

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2007-524341

(P2007-524341A)

(43) 公表日 平成19年8月30日(2007.8.30)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 4
C O 7 K 14/705 (2006.01)	C O 7 K 14/705	4 B O 6 3
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02	4 H O 4 5
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 A	
C 1 2 Q 1/70 (2006.01)	C 1 2 Q 1/70	
審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 148 頁) 最終頁に続く		

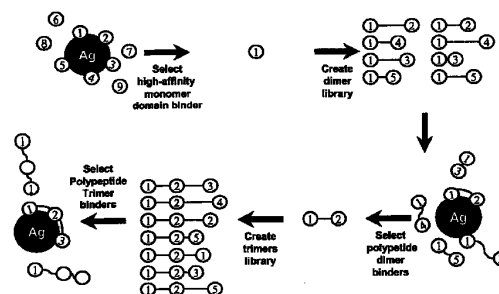
(21) 出願番号 特願2004-551939 (P2004-551939)
 (86) (22) 出願日 平成15年11月6日 (2003.11.6)
 (85) 翻訳文提出日 平成17年6月29日 (2005.6.29)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2003/035664
 (87) 国際公開番号 W02004/044011
 (87) 国際公開日 平成16年5月27日 (2004.5.27)
 (31) 優先権主張番号 10/289,660
 (32) 優先日 平成14年11月6日 (2002.11.6)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 503393179
 アビディア インコーポレイテッド
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 マウ
 ンテン ビュー ベイショア パークウェ
 イ 2 4 5 0
 (74) 代理人 100102978
 弁理士 清水 初志
 (74) 代理人 100128048
 弁理士 新見 浩一
 (72) 発明者 コルクマン ヨースト エイ.
 ベルギー国 ヴォートウェグ シント マ
 ルテンスラーテム 9 8 3 0
 (72) 発明者 スティマー ウィレム ビー. シー.
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 ロス
 ガトス キャシー コート 1 0 8
 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 単量体ドメインの組み合わせライブラリー

(57) 【要約】

所望の特性を有する個別の単量体ドメインおよび免疫ドメインを同定するための方法が提供される。2つまたはそれ以上の選択された個別の単量体ドメイン由来の多量体を生成するための方法もまた、所望の特性を有する多量体を同定するための方法と共に、提供される。個別の単量体および/または免疫ドメイン、選択された単量体および/または免疫ドメイン、多量体および/または選択された多量体を提示して、それらの選択を可能にする提示系もまた、提供される。1つまたは複数のライブラリーメンバーを発現する組成物、ライブラリーおよび細胞もまた、キットおよび組み込み系と共に本発明に含まれる。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

標的分子に結合する多量体を同定する方法であって、
 単量体ドメインおよび / または免疫ドメインのライブラリーを提供することと、
 第一の標的分子への親和性に関して単量体ドメインおよび / または免疫ドメインのライ
 ブラリーをスクリーニングすることと、

少なくとも1個の標的分子に結合する少なくとも1個の単量体ドメインおよび / または免
 疫ドメインを同定することと、

同定された単量体ドメインおよび / または免疫ドメインを単量体ドメインおよび / また
 は免疫ドメインのライブラリーに連結して、それぞれが少なくとも2個の単量体ドメイン
 、免疫ドメインまたはそれらの組み合わせを含む多量体のライブラリーを形成することと
 、

第一の標的分子に結合する能力に関して多量体のライブラリーをスクリーニングするこ
 とと、

第一の標的分子に結合する多量体を同定することと
 を含む方法。

【請求項 2】

単量体ドメインがそれぞれイオンに結合する、請求項1記載の方法。

【請求項 3】

イオンが、カルシウムおよび亜鉛からなる群より選択される、請求項2記載の方法。

【請求項 4】

単量体ドメインが、Aドメイン、EGFドメイン、EFハンド、カドヘリンドメイン、C型レ
 クチン、C2ドメイン、アネキシン、Glaドメイン、トロンプスポンジン3型ドメインおよび
 ジンクフィンガーからなる群より選択される、請求項1記載の方法。

【請求項 5】

単量体ドメインがアミノ酸25～500個である、請求項1記載の方法。

【請求項 6】

単量体ドメインが、以下の配列

$$C_a X_{3-15} C_b X_{3-15} C_c X_{6-7} C_d (D, N) X_4 C_e X_{4-6} DEX_{2-8} C_f$$

(式中、Cがシステインであり、 X_{n-m} が、独立して選択されるアミノ酸の数をnとmとの間
 で表し、かつ(D,N)が、位置がDまたはNであることができることを示し、

C_a-C_c 、 C_b-C_e および C_d-C_f がジスルフィド結合を形成する)
 を含むLDL受容体クラスAドメイン単量体である、請求項1記載の方法。

【請求項 7】

単量体ドメインが、以下の配列

$$C_a X_{6-7} C_b X_{4-5} C_c X_6 C_d X_5 C_e X_{8-10} C_f$$

(式中、Xが、

10

20

30

C	X(6,7)	C	X(4,5)	C	X(6)	C	X(5)	C	X(8,10)	C
X1 X2 X3 X4 X5 X6	X1 X2 X3 X4	X1 X2 X3 X4 X5 X6	X1 X2 X3 X4 X5	X1 X2 X3 X4 X5 X6	X1 X2 X3 X4 X5	X1 X2 X3 X4 X5 X6 X7 X8	X1 X2 X3 X4 X5 X6 X7 X8 X9	X1 X2 X3 X4 X5 X6 X7 X8 X9 X10		
A A A A A A	A A A A	A A A A A A	A A A A	A A A A A A	A A A A	A A A A A A A	A A A A A A A	A A A A A A A A		
D D D D	D D D D	D D D D D E	D D D D	D D D D D E	D D D D D E	D D D D D E E E	D D D D D E E E	D D D D D E E E		
E E E E E	E E E E	E E E E F	E E E E	E E E E F	E E E E F	E E E E F F F	E E E E F F F	E E E E F F F		
F F F F F	F F F F	F F F F G	F F F F	F F F F G	F F F F	F F F F G G G	F F F F G G G	F F F F G G G		
G G G G H	G G G H	G G G G H	G G G H	G G G G H	G G G H	G G G H H H H	G G G H H H H	G G G H H H H		
H H H I I	H H H I	H H H I I	H H H I	H H H I I	H H H I	H H H I I I I	H H H I I I I	H H H I I I I		
I I K K K	I I K K	I I K K K K	I I K K	I I K K K K	I I K K K	I I K K K K K	I I K K K K K	I I K K K K K		
K K L L L	K K L L	K K L L L L	K K L L	K K L L L L	K K L L L	K K L L L M M	K K L L L M M	K K L L L M M		
L L M M M	L L M M	L L M M M M	L L M M	L L M M M M	L L M M M	L L M M M N N	L L M M M N N	L L M M M N N		
M M N N N	M M N N	M M N N N N	M M N N	M M N N N N	M M N N N	M M N N N P P	M M N N N P P	M M N N N P P		
N N P P P	N N P P	N N P P P P	N N P P	N N P P P P	N N P P P	N N P P P Q Q	N N P P P Q Q	N N P P P Q Q		
P P Q Q Q	P P Q Q	P P Q Q Q Q	P P Q Q	P P Q Q Q Q	P P Q Q Q	P P Q Q Q R R	P P Q Q Q R R	P P Q Q Q R R		
Q Q R R R	Q Q R R	Q Q R R R R	Q Q R R	Q Q R R R R	Q Q R R R	Q Q R R R S S	Q Q R R R S S	Q Q R R R S S		
R R S S S	R R S S	R R S S S S	R R S S	R R S S S S	R R S S S	R R S S S T T	R R S S S T T	R R S S S T T		
S S T T T	S S T T	S S T T T T	S S T T	S S T T T T	S S T T T	S S T T T V V	S S T T T V V	S S T T T V V		
T T V V V	T T V V	T T V V V V	T T V V	T T V V V V	T T V V V	T T V V V W W	T T V V V W W	T T V V V W W		
V V W W W	V V W W	V V W W W W	V V W W	V V W W W W	V V W W W	V V W W W Y Y	V V W W W Y Y	V V W W W Y Y		
W Y Y Y Y	W Y Y Y	W Y Y Y Y Y	W Y Y Y	W Y Y Y Y Y	W Y Y Y Y	W Y Y Y Y Y Y	W Y Y Y Y Y Y	W Y Y Y Y Y Y		
Y Y Y Y Y	Y Y Y Y	Y Y Y Y Y Y	Y Y Y Y	Y Y Y Y Y Y	Y Y Y Y Y	Y Y Y Y Y Y Y	Y Y Y Y Y Y Y	Y Y Y Y Y Y Y		

10

20

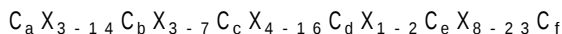
30

のように定義される)

を含むLDL受容体クラスAドメイン単量体である、請求項6記載の方法。

【請求項8】

単量体ドメインが、以下の配列



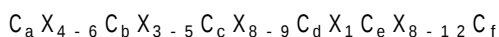
(式中、Cがシステインであり、 X_{n-m} が、独立して選択されるアミノ酸の数をnとmとの間で表し、かつ

C_a-C_c 、 C_b-C_e および C_d-C_f がジスルフィド結合を形成する)

を含むEGFドメイン単量体である、請求項1記載の方法。

【請求項9】

単量体ドメインが、以下の配列



(式中、Xが、

40

X(4,8)				X(3,5)			X(8,9)								X(1)		X(8/12)																		
X1	X2	X3	X4	X1	X2	X3	X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7	X8	X1	X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7	X8	X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7	X8	X9	X10	X11	X12
A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	
D	D	D	E	D	D	E	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	
E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	
F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	
G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	
H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	
I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	
K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	
L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	
M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	
N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	
Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	
R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	
V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V
W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W
Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y

10

20

30

のように定義される)

を含むEGFドメイン単量体である、請求項6記載の方法。

【請求項10】

標的分子が、ウイルス抗原、細菌抗原、真菌抗原、酵素、酵素基質、細胞表面タンパク質、酵素阻害剤、レポーター分子および受容体からなる群より選択される、請求項1記載の方法。

40

【請求項11】

単量体ドメインおよび/または免疫ドメインのライブラリーがファージディスプレイ、リボソームディスプレイまたは細胞表面ディスプレイとして発現している、請求項1記載の方法。

【請求項12】

単量体ドメインおよび/または免疫ドメインのライブラリーがマイクロアレイ上に提示されている、請求項1記載の方法。

【請求項13】

単量体ドメインがジスルフィド結合の形成によって二次構造を形成する、請求項1記載の方法。

50

【請求項 14】

単量体ドメインおよび / または免疫ドメインがポリペプチドリinkerによって連結されている、請求項1記載の方法。

【請求項 15】

請求項1で同定された多量体を含むポリペプチドを生成する方法。

【請求項 16】

組換え遺伝子発現によってポリペプチドを生成する、請求項15記載の方法。

【請求項 17】

請求項1で同定された単量体ドメインを含むポリペプチド。

【請求項 18】

請求項1で同定された単量体ドメインをコードするポリヌクレオチド。

【請求項 19】

標的分子に結合するヒトキメラ単量体ドメインを同定する方法であって、
同じファミリーの単量体ドメインからの少なくとも2個の天然ヒト単量体ドメインの配列アライメントを提供することと、

ヒト単量体ドメインの間で異なる、ヒト単量体ドメイン配列中の対応する位置にあるアミノ酸残基を同定することと、

ヒトキメラ単量体ドメインのライブラリーであって、各ヒトキメラ単量体ドメイン配列が、同じファミリーの単量体ドメインからの2個またはそれ以上の天然ヒト単量体ドメインからの残基とタイプおよび位置において対応するアミノ酸残基からなるライブラリーを作製することと、

標的分子への結合に関してヒトキメラ単量体ドメインをスクリーニングすることと、
標的分子に結合するヒトキメラ単量体ドメインを同定することとを含む方法。

【請求項 20】

天然ヒト単量体ドメインがLDL受容体Aドメイン単量体である、請求項19記載の方法。

【請求項 21】

天然ヒト単量体ドメインがEGF様ドメイン単量体である、請求項19記載の方法。

【請求項 22】

ツーハイブリッドスクリーニング法を使用してライブラリーのスクリーニングを実施する、請求項19記載の方法。

【請求項 23】

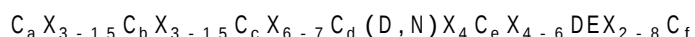
請求項19で同定された多量体を含むポリペプチドを生成する方法。

【請求項 24】

組換え遺伝子発現によってポリペプチドを生成する、請求項24記載の方法。

【請求項 25】

LDL受容体クラスAドメイン単量体を含む非天然ポリペプチドであって、単量体が、以下の配列

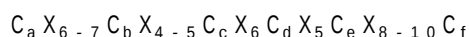


(式中、Cがシステインであり、 X_{n-m} が、独立して選択されるアミノ酸の数をnとmとの間で表し、かつ(D,N)が、位置がDまたはNであることができることを示し、

C_a-C_c 、 C_b-C_e および C_d-C_f がジスルフィド結合を形成する)を含むポリペプチド。

【請求項 26】

単量体ドメインが、以下の配列



(式中、Xが、

10

20

30

40

C		X(6,7)					C		X(4,5)				C		X(6)						C		X(5)					C		X(8,10)										C	
X1	X2	X3	X4	X5	X6	X1	X2	X3	X4	X1	X2	X3	X4	X5	X6	X1	X2	X3	X4	X5	X1	X2	X3	X4	X5	X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7	X8								
A	A	A	A	A	A	A	A			A	A	A	A	A	A						A	A	A			A	A	A			A	A	A								
A	C								A				C																												
D	E	D	D			D	D		D	D	D	D	D	E		D	D	D	D	E	D	D	D	D	E	D	D	D	D		D	D	D								
E	E	E	E		E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	F	E	E	E	E	F	E	E	E	E	F	E	E	E	E		E	E	E								
F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F		F	F	F								
G	H	G	G	H		H	H	H	H	H	H	G	G	G		H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H		H	H	H								
I	I					I			I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I		I	I	I								
K	K	K	K	K	K	K			K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K		K	K	K								
L	L	L	L	L	L	L			L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L		L	L	L								
M	M	M	M	M	M	M			M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M		M	M	M								
N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N		N	N	N								
P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P		P	P	P									
Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q		Q	Q	Q									
R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R		R	R	R									
S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S		S	S	S									
T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T		T	T	T									
V	V	V	V	V	V	V	V		V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V		V	V	V									
W	W	W	W	W	W	W	W		W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W		W	W	W									
Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y		Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y		Y	Y	Y									

C		X(6,7)					C		X(4,5)				C		X(6)						C		X(5)					C		X(8,10)										C	
X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7	X1	X2	X3	X4	X5	X1	X2	X3	X4	X5	X1	X2	X3	X4	X5	X1	X2	X3	X4	X5	X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7	X8							
A	A					A	A	A	A	A	A																														
D	E	D	D	E	D	E	D	E	D	D	D	D	E				D	D	D	D	E	D	D	D	D	E	D	D	D	D		D	D	D							
E	F	F	F	F	F	F	E	F	F	F	F	F	F	F	F	F	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E		E	E	E							
G	H	G	G	H		H	G	G	G	H	G	H	G	H	G	H	G	H	H	H	H	G	G	H	H	H	H	H	H	H		G	G	H							
K		K	K	K	K	K	K	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L		L	L	L								
L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L		L	L	L								
M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M		M	M	M								
N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N		N	N	N								
P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P		P	P	P									
Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q		Q	Q	Q									
R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R		R	R	R									
S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S		S	S	S									
T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T		T	T	T									
V	V	V	V	V	V	V	V		V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V		V	V	V									
W	W	W	W	W	W	W	W		W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W		W	W	W									
Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y		Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y		Y	Y	Y									

C		X(6,7)					C		X(4,5)				C		X(6)						C		X(5)					C		X(8,10)										C	
X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7	X1	X2	X3	X4	X5	X1	X2	X3	X4	X5	X1	X2	X3	X4	X5	X1	X2	X3	X4	X5	X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7	X8							
A	A					A	A	A	A	A	A																														
D	E	D	D	E	D	E	D	E	D	D	D	D	E				D	D	D	D	E	D	D	D	D	E	D	D	D	D		D	D	D							
E	F	F	F	F	F	F	E	F	F	F	F	F	F	F	F	F	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E		E	E	E							
G	H	G	G	H		H	G	G	G	H	G	H	G	H	G	H	G	H	H	H	H	G	G	H	H	H	H	H	H	H		G	G	H							
K		K	K	K	K	K	K	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L		L	L	L								
L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L		L	L	L								
M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M		M	M	M								
N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N		N	N	N								
P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P		P	P	P									
Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q		Q	Q	Q									
R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R		R	R	R									
S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S		S	S	S									
T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T		T	T	T									
V	V	V	V	V	V	V	V		V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V		V	V	V									
W	W	W	W	W	W	W	W		W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W		W	W	W									
Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y		Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y		Y	Y	Y									

C		X(6,7)					C		X(4,5)				C		X(6)						C		X(5)					C		X(8,10)										C	
X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7	X1	X2	X3	X4	X5	X1	X2	X3	X4	X5	X1	X2	X3	X4	X5	X1	X2	X3	X4	X5	X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7	X8							
A	A					A	A	A	A	A	A																														
D	E	D	D	E	D	E	D	E	D	D	D	D	E				D	D	D	D	E	D	D	D	D	E	D	D	D	D		D	D	D							
E	F	F	F	F	F	F	E	F	F	F	F	F	F	F	F	F	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E		E	E	E							
G	H	G	G	H		H	G	G	G	H	G	H	G	H	G	H	G	H	H	H	H	G	G	H	H	H	H	H	H	H		G	G	H							
K		K	K	K	K	K	K	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L		L	L	L								
L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L		L	L	L								
M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M		M	M	M								
N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N		N	N	N								
P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P		P	P	P									
Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q		Q	Q	Q									
R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R		R	R	R									
S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S		S	S	S									
T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T																														

10

20

30

40

50

$$C_a X_{3-14} C_b X_{3-7} C_c X_{4-16} C_d X_{1-2} C_e X_{8-23} C_f$$

(式中、Cがシステインであり、 X_{n-m} が、独立して選択されるアミノ酸の数をnとmとの間で表し、

C_a-C_c 、 C_b-C_e および C_d-C_f がジスルフィド結合を形成する)
を含むポリペプチド。

【請求項32】

単量体ドメインが、以下の配列

$$C_a X_{4-6} C_b X_{3-5} C_c X_{8-9} C_d X_1 C_e X_{8-12} C_f$$

(式中、Xが、

C	X(4,6)	C	X(3,5)	C	X(8,9)	C	X(1)	C	X(8/12)	C
X1 X2 X3 X4	X1 X2 X3	X1 X2 X3 X4 X5 X6 X7 X8	X1	X1 X2 X3 X4 X5 X6 X7 X8						
A A A A	A A	A A A A A A A A	A	A A A A A A A A						
D D D	D D	D D D D D D D	D	D D D D D D D						
E E E	E E	E E E E E E E	E	E E E E E E E						
F F F	F F	F F F F F F F	F	F F F F F F F						
G G G G	G G	G G G G G G G	G	G G G G G G G						
H H H	H H	H H H H H H H	H	H H H H H H H						
I I I	I I	I I I I I I I	I	I I I I I I I						
K K K	K K	K K K K K K K	K	K K K K K K K						
L L L	L L	L L L L L L L	L	L L L L L L L						
M M M	M M	M M M M M M M	M	M M M M M M M						
N N N	N N	N N N N N N N	N	N N N N N N N						
P P P	P P	P P P P P P P	P	P P P P P P P						
Q Q Q	Q Q	Q Q Q Q Q Q Q	Q	Q Q Q Q Q Q Q						
R R R	R R	R R R R R R R	R	R R R R R R R						
S S S	S S	S S S S S S S	S	S S S S S S S						
T T T	T T	T T T T T T T	T	T T T T T T T						
V V V	V V	V V V V V V V	V	V V V V V V V						
W W	W	W W W W W W W	W	W W W W W W W						
Y Y	Y Y	Y Y Y Y Y Y Y	Y	Y Y Y Y Y Y Y						
X1 X2 X3 X4 X5	X1 X2 X3 X4	X1 X2 X3 X4 X5 X6 X7 X8 X9	X1	X1 X2 X3 X4 X5 X6 X7 X8 X9 X10 X11 X12						
A A A A A	A A A A	A A A A A A A A	A	A A A A A A A A A A						
D D D	D D D	D D D D D D D	D	D D D D D D D D D D						
E E E	E E E	E E E E E E E	E	E E E E E E E E E E						
F F F	F F F	F F F F F F F	F	F F F F F F F F F F						
G G G	G G G	G G G G G G G	G	G G G G G G G G G G						
H H H	H H H	H H H H H H H	H	H H H H H H H H H H						
I I I	I I I	I I I I I I I	I	I I I I I I I I I I						
K K K	K K K	K K K K K K K	K	K K K K K K K K K K						
L L L	L L L	L L L L L L L	L	L L L L L L L L L L						
M M M	M M M	M M M M M M M	M	M M M M M M M M M M						
N N N	N N N	N N N N N N N	N	N N N N N N N N N N						
P P P	P P P	P P P P P P P	P	P P P P P P P P P P						
Q Q Q	Q Q Q	Q Q Q Q Q Q Q	Q	Q Q Q Q Q Q Q Q Q Q						
R R R	R R R	R R R R R R R	R	R R R R R R R R R R						
S S S	S S S	S S S S S S S	S	S S S S S S S S S S						
T T T	T T T	T T T T T T T	T	T T T T T T T T T T						
V V V	V V V	V V V V V V V	V	V V V V V V V V V V						
W W	W	W W W W W W W	W	W W W W W W W W W W						
Y Y	Y Y	Y Y Y Y Y Y Y	Y	Y Y Y Y Y Y Y Y Y Y						
X1 X2 X3 X4 X5 X6	X1 X2 X3 X4 X5	X1 X2 X3 X4 X5 X6 X7 X8	X1							
A A A A A A	A A A A A	A A A A A A A	A							
D D D	D D D	D D D D D D D	D							
E E E	E E E	E E E E E E E	E							
F F F	F F F	F F F F F F F	F							
G G G	G G G	G G G G G G G	G							
H H H	H H H	H H H H H H H	H							
I I I	I I I	I I I I I I I	I							
K K K	K K K	K K K K K K K	K							
L L L	L L L	L L L L L L L	L							
M M M	M M M	M M M M M M M	M							
N N N	N N N	N N N N N N N	N							
P P P	P P P	P P P P P P P	P							
Q Q Q	Q Q Q	Q Q Q Q Q Q Q	Q							
R R R	R R R	R R R R R R R	R							
S S S	S S S	S S S S S S S	S							
T T T	T T T	T T T T T T T	T							
V V V	V V V	V V V V V V V	V							
W W	W	W W W W W W W	W							
Y Y	Y Y	Y Y Y Y Y Y Y	Y							

10

20

30

40

のように定義される)

を含むEGFドメイン単量体である、請求項31記載のポリペプチド。

【請求項33】

EGFドメイン単量体が非相同アミノ酸配列に融合している、請求項31記載のポリペプチド。

【請求項34】

単量体が標的分子に結合する、請求項31記載のポリペプチド。

50

【請求項 35】

アミノ酸45個またはそれ以下の長さである、請求項31記載のポリペプチド。

【請求項 36】

非相同アミノ酸配列が、親和性ペプチド、非相同LDL受容体クラスAドメイン、非相同EGFドメイン、精製タグ、酵素およびレポータータンパク質より選択される、請求項33記載のポリペプチド。

【請求項 37】

多数のリガンドへの結合親和性に関して単量体ドメインまたは単量体ドメインを含む多量体のライブラリーをスクリーニングする方法であって、

単量体ドメインまたは単量体ドメインの多量体のライブラリーを多数のリガンドに接触させることと、 10

リガンドの少なくとも1個に結合する単量体ドメインまたは多量体を選択することとを含む方法。

【請求項 38】

i. 単量体ドメインのライブラリーを多数のリガンドに接触させることと、

ii. リガンドの少なくとも1個に結合する単量体ドメインを選択することと、

iii. 選択された単量体ドメインを単量体ドメインのライブラリーに連結して、選択された単量体ドメインおよび第二の単量体ドメインをそれぞれが含む多量体のライブラリーを形成することと、

iv. 多量体のライブラリーを多数のリガンドに接触させて、多量体およびリガンドをそれぞれが含む複数の複合体を形成することと、 20

v. 少なくとも1個の複合体を選択することと

を含む、請求項37記載の方法。

【請求項 39】

選択された複合体の多量体を単量体ドメインまたは多量体のライブラリーに連結して、選択された多量体および少なくとも第三の単量体ドメインをそれぞれが含む多量体の第二のライブラリーを形成することと、

第二の多量体ライブラリーを多数のリガンドに接触させて複数の第二の複合体を形成することと、

少なくとも1個の第二の複合体を選択することと 30

をさらに含む、請求項38記載の方法。

【請求項 40】

リガンドおよび多量体の同一性を決定する、請求項38記載の方法。

【請求項 41】

単量体ドメインのライブラリーを多数のリガンドと接触させる、請求項37記載の方法。

【請求項 42】

多量体のライブラリーを多数のリガンドと接触させる、請求項37記載の方法。

【請求項 43】

多数のリガンドが混合物の状態にある、請求項37記載の方法。

【請求項 44】

多数のリガンドがアレイ状にある、請求項37記載の方法。 40

【請求項 45】

多数のリガンドが細胞または組織の中または上にある、請求項37記載の方法。

【請求項 46】

多数のリガンドが固体支持体上に固定化されている、請求項37記載の方法。

【請求項 47】

リガンドがポリペプチドである、請求項37記載の方法。

【請求項 48】

ポリペプチドがファージの表面で発現している、請求項48記載の方法。

【請求項 49】

単量体ドメインまたは多量体ライブラリーがファージの表面で発現している、請求項37記載の方法。

【請求項50】

単量体ドメインがLDL受容体A型単量体ドメインである、請求項37記載の方法。

【請求項51】

単量体ドメインがEGF単量体ドメインである、請求項37記載の方法。

【請求項52】

多量体のライブラリーがファージの表面に発現してライブラリー発現ファージを形成し、かつリガンドがファージの表面に発現してリガンド発現ファージを形成する方法であって、

10

ライブラリー発現ファージをリガンド発現ファージと接触させてリガンド発現ファージ／ライブラリー発現ファージのペアを形成することと、

ライブラリー発現ファージに結合しないリガンド発現ファージを除去する、またはリガンド発現ファージに結合しないライブラリー発現ファージを除去することと、

リガンド発現ファージ／ライブラリー発現ファージのペアを選択することとを含む、請求項37記載の方法。

【請求項53】

ファージペアからポリヌクレオチドを単離することと、ポリヌクレオチドを増幅して、リガンド発現ファージおよびライブラリー発現ファージからのポリヌクレオチドを含むポリヌクレオチドハイブリッドを産生することとをさらに含む、請求項52記載の方法。

20

【請求項54】

複数のファージペアからポリヌクレオチドハイブリッドを単離して、それにより、ポリヌクレオチドハイブリッドの混合物を形成することを含む、請求項53記載の方法。

【請求項55】

ハイブリッドポリヌクレオチドの混合物を、ポリヌクレオチドハイブリッド形成を可能にする条件下、cDNAライブラリーに接触させて、それにより、ハイブリッドポリヌクレオチドをcDNAライブラリー中のcDNAにハイブリッド形成させることと、

ハイブリッド形成されたハイブリッドポリヌクレオチドのヌクレオチド配列を決定して、それにより、cDNAによってコードされたポリペプチドに特異的に結合する単量体ドメインを同定することと

30

を含む、請求項54記載の方法。

【請求項56】

単量体ドメインライブラリーがファージの表面に発現してライブラリー発現ファージを形成し、かつリガンドがファージの表面に発現してリガンド発現ファージを形成し、かつ選択された複合体が、リガンド発現ファージに結合したライブラリー発現ファージを含む方法であって、

選択された単量体ドメインまたは多量体を第一および第二の部分に分割することと、

第一の部分の単量体ドメインまたは多量体を固体面に連結し、かつファージディスプレイリガンドライブラリーを第一の部分の単量体ドメインまたは多量体に接触させて、第一の部分の単量体ドメインまたは多量体に結合する標的リガンドファージを同定することと

40

、第二の部分の単量体ドメインまたは多量体を表示するファージを細菌に感染させてファージを発現させることと、

標的リガンドファージをこの発現したファージに接触させて、標的リガンドファージおよび単量体ドメインまたは多量体を表示するファージで構成されるファージペアを形成することと

を含む、請求項37記載の方法。

【請求項57】

ファージペアの各ファージからポリヌクレオチドを単離して、それにより、ファージペア中のリガンドに結合する多量体または単量体ドメインを同定することとをさらに含む、請

50

求項56記載の方法。

【請求項58】

ポリヌクレオチドを増幅して、標的リガンドファージおよびライブラリーファージからのポリヌクレオチドを含むポリヌクレオチドハイブリッドを産生することをさらに含む、請求項59記載の方法。

【請求項59】

複数のファージペアからポリヌクレオチドハイブリッドを単離し、かつ増幅して、それにより、ポリヌクレオチドハイブリッドの混合物を形成することを含む、請求項56記載の方法。

【請求項60】

ハイブリッドポリヌクレオチドの混合物を、ハイブリッド形成を可能にする条件下、cDNAライブラリーに接触させて、それにより、ハイブリッドポリヌクレオチドをcDNAライブラリー中のcDNAにハイブリッド形成させることと、

会合したハイブリッドポリヌクレオチドのヌクレオチド配列を決定して、それにより、cDNA会合cDNAによってコードされるリガンドに特異的に結合する単量体ドメインを同定することと

を含む、請求項59記載の方法。

【請求項61】

血液中の分子の血清半減期を増大させる方法であって、

多量体に結合した分子を対象者に投与することを含み、多量体が、

血液成分に特異的に結合する第一の単量体ドメイン、および

分子に特異的に結合する第二の単量体ドメイン

を含む方法。

【請求項62】

血液成分が、ヒト血清アルブミン、赤血球およびIgGからなる群より選択される、請求項61記載の方法。

【請求項63】

第一および第二のドメインがLDL受容体クラスAドメインである、請求項61記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【背景技術】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2002年11月6日出願の米国特許出願第10/289,660号への優先権の利益を主張する。2002年11月6日出願の米国特許出願第10/289,660号は、2002年4月26日出願の米国特許出願第10/133,128号の一部継続出願であり、後者出願は、すべて参照として本明細書に組み入れられる、2002年4月18日出願の米国特許出願第60/374,107号、2001年11月26日出願の米国特許出願第60/333,359号、2001年11月19日出願の米国特許出願第60/337,209号および2001年4月26日出願の米国特許出願第60/286,823号への優先権の利益を主張する。

【0002】

発明の背景

タンパク質配列および三次元構造の解析は、多くのタンパク質が多数の個別の単量体ドメインから構成されることを示してきた。個別の単量体ドメインの大部分は細胞外タンパク質であるか、または膜結合タンパク質の細胞外部分を構成する。

【0003】

個別の単量体ドメインの重要な特性は、独立して、またはいくぶん限定された補助を伴って折り畳まれるその能力である。限定された補助には、シャペロニン（例えば、受容体結合タンパク質（RAP））の補助が含まれ得る。金属イオンの存在もまた、限定された補助を提供する。独立して折り畳まれる能力は、新規なタンパク質環境に挿入された場合に、そのドメインの誤った折り畳みを妨害する。この特性は、個別の単量体ドメインが進化的に移動性であることを可能にしてきた。結果として、個別のドメインは進化の過程で伝

10

20

30

40

50

播し、かつ現在は関連性のない別のタンパク質に存在している。III型フィブロネクチンドメインおよび免疫グロブリン様ドメインを含むいくつかのドメインは、多数のタンパク質中に存在するが、他のドメインは限られた数のタンパク質においてのみ見いだされる。

【0004】

これらのドメインを含むタンパク質は、種々のプロセス（例えば、発生および神経伝達に参与する、細胞輸送体、コレステロールの輸送、シグナル伝達、およびシグナル伝達機能）に参与している。Herz、Lipoprotein receptors: beacon to neurons?, (2001) *Trends in Neurosciences* 24 (4): 193-195; GoldsteinおよびBrown、The Cholesterol Quartet, (2001) *Science* 292: 1310-1312を参照されたい。個別の単量体ドメインの機能はしばしば特異的であるが、それはまた、タンパク質またはポリペプチドの全体の活性に寄与する。例えば、LDL受容体クラスAドメイン（クラスAモジュール、相補型反復、またはAドメインとも呼ばれる）は、ビタミンK依存性血液凝固タンパク質中に見いだされる γ -カルボキシグルタミン酸（Gla）ドメインがリン脂質膜への高親和性結合に参与する一方、リガンド結合に参与する。他の個別の単量体ドメインには、例えば、肝細胞への結合を媒介し、それによって循環からのこのフィブリン溶解性酵素の除去を調節する組織型プラスミノーゲン活性化因子中の上皮成長因子（EGF）様ドメイン、および受容体媒介エンドサイトーシスに参与するLDL受容体の細胞質側テールが挙げられる。

10

【0005】

個々のタンパク質は1つまたは複数の個別の単量体ドメインを有し得る。これらのタンパク質は、しばしばモザイクタンパク質と呼ばれる。例えば、LDL受容体ファミリーのメンバーは、4つの主要な構造的ドメインを含む：システインリッチAドメイン反復、上皮成長因子前駆体様反復、膜貫通ドメイン、および細胞質ドメイン。LDL受容体ファミリーは、1) 細胞表面受容体であるメンバー；2) 細胞外リガンドを認識するメンバー；および3) リソソームによる分解のためにそれらを内在化するメンバーを含む。Hussainら、The Mammalian Low-Density Lipoprotein Receptor Family, (1999) *Annu. Rev. Nutr.* 19:141-72を参照されたい。例えば、いくつかのメンバーには、超低密度リポタンパク質受容体（VLDL-R）、アポリポタンパク質E受容体2、LDLR関連タンパク質（LRP）、およびメガリンが含まれる。ファミリーのメンバーは以下の特徴を有する。1) 細胞表面での発現；2) Aドメイン反復からなる細胞外リガンド結合；3) リガンド結合に対するカルシウムの要求性；4) 受容体結合タンパク質およびアポリポタンパク質（apo）Eの認識；5) YWTD反復（配列番号：198）を含む上皮成長因子（EGF）前駆体相同性ドメイン；6) 単一の膜貫通領域；ならびに7) 種々のリガンドの受容体媒介エンドサイトーシス。Hussain、前記を参照されたい。さらに、これらのメンバーは、構造的に異なるいくつかのリガンドを結合する。

20

30

【0006】

これらの個別の単量体ドメインの所望の特性を生成および最適化するための方法を開発することは利点がある。しかし、個別の単量体ドメインは、しばしば、構造的に保存されているが、特定のアミノ酸（例えば、Aドメインのシステイン残基）を除いては、ヌクレオチドまたはアミノ酸レベルで保存されていない。従って、存在するヌクレオチド組換え方法は、これらの個別の単量体ドメインの所望の特性を生成および最適化することを満たしていない。

40

【0007】

本発明は、これらおよび他の問題に取り組むものである。

【発明の開示】

【0008】

発明の概要

本発明は、標的分子に結合する単量体および多量体を同定する方法を提供する。いくつかの態様において、方法は、単量体ドメインのライブラリーを提供することと、第一の標的分子への親和性に関して単量体ドメインのライブラリーをスクリーニングすることと、少なくとも1個の標的分子に結合する少なくとも1個の単量体ドメインを同定することとを

50

含む。いくつかの態様において、単量体ドメインはそれぞれイオンに結合する。

【0009】

いくつかの態様において、イオンはカルシウムまたは亜鉛より選択される。いくつかの態様において、単量体ドメインは、Aドメイン、EGFドメイン、EFハンド、カドヘリンドメイン、C型レクチン、C2ドメイン、アネキシン、Glaドメイン、トロンボスポンジン3型ドメインおよびジンクフィンガーからなる群より選択される。

【0010】

いくつかの態様において、方法は、単量体ドメインのライブラリーを提供することと、第一の標的分子への親和性に関して単量体ドメインのライブラリーをスクリーニングすることと、少なくとも1個の標的分子に結合する少なくとも1個の単量体ドメインを同定することとを含む。いくつかの態様において、方法はさらに、同定された単量体ドメインを第二の単量体ドメインに連結して、少なくとも2個の単量体ドメインをそれぞれが含む多量体のライブラリーを形成することと、第一の標的分子に結合する能力に関して多量体のライブラリーをスクリーニングすることと、第一の標的分子に結合する多量体を同定することとを含む。

10

【0011】

適当な単量体ドメインは、アミノ酸25～500個、アミノ酸100～150個またはアミノ酸25～50個の長さの単量体ドメインを含む。

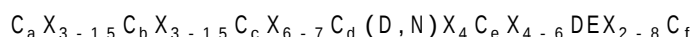
【0012】

いくつかの態様において、選択された多量体の各単量体ドメインは同じ標的分子に結合する。いくつかの態様において、選択された多量体は少なくとも3個の単量体ドメインを含む。いくつかの態様において、選択された多量体は3～10個の単量体ドメインを含む。いくつかの態様において、選択された多量体は4個の単量体ドメインを含む。いくつかの態様において、少なくとも3個の単量体ドメインが同じ標的分子に結合する。

20

【0013】

いくつかの態様において、単量体ドメインは、以下の配列を含むLDL受容体クラスAドメイン単量体である。

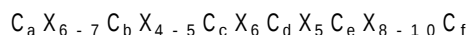


式中、Cはシステインであり、 X_{n-m} は、独立して選択されるアミノ酸の数をnとmとの間で表し、かつ(D,N)は、位置がDまたはNであることができることを示し、 C_a-C_c 、 C_b-C_e および C_d-C_f はジスルフィド結合を形成する。

30

【0014】

いくつかの態様において、単量体ドメインは、以下の配列を含むLDL受容体クラスAドメイン単量体である。



式中、Xは以下のように定義される。

C	X(6,7)						C	X(4,5)				C	X(8)						C	X(5)					C	X(8,10)										C
	X1	X2	X3	X4	X5	X6		X1	X2	X3	X4		X1	X2	X3	X4	X5	X6		X1	X2	X3	X4	X5		X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7	X8			
	A	A	A	A	A			A	A				A	A	A	A	A			A	A	A				A	A	A		A	A					
	C							C					C							C						C										
	D	D	D	D				D	D	D	D		D	D	D	D				D	D	D	D			D	D	D		D	D					
	E	E	E	E		E		E	E	E	E		E	E	E	E				E	E	E	E			E	E	E		E	E					
	F	F	F	F	F	F		F	F	F	F		F	F	F	F				F	F	F	F			F	F	F		F	F					
	G	G	G	G				G	G	G	G		G	G	G	G				G	G	G	G			G	G	G		G	G					
	H	H	H	H	H	H		H	H	H	H		H	H	H	H				H	H	H	H			H	H	H		H	H					
	I							I					I							I						I				I						
	K	K	K	K	K	K		K	K	K	K		K	K	K	K				K	K	K			K	K	K		K	K						
	L	L	L	L	L	L		L	L	L	L		L	L	L	L				L	L	L			L	L	L		L	L						
	M	M		M	M	M		M		M	M		M	M	M	M				M	M	M			M	M	M		M	M						
	N	N	N	N	N	N		N	N	N	N		N	N	N	N				N	N	N	N			N	N	N		N	N					
	P	P	P			P		P					P							P						P				P						
	Q	Q	Q	Q	Q	Q		Q	Q	Q	Q		Q	Q	Q	Q				Q	Q	Q	Q			Q	Q	Q		Q	Q					
	R	R	R	R	R	R		R	R	R	R		R	R	R	R				R	R	R	R			R	R	R		R	R					
	S	S	S	S	S	S		S	S	S	S		S	S	S	S				S	S	S	S			S	S	S		S	S					
	T	T	T	T	T	T		T	T	T	T		T	T	T	T				T	T	T	T			T	T	T		T	T					
	V	V	V		V	V		V	V		V		V	V	V	V				V	V	V			V	V		V	V							
	W	W		W				W		W	W		W	W	W	W				W	W	W			W	W		W	W							
	Y	Y	Y	Y				Y	Y				Y	Y	Y	Y				Y	Y				Y	Y		Y								

10

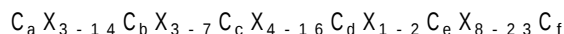
20

30

いくつかの態様において、LDL受容体クラスAドメイン単量体はそれぞれ配列番号：201を含む。

【0015】

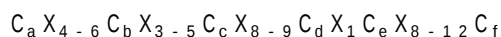
いくつかの態様において、単量体ドメインは、以下の配列を含むEGFドメイン単量体である。



式中、Cはシステインであり、 X_{n-m} は、独立して選択されるアミノ酸の数をnとmとの間で表し、 C_a-C_c 、 C_b-C_e および C_d-C_f はジスルフィド結合を形成する。

【0016】

いくつかの態様において、単量体ドメインは、以下の配列を含むEGFドメイン単量体である。



式中、Xは以下のように定義される。

40

30

40

50

いくつかの態様において、本発明の方法は、単量体ドメイン単独の結合活性と比較して、同じ標的分子について、標的に対する結合活性の改善を有する多量体を同定する工程を包含する。いくつかの態様において、多量体の結合活性は、単量体ドメイン単独の結合活性の少なくとも2倍である。

いくつかの態様において、単量体ドメインのライブラリーのスクリーニングおよび単量体ドメインの同定は同時に行われる。いくつかの態様において、多量体のライブラリーのスクリーニングおよび多量体の同定は同時に行われる。

【0020】

いくつかの態様において、ポリペプチドドメインは、EGF様ドメイン、クリングル（Kri
ngle）ドメイン、I型フィブロネクチンドメイン、II型フィブロネクチンドメイン、III型
フィブロネクチンドメイン、PANDドメイン、Glaドメイン、SRCRドメイン、クニッツ（Kuni
tz）/ウシ膀胱トリプシンインヒビタードメイン、カザル（Kazal）型セリンプロテアーゼ
インヒビタードメイン、トレフォイル（Trefoil）（P型）ドメイン、C型フォンウィルブ
ランド（von Willebrand）因子ドメイン、アナフィラトキシン様ドメイン、CUBドメイン
、I型サイログロブリン反復、LDL受容体クラスAドメイン、スシ（Sushi）ドメイン、リン
ク（Link）ドメイン、I型トロンプスポンジンドメイン、免疫グロブリン様ドメイン、C型
レクチンドメイン、MAMドメイン、A型フォンウィルブランド因子ドメイン、ソマトメジン
Bドメイン、WAP型4ジスルフィドコアドメイン、C型F5/8ドメイン、ヘモペキシンドメイン
、SH2ドメイン、SH3ドメイン、ラミニン型EGF様ドメイン、およびC2ドメインからなる群
より選択される。

【0021】

いくつかの態様において、本発明の方法は、少なくとも1つの単量体ドメインを変異さ
せ、それによって変異した単量体ドメインを含有するライブラリーを提供する工程をさら
に包含する。いくつかの態様において、この変異工程は、単量体ドメインをコードする少
なくとも1つのポリヌクレオチドの、複数のポリヌクレオチド断片を組換える工程を包含
する。いくつかの態様において、この変異工程は方向付けられた進化を含む。いくつかの
態様において、この変異工程は部位特異的変異誘発を含む。いくつかの態様において、突
然変異工程は、異なるループ配列を組み合わせることを含む。いくつかの態様において、突
然変異工程は、部位特異的突然変異誘発を含む。いくつかの態様において、突然変異工
程は、部位特異的組換えを実施して、ヒト配列と同一である配列を生成する交叉を生成す
ることを含む。

【0022】

いくつかの態様において、本発明の方法は、第2の標的分子に対する親和性について単
量体ドメインのライブラリーをスクリーニングする工程；第2の標的分子に結合する、単
量体ドメインを同定する工程；第1の標的分子についての親和性を有する少なくとも1つの
単量体ドメインを、第2の標的分子についての親和性を有する少なくとも1つの単量体ドメ
インと連結して、それによって多量体のライブラリーを形成する工程；第1の標的分子お
よび第2の標的分子に結合する能力について多量体のライブラリーをスクリーニングする
工程；ならびに、第1の標的分子および第2の標的分子に結合する多量体を同定し、それ
によって第1の標的分子および第2の標的分子を特異的に結合する多量体を同定する工程、を
さらに包含する。

【0023】

本発明はまた、上記方法にしたがって同定された単量体ドメインおよび多量体を含むポ
リペプチドを生成する方法を提供する。いくつかの態様において、単量体ドメインまたは
多量体は組換え遺伝子発現によって生成される。

【0024】

本発明の特定の方法は、単量体ドメインの第2のライブラリーを提供する工程；少なく
とも第2の標的分子に対する親和性について単量体ドメインの第2のライブラリーをスクリ
ーニングする工程；第2の標的分子に結合する第2の単量体ドメインを同定する工程；第1
の標的分子または第2の標的分子に結合する同定された単量体ドメインを連結し、それ
によって多量体のライブラリーを形成する工程；第1の標的分子および第2の標的分子に結合
する能力について、多量体のライブラリーをスクリーニングする工程；ならびに、第1の
標的分子および第2の標的分子に結合する多量体を同定する工程、をさらに包含する。

【0025】

いくつかの態様において、標的分子は、ウイルス抗原、細菌抗原、真菌抗原、酵素、細
胞表面タンパク質、酵素阻害剤、レポーター分子、血清タンパク質、血清タンパク質、お
よび受容体からなる群より選択される。いくつかの態様において、ウイルス抗原は、ウイ

ルス複製に必要とされるポリペプチドである。いくつかの態様において、第1の標的分子および少なくとも第2の標的分子は、同じウイルス複製系の異なる成分である。いくつかの態様において、選択された多量体は同じウイルスの少なくとも2つの血清型に結合する。

【0026】

いくつかの態様において、単量体ドメインのライブラリーは、ファージディスプレイ、リボソームディスプレイ、ポリソームディスプレイ、または細胞表面ディスプレイとして発現される。いくつかの態様において、単量体ドメインのライブラリーは、マイクロアレイ上に提示される。

【0027】

いくつかの態様において、単量体ドメインはポリペプチドリンカーによって連結される。いくつかの態様において、ポリペプチドリンカーは単量体ドメインと天然に結合しているリンカーである。いくつかの態様において、ポリペプチドリンカーは、単量体ドメインと天然に結合しているリンカーの改変体である。いくつかの態様において、連結工程は、単量体ドメインを異なる長さおよび組成の種々のリンカーと連結させることを含む

【0028】

いくつかの態様において、これらのドメインはジスルフィド結合の形成により二次構造を形成する。いくつかの態様において、多量体は、ポリペプチドリンカーによって単量体ドメインに連結されているAドメインを含む。いくつかの態様において、リンカーは1~20アミノ酸である。いくつかの態様において、リンカーは5~7アミノ酸で作製される。いくつかの態様において、リンカーは6アミノ酸の長さである。いくつかの態様において、リンカーは、以下の配列 $A_1A_2A_3A_4A_5A_6$ （配列番号：244）を含み、ここで、 A_1 はアミノ酸A、P、T、Q、E、およびKより選択され； A_2 および A_3 はC、F、Y、W、またはM以外の任意のアミノ酸であり； A_4 はアミノ酸S、G、およびRより選択され； A_5 はアミノ酸H、P、およびRより選択され； A_6 はアミノ酸Tである。いくつかの態様において、リンカーは、第1のAドメインのC末端システインと第2のAドメインのN末端システインとの間の天然に存在する配列を含む。

【0029】

いくつかの態様において、多量体は、ポリペプチドリンカーによって単量体ドメインに連結されたC2ドメインを含む。いくつかの態様において、各C2単量体ドメインは、少なくとも1つのアミノ酸残基の、ループ領域を構成する部分が、別のアミノ酸残基で置き換わっているという点；少なくとも1つのアミノ酸残基の、ループ領域を構成する部分が欠失しているという点、および/または少なくとも1つのアミノ酸残基が、少なくとも1つのループ領域に挿入されているという点で、対応する野生型C2単量体ドメインと異なる。いくつかの態様において、C2ドメインは、ループ領域1、ループ領域2、およびループ領域3を含み、ループ領域1、ループ領域2、およびループ領域3の外側のアミノ酸配列は、ポリペプチド多量体に存在するすべてのC2単量体ドメインについて同一である。これらのいくつかの態様において、リンカーの長さは1~20アミノ酸残基である。いくつかの態様において、リンカーの長さは10~12アミノ酸残基である。いくつかの態様において、リンカーの長さは11アミノ酸残基である。

【0030】

本発明はまた、上記のように選択された多量体または単量体のドメインを含むポリペプチドを提供する。

【0031】

本発明はまた、上記のように選択された多量体または単量体のドメインをコードするポリヌクレオチドを提供する。

【0032】

本発明はまた、上記のように形成された多量体または単量体のドメインのライブラリーを提供する。

【0033】

10

20

30

40

50

本発明はまた、少なくとも1つの標的分子に結合する多量体を同定するための方法を提供し、この方法は、多量体のライブラリーを提供する工程、ここで各多量体は少なくとも2つの単量体ドメインを含み、各単量体ドメインは標的分子についての結合特異性を示す；および、標的分子結合多量体についての多量体のライブラリーをスクリーニングする工程を包含する。いくつかの態様において、この方法は、標的分子についての単一の単量体ドメインの結合活性よりも大きい、標的分子についての結合活性を有する標的分子結合多量体を同定する工程をさらに包含する。いくつかの態様において、1つまたは複数の多量体は、第2の標的分子に特異的に結合する単量体ドメインを含む。

【0034】

標的分子に結合する多量体を同定する別の方法としては、単量体ドメインおよび/または免疫ドメインのライブラリーを提供することと、第一の標的分子への親和性に関して単量体ドメインおよび/または免疫ドメインのライブラリーをスクリーニングすることと、少なくとも1個の標的分子に結合する少なくとも1個の単量体ドメインおよび/または免疫ドメインを同定することと、同定された単量体ドメインおよび/または免疫ドメインを単量体ドメインおよび/または免疫ドメインのライブラリーに連結して、少なくとも2個の単量体ドメイン、免疫ドメインまたはそれらの組み合わせをそれぞれが含む多量体のライブラリーを形成することと、第一の標的分子に結合する能力に関して多量体のライブラリーをスクリーニングすることと、第一の標的分子に結合する多量体を同定することとを含む方法がある。

10

【0035】

いくつかの態様において、単量体ドメインはそれぞれイオンに結合する。いくつかの態様において、イオンは、カルシウムおよび亜鉛からなる群より選択される。いくつかの態様において、単量体ドメインは、Aドメイン、EGFドメイン、EFハンド、カドヘリンドメイン、C型レクチン、C2ドメイン、アネキシン、Glaドメイン、トロンボスポンジン3型ドメインおよびジンクフィンガーからなる群より選択される。

20

【0036】

本発明はまた、多量体のライブラリーを提供する。いくつかの態様において、各多量体は、リンカーによって接続された少なくとも2個の単量体ドメインを含み、各単量体ドメインが、標的分子に対する結合特異性を示し、各単量体ドメインが非天然単量体ドメインである。いくつかの態様において、各多量体は、リンカーによって接続された少なくとも2個の単量体ドメインを含み、各単量体ドメインがイオンに結合する。

30

【0037】

いくつかの態様において、イオンはカルシウムおよび亜鉛より選択される。いくつかの態様において、ポリペプチドドメインは、Aドメイン、EGFドメイン、EFハンド、カドヘリンドメイン、C型レクチン、C2ドメイン、アネキシン、Glaドメイン、トロンボスポンジン3型ドメインおよびジンクフィンガーからなる群より選択される。

【0038】

いくつかの態様において、リンカーは少なくとも3個のアミノ酸残基を含む。いくつかの態様において、リンカーは少なくとも6個のアミノ酸残基を含む。いくつかの態様において、リンカーは少なくとも10個のアミノ酸残基を含む。

40

【0039】

本発明はまた、非相同リンカー配列によって分けられた少なくとも2個の単量体ドメインを含むポリペプチドを提供する。いくつかの態様において、各単量体ドメインは標的分子に特異的に結合し、各単量体ドメインは非天然タンパク質単量体ドメインである。いくつかの態様において、各単量体ドメインはイオンに結合する。

【0040】

いくつかの態様において、イオンはカルシウムおよび亜鉛より選択される。いくつかの態様において、単量体ドメインは、Aドメイン、EGFドメイン、EFハンド、カドヘリンドメイン、C型レクチン、C2ドメイン、アネキシン、Glaドメイン、トロンボスポンジン3型ドメインおよびジンクフィンガーからなる群より選択される。

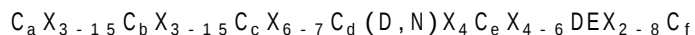
50

【 0 0 4 1 】

いくつかの態様において、ポリペプチドは、第一の標的分子に結合する第一の単量体ドメインおよび第二の標的分子に結合する第二の単量体ドメインを含む。いくつかの態様において、ポリペプチドは2個の単量体ドメインを含み、各単量体ドメインが、同じ標的分子上の異なる部位に対して特異的である結合特異性を有する。いくつかの態様において、ポリペプチドはさらに、第二の標的分子に対する結合特異性を有する単量体ドメインを含む。

【 0 0 4 2 】

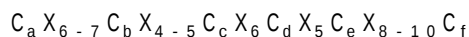
いくつかの態様において、単量体ドメインは、以下の配列を含むLDL受容体クラスAドメイン単量体である。



式中、Cはシステインであり、 X_{n-m} は、独立して選択されるアミノ酸の数をnとmとの間で表し、かつ(D,N)は、位置がDまたはNであることができることを示し、かつ C_a-C_c 、 C_b-C_e および C_d-C_f はジスルフィド結合を形成する。

【 0 0 4 3 】

いくつかの態様において、単量体ドメインは、以下の配列を含むLDL受容体クラスAドメイン単量体である。



式中、Xは以下のように定義される。

C	X(6,7)	C	X(4,5)	C	X(6)	C	X(5)	C	X(8,10)	C
X1 X2 X3 X4 X5 X6	X1 X2 X3 X4	X1 X2 X3 X4 X5 X6	X1 X2 X3 X4 X5	X1 X2 X3 X4 X5 X6	X1 X2 X3 X4 X5	X1 X2 X3 X4 X5 X6 X7 X8		X1 X2 X3 X4 X5 X6 X7 X8 X9		
A A A A A A	A A A C	A A A A A A	A A A	A A A	A A A	A A A A A A		A A A A A A		
D D D D E	D D D D	D D D D E	D D D D E	D D D D E	D D D D E	D D D D D D		D D D D D D		
E E E F F	E E F	E E F F F F	E E F F F F	E E F F F F	E E F F F F	E E F F F F		E E F F F F		
G G G G H H	G G G G H	G G G G H H	G G G G H	G G G G H	G G G G H	G G G G H H		G G G G H H		
H H H I I	H H H I	H H H I I	H H H I	H H H I	H H H I	H H H I I		H H H I I		
K K K K L L	K K L L	K K K K L L	K K K K L L	K K K K L L	K K K K L L	K K K K L L		K K K K L L		
L L L M M M	L L M	L L L M M M	L L L M M M	L L L M M M	L L L M M M	L L L M M M		L L L M M M		
M M N N P P	M M N N	M M N N P P	M M N N P P	M M N N P P	M M N N P P	M M N N P P		M M N N P P		
N N P Q Q Q	N N Q Q	N N P Q Q Q	N N P Q Q Q	N N P Q Q Q	N N P Q Q Q	N N P Q Q Q		N N P Q Q Q		
P Q R R S S	P Q R R S	P Q R R S S	P Q R R S S	P Q R R S S	P Q R R S S	P Q R R S S		P Q R R S S		
Q R R S S T	Q R R S T	Q R R S S T	Q R R S S T	Q R R S S T	Q R R S S T	Q R R S S T		Q R R S S T		
R S S T T V	R S S T V	R S S T T V	R S S T T V	R S S T T V	R S S T T V	R S S T T V		R S S T T V		
S T T V W Y	S T T V	S T T V W Y	S T T V W Y	S T T V W Y	S T T V W Y	S T T V W Y		S T T V W Y		
T V W Y Y	T V Y	T V W Y Y	T V W Y Y	T V W Y Y	T V W Y Y	T V W Y Y		T V W Y Y		
V W Y Y	V Y	V W Y Y	V W Y Y	V W Y Y	V W Y Y	V W Y Y		V W Y Y		
W Y Y	W	W Y Y	W Y Y	W Y Y	W Y Y	W Y Y		W Y Y		
X X X X X X X	X X X X	X X X X X X X	X X X X X X X	X X X X X X X	X X X X X X X	X X X X X X X		X X X X X X X		
A A A A A A	A A A A	A A A A A A	A A A A	A A A A	A A A A	A A A A A A		A A A A A A		
D D D D E	D D D D	D D D D E	D D D D	D D D D E	D D D D E	D D D D D D		D D D D D D		
E E F F G	E E F	E E F F G	E E F F G	E E F F G	E E F F G	E E F F G		E E F F G		
G G G H H	G G H H	G G G H H	G G H H	G G G H H	G G G H H	G G G H H		G G G H H		
H H I I K L	H H I I K	H H I I K L	H H I I K	H H I I K L	H H I I K L	H H I I K L		H H I I K L		
K L L M M	K L L	K L L M M	K L L M	K L L M M	K L L M M	K L L M M		K L L M M		
L M N N P P	L M N N	L M N N P P	L M N N	L M N N P P	L M N N P P	L M N N P P		L M N N P P		
M N P Q R	M N P Q	M N P Q R	M N P Q	M N P Q R	M N P Q R	M N P Q R		M N P Q R		
N P Q R S	N P Q R	N P Q R S	N P Q R	N P Q R S	N P Q R S	N P Q R S		N P Q R S		
P Q R S T	P Q R S	P Q R S T	P Q R S	P Q R S T	P Q R S T	P Q R S T		P Q R S T		
Q R S T V	Q R S T	Q R S T V	Q R S T	Q R S T V	Q R S T V	Q R S T V		Q R S T V		
R S T V W	R S T V	R S T V W	R S T V	R S T V W	R S T V W	R S T V W		R S T V W		
S T V W Y	S T V	S T V W Y	S T V W	S T V W Y	S T V W Y	S T V W Y		S T V W Y		
T V W Y	T V	T V W Y	T V W	T V W Y	T V W Y	T V W Y		T V W Y		
V W Y	V	V W Y	V W	V W Y	V W Y	V W Y		V W Y		
W Y	W	W Y	W	W Y	W Y	W Y		W Y		
X X X X X X X X X	X X X X X X X	X X X X X X X X X	X X X X X X X X X	X X X X X X X X X	X X X X X X X X X	X X X X X X X X X		X X X X X X X X X		
A A A A A A A	A A A A A	A A A A A A A	A A A A A	A A A A A A A	A A A A A A A	A A A A A A A		A A A A A A A		
D D D D E	D D D D	D D D D E	D D D D	D D D D E	D D D D E	D D D D D D		D D D D D D		
E E F F G	E E F	E E F F G	E E F	E E F F G	E E F F G	E E F F G		E E F F G		
G G H I K L	G G H I K	G G H I K L	G G H I K	G G H I K L	G G H I K L	G G H I K L		G G H I K L		
H I K L M	H I K L	H I K L M	H I K L	H I K L M	H I K L M	H I K L M		H I K L M		
K L M N P	K L M N	K L M N P	K L M N	K L M N P	K L M N P	K L M N P		K L M N P		
L M N P Q	L M N P	L M N P Q	L M N P	L M N P Q	L M N P Q	L M N P Q		L M N P Q		
M N P Q R	M N P Q	M N P Q R	M N P Q	M N P Q R	M N P Q R	M N P Q R		M N P Q R		
N P Q R S	N P Q R	N P Q R S	N P Q R	N P Q R S	N P Q R S	N P Q R S		N P Q R S		
P Q R S T	P Q R S	P Q R S T	P Q R S	P Q R S T	P Q R S T	P Q R S T		P Q R S T		
Q R S T V	Q R S T	Q R S T V	Q R S T	Q R S T V	Q R S T V	Q R S T V		Q R S T V		
R S T V W	R S T V	R S T V W	R S T V	R S T V W	R S T V W	R S T V W		R S T V W		
S T V W Y	S T V	S T V W Y	S T V W	S T V W Y	S T V W Y	S T V W Y		S T V W Y		
T V W Y	T V	T V W Y	T V W	T V W Y	T V W Y	T V W Y		T V W Y		
V W Y	V	V W Y	V W	V W Y	V W Y	V W Y		V W Y		
W Y	W	W Y	W	W Y	W Y	W Y		W Y		

10

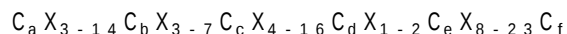
20

30

いくつかの態様において、LDL受容体クラスAドメイン単量体はそれぞれ配列番号：201を含む。

【0044】

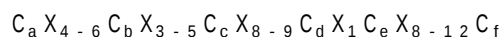
いくつかの態様において、単量体ドメインは、以下の配列を含むEGFドメイン単量体である。



式中、Cはシステインであり、 X_{n-m} は、独立して選択されるアミノ酸の数をnとmとの間で表し、 C_a-C_c 、 C_b-C_e および C_d-C_f はジスルフィド結合を形成する。

【0045】

いくつかの態様において、単量体ドメインは、以下の配列を含むEGFドメイン単量体である。



式中、Xは以下のように定義される。

40

C X(4,6)					C X(3,5)			C X(8,9)							C X(1) C		X(8/12)								C		
X1	X2	X3	X4	X5	X1	X2	X3	X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7	X8	X1	X2	X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7	X8	X1	X2
A	A	A	A		A		A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
D	D	E	D		D		D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
E	E	E	E		E		E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E
F	F	G	G	G	F	F	G	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F
G	G	G	G		G		G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
H	H	H	H		H		H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H
I	I	K	K		I		K	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
K	K	L	L		K		L	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K
L	L	L	L	M	L		L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L
M	M	N	N	N	M		N	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M
N	N	P	P	P	N		P	N	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
P	P	Q	Q	Q	P		Q	P	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q
Q	Q	R	R	R	Q		R	Q	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
R	R	S	S	S	R		S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
S	S	T	T	T	S		T	S	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
T	T	V	V	V	T		V	T	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V
V	V	W	W		V		W	V	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W
W	W	Y	Y		W		Y	W	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
Y	Y				Y			Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y

10

20

30

40

50

【 0 0 4 6 】

いくつかの態様において、ライブラリー、多量体またはポリペプチドの単量体ドメインは、互いに通常は約40%同一であり、普通は約50%同一であり、ときには約60%同一であり、しばしば少なくとも70%同一である。

【 0 0 4 7 】

本発明はまた、上記ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを提供する。

【 0 0 4 8 】

本発明はまた、標的分子についての結合特異性を有する免疫ドメインの多量体、ならびに、所望の標的分子に結合するためのこのような多量体のライブラリーを生成およびスクリーニングする方法を提供する。より詳細には、本発明は、標的分子に結合する多量体を同定するための方法を提供し、この方法は、免疫ドメインのライブラリーを提供する工程；第1の標的分子に対する親和性について免疫ドメインのライブラリーをスクリーニングする工程；少なくとも1つの標的分子に結合する1つまたは複数（例えば、2つまたはそれ以上）の免疫ドメインを同定する工程；同定した単量体ドメインを連結して多量体のライブラリーを形成する工程、ここで各多量体は、少なくとも3つの免疫ドメイン（例えば、4つまたはそれ以上、5つまたはそれ以上、6つまたはそれ以上など）を含む；第1の標的分

子に結合する能力について多量体のライブラリーをスクリーニングする工程；および第1の標的分子に結合する多量体を同定する工程、を包含する。ミニボディー、単ドメイン抗体、Fab、またはこれらの組み合わせである、少なくとも2つの免疫ドメインの多量体のライブラリーはまた、本発明の実施において使用される。このようなライブラリーは、本明細書中に記載された本発明の方法と共に、所望の標的分子に結合する多量体について容易にスクリーニングされ得る。

【0049】

本発明はさらに、標的分子に結合するヘテロ免疫多量体を同定するための方法を提供する。いくつかの態様において、この方法は、免疫ドメインのライブラリーを提供する工程；第1の標的分子に対する親和性について免疫ドメインのライブラリーをスクリーニングする工程；単量体ドメインのライブラリーを提供する工程；第1の標的分子に対する親和性について単量体ドメインのライブラリーをスクリーニングする工程；少なくとも1つの標的分子に結合する少なくとも1つの免疫ドメインを同定する工程；少なくとも1つの標的分子に結合する少なくとも1つの単量体ドメインを同定する工程；同定した免疫ドメインと同定した単量体ドメインを連結して多量体のライブラリーを形成する工程、ここで各多量体は、少なくとも2つのドメインを含む；第1の標的分子に結合する能力について多量体のライブラリーをスクリーニングする工程；および、第1の標的分子に結合する多量体を同定する工程、を包含する。

10

【0050】

本発明はまた、標的分子に結合するLDL受容体クラスA単量体ドメインを同定する方法を提供する。いくつかの態様において、方法は、LDL受容体クラスA単量体ドメインのライブラリーを提供することと、標的分子への親和性に関してLDL受容体クラスA単量体ドメインのライブラリーをスクリーニングすることと、標的分子に結合するLDL受容体クラスA単量体ドメインを同定することとを含む。

20

【0051】

いくつかの態様において、方法は、LDL受容体クラスA単量体のライブラリーの各メンバーを同定された単量体ドメインに連結して多量体のライブラリーを形成することと、標的分子への親和性に関して多量体のライブラリーをスクリーニングすることと、標的分子に結合する多量体を同定することとを含む。いくつかの態様において、多量体は、単量体よりも大きな親和性で標的に結合する。いくつかの態様において、方法はさらに、ファージディスプレイ、リボソームディスプレイ、ポリソームディスプレイまたは細胞表面ディスプレイからなる群より選択されるディスプレイフォーマットを使用してライブラリーを発現させることを含む。

30

【0052】

いくつかの態様において、方法はさらに、少なくとも1個の単量体ドメインを突然変異させて、それにより、突然変異LDL受容体クラスA単量体ドメインを含むライブラリーを提供する工程を含む。いくつかの態様において、突然変異工程は定方向進化を含む。いくつかの態様において、突然変異工程は部位特異的突然変異誘発を含む。

【0053】

本発明はまた、LDL受容体クラスA単量体ドメインのライブラリーを提供することと、標的分子への親和性に関してLDL受容体クラスA単量体ドメインのライブラリーをスクリーニングすることと、標的分子に結合するLDL受容体クラスA単量体ドメインを同定することとを含む方法で同定された多量体を含むポリペプチドを生成する方法を提供する。いくつかの態様において、多量体は組換え遺伝子発現によって生成される。

40

【0054】

本発明はまた、ヒトLDL受容体Aドメインに由来するキメラLDL受容体Aドメイン単量体のライブラリーを生成する方法を提供する。いくつかの態様において、方法は、ヒトLDL受容体Aドメインの二つの異なる天然変異体それぞれからの少なくとも1個のループに対応する、ポリヌクレオチドまたはポリペプチド配列であるループ配列を提供することと、ループ配列を共有結合的に組み合わせて、少なくとも2個のループを有するキメラLDL受容体A

50

ドメイン単量体を各キメラ配列がコードするキメラ単量体ドメイン配列のライブラリーを生成することと、ファージディスプレイ、リボソームディスプレイ、ポリソームディスプレイおよび細胞表面ディスプレイからなる群より選択されるディスプレイフォーマットを使用してキメラLDL受容体Aドメイン単量体のライブラリーを発現させることと、標的分子への結合に関して発現したキメラLDL受容体Aドメイン単量体ライブラリーをスクリーニングすることと、標的分子に結合するキメラLDL受容体Aドメイン単量体を同定することとを含む。

【0055】

いくつかの態様において、方法はさらに、同定されたキメラLDL受容体Aドメイン単量体ドメインをキメラLDL受容体Aドメイン単量体のライブラリーの各メンバーに連結して多量体のライブラリーを形成することと、増大した親和性で第一の標的分子に結合する能力に関して多量体のライブラリーをスクリーニングすることと、増大した親和性で第一の標的分子に結合するキメラLDL受容体Aドメイン単量体の多量体を同定することとを含む。

10

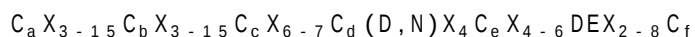
【0056】

本発明はまた、ヒトLDL受容体Aドメインの二つの異なる天然変異体それぞれからの少なくとも1個のループに対応する、ポリヌクレオチドまたはポリペプチド配列であるループ配列を提供することと、ループ配列を共有結合的に組み合わせて、少なくとも2個のループを有するキメラLDL受容体Aドメイン単量体を各キメラ配列がコードするキメラ単量体ドメイン配列のライブラリーを生成することと、ファージディスプレイ、リボソームディスプレイ、ポリソームディスプレイおよび細胞表面ディスプレイからなる群より選択されるディスプレイフォーマットを使用してキメラLDL受容体Aドメイン単量体のライブラリーを発現させることと、標的分子への結合に関して発現したキメラLDL受容体Aドメイン単量体ライブラリーをスクリーニングすることと、標的分子に結合するキメラLDL受容体Aドメイン単量体を同定することとを含む方法で同定されたキメラLDL受容体Aドメイン単量体を生成する方法を提供する。いくつかの態様において、キメラLDL受容体Aドメイン単量体は組換え遺伝子発現によって生成される。

20

【0057】

本発明はまた、LDL受容体クラスAドメイン単量体を含む非天然ポリペプチドであって、単量体が以下の配列を含むポリペプチドを提供する。

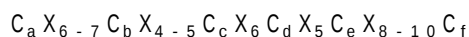


30

式中、Cはシステインであり、 X_{n-m} は、独立して選択されるアミノ酸の数をnとmとの間で表し、かつ(D,N)は、位置がDまたはNであることができることを示し、 C_a-C_c 、 C_b-C_e および C_d-C_f はジスルフィド結合を形成する。

【0058】

いくつかの態様において、単量体ドメインは、以下の配列を含むLDL受容体クラスAドメイン単量体である。



式中、Xは以下のように定義される。

C	X(6,7)						C	X(4,5)				C	X(6)						C	X(5)					C	X(8,10)										C
	X1	X2	X3	X4	X5	X6		X1	X2	X3	X4		X1	X2	X3	X4	X5	X6		X1	X2	X3	X4	X5		X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7	X8	X9	X10	
	A	A	A	A	A	A		A	A				A	A	A	A	A	A		A	A	A				A	A	A								
	D	D	D	D				D	D				D	D	D	D	D			D	D	D				D	D			D	D					
	E	E	E	E		E		E	E				E	E	E	E	E			E	E	E				E	E			E	E					
	F	F	F	F		F		F	F				F	F	F	F	F			F	F	F				F	F			F	F					
	G	G	G	G				G	G				G	G	G	G				G	G	G				G	G			G	G					
	H	H	H	H		H		H	H				H	H	H	H				H	H	H				H	H			H	H					
	I					I		I					I							I						I				I						
	K	K	K	K		K		K	K				K	K	K	K	K			K	K	K				K	K			K	K					
	L	L		L		L		L					L	L	L	L	L			L	L	L				L	L			L	L					
	M	M		M		M		M					M	M	M	M	M			M	M	M				M	M			M	M					
	N	N		N		N		N					N	N	N	N	N			N	N	N				N	N			N	N					
	P	P		P		P		P					P	P	P		P			P	P	P				P	P			P	P					
	Q	Q		Q		Q		Q					Q	Q	Q	Q	Q			Q	Q	Q				Q	Q			Q	Q					
	R	R		R		R		R					R	R	R	R	R			R	R	R				R	R			R	R					
	S	S		S		S		S					S	S	S	S	S			S	S	S				S	S			S	S					
	T	T		T		T		T					T	T	T	T	T			T	T	T				T	T			T	T					
	V	V		V		V		V					V	V	V	V	V			V	V	V				V	V			V	V					
	W	W		W		W		W					W	W	W	W	W			W	W	W				W	W			W	W					
	Y	Y		Y		Y		Y					Y	Y	Y	Y	Y			Y	Y	Y				Y	Y			Y	Y					

10

20

30

40

50

【0059】

いくつかの態様において、ポリペプチドは、アミノ酸65個またはそれ以下の長さである。いくつかの態様において、単量体は、非相同アミノ酸配列に融合している。いくつかの態様において、単量体は標的分子に結合する。いくつかの態様において、非相同アミノ酸配列は、親和性ペプチド、非相同LDL受容体クラスAドメイン、非相同EGFドメインおよび精製タグより選択される。

【0060】

本発明はまた、EGFドメイン単量体を含む非天然ポリペプチドであって、EGFドメイン単量体が以下の配列を含むポリペプチドを提供する。

$$C_a X_{3-14} C_b X_{3-7} C_c X_{4-16} C_d X_{1-2} C_e X_{8-23} C_f$$

式中、Cはシステインであり、 X_{n-m} は、独立して選択されるアミノ酸の数をnとmとの間で表し、

C_a-C_c 、 C_b-C_e および C_d-C_f はジスルフィド結合を形成する。

【0061】

いくつかの態様において、単量体ドメインは、以下の配列を含むEGFドメイン単量体で

ある。

$$C_a X_{4-6} C_b X_{3-5} C_c X_{8-9} C_d X_1 C_e X_{8-12} C_f$$

式中、Xは以下のように定義される。

C	X(4,6)	C	X(3,5)	C	X(8,9)	C	X(1) C	X(8/12)	C
X1-X2-X3-X4	X1-X2-X3	X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8	X1	X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8					
A A A A	A A	A A A A A A A A	A	A A A A A A A A					
D D D	D D	D D D D D D D	D	D D D D D D D D					
E E E E	E E	E E E E E E E	E	E E E E E E E E					
F F F F	F F	F F F F F F F	F	F F F F F F F F					
G G G G	G G	G G G G G G G	G	G G G G G G G G					
H H H H	H H	H H H H H H H	H	H H H H H H H H					
I I I I	I I	I I I I I I I	I	I I I I I I I I					
K K K K	K K	K K K K K K K	K	K K K K K K K K					
L L L L	L L	L L L L L L L	L	L L L L L L L L					
M M M M		M M M M M M M	M	M M M M M M M M					
N N N N	N N N	N N N N N N N	N	N N N N N N N N					
P P P P		P P P P P P P	P	P P P P P P P P					
Q Q Q Q	Q Q	Q Q Q Q Q Q Q	Q	Q Q Q Q Q Q Q Q					
R R R R	R R	R R R R R R R	R	R R R R R R R R					
S S S S	S S	S S S S S S S	S	S S S S S S S S					
T T T T	T T	T T T T T T T	T	T T T T T T T T					
V V V V	V V	V V V V V V V	V	V V V V V V V V					
W W W W		W W W W W W W	W	W W W W W W W W					
Y Y Y Y	Y Y	Y Y Y Y Y Y Y	Y	Y Y Y Y Y Y Y Y					

10

20

30

【0062】

いくつかの態様において、EGFドメイン単量体は、非相同アミノ酸配列に融合している。いくつかの態様において、単量体は標的分子に結合する。いくつかの態様において、ポリペプチドは、アミノ酸45個またはそれ以下の長さである。いくつかの態様において、非相同アミノ酸配列は、親和性ペプチド（たとえばSKVILF）、非相同LDL受容体クラスAドメイン、非相同EGFドメイン、精製タグ、酵素（たとえば西洋ワサビペルオキシダーゼまたはアルカリホスファターゼ）およびレポータータンパク質（たとえば緑蛍光タンパク質またはルシフェラーゼ）より選択される。

40

【0063】

本発明は、多数のリガンドへの結合親和性に関して単量体ドメインまたは単量体ドメインを含む多量体のライブラリーをスクリーニングする方法を提供する。いくつかの態様において、方法は、単量体ドメインまたは単量体ドメインの多量体のライブラリーを多数のリガンドに接触させることと、リガンドの少なくとも1個に結合する単量体ドメインまた

50

は多量体を選択することを含む。

【0064】

いくつかの態様において、方法は、(i.)単量体ドメインのライブラリーを多数のリガンドに接触させることと、(ii.)リガンドの少なくとも1個に結合する単量体ドメインを選択することと、(iii.)選択された単量体ドメインを単量体ドメインのライブラリーに連結して、選択された単量体ドメインおよび第二の単量体ドメインをそれぞれが含む多量体のライブラリーを形成することと、(iv.)多量体のライブラリーを多数のリガンドに接触させて、多量体およびリガンドをそれぞれが含む複数の複合体を形成することと、(v.)少なくとも1個の複合体を選択することを含む。

【0065】

10

いくつかの態様において、方法はさらに、選択された複合体の多量体を単量体ドメインまたは多量体のライブラリーに連結して、選択された多量体および少なくとも1個の第三の単量体ドメインをそれぞれが含む多量体の第二のライブラリーを形成することと、第二の多量体ライブラリーを多数のリガンドに接触させて複数の第二の複合体を形成することと、少なくとも1個の第二の複合体を選択することを含む。

【0066】

いくつかの態様において、リガンドおよび多量体の同一性を決定する。いくつかの態様において、単量体ドメインのライブラリーを多数のリガンドと接触させる。いくつかの態様において、多量体のライブラリーを多数のリガンドと接触させる。

【0067】

20

いくつかの態様において、多数のリガンドは混合物の状態にある。いくつかの態様において、多数のリガンドはアレイ状にある。いくつかの態様において、多数のリガンドは細胞または組織の中または上にある。いくつかの態様において、多数のリガンドは固体支持体上に固定化されている。

【0068】

いくつかの態様において、リガンドはポリペプチドである。いくつかの態様において、ポリペプチドはファージの表面で発現している。いくつかの態様において、単量体ドメインまたは多量体ライブラリーをファージの表面で発現している。

【0069】

いくつかの態様において、単量体ドメインはLDL受容体A型単量体ドメインである。いくつかの態様において、単量体ドメインはEGF単量体ドメインである。

30

【0070】

いくつかの態様において、多量体のライブラリーがファージの表面に発現してライブラリー発現ファージを形成し、リガンドがファージの表面に発現してリガンド発現ファージを形成し、かつ方法は、ライブラリー発現ファージをリガンド発現ファージと接触させてリガンド発現ファージ/ライブラリー発現ファージのペアを形成することと、ライブラリー発現ファージに結合しないリガンド発現ファージを除去する、またはリガンド発現ファージに結合しないライブラリー発現ファージを除去することと、リガンド発現ファージ/ライブラリー発現ファージのペアを選択することを含む。いくつかの態様において、方法はさらに、ファージペアからポリヌクレオチドを単離することと、ポリヌクレオチドを増幅して、リガンド発現ファージおよびライブラリー発現ファージからのポリヌクレオチドを含むポリヌクレオチドハイブリッドを産生することを含む。

40

【0071】

いくつかの態様において、方法は、複数のファージペアからポリヌクレオチドハイブリッドを単離して、それにより、ポリヌクレオチドハイブリッドの混合物を形成することを含む。いくつかの態様において、方法は、ハイブリッドポリヌクレオチドの混合物を、ポリヌクレオチドハイブリッド形成を可能にする条件下、cDNAライブラリーに接触させて、それにより、ハイブリッドポリヌクレオチドをcDNAライブラリー中のcDNAにハイブリッド形成させることと、ハイブリッド形成されたハイブリッドポリヌクレオチドのヌクレオチド配列を決定して、それにより、cDNAによってコードされたポリペプチドに特異的に結合

50

する単量体ドメインを同定することを含む。いくつかの態様において、単量体ドメインライブラリーがファージの表面に発現してライブラリー発現ファージを形成し、リガンドがファージの表面に発現してリガンド発現ファージを形成し、選択された複合体が、リガンド発現ファージに結合したライブラリー発現ファージを含み、方法が、選択された単量体ドメインまたは多量体を第一および第二の部分に分割し、第一の部分の単量体ドメインまたは多量体を固体面に連結し、ファージディスプレイリガンドライブラリーを第一の部分の単量体ドメインまたは多量体に接触させて、第一の部分の単量体ドメインまたは多量体に結合する標的リガンドファージを同定することと、第二の部分の単量体ドメインまたは多量体を表示するファージを細菌中に感染させてファージを発現させることと、標的リガンドファージを発現したファージに接触させて、標的リガンドファージおよび単量体ドメインまたは多量体を表示するファージで構成されるファージペアを形成することを含む。

10

【0072】

いくつかの態様において、方法はさらに、ファージペアの各ファージからポリヌクレオチドを単離して、それにより、ファージペア中のリガンドに結合する多量体または単量体ドメインを同定することを含む。いくつかの態様において、方法はさらに、ポリヌクレオチドを増幅して、標的リガンドファージおよびライブラリーファージからのポリヌクレオチドを含むポリヌクレオチドハイブリッドを産生することを含む。

【0073】

いくつかの態様において、方法は、複数のファージペアからポリヌクレオチドハイブリッドを単離し、増幅して、それにより、ポリヌクレオチドハイブリッドの混合物を形成することを含む。いくつかの態様において、方法は、ハイブリッドポリヌクレオチドの混合物を、ハイブリッド形成を可能にする条件下、cDNAライブラリーに接触させて、それにより、ハイブリッドポリヌクレオチドをcDNAライブラリー中のcDNAにハイブリッド形成させることと、会合したハイブリッドポリヌクレオチドのヌクレオチド配列を決定して、それにより、cDNA会合cDNAによってコードされたリガンドに特異的に結合する単量体ドメインを同定することを含む。

20

【0074】

本発明はまた、血液中の分子の血清半減期を増大させる方法を提供する。いくつかの態様において、方法は、多量体に結合した分子を対象者に投与することを含み、多量体が、血液成分に特異的に結合する第一の単量体ドメインおよび分子に特異的に結合する第二の単量体ドメインを含む。いくつかの態様において、血液成分は、ヒト血清アルブミン、赤血球およびIgGからなる群より選択される。いくつかの態様において、第一および第二のドメインはLDL受容体クラスAドメインである。

30

【0075】

定義

他に明示しない限りは、以下の定義が当技術分野におけるそれに代わって用いられる。

【0076】

「単量体ドメイン」または「単量体」という用語は、本明細書中で交換可能に用いられ、タンパク質またはポリペプチド中に見い出される個別の領域をいう。単量体ドメインは、隣接するネイティブなアミノ酸配列の非存在下で、溶液中でネイティブな三次元構造を形成する。本発明の単量体ドメインは、標的分子に特異的に結合する。例えば、標的分子に結合する三次元構造を形成するポリペプチドは単量体ドメインである。本明細書中で使用される場合、「単量体ドメイン」という用語は、抗体の相補性決定部位(CDR)を含まない。

40

【0077】

「単量体ドメイン改変体」という用語とは、単量体ドメイン配列の人為的操作から得られたドメインをいう。人為的操作した変化の例には、例えば、ランダム突然変異、部位特異的変異誘発、シャッフリング、方向付けられた進化、オリゴ依存性強制クロスオーバー現象(oligo-directed forced crossover events)、変異の直接的遺伝子合成取り込み(

50

direct gene synthesis incorporation of mutation)などが挙げられる。「単量体ドメイン改変体」という用語は、突然変異した抗体の相補性決定部位(CDR)を含まない。

【0078】

「ループ」という用語とは、単量体ドメインのうち、単量体ドメインタンパク質の足場構造のアセンブリーによって通常は自然環境に露出している、標的結合に関与する部分という。本発明は、具体的な特徴、たとえばジスルフィド結合のための電位、二次タンパク質構造の間の橋掛けおよび分子動態(すなわち可動性)によって識別される3種のループを提供する。3種のループ配列とは、システイン限定ループ配列、構造限定ループ配列およびB因子限定ループ配列である。

【0079】

本明細書で使用する「システイン限定ループ配列」という用語とは、同じファミリーの少なくとも1個の他の天然単量体ドメインに関して保存されているシステイン残基が各端に結合している天然単量体ドメインコード配列のサブ配列をいう。システイン限定ループ配列は、天然単量体ドメインの多重配列アライメントののち配列分析を実施して、保存されたシステイン残基を同定することによって同定される。保存されたシステイン残基の各連続ペアの間の配列がシステイン限定ループ配列である。システイン限定ループ配列は、各終端に隣接するシステイン残基を含まない。システイン限定ループ配列を有する単量体ドメインは、LDL受容体Aドメイン、EGF様ドメイン、スシドメイン、フィブロネクチン1型ドメインなどを含む。したがって、たとえば、共通配列CX₆CX₄CX₆CX₅CX₈C(図9をも参照されたい)(式中、X₆、X₄、X₅およびX₈はそれぞれシステイン限定ループ配列を表す)によって示されるLDL受容体Aドメインの場合。

【0080】

本明細書で使用する「構造的に限定されたループ配列」という用語とは、それぞれが二次構造を形成するサブ配列に各端で結合している単量体ドメインコード配列のサブ配列をいう。既知の三次元構造を有するタンパク質の二次構造は、Frishman, D.およびArgos, P. (1995)「Knowledge-based secondary structure assignment」、Proteins, 23(4):566-79に記載されている、タンパク質二次構造を割り当てるためのアルゴリズムSTRIDE(同じく、ワールドワイドウェブで//hgmp.mrc.ac.uk/Registered/Option/stride.htmlを参照されたい)にしたがって同定される。未知または特性決定されていない三次元構造を有するタンパク質の二次構造は、Jones, D.T. (1999)、「Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices」、J. Mol. Biol., 292:195-202に記載されているアルゴリズム(同じく、McGuffin, L.J., Bryson, K., Jones, D.T. (2000)「The PSIPRED protein structure prediction server」、Bioinformatics, 16:404-405およびワールドワイドウェブの//bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/を参照されたい)にしたがって同定される。二次構造としては、たとえば、プリーツシート、らせんなどがある。構造限定ループ配列を有する単量体ドメインの例は、C2ドメイン、Igドメイン、因子5/8Cドメイン、フィブロネクチン3型ドメインなどである。

【0081】

「B因子限定ループ配列」という用語とは、B因子限定ループ中のα炭素のB因子が全単量体ドメイン中のα炭素B因子の最高25%に入る、単量体ドメインコード配列の少なくとも3個のアミノ酸残基のサブ配列をいう。通常、サブ配列の平均α炭素B因子は少なくとも約65である。本明細書に使用する「B因子」(または「温度因子」または「デバイ・ウォーラー因子」という用語はX線散乱データから導出される。B因子は、原子または原子群ごとにX線散乱項に適用することができる、電子密度が拡散する程度を記述する因子である。本発明の実施で使用するB因子は、等方性であってもよいし異方性であってもよい。「平均α炭素B因子」という用語とは、

$$\frac{(\sum_{i=1}^n B\text{-因子}_{\alpha i})}{n}$$

(式中、nは、ループ中の残基の数に対応し、少なくとも3であり、B-factor_{c_αi}は、ルー

10

20

30

40

50

ブのアミノ酸残基 i の α 炭素のB因子である)をいう。

【0082】

本明細書中、「多量体」という用語は、少なくとも2個の単量体ドメインおよび/または免疫ドメイン(たとえば、少なくとも2個の単量体ドメイン、少なくとも2個の免疫ドメインまたは少なくとも1個の単量体ドメインおよび少なくとも1個の免疫ドメイン)を含むポリペプチドを指すために使用される。多量体中の別個の単量体ドメインおよび/または免疫ドメインがリンカーによって連結されていることもできる。多量体は、組み合わせモザイクタンパク質または組換えモザイクタンパク質とも知られる。

【0083】

「ファミリー」および「ファミリークラス」という用語は、アミノ酸配列の類似性に基づいて同類に分類されるタンパク質を示すために交換可能に使用される。これらの類似した配列は、タンパク質の機能および/またはタンパク質の三次元構造の維持にとって重要であるため、一般に保存される。そのようなファミリーの例は、LDL受容体Aドメインファミリー、EGF様ファミリーなどを含む。

【0084】

「リガンド」という用語は、本明細書中では「標的分子」ともいい、単純な分子から複雑な標的までの範囲にわたる広範な種々の物質および分子を含む。標的分子は、タンパク質、核酸、脂質、炭水化物、またはポリペプチドドメインによる認識が可能な任意の他の分子であり得る。例えば、標的分子は、化学的化合物(すなわち、非生物学的化合物(例えば、有機分子、無機分子、または、ポリヌクレオチドおよびタンパク質を除く、有機原子と無機原子の両方を有する分子))、化学的化合物の混合物、空間的に局在化した化合物のアレイ、生物学的高分子、バクテリオファージペプチドディスプレイライブラリー、ポリソームペプチドディスプレイライブラリー、生物学的材料(例えば、細菌、植物、真菌、または動物(例えば、哺乳動物)の細胞または組織)から作製された抽出物、タンパク質、毒素、ペプチドホルモン、細胞、ウイルスなどを含み得る。他の標的分子には、例えば、細胞全体、組織全体、関連したタンパク質または関連していないタンパク質の混合物、ウイルス株または細菌株の混合物などが含まれる。標的分子はまた、本明細書中に記載されるアレイのスクリーニングにおいて含まれること、または特定のタンパク質相互作用を増強または阻害すること(すなわち、2つのあらかじめ定められたポリペプチド間の結合相互作用を任意に阻害する因子)によって定義され得る。

【0085】

本明細書中で使用される場合、「免疫ドメイン」という用語とは、少なくとも1つの、抗体の相補性決定部位(CDR)を含むタンパク質結合ドメインをいう。免疫ドメインは、天然に存在する(すなわち、自然状態から単離された)免疫学的ドメインであり得るか、または人為的な操作(例えば、ランダム突然変異、部位特異的変異誘発、および組換えなど)のような変異誘発方法を介して、ならびに方向付けられた進化の方法(例えば、再帰的なエラーの生じやすいPCR、再帰的な組換えなど)によって変更された、天然には存在しない免疫学的ドメインであり得る。本発明の実施における使用のために適切な異なる型の免疫ドメインには、ミニボディー、単ドメイン抗体、単鎖可変断片(ScFv)、およびFab断片が含まれる。

【0086】

本明細書中で、「ミニボディー」という用語とは、天然に存在するかまたは天然には存在しない(例えば、変異誘発を受けた)、重鎖可変ドメインまたは軽鎖可変ドメイン、またはそれらの組み合わせの、2つのみの相補性決定部位(CDR)をコードするポリペプチドをいう。ミニボディーの例は、Pessiら、A designed metal-binding protein with a novel fold、(1993) *Nature* 362: 367-369に記載されている。ミニボディーの多量体は、図11Aに図示されている。円はミニボディーを示し、実線は免疫ドメインを互いに連結させるリンカー部分を示す。

【0087】

10

20

30

40

50

本明細書中で使用される場合、「単ドメイン抗体」という用語とは、抗体の重鎖可変ドメイン（「 V_H 」）、すなわち、軽鎖可変ドメインを有さない重鎖可変ドメインをいう。本発明の実施において使用される例示的な単ドメイン抗体には、例えば、Hamers-Casterman, C $\bar{A}$ 、Naturally occurring antibodies devoid of light chains (1993) Nature 363: 446-448、および、Dumoulinら、Single-domain antibody fragments with high conformational stability (2002) Protein Science 11: 500-515に記載されているような、カメリド (camelid) 重鎖可変ドメイン (約118~136アミノ酸残基) が挙げられる。単ドメイン抗体の多量体は、図11Bに示されている。楕円は単ドメイン抗体を示し、実線は単ドメイン抗体を互いに連結させるリンカー部分を示す。

【0088】

10

「単鎖可変断片」または「ScFv」という用語は本明細書中で交換可能に使用され、少なくとも12アミノ酸残基を有するペプチドリンカーによって連結された抗体の重鎖および軽鎖の可変ドメインをいう。本発明の実施における使用のために意図される単鎖可変断片には、Birdら、Single-chain antigen-binding proteins (1988) Science 242 (4877): 423-426およびHustonら、Protein engineering of antibody binding site: recovery of specific activity in an anti-digoxin single-chain Fv analogue produced in *Escherichia coli* (1988) Proc Natl Acad Sci USA 85 (16): 5879-83において記載されるものが含まれる。単鎖可変断片の多量体は、図11Cに図示されている。点線は、重鎖および軽鎖の可変ドメインを互いに連結しているペプチドリンカーを表す。実線は重鎖可変ドメインを互いに連結しているリンカー部分を示す。

20

【0089】

本明細書中で使用される場合、「Fab断片」という用語とは、2つのタンパク質鎖を有する免疫ドメインをいい、ここでその1つは、2つの軽鎖ドメイン（ V_L 可変ドメインおよび C_L 定常ドメイン）からなる軽鎖であり、2つの重鎖ドメイン（すなわち、 V_H 可変ドメインおよび C_H 定常ドメイン）からなる重鎖である。本発明の実施において使用されるFab断片には、各重鎖および軽鎖成分のC末端に鎖間のジスルフィド結合を有するもの、ならびにそのようなC末端ジスルフィド結合を有さないものが含まれる。各断片は約47kDである。Fab断片は、PluckthunおよびSkerra、Expression of functional antibody Fv and Fab fragments in *Escherichia coli* (1989) Methods Enzymol 178: 497-515によって記載されている。Fab断片の多量体は、図11Dに示されている。白い楕円はFab断片の重鎖成分を表し、塗りつぶした楕円はFabの軽鎖成分を表す。

30

【0090】

「リンカー」という用語は、本明細書中で使用され、2つまたはそれ以上の個別の分離した単量体ドメインを連結または接続する部分または部分の群を示す。リンカーは、多量体に一緒に連結された場合に、個別の分離した単量体ドメインが分離したままになることを可能にする。リンカー部分は、典型的には、実質的に線状部分である。適切なリンカーには、ポリペプチド、ポリ核酸、ペプチド核酸などが含まれる。適切なリンカーはまた、炭素骨格中に組み込まれた1つまたは複数の酸素原子を有する、任意で置換されたアルキレン部分を含む。代表的には、リンカーの分子量は、約2000ダルトン未満である。より代表的には、リンカーの分子量は約1500ダルトン未満であり、通常約1000ダルトン未満である。リンカーは、個別の分離した単量体ドメインを協働させること（例えば、多量体中の個別の分離した単量体ドメインの各々が分離した結合部位を介して同じ標的分子に結合する場合）を可能にするに十分に小さくあり得る。例示的なリンカーには、ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、またはアミノ酸のポリペプチド、または他の天然には存在しない部分が含まれる。リンカーは、ネイティブな配列、その改変体、または合成配列の一部であり得る。リンカーは、例えば、天然に存在するアミノ酸、天然には存在しないアミノ酸、または両方の組み合わせを含み得る。

40

【0091】

「分離した」という用語は、本明細書中で使用され、他の部分（例えば、他の単量体ドメインを含む）と複合体化した場合でさえ、独立しかつ独立した状態で残っている部分の

50

特性をいう。単量体ドメインは、タンパク質中で分離したドメインである。なぜなら、単量体ドメインは、認識され得、かつタンパク質から分離され得る独立した特性を有するからである。例えば、LDLR中のAドメインのリガンド結合能力は、独立した特性である。他の分離の例には、リンカーによって多量体中に複合体化または一緒に結合された場合でさえ、分離した独立したドメインを残している、多量体中の分離した単量体ドメインが含まれる。分離した特性の別の例は、多量体中のリガンドに対する分離した結合部位である。

【0092】

本明細書中で使用される場合、「方向付けられた進化」とは、ポリヌクレオチド改変体が、それによって、再帰性のプロセス中で活性（例えば、結合活性を有するポリペプチド）について生成、発現、およびスクリーニングされる、プロセスをいう。スクリーニング中での1つまたは複数の候補が選択され、次いで、選択された候補をコードするポリヌクレオチドを使用してこのプロセスが反復されて、新規な改変体が生成する。方向付けられた進化は、変種生成の少なくとも2ラウンドを含み、3、4、5、10、20、またはそれ以上の変種生成および選択のラウンドを含み得る。変種は、当業者に公知の任意の方法によって生成され得、これには例えば、エラーの生じやすいPCR、遺伝子シャッフリング、化学的変位誘発などが含まれる。

【0093】

「シャッフリング」という用語は、本明細書中で使用され、同一でない配列間の組換えを示す。いくつかの態様において、シャッフリングは、相同組換えを介するかまたは非同相組換えを介する（例えば、cre/lox系および/またはflp/frt系を介する）組換えを含み得る。シャッフリングは、種々の異なった形式（例えば、インビトロおよびインビボシャッフリング形式、インシリコシャッフリング形式、二本鎖または一本鎖鋳型のいずれかを使用するシャッフリング形式、プライマーに基づくシャッフリング形式、核酸断片化に基づくシャッフリング形式、ならびにオリゴヌクレオチド媒介シャッフリング形式（これらのすべては同一でない配列間の組換え現象に基づき、かつ本明細書中以下でより詳細に記載されるかまたは引用される）、ならびに他の同様な組換えに基づく形式）を使用することによって実行され得る。本明細書中で使用される場合、「ランダム」という用語とは、2つまたはそれ以上のアミノ酸から構成され、かつ確率的なまたはランダムなプロセスによって構築されたポリヌクレオチド配列またはアミノ酸配列をいう。ランダムなポリヌクレオチド配列またはアミノ酸配列には、インバリエント鎖を含み得る、枠組みまたは骨格モチーフが含まれ得る。

【0094】

本明細書中で使用される場合、「擬似ランダム」という用語とは、限られた可変性を有し、その結果、任意の位置における残基の可変性の程度が限定されているが、任意の擬似ランダム部位は少なくともある程度の残基の可変性を許容している、一組の配列、ポリヌクレオチド、またはポリペプチドをいう。

【0095】

「ポリペプチド」「ペプチド」および「タンパク質」という用語は、2つまたはそれ以上のアミノ酸のアミノ酸配列をいうために交換可能に本明細書中で使用される。

【0096】

「保存性アミノ酸置換」とは、類似の側鎖を有する残基の交換可能性をいう。例えば、脂肪族側鎖を有するアミノ酸の群は、グリシン、バリン、ロイシン、およびイソロイシンであり；脂肪族水酸基側鎖を有するアミノ酸の群は、セリンおよびスレオニンであり；アミド含有側鎖を有するアミノ酸の群は、アスパラギンおよびグルタミンであり；芳香族側鎖を有するアミノ酸の群は、フェニルアラニン、チロシン、およびトリプトファンであり；塩基性側鎖を有するアミノ酸の群は、リジン、アルギニン、およびヒスチジンであり；かつ硫黄含有側鎖を有するアミノ酸の群は、システインおよびメチオニンである。好ましい保存性アミノ酸置換群は、バリン-ロイシン-イソロイシン、フェニルアラニン-チロシン、リジン-アルギニン、アラニン-バリン、およびアスパラギン-グルタミンである。

【0097】

10

20

30

40

50

「核酸配列」という句は、5'末端から3'末端に読まれる、一本鎖または二本鎖の、デオキシリボヌクレオチド塩基またはリボヌクレオチド塩基のポリマーをいう。これは、一次的な構造的役割を果たす、染色体DNA、自己複製プラスミド、およびDNAまたはRNAを含む。

【0098】

「コードする」という用語とは、1つまたは複数のアミノ酸をコードするポリヌクレオチド配列をいう。この用語は開始コドンまたは終止コドンを必要としない。アミノ酸配列は、ポリヌクレオチド配列によって提供される6つの異なる読み枠のいずれか1つでコードされ得る。

【0099】

「プロモーター」という用語とは、RNAポリメラーゼおよび転写を開始する他のタンパク質の認識および結合に関与する、転写の開始から上流および/または下流に位置する領域または配列をいう。

【0100】

「ベクター」とは、宿主の染色体とは独立している場合に、宿主生物中で複製が可能なポリヌクレオチドをいう。ベクターの例には、プラスミドが含まれる。ベクターは、代表的には、複製起点を有する。ベクターは、例えば、転写および翻訳のターミネーター、転写および翻訳の開始配列、および特定の核酸の発現の調節に有用なプロモーターを含み得る。

【0101】

「組換え」という用語は、例えば、細胞、または核酸、タンパク質、またはベクターに関連して使用される場合には、細胞、核酸、タンパク質、またはベクターが、異種核酸もしくはタンパク質の導入、またはネイティブな核酸もしくはタンパク質の改変によって修飾されたことを示すか、または細胞がそのように修飾された細胞に由来することを示す。従って、例えば、組換え細胞は、ネイティブな（組換えでない）細胞の形態において見いだされない遺伝子を発現するか、またはさもなければ異常に発現したか、発現が減少している、または全く発現していない、ネイティブな遺伝子を発現する。

【0102】

ポリペプチドに「特異的に（または任意で）結合する」という句は、単量体または多量体に対していう場合、不均一なタンパク質および他の生物製剤の集合中に、ポリペプチドが存在することの決定要因であり得る、結合反応をいう。従って、抗体結合アッセイ法において使用される標準条件およびアッセイ法の下で、特定の単量体または多量体は、バックグラウンドよりも多くの（例えば、バックグラウンドよりも2倍、5倍、10倍またはそれ以上）の特定の標的因子に結合し、かつ試料中に存在する他の分子に、有意な量では結合しない。

【0103】

2つまたはその以上の核酸またはポリペプチドの配列という文脈において、「同一な」または「同一性」パーセントという用語は、同一である2つまたはそれ以上の配列またはサブ配列をいう。「実質的に同一」とは、比較ウィンドウに対して、または、以下の配列比較アルゴリズムの1つを使用して、もしくは手作業でのアライメントおよび目視の検査によって測定されるような指定された領域比較されかつ最大の一一致のために整列された場合に、同一であるアミノ酸残基またはポリヌクレオチドの特定のパーセント（すなわち、特定の領域にわたって、または特定されていない場合には、全体の配列にわたって、60%同一、任意で、65%、70%、75%、80%、85%、90%、または95%同一）を有する同一である2つまたはそれ以上の核酸またはポリペプチドをいう。任意で、同一性または実質的な同一性は、少なくとも50ヌクレオチド長である領域にわたって、またはより好ましくは、100~500個、または1000個またはそれ以上のヌクレオチドまたはアミノ酸の長さである領域にわたって存在する。

【0104】

ポリヌクレオチドまたはアミノ酸の配列は、第二の配列に対し、それら二つの配列が天

10

20

30

40

50

然の配列で見いだされるものと同じように連結されていない場合、「非相同」である。たとえば、非相同コード配列に作用的に連結されているプロモーターとは、天然の対立遺伝子変異体とは異なるコード配列をいう。

多量体に関連して使用される場合、「異種リンカー」という用語とは、自然状態では互いに同じ関連性が見いだされないリンカーおよび単量体を含む多量体を示す（例えば、それらは融合タンパク質を形成する）。

【 0 1 0 5 】

発明の詳細な説明

本発明は、個別の単量体ドメインおよび/または免疫ドメインの特性を選択および最適化して多量体を作製するための強化したアプローチを提供する。特に、本開示は、所望のリガンドまたはリガンドの混合物に結合する個別の単量体ドメインおよび/または免疫ドメインを同定する、およびリンカーを介して連結する、2つまたはそれ以上の単量体ドメインおよび/または免疫ドメインを含む多量体（コンビナトリアルモザイクタンパク質またはリコンビナントモザイクタンパク質としても知られる）を作製するための、方法、組成物、およびキットを記載する。多量体は、個別の単量体ドメインと比較して、リガンドまたはリガンドの混合物について、改善された結合活性もしくは親和性または変化した特異性のような、改善された表現型を有する多量体を同定するためにスクリーニングされ得る。

10

【 0 1 0 6 】

1. 個別の単量体ドメイン

20

単量体ドメインは、任意のサイズのポリペプチド鎖であり得る。いくつかの態様において、単量体ドメインは、約25～約500、約39～約200、約30～約100、約90～約200、約30～約250、約30～約60、約90～約150、約100～約150、約25～約50、または約30～約150のアミノ酸を有する。同様に、本発明の単量体ドメインは、例えば、約30～約200アミノ酸；約25～約180アミノ酸；約40～約150アミノ酸；約50～約130アミノ酸；または約75～約125アミノ酸を含み得る。単量体ドメインおよび免疫ドメインは、代表的には、溶液中で安定な高次構造を維持し得る。時折、単量体ドメインおよび免疫ドメインは、独立して安定な高次構造に折り畳まれ得る。1つの態様において、安定な高次構造は、金属イオンによって安定化される。安定な高次構造は、任意でジスルフィド結合（例えば、少なくとも1個、2個、または3個またはそれ以上のジスルフィド結合）を含み得る。ジスルフィド結合は、任意で2つのシステイン残基間で形成され得る。いくつかの態様において、単量体ドメインまたは単量体ドメインの改変体は、例示された配列（例えば、A、C2）または本明細書中に引用された他の配列と実質的に同一である。

30

【 0 1 0 7 】

単量体ドメインおよびモザイクタンパク質を記載する刊行物ならびにその中に引用される参考文献には、以下のものが含まれる。

Hegyi, H and Bork, P., *On the classification*

and evolution of protein modules, (1997) J. Protein Chem., 16(5):545-551; Baron et al.,

Protein modules (1991) Trends Biochem. Sci., 16(1):13-7; Ponting et al., *Evolution of*

40

domain families, (2000), Adv. Protein Chem., 54:185-244; Doolittle, *The multiplicity of*

domains in proteins, (1995) Annu. Rev. Biochem 64:287-314; Doolittle and Bork,

Evolutionarily mobile modules in proteins (1993) Scientific American, 269 (4):50-6; and

Bork, *Shuffled domains in extracellular proteins* (1991), FEBS letters 286(1-2):47-54

本発明の単量体ドメインはまた、PfamデータベースおよびSMARTデータベースにおいて見い出されるドメインを含む。Shultzら、SMART: a web-based tool for the study of genetically mobile domains, (2000) Nucleic Acid Res. 28(1):231-34を参照されたい。

【 0 1 0 8 】

50

本発明の実施における使用に特に適切な単量体ドメインは、(1) β サンドイッチドメイン；(2) β バレルドメイン；または(3) ジスルフィド結合を含むシステインリッチドメインである。本発明の実施において使用されるシステインリッチドメインは、代表的には、 α ヘリックス、 β シート、または β バレル構造を形成しない。代表的には、ジスルフィド結合は、ドメインが三次元構造に折り畳まれることを促進する。通常、システインリッチドメインは、少なくとも2つのジスルフィド結合、より代表的には、少なくとも3つのジスルフィド結合を有する。

【0109】

ドメインは、多くの特徴を有し得る。例えば、いくつかの態様において、ドメインは、動物（例えば、ヒト）において、低い免疫原性を有するか、または免疫原性を有さない。ドメインは小さなサイズを有し得る。いくつかの態様において、ドメインは、皮膚または他の組織に浸透するのに十分に小さい。ドメインは、一定の範囲のインビボでの半減期または安定性を有し得る。

10

【0110】

本発明の実施における使用のために適切な例示的な単量体ドメインには、例えば、EGF様ドメイン、クリングルドメイン、I型フィブロネクチンドメイン、II型フィブロネクチンドメイン、III型フィブロネクチンドメイン、PANDドメイン、Glaドメイン、SRCRドメイン、クニッツ/ウシ膵臓トリプシンインヒビタードメイン、カザル型セリンプロテアーゼインヒビタードメイン、トレフォイル(P型)ドメイン、C型フォンウィルブランド因子ドメイン、アナフィラトキシン様ドメイン、CUBドメイン、I型サイログロブリン反復、LDL受容体クラスAドメイン、スシドメイン、リンクドメイン、I型トロンボスポンジンドメイン、免疫グロブリン様ドメイン、C型レクチンドメイン、MAMドメイン、A型フォンウィルブランド因子ドメイン、ソマトメジンBドメイン、WAP型4ジスルフィドコアドメイン、C型F5/8ドメイン、ヘモペキシンドメイン、SH2ドメイン、SH3ドメイン、ラミニン型EGF様ドメイン、C2ドメイン、および当業者に公知の他のこのようなドメイン、ならびにこれらの誘導体および/または改変体が挙げられる。いくつかの態様において、単量体ドメインはC2ドメインではない。図1は、LDL受容体ファミリー中の分子において見い出される様々な種類の単量体ドメインを概略的に図示する。

20

【0111】

いくつかの態様において、適切な単量体ドメイン（例えば、独立してまたはある程度の限られた補助で折り畳まれる能力を有するドメイン）が、Simple Modular Architecture Research Tool (SMART) (Shultzら、SMART: a web-based tool for the study of genetically mobile domains、(2000) Nucleic Acid Res. 28(1):231-234を参照されたい) またはCATH (Pearlら、Assigning genomic sequences to CATH、(2000) Nucleic Acids Research 28(1):277-282を参照されたい) のようなコンピュータ配列解析ツールによって規定されるような β サンドイッチまたは β バレル三次元構造を含むタンパク質ドメインのファミリーより選択され得る。

30

【0112】

別の態様において、本発明の単量体ドメインは、III型フィブロネクチンドメイン、アンチカリンドメイン、およびCTLA-4由来のIg様ドメイン以外のドメインを含む。これらのドメインのいくつかの局面は、2001年9月7日に刊行された、Lipovsekらによる「Protein scaffolds for antibody mimics and other binding proteins」という標題の国際公開公報第01/64942号、1999年4月8日に刊行された、Besteらによる「Anticlins」という標題の国際公開公報第99/16873号および2000年10月12日に公開された、Desmetらによる「A poly peptide structure for use as a scaffold」という標題の国際公開公報第00/60070号に記載されている。

40

【0113】

上記に記載のように、単量体ドメインは任意でシステインリッチである。適切なシステインリッチ単量体ドメインは、例えば、LDL受容体クラスAドメイン(Aドメイン)またはEGF様ドメインを含む。単量体ドメインはまた、負に荷電した残基のクラスターを有し得る

50

。任意で単量体ドメインは、反復配列（例えば、 β プロペラドメインにおいて見い出されるようなYWTD（配列番号：198））を含む。

【0114】

単量体ドメインの他の特徴には、リガンドを結合する能力（例えば、LDL受容体クラスAドメイン、またはCUBドメイン（補体C1r/C1s、Uegf、および骨形成タンパク質-1ドメイン）における場合）、エンドサイトーシスまたは内部移行に関与する能力（例えば、LDL受容体の細胞質側テールまたはMegalinの細胞質側テールにおける場合）、イオンを結合する能力（例えば、LDL受容体Aドメインによる Ca^{2+} 結合）、および/または細胞接着に関与する能力（例えば、EGF様ドメインにおける場合）が含まれる。イオンに結合してその二次構造を維持する他の単量体ドメインとしては、たとえば、すべてカルシウムに結合するAドメイン、EGFドメイン、EFハンド（たとえばカルモジュリンおよびトロポニンC中に見られるもの）、カドヘリンドメイン、C型レクチン、C2ドメイン、アネキシン、Glaドメイン、トロンボスポンジン3型ドメインならびに亜鉛に結合するジンクフィンガー（たとえばC2H2型C3HC4型（RINGフィンガー）、インテグラーゼ亜鉛結合ドメイン、PHDフィンガー、GATAジンクフィンガー、FYVEジンクフィンガー、Bボックスジンクフィンガー）がある。発明を限定する意図はないが、イオン結合が、一次配列に依存する多数の結合構造を可能にする十分な可動性を提供しながらも、二次構造の安定性を提供すると考えられる。

10

【0115】

単量体ドメインの特徴には、独立して折り畳まれる能力および安定な構造を形成する能力が含まれる。従って、単量体ドメインの構造は、しばしば保存されているが、単量体をコードするポリヌクレオチド配列は保存される必要はない。例えば、Aドメイン構造は、Aドメインファミリーのメンバー間で保存されているが、Aドメインの核酸配列は保存されていない。従って、例えば、単量体ドメインは、そのシステイン残基およびそのカルシウムに対する親和性によってAドメインとして分類されるが、その核酸配列によっては必ずしも分類されない。図2を参照されたい。

20

【0116】

詳細には、Aドメイン（時折、「相補型反復」と呼ばれる）は、約30～50アミノ酸または30～65アミノ酸を含む。いくつかの態様において、このドメインは約35～45アミノ酸を含み、いくつかの場合には約40アミノ酸を含む。30～50アミノ酸中には、約6つのシステイン残基が存在する。これら6つのシステインでは、ジスルフィド結合は、代表的には、以下のシステイン間で見い出される。C1およびC3、C2およびC5、ならびに、C4およびC6。Aドメインは、リガンド結合部分を構成する。このドメインのシステイン残基は、ジスルフィド結合によって連結され、コンパクトで、安定な、機能的に独立した部分を形成する。図3を参照されたい。これらの反復のクラスターは、リガンド結合ドメインを形成し、差次的なクラスター形成は、リガンド形成に関連する特異性に影響を与え得る。

30

【0117】

例示的なAドメイン配列および共通配列は、図2、3、および8に示される。図9は、引き続くシステイン間の間隔を有するAドメインにおける残基の位置および存在を示す。さらに、図10は、多数のAドメインを示し、保存アミノ酸のリストを提供する。Aドメインを同定するために有用な1つの代表的な共通配列は以下である。

40

C-[VILMA]-X₍₅₎-C-[DNH]-X₍₃₎-[DENQHT]-

C-X_(3,4)-[STADE]-[DEH]-[DE]-X_(1,5)-C (配列番号: 200)

ここで角括弧 [] 内の残基は、1つの位置で可能な残基を示す。「X_(#)」は残基の数を示す。これらの残基は、任意のアミノ酸残基であり得る。2つの数字を含む丸括弧 () は、その位置を占め得るアミノ酸の範囲をいう（例えば、「[DE]-X_(1,5)-C」は、アミノ酸DEの後に1個、2個、3個、4個、または5個の残基が続き、その後にCが続くことを意味する）。この共通配列は、第3のシステインで開始するAドメインの部分のみを表す。第2の一致は以下である。

C-X₍₃₋₁₅₎-C-X₍₄₋₁₅₎-C-X₍₆₋₇₎-C-[N,D]-X₍₃₎-[D,E,N,Q,H,S,T]-

C-X₍₄₋₆₎-D-E-X₍₂₋₈₎-C (配列番号: 201)

第2の一致は、6つすべてのシステイン残基にわたるアミノ酸残基を示す。いくつかの態様において、Aドメイン改変体は、上記の配列のいずれかと実質的に同一な配列を含む。

【0118】

さらなる例示的なAドメインは以下の配列を含む。

$C_a X_{3-15} C_b X_{3-15} C_c X_{6-7} C_d (D, N) X_4 C_e X_{4-6} DEX_{2-8} C_f$

式中、Cはシステインであり、 X_{n-m} は、独立して選択されるアミノ酸の数をnとmとの間で表し、かつ(D,N)は、位置がDまたはNであることができることを示し、 C_a-C_c 、 C_b-C_e および C_d-C_f はジスルフィド結合を形成する。

10

【0119】

いくつかの態様において、単量体ドメインは、以下の配列を含むLDL受容体クラスAドメイン単量体である。

$C_a X_{6-7} C_b X_{4-5} C_c X_6 C_d X_5 C_e X_{8-10} C_f$

式中、Xは以下のように定義される。

X(6,7)							X(4,5)				X(6)						X(5)					X(8,10)										
X1	X2	X3	X4	X5	X6		X1	X2	X3	X4		X1	X2	X3	X4	X5	X6	X1	X2	X3	X4	X5		X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7	X8	
A	A	A	A	A	A		A	A				A	A	A	A	A		A	A	A			A	A	A	A	A	A	A	A		
D		C					D		D			D		D				D		D			D		D		D		D		D	
E	E		D	E			E	F	D	E	F	E	F	D	E	F		E		E	F	E		E		E	F	E	F	F	F	
F		F	F	F	F		F	G	F	G	F	G	F	G	F	G		F		F	G	F		F		F	F	F	F	F	F	
G		G	G	G			G	H	G	H	G	H	G	H	G			H		H	H	H		H		H	H	H	H	H	H	
H		H	H	H		H	H	H	H			H	H	H				I		I	I	I		I		I	I	I	I	I	I	
I																		I		I	I	I		I		I	I	I	I	I	I	
K	K	K	K	K	K	K	K			K	K	K	K	K	K	K		K		K	K	K		K		K	K	K	K	K	K	
L	L		L	L	L		L			L	L	L	L	L	L	L		L		L	L	L		L		L	L	L	L	L	L	
M	M	M	M	M	M	M				M	M	M	M	M	M	M		M		M	M	M		M		M	M	M	M	M	M	
N	N	N	N	N	N	N	N			N	N	N	N	N	N	N		N		N	N	N		N		N	N	N	N	N	N	N
P	P	P	P	P	P	P	P			P	P	P	P	P	P	P		P		P	P	P		P		P	P	P	P	P	P	
Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q			Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q		Q		Q	Q	Q		Q		Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q
R	R	R	R	R	R	R	R			R	R	R	R	R	R	R		R		R	R	R		R		R	R	R	R	R	R	R
S	S	S	S	S	S	S	S			S	S	S	S	S	S	S		S		S	S	S		S		S	S	S	S	S	S	S
T	T	T	T	T	T	T	T			T	T	T	T	T	T	T		T		T	T	T		T		T	T	T	T	T	T	T
V	V	V	V	V	V	V	V			V	V	V	V	V	V	V		V		V	V	V		V		V	V	V	V	V	V	V
W	W	W	W	W	W	W	W			W	W	W	W	W	W	W		W		W	W	W		W		W	W	W	W	W	W	W
Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y			Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y		Y		Y	Y	Y		Y		Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y

X(6,7)							X(4,5)														X(5)					X(8,10)									
X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7	X1	X2	X3	X4	X5											X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7	X8	X9	X10				
A	A					A	A	A	A	A	A											A	A	A	A	A	A	A	A	A	A				
D	D	D	D	D			D	D	D	D	D											D	D		D		D	D	D	D	D				
E	E		D	E		E	E	E		D	E											E		E	E	E	E	E	E	E	E				
F		F	F	F	F		F	G	F	G												F													
G		G	G	G		G	G	G	G	H												G		G											
H		H		H		H	H		H	H												H		H											
K			K	K	K	K	K		K	K												K		K											
L	L	L	L	L	L	L	L		L	L												L		L											
M				M																		M		M											
N	N	N	N	N	N	N	N		N	N												N		N											
P	P	P	P	P	P	P	P		P	P												P		P											
Q		Q	Q	Q	Q	Q	Q		Q	Q												Q		Q											
R	R	R	R	R	R	R	R		R	R												R		R											
S	S	S	S	S	S	S	S		S	S												S		S											
T				T	T	T	T		T	T												T		T											
V				V	V	V	V		V	V												V		V											
W				W	W	W	W		W	W												W		W											
Y				Y	Y	Y	Y		Y	Y												Y		Y											

X(6,7)							X(4,5)														X(5)					X(8,10)									
X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7	X1	X2	X3	X4	X5											X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7	X8	X9	X10				
A	A					A	A	A	A	A	A											A	A	A	A	A	A	A	A	A	A				
D	D	D	D	D			D	D	D	D	D											D	D		D		D	D	D	D	D				
E	E		D	E		E	E	E		D	E											E		E	E	E	E	E	E	E	E				
F		F	F	F	F		F	G	F	G												F													
G		G	G	G		G	G	G	G	H												G		G											
H		H		H		H	H		H	H												H		H											
K			K	K	K	K	K		K	K												K		K											
L	L	L	L	L	L	L	L		L	L												L		L											
M				M																		M		M											
N	N	N	N	N	N	N	N		N	N												N		N											
P	P	P	P	P	P	P	P		P	P												P		P											
Q		Q	Q	Q	Q	Q	Q		Q	Q												Q		Q											
R	R	R	R	R	R	R	R		R	R												R		R											
S	S	S	S	S	S	S	S		S	S												S		S											
T				T	T	T	T		T	T												T		T											
V				V	V	V	V		V	V												V		V											
W				W	W	W	W		W	W												W		W											
Y				Y	Y	Y	Y		Y	Y												Y		Y											

X(6,7)							X(4,5)														X(5)					X(8,10)									
X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7	X1	X2	X3	X4	X5											X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7	X8	X9	X10				
A	A					A	A	A	A	A	A											A	A	A	A	A	A	A	A	A	A				
D	D	D	D	D			D	D	D	D	D											D	D		D		D	D	D	D	D				
E	E		D	E		E	E	E		D	E											E		E	E	E	E	E	E	E	E				
F		F	F	F	F		F	G	F	G												F													
G		G	G	G		G	G	G	G	H												G		G											
H		H		H		H	H		H	H												H		H											
K			K	K	K	K	K		K	K												K		K											
L	L	L	L	L	L	L	L		L	L												L		L											
M				M																		M		M											
N	N	N	N	N	N	N	N		N	N												N		N											
P	P	P	P	P	P	P	P		P	P												P		P											
Q		Q	Q	Q	Q	Q	Q		Q	Q												Q		Q											
R	R	R	R	R	R	R	R		R	R												R		R											
S	S	S	S	S	S	S	S		S	S												S		S											
T				T	T	T	T		T	T												T		T											
V				V	V	V	V		V	V												V		V											
W				W	W	W	W		W	W												W		W											
Y				Y	Y	Y	Y		Y	Y												Y		Y											

10

20

30

40

50

上記表は、LDL受容体クラスA単量体ドメインの各位置における別のアミノ酸残基を示す。たとえば、システインC1とシステインC2との間には6個または7個のアミノ酸があることができる。表の左上ボックスは、C1とC2との間に6個のアミノ酸がある場合の各位置における別のアミノ酸残基を示す。表の左下ボックスは、C1とC2との間に7個のアミノ酸がある場合の別のアミノ酸残基を示す。すべての場合で、ある位置（たとえばX1）のアミノ酸は、残りの位置（たとえばX2、X3など）に選択されるアミノ酸とは独立して選択される。

【0 1 2 0】

今日まで、少なくとも190個のヒトAドメインが、cDNA配列に基づいて同定されている。例えば、図10を参照されたい。Aドメインを含む例示的なタンパク質には、例えば、補体成分（例えば、C6、C7、C8、C9、およびI因子）、セリンプロテアーゼ（例えば、エンテロペプチダーゼ、マトリプターゼ、およびコリン）、膜貫通タンパク質（例えば、ST7、LRP3、LRP5、およびLRP6）、およびエンドサイトーシス受容体（例えば、サルチリン（Sortilin）関連受容体、LDL受容体、VLDLR、LRP1、LRP2、およびApoER2）が含まれる。AドメインおよびAドメイン改変体は、単量体ドメインおよびその改変体として、本発明の実施において容易に使用され得る。Aドメインのさらなる記載は、以下の刊行物およびそこで

引用される参考文献において見出され得る。

Howell and Hertz, *The LDL receptor gene family: signaling functions during development*, (2001) *Current Opinion in Neurobiology* 11:74-81; Herz (2001), *supra*;
Krieger, *The "best" of cholesterol, the "worst" of cholesterol: A tale of two receptors*,
(1998) *PNAS* 95: 4077-4080; Goldstein and Brown, *The Cholesterol Quartet*, (2001)
Science, 292: 1310-1312; and, Moestrup and Verroust, *Megalin-and Cubilin-Mediated Endocytosis of Protein-Bound Vitamins, Lipids, and Hormones in Polarized Epithelia*, (2001)
Ann. Rev. Nutr. 21:407-28

10

【 0 1 2 1 】

本発明の実施における使用のために適切な別の例示的な単量体ドメインはC2ドメインである。C2単量体ドメインは、2つ、4つの鎖のβシートからなるコンパクトなβサンドイッチを含むポリペプチドである。ここで、このドメインの「トップ」のループおよびこのドメインの「ボトム」のループは、8つのβ鎖を連結している。C2単量体ドメインは2つのサブクラス、すなわち、トポロジーI（シナプトタグミン様トポロジー）、およびトポロジーII（サイトゾルホスホリパーゼA2様トポロジー）を、それぞれ有するC2単量体ドメインに分けられ得る。トポロジーIを有するC2単量体ドメインは、分子の「トップ」に3つのループ（それらのすべてがCa²⁺結合ループである）を含むが、トポロジーIIを有するC2単量体ドメインは、分子の「トップ」に4つのループ（それらの内で3つのみがCa²⁺結合ループである）を含む。C2単量体ドメインの構造は、RizoおよびSudhof、*J. Biol. Chem.* 273; 15879-15882 (1998)ならびにCho、*J. Biol. Chem.* 276; 32407-32410 (2001)によって概説されている。「ループ領域1」、「ループ領域2」、および「ループ領域3」という用語とは、分子の「トップ」に位置するCa²⁺結合ループ領域をいう。この命名法（これは、分子の「トップ」に位置する3つのCa²⁺結合ループをCa²⁺結合ループでないループ（主として分子の「ボトム」に位置する）と区別するために使用される）は、広範に使用され、文献中で認知されている。RizoおよびSudhof、*J. Biol. Chem.* 273; 15879-15882 (1998)を参照されたい。ループ領域1、2、および3は標的結合領域を示し、従って、結合特異性および親和性を調節するために変化させ得る。C2ドメインの残りの部分は、所望の場合、変更することなしに維持され得る。いくつかの例示的なC2ドメインは以下の配列と実質的に同一である（配列番号：202）

20

30

40

Tyr	Ser	His	Lys	Phe	Thr	Val	Val	Val	Leu	Arg	Ala	Thr	Lys	Val
1				5					10					15
Thr	Lys	Gly	Ala	Phe	Gly	Asp	Met	Leu	Asp	Thr	Pro	Asp	Pro	Tyr
				20					25					30
Val	Glu	Leu	Phe	Ile	Ser	Thr	Thr	Pro	Asp	Ser	Arg	Lys	Arg	Thr
				35					40					45
Arg	His	Phe	Asn	Asn	Asp	Ile	Asn	Pro	Val	Trp	Asn	Glu	Thr	Phe
				50					55					60
Glu	Phe	Ile	Leu	Asp	Pro	Asn	Gln	Glu	Asn	Val	Leu	Glu	Ile	Thr
				65					70					75
Leu	Met	Asp	Ala	Asn	Tyr	Val	Met	Asp	Glu	Thr	Leu	Gly	Thr	Ala
				80					85					90
Thr	Phe	Thr	Val	Ser	Ser	Met	Lys	Val	Gly	Glu	Lys	Lys	Glu	Val
				95					100					105
Pro	Phe	Ile	Phe	Asn	Gln	Val	Thr	Glu	Met	Val	Leu	Glu	Met	Ser
				110					115					120
Leu	Glu	Val												

:

50

残基1～16、29～48、54～77、および86～123はループ領域1、2、および3の外側に局在する位置を、残基17～28、49～53、および78～85はループ領域1、2、および3を、それぞれ構成する。

【0122】

単量体ドメインの他の例は、EGF型反復およびCUBドメインを含むタンパク質キャビリン (Cubilin) において見出され得る。CUBドメインはリガンド結合に關与する (例えば、いくつかのリガンドには、内因子 (IF) - ビタミンB12、受容体結合タンパク質 (RAP)、Apo A-I、トランスフェリン、アルブミン、Ig軽鎖、およびカルシウムが含まれる)。MoestrupおよびVerrouost、前記を参照されたい。

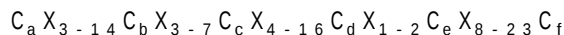
【0123】

メガリンもまた、複数の単量体ドメインを含む。詳細には、メガリンは、LDL受容体型Aドメイン、EGF型反復、膜貫通セグメント、および細胞質テールを有する。メガリンは、多様なリガンドのセット (例えば、ApoB、ApoE、ApoJ、クラスタリン、ApopH/β2-グリコプロテインI、PTH、トランスサイレチン、サイログロブリン、インスリン、アミノグリコシド、ポリミキシンB、アプロチニン、トリコサンチン、PAI-1、PAI-1-ウロキナーゼ、PAI-1-tPA、プロ-ウロキナーゼ、リボタンパク質リパーゼ、α-アミラーゼ、アルブミン、RAP、Ig軽鎖、カルシウム、C1q、ラクトフェリン、β2-ミクログロブリン、EGF、プロラクチン、リゾチーム、シトクロムc、PAP-1、臭気物質結合タンパク質、精囊分泌タンパク質II) を結合する。MoestrupおよびVerrouost、前記を参照されたい。

10

【0124】

例示的なEGF単量体ドメインは以下の配列を含む。

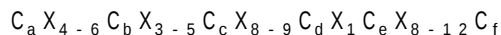


式中、Cはシステインであり、 X_{n-m} は、独立して選択されるアミノ酸の数をnとmとの間で表し、かつ

C_a-C_c 、 C_b-C_e および C_d-C_f はジスルフィド結合を形成する。

【0125】

いくつかの態様において、単量体ドメインは、以下の配列を含むEGFドメイン単量体である。



式中、Xは以下のように定義される。

20

30

30

【 0 1 2 6 】

いくつかの例示的な単量体ドメインの記載は以下の刊行物およびそこに引用される参考文献中に見出され得る。

Yamazaki et al., *Elements of Neural*

Adhesion Molecules and a Yeast Vacuolar Protein Sorting Receptor are Present in a Novel Mammalian Low Density Lipoprotein Receptor Family Member, (1996) Journal of Biological Chemistry 271(40):24761-24768; Nakayama et al., *Identification of High-Molecular-Weight Proteins with Multiple EGF-like Motifs by Motif-Trap Screening*, (1998) Genomics 51:27-34; Liu et al, *Genomic Organization of New Candidate Tumor Suppressor Gene, LRP1B*, (2000) Genomics 69:271-274; Liu et al., *The Putative Tumor Suppressor LRP1B, a Novel Member of the Low Density Lipoprotein (LDL) Receptor Family, Exhibits Both Overlapping and Distinct Properties with the LDL Receptor-related Protein*, (2001) Journal of Biological Chemistry 276(31):28889-28896; Ishii et al, *cDNA of a New Low-Density Lipoprotein Receptor-Related Protein and Mapping of its Gene (LRP3) to Chromosome Bands 19q12-q13.2*, (1998) Genomics 51:132-135; Orlando et al, *Identification of the second cluster of ligand-binding repeats in megalin as a site for receptor-ligand interactions*, (1997) PNAS USA 94:2368-2373; Jeon and Shipley, *Vesicle-reconstituted Low Density Lipoprotein Receptor*, (2000) Journal of Biological Chemistry 275(39):30458-30464; Simmons et al., *Human Low Density Lipoprotein Receptor Fragment*, (1997) Journal of Biological Chemistry 272(41):25531-25536; Fass et al., *Molecular Basis of familial hypercholesterolaemia from structure of LDL receptor module*, (1997) Nature 388:691-93; Daly et al., *Three-dimensional structure of a cysteine-rich repeat from the low-density lipoprotein receptor*, (1995) PNAS USA 92:6334-6338; North and Blacklow, *Structural Independence of Ligand-Binding Modules Five and Six of the LDL Receptor*, (1999) Biochemistry 38:3926-3935; North and Blacklow, *Solution Structure of the Sixth LDL-A module of the LDL Receptor*, (2000) Biochemistry 39:25640-2571; North and Blacklow, *Evidence that Familial Hypercholesterolemia Mutations of the LDL Receptor Cause Limited Local Misfolding in an LDL-A Module Pair*, (2000) Biochemistry 39:13127-13135; Beglova et al., *Backbone Dynamics of a Module Pair from the Ligand-Binding Domain of the LDL Receptor*, (2001) Biochemistry 40:2808-2815; Bieri et al., *Folding, Calcium binding, and Structural Characterization of a Concatemer of the First and Second Ligand-Binding Modules of the Low-Density Lipoprotein Receptor*, (1998) Biochemistry 37:10994-11002; Jeon et al., *Implications for familial hypercholesterolemia from the structure of the LDL receptor YWTD-EGF domain pair*, (2001) Nature Structural Biology 8(6):499-504; Kurniawan et al., *NMR structure of a concatemer of the first and*

10

20

30

40

second ligand-binding modules of the human low-density lipoprotein receptor, (2000) Protein Science 9:1282-1293; Esser et al., *Mutational Analysis of the Ligand Binding Domain of the Low Density Lipoprotein Receptor*, (1988) Journal of Biological Chemistry 263(26):13282-13290; Russell et al., *Different Combinations of Cysteine-rich Repeats Mediate Binding of Low Density Lipoprotein Receptor to Two Different Proteins*, (1989) Journal of Biological Chemistry 264(36):21682-21688; Davis et al., *Acid-dependent ligand dissociation and recycling of LDL receptor mediated by growth factor homology region*, (1987) Nature 326:760-765; Rong et al., *Conversion of a human low-density lipoprotein receptor ligand-binding repeat to a virus receptor: Identification of residues important for ligand specificity*, (1998) PNAS USA 95:8467-8472; Agnello et al., *Hepatitis C virus and other Flaviviridae viruses enter cells via low density lipoprotein receptor*; (1999) PNAS 96(22):12766-12771; Esser and Russell, *Transport-deficient Mutations in the Low Density lipoprotein receptor*, (1988) Journal of Biological Chemistry 263(26):13276-13281; Davis et al., *The Low Density Lipoprotein Receptor*, (1987) Journal of Biological Chemistry 262(9):4075-4082; and, Peacock et al., *Human Low Density Lipoprotein Receptor Expressed in Xenopus Oocytes*, (1988) Journal of Biological Chemistry 263(16):7838-7845

10

20

【 0 1 2 7 】

VLDLRタンパク質、ApoER2タンパク質、およびLRP1タンパク質ならびにそれらの単量体ドメインを記載する他の刊行物には、以下の刊行物およびそこに引用される参考文献中が含まれる。

Savonen et al., *The Carboxyl-terminal Domain of Receptor-associated Protein Facilitates Proper Folding and Trafficking of the Very Low Density Lipoprotein Receptor by Interaction with the Three Amino-terminal Ligand-binding Repeats of the Receptor*, (1999) Journal of Biological Chemistry 274(36):25877-25882; Hewat et al., *The cellular receptor to human rhinovirus 2 binds around the 5-fold axis and not in the canyon: a structural view*, (2000) EMBO Journal 19(23):6317-6325; Okun et al., *VLDL Receptor Fragments of Different Lengths Bind to Human Rhinovirus HRV2 with Different Stoichiometry*, (2001) Journal of Biological Chemistry 276(2):1057-1062; Rettenberger et al., *Ligand Binding Properties of the Very Low Density Lipoprotein Receptor*, (1999) Journal of Biological Chemistry 274(13):8973-8980; Mikhailenko et al., *Functional Domains of the very low density lipoprotein receptor: molecular analysis of ligand binding and acid-dependent ligand dissociation mechanisms*, (1999) Journal of Cell Science 112:3269-3281; Brandes et al., *Alternative Splicing in the Ligand Binding Domain of Mouse ApoE Receptor-2 Produces Receptor Variants Binding Reelin but not alpha2-macroglobulin*, (2001) Journal of Biological Chemistry 276(25):22160-22169; Kim et al., *Exon/Intron Organization, Chromosome Localization, Alternative Splicing, and Transcription Units of the Human Apolipoprotein E*

30

40

Receptor 2 Gene, (1997) Journal of Biological Chemistry 272(13):8498-8504; Obermoeller-McCormick et al., *Dissection of receptor folding and ligand-binding property with functional minireceptors of LDL receptor-related protein*, (2001) Journal of Cell Science 114(5):899-908; Horn et al., *Molecular Analysis of Ligand Binding of the Second Cluster of Complement-type Repeats of the Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein*, (1997) Journal of Biological Chemistry 272(21):13608-13613; Neels et al., *The Second and Fourth Cluster of Class A Cysteine-rich Repeats of the Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein Share Ligand-binding Properties*, (1999) Journal of Biological Chemistry 274(44):31305-31311; Obermoeller et al., *Differential Functions of the Triplicated Repeats Suggest Two Independent Roles for the Receptor-Associated Protein as a Molecular Chaperone*, (1997) Journal of Biological Chemistry 272(16):10761-10768; Andersen et al., *Identification of the Minimal Functional Unit in the Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein for Binding the Receptor-associated Protein (RAP)*, (2000) Journal of Biological Chemistry 275(28):21017-21024; Andersen et al., *Specific Binding of alpha-Macroglobulin to Complement-Type Repeat CR4 of the Low-Density Lipoprotein Receptor-Related Protein*, (2000) Biochemistry 39:10627-10633; Vash et al., *Three Complement-Type Repeats of the Low-Density Lipoprotein Receptor-Related Protein Define a Common Binding Site for RAP, PAI-1, and Lactoferrin*, (1998) Blood 92(9):3277-3285; Dolmer et al., *NMR Solution Structure of Complement-like Repeat CR3 from the Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein*, (2000) Journal of Biological Chemistry 275(5):3264-3269; Huang et al., *NMR Solution Structure of Complement-like Repeat CR8 from the Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein*, (1999) Journal of Biological Chemistry 274(20):14130-14136; and Liu et al., *Uptake of HIV-1 Tat protein mediated by low-density lipoprotein receptor-related protein disrupts the neuronal metabolic balance of the receptor ligands*, (2000) Nature Medicine 6(12):1380-1387

10

20

30

【 0 1 2 8 】

単量体ドメインに関連する他の参照文献には、以下の刊行物およびそこに引用される参照文献も含まれる。

FitzGerald et al, *Pseudomonas Exotoxin-mediated Selection Yields Cells with Altered Expression of Low-Density Lipoprotein Receptor-related Protein*, (1995) Journal of Cell Biology, 129: 1533-41; Willnow and Herz, *Genetic deficiency in low density lipoprotein receptor-related protein confers cellular resistance to Pseudomonas exotoxin A*, (1994) Journal of Cell Science, 107:719-726; Trommsdorf et al., *Interaction of Cytosolic Adaptor Proteins with Neuronal Apolipoprotein E Receptors and the Amyloid Precursor Protein*, (1998) Journal of Biological Chemistry, 273(5): 33556-33560; Stockinger et al., *The Low Density Lipoprotein Receptor Gene Family*, (1998) Journal of Biological Chemistry, 273(48): 32213-32221; Obermoeller et al., *Ca²⁺ and Receptor-associated Protein are independently required for proper folding and disulfide bond formation of the low density lipoprotein receptor-related protein*, (1998) Journal of Biological Chemistry, 273(35):22374-22381; Sato et al., *39-kDa receptor-associated protein (RAP) facilitates secretion and ligand binding of extracellular region of very-low-density-lipoprotein receptor: implications for a distinct pathway from low-density-lipoprotein receptor*, (1999) Biochem. J., 341:377-383; Avromoglu et al, *Functional Expression of the Chicken Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein in a mutant Chinese Hamster Ovary Cell Line Restores Toxicity of Pseudomonas Exotoxin A and Degradation of alpha2-Macroglobulin*, (1998) Journal of Biological Chemistry, 273(11) 6057-6065; Kingsley and Krieger, *Receptor-mediated endocytosis of low density lipoprotein: Somatic cell mutants define multiple genes required for expression of surface-receptor activity*, (1984) PNAS USA, 81:5454-5458; Li et al, *Differential Functions of Members of the Low Density Lipoprotein Receptor Family Suggests by their distinct endocytosis rates*, (2001) Journal of Biological Chemistry 276(21):18000-18006; and, Springer, *An Extracellular beta-Propeller Module Predicted in Lipoprotein and Scavenger Receptors, Tyrosine Kinases, Epidermal Growth Factor Precursor, and Extracellular Matrix Components*, (1998) J. Mol. Biol. 283:837-862

10

20

30

【 0 1 2 9 】

単量体ドメインをコードするポリヌクレオチド（核酸ともいう）は、代表的には、発現を通して単量体ドメインを作製するために使用される。単量体ドメインをコードする核酸は、種々の異なる供給源に由来し得る。単量体ドメインのライブラリーは、天然に存在する単量体ドメイン、変化させた単量体ドメイン（すなわち、単量体ドメイン改変体）、またはそれらの組み合わせをコードする複数の異なる核酸を発現することによって調製され得る。

40

【 0 1 3 0 】

本発明は、選択されたりガンドもしくは所望のリガンド、またはリガンドの混合物に結合する単量体ドメインを同定するための方法を提供する。いくつかの態様において、単量体ドメインおよび/または免疫ドメインは、所望の特性（例えば、結合親和性）について同定または選択され、次いで、単量体ドメインおよび/または免疫ドメインは、多量体を形成する。例えば、図5を参照されたい。これらの態様のために、所望の特性（例えば、特定の結合特性）を有するドメインの選択を生じる任意の方法が使用され得る。例えば、

50

本発明の方法は、異なる複数の核酸を提供する工程（ここで各核酸は、単量体ドメインをコードする）；この異なる複数の核酸を翻訳し、それによって異なる複数の単量体ドメインを提供する工程；所望のリガンドまたはリガンドの混合物の結合について、異なる複数の単量体ドメインをスクリーニングする工程；および、所望のリガンドまたはリガンドの混合物を結合する異なる複数の単量体ドメインのメンバーを同定する工程、を包含し得る。

【0131】

上記に述べたように、単量体ドメインは、天然に存在するものであるか、または変化させたもの（非天然の改変体）であり得る。「天然に存在する」という用語は、対象のものが天然に見出され得ることを示すために本明細書中で使用される。例えば、天然の単量体ドメインは、ヒト単量体ドメイン、または任意で異なる種または供給源（例えば、哺乳類、霊長類、齧歯類、魚類、鳥類、爬虫類、植物など）由来のドメインを含み得る。天然に存在する単量体ドメインは、多くの方法（例えば、ゲノムDNAまたはcDNAのPCR増幅による方法）によって入手し得る。

10

【0132】

本発明の単量体ドメインは、天然に存在するドメインまたは天然には存在しない改変体であり得る。本発明の実施において使用される単量体ドメインのライブラリーは、天然に存在する単量体ドメイン、天然には存在しない単量体ドメイン改変体、またはそれらの組み合わせを含み得る。

【0133】

単量体ドメイン改変体は、先祖ドメイン、キメラドメイン、ランダムドメイン、変異ドメインなどを含み得る。例えば、先祖ドメインは、系統発生的解析に基づき得る。キメラドメインは、1つまたは複数の領域が、同じファミリーの他のドメイン由来の対応する領域によって置き換えられる。たとえば、キメラドメインは、同じファミリーの多数の関連ドメインからのループ配列を組み合わせ、免疫原性が潜在的に低下している新規ドメインを形成することによって構築することができる。当業者は、ランダムなアミノ酸配列を作製するのではなく、同じファミリーの多様な関連ドメインからのループ領域を組み合わせることによって修飾された結合ドメイン単量体を構築する免疫学的利点を認識すると思われる。たとえば、ヒトLDL受容体クラスAドメイン中に天然に存在するループ配列または多数のループ配列を組み合わせることによって変異体ドメインを構築することにより、得られるドメインは、新規な結合特性を含むことができるが、露出したループがすべてヒト起源であるため、免疫原性タンパク質配列を含むことはできない。内在性という意味でのループアミノ酸配列の組み合わせは、本発明の単量体構築物すべてに適用することができる。したがって、本発明は、ヒトタンパク質に由来するキメラ単量体ドメインのライブラリーを生成する方法であって、ヒトタンパク質の少なくとも二つの異なる天然変異体それぞれからの少なくとも1個のループに対応する、ポリヌクレオチドまたはポリペプチド配列であるループ配列を提供することと、ループ配列を共有結合的に組み合わせ、少なくとも2個のループを有するキメラ単量体ドメインをそれぞれがコードする少なくとも二つの異なるキメラ配列のライブラリーを生成することを含む方法を提供する。通常、キメラ領域は、少なくとも4個のループ、普通は少なくとも6個のループを有する。上記のように、本発明は、具体的な特徴、たとえばジスルフィド結合のための電位、二次タンパク質構造の間の橋掛けおよび分子動態（すなわち可動性）によって識別される3種のループを提供する。3種のループ配列とは、システイン限定ループ配列、構造限定ループ配列およびB因子限定ループ配列である。

20

30

40

【0134】

ランダムドメインは、1つまたは複数の領域がランダム化されているドメインである。ランダム化は、全体的なランダム化に基づき得るか、または任意で配列多様性の自然分布に基づく部分的なランダム化に基づき得る。

【0135】

天然には存在しない単量体ドメインまたは変化させた単量体ドメインは、多くの方法に

50

よって作製され得る。変異誘発の任意の方法（例えば、部位特異的変異誘発およびランダム変異誘発（例えば、化学的変異誘発））が、改変体を作製するために使用され得る。いくつかの態様において、エラーの生じやすいPCRが、改変体を作製するために使用され得る。さらなる方法には、天然に存在する複数の単量体ドメイン中の保存性アミノ酸を整列させることによって天然に存在する複数の単量体ドメインを整列させる工程；ならびに、保存性アミノ酸を維持すること、および保存性アミノ酸周辺にアミノ酸を挿入、欠失、または変更させることによって、天然には存在しない単量体ドメインを設計して、天然には存在しない単量体ドメインを生成する工程が含まれる。1つの態様において、保存性アミノ酸残基にはシステインが含まれる。別の態様において、挿入工程はランダムアミノ酸を使用するか、または任意で挿入工程は、天然に存在する単量体ドメインの部分を使用する。これらの部分は、理想的には、同じファミリーからのドメインからのループをコードすることができる。アミノ酸は、合成オリゴヌクレオチドを使用して、または混合によって、または制限酵素に基づく組換えによって挿入または交換される。本発明のヒトキメラドメインは、最小限の免疫原性が望まれる治療用途で有用である。本発明は、ヒトキメラドメインのライブラリーを生成する方法を提供する。ヒトキメラ単量体ドメインのライブラリーは、上記のように、ヒト単量体ドメインの種々の変異体からのループ配列を組み合わせることによって構築することができる。組み合わせられるループ配列は、配列限定ループ、構造限定ループ配列、B因子限定ループまたはこれら二つまたはそれ以上の組み合わせであることができる。

10

20

30

40

50

【0136】

あるいはまた、ヒトキメラドメインライブラリーは、天然ヒト単量体ドメインを、ループレベルではなくアミノ酸レベルで修飾することによって生成することもできる。免疫原性の潜在性を最小限にするため、ヒト単量体ドメインの同じファミリーからのタンパク質配列中に天然に存在する残基のみがキメラ配列の作製に使用される。これは、同じファミリーの単量体ドメインからの少なくとも2個のヒト単量体ドメインの配列アライメントを提供し、ヒト単量体ドメインの間で異なる、ヒト単量体ドメイン配列中の対応する位置にあるアミノ酸残基を同定し、各ヒトキメラ単量体ドメイン配列が、同じファミリーの単量体ドメインからの2個またはそれ以上のヒト単量体ドメインからの残基とでタイプおよび位置において対応するアミノ酸残基からなる2個またはそれ以上のヒトキメラ単量体ドメインを生成することによって達成することができる。ヒトキメラ単量体ドメインのライブラリーを使用して、標的分子への結合に関してヒトキメラ単量体ドメインをスクリーニングし、標的分子に結合するヒトキメラ単量体ドメインを同定することにより、対象の標的に結合するヒトキメラ単量体ドメインを同定することができる。初期配列アライメント工程で使用される適当な天然ヒト単量体ドメイン配列は、本明細書で記載する天然単量体ドメインのいずれかに対応する配列を含む。

【0137】

本発明のヒトキメラドメインライブラリー（異なるループによって生成されたものか、単一アミノ酸残基によって生成されたものかを問わない）は、当業者に公知の方法によって調製することができる。これらのライブラリーを生成するのに特に適した方法は、スプリットプールフォーマットおよび国際公開公報第01/23401号に記載されているトリヌクレオチド合成フォーマットである。

【0138】

ヒトキメラドメインライブラリーを生成する本発明方法に加えて、本発明はまた、候補タンパク質配列を提供し、候補タンパク質配列をヒトタンパク質配列のデータベースと比較し、データベースからのヒトタンパク質配列の部分に対応する候補タンパク質配列の部分と同定し、候補タンパク質配列とデータベースからのヒトタンパク質配列との対応の程度を決定することにより、潜在的な免疫原性に関してタンパク質をスクリーニングする方法を提供する。

【 0 1 3 9 】

一般に、候補タンパク質配列とデータベースからのヒトタンパク質配列の一つ以上との対応の程度が大きければ大きいほど、データベースからのヒトタンパク質配列のいずれともほとんど対応しない候補タンパク質と比較して、免疫原性の潜在性は低くなると予想される。候補タンパク質をスクリーニングする本発明の方法の実施で使用するのに適したヒトタンパク質配列のデータベースは、ワールドワイドウェブのncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgiで見いだすことができる（加えて、以下のウェブサイトを使用して、短いほぼ正確なマッチを検索することができる。

```
cbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi?CMD
=Web&LAYOUT=TwoWindows&AUTO_FORMAT=Semiauto&ALIGNMENTS=50&ALI
GNMENT_VIEW=Pairwise&CLIENT=web&DATABASE=nr&DESCRIPTIONS=100&EN
TREZ_QUERY=(none)&EXPECT=1000&FORMAT_OBJECT=Alignment&FORMAT_TY
PE=HTML&NCBI_GI=on&PAGE=Nucleotides&PROGRAM=blastn&SERVICE=plain&S
ET_DEFAULTS.x=29&SET_DEFAULTS.y=6&SHOW_OVERVIEW=on&WORD_SIZE=
7&END_OF_HTTPGET=Yes&SHOW_LINKOUT=yes at the World Wide Web)
```

10

この方法は、キメラタンパク質中の交叉配列、たとえばキメラ単量体ドメインが免疫原性事象を生じさせる可能性が高いかどうかを決定する際に特に有用である。交叉配列がヒトタンパク質配列のデータベース中で見いだされる配列の部分と対応する場合には、その交叉配列は、免疫原性事象を発生させる可能性がより低いと考えられる。比較工程の一例が、二つの候補タンパク質配列とデータベースからのヒト配列との比較を示す図15に示されている。横線が、データベースからのヒトタンパク質配列が候補タンパク質配列と同一であるところを示す。

20

【 0 1 4 0 】

本発明の方法にしたがって調製されたヒトキメラドメインライブラリーは、結合親和性に加えて、潜在的な免疫原性に関してスクリーニングすることができる。さらには、データベースからのヒトタンパク質配列の部分に関する情報を使用して、ヒト様キメラタンパク質のタンパク質ライブラリーを設計することができる。このようなライブラリーは、天然のヒトタンパク質中に存在する「交叉配列」に関する情報を使用して生成することができる。本明細書中、「交叉配列」という用語とは、少なくとも一つの天然ヒトタンパク質中に全体として見いだされる配列であって、その配列の部分が二つまたはそれ以上の天然タンパク質中で見いだされる配列をいう。したがって、後者の二つまたはそれ以上の天然タンパク質の組換えが、配列のキメラ部分が別の天然タンパク質中で見いだされる配列に実際に対応するキメラタンパク質を生成する。交叉配列は、二つの連続するアミノ酸残基位置のキメラ接合部を含み、その第一のアミノ酸位置は、第一および第二の天然ヒトタンパク質配列で見いだされるものとタイプおよび位置において同一であるが、第三の天然ヒトタンパク質配列とは同一ではないアミノ酸残基によって占められている。第二のアミノ酸位置は、第二および第三の天然ヒトタンパク質配列で見いだされるものとタイプおよび位置において同一であるが、第一の天然ヒトタンパク質配列とは同一ではないアミノ酸残基によって占められている。換言するならば、「第二の」天然ヒトタンパク質配列は、上記のように交叉配列が全体として見られる天然ヒトタンパク質と対応する。

30

40

【 0 1 4 1 】

本発明にしたがって、ヒト様キメラタンパク質のライブラリーは、データベースから、同じタンパク質ファミリーからのタンパク質に対応するヒトタンパク質配列を同定し、同じタンパク質ファミリーからのヒトタンパク質配列を参照タンパク質配列とで整列化し、同じファミリーの異なるヒトタンパク質配列に由来するサブ配列のセットであって、各サブ配列が、異なる天然ヒトタンパク質配列に由来する少なくとも一つの他のサブ配列とで同一性の領域を共有するセットを同定し、異なる天然ヒトタンパク質配列にそれぞれ由来

50

する第一、第二および第三のサブ配列から、第一のアミノ酸位置が第一および第二の天然ヒトタンパク質配列と共通であり、第三の天然ヒトタンパク質配列とは共通ではないアミノ酸残基によって占められ、第二のアミノ酸位置が、第二および第三の天然ヒトタンパク質配列と共通であるアミノ酸残基によって占められている二つの連続するアミノ酸残基位置を含むキメラ接合部を同定し、それぞれがサブ配列のセットからの二つまたはそれ以上のサブ配列と配列において対応し、それぞれが同定されたキメラ接合部の一つ以上を含むヒト様キメラタンパク質分子を生成することによって生成される。

【0142】

したがって、たとえば、第一の天然ヒトタンパク質配列がA-B-Cであり、第二のものがB-C-D-Eであり、第三のものがD-E-Fである場合には、キメラ接合部はC-Dである。あるいはまた、第一の天然ヒトタンパク質配列がD-E-F-Gであり、第二のものがB-C-D-E-Fであり、第三のものがA-B-C-Dである場合には、キメラ接合部はD-Eである。ヒト様キメラタンパク質分子は、多様な方法で生成することができる。たとえば、キメラ接合部をコードする配列を含むオリゴヌクレオチドを、サブ配列の上記セットからの二つまたはそれ以上のサブ配列と配列において対応するオリゴヌクレオチドで組換えして、ヒト様キメラタンパク質およびそのライブラリーを生成することができる。天然ヒトタンパク質を整列化するために使用される参照配列は、同じファミリーの天然ヒトタンパク質からの配列またはそのファミリーのキメラもしくは他のタンパク質の変異体である。

【0143】

天然に存在する単量体ドメインおよび/または免疫ドメインの断片をコードする核酸はまた、混合および/または組み換えされ得（例えば、化学的または酵素的に産生された断片を使用することによって）、全長の、修飾単量体ドメインおよび/または免疫ドメインを生成する。この断片および単量体ドメインはまた、そのドメインまたは断片をコードする核酸を操作することによって組み換えられ得る。例えば、単量体ドメインの断片をコードする核酸構築物を連結する工程は、変化させた単量体ドメインを生成するために使用され得る。

【0144】

変化させた単量体ドメインはまた、ペプチド配列の、保存配列、ランダム配列、擬似ランダム配列、または定義された配列をコードする合成オリゴヌクレオチドのコレクション（例えば、重複するオリゴヌクレオチド）を提供することによって生成され得る。これらの配列は、次いで、単量体ドメインをコードするポリヌクレオチド中の所定の位置への連結によって挿入される。同様に、1つまたは複数の単量体ドメインの配列の多様性は、部位特異的変位誘発、ランダム変異、擬似ランダム変異、定められたカーネル（kernel）変異、コドンに基づく変異などで単量体ドメインを変異させることによって拡張され得る。得られる核酸分子は、クローニングおよび増幅のために、宿主中で増殖され得る。いくつかの態様において、核酸はシャッフリングされる。

【0145】

本発明はまた、単量体ドメインをコードする複数の核酸を組み換える、および所望のリガンドまたはリガンドの混合物などを結合する単量体ドメインについて得られたライブラリーをスクリーニングするための方法を提供する。選択された単量体ドメイン核酸はまた、ニュートラルな配列（すなわち、結合に対して実質的な機能的効果を有さない配列）をコードするポリヌクレオチド配列とシャッフリングすることによって戻し交配され（例えば、選択された配列と実質的に同一の野生型または天然に存在する配列と戻し交配することによって）、ネイティブ様の機能的単量体ドメインを作製することができる。一般的に、戻し交配の間に、引き続く選択が、特性（例えば、リガンドに対する結合）を保持するために適用される。

【0146】

いくつかの態様において、単量体ライブラリーは、シャッフリングによって調製される。このような場合、単量体ドメインは、単離およびシャッフリングされて、単量体ドメインをコードする核酸配列をコンビナトリアル的に組み換える（組換えは、単量体ドメイン

間もしくは単量体ドメイン内、またはその両方で起こり得る)。第1の工程は、所望の特性(例えば、特定のリガンドについての親和性)を有する単量体ドメインを同定することを含む。組換えの間に保存性アミノ酸を維持する一方、単量体ドメインをコードする核酸配列は、組み換えられ得るか、または組み換えられかつ多量体に連結され得る。

【0147】

ドメインのライブラリーからの単量体ドメインおよび/または免疫ドメインの選択は、種々の手順によって達成され得る。例えば、所望の特性を有する単量体ドメインおよび/または免疫ドメインを同定するための1つの方法は、複数の核酸を翻訳する工程(ここでは、各核酸は単量体ドメインおよび/または免疫ドメインをコードする)、複数の核酸によってコードされるポリペプチドをスクリーニングする工程、ならびに、例えば、所望のリガンドまたはリガンドの混合物に結合する、これらの単量体ドメインおよび/または免疫ドメインを同定し、それによって選択された単量体ドメインおよび/または免疫ドメインを作製する工程を包含する。各々の核酸によって発現される単量体ドメインおよび/または免疫ドメインは、当技術分野において公知の方法(すなわち、パニング、アフィニティークロマトグラフィー、FACS解析)によって、リガンドに結合するそれらの能力について試験され得る。

10

【0148】

上記に述べたように、単量体ドメインおよび/または免疫ドメインの選択は、標的タンパク質または他の標的分子(例えば、脂質、糖質、核酸など)のようなリガンドへの結合に基づき得る。他の分子は、任意で標的と共に方法中に含まれ得る(例えば、 Ca^{2+} のようなイオン)。リガンドは、公知のリガンド(例えば、複数の単量体ドメインの1つに結合することが知られているリガンド)であり得るか、または例えば、所望のリガンドは、未知の単量体ドメインリガンドであり得る。例えば、Aドメインに結合するいくつかのリガンドを例証している図4を参照されたい。単量体ドメインおよび/または免疫ドメインの他の選択は、例えば、標的タンパク質の特定の機能または活性の阻害または増強に基づき得る。標的タンパク質の活性には、例えば、エンドサイトーシスもしくは内部移行、第2メッセンジャー系の誘導、遺伝子の上方制御もしくは下方制御、細胞外マトリックスへの結合、分子の放出、または高次構造の変化が含まれ得る。この場合、リガンドは公知である必要はない。選択はまた、高処理能力アッセイ法を使用することを含み得る。

20

【0149】

単量体ドメインおよび/または免疫ドメインがリガンドに結合するその能力に基づいて選択される場合、その選択の根拠には、通常、高い親和性が予測される、遅い解離速度に基づく選択が含まれ得る。リガンドの結合価はまた、選択された単量体ドメインおよび/または免疫ドメインの平均結合親和性を制御するために変動され得る。リガンドは、例えば、競合物質化合物を含めることによって、希釈によって、または当業者に公知の他の方法によって、変動させた濃度で表面または基質に結合され得る。高濃度(結合価)の所定のリガンドは、比較的低い親和性を有する単量体ドメインを富化するために使用され得、一方低濃度(結合価)は、より高い親和性の単量体ドメインを優先的に富化し得る。

30

【0150】

種々のレポーターディスプレイのベクターまたは系は、本発明の単量体ドメイン、免疫ドメイン、および/または多量体をコードする核酸を発現するため、および所望の活性について試験するために使用され得る。例えば、ファージディスプレイ系は、単量体ドメインがファージ表面に融合タンパク質として発現される系である(Pharmacia, Milwaukee Wis.)。ファージディスプレイは、単量体ドメインおよび/または免疫ドメインをコードするポリペプチド配列の、繊維状バクテリオファージの表面上での提示を(代表的には、バクテリオファージの外殻タンパク質との融合物として)含み得る。

40

【0151】

一般的に、これらの方法において、各々のファージ粒子または細胞は、天然のファージまたは細胞のタンパク質配列に加えて、ディスプレイされたポリペプチドの単一の種をディスプレイする個々のライブラリーメンバーとして機能する。複数の核酸が、融合タンパ

50

ク質の転写を生じる部位でファージDNAにクローニングされ、融合タンパク質の一部が複数の核酸によってコードされる。核酸分子を含むファージは、細胞中で複製および転写を受ける。融合タンパク質のリーダー配列は、ファージ粒子の先端への融合タンパク質の輸送を方向付ける。従って、この核酸によって部分的にコードされる融合タンパク質は、上記または下記に記載した方法による検出および選択のために、ファージ粒子上でディスプレイされる。例えば、ファージライブラリーは、所定の（所望の）リガンドとインキュベートされ得、その結果、リガンドに結合する融合タンパク質配列を提供するファージ粒子は、所定のリガンドに結合するポリペプチド配列を提供しないファージ粒子から、差次的に分配される。例えば、この分離は、所定のリガンドを固定化することによって提供され得る。次いで、固定化されたリガンドに結合するファージ粒子（すなわち、ライブラリーメンバー）は回収され、親和性富化およびファージ複製の引き続くラウンドのために、選択されたファージの亜集団を増幅するために複製される。親和性富化およびファージ複製の数回のラウンドの後で、このように選択されたファージライブラリーメンバーは単離され、ディスプレイされたポリペプチド配列をコードするヌクレオチド配列が決定され、それによって、所定のリガンドに結合するポリペプチドの配列を同定する。このような方法は、PCT特許公報第91/17271号、同第91/18980号、同第91/19818号、および同第93/08278号にさらに記載されている。

【0152】

他のディスプレイ系の例には、リボソームディスプレイ、ヌクレオチド結合ディスプレイ（例えば、米国特許第6,281,344号；同第6,194,550号；同第6,207,446号；同第6,214,553号；および同第6,258,558号を参照されたい）、ポリソームディスプレイ、細胞表面ディスプレイなどが挙げられる。細胞表面ディスプレイには、種々の細胞（例えば、大腸菌細胞、酵母細胞、および/または哺乳動物細胞）が挙げられる。細胞がディスプレイとして使用された場合、核酸（例えば、PCR増幅、続いて消化によって得られたもの）は、細胞に導入され翻訳される。任意で本発明の単量体ドメインまたは多量体をコードするポリペプチドが導入され得る（例えば、細胞への注入によって）。

【0153】

本発明はまた、本発明の方法によって産生される組成物を含む。例えば、本発明は、本発明の方法によって作製された単量体ドメインを含む（1つおよび/または複数の）ライブラリーより選択または同定された単量体ドメインを含む。

【0154】

本発明はまた、単量体ドメイン、免疫ドメインのライブラリーならびに単量体ドメインおよび/または免疫ドメインをコードする核酸のライブラリーを提供する。このライブラリーには、単量体ドメインおよび/または免疫ドメインをコードする、例えば、約100、250、500またはそれ以上の核酸が含まれ得るか、またはこのライブラリーには、単量体ドメインおよび/または免疫ドメインをコードする、例えば、約100、250、500またはそれ以上のポリペプチドが含まれ得る。ライブラリーには、同じシステインフレーム（例えば、AドメインまたはEGF様ドメイン）を含む単量体ドメインが含まれ得る。

【0155】

いくつかの態様において、改変体は、単量体ドメインおよび/または免疫ドメイン（例えば、LDL受容体クラスAドメイン）の同じファミリー由来の2つまたはそれ以上の異なる配列を組換えることによって生成される。または、異なるファミリー由来の2つまたはそれ以上の異なる単量体ドメインおよび/または免疫ドメインが組み合わされて多量体を形成し得る。いくつかの態様において、多量体は、以下のファミリークラスの少なくとも1つの単量体または単量体改変体から形成される：EGF様ドメイン、クリングルドメイン、I型フィブロネクチンドメイン、II型フィブロネクチンドメイン、III型フィブロネクチンドメイン、PANドメイン、Glaドメイン、SRCRドメイン、クニッツ/ウシ脾臓トリプシンインヒビタードメイン、カザル型セリンプロテアーゼインヒビタードメイン、トレフォイル（P型）ドメイン、C型フォンウィルブランド因子ドメイン、アナフィラトキシン様ドメイン、CUBドメイン、I型サイログロブリン反復、LDL受容体クラスAドメイン、スシドメイン

、リンクドメイン、I型トロンスポンジンドメイン、免疫グロブリン様ドメイン、C型レクチンドメイン、MAMドメイン、A型フォンウィルブランド因子ドメイン、ソマトメジンBドメイン、WAP型4ジスルフィドコアドメイン、C型F5/8ドメイン、ヘモペキシンドメイン、SH2ドメイン、SH3ドメイン、ラミニン型EGF様ドメイン、C2ドメイン、およびこれらの誘導体。別の態様において、単量体ドメインおよび異なる単量体ドメインには、Pfamデータベースおよび/またはSMARTデータベースにおいて見い出される1つまたは複数のドメインが含まれ得る。上記の方法によって作製されるライブラリー、そのライブラリーの1つまたは複数のメンバーを含む1つまたは複数の細胞、およびそのライブラリーの1つまたは複数のメンバーを含む1つまたは複数のディスプレイもまた、本発明に含まれる。

【0156】

10

任意で単量体ドメインをコードする核酸文字列のデータセットは、例えば、単量体ドメインをコードする第1の文字列を、異なる単量体ドメインをコードする1つまたは複数の文字列と混合し、それによって単量体ドメイン（本明細書中に記載されているドメインを含む）をコードする核酸文字列のデータセットを作製することによって生成され得る。別の態様において、単量体ドメインおよび異なる単量体ドメインには、Pfamデータベースおよび/またはSMARTデータベースにおいて見い出される1つまたは複数のドメインが含まれ得る。本方法は、単量体ドメインをコードする第1の文字列および異なる単量体ドメインをコードする1つまたは複数の第2の文字列をコンピュータに挿入する工程、ならびに、多量体文字列またはそのライブラリーを、コンピュータで生成する工程をさらに包含し得る。

【0157】

20

ライブラリーは、所望の特性（例えば、所望のリガンドもしくはリガンドの混合物の結合）についてスクリーニングされ得る。例えば、単量体ドメインのライブラリーのメンバーは、公知であるかまたは知られていない、リガンドまたはリガンドの混合物への結合についてディスプレイされかつあらかじめスクリーニングされ得る。次いで、単量体ドメイン配列は、変異誘発され得るか（例えば、組み換えられ、化学的に変化されるなど）、さもなければ変化され、新規な単量体ドメインが、改善された親和性を有するリガンドまたはリガンドの混合物への結合について再度スクリーニングされ得る。選択された単量体ドメインは、合わされるかまたは連結されて多量体を形成し得、次いで、この多量体は、リガンドまたはリガンドの混合物に対する改善された親和性もしくは結合活性、または変化された特異性についてスクリーニングされ得る。変化された特異性は、特異性が広げられること（例えば、複数の関連するウイルスの結合）を意味し得るか、または任意で変化した特異性は、特異性が狭められること（例えば、リガンドの特定の領域内での結合）を意味し得る。当業者は、結合活性を計算するために利用可能である、多くの方法が存在することを認識している。例えば、Mammenら、*Angew Chem Int. Ed.* 37:2754-2794 (1998)；Mullerら、*Anal. Biochem.* 261: 149-158 (1998)を参照されたい。

30

【0158】

当業者は、結果を最適化するために、変種を生成する工程、および所望の特性についてスクリーニングする工程が反復され得る（すなわち、再帰的に実行される）ことを認識する。例えば、ファージディスプレイライブラリーまたは他の同様の形式において、ライブラリーの第1のスクリーニングは、比較的低いストリンジェンシーで実行され得、それによって標的分子と結合する可能な限り多くの粒子が選択される。次いで、選択された粒子は単離され得、単量体または多量体をコードするポリヌクレオチドが粒子から単離され得る。次いで、さらなる変種がこれらの配列から生成され得、引き続いてより高い親和性でスクリーニングされ得る。図7は、選択の一般的サイクルおよび変種の生成を例証する。

40

【0159】

核酸およびポリペプチドの組成物は本発明に含まれる。例えば、本発明は、複数の異なる核酸を提供し、ここで各々の核酸は少なくとも1つの単量体ドメインまたは免疫ドメインをコードする。いくつかの態様において、少なくとも1つの単量体ドメインは、以下からなる群より選択される：EGF様ドメイン、クリングルドメイン、I型フィブロネクチンドメイン、II型フィブロネクチンドメイン、III型フィブロネクチンドメイン、PANドメイン

50

、Glaドメイン、SRCRドメイン、クニッツ/ウシ膵臓トリプシンインヒビタードメイン、カザル型セリンプロテアーゼインヒビタードメイン、トレフォイル（P型）ドメイン、C型フォンウィルブランド因子ドメイン、アナフィラトキシン様ドメイン、CUBドメイン、I型サイログロブリン反復、LDL受容体クラスAドメイン、スシドメイン、リンクドメイン、I型トロンボスポンジンドメイン、免疫グロブリン様ドメイン、C型レクチンドメイン、MAMドメイン、A型フォンウィルブランド因子ドメイン、ソマトメジンBドメイン、WAP型4ジスルフィドコアドメイン、C型F5/8ドメイン、ヘモペキシンドメイン、SH2ドメイン、SH3ドメイン、ラミニン型EGF様ドメイン、C2ドメイン、およびこれらの1つまたは複数の改変体。適切な単量体ドメインにはまた、Pfamデータベースおよび/またはSMARTデータベースにおいて列挙されるものが含まれる。

10

【0160】

本発明はまた、複数の単量体ドメインおよび/または免疫ドメインを含む1つまたは複数のポリペプチドをコードする組換え核酸を提供する。この単量体ドメインは、天然に存在するポリペプチドと比較して、順番または配列が変化している。例えば、天然に存在するポリペプチドは、以下からなる群より選択され得る：EGF様ドメイン、クリングルドメイン、I型フィブロネクチンドメイン、II型フィブロネクチンドメイン、III型フィブロネクチンドメイン、PANドメイン、Glaドメイン、SRCRドメイン、クニッツ/ウシ膵臓トリプシンインヒビタードメイン、カザル型セリンプロテアーゼインヒビタードメイン、トレフォイル（P型）ドメイン、C型フォンウィルブランド因子ドメイン、アナフィラトキシン様ドメイン、CUBドメイン、I型サイログロブリン反復、LDL受容体クラスAドメイン、スシドメイン、リンクドメイン、I型トロンボスポンジンドメイン、免疫グロブリン様ドメイン、C型レクチンドメイン、MAMドメイン、A型フォンウィルブランド因子ドメイン、ソマトメジンBドメイン、WAP型4ジスルフィドコアドメイン、C型F5/8ドメイン、ヘモペキシンドメイン、SH2ドメイン、SH3ドメイン、ラミニン型EGF様ドメイン、C2ドメイン、およびこれらの1つまたは複数の改変体。別の態様において、天然に存在するポリペプチドは、Pfamデータベースおよび/またはSMARTデータベースにおいて見い出される単量体ドメインをコードする。

20

【0161】

本発明の方法によって作製された組成物（例えば、単量体ドメインおよび/または免疫ドメイン、ならびに多量体およびそのライブラリー）を含む本発明のすべての組成物は、アフィニティー材料のマトリックスに任意で結合させ得る。アフィニティー材料の例には、ビーズ、カラム、固体支持体、マイクロアレイ、試薬支持体の他のプールなどが含まれる。

30

【0162】

2. 多量体（組換えモザイクタンパク質またはコンビナトリアルモザイクタンパク質とも呼ばれる）

多量体を生成するための方法は、本発明の特徴である。多量体は、少なくとも2つの単量体ドメインおよび/または免疫ドメインを含む。例えば、本発明の多量体は、2～約10個の単量体ドメインおよび/または免疫ドメイン、2～約8個の単量体ドメインおよび/または免疫ドメイン、約3～約10個の単量体ドメインおよび/または免疫ドメイン、約7個の単量体ドメインおよび/または免疫ドメイン、約6個の単量体ドメインおよび/または免疫ドメイン、約5個の単量体ドメインおよび/または免疫ドメイン、または約4個の単量体ドメインおよび/または免疫ドメインを含み得る。いくつかの態様において、多量体は、少なくとも3つの単量体ドメインおよび/または免疫ドメインを含む。代表的には、単量体ドメインは、関心対象の標的分子への結合についてあらかじめ選択される。

40

【0163】

いくつかの態様において、各単量体ドメインは、1つの標的分子に特異的に結合する。これらの態様のいくつかにおいて、各単量体は、標的分子上の異なる位置（エピトープに類似）に結合する。同じ標的分子に結合する複数の単量体ドメインおよび/または免疫ドメインは、各々の個々の単量体と比較して、標的分子に対する、多量体の改善された結合

50

活性を生じる結合活性効果を生じる。いくつかの態様において、多量体は、単量体ドメイン単独の結合活性の少なくとも約1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、20倍、50倍、または100倍の結合活性を有する。

【0164】

別の態様において、多量体は、異なる標的分子に対する特異性を有する単量体ドメインを含む。例えば、このような多様な単量体ドメインの多量体は、ウイルス複製系の異なる成分またはウイルスの異なる血清型に特異的に結合し得る。いくつかの態様において、少なくとも1つの単量体ドメインは、毒素に結合し、少なくとも1つの単量体ドメインは細胞表面分子に結合し、それによって、毒素を標的化する機構として作用する。いくつかの態様において、多量体の少なくとも2つの単量体ドメインおよび/または免疫ドメインは、標的の細胞または組織中の異なる標的分子に結合する。同様に、治療用の分子は、治療剤を、細胞または組織結合の特異性を有する他の単量体ドメインおよび/または免疫ドメインもまた含む、多量体の単量体に結合させることによって、細胞または組織に標的化され得る。

10

【0165】

多量体は、種々の単量体ドメインの組み合わせを含み得る。例えば、単一の多量体において、選択された単量体ドメインは、同じかまたは同一であり得、任意で異なるかまたは非同一であり得る。さらに、選択された単量体ドメインは、同じ単量体ドメインファミリー由来の種々の異なる単量体ドメイン、または異なるドメインファミリー由来の種々の単量体ドメイン、または、任意で両方の組み合わせを含み得る。

20

【0166】

本発明の実施において生成される多量体は、以下のいずれかであり得る。

(1) ホモ多量体 (同じドメインの多量体、すなわち、A1-A1-A1-A1) ;

(2) 同じドメインクラスの異なるドメインのヘテロ多量体、例えば、A1-A2-A3-A4。例えば、ヘテロ多量体には、A1、A2、A3、およびA4が異なる、特にLDL受容体クラスAドメインの天然には存在しない改変体である多量体、または、A1、A2、A3、およびA4のいくつか、LDL受容体クラスAドメインの天然に存在する改変体である多量体が含まれる (例えば、図10を参照されたい)。

(3) 異なる単量体ドメインクラス (例えば、A1-B2-A2-B1) 由来のドメインのヘテロ多量体。例えば、A1およびA2は、LDL受容体クラスA由来の2つの異なる単量体ドメイン (天然に存在するかまたは天然には存在しないかのいずれか) であり、B1およびB2は、EGF様ドメインクラス由来の2つの異なる単量体ドメイン (天然に存在するかまたは天然には存在しないかのいずれか) である場合。

30

【0167】

本発明の実施において使用される多量体ライブラリーには、ホモ多量体、同じ単量体クラスの異なる単量体ドメイン (天然または非天然) のヘテロ多量体、または異なる単量体クラス由来の単量体ドメイン (天然または非天然) のヘテロ多量体、またはそれらの組み合わせが含まれ得る。免疫ドメインをふくむ例示的なヘテロ多量体には、例えば、ミニボディー、単一ドメイン抗体およびFabの二量体 (ここでその二量体は共有結合的リンカーによって連結されている) が含まれる。他の例示的な多量体には、ミニボディー、単一ドメイン抗体およびFabの、例えば、三量体およびより高次の多量体 (例えば、四量体) が含まれる。なおより例示的な多量体には、例えば、単鎖抗体断片の二量体、三量体、およびより高レベルの多量体 (ここで、単鎖抗体は共有結合で連結されてはいない) が含まれる。

40

【0168】

本発明は、図13ならびに図14BおよびCに示されているように、Fvsの多量体を形成するために結合したV_HおよびV_Lドメインの多量体を提供する。本明細書中で使用される場合、「Fv」という用語とは、非共有結合的に結合したV_HV_L二量体をいう。このような二量体は、例えば、図13Aに示されており、ここで重なり合った影付きおよび白色の楕円の各々の対は、単一のFvを表す。本発明のFv多量体は、同じFv由来の重鎖可変ドメインに直接的に

50

共有結合した軽鎖可変ドメインを含まない。しかし、本発明のFv多量体は、少なくとも1つまたは複数のドメインによって分離されている、同じFvの軽鎖可変ドメインおよび重鎖可変ドメインの共有結合を含み得る。例えば、多量体の例示的な高次構造は、 $V_{H1}-V_{H2}-V_{L1}-V_{L2}$ 、または $V_{H1}-V_{L2}-V_{L1}-V_{H2}$ （ここで、 $V_{L\#}$ および $V_{H\#}$ は、それぞれ、重鎖および軽鎖の可変ドメインを表す）である。

【0169】

これらまたは他の態様において、重鎖または軽鎖可変ドメインは、対応する重鎖または軽鎖の可変ドメインが結合して対応するFv（すなわち、 $Fv_1 = V_{H1}V_{L1}$ 、 $Fv_2 = V_{H2}V_{L2}$ など）を形成するように整列される。図14BおよびCは、このようなFv多量体を図示する。当業者は、このようなFv多量体が、例えば、6、8、またはそれ以上の免疫ドメインの比較的大きな多量体を形成するためにFvのさらなる重鎖または軽鎖可変ドメインを含み得ることを容易に理解する。例えば、図13を参照されたい。本発明のFv多量体中のFvはscFvではない（すなわち、 V_{L1} は V_{H1} に共有結合的に結合しているのではない）。

10

【0170】

本明細書中に記載しているような単量体ドメインはまた、免疫ドメイン含有ヘテロ多量体（すなわち、少なくとも1つの免疫ドメイン改変体および1つの単量体ドメイン改変体を有する多量体）中で容易に使用される。従って、本発明の多量体は、少なくとも1つの免疫ドメイン（例えば、ミニボディー、単ドメイン抗体、単鎖可変断片（ScFv）、またはFab断片）；および少なくとも1つの単量体ドメイン（例えば、EGF様ドメイン、クリングルドメイン、I型フィブロネクチンドメイン、II型フィブロネクチンドメイン、III型フィブロネクチンドメイン、PANドメイン、Glaドメイン、SRCRドメイン、クニッツ/ウシ膵臓トリプシンインヒビタードメイン、カザル型セリンプロテアーゼインヒビタードメイン、トレフォイル（P型）ドメイン、C型フォンウィルブランド因子ドメイン、アナフィラトキシン様ドメイン、CUBドメイン、I型サイログロブリン反復、LDL受容体クラスAドメイン、スシドメイン、リンクドメイン、I型トロンプスポンジンドメイン、免疫グロブリン様ドメイン、C型レクチンドメイン、MAMドメイン、A型フォンウィルブランド因子ドメイン、ソマトメジンBドメイン、WAP型4ジスルフィドコアドメイン、C型F5/8ドメイン、ヘモペキシンドメイン、SH2ドメイン、SH3ドメイン、ラミニン型EGF様ドメイン、C2ドメイン、またはこれらの改変体）を有し得る。

20

【0171】

ドメインが連結され多量体を形成する前にドメインが選択される必要はない。一方、多量体に連結される前に、ドメインは、標的分子に結合する能力について選択され得る。従って、例えば、多量体は、1つの標的分子に結合する2つのドメインおよび第2の標的分子に結合する第3のドメインを含み得る。

30

【0172】

選択された単量体ドメインはリンカーによって連結されて多量体を形成する。例えば、リンカーは、多量体中の各々の分離した個別の単量体ドメインの間に位置する。代表的には、免疫ドメインもまた、リンカー部分を介して互いに、または単量体ドメインに連結される。免疫ドメイン改変体を一緒に連結するために容易に使用され得るリンカー部分は、単量体ドメイン改変体の多量体について記載されたものと同じである。免疫ドメイン改変体を他のドメインに連結して多量体にするために適切な例示的なリンカー部分は本明細書中に記載されている。

40

【0173】

選択された単量体ドメインをリンカーを介して連結することは、当技術分野において公知の種々の技術を使用して達成され得る。例えば、選択された単量体ドメインをコードするポリヌクレオチドのコンビナトリアルアセンブリーは、制限酵素消化、および再ライゲーションによって、PCRに基づく、自己プライミング重複反応、またはその他の組換え法によって、またはその他の組換え法によって達成され得る。リンカーは、単量体が標的の多量体に結合するその能力について同定される前に、または単量体が標的の多量体に結合する能力について選択された後で、単量体に結合され得る。

50

【0174】

リンカーは、天然に存在するものであるか、合成であるか、または両方の組み合わせであり得る。例えば、合成リンカーは、ランダムリンカー（例えば、配列およびサイズの両方において）であり得る。1つの局面において、ランダムリンカーは、十分にランダム化された配列を含み得るか、または任意でランダムリンカーは、天然のリンカー配列に基づき得る。リンカーは、例えば、ポリペプチドでない部分、ポリヌクレオチド、ポリペプチドなどを含み得る。

【0175】

リンカーは、強固であるか、または代替的には、柔軟性があるか、またはその両方の組み合わせであり得る。リンカーの柔軟性は、リンカーと、リンカーが相互作用する単量体の両方の組成物の関数であり得る。リンカーは、2つの選択した単量体ドメインを連結し、単量体ドメインを分離した個別の単量体ドメインとして維持する。リンカーは、分離した個別の単量体ドメインが協同し、なお分離した特性（例えば、同じリガンドについての多量体中の複数の結合部位、または、例えば、異なるリガンドについての多量体中の複数の分離した結合部位）を維持することを可能にし得る。場合によっては、2個の連結された単量体ドメインの間またはリンカーと単量体ドメインとの間にジスルフィドブリッジが存在する。いくつかの態様において、単量体ドメインおよび/またはリンカーは金属結合中心を含む。

【0176】

2つまたはそれ以上の単量体ドメイン（すなわち、ポリペプチド鎖）が連結される、特定の場

10

20

【0177】

合の場合についての適切なリンカーを選択することは、種々のパラメーター（例えば、単量体ドメインの性質、ポリペプチド多量体が結合すべき標的の構造および性質ならびに/またはタンパク質分解および酸化に対するペプチドリンカーの安定性を含む）に依存し得る。

【0178】

本発明は、一旦所望の単量体ドメイン/改変体が同定されると、リンカーの選択を最適化するための方法を提供する。一般的に、単量体ドメイン組成に関して固定されているが、リンカーの組成および長さが変動し得る組成を有する多量体のライブラリーは、上記のように、容易に調製およびスクリーニングされ得る。

30

【0179】

この目的のための適切な長さは、少なくとも1アミノ酸残基、および代表的には約50アミノ酸残基よりも少ない長さ（例えば、2~25アミノ酸残基、5~20アミノ酸残基、5~15アミノ酸残基、8~12アミノ酸残基、または11アミノ酸残基）の長さである。同様に、リンカーをコードするポリペプチドは、サイズにおいて、例えば、約2~約15アミノ酸、約3~15アミノ酸、約4~12アミノ酸、約10アミノ酸、約8アミノ酸、または約6アミノ酸の範囲であり得る。核酸（例えば、DNA、RNA、または両方の組み合わせ）を含有する方法および組成物において、リンカー配列を含むポリヌクレオチドは、例えば、約6ヌクレオチド~約45ヌクレオチドの間、約9ヌクレオチド~約45ヌクレオチドの間、約12ヌクレオチド~約36ヌクレオチドの間、約30ヌクレオチド、約24ヌクレオチド、または約18ヌクレオチドであり得る。同様に、リンカーポリペプチドに含めるために選択されたアミノ酸残基は

40

50

、ポリペプチド多量体の活性または機能を有意に妨害しない特性を示すべきである。従って、ペプチドリinkerは、全体では、ポリペプチド多量体の活性または機能と矛盾するか、または内在性の折り畳みを妨害するか、または、問題の標的に対するポリペプチド多量体の結合を深刻に妨害する、1つもしくはそれ以上の単量体ドメイン中のアミノ酸残基と結合または他の相互作用を形成する、電荷を示さないのが当然である。

【0180】

本発明の別の態様において、ペプチドリinkerはライブラリーより選択され、ここでは、ペプチドリinker中のアミノ酸残基は、特定のポリペプチド多量体中の単量体ドメインの特定のセットのためにランダム化される。柔軟性のあるリンカーは、単量体ドメインの適切な組み合わせを見い出すために使用され得、次いで、この組み合わせは、最適な長さおよび形状を有するリンカーを得るために可変性のリンカーのこのランダムライブラリーを使用して最適化される。最適なリンカーは、標的への結合に関与し、かつ、標的に結合しない場合のポリペプチド多量体中での互いに対する単量体ドメインの動きを制限する、最小の数の正しい型のアミノ酸残基を含み得る。

10

【0181】

天然に存在するペプチドリinkerならびに人工のペプチドリinkerをポリペプチドに連結して新規な連結した融合ポリペプチドにするための使用は文献中で周知である。

(Hallewell *et al.* (1989), *J. Biol. Chem.* 264, 5260-5268; Alfthan *et al.* (1995), *Protein Eng.* 8, 725-731; Robinson & Sauer (1996), *Biochemistry* 35, 109-116; Khandekar *et al.* (1997), *J. Biol. Chem.* 272, 32190-32197; Fares *et al.* (1998), *Endocrinology* 139, 2459-2464; Smallshaw *et al.* (1999), *Protein Eng.* 12, 623-630; US 5,856,456)

20

【0182】

ペプチドリinkerの使用が広範囲に及んでいる1つの例は、単鎖抗体（軽鎖（ V_L ）および重鎖（ V_H ）の可変領域が人工のリンカーを介して連結されている）の産生についてであり、この特定の分野において膨大な刊行物が存在する。広範に使用されるペプチドリinkerは、Gly-Gly-Gly-Gly-Ser（配列番号：240）アミノ酸配列の3反復（ $(\text{Gly}_4\text{Ser})_3$ ）からなる15merである。他のリンカーは使用されてきており、ファージディスプレイ技術ならびに選択的感染性ファージ技術が適切なリンカー配列を多様化および選択するために使用されてきた（Tangら、(1996) *J. Biol. Chem.* 271, 15682-15686；Henneckeら、(1998)、*Protein Eng.* 11, 405-410）。ペプチドリinkerは、ヘテロ二量体タンパク質およびホモ二量体タンパク質（例えば、T細胞受容体、 λ Croリプレッサー、P22ファージArcリプレッサー、IL-12、TSH、FSH、IL-5、およびインターフェロン- γ ）中の個々の鎖を接続するために使用されてきた。ペプチドリinkerはまた、融合ポリペプチドを作製するために使用されてきた。種々のリンカーが使用されてきており、Arcリプレッサーファージディスプレイの場合には、単鎖タンパク質の安定性の増加のために、ファージディスプレイがリンカーの長さおよび組成を最適化するために使用されてきた（RobinsonおよびSauer (1998)、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 5929-5934）。

30

【0183】

別のタイプのリンカーはインティン（すなわち、単鎖ポリペプチドとともに発現されるが、タンパク質スプライシングによって翻訳後に除去されるペプチドストレッチ）である。インティンの使用は、F.S.Gimble、*Chemistry and Biology*、1998、第5巻、第10号、251～256頁によって概説されている。

40

【0184】

適切なリンカーを得るためのさらに別の方法は、単純なリンカー（例えば、 $(\text{Gly}_4\text{Ser})_n$ ）（配列番号：240）を、ランダム変異誘発を通して最適化することによる。

【0185】

上記に言及したように、ペプチドリinkerは、少なくともある程度の柔軟性を有することが一般的に好ましい。従って、いくつかの態様において、ペプチドリinkerは、1～25

50

のグリシン残基、5～20のグリシン残基、5～15のグリシン残基、または8～12のグリシン残基を含む。ペプチドリンカーは、代表的には、少なくとも50%のグリシン残基（例えば、少なくとも75%のグリシン残基）を含む。本発明のいくつかの態様において、ペプチドリンカーは、グリシン残基のみを含む。

【0186】

ペプチドリンカーは、グリシン残基に加えて、他の残基、特に、Ser、Ala、およびThrからなる群より選択される残基、特にSerを含む。従って、特定のペプチドリンカーの1つの例には、アミノ酸配列Gly_x-Xaa-Gly_y-Xaa-Gly_z（配列番号：203）を有するペプチドリンカーが含まれ、ここで各Xaaは、独立して、

Ala, Val, Leu, Ile, Met, Phe, Trp,

10

Pro, Gly, Ser, Thr, Cys, Tyr, Asn, Gln, Lys, Arg, His, Asp および Glu

からなる群より選択され、かつx、y、zは、各々、1～5の範囲の整数である。いくつかの態様において、各Xaaは、独立して、Ser、Ala、およびThrからなる群、特にSerより選択される。より詳細には、ペプチドリンカーは、アミノ酸配列

Gly-Gly-Gly-Xaa-Gly-Gly-Gly-Xaa-Gly-Gly-

Gly（配列番号：204）

を有し、ここでXaaは、独立して、

20

Ala, Val, Leu, Ile, Met, Phe, Trp, Pro, Gly, Ser, Thr, Cys, Tyr, Asn, Gln, Lys, Arg,

His, AspおよびGlu

からなる群より選択される。いくつかの態様において、各Xaaは、独立して、Ser、Ala、およびThrからなる群、特にSerより選択される。

【0187】

いくつかの場合、ペプチドリンカーにある程度の強固さを提供することが望ましいかまたは必要であり得る。このことは、ペプチドリンカーのアミノ酸配列にプロリン残基を含ませることによって達成され得る。従って、本発明の別の態様において、ペプチドリンカーは、ペプチドリンカーのアミノ酸配列中に少なくとも1つのプロリン残基を含む。例えば、ペプチドリンカーは、アミノ酸配列の少なくとも25%、例えば少なくとも50%、例えば少なくとも75%がプロリン残基である、アミノ酸配列を有する。本発明の1つの特定の態様において、ペプチドリンカーは、プロリン残基のみを含む。

30

【0188】

本発明のいくつかの態様において、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な様式で修飾される。このようなアミノ酸残基の例は、システイン残基（次いで、非ポリペプチド部分が引き続いて結合する）であり得るか、またはアミノ酸配列は、インビボでのN-グリコシル化部位（それによって糖部分を（インビボで）ペプチドリンカーに結合する）を含み得る。さらなる選択肢は、進化したtRNAおよびtRNAシンセターゼ（たとえば米国特許出願公開公報第2003/0082575号を参照されたい）を使用して、非天然アミノ酸を単量体ドメインまたはリンカーに遺伝子的に取り込むことである。たとえば、ケト-チロシンの挿入が、発現した単量体ドメインまたは多量体への部位特異的結合を可能にする。

40

【0189】

本発明のいくつかの態様において、ペプチドリンカーは、少なくとも1つのシステイン残基（例えば、1つのシステイン残基）を含む。従って、本発明のいくつかの態様において、ペプチドリンカーは、Gly、Ser、Ala、Thr、およびCysからなる群より選択されるアミノ酸残基を含む。いくつかの態様において、このようなペプチドリンカーは、1つのシステイン残基のみを含む。

【0190】

50

さらなる態様において、ペプチドリンカーは、グリシン残基およびシステイン残基（例えば、グリシン残基およびシステイン残基のみ）を含む。代表的には、ペプチドリンカーあたり1つのみのシステイン残基が含まれる。従って、システイン残基を含む特定のペプチドリンカーの1つの例には、アミノ酸配列Gly_n-Cys-Gly_m（配列番号：205）を有するペプチドリンカーが含まれ、ここでnおよびmは、それぞれ、1～12の整数（例えば、3～9、4～8、または4～7の整数）である。より詳細には、ペプチドリンカーは、アミノ酸配列GGG-GG-C-GGGGG（配列番号：206）を有し得る。

【0191】

このアプローチ（すなわち、非ペプチド部分のための結合基を含むアミノ酸残基の導入）はまた、より強固なプロリン含有リンカーのために使用され得る。従って、ペプチドリンカーは、プロリンおよびシステイン残基（例えば、プロリン残基およびシステイン残基のみ）を含み得る。システイン残基を含む特定のプロリン含有ペプチドリンカーの1つの例には、アミノ酸配列Pro_n-Cys-Pro_m（配列番号：207）を有するペプチドリンカーが含まれ、ここでnおよびmは、それぞれ、1～12の整数、好ましくは、3～9（例えば、4～8、または4～7）の整数である。より詳細には、ペプチドリンカーは、アミノ酸配列PPPPP-C-PPP（配列番号：208）を有し得る。

10

【0192】

いくつかの態様において、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（例えば、システイン残基）の導入の目的は、その残基に、引き続いて非ポリペプチド部分を結合させることである。例えば、非ポリペプチド部分は、ポリペプチド多量体の血清中半減期を改善し得る。従って、システイン残基は、非ポリペプチド部分に共有結合的に結合され得る。非ポリペプチド部分の好ましい例には、ポリマー分子（例えば、PEGまたはmPEG、特にmPEG）、ならびに非ポリペプチド治療剤が含まれる。

20

【0193】

当業者は、システイン以外のアミノ酸残基が、非ポリペプチド部分をペプチドリンカーに結合させるために使用され得ることを認識する。このような他の残基の1つの特定の例には、非ポリペプチド部分をリジン残基に結合させることが含まれる。

【0194】

ペプチドリンカー中の非ペプチド部分に部位特異的結合基を導入することの別の可能性は、ペプチドリンカー中に、インビボのN-グリコシル化部位（例えば、1つのインビボのN-グリコシル化部位）を導入することである。例えば、1つのインビボのN-グリコシル化部位は、Gly、Ser、Ala、およびThrからなる群より選択されるアミノ酸残基を含むペプチドリンカーに導入され得る。糖部分が実際にそのインビボのN-グリコシル化部位に結合させることを保証するために、ポリペプチド多量体をコードするヌクレオチド配列が、グリコシル化を行う、真核生物発現宿主に挿入されなければならないことが理解される。

30

【0195】

インビボのN-グリコシル化部位を含むペプチドリンカーの特定の例は、アミノ酸配列Gly_n-Asn-Xaa-Ser/Thr-Gly_m（配列番号：209）、好ましくはGly_n-Asn-Xaa-Thr-Gly_m（配列番号：210）を有するペプチドリンカーであり、ここでXaaはプロリン以外の任意のアミノ酸残基であり、かつnおよびmは、それぞれ、1～8の範囲、好ましくは2～5の範囲の整数である。

40

【0196】

しばしば、ポリペプチド多量体中に存在するすべてのペプチドリンカーのアミノ酸配列は同一である。それにもかかわらず、特定の態様においては、ポリペプチド多量体中に存在するすべてのペプチドリンカーのアミノ酸配列は異なり得る。後者は、ポリペプチド多量体がポリペプチドの三量体また四量体である場合、特に、非ペプチド部分のための結合基を含むアミノ酸残基がペプチドリンカーに含まれる場合に、特に関連性があると考えられている。

【0197】

かなり頻繁に、所望の効果（例えば、血清中半減期の延長）を達成するために、ポリペ

50

プチド多量体に、ほんのわずかの、代表的には1つのみの、非ペプチド部分（例えば、mPEG、糖部分、または非ポリペプチド治療剤）を結合させることが所望されるかまたは必要である。明白なことに、2つのポリペプチドリンカーを含むポリペプチド三量体の場合には、1つのみのペプチドリンカーが、代表的には、例えば、システイン残基の導入によって修飾される必要があるが、一方、他のペプチドリンカーの修飾は、代表的には必要でない。この場合、ポリペプチド多量体（三量体）のすべての（両方の）ペプチドリンカーは異なる。

【0198】

従って、本発明のさらなる態様において、ポリペプチド多量体中に存在するすべてのペプチドリンカーのアミノ酸配列は、1つ、2つ、または3つのペプチドリンカーを除いて（例えば、1つまたは2つのペプチドリンカーを除いて、特に1つのペプチドリンカーを除いて）同一である。このペプチドリンカーは、非ペプチド部分のための結合基を含むアミノ酸残基を含むアミノ酸配列を有する。このようなアミノ酸残基の好ましい例には、インビボのN-グリコシル化部位のシステイン残基が含まれる。

【0199】

リンカーはネイティブまたは合成のリンカー配列であり得る。例示的なネイティブなリンカーには、例えば、第1のLDL受容体Aドメインの最後のシステインと第2のLDL受容体Aドメインの最初のシステインとの間の配列が含まれ、この配列はリンカー配列として使用され得る。種々のAドメイン連結の解析は、ネイティブなリンカーが、少なくとも3アミノ酸～20アミノ酸より少ない範囲（例えば、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、または18アミノ酸長）にわたることを示す。しかし、当業者は、より長いまたはより短いリンカー配列が使用され得ることを認識する。例示的なAドメインリンカー配列は図8に示される。いくつかの態様において、リンカーは、以下の配列 $A_1A_2A_3A_4A_5A_6$ （配列番号：244）の6merであり、ここで、 A_1 はアミノ酸A、P、T、Q、E、およびKより選択され； A_2 および A_3 は、C、F、Y、W、またはM以外の任意のアミノ酸であり； A_4 はアミノ酸S、G、およびRより選択され； A_5 はアミノ酸H、P、およびRより選択され；かつ A_6 はアミノ酸Tである。

【0200】

単量体ドメインおよび/または免疫ドメインから多量体を生成するための方法は、選択されたドメインを少なくとも1つのリンカーと連結して、少なくとも1つの多量体を生成する工程を包含し得る。例えば、多量体は少なくとも2つの単量体ドメインおよび/または免疫ドメインならびにリンカーを含み得る。次いで、多量体は、選択された単量体ドメインと比較して、所望のリガンドまたはリガンドの混合物に対する、改善された結合活性もしくは親和性または変化した特異性についてスクリーニングされる。この方法によって作製された多量体の組成は、本発明に含まれ得る。

【0201】

他の方法において、選択された多量体ドメインは、少なくとも1つのリンカーと連結され、少なくとも2つの多量体を生成する。ここで、2つの多量体は、2つまたはそれ以上の選択された単量体ドメインおよびリンカーを含む。2つまたはそれ以上の多量体は、選択された単量体ドメインと比較して、所望のリガンドまたはリガンドの混合物に対する、改善された結合活性もしくは親和性または変化した特異性についてスクリーニングされる。上記の方法によって作製された2つまたはそれ以上の多量体の組成もまた、本発明の特徴である。

【0202】

代表的には、本発明の多量体は、単一の個別のポリペプチドである。部分的リンカードメイン-部分的リンカー部分の多量体は、複数のポリペプチドの結合物であり、各々が部分的リンカードメイン-部分的リンカー部分に対応する。

【0203】

比較的大きな標的に結合することができる多量体が望まれる場合、それらの多量体は、「ウォーキング」選択法によって生成することができる。この方法は、単量体ドメインの

ライブラリーを提供し、第一の標的分子への親和性に関して単量体ドメインのライブラリーをスクリーニングすることによって実施される。ひとたび標的に結合する少なくとも1個の単量体が同定された場合には、その単量体を新たなライブラリーまたは元の単量体ドメインライブラリーの残りの各メンバーに共有結合させる。そして、この新たな多量体(二量体)ライブラリーを、増大した親和性で標的に結合する多量体に関してスクリーニングし、増大した親和性で標的に結合する多量体を同定することができる。「ウォーキング」単量体選択法は、リンカー長さの制約を与えられる場合には互いに加算的または相乗的に作用することができる単量体で構成された多量体を構築する方法を提供する。このウォーキング技術は、高い親和性で大きな標的タンパク質に結合することができる多量体を選択し、構築する場合に非常に有用である。ウォーキング法を繰り返し実施してより多くの単量体を追加して、それにより、いっしょに連結された2、3、4、5、6、7、8またはそれを超える数の単量体を含む多量体を得ることができる。

10

【0204】

いくつかの態様において、選択された多量体は、2つより多いドメインを含む。このような多量体は、段階的な様式で生成され得る。例えば、ここでは、各々の新規なドメインの付加が個々に試験され、ドメインの効果は連続的な様式で試験される。例えば、図6を参照されたい。別の態様において、ドメインは、2つより多いドメインを含む多量体を形成するために連結され、どの程度小さい多量体が結合するか、または代替的には、どのように各々のドメインが結合するかについての事前の知見なしに、結合について選択される。

20

【0205】

本発明の方法はまた、多量体を進化させる方法を包含する。この方法は、例えば、以下の工程のいずれかまたはすべてを含み得る。複数の異なる核酸を提供する工程、ここで各核酸は単量体ドメインをコードしている；複数の異なる核酸を翻訳する工程、これは複数の異なる単量体ドメインを提供する；複数の異なる単量体ドメインを、所望のリガンドまたはリガンドの混合物の結合についてスクリーニングする工程；所望のリガンドまたはリガンドの混合物を結合する複数の異なる単量体ドメインのメンバーを同定する工程、これは、選択された単量体ドメインを提供する；選択された単量体ドメインを少なくとも1つのリンカーと連結し、少なくとも1つの多量体を生成する工程、ここで少なくとも1つの多量体は、少なくとも2つの選択された単量体ドメインおよび少なくとも1つのリンカーを含む；ならびに、選択された単量体ドメインと比較して、所望のリガンドまたはリガンドの混合物に対する、改善された結合活性もしくは親和性または変化した特異性について少なくとも1つの多量体をスクリーニングする工程。

30

【0206】

さらなる変種は、ドメイン間に異なる長さおよび組成のリンカーを挿入することによって導入され得る。このことは、ドメイン間の、最適なリンカーの選択を可能にする。いくつかの態様において、リンカーの最適な長さおよび組成は、最適なドメインの結合を可能にする。いくつかの態様において、特定の結合親和性を有するドメインは、異なるリンカーを介して連結され、最適なリンカーが結合アッセイ法において選択される。例えば、ドメインは、所望の結合特性について選択され、その後、それらは、種々のリンカーを含むライブラリーに形成される。次いで、このライブラリーは、最適なリンカーを同定するためにスクリーニングされ得る。または、多量体ライブラリーは、ドメインまたはリンカーの、標的分子結合に対する効果が未知の場合に形成され得る。

40

【0207】

本発明の方法はまた、複数の単量体ドメインおよび/または免疫ドメインを提供することによって、1つまたは複数の選択された多量体を生成する工程を包含する。複数の単量体ドメインおよび/または免疫ドメインは、所望のリガンドまたはリガンドの混合物の結合についてスクリーニングされる。所望のリガンドまたはリガンドの混合物を結合する複数のドメインのメンバーが同定され、それによって、所望の親和性を有するドメインを提供する。同定されたドメインは、多量体を生成するために少なくとも1つのリンカーと連

50

結され（ここで、各多量体は、少なくとも2つの選択されたドメインおよび少なくとも1つのリンカーを含む）；かつ、その多量体は、選択されたドメインと比較して、所望のリガンドまたはリガンドの混合物に対する、改善された親和性もしくは結合活性または変化した特異性についてスクリーニングされ、それによって1つまたは複数の選択された多量体を同定する。

【0208】

多量体の選択は、単量体ドメインを同定するための上記に述べた方法を含む種々の技術を使用して達成され得る。他の選択方法には、例えば、選択された単量体ドメインと比較した、リガンドに対する改善された親和性もしくは結合活性または変化した特異性に基づく選択が挙げられる。例えば、選択は、特定の細胞型、または関連する細胞またはタンパク質の型のセット（例えば、異なるウイルス血清型）への選択的結合に基づき得る。本発明において言及されるように、例えば、リガンドの結合活性について選択された特性の最適化は、次いで、ドメインを組み換えること、ならびに、個々の単量体ドメインもしくはリンカードメインのアミノ酸配列、またはそのようなドメインをコードするヌクレオチド配列を操作することによって達成され得る。

10

【0209】

多量体を同定するための1つの方法は、多量体をディスプレイすることによって達成され得る。単量体ドメインについてと同様に、多量体は、任意で上記のような種々のディスプレイ系（例えば、ファージディスプレイ、リボソームディスプレイ、ポリソームディスプレイ、ヌクレオチド結合ディスプレイ（例えば、米国特許第6,281,344号；同第6,194,550号；同第6,207,446号；同第6,214,553号；および同第6,258,558号を参照されたい）および/または細胞表面ディスプレイ）上で発現またはディスプレイされる。細胞表面ディスプレイは、大腸菌細胞、酵母細胞、または哺乳動物細胞を含み得るがこれらに限定されない。さらに、複数の結合部位を有する多量体のディスプレイライブラリーは、リガンドまたは複数のリガンドについての結合活性または親和性または変化した特異性についてパニング（pan）され得る。

20

【0210】

単量体または多量体は、ツーハイブリッドスクリーニング検定法を使用して、酵母細胞中での標的結合活性に関してスクリーニングすることができる。このタイプのスクリーニングでは、スクリーニングする単量体または多量体ライブラリーが、ライブラリーの各単量体または多量体と酵母転写活性化因子断片（すなわちGal4）との間での融合タンパク質の形成を指示するベクター中にクローニングされる。「標的」タンパク質をコードする配列が、標的とGal4タンパク質の残り（DNA結合ドメイン）との間での融合タンパク質の産生をもたらすベクター中にクローニングされる。第三のプラスミドが、Gal4結合部位のDNA配列よりも下流にレポーター遺伝子を含有する。標的タンパク質に結合することができる単量体が、それとともにGal4活性化ドメインをもたらし、したがって機能性Gal4タンパク質を再構成する。レポーター遺伝子よりも上流の結合部位に結合したこの機能性Gal4タンパク質が、レポーター遺伝子の発現および標的結合タンパク質としての単量体または多量体の選択を生じさせる。（Chienら、(1991) Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 88:9578, Fields S.およびSong O. (1989) Nature 340:245を参照されたい）。ライブラリースクリーニングのためのツーハイブリッド系の使用は、米国特許第5,811,238号にさらに記載されている（同じく、Silver S.C.およびHunt S.W. (1993) Mol. Biol. Rep. 17:155; Durfeeら、(1993) Genes Devel. 7:555、Yangら、(1992) Science 257:680、Lubanら、(1993) Cell 73:1067、Hardyら、(1992) Genes Devel. 6:801、Bartelら、(1993) Biotechniques 14:920およびVojtekら、(1993) Cell 74:205を参照されたい）。本発明を実施するためのもう一つの有用なスクリーニング系は、大腸菌/BCCP相互作用的スクリーニング系である（Germinoら、(1993) Proc. Nat. Acad. Sci. (U.S.A.) 90:993, Guarente L. (1993) Proc. Nat. Acad. Sci. (U.S.A.) 90:1639）。

30

40

【0211】

他の変種には、複数の結合化合物の使用が含まれ、その結果、単量体ドメイン、多量体

50

、またはこれらの分子のライブラリーが、異なる結合特異性を有する多様なリガンドまたは化合物について同時にスクリーニングされ得る。複数のあらかじめ予定されたリガンドまたは化合物は、単一のライブラリー中で同時にスクリーニングされ得るか、または多数の単量体ドメインまたは多量体に対して連続的にスクリーニングされ得る。1つの変種において、各々が分離したビーズ（またはビーズのサブセット）上にコードされている複数のリガンドまたは化合物は、適切な結合条件下で、単量体ドメイン、多量体、またはこれらの分子のライブラリーを混合およびインキュベートされ得る。次いで、複数のリガンドまたは化合物を含むビーズのコレクションは、アフィニティー選択によって、選択された単量体ドメイン、選択された多量体またはライブラリーメンバーを単離するために使用され得る。一般的に、引き続くアフィニティースクリーニングのラウンドは、ビーズ、そのサブセット、または1つもしくは2つのみの個々のリガンドもしくは化合物を含むビーズの同じ混合物を含み得る。このアプローチは効率的なスクリーニングを提供し、かつ実験室レベルの自動化、バッチプロセス、および高スループットスクリーニング方法に適合可能である。

10

【0212】

別の態様において、多量体は、複数のリガンドを結合する能力について同時にスクリーニングされ得る。ここで、各々のリガンドは、異なる標識を含む。例えば、各々のリガンドは、異なる蛍光標識で標識され得、多量体または多量体のライブラリーと同時に接触され得る。次いで、所望の親和性を有する多量体が、所望の標識に連結された標識の存在に基づいて同定される（例えば、FACSソーティングによって）。

20

【0213】

単量体ドメインまたは多量体（以下の記載では便宜上「親和性因子」と呼ぶ）のライブラリーを多数のリガンドに対して多数の異なるフォーマットで同時にスクリーニング（パニング）することができる。たとえば、多数のリガンドを、細胞もしくは組織上に表示された（たとえば細胞または組織が、本発明の単量体ドメインまたは多量体と結合することができる多数の分子を提供する）および/または固定化された配列中の簡単な混合物中でスクリーニングすることができる。親和性因子のライブラリーは、任意で酵母またはファージディスプレイ系で表示することができる。同様に、望むならば、リガンド（たとえばcDNAライブラリー中でコードされている）を酵母またはファージディスプレイ系で表示することもできる。

30

【0214】

まず、親和性因子ライブラリーを多数のリガンドに対してパニングする。任意で得られた「ヒット」をリガンドに対して1回または複数回パニングして、得られた親和性因子個体群を濃縮する。たとえば図24を参照されたい。

【0215】

所望により、個々の親和性因子および/またはリガンドの同一性を決定することができる。いくつかの態様において、親和性因子はファージ上に表示されている。最初のスクリーニングで結合と同定された親和性因子を第一および第二の部分に分割する。たとえば図25を参照されたい。第一の部分を細菌中に感染させて、使用されるファージのタイプに依存してブランクまたは細菌コロニーを得る。発現したファージを固定化したのち、以下に記すようにファージに表示されたリガンドで探索する。

40

【0216】

第二の部分をビーズに結合するか、他の方法で固定化し、元の混合物中のリガンドの少なくともいくつかを含有するファージディスプレイライブラリーを固定化された第二の部分と接触させる。その後、第二の部分に結合するファージを溶出させ、先の段落で記載した固定化ファージと接触させる。ファージ-ファージ相互作用を検出し（たとえば、リガンド発現ファージに対して特異的なモノクローナル抗体を使用して）、得られたファージポリヌクレオチドを単離することができる。

【0217】

いくつかの態様において、親和性因子-リガンドペアの同一性を決定する。たとえば、

50

親和性因子およびリガンドがファージまたは酵母上に表示されている場合、そのペアからのDNAを単離し、配列決定することができる。いくつかの態様において、リガンドおよび親和性因子に特異的なポリヌクレオチドを増幅する。各反応のための増幅プライマーは、相補的である5'配列を含むことができ、その結果、得られる増幅産物が融合し、それにより、親和性因子の少なくとも一部およびリガンドの少なくとも一部をコードするポリヌクレオチドを含むハイブリッドポリヌクレオチドが形成する。得られたハイブリッドを使用して親和性因子またはリガンド（たとえばcDNAコードされた）ポリヌクレオチドライブラリーを探索して、親和性因子およびリガンドの両方を同定することができる。たとえば図26を参照されたい。

【0218】

10

上記方法を「ウォーキング」と簡単に組み合わせて、リガンド混合物中のリガンドにそれぞれが結合する多数の多量体を同時に生成し、同定することができる。これらの態様では、親和性因子（単量体ドメイン、免疫ドメインまたは多量体）の第一のライブラリーを多数のリガンドに対してパニングし、溶出した親和性因子を親和性因子の第一または第二のライブラリーに連結して多量体親和性因子（たとえば2、3、4、5、6、7、8、9またはそれを超える数の単量体または免疫ドメインを含む）のライブラリーを形成し、それを後で多数のリガンドに対してパニングする。この方法を繰り返し実施して、より大きな多量体親和性因子を生成し続けることができる。当然、各段階でパニングを任意で繰り返して有意な結合剤を濃縮する。

【0219】

20

上記の方法の選択された多量体は、例えば、選択された多量体を組換えまたはシャッフリングすること（組換えは、多量体間または多量体内またはその両方で起こり得る）、選択された多量体を変異させること、などによって、さらに操作され得る。これは、変化した多量体を生じ、次いで、その多量体は、選択された多量体と比較して増強された特性を有するメンバーについてスクリーニングおよび選択され得、それによって選択された、変化した多量体を作製する。

【0220】

上記および下記に示した方法によって作製したリンカー、多量体、または選択された多量体は、本発明の特徴である。多量体を含むライブラリー（例えば、本発明の方法によって作製されたか、または本発明の方法によって選択された約100、250、500、またはそれ以上のメンバーを含むライブラリー）が提供される。いくつかの態様において、ライブラリーのメンバーを含む1つまたは複数の細胞もまた、含まれる。組換えポリペプチドのライブラリー（例えば、約100、250、500、またはそれ以上の異なる組換えポリペプチドを含むライブラリー）もまた、本発明の特徴である。

30

【0221】

本発明の組成物は、アフィニティー材料（例えば、組換えポリペプチド）のマトリックスに結合し得る。アフィニティー材料の例には、例えば、ビーズ、カラム、固体支持体などが含まれる。

【0222】

本発明の実施において使用される適切なリンカーには、部分的リンカー部分の絶対（obligate）ヘテロ二量体を含む。「絶対ヘテロ二量体」という用語とは、（「親和性ペプチド」ともいわれる）本明細書中では、組成において互いに異なり、かつ非共有結合的な、特異的な様式で互いに結合し、2つのドメインを一緒に連結する2つの部分的リンカー部分の二量体をいう。特異的結合とは、他の部分的リンカーとの結合と比較して、2つの部分的リンカーが実質的に互いに結合するようなものである。従って、単一ポリペプチドとして発現される本発明の多量体とは対照的に、ヘテロ二量体を介して一緒に連結されるドメインの多量体は、個別の、部分的リンカー-単量体-部分的リンカー単位から構築される。ヘテロ二量体のアセンブリは、例えば、混合によって達成され得る。従って、部分的リンカーがポリペプチドセグメントである場合、各部分的リンカー-単量体-部分的リンカー単位は、多量体アセンブリの前に個別のペプチドとして発現され得る。ジスルフィド結

40

50

合は、正確な非共有結合的な対形成の後にペプチドと一緒に共有結合的にロックするために加えられ得る。このような絶対ヘテロ二量体を含む多量体は、図12に示される。絶対ヘテロ二量体を形成するために適切な部分的リンカー部分には、例えば、ポリヌクレオチド、ポリペプチドなどが含まれる。例えば、部分的リンカーがポリペプチドである場合、結合ドメインは、独立して、それらの独特な連結ペプチド（すなわち、部分的リンカー）と共に作製され、後に合わさって多量体を形成する。たとえば、Madden, M., Aldwin, L., Gollop, M. A., および Stemmer, W. P. C. (1993) Peptide linkers: Unique self-associative high-affinity peptide linkers. Thirteenth American Peptide Symposium, Edmonton, Canada (abstract)を参照されたい。したがって、多量体中の結合ドメインの空間的順序は、各部分リンカーのヘテロ二量体結合特異性によって指示される。部分的リンカーは、所定の非相同アミノ酸配列に特異的に結合する末端アミノ酸配列を含有することができる。このようなアミノ酸配列の例は、Bodenmullerら、The neuropeptide head activator loses its biological activity by dimerization, (1986) EMBOJ 5(8):1825-1829に記載されているヒドラ神経ペプチドヘッド活性化因子である。たとえば米国特許第5,491,074号および国際公開公報第94/28173号を参照されたい。これらの部分リンカーは、多量体を、まず単量体 - 部分リンカー単位または部分リンカー - 単量体 - 部分リンカー単位として生成し、次いでそれらを混合し、各部分リンカーの結合特異性に基づく理想的な順序に構築することを可能にする。あるいはまた、部分リンカーに連結した単量体を表面、たとえば細胞に接触させることができ、するとそこで多数の単量体が会合して、部分リンカーを介してより高い結合活性の複合体を形成することもできる。場合によっては、会合は、ランダムブラウン運動を介して形成する。

10

20

【0223】

部分的リンカーがDNA結合モチーフを含む場合、各単量体ドメインは、独占的な独特なDNA結合特異性を有するDNA結合タンパク質を含む、上流および下流の部分的リンカーを有する（すなわち、Lp-ドメイン-Lp、ここで「Lp」は部分的リンカーの表示である）。これらのドメインは、個々に作製され得、次いで、所望の順番でドメインを連結するために、これらのドメインを、適切なヌクレオチド配列（すなわち、2つの所望のドメインの部分的リンカーのDNA結合タンパク質についての特異的認識部位）を含むDNA断片と混合することによって特定の多量体に構築され得る。さらに、同じドメインは、DNA結合タンパク質認識部位の種々の組み合わせを含むDNA配列を加えることによって多くの異なる多量体に構築され得る。DNA断片におけるDNA結合タンパク質認識部位の組み合わせのさらなるランダム化は、多量体のライブラリーのアセンブリーを可能にし得る。このDNAは、インビボでの分解を妨害するために基本骨格のアナログとともに合成され得る。

30

【0224】

本発明の顕著な利点は、公知のリガンドまたは未知のリガンドが単量体ドメインおよび/または多量体を選択するために使用され得ることである。リガンドの構造に関する事前の情報、関心対象の単量体ドメインまたは関心対象の多量体を単離するために必要とされない。同定された単量体ドメイン、免疫ドメイン、および/または多量体は生物学的活性を有し得、これは、選択されたリガンドまたは所望のリガンドについての少なくとも特異的な結合親和性を含むことを意味し、かついくつかの例において、他の化合物の結合を阻止する能力、代謝経路を刺激または阻害する能力、シグナルまたはメッセンジャーとして機能する能力、細胞活性を刺激または阻害する能力などをさらに含むことを意味する。受容体のための天然リガンドがまだ同定されていない場合（オーファン受容体）、受容体のためのリガンドとして機能させるための単量体ドメインを生成することができる。これらのオーファンリガンドは、それが結合する受容体トップを阻止または活性化するように作製することができる。

40

【0225】

単一のリガンドが使用され得、または任意で種々のリガンドが単量体ドメイン、免疫ドメイン、および/または多量体を選択するために使用され得る。本発明の単量体ドメインおよび/または免疫ドメインは、単一のリガンドまたは種々のリガンドを結合し得る。本

50

発明の多量体は、単一のリガンドについての複数の個別の結合部位を有し得るか、または任意で種々のリガンドについての複数の結合部位を有し得る。

【0226】

いくつかの態様において、多量体は、異なるタンパク質についての特異性を有する単量体ドメインおよび/または免疫ドメインを含む。異なるタンパク質は、関連性があるかまたは関連性がないものであり得る。関連性があるタンパク質の例には、タンパク質ファミリーまたはウイルスの異なる血清型のメンバーが含まれる。または、多量体の単量体ドメインおよび/または免疫ドメインは、生理学的経路中の異なる分子（例えば、異なる血液凝固タンパク質）を標的化し得る。なお他の態様において、単量体ドメインおよび/または免疫ドメインは、関連性のない経路のタンパク質に結合する（例えば、2つのドメインが血液因子に結合し、2つの他のドメインおよび/または免疫ドメインが炎症関連のタンパク質に結合し、第5のドメインが血清アルブミンに結合する）。もう一つの態様では、多量体は、種々の対象病原体または汚染物質に結合する単量体ドメインで構成されている。このような多量体は、多数の病原体または汚染物質のいずれかの可能性を検出することができる単一検出物質として有用である。

10

【0227】

免疫ドメインを含む多量体の最終的な高次構造は、増強した安定性および他の所望の特徴を提供する環状構造であり得る。これらの環状多量体は、単一のポリペプチド鎖として発現され得るか、または複数の個別のポリペプチド鎖から構築され得る。個別のポリペプチド鎖から構築された環状多量体は、代表的には、2つのポリペプチド鎖のアセンブリーである。図13Bは、2つのポリペプチド鎖の環状多量体を示す。環状多量体構造の形成は、空間的な配置（すなわち、距離および順序）ならびに個々のドメインの二量体化の特異性によって非常に影響され得る。例えば、リンカーの長さ、リンカーの組成、および免疫ドメインの順序といったパラメータは、多様な構造を有する環状多量体のライブラリーを生成するために変化され得る。環状多量体のライブラリーは、所望の標的分子に結合する環状多量体を同定するために、本明細書中に記載の本発明の方法に従って容易にスクリーニングされ得る。多量体が生成された後、任意で環状化工程が、所望の結合活性についてさらにスクリーニングされ得る環状化された多量体のライブラリーを生成するために実行され得る。

20

【0228】

これらの環状環構造は、例えば、ScFv免疫ドメインの多量体から構成され得る。ここで、免疫ドメインは分割されて、その結果、ポリペプチド多量体鎖のコイル形成が、免疫ドメインにとって、それらの適切な二量体構造、例えば、

30

N末端-V_L1-V_L2-V_L3-V_L4-V_L5-V_L6-V_L7-V_L8-V_H1-V_H2-

V_H3-V_H4-V_H5-V_H6-V_H7-V_H8-C末端

または

N末端-V_L1-V_H2-V_L3-V_H4-V_H1-V_L2-V_H3-V_L4-C末端

などを形成するために必要である。このような環状構造の例は、図13Aに示されている。この環はまた、2つのポリペプチド鎖の混合によって形成され得る。ここで、各鎖は免疫ドメインの半分を含む。例えば、1つの鎖がV_Lドメインを含み、かつ他方の鎖がV_Hドメインを含み、その結果、V_L/V_Hドメインの正確な対は、2つの鎖が結合する際に一緒に伴われる。鎖の環状化は、図13Bに示されるように、ドメインのフレームの順番を変化させることに委ねられ得る（すなわち、ポリペプチド1:

40

N末端-V_L1-V_L2-V_L3-V_L4-V_L5-V_L6-V_L7-V_L8-C末端

および

N末端-V_H4-V_H5-V_H6-V_H7-V_H8-V_H1-V_H2-V_H3-C末端

50

ポリペプチド2

)。

【0229】

四量体環構造を形成する単一のポリペプチド鎖は、非常に安定であり得、かつ強い結合特性を有する。このような環の例は図13Cに示される。

【0230】

環状多量体はまた、多量体タンパク質のN末端のまたはN末端近傍の少なくとも1つの二量体化ドメインを、コードするか、または結合するか、または連結すること、および、多量体タンパク質のC末端のまたはC末端近傍の少なくとも1つの第2の二量体化ドメインを、コードするか、または結合するか、または連結すること、によって形成され得る。ここで、第1および第2の二量体化ドメインは、互いに強力な親和性を有する。本明細書中で使用される場合、「二量体化ドメイン」という用語とは、卓越した強さおよび特異性で別のタンパク質結合ドメインに結合し、例えば、二量体を形成する能力を有する(免疫学的起源かまたは免疫学的起源でないかのいずれかの)タンパク質結合ドメインをいう。多量体の環状化は、第1の二量体化ドメインおよび第2の二量体化ドメインの互いに対する結合の際に起こる。詳細には、2つのドメイン間の二量体化は、多量体に環状構造を採用させる。二量体化ドメインは、ドメインがそれ自体と同一であるタンパク質に結合するという点でホモ二量体を形成し得る。二量体化ドメインは、ドメインがそれ自体と異なるタンパク質結合ドメインに結合するという点でヘテロ二量体を形成し得る。このような二量体化ドメインについてのいくつかの使用は、例えば、米国特許第5,491,074号および国際公開公報第94/28173号に記載されている。

10

20

【0231】

いくつかの態様において、本発明の多量体は、同じかまたは他の多量体に結合して、凝集体を形成する。凝集は、例えば、2つの単量体ドメインおよび/または免疫ドメイン上の疎水性ドメインの存在によって媒介され得、2つの単量体ドメインおよび/または免疫ドメイン間の非共有結合的相互作用の形成を生じる。または、凝集は、別の多量体中の単量体ドメインについての結合特異性を有する多量体中の1つまたは複数の単量体ドメインによって促進され得る。凝集体は、単一の多量体よりもより標的結合ドメインを含み得る。また、単量体ドメインまたは多量体上の親和性ペプチドの存在により、凝集体が形成することができる。凝集体は、単一の多量体よりも多くの標的分子結合ドメインを含むことができる。

30

【0232】

細胞表面標的および第二の標的の両方に対して親和性、結合活性を有する多量体を増加させることができる。場合によっては、相互作用のス間隔および原子価を最適化する(自己組織化によって)際、膜流動性がタンパク質リンカーよりも可動性になることがある。場合によっては、多量体は、それぞれが異なる細胞上にあるか、一方が細胞上にあり、もう一方が多数の結合部位を有する分子上にある2個の異なる標的に結合する。たとえば図27および28を参照されたい。

【0233】

3. 治療的および予防的な処置の方法

40

本発明はまた、1つまたは複数の、上記の本発明の核酸またはポリペプチド(または、薬学的に許容される賦形剤および1つまたは複数のこのような核酸またはポリペプチドを含む組成物)をインビボまたはエキソビボで、対象者(例えば、哺乳動物(ヒト、霊長類、マウス、ブタ、ウシ、ヤギ、ウサギ、ラット、モルモット、ハムスター、ウマ、ヒツジを含む)または哺乳動物でない脊椎動物(例えば、鳥類(例えば、ニワトリまたはアヒル)、魚類、または無脊椎動物を含む)に投与することによって、疾患または障害を治療的または予防的に処置する方法を含む。

【0234】

本発明の第1の局面において、エキソビボの方法において、1つまたは複数の細胞または対象者の関心対象の細胞の集団(例えば、腫瘍細胞、腫瘍組織試料、器官細胞、血液細胞

50

、皮膚細胞、肺、心臓、筋肉、脳、粘膜、肝臓、腸、脾臓、胃、リンパ系、頸部、膣、前立腺、口、舌など）が対象者から入手されるか取り出され、疾患、障害、または他の状態を予防的または治療的に処置するのに有効な、本発明の選択された単量体ドメインおよび/または多量体の一定の量と接触される。次いで、接触された細胞は、処置される対象者中の関心対象の、それが得られた部位または別の部位（例えば、上記に規定したものを含む）で対象者に戻されるかまたは送達される。所望の場合、接触された細胞は、標準的移植技術および周知の移植技術を使用して、対象者中の関心対象の組織、器官、または系の部位（上記のすべてのものを含む）に移植され得るか、または、例えば、標準的な送達技術または輸血技術を使用して、血液またはリンパ系に送達され得る。

【0235】

本発明はまた、1つまたは複数の細胞または対象者の関心対象の細胞の集団が、疾患、障害、または他の状態を予防的または治療的に処置するのに有効な、本発明の選択された単量体ドメインおよび/または多量体の一定の量と、直接的または間接的に接触される、インビボの方法を提供する。直接的な接触/投与様式においては、選択された単量体ドメインおよび/または多量体は、代表的には、処置される細胞または関心対象の組織の部位（例えば、腫瘍細胞、腫瘍組織試料、器官細胞、血液細胞、皮膚細胞、肺、心臓、筋肉、脳、粘膜、肝臓、腸、脾臓、胃、リンパ系、頸部、膣、前立腺、口、舌など）に、種々の様式（局所的投与、注射（例えば、針またはシリンジを使用することによって）、またはワクチン送達、または遺伝子銃送達（組織、器官または皮膚の部位に押しつける））のいずれかによって、直接的に投与または輸送される。選択された単量体ドメインおよび/または多量体は、例えば、筋肉内、皮内、真皮下（subdermally）、皮下（subcutaneously）、経口、腹腔内、鞘内、静脈内、に送達され得るか、または身体の腔内に配置されるか（例えば、外科手術の間を含む）、または吸入または膣投与もしくは直腸投与により送達され得る。

【0236】

インビボでの間接的な接触/投与様式において、選択された単量体ドメインおよび/または多量体は、本発明のポリペプチドを、そこから処置が容易にされ得る1つまたは複数の細胞または細胞の集団に直接的に接触または投与することによって、代表的には、上記のもの（例えば、皮膚細胞、器官系、リンパ系、または血液細胞系など）を含む、処置される細胞または関心対象の組織の部位に間接的に投与または輸送される。例えば、対象者の身体中の腫瘍細胞は、血液もしくはリンパ系の細胞、皮膚、または器官を、十分な量の選択された単量体ドメインおよび/または多量体と接触されることによって処置され得、その結果、関心対象の部位（例えば、身体中の、関心対象の組織、器官、もしくは細胞、または血液もしくはリンパ系）への選択された単量体ドメインおよび/または多量体の送達が起こり、効果的な予防的または治療的な処置が生じる。このような接触、投与、または輸送は、代表的には、1つまたは複数の、上記に記載した投与の経路または様式を用いて行われる。

【0237】

別の局面において、本発明はエキソビボの方法を提供し、ここでは、1つまたは複数の関心対象の細胞または対象者の関心対象の細胞の集団（例えば、腫瘍細胞、腫瘍組織試料、器官細胞、血液細胞、皮膚細胞、肺、心臓、筋肉、脳、粘膜、肝臓、腸、脾臓、胃、リンパ系、頸部、膣、前立腺、口、舌など）が対象者から入手されるか取り出され、この1つまたは複数の細胞または細胞の集団を、疾患、障害、または他の状態を予防的または治療的に処置するのに有効な、関心対象の生物学的に活性なポリペプチド（例えば、選択された単量体ドメインおよび/または多量体）をコードする本発明の核酸配列を含むポリヌクレオチド構築物と接触させることによって形質転換する。この1つまたは複数の細胞または細胞の集団は、十分な量のポリヌクレオチド構築物およびこの核酸配列の発現を制御するプロモーターと接触され、その結果、ポリヌクレオチド構築物（およびプロモーター）の細胞への取り込みが起こり、本発明の標的の核酸配列の十分な発現を生じて、疾患、障害、または状態を予防的または治療的に処置するのに有効な、選択された単量体ドメ

10

20

30

40

50

ンおよび/または多量体をコードする、生物学的に活性な一定量のポリペプチドを産生する。このポリヌクレオチド構築物は、本発明の核酸配列の発現を制御するプロモーター配列（例えば、CMVプロモーター配列）および/または、所望される場合、少なくとも1つまたは複数の、本発明の別のポリペプチド、サイトカイン、アジュバント、または同時刺激性分子、または関心対象の他のポリペプチドをコードする、1つまたは複数のさらなるヌクレオチド配列を含み得る。

【0238】

形質移入の後、形質転換された細胞は、対象者の、それらがそこから得られた組織の部位もしくは系または対象者において処置される別の部位で（例えば、腫瘍細胞、腫瘍組織試料、器官細胞、血液細胞、皮膚細胞、肺、心臓、筋肉、脳、粘膜、肝臓、腸、脾臓、胃、リンパ系、頸部、膈、前立腺、口、舌など）、対象者に、戻されるか、送達されるか、または輸送される。所望される場合、この細胞は、標準的かつ周知の移植技術を用いて対象者中の関心対象の組織、皮膚、器官、または身体系に移植され得るか、または標準的な送達または輸血技術を用いて血液またはリンパ系に送達され得る。形質転換された細胞の、このような送達、投与、または輸送は、代表的には、1つまたは複数の、上記の投与の経路または様式を用いて行われる。標的の核酸の発現は、天然に存在するかまたは誘導され得（以下により詳細に記載される）、コードされたポリペプチドの一定の量が、その部位または組織系での疾患または状態を処置するに十分かつ効率的に発現される。

【0239】

別の局面において、本発明は、1つもしくはそれ以上の関心対象の細胞または対象者の細胞の集団（例えば、上記の細胞および細胞系ならびに対象者を含む）は、細胞または細胞の集団を、疾患、障害、または他の状態を予防的または治療的に処置するのに有効な、生物学的に活性な関心対象のポリペプチド（例えば、選択された単量体ドメインおよび/または多量体）をコードする本発明の核酸配列を含むポリヌクレオチド構築物を接触させることによって（または、上記の1つまたは複数の投与の経路または様式を用いて、細胞または細胞の集団に投与または輸送することによって）、対象者の身体中で形質転換される。

【0240】

ポリヌクレオチド構築物は、疾患または障害に苦しむ細胞に、直接的に投与または輸送され得る（例えば、1つまたは複数の上記の投与の経路または様式を用いる直接的な接触によって）。または、ポリヌクレオチド構築物は、疾患または障害に苦しむ細胞に間接的に投与または輸送され得る。これは、疾患を有さない細胞または他の疾患を有する細胞を、1つまたは複数の上記の投与の経路または様式を用いて、生物学的に活性なポリペプチドをコードする核酸配列およびその核酸配列の発現を制御するプロモーターを含む、十分な量のポリヌクレオチド構築物と最初に直接的に接触させることによって行われる。その結果、細胞へのポリヌクレオチド構築物（およびプロモーター）の取り込みが起こり、本発明の核酸配列の十分な発現が生じて疾患または障害を予防的または治療的に処置するのに有効な量の生物学的に活性なポリペプチドを産生し、それによってポリヌクレオチド構築物または得られた発現されたポリペプチドは天然にまたは自動的に、対象者の身体の、最初の送達部位、系、組織、または器官から、対象者の身体の、疾患の部位、組織、器官、または系に輸送される（例えば、血液またはリンパ系を介して）。標的核酸の発現は天然に生じるか、または誘導され得（以下により詳細に記載されるように）、その結果、一定量の発現されたポリペプチドは、その部位または組織系での疾患または状態を処置するに十分かつ効果的である。このポリヌクレオチド構築物は、本発明の核酸配列の発現を制御するプロモーター配列（例えば、CMVプロモーター配列）および/または、所望される場合、少なくとも1つまたは複数の、本発明の別のポリペプチド、サイトカイン、アジュバント、または同時刺激性分子、または関心対象の他のポリペプチドをコードする、1つまたは複数のさらなるヌクレオチド配列を含み得る。

【0241】

上記のようなインビボまたはエキソビボの処理方法の各々において、賦形剤および本発

10

20

30

40

50

明のポリペプチドまたは核酸を含む組成物が投与または送達され得る。1つの局面において、薬学的に許容される賦形剤および本発明のポリペプチドまたは核酸を含む組成物は、疾患または障害を処置するに有効な量で、上記のように対象者に投与または送達される。

【0242】

別の局面において、上記のようなインピボおよびエキソピボの処理方法の各々において、細胞または対象者に投与されるポリヌクレオチドの量は、1つまたは複数の対象者の細胞へのそのポリヌクレオチドへの取り込みが起こり、その核酸配列の十分な発現が生じて対象者中で免疫応答（免疫原（例えば、抗原）によって誘導される免疫応答を含む）を増強するのに有効な量の生物学的に活性なポリペプチドを産生するような量であり得る。別の局面において、このような方法の各々において、細胞または対象者に投与されるポリペ

10

【0243】

なお別の局面において、ポリヌクレオチド構築物（またはポリヌクレオチド構築物を含む組成物）が生理学的に活性なポリペプチドを対象者に送達するために使用される、インピボまたはインピボの処理方法において、ポリヌクレオチド構築物の発現は、誘導性のオンおよびオフ遺伝子発現系を用いて誘導され得る。このようなオンおよびオフ遺伝子発現系の例には、Tet-オン（Tet-On）（商標）遺伝子発現システム（Gene Expression System）およびTet-オフ（Tet-Off）（商標）遺伝子発現システムがそれぞれ挙げられる（例えば、このような系の各々の詳細な記載については、Clontechカタログ2000、110-111頁を参照されたい）。他の制御可能なまたは誘導性のオンおよびオフ遺伝子発現系は、当業者に公知である。このような系を用いると、ポリヌクレオチド構築物の標的の核酸の発現が、正確、可逆的、かつ定量的な様式で調節され得る。標的核酸の遺伝子発現は、例えば、標的核酸を含むポリヌクレオチド構築物を含む安定な形質移入した細胞が、関心対象の組織部位、器官、または系に送達または輸送されるか、または関心対象の組織部位、器官、または系に接触されるように作製された後で、誘導され得る。このような系は、標的核酸の発現を遅らせるか、または正確に制御することが有利であるような処置の方法および様式において特に利点がある。（例えば、手術の完了のための時間および/または手術後の治癒を可能にするため；標的核酸を含むポリヌクレオチド構築物が、処置される部位、細胞、系、または組織に到達するための時間を可能にするため；構築物で形質転換された細胞

20

30

【0244】

4. さらなる多量体用途

本発明の多量体の潜在的用途は多岐にわたり、親和性因子が望まれるいかなる用途をも含む。たとえば、本発明は、選択された単量体ドメインまたは多量体が二つのタンパク質の間の相互作用を阻止する拮抗物質を作製する用途で使用するができる。任意で本発明は、作用物質を生成することができる。たとえば、二つの異なるタンパク質、たとえば酵素と基質を結合する多量体は、たとえば酵素活性および/または基質転換をはじめとするタンパク質機能を高めることができる。

40

【0245】

他の用途は細胞標的化を含む。たとえば、特異的細胞表面タンパク質を認識する単量体ドメインおよび/または免疫ドメインからなる多量体は、特定の細胞型に任意で結合することができる。また、抗ウイルス剤としての単量体ドメインおよび/または免疫ドメインを含む用途が含まれる。たとえば、ウイルス粒子上で異なるエピトープに結合する多量体は、その多価性のおかげで、抗ウイルス剤として有用であることができる。他の用途は、タンパク質精製、タンパク質検出、バイオセンサ、リガンド-親和性捕捉実験などを含むことができるが、これらに限定されない。さらには、たとえば治療剤または診断剤としての適当な用途のために、従来手段によってドメインまたは多量体をバルクで合成することができる。

50

【0246】

本発明はさらに、動物中での対象のタンパク質の半減期を延長する方法を提供する。対象のタンパク質は、治療、予防または他の点で望ましい機能性を有するいかなるタンパク質であることもできる。この方法は、まず、半減期延長物質、たとえば血液輸送分子または細胞、たとえば血清アルブミン（たとえばヒト血清アルブミン）、IgG、赤血球などに特異的に結合する結合タンパク質と同定されている単量体ドメインを提供することを含む。そして、半減期延長物質結合単量体を、対象のタンパク質に対して結合親和性を有する別の単量体ドメインに共有結合させる。そして、これら三つのタンパク質（半減期延長物質結合単量体、対象タンパク質結合単量体および対象のタンパク質）を哺乳動物に投与すると、そこで、これらのタンパク質は半減期延長物質と会合して4成分の複合体を形成する。この複合体形成の結果として、結合タンパク質をタンパク質分解から保護し、それにより、タンパク質の半減期を延長する半減期延長物質が得られる（以下、実施例3を参照されたい）。本発明のこの使用の一つの変形は、半減期延長物質結合単量体を対象のタンパク質に共有結合させることを含む。対象のタンパク質は、単量体ドメイン、単量体ドメインの多量体または合成薬物を含むことができる。あるいはまた、免疫グロブリンまたは赤血球に結合する単量体を、上記方法を使用して生成すること、および半減期延長に使用することが可能である。

10

【0247】

半減期延長物質結合多量体は通常、少なくとも2個のドメイン、キメラドメインまたは突然変異誘発ドメインの多量体である。適当なドメインは、半減期延長物質への結合に関してさらにスクリーニングされ、選択される、本明細書に記載したすべてのドメインを含む。半減期延長物質結合多量体は、本明細書に記載された多量体生成方法にしたがって、たとえば、半減期延長物質結合活性に関して事前にスクリーニングされた単量体ドメインを使用して生成される。たとえば、いくつかの半減期延長物質結合LDL受容体クラスAドメイン単量体が以下の実施例2に記載されている。

20

【0248】

本発明はまた、哺乳動物における免疫応答を抑制または低下させる方法を提供する。この方法は、まず、免疫抑制標的に結合する単量体ドメインを選択することを含む。このような「免疫抑制標的」は、別のタンパク質と結合すると、哺乳動物において免疫抑制結果を生じさせるタンパク質と定義される。そして、免疫抑制単量体ドメインを、直接投与することもできるし、免疫抑制単量体の所望の標的化を提供する別の単量体ドメインまたは別のタンパク質に共有結合させることもできる。免疫抑制多量体は通常、少なくとも2個のドメイン、キメラドメインまたは突然変異誘発ドメインの多量体である。適当なドメインは、本明細書に記載されたすべてのドメインを含み、免疫抑制標的への結合に関してさらにスクリーニングされ、選択される。免疫抑制多量体は、本明細書に記載された多量体生成方法にしたがって、たとえばCD40L結合活性に関して事前にスクリーニングされた単量体ドメインを使用して生成される。CD40L結合LDL受容体クラスAドメイン単量体の生成が以下の実施例4に記載されている。

30

【0249】

いくつかの態様において、単量体ドメインは、リガンド阻害、リガンドクリアランスまたはリガンド刺激のために使用される。これらの方法で可能なリガンドとしては、たとえばサイトカインまたはケモカインがある。

40

【0250】

受容体へのリガンド結合の阻害が望まれる場合、リガンドの受容体に接触するリガンド部分でリガンドに結合する、またはリガンドに接触する受容体部分で受容体に結合する単量体ドメインを選択して、それにより、リガンド-受容体相互作用を阻止する。所望により、単量体ドメインは、任意で半減期延長物質に連結することができる。

【0251】

リガンドクリアランスとは、体液中での可溶性リガンドの半減期を改変することをいう。たとえば、大部分の単量体ドメインは、半減期延長物質なしでは、半減期が短い。した

50

がって、リガンドへの単量体ドメインの結合がリガンドの半減期を減らして、それにより、リガンド濃度を下げる。単量体ドメインと結合したリガンドの部分は一般に問題にはならないが、受容体に結合するリガンド部分でリガンドに結合し、それにより、リガンドの影響を阻害することが有利であるかもしれない。この方法は、血流中のあらゆる分子の濃度を減らすのに有用である。

【0252】

あるいはまた、半減期延長物質に結合する第一の単量体ドメインおよびリガンドの受容体に結合しないリガンド部分に結合する第二の単量体ドメインを含む多量体を使用してリガンドの半減期を増すこともできる。

【0253】

別の態様では、リガンドに結合する第一の単量体ドメインおよび受容体に結合する第二の単量体ドメインを含む多量体を使用して、受容体に対するリガンドの有効な親和性を高めることができる。

【0254】

別の態様では、受容体に結合する少なくとも2個の単量体を含む多量体を使用して、2個の受容体がいずれも多量体に結合することによってそれらを隣接させて、それにより、受容体を活性化する。

【0255】

いくつかの態様において、2個の異なる単量体を有する多量体を使用して、標的駆動結合活性増大を使用することができる。たとえば、第一の単量体を第一の細胞型上の細胞表面分子に標的設定し、第二の単量体を第二の細胞型上の表面分子に標的設定する。2個の単量体を連結して多量体を形成したのちその多量体を二つの細胞型の混合物に加えることにより、ひとたび1個の多量体と2個の細胞との間で初期結合事象が起こると細胞の間で結合が起こり、また、他の多量体が両方の細胞に結合する。

【0256】

本発明の潜在的使用のさらなる例は、薬物結合（たとえば標的化のための放射性ヌクレオチドの結合、薬物の半減期延長のための薬学的結合、過量治療および中毒治療のための制御された物質結合）、免疫機能変調（たとえばCTLA-4のような受容体と結合することによる免疫原性ブロック、CD80のような受容体と結合することによる免疫原性増強またはFc型結合による補体活性化）および特殊送達（たとえばリンカー切断、電子輸送ドメイン、二量体化ドメインまたは細胞侵入ドメイン、クリアランス受容体、たとえばFcR、経口送達受容体、たとえば経粘膜輸送のためのpIgRおよび血液脳移動受容体、たとえばトランスフェリンRへの特異的結合による徐放）が可能である単量体ドメインおよびその多量体を含む。

【0257】

さらには、種々の機能性を有する単量体または多量体を組み合わせて、組み合わせ機能を有する多量体を形成することもできる。たとえば、前記HSA結合単量体および前記CD40L結合単量体の両方を別の多量体に付加して、多量体の免疫原性を低下させ、かつ多量体の半減期を増すことができる。

【0258】

さらなる態様では、単量体または多量体を、検出可能な標識（たとえばCy3、Cy5など）に連結することもできるし、レポーター遺伝子産物（たとえばCAT、ルシフェラーゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、GFPなど）に連結することもできる。

【0259】

いくつかの態様において、本発明の単量体は、検出検定法で二次試薬として使用するため、特定の動物、たとえばヤギ、ウサギ、マウスなどからの抗体に結合する能力に関して選択される。

【0260】

場合によっては、同じ標的に結合するための1対の単量体または多量体を選択される（

10

20

30

40

50

すなわちサンドイッチに基づいた検定法で使用するため)。マッチしたMaxybody対を選択するため、通常、2個の異なるMaxybodyが同時に標的タンパク質に結合することができる。そのような対を同定するための一つの手法は以下を含む。

- (1) 標的タンパク質に結合するために事前に選択したファージ混合物を固定化すること、
- (2) 標的タンパク質を固定化ファージに接触させ、洗浄すること、
- (3) ファージ混合物を結合標的に接触させ、洗浄すること、および
- (4) 固定化ファージを溶出させることなく結合ファージを溶出させること。

いくつかの態様において、種々の薬物マーカを有する種々のファージ個体群が使用される。

10

【0261】

本発明の多量体または単量体ドメインの一つの用途は、検出または他の親和性に基づく検定法における抗体または他の親和性因子の代用としての用途である。たとえば、いくつかの態様において、単量体ドメインまたは多量体は、混合物中の標的以外の成分に結合する能力に照らして選択される。一般的な手法は、検定中の試料の組成を模倣することを含む、決定法の条件に厳密に類似した条件下、アフィニティー選択を実施することを含むことができる。したがって、選択工程は、単量体ドメインまたは多量体を、標的リガンドを含まない混合物に接触させ、その混合物と結合する単量体ドメインまたは多量体に照らして選択を実施することを含む。したがって、検定法における試料を代表する混合物（抗体、単量体ドメインまたは多量体を使用して除去することができる標的リガンドを有さない）をブロッキング剤として使用することができる。

20

【0262】

5. 単量体ドメインおよび/または多量体の核酸およびポリペプチドのさらなる操作

上記に述べたように、本発明のポリペプチドは改変され得る。これらのポリペプチドをコードする修飾または改変された核酸配列を生成するための種々の多様な生成手段の記載は、上記ならびに以下の刊行物およびそこに引用される参考文献中に記載される。

Soong, N. et al., *Molecular*

breeding of viruses, (2000) Nat Genet 25(4):436-439; Stemmer, et al., *Molecular breeding of viruses for targeting and other clinical properties*, (1999) Tumor Targeting 4:1-4; Ness et al., *DNA Shuffling of subgenomic sequences of subtilisin*, (1999) Nature Biotechnology 17:893-896; Chang et al., *Evolution of a cytokine using DNA family shuffling*, (1999) Nature Biotechnology 17:793-797; Minshull and Stemmer, *Protein evolution by molecular breeding*, (1999) Current Opinion in Chemical Biology 3:284-290; Christians et al., *Directed evolution of thymidine kinase for AZT phosphorylation using DNA family shuffling*, (1999) Nature Biotechnology 17:259-264; Crameri et al., *DNA shuffling of a family of genes from diverse species accelerates directed evolution*, (1998) Nature 391:288-291; Crameri et al., *Molecular evolution of an arsenate detoxification pathway by DNA shuffling*, (1997) Nature Biotechnology 15:436-438; Zhang et al., *Directed evolution of an effective fucosidase from a galactosidase by DNA shuffling and screening* (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:4504-4509; Patten et al., *Applications of DNA Shuffling to Pharmaceuticals and Vaccines*, (1997) Current Opinion in Biotechnology 8:724-733; Crameri et al., *Construction and evolution of antibody-phage libraries by DNA shuffling*, (1996) Nature Medicine 2:100-103; Crameri et al., *Improved green fluorescent protein by molecular evolution using DNA shuffling*, (1996) Nature Biotechnology 14:315-319; Gates et al., *Affinity selective isolation of ligands from peptide libraries through display on a lac repressor 'headpiece dimer'*, (1996) Journal of Molecular Biology 255:373-386; Stemmer, *Sexual PCR and Assembly PCR*, (1996) In: The Encyclopedia of Molecular Biology. VCH Publishers, New York. pp.447-457; Crameri and Stemmer, *Combinatorial multiple cassette mutagenesis creates all the permutations of mutant and wildtype cassettes*, (1995) BioTechniques 18:194-195; Stemmer et al., *Single-step assembly of a gene and entire plasmid from large numbers of oligodeoxy-ribonucleotides*, (1995) Gene, 164:49-53; Stemmer, *The Evolution of Molecular Computation*, (1995) Science 270: 1510; Stemmer, *Searching Sequence Space*, (1995) Bio/Technology 13:549-553; Stemmer, *Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling*, (1994) Nature 370:389-391; and Stemmer, *DNA shuffling by random fragmentation and reassembly: In vitro recombination for molecular evolution*, (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:10747-10751

10

20

30

40

【 0 2 6 3 】

多様性を生成するための突然変異の方法には、例えば、以下が挙げられる。部位特異的変異誘発

(Ling et al., *Approaches to DNA mutagenesis: an overview*, (1997) Anal Biochem. 254(2): 157-178; Dale et al., *Oligonucleotide-directed random mutagenesis using the phosphorothioate method*, (1996) Methods Mol. Biol. 57:369-374; Smith, *In vitro mutagenesis*, (1985) Ann. Rev. Genet. 19:423-462; Botstein & Shortle, *Strategies and applications of in vitro mutagenesis*, (1985) Science 229:1193-1201; Carter, *Site-directed mutagenesis*, (1986) Biochem. J. 237:1-7; and Kunkel, *The efficiency of oligonucleotide directed mutagenesis*, (1987) in Nucleic Acids & Molecular Biology (Eckstein, F. and Lilley, D.M.J. eds., Springer Verlag, Berlin))

10

; ウラシル含有鋳型を用いる変異誘発

(Kunkel, *Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection*, (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:488-492; Kunkel et al., *Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection*, (1987) Methods in Enzymol. 154, 367-382; and Bass et al., *Mutant Trp repressors with new DNA-binding specificities*, (1988) Science 242:240-245); oligonucleotide-directed mutagenesis ((1983) Methods in Enzymol. 100: 468-500; (1987) Methods in Enzymol. 154: 329-350; Zoller & Smith, *Oligonucleotide-directed mutagenesis using M13-derived vectors: an efficient and general procedure for the production of point mutations in any DNA fragment*, (1982) Nucleic Acids Res. 10:6487-6500; Zoller & Smith, *Oligonucleotide-directed mutagenesis of DNA fragments cloned into M13 vectors*, (1983) Methods in Enzymol. 100:468-500; and Zoller & Smith, *Oligonucleotide-directed mutagenesis: a simple method using two oligonucleotide primers and a single-stranded DNA template*, (1987) Methods in Enzymol. 154:329-350)

20

30

; ホスホロチオエート修飾DNA変異誘発

(Taylor et al., *The use of phosphorothioate-modified DNA in restriction enzyme reactions to prepare nicked DNA*, (1985) Nucl. Acids Res. 13: 8749-8764; Taylor et al., *The rapid generation of oligonucleotide-directed mutations at high frequency using phosphorothioate-modified DNA*, (1985) Nucl. Acids Res. 13: 8765-8787; Nakamaye & Eckstein, *Inhibition of restriction endonuclease Nci I cleavage by phosphorothioate groups and its application to oligonucleotide-directed mutagenesis*, (1986) Nucl. Acids Res. 14: 9679-9698; Sayers et al., *Y-T Exonucleases in phosphorothioate-based oligonucleotide-directed mutagenesis*, (1988) Nucl. Acids Res. 16:791-802; and Sayers et al., *Strand specific cleavage of phosphorothioate-containing DNA by reaction with restriction endonucleases in the presence of ethidium bromide*, (1988) Nucl. Acids Res. 16: 803-814)

40

ギャップ二本鎖DNAを用いた変異誘発

(Kramer et al., *The gapped duplex DNA approach to oligonucleotide-directed mutation construction*, (1984) Nucl. Acids Res. 12: 9441-9456; Kramer & Fritz *Oligonucleotide-directed construction of mutations via gapped duplex DNA*, (1987) Methods in Enzymol. 154:350-367; Kramer et al., *Improved enzymatic in vitro reactions in the gapped duplex DNA approach to oligonucleotide-directed construction of mutations*, (1988) Nucl. Acids Res. 16: 7207; and Fritz et al., *Oligonucleotide-directed construction of mutations: a gapped duplex DNA procedure without enzymatic reactions in vitro*, (1988) Nucl. Acids Res. 16: 6987-6999)

10

【 0 2 6 4 】

さらなる適切な方法には以下が含まれる。点ミスマッチ修復 (Kramerら、Point Mismatch Repair, (1984) Cell 38: 879-887)、修復欠損宿主株を用いる変異誘発 (Carterら、Improved oligonucleotide site-directed mutagenesis using M13 vectors, (1985) Nucl. Acids Res. 13: 4431-4443; およびCarterら、Improved oligonucleotide-directed mutagenesis using M13 vectors, (1987) Methods in Enzymol. 154, 382-403)、欠失変異誘発 (EghtedarzadehおよびHenikoff、Use of oligonucleotides to generate large deletions、(1986) Nucl. Acid Res. 14: 5115)、制限酵素選択および制限酵素精製 (Wellsら、Importance of hydrogen-bond formation in stabilizing the transition state of subtilisin、(1986) Phil. Trans. R. Soc. Lond. A 317: 417-423)、全遺伝子合成による変異誘発

20

(Nambiar et al., *Total synthesis and cloning of a gene coding for the ribonuclease S protein*, (1984) Science 223: 1299-1301; Sakamar and Khorana, *Total synthesis and expression of a gene for the α -subunit of bovine rod outer segment guanine nucleotide-binding protein (transducin)*, (1988) Nucl. Acids Res. 14: 6361-6372; Wells et al., *Cassette mutagenesis: an efficient method for generation of multiple mutations at defined sites*, (1985) Gene 34:315-323; and Grundström et al., *Oligonucleotide-directed mutagenesis by microscale 'shot-gun' gene synthesis*, (1985) Nucl. Acids Res. 13: 3305-3316)

30

、二本鎖切断修復

(Mandecki, *Oligonucleotide-directed double-strand break repair in plasmids of Escherichia coli: a method for site-specific mutagenesis*, (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83:7177-7181; and Arnold, *Protein engineering for unusual environments*, (1993) Current Opinion in Biotechnology 4:450-455)

40

。上記の方法の多くに関するさらなる詳細は、Methods in Enzymology 第154巻に見い出され得、これはまた、種々の変異誘発方法に伴う問題解決のための有用な標準をまた記載する。

【 0 2 6 5 】

種々の多様性を生成する方法に関するさらなる詳細は、以下の米国特許、PCT公開公報および出願、ならびに欧州公開公報において見出され得る。Stemmerに与えられた(1997年2月25日)米国特許第5,605,793号「Methods for in Vitro Recombination」; Stemmerらに与えられた(1998年9月22日)米国特許第5,811,238号「Methods for Generating Polynucleotides having Desired Characteristics by Iterative Selection and Recombination」; Stemmerらに与えられた(1998年11月3日)米国特許第5,830,721号「DNA Mutagen

50

esis by Random Fragmentation and Reassembly」；Stemmerらに与えられた（1998年11月10日）米国特許第5,834,252号「End-Complementary Polymerase Reaction」；Minshullらに与えられた（1998年11月17日）米国特許第5,837,458号「Methods and Compositions for Cellular and Metabolic Engineering」；StemmerおよびCramerによる国際公開公報第95/22625号「Mutagenesis by Random Fragmentation and Reassembly」；StemmerおよびLipschulzによる国際公開公報第96/33207号「End Complementary Polymerase Chain Reaction」；StemmerおよびCramerによる国際公開公報第97/20078号「Methods for Generating Polynucleotides having Desired Characteristics by Iterative Selection and Recombination」；MinshullおよびStemmerによる国際公開公報第97/35966号「Methods and Compositions for Cellular and Metabolic Engineering」；Punnonenらによる国際公開公報第99/41402号「Targeting of Genetic Vaccine Vectors」；Punnonenらによる国際公開公報第99/41383号「Antigen Library Immunization」；Punnonenらによる国際公開公報第99/41369号「Genetic Vaccine Vector Engineering」；Punnonenらによる国際公開公報第99/41368号「Optimization of Immunomodulatory Properties of Genetic Vaccines」；StemmerおよびCramerによる欧州特許第752008号「DNA Mutagenesis by Random Fragmentation and Reassembly」；Stemmerによる欧州特許第0932670号「Evolving Cellular DNA Uptake by Recursive Sequence Recombination」；Stemmerらによる国際公開公報第99/23107号「Modification of Virus Tropism and Host Range by Viral Genome Shuffling」；Aptらによる国際公開公報第99/21979号「Human Papillomavirus Vectors」；del Cardayreらによる国際公開公報第98/31837号「Evolution of Whole Cells and Organisms by Recursive Sequence Recombination」；PattenおよびStemmerらによる国際公開公報第98/27230号「Methods and Composition for Polypeptide Engineering」；Stemmerらによる国際公開公報第98/27230号「Methods for Optimization of Gene Therapy by Recursive Sequence Shuffling and Selection」、国際公開公報第00/00632号「Methods for Generating Highly Diverse Libraries」、国際公開公報第00/09679号「Methods for Obtaining in Vitro Recombined Polynucleotide Sequence Banks and Resulting Sequences」、Arnoldらによる国際公開公報第98/42832号「Recombination of Polynucleotide Sequences Using Random or Defined Primers」、Arnoldらによる国際公開公報第99/29902号「Methods for Creating Polynucleotide and Polypeptide Sequences」、Vindによる国際公開公報第98/41653号「An in Vitro Method for Construction of a DNA Library」、Borchertらによる国際公開公報第98/41622号「Method for Constructing a Library Using DNA Shuffling」、ならびに、PatiおよびZarlingらによる国際公開公報第98/42727号「Sequence Alterations using Homologous Recombination」、Pattenらによる国際公開公報第00/18906号「Shuffling of Codon-Altered Genes」；del Cardayreらによる国際公開公報第00/04190号「Evolution of Whole Cells and Organisms by Recursive Recombination」；Cramerらによる国際公開公報第00/042561号「Oligonucleotide Mediated Nucleic Acid Recombination」；SelifonovおよびStemmerによる国際公開公報第00/42559号「Methods of Populating Data Structures for Use in Evolutionary Simulations」；Selifonovらによる国際公開公報第00/42560号「Methods for Making Character Strings, Polynucleotides & Polypeptides Having Desired Characteristics」；Welchらによる国際公開公報第01/23401号「Use of Codon-Varied Oligonucleotide Synthesis for Synthetic Shuffling」；ならびに、Affholterによる国際特許出願番号PCT/US01/06775号「Single-Stranded Nucleic Acid Template-Mediated Recombination and Nucleic Acid Fragment Isolation」。

【 0 2 6 6 】

本発明の別の局面は、核酸をコードする、単量体ドメイン、選択された単量体ドメイン、多量体、および/または選択された多量体のクローニングおよび発現を含む。従って、多量体ドメインは、当技術分野で周知の発現系を用いて単一のタンパク質として合成され得る。上記に示した数多くのテキストに加えて、例えば、単量体ドメイン、選択された単量体ドメイン、多量体、および/または選択された多量体のような核酸を発現するのに関

連性のある、ベクター、プロモーター、および多くの他のトピックの使用を含む、本明細書中で有用な分子生物学の技術を記載する一般的なテキストには、以下が含まれる。BergerおよびKimmel、Guide to Molecular Cloning Techniques, Methods in Enzymology 第152巻、Academic Press, Inc., San Diego, CA (Berger); Sambrookら、Molecular Cloning-A Laboratory Manual (第2版) 第1-3巻、Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1989 (「Sambrook」)およびCurrent Protocols in Molecular Biology, F.M. Ausubelら編、Current Protocols (Greene Publishing Associates, Inc. と John Wiley & Sons, Inc. の合併事業) (1999年から補遺) (「Ausubel」)。核酸をコードする単量体ドメインおよび多量体を同定、単離、およびクローニングする際に有用なインビトロ増幅方法(ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)、リガーゼ連鎖反応(LCR)、Q-レプリカーゼ増幅、および他のRNAポリメラーゼ媒介技術(例えば、NASBA)を含む)によって当業者に指示するに十分な技術の例は、以下において見出され得る。

10

Berger, Sambrook, ならびに Ausubel, および Mullis *et*

al., (1987) U.S. Patent No. 4,683,202; *PCR Protocols A Guide to Methods* ならびに *Applications*

(Innis *et al.* eds) Academic Press Inc. San Diego, CA (1990) (Innis); Arnheim & Levinson

(October 1, 1990) *C&EN* 36-47; *The Journal Of NIH Research* (1991) 3, 81-94; (Kwoh *et al.*

(1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 1173; Guatelli *et al.* (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*

87, 1874; Lomell *et al.* (1989) *J. Clin. Chem* 35, 1826; Landegren *et al.*, (1988) *Science* 241,

20

1077-1080; Van Brunt (1990) *Biotechnology* 8, 291-294; Wu ならびに Wallace, (1989) *Gene* 4,

560; Barringer *et al.* (1990) *Gene* 89, 117, ならびに Sooknanan ならびに Malek (1995)

Biotechnology 13: 563-564

インビトロ増幅核酸をクローニングする改善方法は、Wallaceら、米国特許第5,426,039号に記載されている。PCRによって大きな核酸を増幅する改善方法は、Chengら(1994) *Nature* 369: 684-685およびそこに引用されている参照文献に要約されている(そこでは40kbまでのPCRアンプリコンが生成されている)。当業者は、本質的に、いかなるRNAも、逆転写酵素およびポリメラーゼを使用する、制限消化、PCR伸長、および配列決定に適切な二本鎖DNAに転換し得ることを理解する。Ausubel、Sambrook、およびBerger(すべて前記)を参照されたい。

30

【0267】

本発明はまた、組換え技術による、宿主細胞への本発明のベクターの導入、ならびに本発明の単量体ドメイン、選択された単量体ドメイン、免疫ドメイン、多量体、および/または選択された多量体の産生に関する。宿主細胞は、本発明のベクターで遺伝的に操作される(すなわち、遺伝子導入、形質転換、または形質移入)。このベクターは、例えば、クローニングベクターまたは発現ベクターであり得る。このベクターは、例えば、プラスミド、ウイルス粒子、ファージなどの形態であり得る。遺伝子操作された宿主細胞は、プロモーターを活性化するか、形質転換体を選択するか、または関心対象の単量体ドメイン、選択された単量体ドメイン、多量体、および/または選択された多量体の遺伝子を増幅するために適切であるように改変された通常の栄養培地中で培養され得る。温度、pHなどのような培養条件は、発現のために選択された宿主細胞とともに以前に使用されたものであり、当業者には、当技術分野および本明細書中に引用される参照文献中で明白である(例えば、Freshney(1994) *Culture of Animal Cells, a Manual of Basic Technique*, 第3版、Wiley-Liss, New Yorkおよびそこに引用される参照文献を含む)。

40

【0268】

上記に言及したように、本発明のポリペプチドはまた、動物でない細胞(例えば、植物、酵母、真菌、細菌など)中で産生され得る。確かに、全体にわたって述べたように、ファージディスプレイはこのようなポリペプチドを産生するために特に関連する技術である

50

。Sambrook、Berger、およびAusubelに加えて、細胞培養に関する詳細は、以下において見い出され得る。

Payne *et al.* (1992) *Plant Cell and Tissue Culture in Liquid Systems* John

Wiley & Sons, Inc. New York, NY; Gamborg and Phillips (eds) (1995) *Plant Cell, Tissue*

and Organ Culture; Fundamental Methods Springer Lab Manual, Springer-Verlag (Berlin

Heidelberg New York) and Atlas and Parks (eds) *The Handbook of Microbiological Media*

(1993) CRC Press, Boca Raton, FL

10

【0269】

本発明はまた、薬学的な特性を改善するため、免疫原性を減少するため、または多量体および/または単量体ドメインの細胞または組織への輸送（例えば、血液脳関門を通して、または皮膚を通して）を容易にするための、単量体ドメイン、免疫ドメイン、および/または多量体の改変を含む。これらの型の改変には、種々の修飾（例えば、糖基の付加またはグリコシル化）、PEGの付加、特定のタンパク質（例えば、HSAまたは他の血清タンパク質）を結合するタンパク質ドメインの付加、細胞へ、細胞の外に、または細胞を通してシグナルを移動または輸送するタンパク質の断片または配列の付加が含まれる。さらなる成分もまた、多量体および/または単量体ドメインに付加されて、多量体および/または単量体ドメインの特性を操作し得る。種々の成分がまた付加され得、これらには、例えば、公知の受容体を結合するドメイン（例えば、Fc受容体を結合するFc領域タンパク質ドメイン）、毒素または毒素の一部、多量体または単量体ドメインを活性化するために任意で切断され得るプロドメイン、レポーター分子（例えば、緑色蛍光タンパク質）、レポーター分子を結合する成分（例えば、放射線治療のための放射性核種、ビオチン、またはアビジン）、または修飾の組み合わせが含まれる。

20

【0270】

6. 動物モデル

本発明のもう一つの局面は、単量体または多量体ドメインの免疫原性を試験するための特異的非ヒト動物モデルの開発である。このような非ヒト動物モデルを作製する方法は、レシピエント非ヒト動物の少なくともいくつかの細胞の中に、同じタンパク質ファミリーからの複数のヒトタンパク質をコードする遺伝子を含むベクターを導入することを含み、遺伝子それぞれが、ベクターが導入される細胞の少なくともいくつかの中で機能性であるプロモーターに作用的に連結して、同じタンパク質ファミリーからの複数のヒトタンパク質を発現させることができる遺伝子的に改変された非ヒト動物が得られるようになる。

30

【0271】

本発明の実施に使用される適当な非ヒト動物は、ヒトを除くすべての脊椎動物（たとえばマウス、ラット、ウサギ、ヒツジなど）を含む。通常、タンパク質ファミリーの複数のメンバーとは、そのファミリーの少なくとも2種のメンバー、普通は少なくとも10種のメンバーを含む。いくつかの態様において、複数とは、タンパク質ファミリーのすべての既知のメンバーを含む。使用することができる例示的な遺伝子は、単量体ドメイン、たとえばLDL受容体クラスAドメインファミリー、EGF様ドメインファミリーおよび本明細書に記載する他のドメインファミリーをコードする遺伝子を含む。

40

【0272】

本発明に非ヒト動物モデルは、非ヒト動物モデルによって発現される同じタンパク質ファミリーに由来する単量体または多量体ドメインの免疫原性に関してスクリーニングするために使用することができる。本発明は、上記方法にしたがって作製された非ヒト動物モデルならびに同じタンパク質ファミリー（たとえば本明細書に記載する単量体ドメイン）からの複数のヒトタンパク質をコードするDNA分子を含有し、発現する体細胞および生殖細胞を有する形質転換非ヒト動物であって、DNA分子が胚段階で導入されたものであり、DNA分子それぞれが、DNA分子が導入された細胞の少なくともいくつかの中でプロモーター

50

に作用的に連結している形質転換非ヒト動物を含む。

【0273】

LDL受容体クラスAドメイン由来結合タンパク質をスクリーニングするのに有用なマウスモデルの例を以下に記す。PCRを使用して、ヒト細胞から、野生型ヒトLDL受容体クラスAドメイン単量体をコードする遺伝子クラスターを増幅する。200個の異なるAドメインのほぼすべてを、それぞれ約7kbのわずか3回の別個の増幅反応で増幅することができる。そして、これらの断片を使用して、上記方法にしたがって形質転換マウスを生成する。形質転換マウスは、ヒトAドメインを「自己」として認識し、したがって、Aドメインに関してヒトの「自己性」を模倣する。これらのマウスにおいて、Aドメイン由来単量体または多量体をマウスに注射したのち、発生する免疫応答（またはその欠如）を分析することにより、個々のAドメイン由来単量体または多量体を試験する。マウスを試験して、マウスがマウス抗ヒト応答（MAHR）を発したかどうかを判定する。MAHRの発生をもたらさない単量体および多量体は、ヒトに投与された場合、非免疫原性である可能性が高い。

10

【0274】

歴史的には、形質転換マウスにおけるMAHR試験は、その単一タンパク質に対して遺伝形質転換性であるマウスの中の個々のタンパク質を試験するために使用されている。対照的に、上記方法は、ヒトタンパク質の全ファミリーを「自己」として認識し、それぞれが大きく変化した結合活性および用途が可能である膨大な数の変異体タンパク質を評価するために使用されることができる非ヒト動物モデルを提供する。

20

【0275】

7. キット

本発明の方法において必要とされる成分（代表的には、混合していない形態で）およびキットの成分（パッケージング材料、成分および/または方法を使用するための指示書、成分を保持するための1つまたは複数の容器（反応チューブ、カラムなど））を含むキットは、本発明の特徴である。本発明のキットは、多量体ライブラリー、または単一の型のライブラリーを含み得る。キットはまた、標的分子の結合を促進するために適切な試薬（例えば、検出可能に標識した分子を含む、検出を容易にする緩衝剤または試薬）を含み得る。単量体ドメインなどへのリガンドの結合を校正するための標準もまた、本発明のキットに含まれ得る。

30

【0276】

本発明はまた、市販される結合アッセイ法およびアッセイ法を実施するためのキットを提供する。本発明のアッセイ法のいくつかにおいて、1つまたは複数のリガンドが、単量体ドメイン、免疫ドメイン、および/または多量体の結合を検出するために使用される。このようなアッセイ法は、単量体ドメインおよび/または多量体へのリガンドの結合を検出するための当技術分野で公知の任意の方法（例えば、フローサイトメトリー、蛍光顕微鏡法、プラズモン共鳴など）に基づく。

【0277】

アッセイ法に基づくキットもまた提供される。このキットは、代表的には、容器および1つまたは複数のリガンドを含む。このキットは、任意でアッセイ法を実行するための指示書、さらなる検出試薬、緩衝剤、またはこれらの成分のいずれかの使用のための指示書などを含む。または、キットは、本発明の単量体ドメインおよび/または多量体の発現のための、細胞、ベクター（例えば、本発明のポリペプチドを含む、発現ベクター、分泌ベクター）を含み得る。

40

【0278】

さらなる局面において、本発明は、本明細書中のいかなる組成物、単量体ドメイン、免疫ドメイン、多量体、細胞、細胞培養物、装置、装置の成分、またはキットの使用、本明細書中のいかなる方法またはアッセイ法の実施、および/または、治療用製剤としての本明細書中の細胞、細胞培養物、組成物、または他の特徴の使用を提供する。本明細書中で記載されている処置のための治療用製剤としての本明細書中のすべての成分の製造もまた、提供される。

50

【0279】

8. 集積システム

本発明は、単量体ドメイン、選択された単量体ドメイン、多量体、および/または選択された多量体、ならびにこのようなポリペプチドをコードする核酸に対応する文字列を含む、コンピュータ、コンピュータ読み取り可能な媒体、および集積システムを提供する。これらの配列は、インシリコシャッフリング方法によって、または標準的な配列のアライメントもしくはワードプロセッシングソフトウェアによって操作され得る。

【0280】

例えば、異なる型の類似性および種々のストリンジェンシーの考慮および文字列長は、本明細書中の集積システムにおいて検出および認識され得る。例えば、多くも相同性決定方法が、生体高分子の配列の比較解析のために、ワードプロセッシングのためのスペルチェックのために、および種々のデータベースからのデータ検索のために設計されてきた。天然のポリヌクレオチド中の4つの基本的な核酸塩基の間の二重らせんの対の相補性相互作用の理解に際しては、相補的な相同性のポリヌクレオチド文字列のアニーリングを促すモデルもまた、本明細書中の配列に対応する文字列上で代表的には実行される配列アライメントまたは他の操作の根拠として使用され得る（例えば、ワードプロセッシング操作、配列またはサブ配列の文字列を含む図の構成、アウトプットの表など）。配列類似性を計算するためのGOを伴うソフトウェアパッケージの例はBLASTであり、これは、本明細書中の配列に対応する文字列を入力することによって本発明に適應され得る。

【0281】

BLASTはAltschulら (1990) J. Mol. Biol. 215: 403-410に記載されている。BLAST解析を実行するソフトウェアは、National Center for Biotechnology Information (World Wide Webのncbi.nlm.nih.govで利用可能)を通して公的に利用可能である。このアルゴリズムは、照会配列中の長さWの短いワードを同定することによって高スコア配列対を最初に同定することを包含する。これは、データベース配列中の同じ長さのワードと整列された場合に、一致するか、またはいくつかの正の値の閾値スコアTを満足するかのいずれかである。Tは、隣接ワードスコア閾値といわれる(Altschulら、前記)。これらの最初の隣接ワードのヒットは、それらを含むより長いHSPを見つけるための探索を開始するための種として機能する。次いで、このワードヒットは、累積のアライメントスコアが増加される限り、各々の配列に沿って両方の方向で伸長される。累積スコアは、ヌクレオチド配列の場合は、パラメーターM(一致する残基の対についての報酬(reward)スコア; 常に>0)およびパラメーターN(ミスマッチした残基についてのペナルティスコア; 常に<0)を用いて計算される。アミノ酸配列の場合には、スコア付けマトリックスが使用されて累積スコアを計算する。各方向でのワードヒットの伸長は以下の場合に停止される。累積アライメントスコアがそれが達した最大値から数量X落ちた場合; 1つまたは複数の負にスコア付けされる残基のアライメントの蓄積によって累積スコアが0またはそれ以下になった場合; または、配列のいずれかの末端に達した場合。BLASTアルゴリズムのパラメーターW、T、およびXは、アライメントの感度と速度を決定する。BLASTNプログラム(ヌクレオチド配列のための)は、デフォルトとして、ワード長(W)=11、予測性(E)=10、カットオフ=100、M=5、N=4、および両方の鎖の比較を使用する。アミノ酸配列の場合、BLASTPプログラムは、デフォルトとして、ワード長(W)=3、予測性(E)=10、およびBLOSUM62スコアリングマトリックス(HenikoffおよびHenikoff (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 10915を参照されたい)を使用する。

【0282】

有用な配列アライメントアルゴリズムのさらなる例は、PILEUPである。PILEUPは、漸進的な、ペア形成のアルゴリズムを用いて、関連する配列の群より複数の配列アライメントを作製する。これはまた、アライメントを作製するために、使用したクラスター形成の関連性を示す樹形図をプロットし得る。PILEUPは、FengおよびDoolittle、(1987) J. Mol. Evol. 35: 351-360の漸進的なアライメント方法を単純化したものを使用する。使用される方法は、HigginsおよびSharp、(1989) CABIOS 5: 151-153によって記載される方法と同

様である。このプログラムは、例えば、最大長5000文字の300配列までを整列させ得る。この複数のアライメント手順は、2つの最も類似している配列のペア形成アライメントで開始し、2つの整列された配列のクラスターを生成する。次いで、このクラスターは、次に最も関連する配列または整列された配列のクラスターに整列され得る。2つの配列のクラスターは、2つの個々の配列のペア形成アライメントの単純な伸長によって整列され得る。最終的なアライメントは、一連の漸進的な、ペア形成アライメントによって達成される。このプログラムはまた、クラスター形成の関連性の系統樹または樹形図の表示をプロットするために使用され得る。このプログラムは、配列比較の領域についての特定の配列およびアミノ酸またはヌクレオチドの座標を指定することによって実行される。例えば、単量体ドメインファミリー中の保存性アミノ酸を決定するために、または、ファミリー中の単量体ドメインの配列を比較するために、本発明の配列またはコードする核酸が整列されて、構造-機能情報を提供する。

10

【0283】

1つの局面において、コンピュータシステムは、「インシリコ」の配列組換えまたは単量体ドメインに対応する文字列のシャッフリングを実行するために使用される。種々のこのような方法が、1999年2月5日に出願された（米国特許出願第60/118854号）、SelifonovおよびStemmerの「Methods For Making Character Strings, Polynucleotides & Polypeptides Having Desired Characteristics」ならびに、1999年10月12日に出願された（米国特許出願第09/416,375号）、SelifonovおよびStemmerの「Methods For Making Character Strings, Polynucleotides & Polypeptides Having Desired Characteristics」に示されている。手短かに言えば、遺伝子オペレーターが、遺伝的アルゴリズムにおいて、所定の配列を変化させるために使用される（例えば、変異、組換え、死などのような遺伝的現象を模倣することによって）。配列を最適化するための多次元解析はまた、例えば、'375出願において記載されるように、コンピュータシステムにおいて実行され得る。

20

【0284】

デジタルシステムはまた、オリゴヌクレオチド合成機に指示して、オリゴヌクレオチドを合成し得るか（例えば、遺伝子再構築または組換えのために使用される）、または、市販されている供給源からのオリゴヌクレオチドを注文し得る（例えば、適切な注文フォームを印刷することによって、またはインターネット上で注文フォームにリンクすることによって）。

30

【0285】

このデジタルシステムはまた、核酸合成を制御するためのアウトプット要素を含み得る（例えば、配列または組換えのアライメント（例えば、本明細書中に記載されるような、シャッフルされた単量体ドメイン）に基づいて）。すなわち、本発明の集積システムは、任意でオリゴヌクレオチド合成機またはオリゴヌクレオチド合成制御装置を含む。このシステムは、アライメントの下流で発生する他の操作または本明細書中の配列に対応する文字列を使用して実行される他の操作（例えば、アッセイ法に関して上記に示したような操作）を含み得る。

【0286】

実施例

40

以下の実施例は例示のために提供され、特許請求の範囲を制限するためではない。

【0287】

実施例1

本実施例は、単量体ドメインの選択および多量体の作製を記載する。

【0288】

単量体ドメインを同定するためおよび選択された単量体ドメインから多量体を作製するための出発物質、ならびに手順は、種々のヒト配列および/または非ヒト配列のいずれかから導き出され得る。例えば、所望のリガンドまたはリガンドの混合物についての特異的な結合を有する選択された単量体ドメインを産生するために、1つまたは複数の単量体ドメイン遺伝子が、特定のリガンドに結合する単量体ドメインのファミリーより選択される

50

。1つまたは複数の単量体ドメイン遺伝子をコードする核酸配列は、ゲノムDNAまたはcDNAのPCR増幅によって得られ得るか、または任意で重複するオリゴヌクレオチドを使用して合成的に産生され得る。

【0289】

最も一般的には、次いで、これらの配列は、発現およびスクリーニングのために、細胞表面ディスプレイの様式（すなわち、細菌、酵母、または哺乳動物（COS）の細胞表面ディスプレイ；ファージディスプレイ）にクローニングされる。組換え配列は、適切な宿主細胞（ここで組換え配列が発現および細胞表面にディスプレイされる）にトランスフェクト（形質導入または形質転換）される。例えば、細胞は、標識された（例えば、蛍光標識された）所望のリガンドで染色され得る。染色された細胞はフローサイトメトリーによって分別され、遺伝子をコードする選択された単量体ドメインが、陽性細胞から回収される（例えば、プラスミド単離、PCR、または伸長およびクローニングによって）。染色および分別のプロセスは、反復する複数の回数であり得る（例えば、所望のレベルの富化が得られるまで、所望のリガンドの漸進的な減少濃度を使用する）。または、所望のリガンドまたはリガンドの混合物を結合する細胞を同定するために使用され得る、当技術分野で公知のスクリーニングまたは検出の任意の方法が使用され得る。

10

【0290】

細胞を結合する所望のリガンドまたはリガンドの混合物から回収された遺伝子をコードする選択された単量体ドメインは、本明細書または引用された参考文献中に記載される方法のいずれかに従って任意で組み換えられ得る。次いで、多様化のこのラウンドにおいて産生された組換え配列は、所望のまたは標的のリガンドについて改善された親和性を有する組換え遺伝子を同定するために、同じ方法または異なる方法によってスクリーニングされる。多様化および選択のプロセスは、所望の親和性が得られるまで、任意で反復される。

20

【0291】

本方法によって選択された、選択された単量体ドメイン核酸は、リンカー配列を介して一緒に連結され得、多量体を作製する（例えば、DNAライゲーションによる、選択された単量体ドメインをコードする核酸配列のコンピナトリアルアセンブリーによって、または、任意でPCRに基づく、自己プライミング重複反応によって）。次いで、多量体をコードする核酸配列は、発現およびスクリーニングのために、細胞表面ディスプレイ様式（すなわち、細菌、酵母、または哺乳動物（COS）の細胞表面ディスプレイ；ファージディスプレイ）にクローニングされる。組換え配列は、適切な宿主細胞（ここで組換え配列が発現および細胞表面にディスプレイされる）にトランスフェクト（形質導入または形質転換）される。例えば、細胞は、標識された（例えば、蛍光標識された）所望のリガンドまたはリガンドの混合物で染色され得る。染色された細胞はフローサイトメトリーによって分別され、遺伝子をコードする選択された多量体が、陽性細胞から回収される（例えば、PCR、または伸長およびクローニングによって）。陽性細胞は、選択された単量体ドメインと比較して、所望のリガンドまたはリガンドの混合物に対する、改善された結合活性もしくは親和性、または変化した特異性を有する多量体を含む。染色および分別のプロセスは、反復する複数の回数であり得る（例えば、所望のレベルの富化が得られるまで、所望のリガンドまたはリガンドの混合物の漸進的な減少濃度を使用する）。または、所望のリガンドまたはリガンドの混合物を結合する細胞を同定するために使用され得る、当技術分野で公知のスクリーニングまたは検出の任意の方法が使用され得る。

30

40

【0292】

細胞を結合する所望のリガンドまたはリガンドの混合物から回収された遺伝子をコードする選択された多量体は、本明細書または引用された参考文献中に記載される方法のいずれかに従って任意で組み換えられ得る。次いで、多様化のこのラウンドにおいて産生された組換え配列は、所望のまたは標的のリガンドについて改善された結合活性もしくは親和性、または変化した特異性を有する組換え遺伝子を同定するために、同じ方法または異なる方法によってスクリーニングされる。多様化および選択のプロセスは、所望の結合活性

50

もしくは親和性、または変化した特異性が得られるまで、任意で反復される。

【0293】

実施例2

本実施例は、ヒト血清アルブミン（HSA）に結合することができる単量体ドメインの選択を記載する。

【0294】

ファージの産生のため、大腸菌DH10B細胞（Invitrogen）を、pIIIファージタンパク質への融合として、LDL受容体クラスAドメイン変異体のライブラリーをコードするファージベクターで形質転換した。これらの細胞を形質転換するため、エレクトロポレーション装置MicroPulser（BioRad）を、同じ製造業者によって供給されたキュベットとともに使用した。DNA溶液を細胞懸濁液100 μ lと混合し、氷上でインキュベートし、キュベットに移した（電極ギャップ1 mm）。パルス標識ののち、SOC培地（2重量/容量%トリプトン、0.5重量/容量%酵母エキス、10 mM NaCl、10 mM $MgSO_4$ 、10 mM $MgCl_2$ ）2 mlを添加し、形質転換混合物を37 $^{\circ}C$ で1時間インキュベートした。多数の形質転換物を合わせ、20 μ g/mlテトラシクリンおよび2 mM $CaCl_2$ を含有する500 ml 2xYT培地に希釈した。全部で10 μ gの連結DNAを使用する10回のエレクトロポレーションにより、 1.2×10^8 個の独立したクローンを得た。

10

【0295】

Aドメイン変異体ファージのライブラリーをコードするファージベクターで形質転換された細胞を含有する培養物160 mlを22 $^{\circ}C$ 、250 rpmで24時間増殖させ、その後、無菌遠心分離管に移した。細胞を遠心分離（15分、5000g、4 $^{\circ}C$ ）によって沈降させた。ファージ粒子を含有する上澄みを1/5容量の20重量/容量% PEG8000、15重量/容量% NaClと混合し、-4 $^{\circ}C$ で数時間インキュベートした。遠心分離（20分、10000g、4 $^{\circ}C$ ）ののち、沈殿したファージ粒子を、2 mM $CaCl_2$ を含有する冷温TBS（50 mMトリス、100 mM NaCl、pH8.0）2 mlに溶解した。溶液を氷上で30分間インキュベートし、2個の1.5 ml反応容器に分配した。遠心分離して未溶解成分を除去したのち（5分、18500g、4 $^{\circ}C$ ）、上澄みを新たな反応容器に移した。1/5容量の20重量/容量% PEG8000、15重量/容量% NaClを加え、氷上で60分間インキュベートすることにより、ファージを再沈殿させた。遠心分離（30分、18500g、4 $^{\circ}C$ ）し、上澄みを除去したのち、沈殿したファージ粒子を、2 mM $CaCl_2$ を含有する全部で1 mlのTBSに溶解した。氷上で30分間インキュベートしたのち、上記のように溶液を遠心分離処理した。ファージ粒子を含有する上澄みをアフィニティー濃縮のためにそのまま使用した。

20

30

【0296】

96穴プレート（Maxisorp, NUNC, Denmark）を使用してファージのアフィニティー濃縮を実施した。単一のウェルを、TBS中100 μ g/mlヒト血清アルブミン（HSA, Sigma）の溶液150 μ lとのインキュベートにより、室温で12時間コーティングした。HSAインキュベートののち残った結合部位を、TBST（TBS、0.1重量/容量% Tween 20を含有）中250 μ l 2重量/容量% ウシ血清アルブミン（BSA）とともに室温で2時間インキュベートすることによって飽和させた。その後、約 5×10^{11} 個のファージ粒子を含有するファージ溶液40 μ lを、3% BSAおよび2 mM $CaCl_2$ を含有する80 μ l TBSTと室温で1時間かけて混合した。非結合ファージ粒子を除去するため、2 mM $CaCl_2$ を含有する130 μ l TBSTを使用して、ウェルを1分間ずつ5回洗浄した。

40

【0297】

ウェル表面に結合したファージを、130 μ l 0.1 M グリシン/HCl pH2.2との15分間のインキュベートまたはTBS中500 μ g/ml HSA 130 μ lを加えることによる競合的な方法で溶出させた。前者の場合、ウェルから取り出したのち、溶出液を30 μ l 1Mトリス/HCl pH8.0と混合することにより、溶出画分のpHをすぐに中和した。

【0298】

ファージの増幅のためには、溶出液を使用して大腸菌K91BluKan細胞（F⁺）に感染させた。溶出したファージ溶液50 μ lを細胞調製物50 μ lと混合し、室温で10分間インキュベ

50

トした。その後、20 μ g/ml テトラシクリンを含有する20 ml LB培地を加え、感染した細胞を22^o、250rpmで36時間増殖させた。その後、細胞を沈降させた(10分、5000g、4^o)。上記の沈殿によって上澄みからファージを回収した。ファージ粒子を繰り返しアフィニティー濃縮するため、本実施例に記載する同じ手順を使用した。HSAに対するその後2回のパニングののち、ランダムなコロニーを選択し、使用された標的タンパク質に対するその結合特性に関して試験した。

【0299】

実施例3

本実施例は、HSAに結合することができる単量体ドメインの生物学的活性の測定を記載する。

10

【0300】

HSA結合ドメインがインビボでのタンパク質の血清半減期を延長する能力を示すため、以下の実験手順を実施した。HSAに結合するために進化したAドメイン(実施例2を参照されたい)およびストレプトアビジン結合Aドメインからなる多量体Aドメインをストレプトアビジン結合Aドメインそのものと比較した。タンパク質を、ヒト血清アルブミン(HSA)を添加されていたマウスまたは添加されていなかったマウス(対照としての)に注射した。Aドメインタンパク質の血清レベルを観察した。

【0301】

したがって、標準的な分子生物学法(Maniatisらを参照されたい)を使用して、HSAに結合するために進化したAドメイン(実施例1を参照されたい)を遺伝子レベルでストレプトアビジン結合Aドメイン多量体に融合させた。Aドメイン多量体ならびにヘキサヒスチジンタグおよびHAタグをコードする得られた遺伝子構築物を使用して大腸菌中でタンパク質を産生した。再折りたたみおよびアフィニティータグ媒介精製ののち、タンパク質を150 mM NaCl、5 mM トリス pH8.0、100 μ M CaCl_2 に対して数回透析し、無菌ろ過した(0.45 μ M)。

20

【0302】

2セットの動物実験を実施した。第一のセットで、濃度2.5 μ Mの調製タンパク質溶液各1 mlを別々のマウスの尾静脈に注射し、注射の2分後、5分後および10分後に血清試料を採取した。第二のセットで、前記タンパク質溶液を50 mg/mlヒト血清アルブミンで補足した。前記のとおり、各溶液1 mlをマウス1匹あたり注射した。注射されたストレプトアビジン結合Aドメイン二量体の場合、注射の2分後、5分後および10分後に血清試料を採取したが、三量体の場合、10分後、30分後および120分後に血清試料を採取した。すべての実験は二通りで実施し、個々のマウスを時点ごとに検定した。

30

【0303】

血清試料中のAドメインの血清レベルを検出するため、酵素結合免疫吸着検定法(ELISA)を実施した。そのために、Maxisorp 96穴マイクロタイタープレート(NUNC, Denmark)のウェルを、2 mM CaCl_2 を含有するTBS中の抗His₆抗体各1 μ gで、4^oで1時間かけてコーティングした。残りの結合部位をカゼイン(Sigma)溶液で1時間ブロックしたのち、ウェルを、0.1% Tweenおよび2 mM CaCl_2 を含有するTBSで3回洗浄した。血清試料の連続希釈物を調製し、ウェルの中で2時間インキュベートしてAドメインタンパク質を捕捉した。前記のように洗浄したのち、西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)(Roche Diagnostics, 25 μ g/ml)に結合した抗HAタグ抗体を加え、2時間インキュベートした。上記のとおり洗浄したのち、HRP基質(Pierce)を加え、製造業者の指示にしたがって検出反応を発生させた。血清試料中に存在するAドメインタンパク質の量を反映する光吸収を450 nmの波長で計測した。得られた値を正規化し、タイムスケールに対してプロットした。

40

【0304】

得られた値の評価は、HSAの非存在で約4分、マウスがHSAを添加されていた場合で5.2分のストレプトアビジン結合Aドメインの血清半減期を示した。HSA結合Aドメインを含有するAドメインの三量体は、HSAの非存在で6.3分の血清半減期を示したが、HSAがマウス中に存在した場合、有意に増大した38分の半減期を示した。これは、HSA結合Aドメインを融合

50

パートナーとして使用して、タンパク質治療剤をも含む任意のタンパク質の血清半減期を増すことができることを明らかに示す。

【0305】

実施例4

本実施例は、血中のタンパク質の半減期の延長を実証する実験を記載する。

【0306】

本発明の単量体ドメインを使用してタンパク質の血中半減期を延長することができることをさらに実証するため、サル血清アルブミン、ヒト血清アルブミン、ヒトIgGおよびヒト赤血球に対して選択した個々の単量体ドメインタンパク質をヘパリン化ヒトまたはサル全血のアリコートに加えた。

10

【0307】

以下のリストは、本実施例で分析した単量体ドメインの配列を提示する。

```
IG156  CLSSEFQCQSSGRCIPLAWVCDGDNDCCRDDSDEKSKCKPRT
RBCA   CRSSQFQCNDSTRICIPGRWRCDGDNDCCQDGSDETGCQDSDHILPFSTPGPST
RBCB   CPAGEFPCKNGQCLPVTWLCQDGVNDCLDGSDEKGCGRPGPGATSAPAA
RBC11  CPPDEFPCCKNGQCIQDQWLCQDGVNDCLDGSDEKDCGRPGPGATSAPAA
CSA-A8 CGAGQFPCKNGHCLPLNLLCDGVNDCEDNSDEPSELCKALT
```

【0308】

次に、単量体タンパク質を含有する血液アリコートを個々の透析バッグ（2,5000 MWCO）に加え、シールし、トリス緩衝生理食塩水4L中、室温で終夜攪拌した。

20

【0309】

疎水性相互作用によって抗6xHis抗体を96穴プレート（Nunc）に固定化した。各血液試料からの血清の連続希釈物を固定化抗体とともに3時間インキュベートした。プレートを洗浄して非結合タンパク質を除去し、 α -HA-HRPで探索して単量体を検出した。

【0310】

透析実験で長い半減期を有すると同定された単量体を、HA、FLAG、E-Tagまたはmycエピトープタグを含有するように構築した。タグごとに一つのタンパク質を含有する四つの単量体をプールして、二つのプールを作製した。

【0311】

1匹のサルに対し、生理食塩水中2.5 ml全量の単量体をプールあたり0.25 mg/kgの用量で皮下注射した。24時間後、48時間後、96時間後および120時間後に血液試料を抜き取った。疎水性相互作用によって抗6xHis抗体を96穴プレート（Nunc）に固定化した。各血液試料からの血清の連続希釈物を固定化抗体とともに3時間インキュベートした。プレートを洗浄して非結合タンパク質を除去し、 α -HA-HRP、 α -FLAG-HRP、 α -ETag-HRPおよび α -myc-HRPで探索して単量体を検出した。

30

【0312】

実施例5

本実施例は、CD40Lに結合することができる単量体ドメインの生物学的活性の測定を記載する。

40

【0313】

実施例2で上記の同じスクリーニング法を使用して、ただし、組換えCD40Lを標的として使用し、競合的溶出工程を実施せずに、CD40Lに結合することができる単量体に関してLDL受容体クラスAドメインライブラリーをスクリーニングした。選択したAドメインの生物学的活性を測定するため、大腸菌中で封入体または可溶性タンパク質としてタンパク質を産生した。CD40Lへの結合親和性を有するアフィニティータグ精製Aドメインタンパク質の生物学的活性をrsCD40L刺激B細胞増殖の阻害によって計測した。そのために、B細胞をインターロイキン4（IL-4, R&D Systems, Minneapolis, MN）および組換え可溶性CD40L（rsCD40L, Peprotech, Rocky Hill, NJ）で刺激し、トリチウム標識チミジンの取り込みを計測した。

50

健康なドナーのパフィーコートから勾配遠心分離によってB細胞を濃縮し、FACSによってさらに精製した。典型的な検定法のために、B細胞を96穴マイクロタイタープレート（1ウェルあたり細胞100000個）に移し、適切な組織培地中、IL-4（100 μ g/ml）、rsCD40L（10 μ g/ml）および異なる濃度の選択されたAドメイン変異体とともに3日間インキュベートした。インキュベーションの最後の8時間中、培養物を1 μ Ci/ウェルの 3 Hチミジン（ICN）でパルス標識し、その後の取り込みをシンチレーションカウンターで計測した。

CD40Lへの結合親和性を有する選択されたAドメインは、AドメインとともにインキュベートされたB細胞へのチミジン取り込みの低下によって示されるように、rsCD40L誘発B細胞刺激を阻害することができた。

实施例 6

【 0 3 1 7 】

単量体性C2ドメインをコードするDNA配列のライブラリーは、Stemmerら、Gene 164、49-53 (1995)に記載されるように、アセンブリーPCRによって作製される。このPCR反応において使用するオリゴヌクレオチドは：

[illegible]

【 0 3 1 8 】

PCR断片をBamHIおよびXhoIで消化する。消化産物を、1.5%アガロースゲルで分離し、C2ドメイン断片をゲルから精製する。このDNA断片を、酵母表面ディスプレイベクターpYD1 (Invitrogen) の対応する制限部位にライゲーションする。

ライゲーション混合物を、酵母株EBV100の形質転換のために使用する。形質転換体は、グルコース含有選択培地（-Trp）中で、30℃で細胞を増殖することによって選択する。

C2ドメインライブラリーの表面ディスプレイは、ガラクトース含有選択培地中で、20で細胞を増殖することによって誘導される。細胞をPBSですすぎ、次いで、蛍光標識した標的タンパク質とともにインキュベートし、再度PBS中ですすぎ。

次いで、細胞を、FACSによって分別し、陽性細胞をグルコース含有選択培地中で再度増殖される。この細胞培養物を、分別の2回めのラウンドのために使用し得るか、またはプラスミドDNAの単離のために使用され得る。精製したプラスミドDNAを、DNA配列をコードするC2ドメインをPCR増幅するための鋳型として使用する。

このPCR反応において使用するオリゴヌクレオチドは、

5'-acactgcaatcgcgcttacggctCAGgtgCTGgtgggtcccataagttcactgta
 5'-gaccgatagcttgccgattgcagtCAGcacCTGaaccaccaccagaaccaccaccacacttcaa
 gggacatctcta

(リンカー配列は下線で示す)である(配列番号:224~225、それぞれ出現順)。

【0323】

次いで、PCR断片を、AlwNIで消化し、消化産物を、1.5%アガロースゲルで分離し、C2ドメイン断片をゲルから精製する。続いて、PCR断片を、ストップ断片の存在下でDNAライゲーションによって多量体化する。ストップ断片を以下に列挙する。

ストップ1(配列番号:226):

5'-gaattcaacgctactaccattagtagaattgatgccaccttttcagctcgcgcc
 ccaaatgaaaaaatgggtcaaactaaatctactcgttcgcagaattgggaatcaactgttaca
 tggaatgaaacttccagacaccgtactttatgaatatattatgacgattccgaggcgcgcccg
 gactaccgctatgatgttccggattatgccccgggatcctcaggtgctg-3'

10

(EcoRIとAlwNIとで消化)

ストップ2(配列番号:227):

5'-caggtgctgcactcgaggccactgcggccgcataattaacgtagatttttccctccc
 aacgtcctgactgggtataatgagccagttcttaaaaatcgcataaaccagtagatgggtgattaa
 agttgaaattaaaccgtctcaagagctttgttacggtgatttgggtaatgaagctt-3'

(EcoRIとHindIIIとで消化)

20

【0324】

次いで、このライゲーション混合物を、EcoRIおよびHindIIIで消化する。

【0325】

多量体を、1%アガロースゲル上で分離し、ストップ1-C2-C2-ストップ2に対応するDNA断片をゲルから精製する。ストップ1-C2-C2-ストップ2断片は、プライマー

5'-aattcaacgctactaccat-3'(配列番号:242)および5'-

agcttcattacccaaatcaac-3'(配列番号:243)

を使用してPCR増幅し、引き続いてBamHIとXhoIで消化する。任意で多量体をコードするポリヌクレオチドは、アフィニティースクリーニングのさらなるラウンドを行い得る(例えば、上記のFACS解析)。

30

【0326】

続いて、高親和性結合体を単離および配列決定する。高結合体をコードするDNAを、発現ベクター中にクローニングし、適切な宿主中で複製する。発現したタンパク質を精製および特徴付けする。

【0327】

実施例7

本実施例は、LDL受容体Aドメインからなる三量体のライブラリーの開発を記載する。

【0328】

単量体性AドメインをコードするDNA配列のライブラリーは、Stemmerら、Gene 164、49-53(1995)に記載されるように、アセンブリーPCRによって作製される。このPCR反応において使用するオリゴヌクレオチドは:

40

5'-CACTATGCATGGACTCAGTGTGTCCGATAAGGGCACACGGTGCCTACCCGTATGATGTTCCGGATTATGCC
 CCGGGCAGTA
 5'-CGCCGTCGCATMSCMAGYKCNCSAGRAATACAWYGGCCGYTWYYGCACBKAAATTSGYYAGVCNSACAGGTA
 CTGCCCCGGGGCAT
 5'-CGCCGTCGCATMSCMATKCCNSAGRAATACAWYGGCCGYTWYYGCACBKAAATTSGYYAGVCNSACAGGTA
 CTGCCCCGGGGCAT
 5'-ATGCGACGGCGWWRATGATTGTSVAGATGGTAGCGATGAAVWGRRTTGTVMVNMVNMVGCCVTACGGGCT
 CGGCCTCT
 5'-ATGCGACGGCGWCCGGATTGTSVAGATGGTAGCGATGAAVWGRRTTGTVMVNMVNMVGCCVTACGGGCT
 CGGCCTCT
 5'-ATGCGACGGCGWWRATGATTGTSVAGATAACAGCGATGAAVWGRRTTGTVMVNMVNMVGCCVTACGGGCT
 CGGCCTCT
 5'-ATGCGACGGCGWCCGGATTGTSVAGATAACAGCGATGAAVWGRRTTGTVMVNMVNMVGCCVTACGGGCT
 CGGCCTCT
 5'-TCCTGGTAGTACTTATCTACTACTATTTGTCTGTGTCTGCTCTGGGTTCTTAACGGTTCGGCCACAGAGGC
 CGAGCCCGTA

10

である（配列番号：228～235、それぞれ出現順）。

R=A/G, Y=C/T, M=A/C, K=G/T, S=C/G, W=A/T, B=C/G/T, D=A/G/T, H=A/C/T,

V=A/C/G, および N=A/C/G/T

である。

20

【0329】

PCR断片をXmaIおよびSfiIで消化する。消化産物を、3%アガロースゲル上で分離し、Aドメイン断片をゲルから精製する。次いで、このDNA断片を、ファージディスプレイベクターフューズ（fuse）5-HA（フューズ5の誘導体）の対応する制限部位にライゲーションする。ライゲーション混合物を、エレクトロポレーション受容性の*E. coli*細胞（F-株、例えば、Top10またはMC1061）にエレクトロポレーションする。形質転換した*E. coli*細胞を、20 µg/mlのテトラサイクリンを含む2×YT培地中で一晩増殖させる。

【0330】

ビリオンをPEG沈殿によってこの培養物から精製する。標的タンパク質は、0.1M NaHCO₃中でインキュベートすることによって直接的に、またはビオチン-ストレプトアビジン結合を介して間接的に、固体表面（例えば、ペトリ皿またはマイクロタイタープレート）上に固定化される。精製したビリオンを、典型的な数として約 $1 \sim 3 \times 10^{11}$ TUで添加する。ペトリ皿またはマイクロタイタープレートを、4 でインキュベートし、洗浄緩衝液（TBS/Tween）で数回洗浄し、結合したファージをグリシン-HCl緩衝液を添加することによって溶出する。この溶出液を、1M Tris-HCl（pH 9.1）を添加することによって中和する。

30

【0331】

このファージを増幅し、引き続いてアフィニティー選択の2回目のラウンドへのインプットとして使用する。ssDNAを、QIAprep M13キットを用いて最終的な溶出液から抽出する。ssDNAを、DNA配列をコードするAドメインをPCR増幅するための鋳型として使用する。

【0332】

40

このPCR反応において使用するオリゴヌクレオチドは：

5'-aagcctcagcgaccgaa (配列番号: 236)

5'-agcccaataggaacccat (配列番号: 237)

である。

【0333】

PCR断片を、AlwNIおよびBgIIで消化する。消化産物を3%アガロースゲル上で分離し、Aドメイン断片をゲルから精製する。PCR断片を、以下のストップ断片の存在下でDNAライゲーションによって多量体化する。

ストップ1：

50

ストップ 1 (配列番号: 238):

5'-gaattcaacgctactaccattagtagaattgatgccaccttttcagctcgcgccccaaatgaaaaatggt
caactaaatctactcgttcgcagaattgggaatcaactgttacatggaatgaaacttcagacaccgtacttta
tgaatatattatgacgattccgagggcgccccggaactaccggtatgatgttcggattatgccccgggaggatcca
gtacctg-3'

(EcoRIとAlwNIとで消化)

ストップ 2:

ストップ 2 (配列番号: 239):

5'-gccctacgggcctcgaggcacctggtgcggcgcgatattaacgtagatttttccctcccaacgtcctgactg
gtataatgagccagttctttaaatacgcataaccagtagatggtgattaaagttgaaattaaaccgtctcaagagc
tttgttacggtgatttgggtaataagcctt-3'

10

(BglIIIとHindIIIとで消化)

【0334】

このライゲーション混合物を、EcoRIおよびHindIIIで消化する

【0335】

多量体を、1%アガロースゲル上で分離し、ストップ1-A-A-A-ストップ2に対応するDNA断片をゲルから精製する。ストップ1-A-A-A-ストップ2断片は、引き続いて、プライマー 5'-agcttcattacccaaatcaac-3' および 5' aattcaacgctactaccat-3'

20

を使用してPCR増幅し、引き続いて、XmaIおよびSfiIで消化する。次いで、選択したポリヌクレオチドをファージ発現系にクローニングし、標的タンパク質についての親和性について試験する。

【0336】

続いて、高親和性結合体を単離および配列決定する。高結合体をコードするDNAを、発現ベクター中にクローニングし、引き続いて適切な宿主中で発現させる。次いで、発現したタンパク質を精製および性格付けする。

【0337】

実施例 8

30

本実施例は、CD20特異的LDL受容体を用いたAドメインの発現を記載する。

【0338】

Aドメイン 10^9 個のライブラリーを表示する 10^{11} 個のファージを、5 mg/mlカゼインで予めブロッキングされていた 10^6 個のRaji細胞またはDaudi細胞に加えた。この混合物を4で2時間インキュベートしてファージを結合させた。細胞をTBS中1 mg/mlのカゼインで5回洗浄した。細胞をTBS中1 mg/mlのRituxanとともに4で2時間インキュベートして、CD20に特異的なファージを溶出させた。細胞を遠沈させ、上澄みを使用して大腸菌BluKan細胞に感染させた。

【0339】

ファージを25で2日間増殖させ、標準法によって精製した。パニングを、Raji細胞またはDaudi細胞を交互に選択しながら3回繰り返した。32のクローンを選択し、1 mg/mlのRituxanの存在または非存在で、Raji細胞またはDaudi細胞とともにインキュベートした。

40

【0340】

示差的結合を示したクローンを配列決定し(表1)、N末端およびC末端融合したSKVILEペプチドを有する発現ベクター中にクローニングした。タンパク質を産生し、標準法にしたがって精製した。

【0341】

Raji細胞またはDaudi細胞を、10% FBSで補足された新鮮なRPMI培地中で、精製単量体の存在または非存在で、37で6時間インキュベートした。死細胞をトリパンブルーで染め、血球計算器を使用して視覚的に計数した(図16)。

50

【 0 3 4 2 】

(表 1) CD20結合配列

```

2   CLPDEFQCRSTGICIPPLAWRCDGVNDCQDDSDETNCRATGRT
3   CLPGEFRCRGTSICIPPSWVCDGVDDCGDGSDEALEHCGDSHILPFSTPGPST
4   CQPNEFP CGSTGLCVPREWLCDGVDDCGDGSDEPD CGDSHILPFSTPGPST
5   CLPGEFRCRGTSICIPPSWVCDGVDDCGDGSDEALEHCGDSHILPFSTPGPST
6   CRSGEFKCHGTRPCVPQRWVCDGDDDCVDGSDEKSCETPARR
7   CRSSQFKCHNTRPCIPGRWVCDGVNDCLDGSDEANCRRAARR
8   CLPERFQCAVPGYCIPLPGVCDGVND CQEDSDEPNCRAPGLR
9   CRRNEFRCKSGHCVPQPLVCDGVRDCEDNSDEPSCGRPGPGATSAPAA
10  CRAGEFPCKNGQCLPVTWLC DGVNDCLDGSDEKGCGRPGPGATSAPAA
11  CPSNEFTCKSGHCVPQPFVCDGVDPDCEDNSDETSCGRPGPGATSAPAA
14  CRASEFP CRGTGT CIPRHWL CDGENDCADSSDEKDCGRPGPGATSAPAA
15  CPPDEFRCRKS YKRCVPLAFVCDGVDDCEDGSDEEGCGRPGPGATSAPAA
1   CLPDEFQCRSTGICIPPLAWRCDGVNDCQDDSDETNCRATGRT
6   CPAGEFQCGNGQCIPATWLC DGVNDCLDNSDETGC S QDPEFHKV
CC3 CPASQFKCHNTRTCIPRRWVCDGVNDCLDGSDEANCRRAAPT

```

10

【 0 3 4 3 】

実施例 9

本実施例は、TP0-R特異的LDL受容体を用いたAドメインの発生を記載する。

20

【 0 3 4 4 】

Aドメイン 10^9 個のライブラリーを表示する 10^{11} 個のファージを、Immunosorpプレート (Nunc) にコーティングされ、カゼインでブロッキングされていた組換えTP0-Rに加えた。ファージを標的とともに4 で3時間インキュベートし、TBS緩衝剤で3回洗浄し、100 mMグリシンpH2.2で溶出させた。2M Na_2HPO_4 の添加によって溶出液を中和し、これを使用して大腸菌BluKan細胞に感染させた。

【 0 3 4 5 】

ファージを37 で終夜増殖させ、標準法によって精製し、選択を1回繰り返した。固定化されたTP0-R上での二回目の選択ののち、ファージを、カゼインで事前にブロッキングしておいたTF1細胞の懸濁液に加えた。細胞を4 で2時間インキュベートしたのち、TBSで5回洗浄した。

30

【 0 3 4 6 】

細胞懸濁液に大腸菌を直接加えることによってファージを溶出させたのち、ファージを23 で2日間増殖させた。ファージを標準法によって精製し、TF1細胞上での選択を1回繰り返した。

【 0 3 4 7 】

TF1細胞上での二回目の選択から得られたファージを、上記のような固定化組換えTP0-R上での1回の選択に使用した。ただし、ファージは、50 mM EDTAおよび20 mM DTTの溶液を使用して溶出させた。ファージクローンを選択し、組換えTP0-RおよびTF1細胞に結合するその能力に関して検定し(図17)、配列決定した(表2)。

40

【 0 3 4 8 】

陽性のクローンを遺伝子的に融合させて直接ホモ二量体を作製し、12アミノ酸反復Gly-Gly-Serリンカーをドメイン間に挿入し、または挿入せずに、標準的な分子生物学技術を使用して、発現ベクター中にクローニングした。タンパク質を産生し、標準技術を使用して精製した。タンパク質を、TF1細胞増殖検定法で天然TP0活性を模倣するその能力に関して検定した(図18)。

【 0 3 4 9 】

(表 2) TP0-R結合配列

T4690 (TPO1) CHSTGEFRCSRSSGICVSPTWVCDGENDCLDGSDEASCTAAGPT
 T5 (TPO2) CPPSEFRCSNGQCIPREWRCDGDNDCADNSDEESCSAPASEPPGSLSLQ
 T2 (TPO9) CLPSEFRCSNGHCIPRRWRCDGEPDCQDGSDEANCGTSEHTSLQ
 T1 (TPO10) CQSNEFQCHNYNICLPRPWVCDGVNDGPDGSDEEGCSAPASEPPGSLSLQ

【0350】

実施例10

本実施例は、IgE特異的LDL受容体を用いたAドメインおよび多量体の発生を記載する。

【0351】

Aドメイン 10^9 個のライブラリーを表示する 10^{11} 個のファージを、Immunosorpプレート（Nunc）上に固定化され、カゼインでブロッキングされているヒトIgEに加えた。可溶性ヒトIgGをファージとともに5 mg/mlの濃度で加えた。プレートを4 で3時間インキュベートしたのち、3回洗浄して非結合ファージを除去した。ファージを、50 mM EDTA、20 mM DTTの混合物で溶出させ、これを使用して大腸菌に感染させた。ファージを25 で2日間増殖させ、標準法によって精製した。

【0352】

固定化IgE上での選択を2回繰り返した。個々のクローンを配列決定し、IgE結合親和性に関して検定した。選択したライブラリーの主成分であった単一クローンをさらなる研究のために選択した（表3）。

【0353】

いくつかの方法のいずれかによって固定化されたヒトIgEに結合したファージの数を計測することにより、単量体結合エピトープをマッピングした。1) プラスチックに直接コーティングされたIgE、2) IgEとそのCE2ドメインで結合する抗体を介して結合したIgE、3) IgEとそのCE3ドメインで結合する抗体を介して結合したIgE、または4) 固定化組換え可溶性IgE受容体を介して結合したIgE。ファージクローンの結合の示差的頻度は、これらのファージクローンが認識するIgE上の結合部位を示す。

【0354】

データは、この単量体がCE3に結合し、正常な受容体結合を妨害することを示す（図19）。

【0355】

ランダムなドメインをIgE結合配列の5'末端または3'末端に連結し、この構築物をfuse5ファージDNAに連結することによって新たなライブラリーを作製した。ファージを産生し、標準法によって精製した。二量体ファージを、10倍連続希釈（1ウェルあたり1 μ g ~ 10 ag）でImmunosorpプレート（Nunc）に固定化され、カゼインでブロッキングされているヒトIgEとともにインキュベートした。可溶性ヒトIgGを5 mg/mlでファージとともに加えた。ウェルを100 mM酢酸ナトリウムpH5で10回洗浄し、大腸菌細胞の直接添加によってファージを溶出させた。

【0356】

各連続希釈物から溶出させたファージ力価をブランクウェルから溶出させた力価と比較し、ブランクウェルに対して濃縮を示した最低希釈物を増殖のために選択した（通常は1ウェルあたり1 ~ 10 pg）。ファージを25 で2日間増殖させ、標準法によって精製した。

【0357】

連続希釈物に対してさらに2回、ファージを選択した。個々のクローンを配列決定した（表3）。

【0358】

（表3）IgE結合単量体配列

IGE-1

CPANEFQCRNSSTCI PRRWLC DGDDDC GDGSD ETGCSAPASEPPGSLSLQ

ウォーキングした二量体

1

CPANEFQCRNSSTCI PRRWLC DGDDDC GDGSD ETGCSAPASEPPGSL
CQPDQFRCSSGRCLSREWL CDGEDDCEDDSDETDCPTRTSLQ

2

CPANEFQCRNSSTCI PRRWLC DGDDDC GDGSD ETGCSAPASEPPGSL
CLPSQFP CD SGNCLPLTWL CDGVDDCGDNSDEEDCSAPASEPPGSLSLQ

3

CPANEFQCRNSSTCI PRRWLC DGDDDC GDGSD ETGCSAPASEPPGSL
CRANQFP CD NGNCLPQWR CD GND CVDGSD ETSCEAPAH TSLQ

4

CPANEFQCRNSSTCI PRRWLC DGDDDC GDGSD ETGCSAPASEPPGSL
CAPNEFQCRDNNTCLPEDWR CDGEDDCADNSDEANCTTPGPTSLQ

5

CPANEFQCRNSSTCI PRRWLC DGEDDCEDGSDEASDTCSAPASEPPGSL
CPANEFQCRNSSTCI PRRWLC DGDDDC GDGSD ETGCSAPASEPPGSLSLQ

6

CGSGQFP CGSGHC VPLNWV CDGVDDCGDSD ETDC KAHT
CPANEFQCRNSSTCI PRRWLC DGDDDC GDGSD ETGCSAPASEPPGSLSLQ

7

CPANEFQCRNSSTCI PRRWLC DGDDDC GDGSD ETGCSAPASEPPGSL
CGADQFP CSSGHC IPLPWV CDGEDDCADGSDEADCRGTEPTSLQ

8

CPANEFQCRNSSTCI PRRWLC DGDDDC GDGSD ETGCSAPASEPPGSL
CAPSQFRCGNGRCIPRSWR CDGEDDCADDSDEENC SAPASEPPGSLSLQ

10

20

9

RVWRRLVGS

CRPNQFTCKSSETCI PAHWRCDGDDDCGDGSDEADCETRT

CPANEFQCRNSSTCIPRRWLCGDDDCGDGSDETGC SAPASEPPGSL SLQ

10

CPANEFQCRNSSTCIPRRWLCGDDDCGDGSDETGC SAPASEPPGSL

CQSSQFPCHDYEICLPATLLCDGVDDCLDGSDETNC AKPTSLQ

12

CPANEFQCRNSSTCIPRRWLCGDDDCGDGSDEPGCSAPASEPPGSL

CPPGEFPCGNRSVPLTWL CDGVDDCGDNSDETGCETTGR TSLQ

13 (27)

CGSNQFPCEGN CNVPLGWGCDGVNDCQDNSDESLATCGRPGPGATSAPAA

CPANEFQCRNSSTCIPRRWLCGDDDCGDGSDETGC SAPASEPPGSL SLQ

14

CPSGQFP CDNGHCIPRRWLCGEDDCPDGSDEAQVCQRT

CPANEFQCRNSSTCIPRRWLCGDDDCGDGSDETGC SAPASEPPGSL SLQ

15

CPANEFQCRNSSTCIPRRWLCGDDDCGDGSDETGC SAPASEPPGSL SLQ

ALLCDGVDDCDRGSDESALCEEHT

CPANEFQCRNSSTCIPRRWLCGDDDCGDGSDETGC SAPASEPPGSL SLQ

16

CPANEFQCRNSSTCIPRRWLCGDDDCGDGSDEPGCSAPASEPPGSL

CRRAEFTCRNGSCLPVPWL CDAENDCPDGSDEPD CGSPARRSLQ

19

CPANEFQCRNSSTCIPRRWLCGDDDCGDGSDEPGCSAPASEPPGSL

CPPDQFRCKNGRCIPRHLVCDGDDDCGDDSD EAGCQTRTSLQ

21

CPANEFQCRNSSTCIPRRWLCGDDDCGDGSDETGC SAPASEPPGSL

CEPGQFQCNNNDTCVSPPWLCADRD CGRSDERPPHCATPELTSLQ

23

CPAGQFRCENGRCLPPPWRCDGVNDCEDNSDEAGCGDSHILPFSTPGPST

CPANEFQCRNSSTCIPRRWLCGDDDCGDGSDETGC SAPASEPPGSL SLQ

25

CPANEFQCRNSSTCIPRRWLCGDDDCGDGSDEPGCSAPASEPPGSL

CLSSQFRCENGQCIPLTWGC DGDGSDETNCPTRTSLQ

26

CPANEFQCRNSSTCIPRRWLCGDDDCGDGSDETGC SPVPT

CPANEFQCRNSSTCIPRRWLCGDDDCGDGSDETGC SAPASEPPGSL SLQ

27 (13)

CGSNQFPCEGN CNVPLGWGCDGVNDCQDNSDESLATCGRPGPGATSAPAA

CPANEFQCRNSSTCIPRRWLCGDDDCGDGSDETGC SAPASEPPGSL SLQ

30

CPANEFQCRNSSTCIPRRWLCGDDDCGDGSDEPGCSAPASEPPGSL

CAASQFRCMNSRCLPPPLGCDGVDDCGDNSDEADCGRPGPGATSAPAA SLQ

31

CPANEFQCRNSSTCIPRRWLCGDDDCGDGSDETGC SAPASEPPGSL

CPANEFQCRNSSTCIPRRWLCGEDDCGDGSDETGC SAPASEPPGSL SLQ

10

20

30

【 0 3 5 9 】

実施例 11

本実施例は、「ウォーキング」によるCD28特異的LDL受容体を用いたAドメインおよび二量体の発生を記載する。

40

【 0 3 6 0 】

Stemmerら、Gene 164:49-53(1995)に記載されているアセンブリーPCRによって単量体AドメインをコードするDNA配列のライブラリーを作製した。このPCR反応で使用したオリゴヌクレオチドは以下である。

5'-ATTCTCACTCGGCCGACGGTGCCTACCCGT-3'
 5'-ACGGTGCCTACCCGTATGATGTTCCGGATTATGCCCGGGTCTGGAGGCGTCTGGTGGTTTCGTGT-3'
 5'-CGCCGTCGCAAMSCMASBBBCNSTGRAABGCATNTKYYGKWAYYSYKGCATYYAAATTBGBYGRDAGVKTBCACGAACC
 ACCAGA-3'
 5'-CGCCGTCGCAAMSCMASBBBCNSTGRAABGCAKYKCCGYTKYYGCATYYAAATTBGBYGRDAGVKTBCACGAACCACCAGA-3'
 5'-CGCCGTCGCAAMSCMASBBBCNSTGRAABGCATNTKYYGKWAYYSYKGCACBKGAAC TSGYYCGVCNSACA
 CGAACCACCAGA-3'
 5'-CGCCGTCGCAAMSCMASBBBCNSTGRAABGCAKYKCCGYTKYYGCACBKGAAC TSGYYCGVCNSACACGAACCACCAGA-3'
 5'-TTGCGACGGCGWWRATGATTGTSNGGACRRCTCGGATGAA-3'
 5'-TTGCGACGGCGWWRATGATTGTSNGGACGGCTCGGATGAA-3'
 5'-TTGCGACGGCGWWRATGATTGTSRGGACRRCTCGGATGAA-3'
 5'-TTGCGACGGCGWCCGGATTGTSNGGACRRCTCGGATGAA-3'
 5'-TTGCGACGGCGWCCGGATTGTSNGGACGGCTCGGATGAA-3'
 5'-TTGCGACGGCGWCCGGATTGTSRGGACRRCTCGGATGAA-3'
 5'-AGGCCTGCAATGACGTABGCKBTKBACAGYTKYTTTCATCCGAGYYGTCC-3'
 5'-AGGCCTGCAATGACGTABGTNCGNSSYTBACAGYTKYTTTCATCCGAGYYGTCC-3'
 5'-AGGCCTGCAATGACACTTTGTGAAATTCGGATCCTGGCTACAGYTKYTTTCATCCGAGYYGTCC-3'
 5'-AGGCCTGCAATGACAGGAAACCCGGCGGTTTCAGATGCTGGCGCGCTACAGYTKYTTTCATCCGAGYYGTCC-3'
 5'-AGGCCTGCAATGACGCTGCCGGTGCAGAGTGCACCTGGGCGCGGACGACACAGYTKYTTTCATCCGAGYYGTCC-3'
 5'-AGGCCTGCAATGACGTGCTCGGACCTGGGGTCTAAACGGCAGAATATGAGAATCACCACAGYTKYTTTCATCCGAGYYGTCC-3'
 5'-AGGCCTGCAATGACGTABGCKBTKBACAMWSCKSCGVTTTCATCCGAGCCGTCC-3'
 5'-AGGCCTGCAATGACGTABGTNCGNSSYTBACAMWSCKSCGVTTTCATCCGAGCCGTCC-3'
 5'-AGGCCTGCAATGACACTTTGTGAAATTCGGATCCTGGCTACAMWSCKSCGVTTTCATCCGAGCCGTCC-3'
 5'-AGGCCTGCAATGACAGGAAACCCGGCGGTTTCAGATGCTGGCGCGCTACAMWSCKSCGVTTTCATCCGAGCCGTCC-3'
 5'-AGGCCTGCAATGACGCTGCCGGTGCAGAGTGCACCTGGGCGCGGACGACACAMWSCKSCGVTTTCATCCGAGCCGTCC-3'
 5'-AGGCCTGCAATGACGTGCTCGGACCTGGGGTCTAAACGGCAGAATATGAGAATCACCACAMWSCKSCGVTTTCATCCGAGC
 CGTCC-3'
 5'-AGGCCTGCAATGACGTABGCKBTKBACAGDKWCCRRCGVTTTCATCCGAGYYGTCC-3'
 5'-AGGCCTGCAATGACGTABGTNCGNSSYTBACAGDKWCCRRCGVTTTCATCCGAGYYGTCC-3'
 5'-AGGCCTGCAATGACACTTTGTGAAATTCGGATCCTGGCTACAGDKWCCRRCGVTTTCATCCGAGYYGTCC-3'
 5'-AGGCCTGCAATGACAGGAAACCCGGCGGTTTCAGATGCTGGCGCGCTACAGDKWCCRRCGVTTTCATCCGAGYYGTCC-3'
 5'-AGGCCTGCAATGACGCTGCCGGTGCAGAGTGCACCTGGGCGCGGACGACACAGDKWCCRRCGVTTTCATCCGAGYYGTCC-3'
 5'-AGGCCTGCAATGACGTGCTCGGACCTGGGGTCTAAACGGCAGAATATGAGAATCACCACAGDKWCCRRCGVTTTCATCCGAGYYG
 TCC-3'
 5'-TGAATTTTCTGTATGAGGTTTTGTCTAAACAACCTTTCAACAGTTTCGGCCCCAGAGGCTGCAATGAC-3'
 (R=A/G, Y=C/T, M=A/C, K=G/T, S=C/G, W=A/T, B=C/G/T, D=A/G/T, H=A/C/T, V=A/C/G, および
 N=A/C/G/T)

10

20

30

40

50

【0361】

PCR断片をXmaIおよびSfiIで消化した。消化産物を3%アガロースゲル上で分離し、Aドメイン断片をゲルから精製した。DNA断片を、インフレーションHAエピトープを有するfuse5の誘導体であるファージディスプレイベクターfuse5-HAの対応する制限部位に連結した。このライゲーション混合物をTransforMax(商標)EC100(商標)エレクトロコンピテント大腸菌細胞中にエレクトロポレーションした。形質転換大腸菌細胞を、20 µg/mlテトラシクリンおよび2 mM CaCl₂を含有する2xYT培地中37 °Cで終夜増殖させた。

【0362】

培地からPEG沈殿によってファージ粒子を精製した。96穴マイクロタイタープレート(Maxisorp)の個々のウェルを0.1M NaHCO₃中の標的タンパク質(IL-6またはCD28、1 µg/ウェル)でコーティングした。10 mg/mlカゼインを含有するTBS緩衝剤でウェルをブロッキングしたのち、精製ファージを約1~3×10¹¹個の典型的な数で加えた。マイクロタイタープレートを4 °Cで4時間インキュベートし、洗浄緩衝剤(TBS/Tween)で5回洗浄し、グリシン-HCl緩衝剤pH2.2を加えることによって結合ファージを溶出させた。1Mトリス-HCl(pH9.1)を加えることによって溶出液を中和した。大腸菌K91BluKan細胞を使用してファージ溶出液を増幅し、精製ののち、二回目および三回目のアフィニティー選択(上記工程を繰り返す)への入力として使用した。

【0363】

最終溶出液からのファージを、精製することなく直接、AドメインコードDNA配列をPCR増幅するための鋳型として使用した。このPCR反応で使用したオリゴヌクレオチドは以下である。

5'-aagcctcagcgaccgaa
 5'-agcccaataggaacccat

【0364】

PCR産物を精製したのち、50%をBpmIで消化し、他方の50%をBsrDIで消化した。

【0365】

DNAライゲーションを使用してナイーブAドメイン断片のライブラリーを結合することにより、消化した単量体断片を二量体に「ウォーキング」した。ナイーブAドメイン配列は、上記Aドメインプライマーを使用する初期Aドメインライブラリー（上記PEG精製から得られる）のPCR増幅によって得た。PCR断片を精製し、二等量に分けたのち、BpmIまたはBsrDIのいずれかで消化した。

【0366】

消化産物を2%アガロースゲル上で分離し、Aドメイン断片をゲルから精製した。精製した断片を二つの別個のプール（ナイーブ / BpmI + 選択 / BsrDIおよびナイーブBsrDI / + 選択 / BpmI）に組み合わせたのち、16 で終夜連結した。

【0367】

二量体Aドメイン断片をPCR増幅し（5サイクル）、XmaIおよびSfiIで消化し、2%アガロースゲルから精製した。高親和性結合剤を得るために洗浄をより激しく実施したことを除いて上記のとおりスクリーニング工程を繰り返し実施した。感染後、K91BluKan細胞を、40 µg/mlテトラシクリンを含む2xYT寒天プレートに載せ、終夜増殖させた。単一コロニーを選択し、20 µg/mlテトラシクリンおよび2mM CaCl₂を含む2xYT培地中で終夜増殖させた。これらの培養物からファージ粒子を精製した。

【0368】

個々のファージクローンのそれらの標的タンパク質への結合をELISAによって分析した。最高のELISAシグナルを発したクローンを配列決定し、その後、タンパク質発現ベクター中に再クローニングした。例示的な配列を以下に提示する。

>CD28-A1
CGPGRFQCESGQCIPATWVCDGENDCVDDSDKSCATTAPTCLPDQFQCHDYRRCIPLGWVCDGVDPDCVDNSDEA
NCEPPT

>CD28-A2
CGPGRFQCESGQCIPATWVCDGENDCVDDSDKSCATTAPTCTPPDQFTCNNGRCVPLNLCDGVNDCADSSDEPP
ECQPT

>CD28-A10
CGPGRFQCESGQCVPATWVCDGDDDCADGSDKSCATTAPTCESNQFQCGSGQCLPGTWRCVNDGNDCADSSDET
GCRPGPGATSAPAAACGPGRFQCNNGNCVPTLGLCDGNDGDDSDKANCSAPASEPPGSL

>CD28-A4
CGPGRFQCESGQCIPATWVCDGENDCVDDSDKSCATTAPTCPANQFQCGNGRCIPPAWLCDGVNDGDDGSDSQ
LCAATGPT

>CD28-A5
CGPGRFQCESGQCIPATWVCDGENDCVDDSDKSCATTAPTCLPNEFRCSNGQCIPPNWRCVDDCDRDSDEAG
CSQDPEFHKV

>CD28-A7
CGPGRFQCESGQCIPATWVCDGENDCVDDSDKSCATTAPTCSGQFRCNSNGNCLPLRLGCDGVDDCGDSSDEPL
DPCAATVRT

>CD28-A17
CGPGRFQCESGQCIPATWVCDGENDCVDDSDKSCATTAPTCTPSGQFKCNSNGRCVPPNWLCDGVNDGDDSDCAN
CPPT

>CD28-A19
CGPGRFQCESGQCIPATWVCDGENDCVDDSDKSCATTAPTCADEFQCSGKCLPVNWVCDGNDGDDSDDET
NCATTGRT

【0369】

IPTGによって発現ベクター中でタンパク質産生を誘発し、金属キレート化合物アフィニティークロマトグラフィーによって精製した。CD28特異的単量体を以下のようにして特性決定した。

【0370】

10

20

30

40

50

Biacore

250RU CD28をNHS/EDC結合によってCM5チップ（Biacore）に固定化した。単量体タンパク質の0.5 μ Mおよび5 μ M溶液を誘導体化チップの上に流し、標準的なBiacoreソフトウェアパッケージを使用してデータを解析した。表4を参照されたい。

【0371】

(表4)

CD28	ka	kd	KD
4	5.3E+03	3.9E-03	7.4E-07
5	1.7E+04	8.3E-04	4.8E-08
7	3.0E+04	3.2E-03	1.1E-07
17	1.4E+04	2.6E-03	1.9E-07
18	5.1E+02	2.1E-03	4.1E-06
19	1.8E+04	2.4E-03	1.3E-07
1	2.9E+03	3.9E-03	1.3E-06
2	7.4E+04	2.2E-03	3.0E-08
10	5.8E+04	1.7E-03	2.9E-08

10

【0372】

ELISA

1ウェルあたり10ナノグラムのCD28を疎水性相互作用によって96穴プレート（Nunc）に固定化した。プレートを5 mg/mlカゼインでブロッキングした。単量体タンパク質の連続希釈物を各ウェルに加え、3時間インキュベートした。プレートを洗浄して非結合タンパク質を除去し、 α -HA-HRPで探索して単量体を検出した。図20および表5を参照されたい。

20

【0373】

(表5)

	Biacore	ELISA
4	7.4E-07	1.4E-07
5	4.8E-08	1.0E-06
7	1.1E-07	1.2E-06
17	1.9E-07	5.4E-09
18	4.1E-06	1.0E-05
19	1.3E-07	6.3E-07
1	1.3E-06	7.8E-07
2	3.0E-08	1.6E-08
10	2.9E-08	1.7E-10

30

【0374】

PBMC検定法

ヒトおよびサルPBMCを使用して上記のように効力検定を実施した。PBMC検定法におけるCD28結果

ヒト細胞上：

CD28 単量体	クローン 18	IC50 = >1,000 nM (低活性)	
CD28 二量体	クローン 7	IC50 = 2 nM = 14 ng/ml	阻害率 82%
CD28 三量体	クローン 10	IC50 = 3 nM = 40 ng/ml	阻害率 81%

サル細胞上：

CD28 二量体	クローン 7	IC50 = 2 nM	阻害率 54%
CD28 三量体	クローン 10	IC50 = 7 nM	阻害率 81%

10

【 0 3 7 5 】

実施例 12

本実施例は、IL6特異的LDL受容体を用いたAドメインおよび二量体の発生を記載する。

【 0 3 7 6 】

Stemmerら、Gene 164:49-53(1995)に記載されているアセンブリ-PCRによって単量体AドメインをコードするDNA配列のライブラリーを作製した。このPCR反応で使用したオリゴヌクレオチドは以下である。

```

5'-ATTCTCACTCGGCCGACGGTGCCTACCCGT-3'
5'-ACGGTGCCTACCCGTATGATGTTCCGGATTATGCCCGGGTCTGGAGGCGTCTGGTGGTTCGTGT-3'
5'-CGCCGTCGCAAMSCMASBBBCNSTGRAABGCATNTKYYGKWAYYSYKGCATYYAAATTBGBYGRDAGVKTBACACGAACC
  ACCAGA-3'
5'-CGCCGTCGCAAMSCMASBBBCNSTGRAABGCAKYKGGCGYTKYYGCATYYAAATTBGBYGRDAGVKTBACACGAACCACCAGA-3'
5'-CGCCGTCGCAAMSCMASBBBCNSTGRAABGCATNTKYYGKWAYYSYKGCACBKGAACSTSGYYCGVCNSACA
  CGAACCACCAGA-3'
5'-CGCCGTCGCAAMSCMASBBBCNSTGRAABGCAKYKGGCGYTKYYGCACBKGAACSTSGYYCGVCNSACACGAACCACCAGA-3'
5'-TTGCGACGGCGWWRATGATTGTSNNGGACRRCTCGGATGAA-3'
5'-TTGCGACGGCGWWRATGATTGTSNNGGACGGCTCGGATGAA-3'
5'-TTGCGACGGCGWWRATGATTGTSRGGACRRCTCGGATGAA-3'
5'-TTGCGACGGCGWCCGGATTGTSNNGGACRRCTCGGATGAA-3'
5'-TTGCGACGGCGWCCGGATTGTSRGGACRRCTCGGATGAA-3'
5'-TTGCGACGGCGWCCGGATTGTSRGGACRRCTCGGATGAA-3'
5'-AGGCCCTGCAATGACGTABGCKBTKBACAGYYTKYTTTCATCCGAGYYGTCC-3'
5'-AGGCCCTGCAATGACGTABGCTNCGNNSYTBACAGYYTKYTTTCATCCGAGYYGTCC-3'
5'-AGGCCCTGCAATGACACTTTGTGAAATTCGGATCCTGGCTACAGYYTKYTTTCATCCGAGYYGTCC-3'
5'-AGGCCCTGCAATGACAGGAACCCGGCGTTTCAGATGCTGGCGCGCTACAGYYTKYTTTCATCCGAGYYGTCC-3'
5'-AGGCCCTGCAATGACGCTGCGCGTGCAGAAAGTCGCACCTGGGCCCCGACGACCACAGYYTKYTTTCATCCGAGYYGTCC-3'
5'-AGGCCCTGCAATGACGTABGCKBTKBACAMWSCKSCGVTTTCATCCGAGCCGTCC-3'
5'-AGGCCCTGCAATGACGTABGCTNCGNNSYTBACAMWSCKSCGVTTTCATCCGAGCCGTCC-3'
5'-AGGCCCTGCAATGACACTTTGTGAAATTCGGATCCTGGCTACAMWSCKSCGVTTTCATCCGAGCCGTCC-3'
5'-AGGCCCTGCAATGACAGGAACCCGGCGTTTCAGATGCTGGCGCGCTACAMWSCKSCGVTTTCATCCGAGCCGTCC-3'
5'-AGGCCCTGCAATGACGCTGCGCGTGCAGAAAGTCGCACCTGGGCCCCGACGACCACAMWSCKSCGVTTTCATCCGAGCCGTCC-3'
5'-AGGCCCTGCAATGACGTGCTCGGACCTGGGTTGCTAAACGGCAGAAATATGAGAATCACCACAMWSCKSCGVTTTCATCCGAGC
  GTCC-3'
5'-AGGCCCTGCAATGACGTABGCKBTKBACAGDKWCCRRCGVTTTCATCCGAGYYGTCC-3'
5'-AGGCCCTGCAATGACGTABGCTNCGNNSYTBACAGDKWCCRRCGVTTTCATCCGAGYYGTCC-3'
5'-AGGCCCTGCAATGACACTTTGTGAAATTCGGATCCTGGCTACAGDKWCCRRCGVTTTCATCCGAGYYGTCC-3'
5'-AGGCCCTGCAATGACAGGAACCCGGCGTTTCAGATGCTGGCGCGCTACAGDKWCCRRCGVTTTCATCCGAGYYGTCC-3'
5'-AGGCCCTGCAATGACGCTGCGCGTGCAGAAAGTCGCACCTGGGCCCCGACGACCACAGDKWCCRRCGVTTTCATCCGAGYYGTCC-3'
5'-AGGCCCTGCAATGACGTGCTCGGACCTGGGTTGCTAAACGGCAGAAATATGAGAATCACCACAGDKWCCRRCGVTTTCATCCGAGY
  TCC-3'
5'-TGAATTTCTGTATGAGGTTTTGCTAAACAACTTTCAACAGTTTCGGCCCCAGAGGCCTGCAATGAC-3'
(R=A/G, Y=C/T, M=A/C, K=G/T, S=C/G, W=A/T, B=C/G/T, D=A/G/T, H=A/C/T, V=A/C/G, および
N=A/C/G/T)

```

20

30

40

【 0 3 7 7 】

PCR断片をXmaIおよびSfiIで消化した。消化産物を3%アガロースゲル上で分離し、Aドメイン断片をゲルから精製した。DNA断片を、インフレーションHAエピトープを有するfuse5の誘導体であるファージディスプレイベクターfuse5-HAの対応する制限部位に連結した。このライゲーション混合物をTransforMax(商標)EC100(商標)エレクトロコンピテント大腸菌細胞中にエレクトロポレーションした。形質転換大腸菌細胞を、20 μg/mlテトラシクリンおよび2 mM CaCl₂を含有する2xYT培地中37℃で終夜増殖させた。

【 0 3 7 8 】

50

培地からPEG沈殿によってファージ粒子を精製した。96穴マイクロタイタープレート (M axisorp) の個々のウェルを0.1M NaHCO₃中の標的タンパク質 (IL-6またはCD28、1 µg/ウェル) でコーティングした。10 mg/mlカゼインを含有するTBS緩衝剤でウェルをブロッキングしたのち、精製したファージを約 $1 \sim 3 \times 10^{11}$ 個の典型的な数で加えた。マイクロタイタープレートを4で4時間インキュベートし、洗浄緩衝剤 (TBS/Tween) で5回洗浄し、グリシン-HCl緩衝剤 pH2.2を加えることによって結合ファージを溶出させた。1Mトリス-HCl (pH9.1)を加えることによって溶出液を中和した。大腸菌K91BluKan細胞を使用してファージ溶出液を増幅し、精製ののち、二回目および三回目のアフィニティー選択 (上記工程を繰り返す) への入力として使用した。

【0379】

10

最終溶出液からのファージを、精製することなく直接、AドメインコードDNA配列をPCR増幅するための鋳型として使用した。このPCR反応で使用したオリゴヌクレオチドは以下である。

5'-aagcctcagcgaccgaa
5'-agcccaataggaacccat

【0380】

PCR産物を精製したのち、50%をBpmIで消化し、他方の50%をBsrDIで消化した。

【0381】

消化産物を2%アガロースゲル上で分離し、Aドメイン単量体断片をゲルから精製した。精製した断片をプールしたのち、16での終夜連結によって二量化した。

20

【0382】

CD28に関して上記した同じ方法によってクローンを同定した。同定されたクローンは以下を含むものであった。

>IL6#4
CLSSQFQCKNGQCIPQTWVCDGDNDCEDDSDETGCGDSHILPFSTPGPSTCPPSQFTCRSTNTCIPAPWRCDGD
DDCEDDSDEEGCSAPASEPPGSL

>IL6#7
CLSSQFQCKNGQCIPQTWVCDGDNDCEDDSDETGCGDSHILPFSTPGPSTCRSNEFQCRSSGICIPRTWVCDGD
DDCLDNSDEKCAART

30

>IL6#9
CRSDQFQCGSGHCIPQDWVCDGENDCEDGSDETDCSAPASEPPGSLCLSSQFQCKNGQCIPQTWVCDGDNDCE
DSDETGCGDSHILPFSTPGPST

>IL6#P8
CRSDQFQCGSGHCIPQDWVCDGENDCEDGSDETDCSAPASEPPGSLCRSNEFQCRSSGICIPRTWVCDGDDCL
DNSDEKCAART

>IL6#N7
CPPSQFTCRSTNTCIPAPWRCDGDDCEDDSDEADCGDSHILPFSTPGPSTCLSSQFQCKNGQCIPQTWVCDGD
NDCEDDSDETGCGDSHILPFSTPGPST

【0383】

40

Biacore

180RU IL6をNHS/EDC結合によってCM5チップ (Biacore) に固定化した。単量体タンパク質の0.1 µM、0.5 µM、1 µMおよび5 µM溶液を誘導体化チップの上に流し、標準的なBiacoreソフトウェアパッケージを使用してデータを解析した。表6を参照されたい。

【0384】

(表6)

	kon (M-1s-1)	koff(s-1)	Kd
IL-6クローン9	3.0x10e4	7.3x10e-4	26 nM
IL-6クローン4	4.0x10e3	2.6x10e-4	65 nM

【0385】

競合ELISA

IL6受容体をビオチン-S-S-NHS (Pierce) でビオチニル化した。2 × 10⁻¹⁵ モルのIL6を疎水性相互作用によって96穴プレート (Nunc) に固定化した。プレートを5 mg/mlカゼインでブロッキングした。8 × 10⁻¹⁵ モルのビオチニル化IL6受容体を各ウェルに加えた。単量体タンパク質の連続希釈物を二通りで各ウェルに加え、3時間インキュベートした。プレートを洗浄して非結合タンパク質を除去し、α-HA-HRP (単量体を検出する場合) またはストレプトアビジン-HRP (IL6受容体を検出する場合) で探索した。図21を参照されたい。

【0386】

細胞増殖阻害

TF1細胞を5 ng/ml IL6および単量体タンパク質の連続希釈物とともに3日間インキュベートした。トリチウムチミジン取り込みによって増殖を計測した。図22を参照されたい。

【0387】

PBMC検定法

単量体のエキスピボ効力を検定するため、単離した末梢血リンパ球 (PBMC) に対して単量体を試験した。末梢血リンパ球は、健康なボランティアまたはカニクイザルから抜き取ったばかりのナトリウムヘパリン化血から、標準法にしたがってFicoll-Hypaque (Sigma, St. Louis, MO) 上での遠心分離によって得た。1ウェルあたり1 × 10⁵ 個のPBMCを、10% ウシ胎児血清ならびにペニシリンおよびストレプトマイシン各100単位を含有するダルベッコ改変イーグル培地 (Invitrogen) 中、96穴プレートで、抗ヒトCD3モノクローナル抗体 (PharMingen, San Diego, CA) 0.2 ug/ml (ヒト細胞を使用する場合、) またはブドウ球菌腸毒素B (Toxin Technology, Sarasota, FL) 1 ng/ml (ヒトまたはサル細胞の場合) のいずれかで刺激した。単量体タンパク質を異なる濃度で各培養物に加え、CO₂ 含有雰囲気中37 °Cで3日間インキュベートを実施した。最後の9時間、培養物を1ウェルあたり1uCiの³Hチミジン (ICN, Costa Mesa, CA) でパルス標識し、放射能の取り込みをWallac TriLux Microbetaシンチレーションカウンタ (Perkin Elmer, Boston, MA) で計測した。図23を参照されたい。

【0388】

前述の発明は、いくぶん詳細に明確化および理解の目的のために記載してきたが、この開示を読むことにより、形態および詳細の種々の変更が本発明の真の範囲から逸脱することなくなされ得ることが当業者には明確である。例えば、上記に記載したすべての技術、方法、組成物、装置、および系は種々の組み合わせで使用され得る。本願において引用されるすべての刊行物、特許、特許出願、または他の文書は、あたかも各々の個々の刊行物、特許、特許出願、または他の文書が、すべての目的のために参照として組み入れられることが個々に示されることと同程度に、その全体がすべての目的のために参照として組み入れられる。

【図面の簡単な説明】

【0389】

【図1】LDL受容体ファミリーのメンバーにおいて見い出される単量体ドメインの型、数、および順番を図示する。これらの単量体ドメインには、βプロペラドメイン、EGF様ドメイン、およびLDL受容体クラスAドメインが含まれる。示されたメンバーは、低密度リポタンパク質受容体 (LDLR)、ApoE受容体2 (ApoER2)、極低密度リポタンパク質受容体 (VLDLR)、LDLR関連タンパク質2 (LRP2)、およびLDLR関連タンパク質1 (LRP1) が含まれる。

。

【図2】2つのヒトLRP1配列、2つのヒトLRP2配列、2つのヒトLDLR配列、2つのヒトLDVR配列、1つのヒトLRP3配列、1つのヒトMAT配列、ヒトC06配列、およびヒトS0RL配列を含む、種々のLDL受容体クラスAドメイン（配列番号：103、配列番号：100、配列番号：65、配列番号：117、配列番号：128、配列番号：21、配列番号：29、配列番号：39、配列番号：30、配列番号：77、配列番号：58、配列番号：50、および配列番号：14、それぞれ出現順）からの部分アミノ酸配列のアライメントを、保存性システインを例証するために図示する。

【図3】図3パネルAは、Aドメインの例を図解的に示す。パネルAは、約40アミノ酸長のAドメイン中の保存性アミノ酸を図示する。保存性システイン残基をCによって示し、負に荷電したアミノ酸を、マイナス（「-」）と記した円の記号で示す。「H」と記した円は、疎水性残基を示す。パネルBは、リンカーを介して連結した2つの折り畳まれたAドメインを図示する。パネルBはまた、2つのカルシウム結合部位（ Ca^{2+} と記した黒い円）および、全部で6つのジスルフィド結合について、各々折り畳まれたAドメイン中の3つのジスルフィド結合を示す。

10

【図4】LDL受容体ファミリーによって認識されたりガンドのいくつか（阻害剤、プロテアーゼ、プロテアーゼ複合体、ビタミン担体複合体、リポタンパク質代謝に関与するタンパク質、非ヒトリガンド、抗生物質、ウイルス、およびその他）を示す。

【図5】リガンドに結合する単量体ドメインを同定すること、選択された単量体ドメインを単離すること、種々の組み合わせの選択された単量体ドメインを連結することによって選択された単量体ドメインの多量体を作製すること、およびその多量体をスクリーニングして、リガンドに結合する1つより多い単量体含む多量体を同定することについての一般的なスキームを図解的に示す。

20

【図6】別の選択戦略の図解的な表示である（導かれた選択）。適切な結合特性を有する単量体ドメインは、単量体ドメインのライブラリーから同定される。次いで、同定された単量体ドメインは、単量体ドメインの別のライブラリー由来の単量体ドメインに連結され、多量体のライブラリーを形成する。多量体ライブラリーは、標的に同時に結合する一対の単量体ドメインを同定するためにスクリーニングされる。次いで、このプロセスは、最適な結合プロセスが多量体中で得られるまで反復され得る。

【図7】単量体ドメインの多量体化プロセスを示す。標的-結合単量体のヒットは、ベクターから増幅される。次いで、標的-結合単量体ドメインおよび/または免疫ドメインのこの混合物は、切断され、リンカーの最適な組み合わせおよびストッパーオリゴヌクレオチドと混合される。次いで、生成した多量体は、標的-結合多量体の同定のための第2の選択工程のための適切なベクターにクローニングされる。

30

【図8】Aドメインの各部位における共通のアミノ酸を示す。アミノ酸の位置の上のパーセンテージは、示されたシステイン間の間隔を有する天然に存在するAドメインのパーセンテージをいう。各アミノ酸の位置の下に太字で示した潜在的なアミノ酸残基は、その位置における共通の残基を示す。明るい色の円で示した、最終的な6つのアミノ酸は、リンカー配列を表す。リンカーの2位および3位のイタリックで示したアミノ酸残基の2つのカラムは、その位置には存在しないアミノ酸残基を表す。他の任意のアミノ酸（例えば、A、D、E、G、H、I、K、L、N、P、Q、R、S、T、およびV）はこれらの位置に含まれ得る。

40

【図9】以下のシステイン間の間隔： $\text{CX}_6\text{CX}_4\text{CX}_6\text{CX}_5\text{CX}_8\text{C}$ を有するAドメインについて、天然に存在するAドメインにおけるアミノ酸残基の出現の頻度を示す（配列番号：199）。

【図10】Aドメインのアライメントを示す（配列番号：1~197）。図の一番上および一番下で、小文字（a-q）は保存性残基を示す。これらの位置における優勢なアミノ酸およびネイティブなAドメイン中に観察された頻度は、図の一番下に示される。

【図11】免疫ドメインを含む可能な多量体の高次構造を示す。図11Aは、ミニボディーの多量体を図示する。図11Bは、単鎖ドメイン抗体の多量体を図示する。図11Cは、scfvの免疫ドメイン多量体を図示する。図11Dは、Fab断片の多量体を図示する。

【図12】部分的リンカーを介したドメインの連結を示す。

50

【図 1 3】例示的な多量体環形成を図示する。

【図 1 4】Fvsの重鎖および軽鎖の種々の多量体の高次構造を図示する。

【図 1 5】二つの異なる選択されたクローンとデータベースからの既知のヒト配列との間の配列同一性の領域のグラフ表示である。横棒が、選択されたクロンの配列とヒト配列との間の配列同一性の領域を示し、数字が、同一性領域を画定する正確なアミノ酸番号を示す。縦の矢印が許容しうる交叉配列を示す。

【図 1 6】CD20特異的Aドメイン単量体によって誘発された細胞死滅を示す。

【図 1 7】組換えTP0-R abd TF1細胞へのAドメイン単量体発現性ファージの結合を示す。

【図 1 8】TP0-R特異的Aドメイン単量体および多量体に応答するTF1細胞増殖を示す。

【図 1 9】(a) プレートに直接固定化されたIgE、または(b) IgEのCE2ドメインに固定化された抗体に結合することによってプレートに固定化されたIgE、または(c) IgEのCE3ドメインに固定化された抗体に結合することによってプレートに固定化されたIgE、または(d) 固定化されたIgE受容体R1に結合することによって固定化されたIgEに結合するIgE特異的Aドメイン単量体および多量体発現性ファージを示す。 10

【図 2 0】CD28に結合する選択されたAドメイン単量体のELISA結合データを示す。

【図 2 1】可溶性IL6受容体と単量体Mb9とが固定化IL6に対して競合する競合ELISA実験の結果を示す。

【図 2 2】IL6特異的単量体による細胞増殖阻害を示す。

【図 2 3】単離された末梢血リンパ球(PBMC)に対するIL6特異的単量体の影響を示す。

【図 2 4】細胞上に表示された多数のリガンドに対する単量体ドメインのライブラリーのスクリーニングを示す。 20

【図 2 5】複数のリガンドの1つに結合するように選択された単量体の同定を示す。

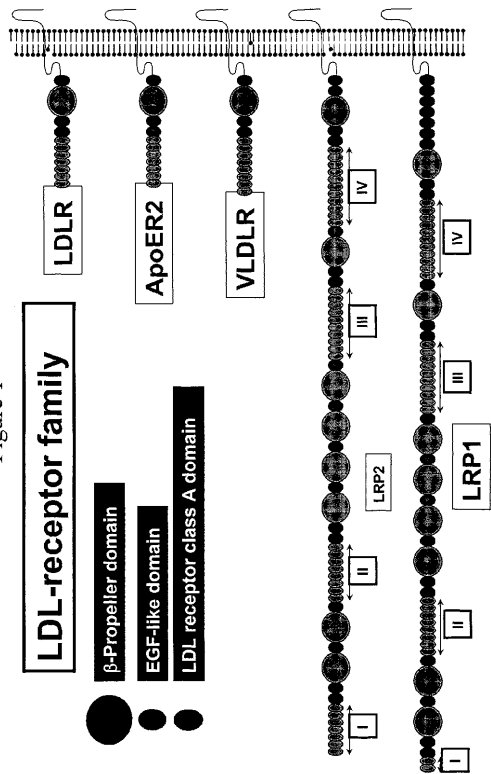
【図 2 6】リガンドおよび単量体ドメインをコードするポリヌクレオチドを同定する態様を示す。

【図 2 7】結合活性の増大のための単量体ドメインおよび多量体態様を示す。この図は特定の遺伝子産物および結合親和性を示すが、これらは単なる例に過ぎず、他の結合標的を同じまたは類似した構造で使用することもできることが理解される。

【図 2 8】結合活性の増大のための単量体ドメインおよび多量体態様を示す。この図は特定の遺伝子産物および結合親和性を示すが、これらは単なる例に過ぎず、他の結合標的を同じまたは類似した構造で使用することもできることが理解される。 30

【 図 1 】

Figure 1



【 図 2 】

Figure 2

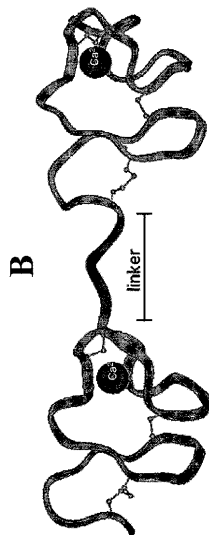
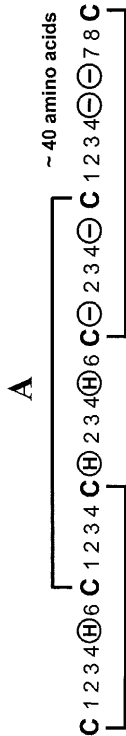
LDL-receptor class A domain

LRP1_HUMAN	C.EPYQFRCKNNR.....CVPGRWQ.CDYDNDCGDNDSEES....C
LRP1_HUMAN	C.LPSQFKCTNTNR.....CIPGIFR.CNGQNCQDGEDERD....C
LDLR_HUMAN	C.SQDEFRCFCHDGK.....CISRFV.CDSDRDCLDGSDEAS....C
LRP2_HUMAN	C.SSSAFTCGHGE.....CIPAHWR.CDKRNDVDGSDENH....C
LRP2_HUMAN	C.SSSEFQCASGR.....CIPQHWY.CDQETDCFADSEFAS....C
CORI_HUMAN	CHSQGLVECRNGQ.....CIPSTFQ.CDGEDCKDGSDEEN....C
MAT_HUMAN	C.PAQTFRCSNGK.....CLSKSQ.CNGKDDCGDGSDEAS....C
COB8_HUMAN	C...EGFVCAQTGR.....CVNRRLL.CNGDNDGQDQSEAN....C
MAT_HUMAN	C.TKHTYRCLNGL.....CLSKGNPECDGKEDCSGDSDEKD....C
LDVR_HUMAN	CLGPGKFKCRSGE.....CIDISKV.CNQEQQCDRWDSEPLKE...C
APOR2_HUM	C.PAEKLSGPTSHK.....CVPASWR.CDGEKDCGEGADEAG....C
SORL1_HUMAN	CTHFMDFVCKNRQQ.....CLFHSWV.CDGIIQCRDGSDEDAFAAGC
ST7_HUMAN	C.AYNQFQCLSRFTKVYVYTCLPESLK.CDGNIDCLDLGDEID....C
consensus	C.1234F6C1264.....CI23456.CDG34dC1D35dE78....C

【 図 3 】

FIGURE 3

A-domains



【 図 4 】

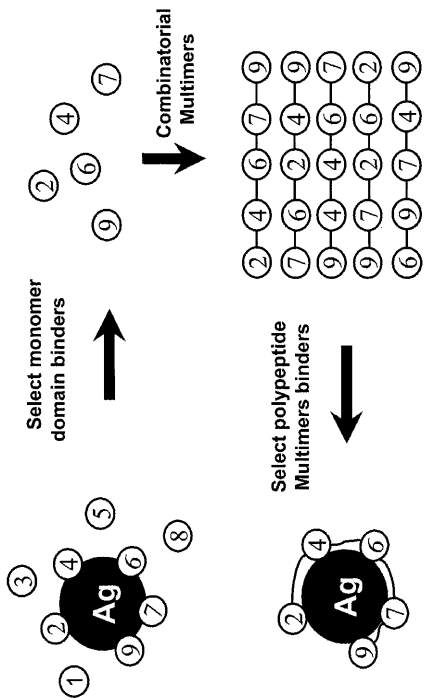
Figure 4

Ligands recognized by LDL-receptor family

proteases	proteins involved in	miscellaneous
factor IXa	lipoprotein metabolism	albumin
pro-uPA	apoB100	transferrin
t-PA	apoE	β-Amyloid precursor protein
plasminogen	apoH (clusterin)	RAP
MMP-9	apoH (β ₂ -glycoprotein I)	complement C3
	Lp(a)	lactoferrin
	hepatic lipase	thyroglobulin
	lipoprotein lipase	thrombospondin
	IDL	saposin precursor
	VLDL	retin
	β-VLDL	insulin
		parathyroid hormone (PTH)
		aprotinin
		amylin
		C1q
		α ₂ -macroglobulin
		β ₂ -microglobulin
		odorant-binding protein
		epidermal growth factor
		prolactin
		lysozyme
		connective tissue growth factor (CTGF)
		cytochrome c
		seminal vesicle secretory protein II
		clara cell secretory protein (CCSP)
		cubulin
		factor VIII

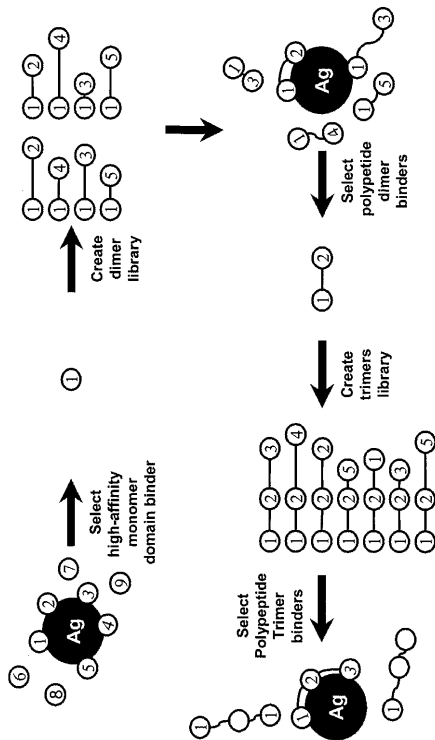
【 図 5 】

Figure 5



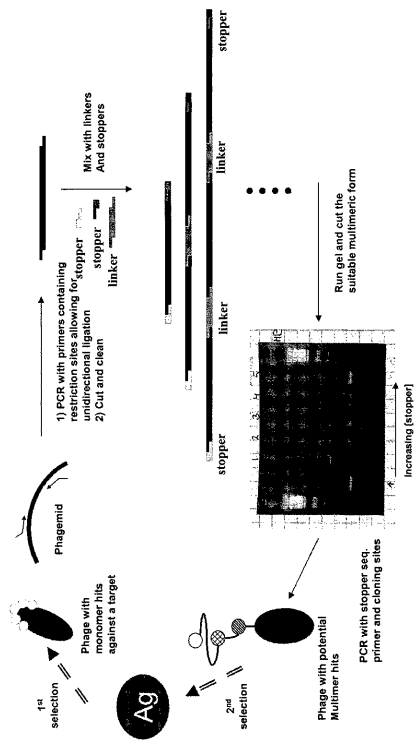
【 図 6 】

Figure 6



【 図 7 】

Figure 7



【 図 8 】

Figure 8

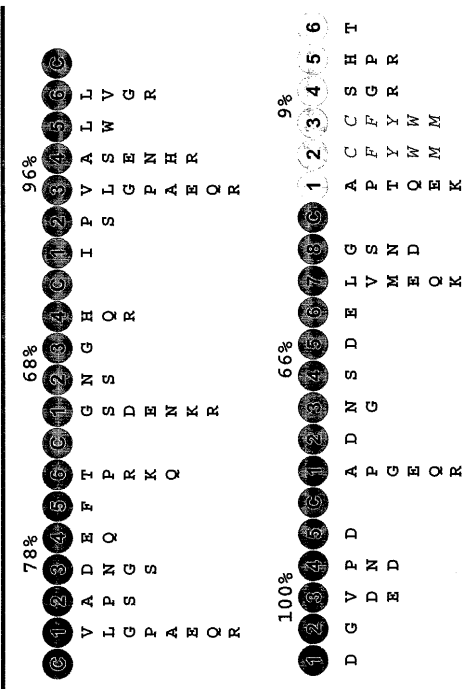


FIG. 9B

[illegible]

FIG. 10 (cont.)

L818_HUMAN	C	PDGFPCACGNH	CIFPWFH	CDGADNCSN	C	KEEHSQT	C
L818_HUMAN	C	QVDFSCSGR	CIFPWFH	CDDEDDCGD	C	TDPMAS	C
L818_HUMAN	C	EPFLTPFCVSGR	CISFWRH	CDNEDDCDGG	C	SDGDM	C
L818_HUMAN	C	PDQVPCVSGR	CIFPWFH	CDGNDGDFG	C	SDGDM	C
L818_HUMAN	C	DMHETFCVDFGN	CVFLDAR	CDNEDDCDSG	C	AEFEGS	C
L818_HUMAN	C	DIQFTFCVSGTR	CIMAWW	CDGIDDCDGG	C	SDDED	C
L818_HUMAN	C	QVDFSCVDFVDF	CQDFEYH	CDNEDDCDGG	C	SDDED	C
L818_HUMAN	C	YATSEFCFSGNR	CDIDVLT	CDNEDDCDGG	C	SEDFELLY	C
L818_HUMAN	C	RHFQFVCSGR	CIFPWFH	CDGNDGDFG	C	SDDED	C
L818_HUMAN	C	ATVFERKACGR	CIFPWFH	CDNEDDCDGG	C	SEDFEN	C
L818_HUMAN	C	CTPFWYLVGVTFVQINISLST	CVLTPFI	CDNEDDCDGG	C	SEDFEN	C
L818_HUMAN	C	EDYFPCVSGR	CIFPWFH	CDGNDGDFG	C	SDDED	C
L818_HUMAN	C	SMWQFACASGR	CISFWRH	CDDEDDCGD	C	LDSDSGE	C
L818_HUMAN	C	QVDFSCVSGR	CIFPWFH	CDGNDGDFG	C	SDDED	C
L818_HUMAN	C	DEMAFNCHNVV	CIFPWFH	CDDEDDCGD	C	SDSDPQ	C
L818_HUMAN	C	DSFESPCADGR	CLMAGTQVDFVDFPCDFH		C	SDSDFPGRK	C
L818_HUMAN	C	EDYFPCVSGR	CIFPWFH	CDGNDGDFG	C	SDDED	C
L818_HUMAN	C	TASQFRCRKTG	CIFPWFH	CDTVDDCVSG	C	SDGTFD	C
L818_HUMAN	C	QVDFPCVSGR	CIFPWFH	CDGNDGDFG	C	SDDED	C
L818_HUMAN	C	LSQFQKCTKXNG	CVFLVLR	CDNEDDCDGG	C	KEDED	C
L818_HUMAN	C	GVYFPCVTFTR	CISFWRH	CDDEDDCGD	C	SDBAN	C
L818_HUMAN	C	QVDFPCVSGR	CIFPWFH	CDGNDGDFG	C	SDDED	C
L818_HUMAN	C	TLKFLPCADNG	SEFVSFN	CDGDFPCADG	C	SDDED	C
L818_HUMAN	C	SESEVDFCSGR	CISFWRH	CDGNDGDFG	C	SDDED	C
L818_HUMAN	C	SESEVDFCSGR	CISFWRH	CDGNDGDFG	C	SDDED	C
L818_HUMAN	C	SESEVDFCSGR	CISFWRH	CDGNDGDFG	C	SDDED	C
L818_HUMAN	C	KEQDFRCRKHAN	CIFPWFH	CDGHDHCVSG	C	SDDEN	C
L818_HUMAN	C	RAQFVLCDSGL	CIFPWFH	CDGNDGDFG	C	SDDED	C
L818_HUMAN	C	PTSPHRCNRRNI	CLGSGFR	CDGNDGDFG	C	SDDEN	C
L818_HUMAN	C	KEDEFACASGR	CIFPWFH	CDNEDDCDGG	C	SDDED	C
OT5851	C	ABDEALCEBGR	CVFPHW	CDQDGDGCG	C	SDDEFG	C
OT5851	C	QGEQTCBGR	CLPALLL	CDNDHDCDGG	C	TDTPSYF	C
OT5851	C	PDGLLACDGR	CLPALLL	CDGDFPCLDA	C	ADGSL	C
OT5851	C	VYFVDFCSGR	CLPALLL	CDGDFPCLDA	C	ADGSL	C
ENSP00000262089	C	GFYFRCFSDSG	CTPFWH	CDDEEDCAG	C	SDMSG	C
OT5851	C	QVDFPCVSGR	CVFSEGL	CDNEDDCDGG	C	SDDED	C
OT5851	C	FLGFLPQVAPGL	CVFSEGL	CDGDFPCDGG	C	SDGLD	C
OT5851	C	DEYTCNGT	CIFPWFH	CDGDFPCGRGVSPFSGCG	C	SDDED	C
OT5851	C	SEKQDGLDGR	CVFSEGL	CDNEDDCDGG	C	SDDED	C
ENSP00000262089	C	GFYFRCFSDSG	CTPFWH	CDDEEDCAG	C	SDMSG	C
OT5851	C	QVDFPCVSGR	CVFSEGL	CDNEDDCDGG	C	SDDED	C
OT5851	C	SPFLGLDGR	CVFSEGL	CDLFPFCDGG	C	SDDED	C
CL60RF3	C	KFTCTSG	CLGLVSL	CDGNDGDFG	C	SDDEN	C
AAH0703/GW97F	C	CTPFWH	CVFSEGL	CDNEDDCDGG	C	SDDED	C
AAH0703/GW97F	C	FLPFTQCTSLG	CVFLTVR	CDRDLDCDGG	C	SEDEE	C
Q98H93	C	LAGEELCLSLD	CFLTVLR	CDGDFPCDPS	C	SEDLG	C
Q98H93	C	SLDFVPCNTTK	CLPGLRN	CDGDFPCDPS	C	AEDEK	C
Q98H93	C	QVDFPCVSGR	CVFSEGL	CDGNDGDFG	C	SDDED	C
Q98H93/Q95DQ	C	QFSLSLCAGD	CKQVQVM	CDNWRCTDGG	C	SDGM	C
BAB5525	C						C
ENSP0000033367	C	SVYFPCDGG	CDITLLA	CDGVQVCCDGG	C	SDDED	C
ENSP00000255793	C	QFSLCLVSGL	CVFA	CDGNDGDFG	C	LDGRN	C
ENSP00000255793	C	RATFCFSGR	CIDLEVR	CDGDDPLCAG	C	SDDEQ	C
ENSP00000255793	C	GVTFPCDGR	CVKRFPC	CDGDFPCDGG	C	SDDED	C
Q98KDQ	C	QKQVFPCLAGT	CIFPWFH	CDNEDDCDGG	C	AEDEK	C
Q98KDQ	C	STRVAVICDGR	CVFSEGL	CDGNDGDFG	C	SDDED	C
Q98KDQ	C	GVTFPCVSGR	CIFPWFH	CDGNDGDFG	C		

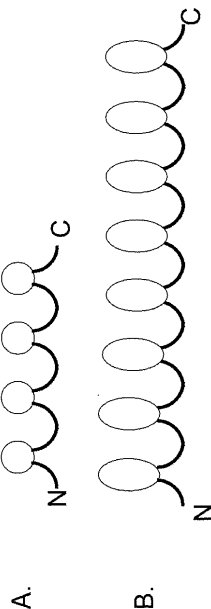
```

FIG. 10 (CONT)

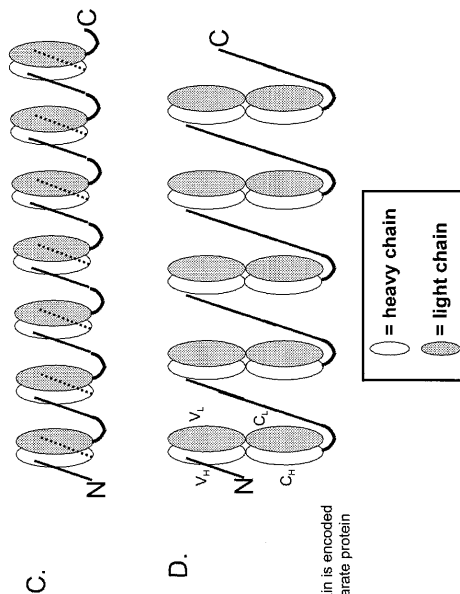
CADD61944      C      PPGHFFCGAAGTSGATA      CYLPAGR      CNYOTFCADG      ADERR      C
CADD61944      C      QPGNFRCRDEK      CVYSTWY      CDQGFPCADG      SDEWD      C
ENSP0000003181006      C      FEITDFLCHDKK      CIASHLL      CDYKFPCCSR      SDEAH      C
ENSP000000320249      C      NNRTFFCGNDI      CFBKQNAKCDGTBCCFDG      SDEEG      C
ENSP000000277547      C      PPGHMHCMKV      CVPFQQL      CDGEEWCSGL      SDENFLT      C
ENSP000000320022      C      KQGNLACDGL      CVPFQGL      CDFFEQCAGG      EDEQA      C
ENSP000000313222      C      PGNFSCDNG      CVTKVNFECDDQEDCDSG      SDEAH      C

```

【 図 1 1 】



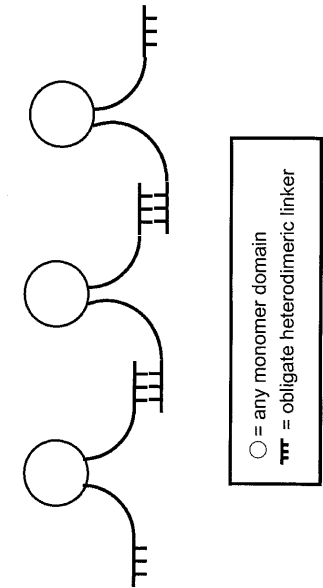
【 図 1 1 】



Light chain is encoded as a separate protein

【 図 1 2 】

Figure 12



【 図 1 3 】

Figure 13

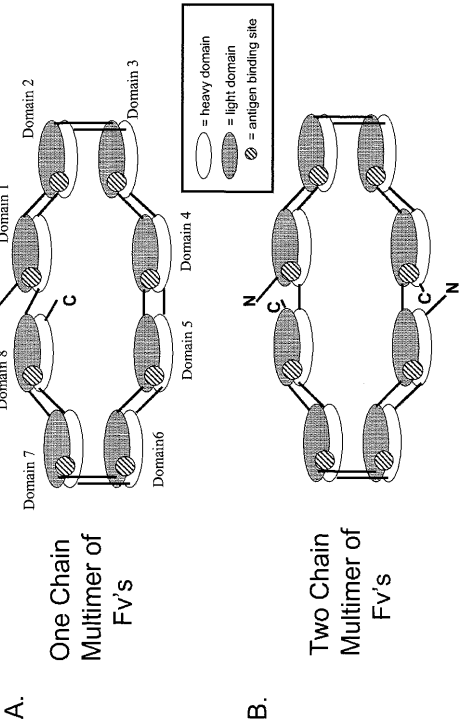
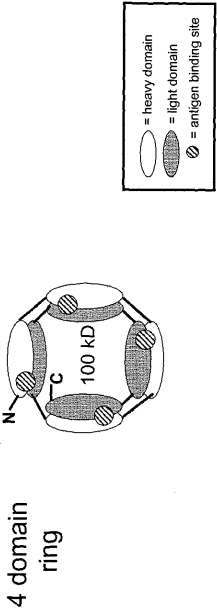
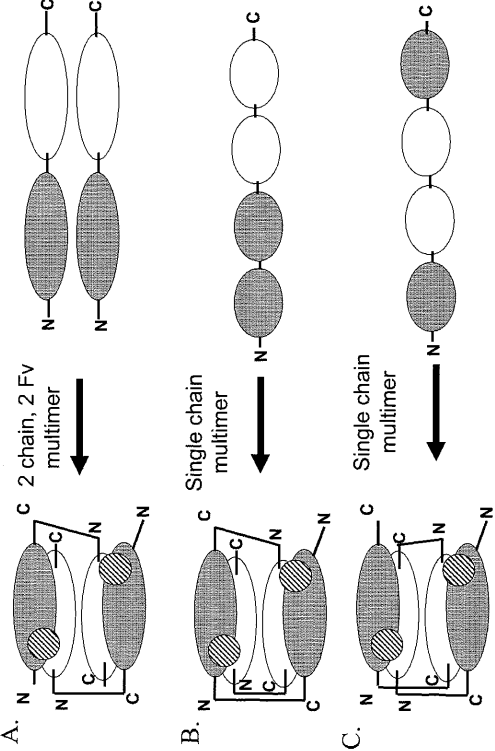


Figure 13C

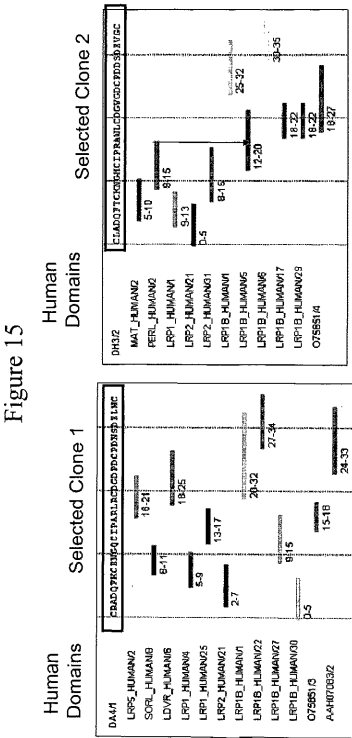


【 図 1 4 】

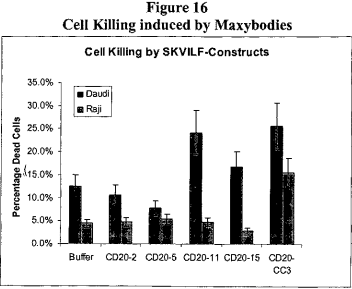
Figure 14



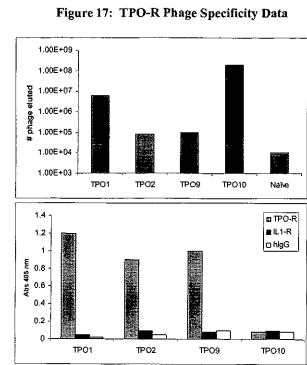
【 15 】



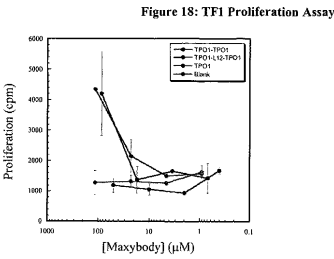
【 16 】



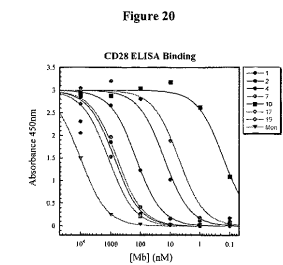
【 17 】



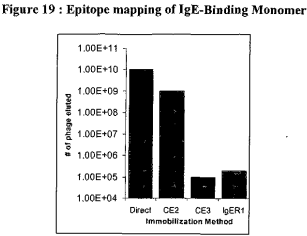
【 18 】



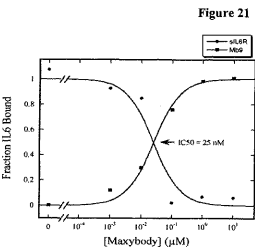
【 20 】



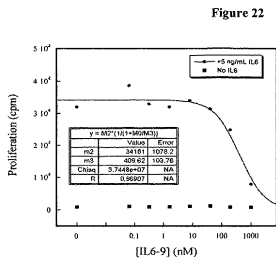
【 19 】



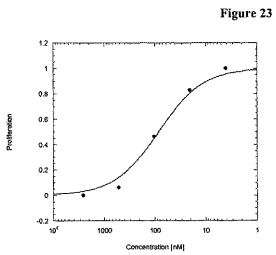
【 21 】



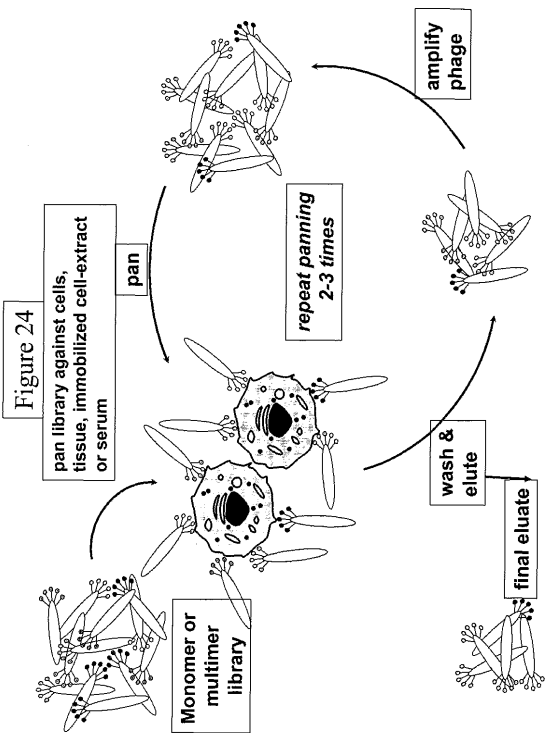
【 2 2 】



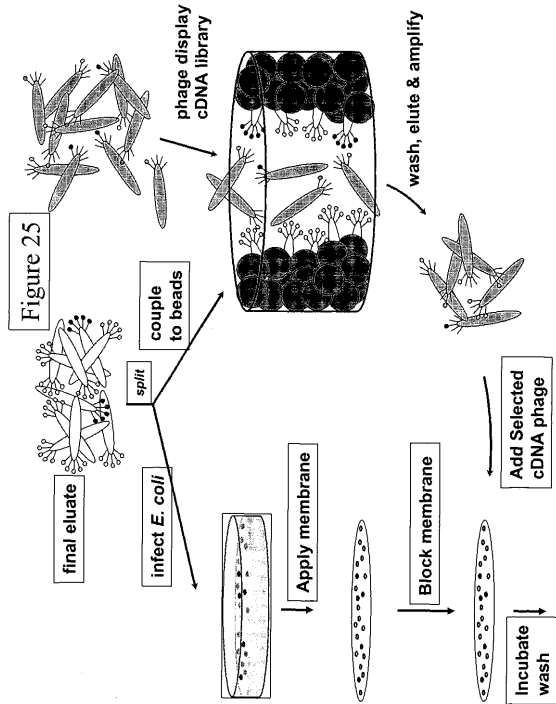
【 2 3 】



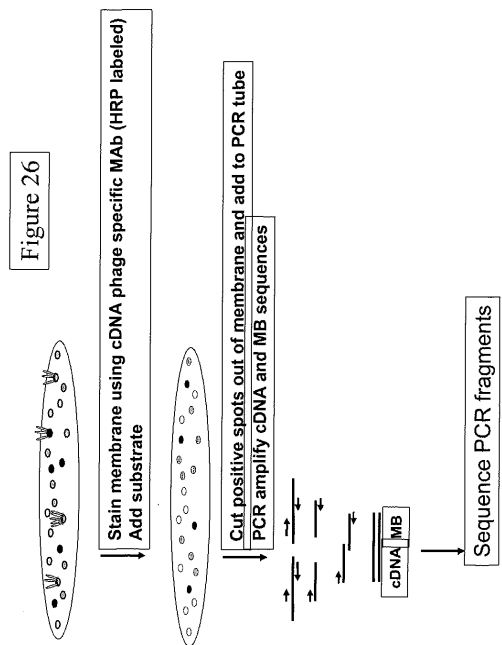
【 2 4 】



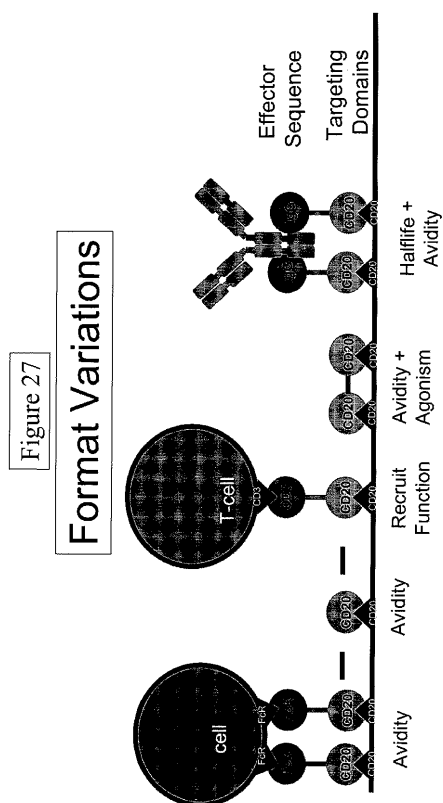
【 2 5 】



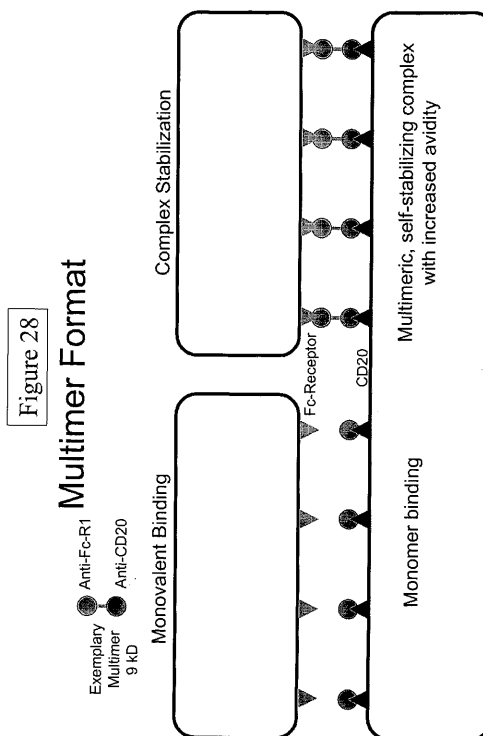
【 2 6 】



【図 27】



【図 28】



【手続補正書】

【提出日】平成17年11月29日(2005.11.29)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

(i) IgGタンパク質に結合する半減期延長ドメイン；および

(ii) 対象のタンパク質に結合する二次ドメイン；

を含むポリペプチドであって、

ここで、半減期延長ドメインおよび二次ドメインが、EGF様ドメイン、クリングル(Kringle)ドメイン、I型フィブロネクチンドメイン、II型フィブロネクチンドメイン、III型フィブロネクチンドメイン、PANドメイン、Glaドメイン、SRCRドメイン、クニッツ(Kunitz)/ウシ膵臓トリプシンインヒビタードメイン、カザル(Kazal)型セリンプロテアーゼインヒビタードメイン、トレフォイル(Trefoil)(P型)ドメイン、C型フォンウィルブランド(von Willebrand)因子ドメイン、アナフィラトキシン様ドメイン、CUBドメイン、I型サイログロブリン反復、LDL受容体クラスAドメイン、スシ(Sushi)ドメイン、リンク(Link)ドメイン、I型トロンボスポンジンドメイン、免疫グロブリン様ドメイン、C型レクチンドメイン、MAMドメイン、A型フォンウィルブランド因子ドメイン、ソマトメジンBドメイン、WAP型4ジスルフィドコアドメイン、C型F5/8ドメイン、ヘモペキシンドメイン、SH2ドメイン、SH3ドメイン、ラミニン型EGF様ドメイン、およびC2ドメインからなる群より選択される、ポリペプチド。

【請求項2】

半減期延長ドメインおよび二次ドメインが、LDL受容体クラスAドメインである、請求項1記載のポリペプチド。

【請求項3】

半減期延長ドメインおよび二次ドメインが、それぞれ30～60アミノ酸長である、請求項1記載のポリペプチド。

【請求項4】

動物における対象タンパク質の半減期を延長するための薬剤を製造するための、請求項1記載のポリペプチドの使用。

【請求項5】

半減期延長ドメインおよび二次ドメインが、LDL受容体クラスAドメインである、請求項4記載の使用。

【請求項6】

半減期延長ドメインおよび二次ドメインが、それぞれ30～60アミノ酸長である、請求項4記載の使用。

【請求項7】

単量体ドメインが、以下の配列

$C_a X_{6-7} C_b X_{4-5} C_c X_6 C_d X_5 C_e X_{8-10} C_f$ (配列番号：220～231)

(式中、Xが、

C	X(6,7)						C	X(4,5)				C	X(6)						C	X(5)					C	X(8,10)										C																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																			
X1 X2 X3 X4 X5 X6							X1 X2 X3 X4				X1 X2 X3 X4 X5 X6						X1 X2 X3 X4 X5					X1 X2 X3 X4 X5 X6 X7 X8																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																	
A	A	A	A	A	A		A	A			A	A	A	A	A		A	A	A		A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A

のように定義される)

を含むLDL受容体クラスAドメイン単量体である、請求項6記載の方法。

【請求項8】

単量体ドメインが、以下の配列

$C_a X_{3-14} C_b X_{3-7} C_c X_{4-16} C_d X_{1-2} C_e X_{8-23} C_f$ (配列番号: 232)

(式中、Cがシステインであり、 X_{n-m} が、独立して選択されるアミノ酸の数をnとmとの間で表し、かつ

C_a-C_c 、 C_b-C_e および C_d-C_f がジスルフィド結合を形成する)

を含むEGFドメイン単量体である、請求項1記載の方法。

【請求項9】

単量体ドメインが、以下の配列

$C_a X_{4-6} C_b X_{3-5} C_c X_{8-9} C_d X_1 C_e X_{8-12} C_f$ (配列番号: 233~322)

(式中、Xが、

X(4,8)				X(3,5)			X(8,9)								X(1)		X(8/12)																		
X1	X2	X3	X4	X1	X2	X3	X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7	X8	X1	X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7	X8	X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7	X8	X9	X10	X11	X12
A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	
D	D	D	E	D	D	E	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	
E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	
F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	
G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	
H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	
I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	
K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	
L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	
M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	
N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	
Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	
R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	
S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	
V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	
W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	
Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	

のように定義される)

を含むEGFドメイン単量体である、請求項6記載の方法。

【請求項10】

標的分子が、ウイルス抗原、細菌抗原、真菌抗原、酵素、酵素基質、細胞表面タンパク質、酵素阻害剤、レポーター分子および受容体からなる群より選択される、請求項1記載の方法。

【請求項11】

単量体ドメインおよび/または免疫ドメインのライブラリーがファージディスプレイ、リボソームディスプレイまたは細胞表面ディスプレイとして発現している、請求項1記載の方法。

【請求項12】

単量体ドメインおよび/または免疫ドメインのライブラリーがマイクロアレイ上に提示されている、請求項1記載の方法。

【請求項13】

単量体ドメインがジスルフィド結合の形成によって二次構造を形成する、請求項1記載の方法。

【請求項 14】

単量体ドメインおよび / または免疫ドメインがポリペプチドリinkerによって連結されている、請求項1記載の方法。

【請求項 15】

請求項1で同定された多量体を含むポリペプチドを生成する方法。

【請求項 16】

組換え遺伝子発現によってポリペプチドを生成する、請求項15記載の方法。

【請求項 17】

請求項1で同定された単量体ドメインを含むポリペプチド。

【請求項 18】

請求項1で同定された単量体ドメインをコードするポリヌクレオチド。

【請求項 19】

標的分子に結合するヒトキメラ単量体ドメインを同定する方法であって、
 同じファミリーの単量体ドメインからの少なくとも2個の天然ヒト単量体ドメインの配列アライメントを提供することと、
 ヒト単量体ドメインの間で異なる、ヒト単量体ドメイン配列中の対応する位置にあるアミノ酸残基を同定することと、
 ヒトキメラ単量体ドメインのライブラリーであって、各ヒトキメラ単量体ドメイン配列が、同じファミリーの単量体ドメインからの2個またはそれ以上の天然ヒト単量体ドメインからの残基とタイプおよび位置において対応するアミノ酸残基からなるライブラリーを作製することと、
 標的分子への結合に関してヒトキメラ単量体ドメインをスクリーニングすることと、
 標的分子に結合するヒトキメラ単量体ドメインを同定することとを含む方法。

【請求項 20】

天然ヒト単量体ドメインがLDL受容体Aドメイン単量体である、請求項19記載の方法。

【請求項 21】

天然ヒト単量体ドメインがEGF様ドメイン単量体である、請求項19記載の方法。

【請求項 22】

ツーハイブリッドスクリーニング法を使用してライブラリーのスクリーニングを実施する、請求項19記載の方法。

【請求項 23】

請求項19で同定された多量体を含むポリペプチドを生成する方法。

【請求項 24】

組換え遺伝子発現によってポリペプチドを生成する、請求項24記載の方法。

【請求項 25】

LDL受容体クラスAドメイン単量体を含む非天然ポリペプチドであって、単量体が、以下の配列

$C_a X_{3-15} C_b X_{3-15} C_c X_{6-7} C_d (D, N) X_4 C_e X_{4-6} DEX_{2-8} C_f$ (配列番号: 219)

(式中、Cがシステインであり、 X_{n-m} が、独立して選択されるアミノ酸の数をnとmとの間で表し、かつ(D,N)が、位置がDまたはNであることができることを示し、

C_a-C_c 、 C_b-C_e および C_d-C_f がジスルフィド結合を形成する)

を含むポリペプチド。

【請求項 26】

単量体ドメインが、以下の配列

$C_a X_{6-7} C_b X_{4-5} C_c X_6 C_d X_5 C_e X_{8-10} C_f$ (配列番号: 220~231)

(式中、Xが、

EGFドメイン単量体を含む非天然ポリペプチドであって、EGFドメイン単量体が、以下の配列

$C_a X_{3-14} C_b X_{3-7} C_c X_{4-16} C_d X_{1-2} C_e X_{8-23} C_f$ (配列番号: 232)

(式中、Cがシステインであり、 X_{n-m} が、独立して選択されるアミノ酸の数をnとmとの間で表し、

C_a-C_c 、 C_b-C_e および C_d-C_f がジスルフィド結合を形成する)
を含むポリペプチド。

【請求項32】

単量体ドメインが、以下の配列

$C_a X_{4-6} C_b X_{3-5} C_c X_{8-9} C_d X_1 C_e X_{8-12} C_f$ (配列番号: 233~322)

(式中、Xが、

C	X(4,6)				C	X(3,5)				C	X(8,9)				C	X(1)	C	X(8/12)				C							
	X1	X2	X3	X4		X1	X2	X3			X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7	X8		X1		X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7	X8
	A	A	A	A		A	A	A			A	A	A	A	A	A	A	A		A		A	A	A	A	A	A	A	
	D	D	D			D		D			D	D	D	D	D	D	D	D		D		D	D	D	D	D	D	D	
	E	E	E	E		E	F	F	G	H	E	F	F	G	G	F	F	F		E		E	F	F	F	F	F	F	
	F	F	F	G		G	G	G	H	I	F	G	G	H	H	G	G	G	H		F		G	H	H	G	G	G	
	G	G	G			H	H	H	I	K	H	I	K	L	L	L	L	L	H		H		H	I	K	L	L	L	
	H	H				I			K	L	I	K	L	L	L	L	L	L	I		K		K	L	L	L	L	L	
	I	K	K	L		K		L	L	L	K	L	L	L	L	L	L	L	K		K		K	L	L	L	L	L	
	K	L	L	M		L			L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L		L		L	L	L	L	L	L	
	L	M	M			M			M	N	L	M	L	L	L	L	L	L	L		L		L	L	L	L	L	L	
	M	N	N	N		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N		N		N	N	N	N	N	N	
	N	P	P	P		P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P		P		P	P	P	P	P	P	
	P	Q	Q	Q		Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q		Q		Q	Q	Q	Q	Q	Q	
	Q	R	R	R		R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R		R		R	R	R	R	R	R	
	R	S	T	T		S	S	T	T	T	S	T	T	T	T	T	T	T	S		S		S	T	T	T	T	T	
	S	T	T	V		T	T	V	V	V	T	T	T	T	T	T	T	T	T		T		T	T	T	T	T	T	
	T	V	V			V	V				V	V	V	V	V	V	V	V	V		V		V	V	V	V	V	V	
	V	W	W			W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W		W		W	W	W	W	W	W	
	W	Y	Y	Y		Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y		Y		Y	Y	Y	Y	Y	Y	

C	X(1,X2,X3,X4,X5)					C	X(1,X2,X3,X4)					C	X(1,X2,X3,X4,X5,X6,X7,X8,X9)					C	X(1,X2,X3,X4,X5,X6,X7,X8,X9,X10,X11,X12)					C									
	X1	X2	X3	X4	X5		X1	X2	X3	X4		X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7	X8	X9		X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7	X8	X9	X10	X11	X12
	A	A	A	A	A		A	A	A	A		A	A	A	A	A	A	A	A		A		A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	
	D	D	D	D	F		D	D	D	D		D	D	D	D	D	D	D	E		D		D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	
	E	F	F	F	G		E	F	G	H		E	F	G	G	G	G	G	F	E		E		E	F	F	F	F	F	F	F	F	
	G	G	G	H	I		G	H	I	K		H	G	H					H				H		H	G	G	G	G	G	G	G	
	I	K	L	L	M		I	K	L	L		I	K	L	L	L	L	L	K				I	K	L	L	L	L	L	L	L	L	
	K	L	M	N	P		K	L	M	N		K	L	M	N	N	M	L	K				K	L	L	L	L	L	L	L	L	L	
	L	M	N	P	Q		L	M	N	P		L	M	N	P	Q	R	P	Q				L	M	N	P	Q	Q	Q	Q	Q	Q	
	M	N	P	Q	R		M	N	P	Q		M	N	P	Q	R	R	R	R				M	N	P	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	
	N	P	Q	R	S		N	P	Q	R		N	P	Q	R	S	S	S	S				N	P	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	
	P	Q	R	S	T		P	Q	R	S		P	Q	R	S	T	T	T	T				P	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	
	Q	R	S	T	V		Q	R	S	T		Q	R	S	T	V	V	V	V				Q	R	S	T	T	T	T	T	T	T	
	R	S	T	V	W		R	S	T	V		R	S	T	V	W	W	W	W				R	S	T	T	T	T	T	T	T	T	
	S	T	V	W	Y		S	T	V	W		S	T	V	W	Y	Y	Y	Y				S	T	T	T	T	T	T	T	T	T	
	T	V	W	Y			T	V	W	Y		T	V	W	Y								T	V	W	W	W	W	W	W	W	W	
	V	W	Y				V	W	Y			V	W	Y									V	W	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	

C	X(1,X2,X3,X4,X5,X6)						C	X(1,X2,X3,X4,X5)						C	X(1,X2,X3,X4,X5,X6,X7,X8)						C									
	X1	X2	X3	X4	X5	X6		X1	X2	X3	X4	X5		X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7	X8		X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7	X8
	A	A	A	A	A	A		A	C	D	E	F		A	C	D	E	F	F	F		A		A	A	A	A	A		
	D	D	D	D	D	E		D	E	F	F	G		D	E	F	F	F	F	F		D		D	D	D	D	D		
	E	F	F	F	G		E	F	G	H		F	G		E	F	G	H	H	H		E		E	F	F	F	F		
	F	F	G	H	I		F	G	H	I		G	H		F	G	H	I	K	L		F		F	G	G	G	G		
	G	H	I	K	L		G	H	I	K		H	I		G	H	I	K	L	L		H		H	I	K	L	L		
	H	I	K	L	M		H	I	K	L		I	K		H	I	K	L	L	L		I		I	K	L	L	L		
	I	K	L	M	N		I	K	L	M		K	L		I	K	L	L	L	L		K		K	L	L	L	L		
	K	L	M	N	P		K	L	M	N		L	M		K	L	M	N	N	M		L		L	M	N	N	N		
	L	M	N	P	Q		L	M	N	P		M	N		L	M	N	P	Q	R		M		M	N	P	Q	Q		
	M	N	P	Q	R		M	N	P	Q		N	P		M	N	P	Q	R	R		N		N	P	Q	Q	Q		
	N	P	Q	R	S		N	P	Q	R		P	Q		N	P	Q	R	S	S		P		P	Q	Q	Q	Q		
	P	Q	R	S	T		P	Q	R	S		R	S		P	Q	R	S	T	T		R		P	Q	Q	Q	Q		
	Q	R	S	T	V		Q	R	S	T		S	T		Q	R	S	T	V	V		S		Q	Q	Q	Q	Q		
	R	S	T	V	W		R	S	T	V		T	V		R	S	T	V	W	W		T		R	S	T	T	T		
	S	T	V	W	Y		S	T	V	W		V	W		S	T	V	W	Y	Y		V		S	T	T	T	T		
	T	V	W	Y			T	V	W	Y		W	Y		T	V	W	Y				W		T	V	T	T	T		
	V	W	Y				V	W	Y			Y		V	W	Y						Y		V	T	T	T	T		

のように定義される)

を含むEGFドメイン単量体である、請求項31記載のポリペプチド。

【請求項33】

EGFドメイン単量体が非相同アミノ酸配列に融合している、請求項31記載のポリペプチド。

【請求項34】

単量体が標的分子に結合する、請求項31記載のポリペプチド。

【請求項 35】

アミノ酸45個またはそれ以下の長さである、請求項31記載のポリペプチド。

【請求項 36】

非相同アミノ酸配列が、親和性ペプチド、非相同LDL受容体クラスAドメイン、非相同EGFドメイン、精製タグ、酵素およびレポータータンパク質より選択される、請求項33記載のポリペプチド。

【請求項 37】

多数のリガンドへの結合親和性に関して単量体ドメインまたは単量体ドメインを含む多量体のライブラリーをスクリーニングする方法であって、

単量体ドメインまたは単量体ドメインの多量体のライブラリーを多数のリガンドに接触させることと、

リガンドの少なくとも1個に結合する単量体ドメインまたは多量体を選択することとを含む方法。

【請求項 38】

i. 単量体ドメインのライブラリーを多数のリガンドに接触させることと、

ii. リガンドの少なくとも1個に結合する単量体ドメインを選択することと、

iii. 選択された単量体ドメインを単量体ドメインのライブラリーに連結して、選択された単量体ドメインおよび第二の単量体ドメインをそれぞれが含む多量体のライブラリーを形成することと、

iv. 多量体のライブラリーを多数のリガンドに接触させて、多量体およびリガンドをそれぞれが含む複数の複合体を形成することと、

v. 少なくとも1個の複合体を選択することと

を含む、請求項37記載の方法。

【請求項 39】

選択された複合体の多量体を単量体ドメインまたは多量体のライブラリーに連結して、選択された多量体および少なくとも第三の単量体ドメインをそれぞれが含む多量体の第二のライブラリーを形成することと、

第二の多量体ライブラリーを多数のリガンドに接触させて複数の第二の複合体を形成することと、

少なくとも1個の第二の複合体を選択することと

をさらに含む、請求項38記載の方法。

【請求項 40】

リガンドおよび多量体の同一性を決定する、請求項38記載の方法。

【請求項 41】

単量体ドメインのライブラリーを多数のリガンドと接触させる、請求項37記載の方法。

【請求項 42】

多量体のライブラリーを多数のリガンドと接触させる、請求項37記載の方法。

【請求項 43】

多数のリガンドが混合物の状態にある、請求項37記載の方法。

【請求項 44】

多数のリガンドがアレイ状にある、請求項37記載の方法。

【請求項 45】

多数のリガンドが細胞または組織の中または上にある、請求項37記載の方法。

【請求項 46】

多数のリガンドが固体支持体上に固定化されている、請求項37記載の方法。

【請求項 47】

リガンドがポリペプチドである、請求項37記載の方法。

【請求項 48】

ポリペプチドがファージの表面で発現している、請求項48記載の方法。

【請求項 49】

単量体ドメインまたは多量体ライブラリーがファージの表面で発現している、請求項37記載の方法。

【請求項50】

単量体ドメインがLDL受容体A型単量体ドメインである、請求項37記載の方法。

【請求項51】

単量体ドメインがEGF単量体ドメインである、請求項37記載の方法。

【請求項52】

多量体のライブラリーがファージの表面に発現してライブラリー発現ファージを形成し、かつリガンドがファージの表面に発現してリガンド発現ファージを形成する方法であって、

ライブラリー発現ファージをリガンド発現ファージと接触させてリガンド発現ファージ/ライブラリー発現ファージのペアを形成することと、

ライブラリー発現ファージに結合しないリガンド発現ファージを除去する、またはリガンド発現ファージに結合しないライブラリー発現ファージを除去することと、

リガンド発現ファージ/ライブラリー発現ファージのペアを選択することとを含む、請求項37記載の方法。

【請求項53】

ファージペアからポリヌクレオチドを単離することと、ポリヌクレオチドを増幅して、リガンド発現ファージおよびライブラリー発現ファージからのポリヌクレオチドを含むポリヌクレオチドハイブリッドを産生することとをさらに含む、請求項52記載の方法。

【請求項54】

複数のファージペアからポリヌクレオチドハイブリッドを単離して、それにより、ポリヌクレオチドハイブリッドの混合物を形成することを含む、請求項53記載の方法。

【請求項55】

ハイブリッドポリヌクレオチドの混合物を、ポリヌクレオチドハイブリッド形成を可能にする条件下、cDNAライブラリーに接触させて、それにより、ハイブリッドポリヌクレオチドをcDNAライブラリー中のcDNAにハイブリッド形成させることと、

ハイブリッド形成されたハイブリッドポリヌクレオチドのヌクレオチド配列を決定して、それにより、cDNAによってコードされたポリペプチドに特異的に結合する単量体ドメインを同定することと

を含む、請求項54記載の方法。

【請求項56】

単量体ドメインライブラリーがファージの表面に発現してライブラリー発現ファージを形成し、かつリガンドがファージの表面に発現してリガンド発現ファージを形成し、かつ選択された複合体が、リガンド発現ファージに結合したライブラリー発現ファージを含む方法であって、

選択された単量体ドメインまたは多量体を第一および第二の部分に分割することと、

第一の部分の単量体ドメインまたは多量体を固体面に連結し、かつファージディスプレイリガンドライブラリーを第一の部分の単量体ドメインまたは多量体に接触させて、第一の部分の単量体ドメインまたは多量体に結合する標的リガンドファージを同定することと、

第二の部分の単量体ドメインまたは多量体を表示するファージを細菌に感染させてファージを発現させることと、

標的リガンドファージをこの発現したファージに接触させて、標的リガンドファージおよび単量体ドメインまたは多量体を表示するファージで構成されるファージペアを形成することと

を含む、請求項37記載の方法。

【請求項57】

ファージペアの各ファージからポリヌクレオチドを単離して、それにより、ファージペア中のリガンドに結合する多量体または単量体ドメインを同定することとをさらに含む、請

求項56記載の方法。

【請求項58】

ポリヌクレオチドを増幅して、標的リガンドファージおよびライブラリーファージからのポリヌクレオチドを含むポリヌクレオチドハイブリッドを産生することをさらに含む、請求項59記載の方法。

【請求項59】

複数のファージペアからポリヌクレオチドハイブリッドを単離し、かつ増幅して、それにより、ポリヌクレオチドハイブリッドの混合物を形成することを含む、請求項56記載の方法。

【請求項60】

ハイブリッドポリヌクレオチドの混合物を、ハイブリッド形成を可能にする条件下、cDNAライブラリーに接触させて、それにより、ハイブリッドポリヌクレオチドをcDNAライブラリー中のcDNAにハイブリッド形成させることと、

会合したハイブリッドポリヌクレオチドのヌクレオチド配列を決定して、それにより、cDNA会合cDNAによってコードされるリガンドに特異的に結合する単量体ドメインを同定することと

を含む、請求項59記載の方法。

【請求項61】

血液中の分子の血清半減期を増大させる方法であって、

多量体に結合した分子を対象者に投与することを含み、多量体が、

血液成分に特異的に結合する第一の単量体ドメイン、および

分子に特異的に結合する第二の単量体ドメイン

を含む方法。

【請求項62】

血液成分が、ヒト血清アルブミン、赤血球およびIgGからなる群より選択される、請求項61記載の方法。

【請求項63】

第一および第二のドメインがLDL受容体クラスAドメインである、請求項61記載の方法。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0005

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0005】

個々のタンパク質は1つまたは複数の個別の単量体ドメインを有し得る。これらのタンパク質は、しばしばモザイクタンパク質と呼ばれる。例えば、LDL受容体ファミリーのメンバーは、4つの主要な構造的ドメインを含む：システインリッチAドメイン反復、上皮成長因子前駆体様反復、膜貫通ドメイン、および細胞質ドメイン。LDL受容体ファミリーは、1) 細胞表面受容体であるメンバー；2) 細胞外リガンドを認識するメンバー；および3) リソソームによる分解のためにそれらを内在化するメンバーを含む。Hussainら、The Mammalian Low-Density Lipoprotein Receptor Family、(1999) *Annu. Rev. Nutr.* 19:141-72を参照されたい。例えば、いくつかのメンバーには、超低密度リポタンパク質受容体(VLDL-R)、アポリポタンパク質E受容体2、LDLR関連タンパク質(LRP)、およびメガリンが含まれる。ファミリーのメンバーは以下の特徴を有する。1) 細胞表面での発現；2) Aドメイン反復からなる細胞外リガンド結合；3) リガンド結合に対するカルシウムの要求性；4) 受容体結合タンパク質およびアポリポタンパク質(apo)Eの認識；5) YWTD反復(配列番号：218)を含む上皮成長因子(EGF)前駆体相同性ドメイン；6) 単一の膜貫通領域；ならびに7) 種々のリガンドの受容体媒介エンドサイトーシス。Hussain、前記を参照されたい。さらに、これらのメンバーは、構造的に異なるいくつかのリガンドを結合する。

【手続補正 3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0013

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0013】

いくつかの態様において、単量体ドメインは、以下の配列を含むLDL受容体クラスAドメイン単量体である。

$$C_a X_{3-15} C_b X_{3-15} C_c X_{6-7} C_d (D,N) X_4 C_e X_{4-6} DEX_{2-8} C_f \text{ (配列番号: 219)}$$

式中、Cはシステインであり、 X_{n-m} は、独立して選択されるアミノ酸の数をnとmとの間で表し、かつ(D,N)は、位置がDまたはNであることができることを示し、 C_a-C_c 、 C_b-C_e および C_d-C_f はジスルフィド結合を形成する。

【手続補正 4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0014

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0014】

いくつかの態様において、単量体ドメインは、以下の配列を含むLDL受容体クラスAドメイン単量体である。

$$C_a X_{6-7} C_b X_{4-5} C_c X_6 C_d X_5 C_e X_{8-10} C_f \text{ (配列番号: 220 ~ 231)}$$

式中、Xは以下のように定義される。

C	X(8,7)						C	X(4,5)				C	X(8)						C	X(5)					C	X(8,10)										C
	X1	X2	X3	X4	X5	X6		X1	X2	X3	X4		X1	X2	X3	X4	X5	X6		X1	X2	X3	X4	X5		X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7	X8			
A	A	A	A	A	A		A	A				A	A	A	A	A			A	A	A				A	A	A			A	A					
C																																				
D	D	D	D				D	D	D	D			D	D	D	D			D	D	D	D			D	D	D			D	D					
E	E	E	E			E	E		E				E	E	E	E			E	E	E	E			E	E	E			E	E					
F	F	F	F	F	F		F		F	F	F	F	F	F	F	F			F	F	F	F			F	F	F			F	F					
G	G	G	G				G	G	G	G			G	G	G	G			G	G	G	G			G	G	G			G	G					
H	H	H	H	H	H		H	H	H	H			H	H	H	H			H	H	H	H			H	H	H			H	H					
I						I							I						I						I					I						
K	K	K	K	K	K		K		K	K	K		K	K	K	K			K	K	K			K	K	K			K	K						
L	L	L	L	L	L		L		L	L	L		L	L	L	L			L	L	L			L	L	L			L	L						
M	M	M	M	M	M		M		M	M	M		M	M	M	M			M	M	M			M	M	M			M	M						
N	N	N	N	N	N		N		N	N	N		N		N	N			N	N	N	N			N	N	N			N	N					
P	P	P	P			P	P		P	P	P		P		P	P			P	P	P			P		P			P							
Q	Q	Q	Q	Q	Q		Q	Q	Q	Q			Q	Q	Q	Q			Q	Q	Q	Q			Q	Q	Q			Q	Q					
R	R	R	R	R	R		R	R	R	R			R	R	R	R			R	R	R	R			R	R	R			R	R					
S	S	S	S	S	S		S	S	S	S			S	S	S	S			S	S	S	S			S	S	S			S	S					
T	T	T	T	T	T		T	T	T	T			T	T	T	T			T	T	T	T			T	T	T			T	T					
V	V	V	V	V	V		V	V		V	V		V	V	V	V			V	V	V			V	V	V			V	V						
W	W	W		W			W		W	W	W		W	W	W	W			W	W	W			W	W	W			W	W						
Y	Y	Y	Y				Y	Y		Y	Y		Y	Y	Y	Y			Y	Y	Y			Y	Y	Y			Y	Y						

	X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7		X1	X2	X3	X4	X5		X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7	X8	X9
A	A						A	A	A	A	A			A	A								
D	D	D	D	D			E	D	D	D	D	D		D	D						D	D	D
E	E	E	E	E				E	E	E	E	E		E	E						E	E	E
F		F	F	F		F		F		F				F									
G	G	G	G	G		G		G	G	G	G			G	G						G	G	
H		H				H		H	H	H	H			H							H		
K	K	K	K	K		K		K	K	K	K			K	K						K	K	
L	L	L	L	L		L		L	L	L	L			L	L						L	L	
M				M				M						M							M		
N	N	N	N	N		N		N	N	N	N			N	N						N	N	
P	P	P	P	P		P		P	P	P	P			P	P						P	P	
Q		Q	Q	Q		Q		Q	Q	Q	Q			Q	Q						Q	Q	
R	R	R	R	R		R		R	R	R	R			R	R						R	R	
S	S	S	S	S		S		S	S	S	S			S	S						S	S	
T	T	T	T	T		T		T	T	T	T			T	T						T	T	
V		V	V			V		V						V							V		
W						W								W									
Y						Y								Y							Y		

	X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7	X8	X9	X10
A	A						A	A	A	A
D	D	D					D	D	D	D
E		E					E	E	E	E
F		F								
G		G					G		G	H
H		H					H		H	
K	K						K	K	K	I
L		L					L	L	L	L
M							M	M	M	M
N	N						N	N	N	N
P	P						P	P	P	P
Q		Q					Q	Q	Q	Q
R	R						R	R	R	R
S	S						S	S	S	S
T		T					T	T	T	T
V							V		V	V
W							W		W	
Y							Y		Y	Y

いくつかの態様において、LDL受容体クラスAドメイン単量体はそれぞれ配列番号：331を含む。

【手続補正5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0015

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0015】

いくつかの態様において、単量体ドメインは、以下の配列を含むEGFドメイン単量体である。

$C_a X_{3-14} C_b X_{3-7} C_c X_{4-16} C_d X_{1-2} C_e X_{8-23} C_f$ (配列番号：232)

式中、Cはシステインであり、 X_{n-m} は、独立して選択されるアミノ酸の数をnとmとの間で表し、 C_a-C_c 、 C_b-C_e および C_d-C_f はジスルフィド結合を形成する。

【手続補正6】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0016

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0016】

いくつかの態様において、単量体ドメインは、以下の配列を含むEGFドメイン単量体である。

$$C_a X_{4-6} C_b X_{3-5} C_c X_{8-9} C_d X_1 C_e X_{8-12} C_f \text{ (配列番号: 233 ~ 322)}$$

式中、Xは以下のように定義される。

C	X(4,6)	C	X(3,5)	C	X(6,9)	C	X(1)	C	X(8/12)	C
X1 X2 X3 X4	X1 X2 X3	X1 X2 X3 X4 X5 X6 X7 X8	X1	X1 X2 X3 X4 X5 X6 X7 X8	X1 X2 X3 X4 X5 X6 X7 X8 X9 X10 X11 X12					
A A A A	A A A	A A A A A A A A	A	A A A A A A A A	A A A A A A A A A A A A A A					
D D D D	D D	D D D D D D D	D	D D D D D D D	D D D D D D D D D D D D D D					
E E E E	E	E E E E E E E	E	E E E E E E E	E E E E E E E E E E E E E E					
F F F F	F F F	F F F F F F F	F	F F F F F F F	F F F F F F F F F F F F F F					
G G G G	G	G G G G G G G	G	G G G G G G G	G G G G G G G G G G G G G G					
H H H H	H	H H H H H H H	H	H H H H H H H	H H H H H H H H H H H H H H					
I I I I	I	I I I I I I I	I	I I I I I I I	I I I I I I I I I I I I I I					
K K K K	K	K K K K K K K	K	K K K K K K K	K K K K K K K K K K K K K K					
L L L L	L	L L L L L L L	L	L L L L L L L	L L L L L L L L L L L L L L					
M M M M	M	M M M M M M M	M	M M M M M M M	M M M M M M M M M M M M M M					
N N N N	N	N N N N N N N	N	N N N N N N N	N N N N N N N N N N N N N N					
P P P P	P	P P P P P P P	P	P P P P P P P	P P P P P P P P P P P P P P					
Q Q Q Q	Q	Q Q Q Q Q Q Q	Q	Q Q Q Q Q Q Q	Q Q Q Q Q Q Q Q Q Q Q Q Q Q					
R R R R	R	R R R R R R R	R	R R R R R R R	R R R R R R R R R R R R R R					
S S S S	S	S S S S S S S	S	S S S S S S S	S S S S S S S S S S S S S S					
T T T T	T	T T T T T T T	T	T T T T T T T	T T T T T T T T T T T T T T					
V V V V	V	V V V V V V V	V	V V V V V V V	V V V V V V V V V V V V V V					
W W W W	W	W W W W W W W	W	W W W W W W W	W W W W W W W W W W W W W W					
Y Y Y Y	Y	Y Y Y Y Y Y Y	Y	Y Y Y Y Y Y Y	Y Y Y Y Y Y Y Y Y Y Y Y Y Y					

【手続補正7】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0028

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0028】

いくつかの態様において、これらのドメインはジスルフィド結合の形成により二次構造を形成する。いくつかの態様において、多量体は、ポリペプチドリinkerによって単量体

ドメインに連結されているAドメインを含む。いくつかの態様において、リンカーは1～20アミノ酸である。いくつかの態様において、リンカーは5～7アミノ酸で作製される。いくつかの態様において、リンカーは6アミノ酸の長さである。いくつかの態様において、リンカーは、以下の配列 $A_1A_2A_3A_4A_5A_6$ （配列番号：352）を含み、ここで、 A_1 はアミノ酸A、P、T、Q、E、およびKより選択され； A_2 および A_3 はC、F、Y、W、またはM以外の任意のアミノ酸であり； A_4 はアミノ酸S、G、およびRより選択され； A_5 はアミノ酸H、P、およびRより選択され； A_6 はアミノ酸Tである。いくつかの態様において、リンカーは、第1のAドメインのC末端システインと第2のAドメインのN末端システインとの間の天然に存在する配列を含む。

【手続補正 8】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0042

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0042】

いくつかの態様において、単量体ドメインは、以下の配列を含むLDL受容体クラスAドメイン単量体である。

$C_aX_{3-15}C_bX_{3-15}C_cX_{6-7}C_d(D,N)X_4C_eX_{4-6}DEX_{2-8}C_f$ （配列番号：219）

式中、Cはシステインであり、 X_{n-m} は、独立して選択されるアミノ酸の数をnとmとの間で表し、かつ(D,N)は、位置がDまたはNであることができることを示し、かつ C_a-C_c 、 C_b-C_e および C_d-C_f はジスルフィド結合を形成する。

【手続補正 9】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0043

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0043】

いくつかの態様において、単量体ドメインは、以下の配列を含むLDL受容体クラスAドメイン単量体である。

$C_aX_{6-7}C_bX_{4-5}C_cX_6C_dX_5C_eX_{8-10}C_f$ （配列番号：220～231）

式中、Xは以下のように定義される。

C	X(6,7)						C	X(4,5)				C	X(6)						C	X(5)					C	X(8,10)										C		
	X1	X2	X3	X4	X5	X6		X1	X2	X3	X4		X1	X2	X3	X4	X5	X6		X1	X2	X3	X4	X5		X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7	X8					
A	A	A	A	A	A		A	A				A	A	A	A	A			A	A	A				A	A	A			A	A							
D	C	D	D				D	D	D	D		D	D	D	D				D	D	D	D			D	D	D			D	D							
E	E	E	E			E	E		E			E	E	E	E				E	E	E	E			E	E	E			E	E							
F	F	F	F	F		F	F		F			F	F	F	F				F	F	F			F	F	F			F	F								
G	G	G	G				G	G	G	G		G	G	G	G				G	G	G	G			G	G	G			G	G							
H	H	H	H	H		H	H		H			H	H	H				H	H	H	H			H	H	H			H	H								
I	I					I	I		I			I	I	I				I	I	I			I	I			I	I			I	I						
K	K	K	K	K	K		K		K	K		K	K	K	K				K	K	K			K	K			K	K									
L	L			L	L		L		L	L		L	L	L	L				L	L	L			L	L			L	L									
M	M			M	M		M		M	M		M	M	M	M				M	M			M	M			M	M			M	M						
N	N	N	N			N	N		N			N	N	N	N				N	N	N	N			N	N			N	N								
P	P	P	P			P	P		P			P	P	P	P				P	P	P			P	P			P	P									
Q	Q	Q	Q	Q	Q		Q	Q	Q	Q		Q	Q	Q	Q				Q	Q	Q	Q			Q	Q			Q	Q								
R	R	R	R	R	R		R	R	R	R		R	R	R	R				R	R	R	R			R	R			R	R								
S	S	S	S	S	S		S	S	S	S		S	S	S	S				S	S	S	S			S	S			S	S								
T	T	T	T	T	T		T	T	T	T		T	T	T	T				T	T	T	T			T	T			T	T								
V	V	V	V			V	V		V			V	V	V	V				V	V	V			V	V			V	V									
W	W			W			W		W	W		W	W	W	W				W	W	W			W	W			W	W									
Y	Y	Y	Y			Y	Y		Y			Y	Y	Y	Y				Y	Y	Y			Y	Y			Y	Y									

	X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7		X1	X2	X3	X4	X5	
A	A						A		A	A	A			
D	D	D	D	D			E		D	D	D	D		
E	E								E	E	E			
F	F	F	F			F			F					
G	G	G	G	G		G			G	G				
H	H			H					H	H				
K	K	K	K	K		K			K	K				
L	L	L	L	L		L			L	L				
M				M					M					
N	N	N	N	N		N			N	N				
P	P	P	P	P		P			P	P				
Q	Q	Q	Q	Q		Q			Q	Q				
R	R	R	R	R		R			R	R				
S	S	S	S	S		S			S	S				
T	T	T	T	T		T			T	T				
V	V	V	V			V			V					
W				W					W	W				
Y	Y					Y			Y					

	X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7	X8	X9	X10
A	A						A	A	A	A
D	D	D					D	D	D	
E	E		E				E	E	E	E
F	F						F			
G	G	G					G		G	
H							H	H	H	
I							I	I	I	
K	K						K	K	K	
L		L					L	L	L	
M							M	M	M	
N	N						N	N	N	
P	P						P	P	P	
Q	Q						Q	Q	Q	
R	R	R					R	R	R	
S	S	S					S	S	S	
T							T		T	
V							V		V	
W							W		W	
Y							Y		Y	

いくつかの態様において、LDL受容体クラスAドメイン単量体はそれぞれ配列番号：331を含む。

【手続補正10】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0044

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0044】

いくつかの態様において、単量体ドメインは、以下の配列を含むEGFドメイン単量体である。

$C_a X_{3-14} C_b X_{3-7} C_c X_{4-16} C_d X_{1-2} C_e X_{8-23} C_f$ (配列番号：232)

式中、Cはシステインであり、 X_{n-m} は、独立して選択されるアミノ酸の数をnとmとの間で表し、 C_a-C_c 、 C_b-C_e および C_d-C_f はジスルフィド結合を形成する。

【手続補正11】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0045

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0045】

いくつかの態様において、単量体ドメインは、以下の配列を含むEGFドメイン単量体である。

$$C_a X_{4-6} C_b X_{3-5} C_c X_{8-9} C_d X_1 C_e X_{8-12} C_f \text{ (配列番号: 233 ~ 322)}$$

式中、Xは以下のように定義される。

C	X(4,6)	C	X(3,5)	C	X(8,9)	C	X(1)	C	X(8,12)	C
X1 X2 X3 X4	X1 X2 X3 X4	X1 X2 X3 X4	X1 X2 X3 X4 X5 X6 X7 X8	X1	X1 X2 X3 X4 X5 X6 X7 X8	X1	X1 X2 X3 X4 X5 X6 X7 X8	X1	X1 X2 X3 X4 X5 X6 X7 X8	X1
A A A A	A A A A	A A A A	A A A A A A A A	A	A A A A A A A A	A	A A A A A A A A	A	A A A A A A A A	A
D D D E	D D D E	D D D E	D D D D D D D D	D	D D D D D D D D	D	D D D D D D D D	D	D D D D D D D D	D
E E E E	E E E E	E E E E	E E E E E E E E	E	E E E E E E E E	E	E E E E E E E E	E	E E E E E E E E	E
F F F F	F F F F	F F F F	F F F F F F F F	F	F F F F F F F F	F	F F F F F F F F	F	F F F F F F F F	F
G G G G	G G G G	G G G G	G G G G G G G G	G	G G G G G G G G	G	G G G G G G G G	G	G G G G G G G G	G
H H H H	H H H H	H H H H	H H H H H H H H	H	H H H H H H H H	H	H H H H H H H H	H	H H H H H H H H	H
I I I I	I I I I	I I I I	I I I I I I I I	I	I I I I I I I I	I	I I I I I I I I	I	I I I I I I I I	I
K K K K	K K K K	K K K K	K K K K K K K K	K	K K K K K K K K	K	K K K K K K K K	K	K K K K K K K K	K
L L L L	L L L L	L L L L	L L L L L L L L	L	L L L L L L L L	L	L L L L L L L L	L	L L L L L L L L	L
M M M M	M M M M	M M M M	M M M M M M M M	M	M M M M M M M M	M	M M M M M M M M	M	M M M M M M M M	M
N N N N	N N N N	N N N N	N N N N N N N N	N	N N N N N N N N	N	N N N N N N N N	N	N N N N N N N N	N
P P P P	P P P P	P P P P	P P P P P P P P	P	P P P P P P P P	P	P P P P P P P P	P	P P P P P P P P	P
Q Q Q Q	Q Q Q Q	Q Q Q Q	Q Q Q Q Q Q Q Q	Q	Q Q Q Q Q Q Q Q	Q	Q Q Q Q Q Q Q Q	Q	Q Q Q Q Q Q Q Q	Q
R R R R	R R R R	R R R R	R R R R R R R R	R	R R R R R R R R	R	R R R R R R R R	R	R R R R R R R R	R
S S S S	S S S S	S S S S	S S S S S S S S	S	S S S S S S S S	S	S S S S S S S S	S	S S S S S S S S	S
T T T T	T T T T	T T T T	T T T T T T T T	T	T T T T T T T T	T	T T T T T T T T	T	T T T T T T T T	T
V V V V	V V V V	V V V V	V V V V V V V V	V	V V V V V V V V	V	V V V V V V V V	V	V V V V V V V V	V
W W W W	W W W W	W W W W	W W W W W W W W	W	W W W W W W W W	W	W W W W W W W W	W	W W W W W W W W	W
Y Y Y Y	Y Y Y Y	Y Y Y Y	Y Y Y Y Y Y Y Y	Y	Y Y Y Y Y Y Y Y	Y	Y Y Y Y Y Y Y Y	Y	Y Y Y Y Y Y Y Y	Y

【手続補正12】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0057

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0057】

本発明はまた、LDL受容体クラスAドメイン単量体を含む非天然ポリペプチドであって、単量体が以下の配列を含むポリペプチドを提供する。

$C_a X_{3-15} C_b X_{3-15} C_c X_{6-7} C_d (D, N) X_4 C_e X_{4-6} DEX_{2-8} C_f$ (配列番号: 219)

式中、Cはシステインであり、 X_{n-m} は、独立して選択されるアミノ酸の数をnとmとの間で表し、かつ(D, N)は、位置がDまたはNであることができることを示し、 C_a - C_c 、 C_b - C_e および C_d - C_f はジスルフィド結合を形成する。

【手続補正 1 3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 5 8

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 0 5 8】

いくつかの態様において、単量体ドメインは、以下の配列を含むLDL受容体クラスAドメイン単量体である。

$C_a X_{6-7} C_b X_{4-5} C_c X_6 C_d X_5 C_e X_{8-10} C_f$ (配列番号: 220~231)

式中、Xは以下のように定義される。

C	X(6,7)						C	X(4,5)				C	X(6)						C	X(5)					C	X(8,10)										C																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																		
X1 X2 X3 X4 X5 X6						X1 X2 X3 X4				X1 X2 X3 X4 X5 X6						X1 X2 X3 X4 X5					X1 X2 X3 X4 X5 X6 X7 X8																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																	
A	A	A	A	A	A	A	A	A			A	A	A	A	A		A	A	A		A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A

【手続補正 1 4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0060

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0060】

本発明はまた、EGFドメイン単量体を含む非天然ポリペプチドであって、EGFドメイン単量体が以下の配列を含むポリペプチドを提供する。

$C_a X_{3-14} C_b X_{3-7} C_c X_{4-16} C_d X_{1-2} C_e X_{8-23} C_f$ (配列番号：232)

式中、Cはシステインであり、 X_{n-m} は、独立して選択されるアミノ酸の数をnとmとの間で表し、

C_a-C_c 、 C_b-C_e および C_d-C_f はジスルフィド結合を形成する。

【手続補正15】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0061

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0061】

いくつかの態様において、単量体ドメインは、以下の配列を含むEGFドメイン単量体である。

$C_a X_{4-6} C_b X_{3-5} C_c X_{8-9} C_d X_1 C_e X_{8-12} C_f$ (配列番号：233～322)

式中、Xは以下のように定義される。

C	X(4,6)				C	X(3,5)			C	X(8,9)								C	X(1)	C	X(8/12)								C							
X1	X2	X3	X4		X1	X2	X3		X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7	X8	X1		X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7	X8		X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7	X8	
A	A	A	A		A		A		A	A	A	A	A	A	A	A	A		A	A	A		A	A		A	A		A	A	A	A	A	A		
D	E	E	E		D		E		D	E	E	E	E	E	E	E	D		D	E	E		D	E	E	E		D	E	E	E	E	E	E		
F	G	G	G	G	F	F	G	G	F	F	F	F	F	F	F	F	F		F	F	F		F	F	F	F		F	F	F	F	F	F	F		
G	H	H	H		G	H	H	I	G	H	H	I	G	H	H	I	H		H	H	H		H	H	H	H		H	H	H	H	H	H	H		
I	K	K	K		K		L	L	I	K	L	L	L	L	L	L	I		I	K	L		I	K	L	L		I	K	L	L	L	L	L		
L	M	M	M	M	L				L	M	L	L	L	L	L	M	L		L	M	M		L	M	M	M		L	M	M	M	M	M	M		
N	P	P	P	P	N	N	N		N	P	N	N	N	N	N	N	N		N	P	N		N	P	N	N		N	P	N	N	N	N	N		
P	Q	Q	Q	Q	P	Q	Q	Q	P	Q	Q	Q	Q	Q	Q	P	Q		Q	Q	Q		Q	Q	Q	Q		Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q		
R	S	S	S	S	R	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	R	S		R	S	S		R	S	S	S		R	S	S	S	S	S	S		
S	T	T	T	T	S	T	T	T	S	T	T	T	T	T	T	T	T		T	T	T		T	T	T	T		T	T	T	T	T	T	T		
T	V	V	V		T		V		T	V	V	V	V	V	V	V	V		V	V	V		V	V	V	V		V	V	V	V	V	V	V		
V	W	W	W		V		Y	Y	Y	W	W	W	W	W	W	Y	W		Y	Y	Y		Y	Y	Y	Y		Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y		
Y	Y	Y	Y		Y				Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y		Y	Y	Y		Y	Y	Y	Y		Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y		

X1	X2	X3	X4	X5	X1	X2	X3	X4	X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7	X8	X9	X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7	X8	X9	X10	X11	X12
A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
D	E	E	F	F	D	E		D	E	E	F		D	E	E		D	E	E	F	F		D	E	E	F	F	D	E
F	G	F	G	G	F	F	G		F	F	F	G	F	F	F	F	F	F	F	F	F		F	F	F	F	F	F	F
H	I	H	H		H	H			H	H			H				H	H					H	H				H	I
K	L	K	L	L	K	L			K	L			K	L			K	L					K	L				K	K
M	N	M	N	N	M	N			M	N			M	N			M	N					M	N				M	M
P	Q	P	Q	Q	P	Q			P	Q			P	Q			P	Q					P	Q				P	Q
R	S	R	S	S	R	S			R	S			R	S			R	S					R	S				R	S
S	T	S	T	T	S	T	T		S	T			S	T			S	T					S	T				S	T
T	V	T	V		T		V		T	V			T	V			T	V					T	V				T	V
W	Y	Y	Y		W		Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y

X1	X2	X3	X4	X5	X6	X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7	X8	
A	A	A	A	A	A	A	C	D	E	D	E		D	E
D	E	F	F	F	F	D	E	F	F	F	F	F	F	
F	G	G	H	I	I	F	G	H	I	K	L	M	N	
I	K	L	M	N	N	I	K	L	L	L	L	M	N	
L	M	N	P	Q	Q	L	M	N	P	Q	Q	R	S	
M	N	P	Q	R	R	M	N	P	Q	R	R	S	T	
N	P	Q	R	S	S	N	P	Q	R	S	S	T	T	
P	Q	R	S	T	T	P	Q	R	S	T	T	T	T	
Q	R	S	T	T	T	Q	R	S	T	T	T	T	T	
R	S	T	T	T	T	R	S	T	T	T	T	T	T	
S	T	T	T	T	T	S	T	T	T	T	T	T	T	
T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	
T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	
T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	
T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	
T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	
T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	
T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	
T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	
T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	
T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	
T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	
T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	
T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	
T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	
T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	
T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	
T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	
T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	
T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	
T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	
T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	
T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	
T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	
T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	
T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	
T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	
T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	
T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	
T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	
T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	
T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	
T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	
T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	
T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	
T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	
T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	
T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	
T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	
T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	
T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	
T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	
T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	
T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	
T	T	T	T	T	T									

【手続補正 16】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0062

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0062】

いくつかの態様において、EGFドメイン単量体は、非相同アミノ酸配列に融合している。いくつかの態様において、単量体は標的分子に結合する。いくつかの態様において、ポリペプチドは、アミノ酸45個またはそれ以下の長さである。いくつかの態様において、非相同アミノ酸配列は、親和性ペプチド（たとえばSKVILF；配列番号：323）、非相同LDL受容体クラスAドメイン、非相同EGFドメイン、精製タグ、酵素（たとえば西洋ワサビペルオキシダーゼまたはアルカリホスファターゼ）およびレポータータンパク質（たとえば緑蛍光タンパク質またはルシフェラーゼ）より選択される。

【手続補正 17】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0113

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0113】

上記に記載のように、単量体ドメインは任意でシステインリッチである。適切なシステインリッチ単量体ドメインは、例えば、LDL受容体クラスAドメイン（Aドメイン）またはEGF様ドメインを含む。単量体ドメインはまた、負に荷電した残基のクラスターを有し得る。任意で単量体ドメインは、反復配列（例えば、 β プロペラドメインにおいて見い出されるようなYWTD（配列番号：218））を含む。

【手続補正18】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0117

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0117】

例示的なAドメイン配列および共通配列は、図2、3、および8に示される。図9は、引き続くシステイン間の間隔を有するAドメインにおける残基の位置および存在を示す。さらに、図10は、多数のAドメインを示し、保存アミノ酸のリストを提供する。Aドメインを同定するために有用な1つの代表的な共通配列は以下である。

C-[VILMA]-X₍₅₎-C-[DNH]-X₍₃₎-[DENQHT]-

C-X_(3,4)-[STADE]-[DEH]-[DE]-X_(1,5)-C（配列番号：330）

ここで角括弧 [] 内の残基は、1つの位置で可能な残基を示す。「X_(#)」は残基の数を示す。これらの残基は、任意のアミノ酸残基であり得る。2つの数字を含む丸括弧 () は、その位置を占め得るアミノ酸の範囲をいう（例えば、「[DE]-X_(1,5)-C」は、アミノ酸DEの後に1個、2個、3個、4個、または5個の残基が続き、その後にCが続くことを意味する）。この共通配列は、第3のシステインで開始するAドメインの部分のみを表す。第2の一致は以下である。

C-X₍₃₋₁₅₎-C-X₍₄₋₁₅₎-C-X₍₆₋₇₎-C-[N,D]-X₍₃₎-[D,E,N,Q,H,S,T]-

C-X₍₄₋₆₎-D-E-X₍₂₋₈₎-C（配列番号：331）

第2の一致は、6つすべてのシステイン残基にわたるアミノ酸残基を示す。いくつかの態様において、Aドメイン改変体は、上記の配列のいずれかと実質的に同一な配列を含む。

【手続補正19】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0118

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0118】

さらなる例示的なAドメインは以下の配列を含む。

C_aX₃₋₁₅C_bX₃₋₁₅C_cX₆₋₇C_d(D,N)X₄C_eX₄₋₆DEX₂₋₈C_f（配列番号：219）

式中、Cはシステインであり、X_{n-m}は、独立して選択されるアミノ酸の数をnとmとの間で表し、かつ(D,N)は、位置がDまたはNであることができることを示し、C_a-C_c、C_b-C_eおよびC_d-C_fはジスルフィド結合を形成する。

【手続補正20】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0119

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0119】

いくつかの態様において、単量体ドメインは、以下の配列を含むLDL受容体クラスAドメ

イン単量体である。

$C_a X_{6-7} C_b X_{4-5} C_c X_6 C_d X_5 C_e X_{8-10} C_f$ (配列番号：220～231)

式中、Xは以下のように定義される。

X(6,7)							X(4,5)				X(6)						X(5)					X(8,10)										
X1	X2	X3	X4	X5	X6		X1	X2	X3	X4	X1	X2	X3	X4	X5	X6	X1	X2	X3	X4	X5	X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7	X8	X9	X10	
A	A	A	A	A	A		A	A		A	A	A	A	A	A		A	A	A		A	A	A	A	A	A	A	A	A	A		
D	C						D	D			A	C					D	D	D		D	D	D	D	D	D	D	D	D	D		
D	E	D	D	D			D	E	D	E	D	E	D	E	F		D	E	D	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E		
F	F	F	F	F	F		F	F	F	F	F	F	F	F	F		F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F		
G	G	G	G	G			G	G	G	G	G	G	G	G	G		G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G		
H	H	H	H	H	H		H	H	H	H	H	H	H	H	H		H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H		
I	I				I		I				I	I	I	I	I		I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I		
K	K	K	K	K	K		K			K	K	L	L	K	K	L	K	K	L	L	K	K	L	L	K	K	L	L	K	K		
L	L			L	L		L			L	L	L	L	L	L		L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L		
M	M	M	M	M	M		M			M	M	M	M	M	M		M			M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	
N	N	N	N	N	N		N	N	N	N	N	N	N	N	N		N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	
P	P	P	P	P	P		P	P	P	P	P	P	P	P	P		P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	
Q	Q	Q	Q	Q	Q		Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q		Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	
R	R	R	R	R	R		R	R	R	R	R	R	R	R	R		R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	
S	S	S	S	S	S		S	S	S	S	S	S	S	S	S		S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	
T	T	T	T	T	T		T	T	T	T	T	T	T	T	T		T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	
V	V	V	V	V	V		V	V		V	V	V	V	V	V		V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	
W	W	W	W	W	W		W	W		W	W	W	W	W	W		W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	
Y	Y	Y	Y	Y	Y		Y	Y		Y	Y	Y	Y	Y	Y		Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	

X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7
A	A					A
D	D	D	D	D		
D	E	E	E	E		E
F	F	F	F	F	F	
G	G	G	G	G		G
H	H			H		H
K		K	K	K		K
L	L	L		L	L	M
N	N	N	N	N	P	
P	P	P	P	P	Q	
R	R	R	R	R	R	
S	S	S	S	S	S	
T						
V						
W						
Y						

X1	X2	X3	X4	X5
A	A	A	A	A
D	D			D
D	E			E
E	E	E	E	E
F				
G	G			
H	H			
K				
L	L			
M				
N	N			
P				
Q	Q			
R				
S	S			
T				
V				
W				
Y	Y			

X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7	X8	X9	X10
A						A	A	A	A
D	D				D			D	D
D	E				E	E	E	E	E
F									
G	G					G	G		
H	H					H	H	H	
K									
L	L					L	L	L	
M						M	M	M	
N	N					N	N	N	
P						P	P	P	
Q	Q					Q	Q	Q	
R						R	R	R	
S	S					S	S	S	
T									
V								V	
W									
Y	Y							Y	

上記表は、LDL受容体クラスA単量体ドメインの各位置における別のアミノ酸残基を示す。たとえば、システインC1とシステインC2との間には6個または7個のアミノ酸があることができる。表の左上ボックスは、C1とC2との間に6個のアミノ酸がある場合の各位置における別のアミノ酸残基を示す。表の左下ボックスは、C1とC2との間に7個のアミノ酸がある場合の別のアミノ酸残基を示す。すべての場合で、ある位置（たとえばX1）のアミノ酸は、残りの位置（たとえばX2、X3など）に選択されるアミノ酸とは独立して選択される。

【手続補正21】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0121

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0121】

本発明の実施における使用のために適切な別の例示的な単量体ドメインはC2ドメインである。C2単量体ドメインは、2つ、4つの鎖の β シートからなるコンパクトな β サンドイッチを含むポリペプチドである。ここで、このドメインの「トップ」のループおよびこのドメインの「ボトム」のループは、8つの β 鎖を連結している。C2単量体ドメインは2つのサブクラス、すなわち、トポロジーI（シナプトタグミン様トポロジー）、およびトポロジーII（サイトゾルホスホリパーゼA2様トポロジー）を、それぞれ有するC2単量体ドメインに分けられ得る。トポロジーIを有するC2単量体ドメインは、分子の「トップ」に3つのループ（それらのすべてが Ca^{2+} 結合ループである）を含むが、トポロジーIIを有するC2単量体ドメインは、分子の「トップ」に4つのループ（それらの内で3つのみが Ca^{2+} 結合ループである）を含む。C2単量体ドメインの構造は、RizoおよびSudhof、J.Biol.Chem.273; 15879-15882 (1998)ならびにCho、J.Biol.Chem.276; 32407-32410 (2001)によって概説されている。「ループ領域1」、「ループ領域2」、および「ループ領域3」という用語とは、分子の「トップ」に位置する Ca^{2+} 結合ループ領域をいう。この命名法（これは、分子の「トップ」に位置する3つの Ca^{2+} 結合ループを Ca^{2+} 結合ループでないループ（主として分子の「ボトム」に位置する）と区別するために使用される）は、広範に使用され、文献中で認知されている。RizoおよびSudhof、J.Biol.Chem. 273; 15879-15882 (1998)を参照されたい。ループ領域1、2、および3は標的結合領域を示し、従って、結合特異性および親和性を調節するために変化させ得る。C2ドメインの残りの部分は、所望の場合、変更することなしに維持され得る。いくつかの例示的なC2ドメインは以下の配列と実質的に同一である（配列番号：332）

Tyr	Ser	His	Lys	Phe	Thr	Val	Val	Val	Leu	Arg	Ala	Thr	Lys	Val
1				5					10					15
Thr	Lys	Gly	Ala	Phe	Gly	Asp	Met	Leu	Asp	Thr	Pro	Asp	Pro	Tyr
				20					25					30
Val	Glu	Leu	Phe	Ile	Ser	Thr	Thr	Pro	Asp	Ser	Arg	Lys	Arg	Thr
				35					40					45
Arg	His	Phe	Asn	Asn	Asp	Ile	Asn	Pro	Val	Trp	Asn	Glu	Thr	Phe
				50					55					60
Glu	Phe	Ile	Leu	Asp	Pro	Asn	Gln	Glu	Asn	Val	Leu	Glu	Ile	Thr
				65					70					75
Leu	Met	Asp	Ala	Asn	Tyr	Val	Met	Asp	Glu	Thr	Leu	Gly	Thr	Ala
				80					85					90
Thr	Phe	Thr	Val	Ser	Ser	Met	Lys	Val	Gly	Glu	Lys	Lys	Glu	Val
				95					100					105
Pro	Phe	Ile	Phe	Asn	Gln	Val	Thr	Glu	Met	Val	Leu	Glu	Met	Ser
				110					115					120
Leu	Glu	Val												
														123.

：

残基1～16、29～48、54～77、および86～123はループ領域1、2、および3の外側に局在する位置を、残基17～28、49～53、および78～85はループ領域1、2、および3を、それぞれ構成する。

【手続補正22】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0124

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0124】

例示的なEGF単量体ドメインは以下の配列を含む。

$C_a X_{3-14} C_b X_{3-7} C_c X_{4-16} C_d X_{1-2} C_e X_{8-23} C_f$ （配列番号：232）

式中、Cはシステインであり、 X_{n-m} は、独立して選択されるアミノ酸の数をnとmとの間

で表し、かつ

C_a-C_c 、 C_b-C_e および C_d-C_f はジスルフィド結合を形成する。

【手続補正 2 3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 1 2 5

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 1 2 5】

いくつかの態様において、単量体ドメインは、以下の配列を含むEGFドメイン単量体である。

$C_aX_{4-6}C_bX_{3-5}C_cX_{8-9}C_dX_1C_eX_{8-12}C_f$ (配列番号：233～322)

式中、Xは以下のように定義される。

C	X(4,6)	C	X(3,5)	C	X(8,9)	C	X(1)	C	X(8/12)	C
X1-X2-X3-X4	A A A A	X1-X2-X3	A A A	X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8	A A A A A A A A	X1	A A A A A A A A	X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8	A A A A A A A A	
D D D		D D		D D D D D D D		D D D D D D D D		D D D D D D D D		
E E E E		E E		E E E E E E E		E E E E E E E E		E E E E E E E E		
F F		F F		F F F F F F F		F F F F F F F F		F F F F F F F F		
G G G G		G G G		G G G G G G G		G G G G G G G G		G G G G G G G G		
H H H		H H H		H H H H H H H		H H H H H H H H		H H H H H H H H		
I I		I I		I I I I I I I		I I I I I I I I		I I I I I I I I		
K K K		K K		K K K K K K K		K K K K K K K K		K K K K K K K K		
L L L		L L		L L L L L L L		L L L L L L L L		L L L L L L L L		
M M M M				M M M M M M M		M M M M M M M M		M M M M M M M M		
N N N N		N N N		N N N N N N N		N N N N N N N N		N N N N N N N N		
P P P P		P P		P P P P P P P		P P P P P P P P		P P P P P P P P		
Q Q Q Q		Q Q Q		Q Q Q Q Q Q Q		Q Q Q Q Q Q Q Q		Q Q Q Q Q Q Q Q		
R R R R		R R		R R R R R R R		R R R R R R R R		R R R R R R R R		
S S S S		S S T		S S S S S S S		S S S S S S S S		S S S S S S S S		
T T T T		T T T		T T T T T T T		T T T T T T T T		T T T T T T T T		
V V		V V		V V V V V V V		V V V V V V V V		V V V V V V V V		
W W				W W W W W W W		W W W W W W W W		W W W W W W W W		
Y Y		Y Y		Y Y Y Y Y Y Y		Y Y Y Y Y Y Y Y		Y Y Y Y Y Y Y Y		
X1-X2-X3-X4-X5	A A A A A	X1-X2-X3-X4	A A A A	X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8-X9	A A A A A A A A A	X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8-X9-X10-X11-X12	A A A A A A A A A A A A			
D D D D D		D D D		D D D D D D D D		D D D D D D D D D D				
E E E E E		E E E		E E E E E E E E		E E E E E E E E E E				
F F F F F		F F F		F F F F F F F F		F F F F F F F F F F				
G G G G G		G G G		G G G G G G G G		G G G G G G G G G G				
H H H H H		H H H		H H H H H H H H		H H H H H H H H H H				
I I I I I		I I I		I I I I I I I I		I I I I I I I I I I				
K K K K K		K K K		K K K K K K K K		K K K K K K K K K K				
L L L L L		L L L		L L L L L L L L		L L L L L L L L L L				
M M M M M		M M M		M M M M M M M M		M M M M M M M M M M				
N N N N N		N N N		N N N N N N N N		N N N N N N N N N N				
P P P P P		P P P		P P P P P P P P		P P P P P P P P P P				
Q Q Q Q Q		Q Q Q		Q Q Q Q Q Q Q Q		Q Q Q Q Q Q Q Q Q Q				
R R R R R		R R R		R R R R R R R R		R R R R R R R R R R				
S S S S S		S S S		S S S S S S S S		S S S S S S S S S S				
T T T T T		T T T		T T T T T T T T		T T T T T T T T T T				
V V V V V		V V V		V V V V V V V V		V V V V V V V V V V				
W W W W W				W W W W W W W W		W W W W W W W W W W				
Y Y Y Y Y		Y Y Y		Y Y Y Y Y Y Y Y		Y Y Y Y Y Y Y Y Y Y				

EGF単量体ドメインは、時にはアミノ酸25～45個、通常はアミノ酸30～39個である。

【手続補正 2 4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 1 8 2

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0182】

ペプチドリンカーの使用が広範囲に及んでいる1つの例は、単鎖抗体（軽鎖（ V_L ）および重鎖（ V_H ）の可変領域が人工のリンカーを介して連結されている）の産生についてであり、この特定の分野において膨大な刊行物が存在する。広範に使用されるペプチドリンカーは、Gly-Gly-Gly-Gly-Ser（配列番号：333）アミノ酸配列の3反復（（ Gly_4Ser ）₃）（配列番号：334）からなる15merである。他のリンカーは使用されてきており、ファージディスプレイ技術ならびに選択的感染性ファージ技術が適切なリンカー配列を多様化および選択するために使用されてきた（Tangら、(1996) J.Biol.Chem、271、15682-15686；Henneckeら、(1998)、Protein Eng. 11、405-410）。ペプチドリンカーは、ヘテロ二量体タンパク質およびホモ二量体タンパク質（例えば、T細胞受容体、 λ Croリプレッサー、P22ファージArcリプレッサー、IL-12、TSH、FSH、IL-5、およびインターフェロン- γ ）中の個々の鎖を接続するために使用されてきた。ペプチドリンカーはまた、融合ポリペプチドを作製するために使用されてきた。種々のリンカーが使用されてきており、Arcリプレッサーファージディスプレイの場合には、単鎖タンパク質の安定性の増加のために、ファージディスプレイがリンカーの長さおよび組成を最適化するために使用されてきた（RobinsonおよびSauer (1998)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95、5929-5934）。

【手続補正25】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0184

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0184】

適切なリンカーを得るためのさらに別の方法は、単純なリンカー（例えば、（ Gly_4Ser ）_n）（配列番号：335）を、ランダム変異誘発を通して最適化することによる。

【手続補正26】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0185

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0185】

上記に言及したように、ペプチドリンカーは、少なくともある程度の柔軟性を有することが一般的に好ましい。従って、いくつかの態様において、ペプチドリンカーは、1～25のグリシン残基（配列番号：336）、5～20のグリシン残基（配列番号：337）、5～15のグリシン残基（配列番号：338）、または8～12のグリシン残基（配列番号：339）を含む。ペプチドリンカーは、代表的には、少なくとも50%のグリシン残基（例えば、少なくとも75%のグリシン残基）を含む。本発明のいくつかの態様において、ペプチドリンカーは、グリシン残基のみを含む。

【手続補正27】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0186

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0186】

ペプチドリンカーは、グリシン残基に加えて、他の残基、特に、Ser、Ala、およびThrからなる群より選択される残基、特にSerを含む。従って、特定のペプチドリンカーの1つの例には、アミノ酸配列 $Gly_x-Xaa-Gly_y-Xaa-Gly_z$ を有するペプチドリンカーが含まれ、ここで各Xaaは、独立して、

Ala, Val, Leu, Ile, Met, Phe, Trp,

Pro, Gly, Ser, Thr, Cys, Tyr, Asn, Gln, Lys, Arg, His, Asp および Glu

からなる群より選択され、かつ x 、 y 、 z は、各々、1～5 (配列番号：340) の範囲の整数である。いくつかの態様において、各 Xaa は、独立して、Ser、Ala、および Thr (配列番号：341) からなる群、特に Ser (配列番号：342) より選択される。より詳細には、ペプチドリinker は、アミノ酸配列

Gly-Gly-Gly-Xaa-Gly-Gly-Gly-Xaa-Gly-Gly-

Gly

を有し、ここで Xaa は、独立して、

Ala, Val, Leu, Ile, Met, Phe, Trp, Pro, Gly, Ser, Thr, Cys, Tyr, Asn, Gln, Lys, Arg,

His, Asp および Glu

(配列番号：343) からなる群より選択される。いくつかの態様において、各 Xaa は、独立して、Ser、Ala、および Thr (配列番号：344) からなる群、特に Ser (配列番号：345) より選択される。

【手続補正 28】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0190

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0190】

さらなる態様において、ペプチドリinker は、グリシン残基およびシステイン残基（例えば、グリシン残基およびシステイン残基のみ）を含む。代表的には、ペプチドリinker あたり1つのみのシステイン残基が含まれる。従って、システイン残基を含む特定のペプチドリinker の1つの例には、アミノ酸配列 Gly_n-Cys-Gly_m を有するペプチドリinker が含まれ、ここで n および m は、それぞれ、1～12 (配列番号：346) の整数（例えば、3～9、4～8、または4～7の整数）である。より詳細には、ペプチドリinker は、アミノ酸配列 GGGGG-C-GGGGG (配列番号：347) を有し得る。

【手続補正 29】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0191

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0191】

このアプローチ（すなわち、非ペプチド部分のための結合基を含むアミノ酸残基の導入）はまた、より強固なプロリン含有リンカーのために使用され得る。従って、ペプチドリinker は、プロリンおよびシステイン残基（例えば、プロリン残基およびシステイン残基のみ）を含み得る。システイン残基を含む特定のプロリン含有ペプチドリinker の1つの例には、アミノ酸配列 Pro_n-Cys-Pro_m を有するペプチドリinker が含まれ、ここで n および m は、それぞれ、1～12 (配列番号：348) の整数、好ましくは、3～9（例えば、4～8、または4～7）の整数である。より詳細には、ペプチドリinker は、アミノ酸配列 PPPPP-C-PPPPP (配列番号：349) を有し得る。

【手続補正 30】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0195

【補正方法】変更

【補正の内容】

【 0 1 9 5 】

インビボのN-グリコシル化部位を含むペプチドリンカーの特定の例は、アミノ酸配列 Gly_n -Asn-Xaa-Ser/Thr-Gly_m (配列番号: 350)、好ましくは Gly_n -Asn-Xaa-Thr-Gly_m (配列番号: 351) を有するペプチドリンカーであり、ここでXaaはプロリン以外の任意のアミノ酸残基であり、かつnおよびmは、それぞれ、1~8の範囲、好ましくは2~5の範囲の整数である。

【 手続補正 3 1 】

【 補正対象書類名 】 明細書

【 補正対象項目名 】 0 1 9 9

【 補正方法 】 変更

【 補正の内容 】

【 0 1 9 9 】

リンカーはネイティブまたは合成のリンカー配列であり得る。例示的なネイティブなリンカーには、例えば、第1のLDL受容体Aドメインの最後のシステインと第2のLDL受容体Aドメインの最初のシステインとの間の配列が含まれ、この配列はリンカー配列として使用され得る。種々のAドメイン連結の解析は、ネイティブなリンカーが、少なくとも3アミノ酸~20アミノ酸より少ない範囲(例えば、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、または18アミノ酸長)にわたることを示す。しかし、当業者は、より長いまたはより短いリンカー配列が使用され得ることを認識する。例示的なAドメインリンカー配列は図8に示される。いくつかの態様において、リンカーは、以下の配列 $A_1A_2A_3A_4A_5A_6$ (配列番号: 352) の6merであり、ここで、 A_1 はアミノ酸A、P、T、Q、E、およびKより選択され； A_2 および A_3 は、C、F、Y、W、またはM以外の任意のアミノ酸であり； A_4 はアミノ酸S、G、およびRより選択され； A_5 はアミノ酸H、P、およびRより選択され；かつ A_6 はアミノ酸Tである。

【 手続補正 3 2 】

【 補正対象書類名 】 明細書

【 補正対象項目名 】 0 3 0 7

【 補正方法 】 変更

【 補正の内容 】

【 0 3 0 7 】

以下のリスト (配列番号: 353~357) は、本実施例で分析した単量体ドメインの配列を提示する。

```
IG156  CLSSEFQCQSSGRCIPLAWVCDGDNDCRDDSDEKSCKPRT
RBCA   CRSSQFQCNDSRICIPGRWRCDGDNDCQDGSDETGCGDSHILPFSTPGPST
RBCB   CPAGEFPCKNGQCLPVTWLCGDVNDCLDGSDEKGCGRPGPGATSAPAA
RBC11  CPPDEFPCKNGQCIPQDWLCGDVNDCLDGSDEKDCGRPGPGATSAPAA
CSA-A8 CGAGQFPCKNGHCLPLNLLCDGVNDCDNSDEPSELCKALT
```

【 手続補正 3 3 】

【 補正対象書類名 】 明細書

【 補正対象項目名 】 0 3 0 9

【 補正方法 】 変更

【 補正の内容 】

【 0 3 0 9 】

疎水性相互作用によって抗6xHis (配列番号: 358) 抗体を96穴プレート (Nunc) に固定化した。各血液試料からの血清の連続希釈物を固定化抗体とともに3時間インキュベートした。プレートを洗浄して非結合タンパク質を除去し、 α -HA-HRPで探索して単量体を検出した。

【 手続補正 3 4 】

【 補正対象書類名 】 明細書

【 0 3 1 7 】

5'-acactgcaatcgcgcccttacggctCCCGGGCGGATCCTcccataagttca
5'-agctaccaaagtgacannknnknnknnknnknnknnknnknnknnkccatacgtcgaattgttca
t
5'-agctaccaaagtgacaaaagggtgcttttggtgatatgttgatactccagatccatacgtcgaattgttca
t
5'-taggaagagaacacgtcatttttnknnknnkattaaacctggttggaacgagacctttgagt
5'-taggaagagaacacgtcattttaataatgatattaacctggttggaacgagacctttgagt
5'-ttggaaatcacccataatgnnknnknnknnknnknnknnknnknnknnkactctaggtacagcaa
5'-ttggaaatcacccataatggatgcaaattatgttatggacgaaactctaggtacagcaa
5'-aagaaggaagtcccatatttttcaatcaagttactgaaatggctcttagagatgtccctt
5'-tgtcactttggtagctcttaacacaactacagtgaacttatgggaGGA
5'-acgtgttctcttcttagaactcggagttgtactgatgaacaattcgcagta
5'-attagggtgattttccaaaacattttcttgattaggatctaataaaactcaaagggtctcggt
5'-atggggacttccttcttttctcccactttcattgaagatacagtaaacgttgctgtacctagagt
5'-gaccgatagcttgccgattgcagtggtGGCCACAGAGGCCTCGAGaacttcaagggaacatctctaaga

【 0 3 2 2 】

【補正の内容】

【 0 3 2 3 】

次いで、PCR断片を、AlwNIで消化し、消化産物を、1.5%アガロースゲルで分離し、C2ドメイン断片をゲルから精製する。続いて、PCR断片を、ストップ断片の存在下でDNAライゲーションによって多量体化する。ストップ断片を以下に列挙する。

ストップ1 (配列番号: 374):

5'-gaattcaacgctactaccattagtagaattgatgccaccttttcagctcgcgcc
ccaaatgaaaaaatgggtcaaactaaatctactcgttcgcagaattgggaatcaactgttaca
tggaatgaaacttccagacaccgtactttatgaatatattatgacgattccgaggcgcgcccg
gactaccgctatgatgttccggattatgccccgggatcctcaggtgctg-3'

(EcoRIとAlwNIとで消化)

ストップ2 (配列番号: 375):

5'-caggtgctgcactcgaggccactgcggccgcataattaacgtagatttttccctccc
aacgtcctgactgggtataatgagccagttctttaaaatcgcataaccagtacatgggtgattaa
agttgaaattaaaccgtctcaagagctttgttacgttgatttggtgaatgaagctt-3'

(EcoRIとHindIIIとで消化)

【 手続補正 3 8 】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 3 2 5

【補正方法】変更

【補正の内容】

【 0 3 2 5 】

多量体を、1%アガロースゲル上で分離し、ストップ1-C2-C2-ストップ2に対応するDNA断片をゲルから精製する。ストップ1-C2-C2-ストップ2断片は、プライマー

5' aattcaacgctactaccat-3' (配列番号: 376) および 5'-

agcttcattaccctcaaatcaac-3' (配列番号: 377)

を使用してPCR増幅し、引き続いてBamHIとXhoIで消化する。任意で多量体をコードするポリヌクレオチドは、アフィニティースクリーニングのさらなるラウンドを行い得る(例えば、上記のFACS解析)。

【 手続補正 3 9 】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 3 2 8

【補正方法】変更

【補正の内容】

【 0 3 2 8 】

単量体性AドメインをコードするDNA配列のライブラリーは、Stemmerら、Gene 164、49-53 (1995)に記載されるように、アセンブリーPCRによって作製される。このPCR反応において使用するオリゴヌクレオチドは：

5'-CACTATGCATGGACTCAGTGTGTCCGATAAGGGCACACGGTGCCTACCCGTATGATGTTCCGGATTATGCC
 CCGGGCAGTA
 5'-CGCCGTCGCATMSCMAGYKCN SAGRAATACAWYGGCCGYTWYYGCACBKAAATTSGYYAGVCNSACAGGTA
 CTGCCCCGGGGCAT
 5'-CGCCGTCGCATMSCMATKCCNSAGRAATACAWYGGCCGYTWYYGCACBKAAATTSGYYAGVCNSACAGGTA
 CTGCCCCGGGGCAT
 5'-ATGCGACGGCGWWRATGATTGTSVAGATGGTAGCGATGAAVWGRRTTGTVMVNMVNMVGCCVTACGGGCT
 CGGCCTCT
 5'-ATGCGACGGCGWCCGGATTGTSVAGATGGTAGCGATGAAVWGRRTTGTVMVNMVNMVGCCVTACGGGCT
 CGGCCTCT
 5'-ATGCGACGGCGWWRATGATTGTSVAGATAACAGCGATGAAVWGRRTTGTVMVNMVNMVGCCVTACGGGCT
 CGGCCTCT
 5'-ATGCGACGGCGWCCGGATTGTSVAGATAACAGCGATGAAVWGRRTTGTVMVNMVNMVGCCVTACGGGCT
 CGGCCTCT
 5'-TCCTGGTAGTACTTATCTACTACTATTTGTCTGTGCTCTGGGTTCTTAACGGTTCGGCCACAGAGGC
 CGAGCCCCTA

である（配列番号：378～385、それぞれ出現順）。

R=A/G, Y=C/T, M=A/C, K=G/T, S=C/G, W=A/T, B=C/G/T, D=A/G/T, H=A/C/T,

V=A/C/G, および N=A/C/G/T

である。

【手続補正 4 0】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 3 3 2

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 3 3 2】

このPCR反応において使用するオリゴヌクレオチドは：

5'-agcctcagcgaccgaa (配列番号: 386)

5'-agcccaataggaacccat (配列番号: 387)

である。

【手続補正 4 1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 3 3 3

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 3 3 3】

PCR断片を、AlwNIおよびBgIIで消化する。消化産物を3%アガロースゲル上で分離し、Aドメイン断片をゲルから精製する。PCR断片を、以下のストップ断片の存在下でDNAライゲーションによって多量体化する。

ストップ1：

ストップ1 (配列番号: 388):

5'-gaattcaacgctactaccattagtagaattgatgccaccttttcagctcgcgcccaaatgaaaaaatggt
 caaactaaatctactcggttcgcagaattgggaatcaactgttacatggaatgaaacttccagacaccgacttta
 tgaatatattatgacgattccgagggcgcgcccggaactaccggtatgatgttcggattatgccccgggcggaatcca
 gtacctg-3'

(EcoRIとAlwNIとで消化)

ストップ2：

ストップ 2 (配列番号: 389):

5'-gccctacgggcctcgaggcacctggtgcgggcgcatattaacgtagatttttcctcccaacgtcctgactg
gtataatgagccagttctttaaatacgcataaccagtagcatggtgattaaagttgaaattaaaccgtctcaagagc
tttggtacgttgatttggttaataagcctt-3'

(BglIII と HindIII とで消化)

【 手続補正 4 2 】

【 補正対象書類名 】 明細書

【 補正対象項目名 】 0 3 3 5

【 補正方法 】 変更

【 補正の内容 】

【 0 3 3 5 】

多量体を、1% アガロースゲル上で分離し、ストップ1-A-A-A-ストップ2に対応するDNA断片をゲルから精製する。ストップ1-A-A-A-ストップ2断片は、引き続いて、プライマー 5'-agcttcattacccaaatcaac-3' (配列番号: 390) および 5' aattcaacgctactacat-3'

(配列番号: 391)

を使用してPCR増幅し、引き続いて、XmaIおよびSfiIで消化する。次いで、選択したポリヌクレオチドをファージ発現系にクローニングし、標的タンパク質についての親和性について試験する。

【 手続補正 4 3 】

【 補正対象書類名 】 明細書

【 補正対象項目名 】 0 3 4 0

【 補正方法 】 変更

【 補正の内容 】

【 0 3 4 0 】

示差的結合を示したクローンを配列決定し(表1)、N末端およびC末端融合したSKVILE (配列番号: 323) ペプチドを有する発現ベクター中にクローニングした。タンパク質を産生し、標準法にしたがって精製した。

【 手続補正 4 4 】

【 補正対象書類名 】 明細書

【 補正対象項目名 】 0 3 4 2

【 補正方法 】 変更

【 補正の内容 】

【 0 3 4 2 】

(表 1) CD20結合配列 (配列番号: 392 ~ 406)

```

2  CLPDEFQCRSTGICIPPLAWRCDGVNDQDDSDDETNCRATGRT
3  CLPGEFRCRGTSICIPPSWVCDGVDDCGDGSDEALEHCGDSHILPFSTPGPST
4  CQPNEFPFGSTGLCVPREWLCDGVDDCQDGSDEPDGCGDSHILPFSTPGPST
5  CLPGEFRCRGTSICIPPSWVCDGVDDCGDGSDEALEHCGDSHILPFSTPGPST
6  CRSGEFKCHGTRPCVPQRWVCDGDDDCVDGSDEKSCETPARR
7  CRSSQFKCHNTRPCIPGRWVCDGVNDCLDGSDEANCRRAARR
8  CLPERFQCAVPGYCIPLPGVCDGVNDQEDSDEPNCRAPGLR
9  CRRNEFRCKSGHCVPQPLVCDGVRDCEDNSDEPSCGRPGPGATSAPAA
10 CRAGEFPCKNGQCLPVTWLC DGVNDC LDGSDEKGCGRPGPGATSAPAA
11 CPSNEFTCKSGHCVPQPFVCDGVPCEDNSDETSCGRPGPGATSAPAA
14 CRASEFPFCRGTGTCIPRHWLC DGENDCADSSDEKDCGRPGPGATSAPAA
15 CPPDEFRCCKSYKRCVPLAFVCDGVDDCEDGSDEEGCGRPGPGATSAPAA
1  CLPDEFQCRSTGICIPPLAWRCDGVNDQDDSDDETNCRATGRT
6  CPAGEFQCGNGQCIPATWLC DGVNDC LDNSDETGCSDPPEFHKV
CC3 CPASQFKCHNTRTCIPRRWVCDGVNDCLDGSDEANCRRAAPT

```

【手続補正 4 5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 3 4 8

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 3 4 8】

陽性のクローンを遺伝子的に融合させて直接ホモ二量体を作製し、12アミノ酸反復Gly-Gly-Serリンカー（配列番号：407）をドメイン間に挿入し、または挿入せずに、標準的な分子生物学技術を使用して、発現ベクター中にクローニングした。タンパク質を産生し、標準技術を使用して精製した。タンパク質を、TF1細胞増殖検定法で天然TP0活性を模倣するその能力に関して検定した（図18）。

【手続補正 4 6】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 3 4 9

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 3 4 9】

（表2）TP0-R結合配列（配列番号：408～411）

```

T4690 (TP01) CHSTGEFRCSRSGICVSPTWVCDGENDCLDGSDEASCTAAGPT
T5 (TP02) CPPSEFRCSNGQCIPREWRCDGDNDCADNSDEESCSAPASEPPGSLSLQ
T2 (TP09) CLPSEFRCSGHCIPRRWRCDGEPDCQDGSDEANCGTSEHTSLQ
T1 (TP010) CQSNEFQCHNYNICLPRPWVCDGVNDCPDGSDEEGCSAPASEPPGSLSLQ

```

【手続補正 4 7】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 3 5 8

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 3 5 8】

（表3）IgE結合単量体配列

IGE-1

CPANEFQCRNSSTCI~~PRRW~~CDGDDDCGDGSD~~ETGCS~~APASEPPGSLSLQ (配列番号：412)

ウォーキングした二量体

1

CPANEFQCRNSSTCI~~PRRW~~CDGDDDCGDGSD~~ETGCS~~APASEPPGSLCQPDQFRCSSGRCLSREWLCDGEDDCEDDSDETD~~CPTR~~TSLQ (配列番号：413)

2

CPANEFQCRNSSTCI~~PRRW~~CDGDDDCGDGSD~~ETGCS~~APASEPPGSLCLPSQFP~~CDSGNCLPLTW~~LDGVDDCGD~~NSDEEDCS~~APASEPPGSLSLQ (配列番号：414)

3

CPANEFQCRNSSTCI~~PRRW~~CDGDDDCGDGSD~~ETGCS~~APASEPPGSLCRANQFPCDNGNCLPQ~~PWR~~CDGDNDCVDGSD~~ETSCEA~~PAHTSLQ (配列番号：415)

4

CPANEFQCRNSSTCI~~PRRW~~CDGDDDCGDGSD~~ETGCS~~APASEPPGSLCAPNEFQCRD~~NNTCLPEDWRC~~DGEDDCAD~~NSDEANCTT~~PGPTSLQ (配列番号：416)

5

CPANEFQCRNSSTCI~~PRRW~~CDGEDDCEDGSDE~~ASDTCS~~APASEPPGSLCPANEFQCRNSSTCI~~PRRW~~CDGDDDCGDGSD~~ETGCS~~APASEPPGSLSLQ (配列番号：417)

6

CGSGQFPCSGHCVPLNWVCDGVDDCGD~~SD~~ETDCKAHTCPANEFQCRNSSTCI~~PRRW~~CDGDDDCGDGSD~~ETGCS~~APASEPPGSLSLQ (配列番号：418)

7

CPANEFQCRNSSTCI~~PRRW~~CDGDDDCGDGSD~~ETGCS~~APASEPPGSL

CGADQFPCSSGHCIPLPWVCDGEDDCADGSDEADCRGTEPTSLQ (配列番号：419)

8

CPANEFQCRNSSTCI~~PRRW~~CDGDDDCGDGSD~~ETGCS~~APASEPPGSLCAPSQFRCGNGRCIPRSWRCDEDDCADD~~SDEENC~~SAPASEPPGSLSLQ (配列番号：420)

9

RVWRRLVGS

CRPNQFTCKSSETCIPAHWRCDGDDDCGDGSDEADCETRT

CPANEFQCRNSSTCIPRRWLCDDDDCGDGSDETGCAPASEPPGSL SLQ (配列番号: 421)

10

CPANEFQCRNSSTCIPRRWLCDDDDCGDGSDETGCAPASEPPGSL

CQSSQFPCHDYEICLPATLLCDGVDDCLDGSDETNC AKPTSLQ (配列番号: 422)

12

CPANEFQCRNSSTCIPRRWLCDDDDCGDGSDEPGCSAPASEPPGSL

CPPGEFPCNGRSVPLTWLCDDDDCGDGSDETGCETTGR TSLQ (配列番号: 423)

13 (27)

CGSNQFPCEGNVCVPLGWGCDGVNDCQDNSDESLATCGRPGPGATSAPAA

CPANEFQCRNSSTCIPRRWLCDDDDCGDGSDETGCAPASEPPGSL SLQ (配列番号: 424)

14

CPSGQFPDNGHCIPRRWLCDDDDCGDGSDEAQVCQRT

CPANEFQCRNSSTCIPRRWLCDDDDCGDGSDETGCAPASEPPGSL SLQ (配列番号: 425)

15

CPANEFQCRNSSTCIPRRWLCDDDDCGDGSDETGCAPASEPPGSL SLQ

ALLCDGVDDCDRGSDESALCEEHT

CPANEFQCRNSSTCIPRRWLCDDDDCGDGSDETGCAPASEPPGSL SLQ (配列番号: 426)

16

CPANEFQCRNSSTCIPRRWLCDDDDCGDGSDEPGCSAPASEPPGSL

CRRAEFTCRNGSCLPVPWLCDAENDCPDGSDEPD CGSPARRSLQ (配列番号: 427)

19

CPANEFQCRNSSTCIPRRWLCDDDDCGDGSDEPGCSAPASEPPGSL

CPPDQFRCKNGRCIPRHLVCDGDDDCGDDSD EAGCQTRTSLQ (配列番号: 428)

21

CPANEFQCRNSSTCIPRRWLCDDDDCGDGSDETGCAPASEPPGSL

CEPGQFQCNNNDTCVSPFWLCDA RDCGRSDERPPHCATPELTSLQ (配列番号: 429)

23

CPAQQFRCENGRC LPPPWRCDGVNDCEDNSDEAGCGDSHILPFSTPGPST

CPANEFQCRNSSTCIPRRWLCDDDDCGDGSDETGCAPASEPPGSL SLQ (配列番号: 430)

25

CPANEFQCRNSSTCIPRRWLCDDDDCGDGSDEPGCSAPASEPPGSL

CLSSQFRCENGQC IPLTWGCDGDDDCQDGSDETNCPTRTSLQ (配列番号: 431)

26

CPANEFQCRNSSTCIPRRWLCDDDDCGDGSDETGCSPVPT

CPANEFQCRNSSTCIPRRWLCDDDDCGDGSDETGCAPASEPPGSL SLQ (配列番号: 432)

27 (13)

CGSNQFPCEGNVCVPLGWGCDGVNDCQDNSDESLATCGRPGPGATSAPAA

CPANEFQCRNSSTCIPRRWLCDDDDCGDGSDETGCAPASEPPGSL SLQ (配列番号: 424)

30

CPANEFQCRNSSTCIPRRWLCDDDDCGDGSDEPGCSAPASEPPGSL

CAASQFRCMNSRCLPPPLGCDGVDDCGDNSDEADCGRPGPGATSAPAA SLQ (配列番号: 433)

31

CPANEFQCRNSSTCIPRRWLCDDDDCGDGSDETGCAPASEPPGSL

CPANEFQCRNSSTCIPRRWLCDDDDCGDGSDETGCAPASEPPGSL SLQ (配列番号: 434)

【 手続補正 4 8 】

【 補正対象書類名 】 明細書

【 補正対象項目名 】 0 3 6 0

【 補正方法 】 変更

【 補正の内容 】

【 0 3 6 0 】

Stemmerら、Gene 164:49-53(1995)で記載されているアセンブリーPCRによって単量体AドメインをコードするDNA配列のライブラリーを作製した。このPCR反応で使用したオリゴヌクレオチドは以下である (配列番号: 435 ~ 465)。

5' -ATTCTCACTCGGCCGACGGTGCCTACCCGT-3'
 5' -ACGGTGCCTACCCGTATGATGTTCCGGATTATGCCCCGGGTCTGGAGGCGTCTGGTGGTTTCGTGT-3'
 5' -CGCCGTCGCAAMSCMASBBBCNSTGRAABGCATNTKYYGKWAYYSYKGCATYYAAATTBGBYGRDAGVKTACACGAACC
 ACCAGA-3'
 5' -CGCCGTCGCAAMSCMASBBBCNSTGRAABGCAKYKCCGYTKYYGCATYYAAATTBGBYGRDAGVKTACACGAACCACCAGA-3'
 5' -CGCCGTCGCAAMSCMASBBBCNSTGRAABGCATNTKYYGKWAYYSYKGCACBKGAAC TSGYYCGVCNSACA
 CGAACCCACCAGA-3'
 5' -CGCCGTCGCAAMSCMASBBBCNSTGRAABGCAKYKCCGYTKYYGCACBKGAAC TSGYYCGVCNSACACGAACCACCAGA-3'
 5' -TTGCGACGGCGWWRATGATTGTSNGGACRRCTCGGATGAA-3'
 5' -TTGCGACGGCGWWRATGATTGTSNGGACGGCTCGGATGAA-3'
 5' -TTGCGACGGCGWWRATGATTGTSRGGACRRCTCGGATGAA-3'
 5' -TTGCGACGGCGWCCGGATTGTSNGGACRRCTCGGATGAA-3'
 5' -TTGCGACGGCGWCCGGATTGTSNGGACGGCTCGGATGAA-3'
 5' -TTGCGACGGCGWCCGGATTGTSRGGACRRCTCGGATGAA-3'
 5' -AGGCCTGCAATGACGTABGCKBTKBACAGYTKYTTTCATCCGAGYYGTCC-3'
 5' -AGGCCTGCAATGACGTABGTNCGGNSSYTBACAGYTKYTTTCATCCGAGYYGTCC-3'
 5' -AGGCCTGCAATGACACTTTGTGAAATTCGGATCCTGGCTACAGYTKYTTTCATCCGAGYYGTCC-3'
 5' -AGGCCTGCAATGACAGGAAACCCGGCGGTTTCAGATGCTGGCGCGCTACAGYTKYTTTCATCCGAGYYGTCC-3'
 5' -AGGCCTGCAATGACGTGCGCGGTGCGAAGTCCGACCTGGGCCCGGACGACCACAGYTKYTTTCATCCGAGYYGTCC-3'
 5' -AGGCCTGCAATGACGTGCTCGGACCTGGGGTGCTAAACGGCAGAATATGAGAATCACCACAGYTKYTTTCATCCGAGYYGTCC-3'
 5' -AGGCCTGCAATGACGTABGCKBTKBACAMWSCKSCGVTTTCATCCGAGCCGTCC-3'
 5' -AGGCCTGCAATGACACTTTGTGAAATTCGGATCCTGGCTACAMWSCKSCGVTTTCATCCGAGCCGTCC-3'
 5' -AGGCCTGCAATGACAGGAAACCCGGCGGTTTCAGATGCTGGCGCGCTACAMWSCKSCGVTTTCATCCGAGCCGTCC-3'
 5' -AGGCCTGCAATGACGTGCGCGGTGCGAAGTCCGACCTGGGCCCGGACGACCACAMWSCKSCGVTTTCATCCGAGCCGTCC-3'
 5' -AGGCCTGCAATGACGTGCTCGGACCTGGGGTGCTAAACGGCAGAATATGAGAATCACCACAMWSCKSCGVTTTCATCCGAGC
 CGTCC-3'
 5' -AGGCCTGCAATGACGTABGCKBTKBACAGDKWCCRRCGVTTTCATCCGAGYYGTCC-3'
 5' -AGGCCTGCAATGACGTABGTNCGGNSSYTBACAGDKWCCRRCGVTTTCATCCGAGYYGTCC-3'
 5' -AGGCCTGCAATGACACTTTGTGAAATTCGGATCCTGGCTACAGDKWCCRRCGVTTTCATCCGAGYYGTCC-3'
 5' -AGGCCTGCAATGACAGGAAACCCGGCGGTTTCAGATGCTGGCGCGCTACAGDKWCCRRCGVTTTCATCCGAGYYGTCC-3'
 5' -AGGCCTGCAATGACGTGCGCGGTGCGAAGTCCGACCTGGGCCCGGACGACCACAGDKWCCRRCGVTTTCATCCGAGYYGTCC-3'
 5' -AGGCCTGCAATGACGTGCTCGGACCTGGGGTGCTAAACGGCAGAATATGAGAATCACCACAGDKWCCRRCGVTTTCATCCGAGY
 TCC-3'
 5' -TGAATTTTCTGTATGAGGTTTTGTCTAAACAAC TTTCAACAGTTTCGGCCCCAGAGGCTGCAATGAC-3'
 (R=A/G, Y=C/T, M=A/C, K=G/T, S=C/G, W=A/T, B=C/G/T, D=A/G/T, H=A/C/T, V=A/C/G, および
 N=A/C/G/T)

【手続補正 4 9】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 3 6 3

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 3 6 3】

最終溶出液からのファージを、精製することなく直接、AドメインコードDNA配列をPCR増幅するための鋳型として使用した。このPCR反応で使用したオリゴヌクレオチドは以下である。

5' -aagcctcagcgaccgaa (配列番号: 466)

5' -agcccaataggaacccat (配列番号: 467)

【手続補正 5 0】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 3 6 8

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 3 6 8】

個々のファージクローンのそれらの標的タンパク質への結合をELISAによって分析した。最高のELISAシグナルを発したクローンを配列決定し、その後、タンパク質発現ベクター中に再クローニングした。例示的な配列を以下に提示する (配列番号: 468 ~ 475)。

>CD28-A1
CGPGRFQCESGQCIPATWVCDGENDCVDDSDKSCATTAPTCLPDQFQCHDYRRCIPLGWVCDGVPDCVDNSDEA
NCEPPT

>CD28-A2
CGPGRFQCESGQCIPATWVCDGENDCVDDSDKSCATTAPTCPDQFTCN SGRCVPLNWLCDGVND CADSSDEPP
ECQPRT

>CD28-A10
CGPGRFQCESGQCV PATWVCDGDDDCADGSDEKSCATTAPTCE SNQFQCGSGQCLPGTWRC DGVNDCADSSDET G
CGRPGPGATSAP AACGPGRFQC NNNGNCVPQTLGCDGDND CGDSSDEANCSAPASEPPGSL

>CD28-A4
CGPGRFQCESGQCIPATWVCDGENDCVDDSDKSCATTAPTCPANQFQCGNGRCIPPAWLCDGVND CGDGSDESQ
LCAATGPT

>CD28-A5
CGPGRFQCESGQCIPATWVCDGENDCVDDSDKSCATTAPTCLPNEFRCSNGQCIPPNWRC DGVD DCRDGSDEAG
CSQDPEFHKV

>CD28-A7
CGPGRFQCESGQCIPATWVCDGENDCVDDSDKSCATTAPT C GSGQFRCSNGNCLPLRLGCDGVDD CGDSSDEPL
DPCAATVRT

>CD28-A17
CGPGRFQCESGQCIPATWVCDGENDCVDDSDKSCATTAPT C P S G Q F K C N S G R C V P P N W L C D G V N D C P D N S D E A N
CPPRT

>CD28-A19
CGPGRFQCESGQCIPATWVCDGENDCVDDSDKSCATTAPT C Q A D E F Q C S S G K C L P V N W V C D G D N D C G D D S D E T
NCATTGRT

【 手続補正 5 1 】

【 補正対象書類名 】 明細書

【 補正対象項目名 】 0 3 7 6

【 補正方法 】 変更

【 補正の内容 】

【 0 3 7 6 】

Stemmerら、Gene 164:49-53(1995)に記載されているアセンブリーPCRによって単量体A
ドメインをコードするDNA配列のライブラリーを作製した。このPCR反応で使用したオリゴ
ヌクレオチドは以下である (配列番号 : 476 ~ 506) 。

5'-ATTCTCACTCGGCCGACGGTGCCTACCCGT-3'
 5'-ACGGTGCCCTACCCGTATGATGTTCCGGATTATGCCCCGGGTCTGGAGGCGTCTGGTGGTTCGTGT-3'
 5'-CGCCGTCGCAAMSCMASBBCNSTGRAABGCATNTKYYGKWAYYSYKGCATYYAAATTBGBYGRDAGVKTACACGAAC
 ACCAGA-3'
 5'-CGCCGTCGCAAMSCMASBBCNSTGRAABGCAKYKCCGYTKYYGCATYYAAATTBGBYGRDAGVKTACACGAACCAACCAGA-3'
 5'-CGCCGTCGCAAMSCMASBBCNSTGRAABGCATNTKYYGKWAYYSYKGCACBKGAACCTSGYYCGVCNSACA
 CGAACCACCAGA-3'
 5'-CGCCGTCGCAAMSCMASBBCNSTGRAABGCAKYKCCGYTKYYGCACBKGAACCTSGYYCGVCNSACACGAACCACCAGA-3'
 5'-TTGCGACGGCGWRATGATTGTSNGGACRRCTCGGATGAA-3'
 5'-TTGCGACGGCGWRATGATTGTSNGGACGGCTCGGATGAA-3'
 5'-TTGCGACGGCGWRATGATTGTSRGGACRRCTCGGATGAA-3'
 5'-TTGCGACGGCGWCCGGATTGTSNGGACRRCTCGGATGAA-3'
 5'-TTGCGACGGCGWCCGGATTGTSNGGACGGCTCGGATGAA-3'
 5'-TTGCGACGGCGWCCGGATTGTSRGGACRRCTCGGATGAA-3'
 5'-AGGCCTGCAATGACGTABGCKBTBACAGYYTKYTTTCATCCGAGYYGTCC-3'
 5'-AGGCCTGCAATGACGTABGTNCGNNSYTBACAGYYTKYTTTCATCCGAGYYGTCC-3'
 5'-AGGCCTGCAATGACACTTTGTGAAATTCGGATCCTGGCTACAGYYTKYTTTCATCCGAGYYGTCC-3'
 5'-AGGCCTGCAATGACAGGGAACCGCGGTTTCAGATGCTGGCGCGCTACAGYYTKYTTTCATCCGAGYYGTCC-3'
 5'-AGGCCTGCAATGACGTGCTCGGACCTGGGGTCTAAACGGCAGAAATAGAGAATCACCACAGYYTKYTTTCATCCGAGYYGTCC-3'
 5'-AGGCCTGCAATGACGTABGCKBTBACAMWSCKSCGVTTTCATCCGAGCCGTCC-3'
 5'-AGGCCTGCAATGACGTABGTNCGNNSYTBACAMWSCKSCGVTTTCATCCGAGCCGTCC-3'
 5'-AGGCCTGCAATGACACTTTGTGAAATTCGGATCCTGGCTACAMWSCKSCGVTTTCATCCGAGCCGTCC-3'
 5'-AGGCCTGCAATGACAGGGAACCGCGGTTTCAGATGCTGGCGCGCTACAMWSCKSCGVTTTCATCCGAGCCGTCC-3'
 5'-AGGCCTGCAATGACGTGCTCGGACCTGGGGTCTAAACGGCAGAAATAGAGAATCACCACAMWSCKSCGVTTTCATCCGAGC
 CGTCC-3'
 5'-AGGCCTGCAATGACGTABGCKBTBACAGDKWKCCRRCGVTTTCATCCGAGYYGTCC-3'
 5'-AGGCCTGCAATGACGTABGTNCGNNSYTBACAGDKWKCCRRCGVTTTCATCCGAGYYGTCC-3'
 5'-AGGCCTGCAATGACACTTTGTGAAATTCGGATCCTGGCTACAGDKWKCCRRCGVTTTCATCCGAGYYGTCC-3'
 5'-AGGCCTGCAATGACAGGGAACCGCGGTTTCAGATGCTGGCGCGCTACAGDKWKCCRRCGVTTTCATCCGAGYYGTCC-3'
 5'-AGGCCTGCAATGACGTGCTCGGACCTGGGGTCTAAACGGCAGAAATAGAGAATCACCACAGDKWKCCRRCGVTTTCATCCGAGYYG
 TCC-3'
 5'-TGAATTTCTGTATGAGGTTTTGCTAAACAATTTCAACAGTTTCGGCCCCAGAGGCCTGCAATGAC-3'
 (R=A/G, Y=C/T, M=A/C, K=G/T, S=C/G, W=A/T, B=C/G/T, D=A/G/T, H=A/C/T, V=A/C/G, および
 N=A/C/G/T)

【手続補正 5 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 3 7 9

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 3 7 9】

最終溶出液からのファージを、精製することなく直接、AドメインコードDNA配列をPCR増幅するための鋳型として使用した。このPCR反応で使用したオリゴヌクレオチドは以下である。

5'-aagcctcagcgaccgaa (配列番号: 466)

5'-agcccaataggaacccat (配列番号: 467)

【手続補正 5 3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 3 8 2

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 3 8 2】

CD28に関して上記した同じ方法によってクローンを同定した。同定されたクローンは以下を含むものであった (配列番号: 507~511)。

>IL6#4
 CLSSQFQCKNGQCIPQTWVCDGDNDCEDDSDETGCGDSHILPFSTPGPSTCPPSQFTCRSTNTCIPAPWRCGDG
 DDCEDDSDEEGCSAPASEPPGSL

>IL6#7
 CLSSQFQCKNGQCIPQTWVCDGDNDCEDDSDETGCGDSHILPFSTPGPSTCRSNEFQCRSSGICIPRTWVCDGD
 DDCLDNSDEKCAART

>IL6#9
 CRSDQFQCGSGHCIPQDWVCDGENDCEDGSDDETDCSAPASEPPGSLCLSSQFQCKNGQCIPQTWVCDGDNDCE
 DSDETGCGDSHILPFSTPGPST

>IL6#P8
 CRSDQFQCGSGHCIPQDWVCDGENDCEDGSDDETDCSAPASEPPGSLCRSNEFQCRSSGICIPRTWVCDGDDCL
 DNSDEKCAART

>IL6#N7
 CPPSQFTCRSTNTCIPAPWRCGDGDDCEDDSDEADCGDSHILPFSTPGPSTCLSSQFQCKNGQCIPQTWVCDGD
 NDCEDDSDETGCGDSHILPFSTPGPST

【 手 続 補 正 5 4 】

【 補 正 対 象 書 類 名 】 明 細 書

【 補 正 対 象 項 目 名 】 0 3 8 9

【 補 正 方 法 】 変 更

【 補 正 の 内 容 】

【 0 3 8 9 】

【 図 1 】 LDL受容体ファミリーのメンバーにおいて見い出される単量体ドメインの型、数、および順番を図示する。これらの単量体ドメインには、βプロペラドメイン、EGF様ドメイン、およびLDL受容体クラスAドメインが含まれる。示されたメンバーは、低密度リポタンパク質受容体（LDLR）、ApoE受容体2（ApoER2）、極低密度リポタンパク質受容体（VLDLR）、LDLR関連タンパク質2（LRP2）、およびLDLR関連タンパク質1（LRP1）が含まれる。

【 図 2 】 種々のLDL受容体クラスAドメイン（配列番号：103、配列番号：100、配列番号：65、配列番号：117、配列番号：128、配列番号：21、配列番号：29、配列番号：39、配列番号：30、配列番号：77、配列番号：58、配列番号：50、および配列番号：14、それぞれ出現順）からの部分アミノ酸配列のアライメントを、保存性システインを例証するために図示する。コンセンサス = 配列番号：324。

【 図 3 】 図3パネルAは、Aドメインの例を図解的に示す。パネルAは、約40アミノ酸長のAドメイン中の保存性アミノ酸（配列番号：325）を図示する。保存性システイン残基をCによって示し、負に荷電したアミノ酸を、マイナス（「-」）と記した円の記号で示す。「H」と記した円は、疎水性残基を示す。パネルBは、リンカーを介して連結した2つの折り畳まれたAドメインを図示する。パネルBはまた、2つのカルシウム結合部位（Ca²⁺と記した黒い円）および、全部で6つのジスルフィド結合について、各々折り畳まれたAドメイン中の3つのジスルフィド結合を示す。

【 図 4 】 LDL受容体ファミリーによって認識されたりガンドのいくつか（阻害剤、プロテアーゼ、プロテアーゼ複合体、ビタミン担体複合体、リポタンパク質代謝に関与するタンパク質、非ヒトリガンド、抗生物質、ウイルス、およびその他）を示す。

【 図 5 】 リガンドに結合する単量体ドメインを同定すること、選択された単量体ドメインを単離すること、種々の組み合わせの選択された単量体ドメインを連結することによって選択された単量体ドメインの多量体を作製すること、およびその多量体をスクリーニングして、リガンドに結合する1つより多い単量体含む多量体を同定することについての一般的なスキームを図解的に示す。

【 図 6 】 別の選択戦略の図解的な表示である（導かれた選択）。適切な結合特性を有する単量体ドメインは、単量体ドメインのライブラリーから同定される。次いで、同定された単量体ドメインは、単量体ドメインの別のライブラリー由来の単量体ドメインに連

結され、多量体のライブラリーを形成する。多量体ライブラリーは、標的に同時に結合する一対の単量体ドメインを同定するためにスクリーニングされる。次いで、このプロセスは、最適な結合プロセスが多量体中で得られるまで反復され得る。

【図 7】単量体ドメインの多量体化プロセスを示す。標的-結合単量体のヒットは、ベクターから増幅される。次いで、標的-結合単量体ドメインおよび/または免疫ドメインのこの混合物は、切断され、リンカーの最適な組み合わせおよびストッパーオリゴヌクレオチドと混合される。次いで、生成した多量体は、標的-結合多量体の同定のための第2の選択工程のための適切なベクターにクローニングされる。

【図 8】Aドメインの各部位における共通のアミノ酸（配列番号：326）を示す。アミノ酸の位置の上のパーセンテージは、示されたシステイン間の間隔を有する天然に存在するAドメインのパーセンテージをいう。各アミノ酸の位置の下に太字で示した潜在的なアミノ酸残基は、その位置における共通の残基を示す。明るい色の円で示した、最終的な6つのアミノ酸は、リンカー配列を表す。リンカーの2位および3位のイタリックで示したアミノ酸残基の2つのカラムは、その位置には存在しないアミノ酸残基を表す。他の任意のアミノ酸（例えば、A、D、E、G、H、I、K、L、N、P、Q、R、S、T、およびV）はこれらの位置に含まれ得る。

【図 9】以下のシステイン間の間隔：CX₆CX₄CX₆CX₅CX₈Cを有するAドメインについて、天然に存在するAドメインにおけるアミノ酸残基の出現の頻度を示す（配列番号：327）。

【図 10】Aドメインのアライメントを示す（配列番号：1～217）。図の一番上および一番下で、小文字（a-q）は保存性残基を示す。

【図 11】免疫ドメインを含む可能な多量体の高次構造を示す。図11Aは、ミニボディーの多量体を図示する。図11Bは、単鎖ドメイン抗体の多量体を図示する。図11Cは、scfvの免疫ドメイン多量体を図示する。図11Dは、Fab断片の多量体を図示する。

【図 12】部分的リンカーを介したドメインの連結を示す。

【図 13】例示的な多量体環形成を図示する。

【図 14】Fvsの重鎖および軽鎖の種々の多量体の高次構造を図示する。

【図 15】二つの異なる選択されたクローン（配列番号：328および329）とデータベースからの既知のヒト配列との間の配列同一性の領域のグラフ表示である。横棒が、選択されたクローンの配列とヒト配列との間の配列同一性の領域を示し、数字が、同一性領域を画定する正確なアミノ酸番号を示す。縦の矢印が許容しうる交叉配列を示す。

【図 16】CD20特異的Aドメイン単量体（SKVILF = 配列番号：323）によって誘発された細胞死滅を示す。

【図 17】組換えTP0-R abd TF1細胞へのAドメイン単量体発現性ファージの結合を示す。

【図 18】TP0-R特異的Aドメイン単量体および多量体に応答するTF1細胞増殖を示す。

【図 19】（a）プレートに直接固定化されたIgE、または（b）IgEのCE2ドメインに固定化された抗体に結合することによってプレートに固定化されたIgE、または（c）IgEのCE3ドメインに固定化された抗体に結合することによってプレートに固定化されたIgE、または（d）固定化されたIgE受容体R1に結合することによって固定化されたIgEに結合するIgE特異的Aドメイン単量体および多量体発現性ファージを示す。

【図 20】CD28に結合する選択されたAドメイン単量体のELISA結合データを示す。

【図 21】可溶性IL6受容体と単量体Mb9とが固定化IL6に対して競合する競合ELISA実験の結果を示す。

【図 22】IL6特異的単量体による細胞増殖阻害を示す。

【図 23】単離された末梢血リンパ球（PBMC）に対するIL6特異的単量体の影響を示す。

【図 24】細胞上に表示された多数のリガンドに対する単量体ドメインのライブラリーのスクリーニングを示す。

【図 25】複数のリガンドの1つに結合するように選択された単量体の同定を示す。

【図 26】リガンドおよび単量体ドメインをコードするポリヌクレオチドを同定する態様を示す。

【図 27】結合活性の増大のための単量体ドメインおよび多量体態様を示す。この図は特

定の遺伝子産物および結合親和性を示すが、これらは単なる例に過ぎず、他の結合標的を同じまたは類似した構造で使用することもできることが理解される。

【図28】結合活性の増大のための単量体ドメインおよび多量体態様を示す。この図は特定の遺伝子産物および結合親和性を示すが、これらは単なる例に過ぎず、他の結合標的を同じまたは類似した構造で使用することもできることが理解される。

【手続補正書】

【提出日】平成18年3月20日(2006.3.20)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

【補正方法】追加

【補正の内容】

【配列表】

2007524341000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成18年10月27日(2006.10.27)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

(i) IgGタンパク質に結合する半減期延長ドメイン；および

(ii) 対象のタンパク質に結合する二次ドメイン；

を含むポリペプチドであって、

ここで、半減期延長ドメインおよび二次ドメインが、EGF様ドメイン、クリングル(Kringle)ドメイン、I型フィブロネクチンドメイン、II型フィブロネクチンドメイン、III型フィブロネクチンドメイン、PANDドメイン、Glaドメイン、SRCRドメイン、クニッツ(Kunitz)/ウシ膵臓トリプシンインヒビタードメイン、カザル(Kazal)型セリンプロテアーゼインヒビタードメイン、トレフォイル(Trefoil)(P型)ドメイン、C型フォンウィルブランド(von Willebrand)因子ドメイン、アナフィラトキシン様ドメイン、CUBドメイン、I型サイログロブリン反復、LDL受容体クラスAドメイン、スシ(Sushi)ドメイン、リンク(Link)ドメイン、I型トロンプスポンジンドメイン、免疫グロブリン様ドメイン、C型レクチンドメイン、MAMドメイン、A型フォンウィルブランド因子ドメイン、ソマトメジンBドメイン、WAP型4ジスルフィドコアドメイン、C型F5/8ドメイン、ヘモペキシンドメイン、SH2ドメイン、SH3ドメイン、ラミニン型EGF様ドメイン、およびC2ドメインからなる群より選択される、ポリペプチド。

【請求項2】

半減期延長ドメインおよび二次ドメインが、LDL受容体クラスAドメインである、請求項1記載のポリペプチド。

【請求項3】

半減期延長ドメインおよび二次ドメインが、それぞれ30～60アミノ酸長である、請求項1記載のポリペプチド。

【請求項4】

動物における対象タンパク質の半減期を延長するための薬剤を製造するための、請求項1記載のポリペプチドの使用。

【請求項5】

半減期延長ドメインおよび二次ドメインが、LDL受容体クラスAドメインである、請求項4記載の使用。

【請求項6】

半減期延長ドメインおよび二次ドメインが、それぞれ30～60アミノ酸長である、請求項4記載の使用。

フロントページの続き

(51)Int.Cl.

F I

テーマコード(参考)

G 0 1 N 33/53 (2006.01)

G 0 1 N 33/53

D

G 0 1 N 37/00 (2006.01)

G 0 1 N 37/00

1 0 2

(81)指定国

AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

Fターム(参考) 4B024 AA11 BA61 BA63 CA01 DA12 DA20 EA03 GA11 GA27 HA08

HA11

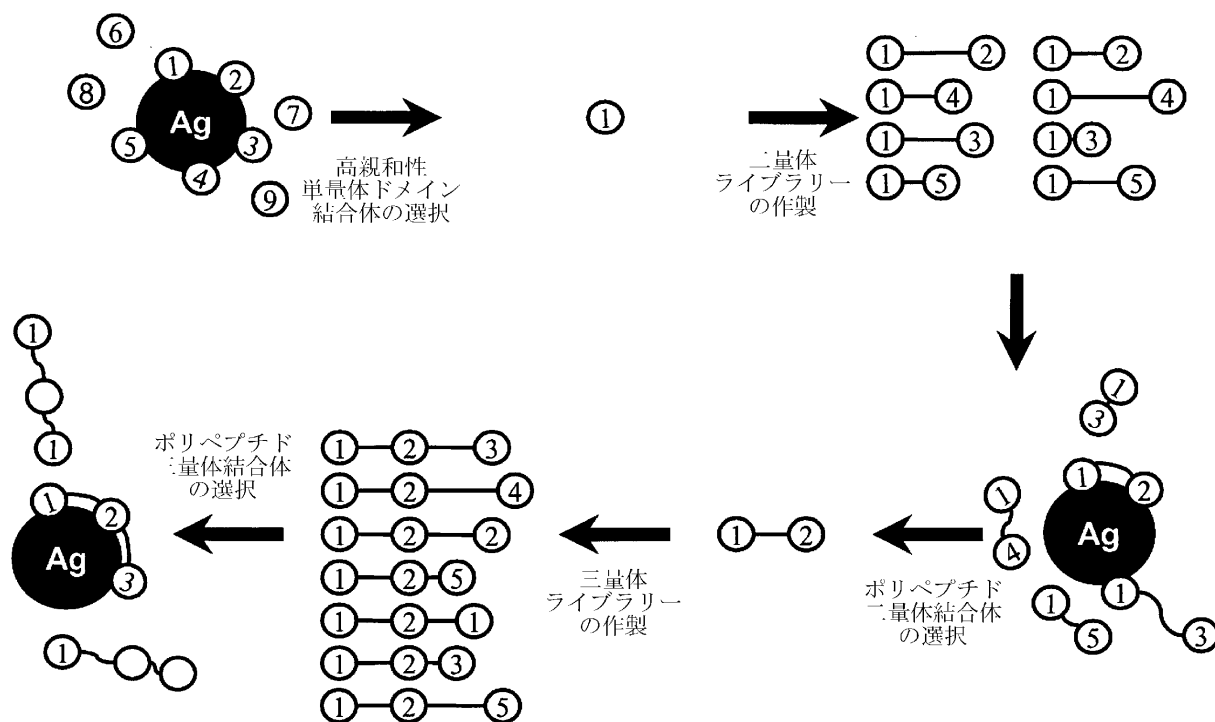
4B063 QA01 QA18 QQ07 QQ08 QQ10 QQ13 QQ42 QQ52 QQ79 QR08

QR32 QR48 QR50 QR59 QR77 QR79 QR80 QS25 QS28 QS32

QS34 QS36 QS39 QX01

4H045 AA10 AA30 BA09 BA41 CA40 DA50 DA75 EA20 EA50 FA74

【要約の続き】



专利名称(译)	单体结构域的组合文库		
公开(公告)号	JP2007524341A	公开(公告)日	2007-08-30
申请号	JP2004551939	申请日	2003-11-06
[标]申请(专利权)人(译)	阿比丁一公司		
申请(专利权)人(译)	Abidia公司		
[标]发明人	コルクマンヨーストエイ スティマーウィレムピーシー		
发明人	コルクマン ヨースト エイ. スティマー ウィレム ピー. シー.		
IPC分类号	C12N15/09 C07K14/705 C12Q1/02 C12Q1/68 C12Q1/70 G01N33/53 G01N37/00 A61K47/42 A61K47/48 C07B61/00 C07K1/04 C08F C08F2/00 C40B30/04 C40B40/10 G01N33/543 G01N33/68		
CPC分类号	C40B30/04 A61K47/62 B01J2219/00659 B01J2219/00702 B01J2219/00725 C07K1/047 C40B40/10 G01N33/6845		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C07K14/705 C12Q1/02 C12Q1/68.A C12Q1/70 G01N33/53.D G01N37/00.102		
F-TERM分类号	4B024/AA11 4B024/BA61 4B024/BA63 4B024/CA01 4B024/DA12 4B024/DA20 4B024/EA03 4B024/GA11 4B024/GA27 4B024/HA08 4B024/HA11 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QQ07 4B063/QQ08 4B063/QQ10 4B063/QQ13 4B063/QQ42 4B063/QQ52 4B063/QQ79 4B063/QR08 4B063/QR32 4B063/QR48 4B063/QR50 4B063/QR59 4B063/QR77 4B063/QR79 4B063/QR80 4B063/QS25 4B063/QS28 4B063/QS32 4B063/QS34 4B063/QS36 4B063/QS39 4B063/QX01 4H045/AA10 4H045/AA30 4H045/BA09 4H045/BA41 4H045/CA40 4H045/DA50 4H045/DA75 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA74		
代理人(译)	清水初衷		
优先权	10/289660 2002-11-06 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

提供了鉴定具有所需特性的离散单体结构域和免疫结构域的方法。还提供了由两种或更多种选择的离散单体结构域产生多聚体的方法，以及鉴定具有所需性质的多聚体的方法。还提供了呈递系统，其呈递离散的单体和/或免疫结构域，选择的单体和/或免疫结构域，多聚体和/或选择的多聚体以允许它们的选择。表达一个或多个文库成员的组合物，文库和细胞，以及试剂盒和整合系统也包括在本发明中。

