

(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2016-524592
(P2016-524592A)

(43) 公表日 平成28年8月18日(2016.8.18)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C07K 16/28 (2006.01)	C07K 16/28 ZNA	4B024
C12N 15/09 (2006.01)	C12N 15/00 A	4B064
C12N 1/15 (2006.01)	C12N 1/15	4B065
C12N 1/19 (2006.01)	C12N 1/19	4C084
C12N 1/21 (2006.01)	C12N 1/21	4H045
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求		(全 65 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2016-509455 (P2016-509455)
 (86) (22) 出願日 平成26年4月23日 (2014.4.23)
 (85) 翻訳文提出日 平成27年12月21日 (2015.12.21)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2014/058276
 (87) 国際公開番号 WO2014/173975
 (87) 国際公開日 平成26年10月30日 (2014.10.30)
 (31) 優先権主張番号 61/815,043
 (32) 優先日 平成25年4月23日 (2013.4.23)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 515295061
 ザ ユニバーシティ コート オブ ザ
 ユニバーシティ オブ アバディーン
 英国, エービー24 3エフエックス ア
 バディーン, キングス カレッジ, ユニバ
 ーシティ オフィス
 (74) 代理人 110000671
 八田国際特許業務法人
 (72) 発明者 バレル, キャロライン ジェーン
 英国, エービー25 2ゼットピー アバ
 ディーン, フォレスターヒル, リバティ
 ビルディング, ユニバーシティ オブ ア
 バディーン

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ICOSLへの治療上の標的特定のVNARドメインの単離

(57) 【要約】

本発明は、免疫化および合成の板鰐亜綱由来ライブラリから単離されたICOSL特異的抗原結合分子を提供する。特に、本発明は、特異的に結合し、ヒト誘発副刺激リガンド (ICOSL) の活性を中和するサメ可変新規抗原レセプター (VNAR) ドメインに関する。中和VNARドメインは、2つの独立したソースから単離される；免疫化テングクザメライブラリおよび合成アブラツノザメフレームワーク融合ライブラリ。分子は、薬剤組成物として製剤化することができ、医薬において用いることができる。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

式 (I) により表されるアミノ酸配列

【化 1】

A-X-B-Y-C (I)

A - は、配列番号 1、配列番号 4 もしくは配列番号 7 であり、
 X は、6 もしくは 7 を有するアミノ酸残基の C D R 1 領域であり、
 B - は、配列番号 2、配列番号 5 もしくは配列番号 8 であり、
 Y は、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、
 20 もしくは 21 のアミノ酸残基を有する C D R 3 領域であり、
 C - は、配列番号 3、配列番号 6 もしくは配列番号 9 であり、
 またはそれと少なくとも 50% 相同な配列を含む I C O S L 特異的抗原結合分子であっ
 て、

10

この際、

配列番号 1 が、TRVDQTPRTATKETGESLTINCVLTDT、TRVD
 QTPRTATKETGESLTINCVVTGA であり、

配列番号 2 が、TSWFRKNPGTTDWERMISIGGRYVESVNKGAKS
 FSLRIKDLTVADSATYYCKA または TSWFRKNPGTTDWERMIS
 IGGRYVESVNKGAKS FSLRIKDLTVADSATYICRA であり、

20

配列番号 3 が、DGAGTVLTVN であり、

配列番号 4 が、ASVNQTPRTATKETGESLTINCVLTDT であり、

配列番号 5 が、TYWYRKNPGSSNQERISISGRYVESVNKRRTMS
 FSLRIKDLTVADSATYYCKA または TYWYRKNPGSSNQERIS
 ISGRYVESVNKRRTMS FSLRIKDLTVADSATYICRA であり、

配列番号 6 が、YGAGTVLTVN であり、

配列番号 7 が、ARVDQTPRSVTKETGESLTINCVLRDP または AR
 VDQTPRSVTKETGESLTINCVLRDA または ARVDQTPRSVTK
 ETGESLTINCVLRDG または ARVDQTPRSVTKETGESLTINC
 VLRES であり、

配列番号 8 が、TCWYRKKSGSTNEESISKGGRYVETVNSGSKS
 FSLRINDLTVEDGGTYRCGA または TCWSRKKSGSTNEESIS
 KGGRYVETVNSGSKS FSLRINDLTVEDGGTYRCGL、TCWT
 RKKSGSTNEESISKGGRYVETVNSGSKS FSLRINDLTVED
 GGTYRCAL、TCWYRKKSGSTNEESISKGGRYVETVNSGSK
 S FSLRINDLTVEDGGTYRCGV、TCWYRKKSGSTNEESISK
 GGRYVETVNSGSKS FSLRINDLTVEDGGTYRCGH、TCWYR
 KKKSGSTNEESISKGGRYVETVNSGSKS FSLRISDLTVEDG
 GTYRCGH であり、

30

配列番号 9 が、CGGGTVVTVN、CGGGTAVTVN、CGDGTAVTVN
 、または CGDGTAVTVN である、I C O S L 特異的抗原結合分子。

40

【請求項 2】

前記 C D R 3 領域が、図 10 A、図 10 B または図 10 C で示される C D R 3 領域であ
 る、請求項 6 に記載の I C O S L 特異的抗原結合分子。

【請求項 3】

前記 C D R 1 領域が、図 10 A または図 10 B で示される C D R 1 領域である、請求項
 6 に記載の I C O S L 特異的抗原結合分子。

【請求項 4】

前記抗原特異的抗原結合分子が、図 9 A または図 9 C のいずれかで示される配列を有す
 る、請求項 6 に記載の I C O S L 特異的抗原結合分子。

【請求項 5】

50

ヒト化された、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載のICOSL 特異的抗原結合分子。

【請求項 6】

請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載のICOSL 特異的抗原結合分子を含む、融合タンパク質。

【請求項 7】

前記ICOSL 特異的抗原結合分子が、生物学的に活性なタンパク質へ融合している、請求項 6 に記載の融合タンパク質。

【請求項 8】

請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載のICOSL 特異的抗原結合分子、または請求項 6 もしくは 7 に記載の融合タンパク質をコードする、核酸。

10

【請求項 9】

請求項 8 に記載の核酸を含む、核酸構築物。

【請求項 10】

請求項 9 に記載のベクターを含む、宿主細胞。

【請求項 11】

請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載のICOSL 特異的抗原結合分子または請求項 6 もしくは 7 に記載の融合タンパク質の製造方法であって、

宿主細胞で前記分子をコードする核酸配列を発現する工程を有する、方法。

【請求項 12】

請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載のICOSL 特異的抗原結合分子または請求項 6 もしくは 7 に記載の融合タンパク質を含む、薬剤組成物。

20

【請求項 13】

薬剤に使用される、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載のICOSL 特異的抗原結合分子または請求項 6 もしくは 7 に記載の融合タンパク質。

【請求項 14】

疾患の治療を必要とする患者への前記治療のための薬剤の製造における請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載のICOSL 特異的抗原結合分子または請求項 6 もしくは 7 に記載の融合タンパク質の使用。

【請求項 15】

治療上有効な量の請求項 12 に記載の薬剤組成物を患者に投与することを含む、治療を必要とする患者における疾患の治療方法。

30

【請求項 16】

請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の検出可能な標識ICOSL 特異的抗原結合分子または請求項 6 もしくは 7 に記載の融合タンパク質をサンプルに添加し、および前記分子の標的分析物への結合を検出することを含む、前記サンプル中の前記標的分析物の存在をアッセイする方法。

【請求項 17】

請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の検出可能な標識ICOSL 特異的抗原結合分子または請求項 6 もしくは 7 に記載の融合タンパク質を被験者に投与することを含む、前記被験者の疾患の部位を画像化する方法。

40

【請求項 18】

請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載のICOSL 特異的抗原結合分子または請求項 6 もしくは 7 に記載の融合タンパク質を被験者に投与することを含む、前記被験者の疾患または医学的状态を診断する方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、免疫化および合成の板鰓亜綱 (Elasmobranchii) 由来ライブラリから単離された高親和性、抗原特異的天然および非天然結合分子の単離および特性に関する。特に、本発明は、特異的に結合し、免疫機能の重要なレギュレータである分子、

50

誘発副刺激リガンド (ICOSL) の活性を中和するサメ可変新規抗原レセプター (VNAR) ドメインに関する。中和VNARドメインは、2つの独立したソースから単離される；免疫化テンジクザメ (nurse shark) ライブラリおよび合成アブラツノザメ (spiny dogfish) フレームワーク融合ライブラリ。

【背景技術】

【0002】

生物製剤に基づくモノクローナル抗体 (mAb) は、継続した臨床的成功およびそれに続くバイオテクノロジーおよびバイオ医薬品企業への経済的価値によって例示されるように、小さな分子に対して多くの利点があった。特異的に標的に結合し、疾患関連の生物学的プロセスに介入する先天的能力は、オフサイト毒性を減少させる一方、それらを有効で

10

【0003】

サメ免疫グロブリンの新型または新規抗原レセプター (IgNAR) は、軟骨魚類の適応免疫システムにおいて役割を果たすとして知られている天然に生じる一本鎖結合ドメインである (Greenberg A. S., et al., Nature, 1995. 374 (6518): p. 168 - 173; Dooley, H., et al., Mol. Immunol., 2003. 40 (1): p. 25 - 33; Muller, M. R., et al., mAbs, 2012. 4 (6): p. 673 - 685)。この機能の重要な側面は、可変領域 (VNAR) での4つの領域 (CDR1、HV2、HV4およびCDR3) の多様性から得られる標的に対する高い親和性ととも

特異的に結合する能力である (Stanfield, R. L., et al. Science, 2004. 305 (5691): p. 1770 - 1773)。追加の非カノニカルシステイン残基は、より潜在性のまたは隠れたエピート

ープに結合可能な普通でないパラトープトポロジを有する構造的に異なるファミリーになるVNARアイソタイプのレパートリーを作り出す (Stanfield, R. L., et al. Science, 2004. 305 (5691): p. 1770 - 1773; Streltsov, V. A., et al., Protein Sci., 2005. 14 (11): p. 2901 - 2909; Stanfield, R. L., et al., J Mol. Biol., 2007. 367 (2): p. 358 - 372)。軽鎖パートナーおよびCDR2の欠如の組み合わせは、VNARを脊椎動物界での最も小さな天然に生じる結合ドメインとなる。それらの優れた標的への選択性に加え、固有の可溶性と安定性により、それらは治療薬および診断の発展の魅力的な候補となる (Barelle, C. J., et al., Adv. Ex. Med. Biol., 2009. 655: p. 49 - 62; Griffiths, K., et al., Antibodies, 2012. 2: p. 66 - 81)。文献中の命名法は、IgNARを免疫グロブリンアイソトープ

新型 (novel) 抗原レセプターまたは免疫グロブリンアイソトープ新規 (new) 抗原レセプターとして参照し、用語は、同義語である。

20

30

40

【0004】

軟骨魚類における標的的特異的IgNAR応答を上昇させる能力は、最初にテンジクザメ (nurse shark) で実証された (WO03/014161)。鶏卵リゾチーム (HEL) をモデル免疫原として用いると、抗原特異的な力価は、最初に、バッファーでの反復ブーストに続くアジュバントとターゲットとを免疫化することにより時間をかけて達成された。本研究に先立ち、二次免疫応答が、進化の結果、より高度な脊椎動物 (例えば、鳥類および哺乳類) に限定されると一般的に認識されていた。したがって、このよう

50

な応答を板鰓垂網のような進化的に原始的な種で確かめることは予期されていなかったであろう。免疫原へのサメの応答はまた、IgNAR応答がげっ歯類や他の哺乳類で見られる血清力価よりも非常に低い抗原-特異的血清力価(約二桁少ない)であるため、哺乳類で見られるものからは非常に異なっている。ナノボディとして知られるラクダ科の単ドメイン抗体の系統とは異なり、IgNARの結合ドメインは、古典的な免疫グロブリン抗体祖先から進化したとは考えられない。

【0005】

このことは、約80-85%のフレームワーク領域にわたり、ナノボディでのヒトIgG重鎖に類似し、IgNARとヒト軽鎖配列との間の類似がたったの20-25%である一次配列での違いから明らかである(Dooley, H. and Flajnik, M. F., Eur. J. Immunol., 2005, 35(3): p. 936-945)。若齢のテンジクザメでの研究は、アイソタイプレパートリー、ゆえにいかなる外部チャレンジに対して上昇するIgNARドメインの多様性がタイプIIIとしていられるD-領域融合アイソタイプに限定されることを示している。理論上では、これは、若い仔(young pups)がまだ子宮内にいる間に暴露されたであろう一般的な病原体への制限された応答でありうる。およそ発生の六か月後、若い成体のサメは、複数の異なるIgNARアイソタイプ;タイプI(テンジクザメでのみこれまで発見されている)、タイプII、タイプIIb、タイプIIIおよびタイプIIbを含むチャレンジへのフルレパートリおよびIgNAR応答を示す。アイソタイプは、結合ドメインのパラトープにわたり、異なる構造的な特徴に変換する非カノニカルシステイン残基の含有量および位置で異なる。

【0006】

2つのプラットフォームがVNARの単離に利用できる。第1は、サメの適応免疫システムの一部としてIgNARの役割に基づいている(WO03/014161)。IgNAR応答が抗原チャレンジに応答して誘発しうる、現在少なくとも3つの異なる種のサメで見られている(Dooley, H., et al., Mol. Immunol., 2003, 40(1): p. 25-33; Muller, M.R., et al., mAbs, 2012, 4(6): p. 673-685; Camacho-Villegas, T., mAbs, 2013, 5(1): p. 80-85 WO2011/056056)。VNARドメインがファージディスプレイに適するため、簡易血液サンプルは、ブースト、抽出されたRNA、このトータルメッセージから生成されたcDNAから増幅されたVNARレパートリーに続く、免疫の反復プロセス後のこれらの動物から得られる(Muller, M.R., et al., Methods Mol. Biol., 2012, 907: p. 177-194, Flajnik, M. F., and Dooley, H., Methods Mol. Biol., 2009, 562: p. 71-82)。標準ファージミドベクターへのクローニングおよびターゲットに対する選択は、ポジティブヒットを探すために用いることができる。VNARドメインを単離するための第2のおよび補完的な他の手段は、CDR領域のエンジニアリングによる重要で追加的な多様性をしばしば含む単一の天然なVNARフレームワークに基づく未感作または半合成ファージディスプレイライブラリの構築である(Nuttall, S. D., et al., Mol. Biol., 2001: 38: p. 313-326; Nuttall, S. D., et al., FEBS Letters, 2002, 516: p. 80-86; Liu, J. L., et al., Mol Immunol., 2007, 44: p. 1175-1783; Liu, J. L., et al., BMC Biotech., 2007, 7: p. 78-88)。シングルフレームワークライブラリに対する重要な改善は、異なる種でのまたは異なる種にわたる異なるVNARアイソタイプからの異なるフレームワークをブレンドまたは融合によって達成しうる。合成ライブラリからVNARを生成する新規な方法は、2013年4月23日出願されたUS61/815,043からの優先権を主張する2014年4月23日出

10

20

30

40

50

願された同時係属中の国際特許出願番号 PCT/EP2014/058251 にて記載されている（参照により引用される）。

【0007】

免疫化および合成ライブラリアプローチは共に、利益と課題とを有する。サメ免疫システムの進化的に離れたポジションは、多くの哺乳類タンパク質への良好な応答を促す。したがって、免疫化は、典型的には、*in vivo*での成熟プロセスを経て抗原ターゲットに対する高い親和性ドメインを提供する。このプロセスは、IgNARレパトリーの成熟を達成するために約4～8ヶ月であるが、動物で発生するように、哺乳類で見られる関連したプロセスよりも少し遅いものである。合成ライブラリからの選択は、このタイムフレームを短縮するが、成功のレベル（特異性および親和性）は、スクリーニングされたライブラリの質とサイズに依存し、一般的に*in vitro*での成熟を通じてさらなる改善を得るであろうものよりも低い親和性のドメインを送達する（*deliver*）であろう。合成ライブラリからのVNARを生成する新規な方法は、2013年4月23日出願されたUS61/815,043からの優先権を主張する2014年4月23日出願された同時係属中の国際特許出願番号PCT/EP2014/058251にて記載されている（参照により引用される）。

10

【0008】

しかし、両方の方法は、複数のターゲットクラスに対するVNARDメインの多くを単離するためにうまく用いられている（Nuttall, S. D. et al., *Mol. Biol.* 2001: 38: p. 313-326; Dooley, H., et al., *Mol. Immunol.* 2003. 40(1): p. 25-33; Nuttall, S., D., *Protein*, 2004. 55: p. 187-197; Liu, J.L., et al., *Mol Immunol.*, 2007. 44: p. 1175-1783; Liu, J.L., et al., *BMC Biotech.*, 2007. 7: p. 78-88; Walsh, R., *Virology*, 2011. 411(1): p. 132-141; Muller, M.R., et al., *mAbs*, 2012. 4(6): p. 673-685; Bojalil, R., *BMC Immunol.*, 2013: 14(7): p. 14-17)。

20

【0009】

免疫調節生物製剤は、多くの異なる治療分野での免疫関連疾患を治療するために用いることができる強力なツールである。それらは、過免疫の応答を減衰するためにデザインされ、したがってリウマチ性関節炎（RA）、全身性エリテマトーデス（SLE）および乾癬のような慢性自己免疫および炎症症状と同じく、臓器移植での有用性を有する。逆に、それらは、癌または慢性的細菌もしくはウイルス感染での免疫応答を強化するように作用しうる（Yao, S., et al., *Nature Reviews*, 2013. 12: p. 130-146）。B7関連タンパク質（B7RP-1）、CD275およびB7ホモログ（B7h）としてもまた知られる誘発副刺激リガンド（ICOSL）は、B細胞、活性化単球および樹状細胞のような抗原提示細胞（APCs）で構造的に発現した細胞表面抗原であり、B7ファミリーメンバー、ICOS（CD278）のリガンドである（Yoshinaga, S., K., et al., *Int. Immunol.*, 2000. 12(10): p. 1439-1447）。最初に、その作用はT細胞の活性化に制限されると考えられていたが、より最近では、免疫調節でのICOSLの中心的な役割は、CD28およびCTLA4それぞれとの相互作用によるT細胞刺激および阻害経路の両方に拡大している。系統制限ICOSL発現を有するトランスジェニックマウスの作製は、T細胞応答、T細胞トランスおよびT細胞依存B細胞応答を刺激することにおけるICOSL-ICOS相互作用の役割を示しており、その抗体媒介性疾患での重要性は、RA、SLEおよびブドウ膜炎を含むヒト疾患の前臨床モデルで確認されている（Yoshinaga, S., K., et al., *Nature*, 1999. 402(827): p. 827-832; , Aich

30

40

50

er, A., et al., *J. Immunol.*, 2000. 164(9): p. 4689-4696; Larimore, K., et al., *BMJ Immunol.*, 2012. 13(29): p. 1-17; Iwai, H., et al., *J. Immunol.*, 2002. 169(8): p. 4332-4339; Frey, O., et al., *Ann. Rheum. Dis.*, 2010. 69(8): p. 1495-1501; Ushui, Y., et al., *Eur J Immunol.*, 2006. 36(11): p. 3071-3081; Hu, Y., L., et al., *J. Immunol.*, 2009. 182(3): p. 1421-1428)。標的化T細胞集団は、胚中心B細胞と相互作用する濾胞ヘルパーT細胞(T_{FH})であることが示されている(Hu, Y., L., et al., *J. Immunol.*, 2009. 182(3): p. 1421-1428)。

10

【0010】

より最近では、ICOSL-ICOS相互作用は、免疫抑制の腫瘍関連制御性T細胞(T_{reg})の調節を通じて腫瘍の発生に関与しているとされる(Strauss L., et al., *J Immunol.*, 2008. 180: p. 2967-2980; Gobert M, et al., *Cancer Res.*, 2009. 69: p. 2000-2009; Faget, J., et al., *Cancer Research*, 2012. 72(23): p. 6130-6141)。T_{reg}の増加数と有病率は、癌患者で確認されており、すい臓癌および乳癌、結腸直腸癌、胃癌および食道癌、白血病およびリンパ腫、黒色腫、非小細胞肺癌、卵巣癌、ならびに肝細胞癌を含む異なる腫瘍および腫瘍間質から単離されている(Menetrier-Caux, C. et al., *Targ. Oncol.*, 2012. 7: p. 15-28)。

20

【0011】

ICOSLは、2つの細胞外免疫グロブリン様ドメイン(IgCおよびIgV)を有するB7関連膜貫通糖たんぱく質である。突然変異解析は、IgVドメインがレセプターとリガンドとの間のインターフェースを形成し、ヒトとげっ歯類との間の低い種のホモロジー(ヒトとマウスの間で約44%)を示すことを明らかにしている。タンパク質複合体の全体的な整合性のため必要とされるが、IgCドメインは、ICOSとのいかなるコンタクトインターフェースを形成せず、IgVドメインに近接して関連する膜である(Chattopadhyay, K., *J. Immunol.*, 2006. 177(6): p. 3920-3929)。活性タンパク質の組織は、主に非共有結合ヘテロダイマーであると考えられており、これらのクラスタリングまたはオリゴマー化が細胞表面で起こることを示唆する証拠がある(Chattopadhyay, K., *J. Immunol.*, 2006. 177(6): p. 3920-3929)。げっ歯類およびヒト標的ドメインの間の配列ホモロジーが低いものであっても、前臨床開発のためのネズミ科またはラットサロゲート分子の単離および開発は有用で有りうる。ICOSLに対するかかるサロゲート抗体の単離および開発は、かねてより実証されている(Iwai, H., et al., *J. Immunol.*, 2002. 169(8): p. 4332-4339; Hu, Y., L., et al., *J. Immunol.*, 2009. 182(3): p. 1421-1428)。

30

40

【0012】

IgV領域に結合し、40~400nMの範囲で親和性を示すマウスICOSLに対する合成ライブラリELSS1から単離されたVNARは、2013年4月23日に出願されたUS61/815,043からの優先権を主張する2014年4月23日に出願された同時係属中の国際特許出願番号PCT/EP2014/058251にて記載されている(参照により引用される)。ヒトICOSLに対して単離されたVNARDドメイン(IgVドメインとしてもまた認識されている)は、単離された抗マウスVNARDドメインと比較して、標的に対して少なくとも一桁は高い親和性を有する。治療上の利益のために、

50

これは、ICOSLに対して単離されたドメインが、その結果、ICOSとの相互作用を阻害することに拮抗すること、それに続き免疫応答を誘導するための下流のシグナル伝達に重要である。T細胞増殖アッセイは、このICOS-ICOSL間の相互作用の阻害を測定する強力な手段であり、*in vitro*でのリード分子の有効性を実証するためにすでに行われている。この研究の間に単離された抗ヒトICOSLドメインは、それらの抗マウスカウンターパートと比較して、T細胞アッセイでの効力において100倍を超える増加を示した。これは、抗マウスのものと比較してターゲットへの抗ヒトドメインの増加した親和性によるものである可能性が高い。したがって、これらのドメインが*in vivo*でのより高い有用性を示すであろうことが予測される。

【発明の概要】

【0013】

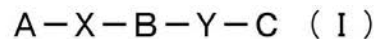
本発明は、中和アッセイでの予想外の有用性、高い親和性およびターゲットへの選択性、ならびに天然ソースおよび非天然ソースからのヒトICOSLに対して単離されたVNARドメインの多様性に関する。

【0014】

本発明の第1の態様によると、式(I)で示されるアミノ酸配列：

【0015】

【化1】



【0016】

A - は、配列番号1、配列番号4または配列番号7であり、
 Xは、6または7のアミノ酸残基を有するCDR1領域であり、
 B - は、配列番号2、配列番号5または配列番号8であり、
 Yは、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21または22のアミノ酸残基を有するCDR3領域であり、
 C - は、配列番号3、配列番号6または配列番号9であり、
 または、それと少なくとも50%相同の配列を含む、ICOSL特異的抗原結合分子が提供される。

【0017】

この際、

配列番号1は、TRVDQTPRTATKETGESLTINCVLTDT、TRVDQTPRTATKETGESLTINCVVTGAであり、

配列番号2は、TSWFRKNP GTTDWERM SIGGRYVESVNKGAKS FSLRIKDLTVADSATY YCKAまたはTSWFRKNP GTTDWERM SIGGRYVESVNKGAKS FSLRIKDLTVADSATY ICRAであり、

配列番号3は、DGAGTVLTVNであり、

配列番号4は、ASVNQTPRTATKETGESLTINCVLTDTであり、

配列番号5は、TYWYRKNP GSSNQERIS ISGRYVESVNKR TMS FSLRIKDLTVADSATY YCKAまたはTYWYRKNP GSSNQERIS ISGRYVESVNKR TMS FSLRIKDLTVADSATY ICRAであり、

配列番号6は、YGAGTVLTVNであり、

配列番号7は、ARVDQTPRSVTKETGESLTINCVLRDPまたはARVDQTPRSVTKETGESLTINCVLRDAまたはARVDQTPRSVTKETGESLTINCVLRDGまたはARVDQTPRSVTKETGESLTINCVLRESであり、

配列番号8は、TCWYRKKSGSTNEESISKGGRYVETVNSGSKS FSLRINDLTVEDGGTYRCGAまたはTCWSRKKSGSTNEESISKGGRYVETVNSGSKS FSLRINDLTVEDGGTYRCGL、TCWYRKKSGSTNEESISKGGRYVETVNSGSKS FSLRINDLTVEDGGTYRCAL、TCWYRKKSGSTNEESISKGGRYVETVNSGSK

10

20

30

40

50

S F S L R I N D L T V E D G G T Y R C G V、T C W Y R K K S G S T N E E S I S K
G G R Y V E T V N S G S K S F S L R I N D L T V E D G G T Y R C G H、T C W Y R
K K S G S T N E E S I S K G G R Y V E T V N S G S K S F S L R I S D L T V E D G
G T Y R C G Hであり、

配列番号9は、C G G G T V V T V N、C G G G T A V T V N、C G D G T A V T V N
、またはC G D G T A V T V Nである。

【0018】

A、X、B、Yおよび/またはCで表されるアミノ酸配列は、板鰓亜綱 (E l a s m o
b r a n c h i i s u b c l a s s) の同じまたは異なる種に由来するであろう。A、
X、B、Yおよび/またはCで表されるアミノ酸配列はまた、V N A R配列の同じまたは
異なるアイソタイプ、例えばタイプI、タイプIIおよび/またはタイプIII (タイプ
I b、タイプII bおよびタイプIII bを含む) に由来するであろう。したがって、任
意の一般的に適する組み合わせのソースマテリアルが可能である。

10

【0019】

本発明のいくつかの実施形態において、式 (I I) A - X - B - Y - C は、エレメント
A、BおよびCが (i) 配列番号1、2、および3； (i i) 配列番号1、2、および6
； (i i i) 配列番号1、5、および3； (i v) 配列番号1、5、および6； (v) 配
列番号4、5、および6； (v i) 配列番号4、5、および3； (v i i) 配列番号4、
2、および6； (v i i i) 配列番号4、2、および3； (i x) 配列番号7、8、およ
び9によって表される配列から構成されるであろう。

20

【0020】

C D R 1領域は、図10Aもしくは10B、またはそれと少なくとも50%相同の配列
で表される、任意のC D R 1領域でありうる。C D R 3領域は、図10A、10Bもし
くは10C、またはそれと少なくとも50%相同の配列で表される任意のC D R 3領域であ
りうる。

【0021】

I O C S L は、2つの細胞外免疫グロブリン様ドメイン (I g C および I g V) を有す
るB7関連膜貫通糖たんぱく質である。GenBankでのI C O S Lのヒトおよびマウ
ス配列は、次のとおりである：

Human : A c c e s s i o n : O 7 5 1 4 4 . 2 ; G I : 1 9 8 5 5 0 6
6 (3 0 2 a a)

30

Mouse : A c c e s s i o n : Q 9 J H J 8 . 1 ; G I : 1 5 2 1 4 0 5
3 (3 2 2 a a) 。

【0022】

アミノ酸配列を整列した場合、総合スコアが43.38であり、%アイデンティティが
47.80である。本発明のI C O S L特異的抗原結合分子は、抗原としていかなるI C
O S L配列に対して惹起されうる。適切には、I C O S L配列は、ヒトI C O S L (h I
C O S L) 配列、もしくはそれと相同の配列、または本明細書に記載される標準的な分子
生物学技術を用いてヒト化後の抗原として表されるであろう他の動物種からのI C O S L
配列でありうる。I C O S Lのヒト配列の例は、図12に示される。

40

【0023】

本発明の一つの実施形態において、I C O S L特異的抗原結合分子は、図9Aもしくは
図9C、またはそれと少なくとも50%相同の配列で表される配列でありうる。

【0024】

C D R 3領域が合成ライブラリに由来するI C O S L特異的抗原結合分子で表される場
合、前記領域は、7~21のアミノ酸残基、適切には7、9、10、11、12、13、
14、16、または21のアミノ酸残基を含むであろう。

【0025】

C D R 3領域が免疫手順により由来するI C O S L特異的抗原結合分子で表される場合
、前記領域は、13~21のアミノ酸残基、適切には13、19、20、または21のア

50

ミノ酸残基を含むであろう。

【0026】

したがって、ICOSL特異的抗原結合分子はまた、単離されたVNARDメインとして定義されうる。

【0027】

非天然および天然ソースから単離された本発明のVNARDメインの配列は、高い親和性を持って、ヒトICOSLに特異的に結合し、ICOSLとICOSとの間の相互作用を中和する。

【0028】

本発明の一つの実施形態において、抗hICOSL VNARDメインは、調製された合成ライブラリから単離され得、2013年4月23日に出願されたUS61/815,043からの優先権を主張する2014年4月23日に出願された同時係属中の国際特許出願番号PCT/EP2014/058251にて記載されている(参照により引用される)。かかるライブラリの一例は、複数の組み合わせで融合された2つの連続したペプチドドメインからなるフレームワーク融合合成ライブラリである合成ライブラリELSS1である。この合成ライブラリデザインは、強力なプラットフォームであることが証明されており、このプラットフォームから、その一因がライブラリの結合分子多様性を著しく増やすためにアイソタイプとサメ種にわたる異なるフレームワークを融合するユニークな方法の一部により複数のターゲットクラスに対するVNARを単離する。抗ヒトICOSLドメインは、それらがユニークなCDR3およびCDR1配列に加えて異なるアイソタイプフレームワーク残基から構成されるため、さらにこのことを例示している。この実施形態において、VNARDメインは、ストレプトアビジンビースに固定化されたビオチン化単量体ヒトICOSLを有するライブラリのスクリーニングにより単離されるであろう。別の実施形態において、免疫チューブのような固体表面に直接固定化されたVNARDメインは、ヒトICOSLを有するライブラリのスクリーニングにより単離されるであろう。

10

20

【0029】

本発明の他の実施形態において、抗ヒトVNARDメインは、免疫化サメ(immunized shark)から単離しうる。テンジクザメは、フロイド完全アジュバントでの単量体ヒトICOSLにより免疫化することができ、その後、PBS中で反復して毎月のブーストが行われる。標的に対するIgNARの血清力価は、モニターすることができ、ヒトICOSLへの応答が可溶性抗原の1回のブーストと3回のブーストとの間で見られうるかどうかを決定することができる。ブリード4(bleed four)からの力価は、かかる状況での典型的な被験動物から達成できる最大の応答とみなすことができ、RNAは、末梢血リンパ球(pbls)から抽出することができる。そのようなサンプルから、cDHAを生産することができ、VNARレポーターをフレームワーク1およびフレームワーク4特異的プライマーを用いて増幅することができる。

30

【0030】

アンプリコンは、約 1×10^8 クローンのディスプレイライブラリを作製するために、E.coli宿主細胞に形質転換されたファージミドベクターにてクローン化することができる。この実施形態において、VNARDメインは、ストレプトアビジンビースに固定化されたビオチン化単量体ヒトICOSLを有するライブラリのスクリーニングにより単離されるであろう。別の実施形態において、免疫チューブのような固体表面に直接固定化されたVNARDメインは、ヒトICOSLを有するライブラリのスクリーニングにより単離されるであろう。

40

【0031】

本発明の重要な利点としては、単離されたVNARDメインによって示されるICOS-ICOSL相互作用の強力な中和を示したことである。ICOSとICOSLとの間の相互作用に拮抗することの効果は、細胞ベースのin vitroアッセイまたはELSAベースの抗原アッセイのような他の方法で示すことができる。中和の効果は、制限されないが、単量体ペリプラズム発現タンパク質、精製タンパク質としておよび哺乳類細胞上

50

清としてのVNARDメイン - Fc融合物ならびにペプチドリンカーを通じてパートナータンパク質もしくは複数のタンパク質とN末端および/またはC末端で結合した抗hICOSL VNARのような分子融合タンパク質を含む、複数のタンパク質フォーマットで示すことができる。

【0032】

本発明の一つの実施形態において、可溶性ペリプラズム発現単量体抗ヒトICOSL VNARDメインは、ICOSを発現した細胞表面とマルチウェルプレートELISAフォーマットでのICOSL - Fc融合タンパク質との間の相互作用をブロックする。

【0033】

本発明のさらなる実施形態において、哺乳類の発現し精製された抗ヒトICOSL VNAR - Fcドメインは、ICOSを発現した細胞表面と濃度依存的なICOSL - Fc融合タンパク質との間の相互作用をブロックできる。

10

【0034】

さらなる実施形態は、N末端もしくはC末端またはその両方、分子ペプチドリンカーを介する二量体もしくは三量体以上複数の融合物に単量体抗ヒトICOSL VNARDメインを再フォーマットするための柔軟性がある。抗ヒト血清アルブミンVNARDメインと三量体フォーマットで融合した抗ヒトICOSL VNARDメインおよび抗マウスICOSL VNARDメインは、hICOSLと結合する能力を保持し、ICOSとICOSLとの間の相互作用をブロックする。この三官能フォーマットにおいて、3つのドメインのすべては、それらの特異的ターゲットへの結合を保持する。

20

【0035】

本発明のさらなる実施形態において、精製した抗ヒト単量体ICOSL VNARDメインは、初代ヒトT細胞の増殖をブロックできる。本発明の別の実施形態において、抗ヒトICOSL VNARDメインは、哺乳類の宿主細胞で発現しうるFcタンパク質融合構築物へと変換することおよび精製することができる。この精製された材料は、初代ヒトT細胞アッセイで滴定することができ、T細胞増殖の濃度依存性阻害を示すことができる。

【0036】

本発明のもう一つの利点としては、抗ヒトICOSLドメインによって示される高い親和性と選択性である。

30

【0037】

本発明の一実施形態において、抗ヒトICOSL VNARDメインは、可溶性の単量体タンパク質ドメインとして発現することができ、結合相互作用による結合および解離速度を測定するためにBIAcoreチャンパーでの固定化hICOSLを通過することができる。

【0038】

本発明のもう一つの実施形態において、抗ヒトICOSL VNARDメインは、哺乳類の宿主細胞で発現しうるFcタンパク質融合構築物へと変換することおよび精製することができる。そしてこの材料は、結合相互作用の結合および解離速度を測定するためにBIAcoreチャンパーでの固定化hICOSLを通過することができる。

40

【0039】

本発明の一実施形態において、抗ヒトICOSL VNARDメインの選択性は、ICOSおよびICOSLを発現するCHO細胞株への結合、二次蛍光色素タグ抗体を用いる検出、ならびにFACS解析を用いて測定された結合により示すことができる。さらなる実施形態は、異なるタンパク質の複数のクラスに対するELISAによって選択性を示す。

【0040】

本発明の第二の態様によると、本発明の第一の態様のICOSL特異的抗原結合分子の薬剤組成物を提供する。

【0041】

50

本発明の薬剤組成物は、任意の適切なおよび薬学的に許容される担体、希釈剤、アジュバントまたはバッファー液を含むことができる。前記組成物は、さらに薬学的活性剤を含むことができる。このような担体は、制限されないが、生理食塩水、緩衝生理食塩水、デキストロース、リポソーム、水、グリセロール、エタノールおよびそれらの組み合わせを含むことができる。

【0042】

このような組成物は、示したように、さらに薬学的活性剤を含むことができる。追加の剤は、治療上の化合物であってもよく、例えば、抗炎症薬、細胞毒性剤、細胞増殖抑制剤または抗生物質である。このような追加の剤は、それを必要とする患者への投与のために適切な形態であろうし、このような投与は、同時、個別または逐次的であろう。成分は、適切な説明書を含むことができるキットの形態で調製することができる。

10

【0043】

薬剤組成物は、例えば、経口、局所、静脈内、筋肉内、鼻腔内または皮内経路などを含む、患者の疾患を治療するのに効果的な、任意の有効で便利な方法で投与することができる。治療において、または予防薬として、前記活性剤は、注射用組成物として、例えば、滅菌水性分散剤、好ましくは等張のものを個体に投与することができる。

【0044】

哺乳類、特にヒトへの投与のために、活性剤の日用量は、体重あたり0.01mg/kgから、一般的には約1mg/kg、2mg/kgまたは4mg/kgまでであろう。いずれにしても医師は、個体の年齢、体重、性別および応答を含むファクターに依存し、個体に最も適しているであろう実際の投与量を決めることができる。上記投与量は、平均的なケースでの例である。もちろん、より高いまたはより低い投与量が有益である例もあるであろうし、そのようなものは、本発明の範囲内である。

20

【0045】

本発明はまた、使用説明書と共に本明細書で定義される薬剤組成物を含むキットを提供する。

【0046】

本発明の第二の態様によると、医薬に使用するための第二の態様の薬剤組成物を提供する。かかる使用は、ICOSLと、限定されないが、ICOS、CD28およびCTLA4を含むそのレセプターパートナーとの間の相互作用に関連した疾患、ならびに/またはT細胞調節に関連した疾患、ならびに/または上記本発明の薬剤組成物の治療上有効な用量の投与を介する抗体媒介性疾患を治療するための方法を含む。前記組成物は、少なくとも一つの本発明のICOSL特異的抗原結合分子(VNARDメイン)、またはかかる分子の組み合わせおよび/もしくはそのヒト化バリエーションを含む。

30

【0047】

本明細書において、用語「治療(treatment)」は、ヒトに利益を与えることができる任意のレジームを含む。前記治療は、任意の既存の状態もしくは障害に関する治療的処置、または予防(予防的処置)でありうる。

【0048】

本発明の組成物で治療できる疾患は、特にサブセット、T_{FH}細胞を含むT細胞活性化で媒介される自己免疫および炎症性疾患を含む。このような疾患の例としては、制限されないが、全身性エリテマトーデス(SLE)、関節リウマチ(RA)、乾癬グレーブス病、重症筋無力症、水疱性類天疱瘡、抗リン脂質症候群、ブドウ膜炎、デビック病、ランパート・イトン筋無力症候群、ギラン・バレー/ミラー・フィッシャー、スティッフマン症候群、自己免疫性脳炎、尋常性天疱瘡を含む。本発明の組成物で治療できるその他の疾患は、調節性T細胞(T_{reg})の活性化により媒介される癌を含み、癌は、制限されないが、すい臓癌および乳癌、結腸直腸癌、胃癌および食道癌、白血病およびリンパ腫、黒色腫、非小細胞肺癌、卵巣癌ならびに肝細胞癌を含む。

40

【0049】

本発明のこの態様によると、ICOSLと、限定されないが、ICOS、CD28およ

50

びCTLA4を含むそのレセプターパートナーとの間の相互作用に関連した疾患、ならびに/または調節性T細胞に関連した疾患、ならびに/または抗体媒介性疾患の治療のための薬剤の製造に使用される第一の態様の組成物を提供する。

【0050】

本発明のICOSL特異的抗原結合分子はまた、患者における疾患状態の性質を調べるために使用できる。ICOSL特異的抗原結合分子は、X線、ガンマ線、もしくはPETスキャンのような画像化技術または類似技術を用いて被験者の身体における疾患部位の画像化を作成するために使用できる。したがって、本発明は、適切に検出可能な標識ICOSL特異的抗原結合分子の被験者への投与およびそれに続く被験者の身体のスキャンを含む、被験者における疾患部位の画像化方法まで及ぶ。また、当該分子の被験者への投与は、分子の投与に続く被験者からのサンプルを分析することによる試験結果を提供できる。かかる実施形態は、本発明のICOSL特異的抗原結合分子の投与を含む被験者における疾患または医学的状態の診断法を含むことができる。

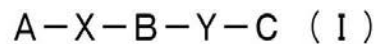
10

【0051】

本発明の一実施形態において、式(I)で表されるアミノ酸配列：

【0052】

【化2】



【0053】

A - は、配列番号1または配列番号4であり、
 Xは、5、6または7のアミノ酸残基を有するCDR1領域であり、
 B - は、配列番号2または配列番号5であり、
 Yは、8、9、10、11、12、13、14、15、16、または17のアミノ酸残基を有するCDR3領域であり、
 C - は、配列番号3または配列番号6であり、
 または、それと少なくとも50%相同の配列を含む抗原特異的抗原結合分子を提供する。

20

【0054】

この際、

配列番号1は、TRVDQTPRTATKETGESLTINCVLTDT, TRVDQTPRTATKETGESLTINCVVTGAであり、

30

配列番号2は、TSWFRKNPGTTDWERMISIGGRYVESVNKGAKSFSRLRIKDLTVADSATYYCKAまたはTSWFRKNPGTTDWERMISIGGRYVESVNKGAKSFSRLRIKDLTVADSATYICRAであり、

配列番号3は、DGAGTVLTVNであり、

配列番号4は、ASVNQTPRTATKETGESLTINCVLTDTであり、

配列番号5は、TYWYRKNPGSSNQERISISGRYVESVNKRRTMSFSLRIKDLTVADSATYYCKAまたはTYWYRKNPGSSNQERISISGRYVESVNKRRTMSFSLRIKDLTVADSATYICRAであり、

配列番号6は、YGAGTVLTVNである。

40

【0055】

前記CDR1領域は、図10Aまたは10Bで表される、任意のCDR1領域でありうる。前記CDR3領域は、図10A、10Bまたは10Cで表される、任意のCDR3領域でありうる。

【0056】

本発明のこの実施形態の配列は、図9Aで表されるものでありうる。

【0057】

本発明の他の実施形態において、式(I)で表されるアミノ酸配列：

【0058】

【化3】

A-X-B-Y-C (I)

【0059】

A - は、配列番号7であり、
 Xは、6のアミノ酸残基を有するCDR1領域であり、
 B - は、配列番号8であり、
 Yは、14、20、または22のアミノ酸残基を有するCDR3領域であり、
 C - は、配列番号9であり、
 または、それと少なくとも50%相同の配列を含む抗原特異的抗原結合分子を提供する。

10

【0060】

この際、

配列番号7は、ARVDQTPRSVTKETGESLTINCVLRDPまたはARVDQTPRSVTKETGESLTINCVLRDAまたはARVDQTPRSVTKETGESLTINCVLRDGまたはARVDQTPRSVTKETGESLTINCVLRESであり、

配列番号8は、TCWYRKKSGSTNEESISKGGRYVETVNSGSKSFSLRINDLTVEDGGTYRCGAまたはTCWSRKKSGSTNEESISKGGRYVETVNSGSKSFSLRINDLTVEDGGTYRCGL、TCWTRKKSGSTNEESISKGGRYVETVNSGSKSFSLRINDLTVEDGGTYRCAL、TCWYRKKSGSTNEESISKGGRYVETVNSGSKSFSLRINDLTVEDGGTYRCGV、TCWYRKKSGSTNEESISKGGRYVETVNSGSKSFSLRINDLTVEDGGTYRCGH、TCWYRKKSGSTNEESISKGGRYVETVNSGSKSFSLRISDLTVEDGGTYRCGHであり、

20

配列番号9は、CGGGTVVTVN、CGGGTAVTVN、CGDGTAVTVN、またはCGDGTAVTVNである。

【0061】

前記CDR1領域は、10Bで表される、任意のCDR1領域でありうる。前記CDR3領域は、10Bで表される、任意のCDR3領域でありうる。

30

【0062】

本発明のこの実施形態の配列は、図9Cで表されるものでありうる。

【0063】

定義

本発明の抗原特異的抗原結合分子は、可変新規抗原レセプター(VNAR)分子の合成ライブラリに由来したまたはVNAR分子の免疫ライブラリに由来したアミノ酸配列を含む。用語VNAR、免疫グロブリン新規抗原レセプター(IgNAR)および新規抗原レセプター(NAR)はまた、交互に用いることができる。

【0064】

アミノ酸は、一文字コードもしくは三文字コードのいずれかまたはその両方により本明細書で表される。

40

【0065】

用語「親和性精製(affinity purification)は、パートナー部分への結合または連結を維持したまま、分子を不純物から分離することができる組み合わせまたはコンプレックスを形成するために、特異的誘引、または分子の化学的もしくは結合のパートナーへの結合に基づく、分子の精製を意味する。

【0066】

用語「相補性決定領域(Complementarity Determining Regions)」またはCDR(すなわち、CDR1およびCDR3)は、VNARドメインのアミノ酸残基を指し、それらの存在は抗原結合のために必要である。各VNAR

50

は、典型的には、CDR1およびCDR3として識別された3つのCDR領域を有する。各相補性決定領域は、「相補性決定領域」からのアミノ酸残基および/または「超可変ループ」(HV)からのアミノ酸残基を含むことができる。いくつかの例において、相補性決定領域は、CDR領域および超可変ループ両方からのアミノ酸を含むことができる。VNAR分子への一般的に認められた命名法によると、CDR2領域は存在しない。

【0067】

「フレームワーク領域 (framework regions)」(FW)は、CDR残基以外のVNAR残基である。各VNARは、典型的には、FW1、FW2、FW3a、FW3bおよびFW4として識別される5つのフレームワーク領域を有する。

【0068】

「細胞 (cell)」、「細胞株 (cell line)」、および「細胞培養 (cell culture)」は、交互に用いられ(文脈がそうでないことを示さない限り)、かかる名称は、細胞または細胞株の全ての子孫を含む。したがって、例えば、「形質転換体 (transformants)」および「形質転換細胞 (transformed cells)」のような用語は、形質転換の数に関係なく、初代被験細胞および初代被験細胞に由来する培養を含む。計画的または意図しない変異により、すべての子孫がDNA量において正確に同一であることはないであろうことも理解されている。当初の形質転換細胞でスクリーニングされたのと同じ機能または生物学的活性を有する変異体の子孫を含む。

【0069】

「コントロール配列 (control sequences)」は、発現を指す場合、特定の宿主生物における制御可能に連結したコード配列の発現のために必要なDNA配列を意味する。原核生物に好適なコントロール配列は、例えば、プロモーター、必要に応じてオペレーター配列、リボソーム結合部位などを含む。真核細胞は、プロモーター、ポリアデニル化シグナル、およびエンハンサーのようなコントロール配列を使用する。

【0070】

用語「コートタンパク質」は、タンパク質、少なくともタンパク質の一部がウイルス粒子の表面に存在するものを意味する。機能的観点から、コートタンパク質は、宿主細胞におけるウイルス構築プロセスの間ウイルス粒子に関連する任意のタンパク質であり、他の宿主細胞に感染するまで構築されたウイルスとの関連を維持する。

【0071】

特定のアッセイにおける化学物質の「検出限界 (detection limit)」は、そのアッセイのバックグラウンドレベルを超えて検出できるその物質の最小濃度である。例えば、ファージELISAにおいて、特定の抗原結合フラグメントをディスプレイする特定のファージの「検出限界」は、特定のファージが抗原結合フラグメントをディスプレイしないコントロールファージにより生成されたものを超えるELISAシグナルを生成するファージ濃度である。

【0072】

「融合タンパク質 (fusion protein)」および「融合ポリペプチド (fusion polypeptide)」は、互いに共有結合している2つの部分を有するポリペプチドを指し、各々の部分は、異なる性質 (property) を有するポリペプチドである。前記性質は、*in vitro*または*in vivo*活性のような、生物学的性質でありうる。前記性質はまた、ターゲット抗原への結合、反応の触媒作用などのような、シンプルな化学的または物理的特性でありうる。前記2つの部分は、単一のペプチド結合によりまたは1以上のアミノ酸残基を含むペプチドリンカーを介して直接結合することができる。一般的に、前記2つの部分および前記リンカーは、互いにリーディングフレームであろう。好ましくは、ポリペプチドの2つの部分は、異種または異なるポリペプチドから得られる。

【0073】

このテキストにおける用語「融合タンパク質 (fusion protein)」は、

10

20

30

40

50

一般的な用語で、水素結合もしくは塩橋を含む、化学的方法により、もしくはタンパク質合成を介したペプチド結合によりまたはその両方により、互いに結合した1以上のタンパク質を意味する。

【0074】

「異種DNA (heterologous DNA)」は、宿主細胞に導入される任意のDNAである。前記DNAは、ゲノムDNA、cDNA、合成DNAおよびそれらの融合または組み合わせを含む多様なソースに由来することができる。前記DNAは、宿主もしくはレシピエント細胞として同一細胞もしくは細胞型からのDNA、または異なる細胞型から、例えば同種もしくは異種ソースからのDNAを含むことができる。前記DNAは、必要に応じて、マーカー遺伝子または選択遺伝子、例えば、抗生物質耐性遺伝子、温度耐性遺伝子などを含むことができる。

10

【0075】

「高度に多様化した位置 (highly diverse position)」は、既知のおよび/または天然の抗体のアミノ酸配列または抗原結合フラグメントを比較した際の位置で表される多くの異なるアミノ酸を有する軽鎖および重鎖の可変領域に位置するアミノ酸の位置を意味する。高度に多様化した位置は、典型的には、CDR領域内である。

【0076】

「同一性 (identity)」は、配列を比較することによって決定された、2以上のポリペプチド配列または2以上のポリヌクレオチド配列の関係を表現する。同一性はまた、ポリペプチドまたはポリヌクレオチド配列の間の配列関連性の程度 (相同性) を意味し、場合によっては、かかる配列のストリング間の一致によって決定される。2つのポリペプチドまたは2つのポリヌクレオチド配列の間の同一性を測定するための方法は多数存在する一方、同一性を決定するために通常用いられる方法は、コンピュータプログラムに体系化される。2つの配列の間の同一性を決定するための好ましいコンピュータプログラムは、制限されないが、GCGプログラムパッケージを含む (Devereux, et al., Nucleic acids Research, 12, 387 (1984), BLASTP, BLASTN, and FASTA (Atschul et al., J. Molec. Biol. (1990) 215, 403)。

20

30

【0077】

好ましくは、タンパク質のアミノ酸配列は、HGMP (Human Genome Mapping Project) により提供されるBLASTコンピュータプログラム (Atschul et al., J. Mol. Biol. (1990) 215, 403-410) のデフォルトパラメータを用いて、本明細書で開示するアミノ酸配列に対し、アミノ酸レベルで、少なくとも50%の同一性を有する

タンパク質配列は、本明細書で表されるアミノ酸配列に対し、核酸またはアミノ酸レベルで、より好ましくは、少なくとも55%、60%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、75%、80%、85%、90%、さらに好ましくは、95% (さらに好ましくは、少なくとも96%、97%、98%または99%) の同一性を有するであろう。

40

【0078】

タンパク質はまた、本明細書で開示される配列に対し、HGMPにより提供されたBLASTコンピュータプログラムのデフォルトパラメータを用いて、少なくとも50%、55%、60%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%の同一性を有する配列を含むことができる。

【0079】

「ライブラリ (library)」は、複数のVNARもしくはVNARフラグメント配列またはそれらの配列をコードする核酸を指す。ライブラリの起源は、多様性が自然ま

50

たは自然フレームワークの組み合わせで操作された、非天然ソースまたは自然の中での合成からであり得、または免疫化された動物から抽出したRNAから単離されたVNARDメインから例示されるように天然ソースからでありうる。

【0080】

「ライゲーション (l i g a t i o n) 」は、2つの核酸フラグメントの間でリン酸ジエステル結合を形成するプロセスである。2つのフラグメントのライゲーションのため、前記フラグメントの末端は、互いに適合可能でなければならない。いくつかのケースにおいて、前記末端は、エンドヌクレアーゼによる消化後、直接的に適合可能であろう。しかし、最初に、プラントエンドへのエンドヌクレアーゼによる消化後、通常生成される互い違いの末端をライゲーションのために適合可能にすることが必要であるだろう。末端をプラントにするため、DNAは、4つのデオキシリボヌクレオチド三リン酸の存在下、約10ユニットのDNAポリメラーゼIのクレノウ断片またはT4DNAポリメラーゼで、少なくとも15分間15 で、適切なバッファーにより処理される。DNAは、その後、フェノール-クロロホルム抽出およびエタノール沈殿によりまたはシリカ精製により精製される。互いにライゲートされうるDNAフラグメントは、溶液中にほぼ等モル量で加えられる。前記溶液はまた、ATP、リガーゼバッファー、およびT4DNAリガーゼのようなりガーゼを、0.5 μgのDNAあたり約10ユニット、含むであろう。前記DNAをベクターにライゲートされうるのであれば、前記ベクターは、適切な制限エンドヌクレアーゼによる消化により最初に線状にされる。線状フラグメントは、その後、ライゲーション工程の間のセルフライゲーションを抑制するためにバクテリアのアルカリホスファターゼまたは仔ウシ腸のホスファターゼで処理される。

10

20

【0081】

「変異 (m u t a t i o n) 」は、削除、挿入、または野生型配列のような、基準ヌクレオチド配列に対するヌクレオチドの置換である。

【0082】

「天然 (n a t u r a l または n a t u r a l l y o c c u r r i n g) 」VNARDは、非合成ソース、例えば、ex vivoで得られた組織ソースから、または板鰓垂網の動物の血清から同定されたVNARDを指す。これらのVNARDは、天然またはその他のいずれかで誘導された、任意のタイプの免疫応答で生成されたVNARDを含むことができる。天然VNARDは、アミノ酸配列、およびこれらの抗体を構成もしくはコードするヌクレオチド配列を含む。本明細書において、天然VNARDは、「合成VNARD (s y n t h e t i c V N A R s) 」とは異なり、合成VNARDは、例えば、異なるアミノ酸を有する特定の位置で、1つのアミノ酸、もしくは1つ以上のアミノ酸の置換、削除または付加により、ソースまたはテンプレート配列から変更されているVNARD配列を指し、前記異なるアミノ酸は、ソースの抗体配列とは異なる抗体配列を提供する。

30

【0083】

用語「核酸構築物 (n u c l e i c a c i d c o n s t r u c t) 」は、一般的に、クローニングにより得られたまたは化学合成により生成されたDNA、cDNAまたはmRNAのようなRNAであろう任意の長さの核酸を指す。前記DNAは、一本鎖または二本鎖でありうる。一本鎖DNAは、コーディングセンス鎖であろうし、またはノンコーディングもしくはアンチセンス鎖であろう。治療での使用のため、核酸構築物は、好ましくは、治療される被験者で発現することができる形態である。

40

【0084】

「制御可能に連結した (o p e r a b l y l i n k e d) 」は、核酸を指す場合、核酸が他の核酸配列と機能的な関係に置かれていることを意味する。例えば、プレ配列または分泌リーダ (s e c r e t o r y l e a d e r) としてのDNAは、ポリペプチドの分泌に関与するプレタンパク質として発現する場合、ポリペプチドとしてのDNAと制御可能に連結している；プロモーターまたはエンハンサーは、配列の転写に作用する場合、コード配列と制御可能に連結している；またはリボソーム結合サイトは、翻訳を促進するために配置される場合、コード配列と制御可能に連結している。一般的に、「制御可能に

50

連結した」は、連結したDNA配列が隣接しており、および分泌リーダーの場合、付随的であり、並びにリーディングフレームであることを意味する。しかし、エンハンサーは、隣接している必要はない。連結(linking)は、適当な制限部位でのライゲーションにより達成される。かかる部位が存在しない場合、合成オリゴヌクレオチドアダプターまたはリンカーは、従来のブラクティスに従って使用される。

【0085】

「ファージディスプレイ」は、変異体ポリペプチドが、ファージ粒子、例えば繊維状ファージ粒子の表面で少なくともコートタンパク質の一部との融合タンパク質として提示される手法である。ファージディスプレイ技術は、ランダム化タンパク質変異体の大きなライブラリを調製することができ、高い親和性で標的抗原に結合したそれらの配列を迅速および効率的にソートできる。ファージでのペプチドおよびタンパク質ライブラリのディスプレイは、特異的結合特性をもつポリペプチドのために何百万ものポリペプチドをスクリーニングするために使用できる。ポリバレントファージディスプレイメソッドは、繊維状ファージのコートタンパク質、pIII、pVII、pVI、pVIIまたはpIXをコードする遺伝子への融合を通じて小さなランダムペプチドおよび小さなタンパク質を提示するために用いられている。

【0086】

「ファージミド(phagemid)」は、バクテリア起源の複製、例えばColE1、およびバクテリオファージの遺伝子間領域のコピーを有するプラスミドベクターである。ファージミドは、繊維状バクテリオファージおよびラムダ状バクテリオファージを含む、任意の既知であるバクテリオファージを用いることができる。プラスミドはまた、一般的に、抗生物質耐性のための選択マーカールを含むであろう。これらのベクターにクローン化されたDNAのセグメントは、プラスミドとして増殖できる。これらのベクターを有する細胞がファージ粒子を製造するために必要なすべての遺伝子とともに提供された場合、プラスミドの複製のモードは、プラスミドDNAの一本鎖のコピーを生成し、ファージ粒子をパッケージングするためにローリングサークル複製へ変化する。ファージミドは、感染性または非感染性ファージ粒子を形成するであろう。この用語は、異種ポリペプチドがファージ粒子の表面に提示されるように遺伝子融合として異種ポリペプチド遺伝子と連結したファージコートタンパク質遺伝子またはそのフラグメントを含むファージミドを含む。ファージミドディスプレイベクターの例としては、pWRIL-1がある。

【0087】

用語「ファージベクター(phage vector)」は、異種遺伝子を含み、複製可能である二本鎖複製型のバクテリオファージを意味する。ファージベクターは、ファージ複製およびファージ粒子形成を可能にするファージ起源の複製を有する。前記ファージは、好ましくは、M13、f1、Pf3ファージもしくはそれらの派生体のような繊維状バクテリオファージ、またはラムダ、21、phi80、もしくはそれらの派生体のようなラムダ状ファージである。

【0088】

用語「タンパク質(protein)」は、一般的な用語では、ペプチド結合により互いに結合した複数のアミノ酸残基を意味する。それは、交互に用いられる、ペプチド、オリゴペプチド、オリゴマーまたはポリペプチドと同じ意味であり、糖たんぱく質およびその誘導体を含む。用語「タンパク質」はまた、タンパク質のフラグメント、類似体、変異体および誘導体を含むことを意図し、前記フラグメント、類似体、変異体および誘導体は、基準タンパク質としての生物学的活性または機能と同じものを基本的に保持している。タンパク質類似体および誘導体の例としては、ペプチド核酸、およびDARPin(Designed Ankyrin Repeat Proteins)を含む。「本発明のポリペプチド」は、本明細書において、ICOSL特異的抗原結合分子である。

【0089】

タンパク質のフラグメント、類似体、変異体および誘導体は、少なくとも25、好ましくは30もしくは40、もしくは50もしくは100までの、または60~120のアミ

10

20

30

40

50

ノ酸長であってよく、長さは由来するオリジナルのタンパク質配列の長さに依存する。90～120、100～110のアミノ酸の長さがいくつかの場合においては便利である。

【0090】

タンパク質のフラグメント、誘導體、変異体または類似体は、(i) 1以上のアミノ酸残基が保存されたまたは非保存のアミノ酸残基（好ましくは、保存されたアミノ酸残基）で置換され、このような置換されたアミノ酸残基が遺伝コードによりコードされたものであってもよいし、そうでなくてもよいもの、(ii) 1以上のアミノ酸残基が置換基を含むもの、または(iii) さらなるアミノ酸が、ポリペプチドの精製に用いられるリーダーまたは補助配列のような成熟ポリペプチドに結合したものであってよい。このようなフラグメント、誘導體、変異体または類似体は、本明細書での教示から当業者が有する範囲内であると思われる。

10

【0091】

「オリゴヌクレオチド(oligonucleotides)」は、既知の方法（例えば、固相技術を用いた、ホスホトリエステル、ホスファイト、またはホスホルアミダイトケミストリー）によって化学的に合成された短い長さの、一本鎖または二本鎖のポリデオキシヌクレオチドである。さらなる方法は、遺伝子の全体の核酸配列が公知である、またはコード鎖に相補的な核酸の配列が利用できる場合に用いられるポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を含む。また、ターゲットのアミノ酸配列が公知の場合、それぞれのアミノ酸残基のための公知で好ましいコーディング残基を用いて可能性のある核酸配列を推測できる。オリゴヌクレオチドは、ポリアクリルアミドゲルもしくは分子サイジングカラムまたは沈殿により精製できる。DNAは、DNAが（極性、非極性、イオン性などであろう）非核酸不純物から分離された場合、「精製」される。

20

【0092】

「ソース(source)」または「テンプレート(template)VNAR」は、本明細書において、VNARまたはVNAR抗原結合フラグメントを指し、その抗原結合配列は、本明細書に記載される基準による多様化が実行されたテンプレート配列として働く。抗原結合配列は、VNAR中に、好ましくはフレームワーク領域を含み、好ましくは少なくとも一つのCDRを一般的に含む。

【0093】

「転写調節因子(transcription regulatory element)」は、1以上の下記のコポーネントを含むであろう：エンハンサーエレメント、プロモーター、オペレーター配列、リプレッサー遺伝子、および転写終止配列。

30

【0094】

「形質転換(transformation)」は、細胞がDNAを取り込み、「形質転換細胞(transformant)となるプロセスを意味する。DNA取り込みは、永続的または一過性でありうる。「形質転換細胞」は、DNAに関連した表現型（例えば、DNAによってコードされたタンパク質によって付与される抗生物質耐性）の発現によって示されるようにDNAを取り込み、維持する細胞である。

【0095】

出発または基準ポリペプチド（例えば、ソースVNARまたはそのCDR）の「変異(variant)」または「突然変異(mutant)」、例えば融合タンパク質（ポリペプチド）または異種ポリペプチド（ファージに対する異種）は、(1) 出発または基準ポリペプチドの配列とは異なるアミノ酸配列、および(2) 天然または人工変異のいずれかによる出発または基準ポリペプチドに由来する、ポリペプチドである。かかる変異は、例えば、目的のポリペプチドのアミノ酸配列内の残基の削除、および/または挿入、および/または置換を含む。例えば、(ソースVNARまたは抗原結合フラグメントにおける対応する位置で発見されたアミノ酸に関して) 変異アミノ酸の配列をコードする非ランダムコドンセットを含むオリゴヌクレオチドを用いて生成された本発明の融合ポリペプチドは、ソースVNARまたは抗原結合フラグメントに関する変異ポリペプチドであろう。したがって、変異CDRは、出発または基準ポリペプチド配列（例えば、ソースVNARま

40

50

たは抗原結合フラグメントの配列)に関する変異配列を含むCDRを指す。変異アミノ酸は、この内容において、出発または基準ポリペプチド配列(例えば、ソースVNARまたは抗原結合フラグメントの配列)内の対応する位置でのアミノ酸と異なるアミノ酸を指す。最終の構築物が望ましい機能特性を有することを条件として、削除、挿入、および置換の任意の組み合わせは、最終の変異または突然変異構築物に至るためになされるであろう。アミノ酸の変化はまた、グリコシル化部位の数および位置を変化させるような、ポリペプチドの翻訳後プロセスを変化させることができる。

【0096】

コートタンパク質、またはソースVNARのCDRのような、「野生型(wild-type)」もしくは「基準(reference)」配列または「野生型」もしくは「基準」タンパク質/ポリペプチドの配列は、変異ポリペプチドが突然変異の導入により得られる基準配列でありうる。一般的には、所定のタンパク質の「野生型」配列は、自然の中で最も一般的な配列である。同様に、「野生型」遺伝子配列は、自然の中で最も一般的に発見される遺伝子の配列である。突然変異は、自然のプロセスまたはヒトにより誘発される方法のいずれかを通じて、「野生型」遺伝子(したがって、それがコードするタンパク質)に導入することができる。このようなプロセスの生成物は、オリジナルの「野生型」タンパク質または遺伝子の「変異」または「突然変異」形態である。

10

【0097】

ライブラリ構築

合成ライブラリは、上記の適切な技術のいずれによっても構築することができる。合成ライブラリからVNARを生成する一つの方法は、2013年4月23日に出願されたUS61/815,043からの優先権を主張する2014年4月23日に出願された同時係属中の国際特許出願番号PCT/EP2014/058251にて記載されている(参照により引用される)。

20

【0098】

テンプレート核酸で選択されたアミノ酸を置換する方法は、当技術分野で確立されている。例えば、ライブラリは、クンケル(Kunkel)法(Kunkel et al., Methods Enzymol. (1987), 154, 367-382)を用いて変異アミノ酸をもつアミノ酸置換のための少なくとも一つのCDR領域でのアミノ酸の位置を標的とすることにより作製することができる。したがって、特異的なコドン

30

【0099】

コドンセットは、望ましい変異アミノ酸をコードするために用いられる異なるヌクレオチドトリプレット配列のセットである。コドンセットは、以下で示すように、IUBコードによる、特定のヌクレオチドまたはヌクレオチドの等モル混合物を指定するためにシンボルを用いて表すことができる。

【0100】

IUBコード

- G グアニン(Guanine)
- A アデニン(Adenine)
- T チミン(Thymine)
- C シトシン(Cytosine)
- R (AまたはG)
- Y (CまたはT)
- M (AまたはC)
- K (GまたはT)
- S (CまたはG)
- W (AまたはT)
- H (AまたはCまたはT)
- B (CまたはGまたはT)

40

50

V (AまたはCまたはG)
 D (AまたはGまたはT)H
 N (AまたはCまたはGまたはT)。

【0101】

オリゴヌクレオチドまたはプライマーセットは、標準的な方法を用いて合成することができる。オリゴヌクレオチドのセットは、例えば、コドンセットにより提供されるヌクレオチドトリプレットのすべての可能な組み合わせを表し、望ましい群のアミノ酸をコードするであろう配列を含む、固相合成によって、合成することができる。

【0102】

特定の位置での選択されたヌクレオチド「縮退 (degeneracy)」を有するオリゴヌクレオチドの合成は、当技術分野で公知である。特定のコドンセットを有するそのようなヌクレオチドのセットは、市販の核酸シンセサイザー (例えば、Applied Biosystems, Foster City, CAから入手可能)を用いて合成ことができ、または商業的に入手することができる (例えば、Gene Link Inc, Hawthorn NY、またはLife Technologies, Rockville, MD)。したがって、特定のコドンセットを有する合成されたオリゴヌクレオチドのセットは、全体の配列内のコドンセットにより確立された差異である、異なる配列を有する複数のオリゴヌクレオチドを一般的に含むであろう。本発明により用いられる、オリゴヌクレオチドは、可変ドメイン核酸テンプレートにハイブリダイゼーションでき、またクローニング目的のための制限酵素部位を含むことができる配列を有する。

10

20

【0103】

その他のソースまたはテンプレート分子をコードする核酸は、公知である、または容易に決定することができる。一般的に、少なくとも25ヌクレオチドの長さのオリゴヌクレオチドが使用される。最適なオリゴヌクレオチドは、突然変異をコードするヌクレオチドのいずれのサイドでのテンプレートと完全に相補的である12~15ヌクレオチドを有するであろう。このことは、オリゴヌクレオチドが一本鎖DNAテンプレート分子へと適切にハイブリダイズするであろうことを確保する。オリゴヌクレオチドは、Crea et al., Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA, (1987) 75: 5765に記載されているような当技術分野で公知の技術を用いて容易に合成される。

30

【0104】

DNAテンプレートは、バクテリオファージM13ベクター (商業的に入手可能なM13mp18およびM13mp19ベクターが適切である)、またはViera et al., Methods Enzymol., (1987) 153, 3に記載の一本鎖ファージ起源の複製を含むこれらのベクターのいずれかに由来するベクターにより生成することができる。したがって、突然変異されたDNAは、一本鎖テンプレートを生成するために、それらのベクターの一つに挿入することができる。

【0105】

ネイティブなDNA配列を変化させるために、オリゴヌクレオチドは、適切なハイブリダイゼーション条件下で、一本鎖テンプレートにハイブリダイズされる。DNA合成酵素 (DNA polymerizing enzyme)、通常ではT7DNAポリメラーゼまたはDNAポリメラーゼIのクレノウ断片は、その後、合成のプライマーとしてオリゴヌクレオチドを用いてテンプレートの相補鎖を合成するために加えられる。したがって、ヘテロ2本鎖分子は、DNAの一方の鎖がコード配列1の突然変異形態をコードし、もう一方の鎖 (オリジナルテンプレート) がネイティブ、コード配列1の変化していない配列をコードするために形成される。そして、ヘテロ2本鎖分子は、適切な宿主細胞、通常はE. Coli JM101のような原核生物内で形質変換される。細胞の増殖後、それらは、アガロースプレート上にプレーティングされ、突然変異DNAを含むバクテリアのコロニーを同定するために³²P-ホスフェートで放射性標識されたオリゴヌクレオチドプ

40

50

ライマーを用いてスクリーニングされる。

【0106】

直前に記載の方法は、ホモ2本鎖分子を生成するために改変することができ、この際、プラスミドの両方の鎖は、突然変異を含む。改変は、以下のとおりである：一本鎖オリゴヌクレオチドは、上述した通り、一本鎖テンプレートにアニールされる。3つのデオキシリボヌクレオチド、デオキシリボアデノシン(dATP)、デオキシリボグアノシン(dGTP)、およびデオキシリボチミジン(dTT)の混合物は、dCTP-(aS)(Amershamから得ることができる)と呼ばれる改変したチオデオキシリボシトシンと組み合わせられる。この混合物は、テンプレート-オリゴヌクレオチドコンプレックスに加えらる。この混合物にDNAポリメラーゼを添加すると、突然変異した塩基を除き、テンプレートと同じDNAの鎖が生成される。加えて、このDNAの新たな鎖は、dCTPの代わりにdCTP-(aS)を含み、このことは、制限エンドヌクレアーゼ消化からそれを保護するために役立つ。2本鎖のヘテロ2本鎖のテンプレート鎖は、適切な制限酵素でニックされた後、テンプレート鎖は、突然変異が誘発された部位を含む領域を越えて、ExoIIヌクレアーゼまたはその他の適切なヌクレアーゼで消化することができる。反応は、その後、部分的に一本鎖だけである分子を残すために停止される。完全な2本鎖DNAホモ2本鎖は、次に、4つのデオキシリボヌクレオチド三リン酸、ATP、およびDNAリガーゼすべての存在下、DNAポリメラーゼを用いて形成される。そして、このホモ2本鎖分子は、適切な宿主細胞内で形質転換することができる。

10

【0107】

先で示したように、オリゴヌクレオチドセットの配列は、テンプレート核酸とハイブリダイズするのに十分な長さであり、また、必ずしも必要ではないが、制限部位を含むことができる。DNAテンプレートは、バクテリオファージM13ベクターまたはVieret al. (Meth. Enzymol. (1987), 153, 3)に記載された一本鎖ファージ起源の複製を含むベクターのいずれかに由来するベクターにより生成することができる。したがって、突然変異されるDNAは、一本鎖テンプレートを生成するために、それらのベクターの一つに挿入されなければならない。

20

【0108】

オリゴヌクレオチドセットは、核酸カセット(cassette)を作製するためのテンプレートとして核酸テンプレート配列を用いてポリメラーゼ連鎖反応にて使用することができる。核酸テンプレート配列は、VNAR分子の任意の部分(すなわち、置換のターゲットとされるアミノ酸をコードする核酸配列)でありうる。核酸テンプレート配列は、第1の核酸鎖と補完的な第2の核酸鎖とを有する二本鎖DNA分子の一部である。核酸テンプレート配列は、少なくともVNARDメインの一部を含み、少なくとも一つのCDRを有する。いくつかのケースにおいて、核酸テンプレート配列は、一つ以上のCDRを含む。核酸テンプレート配列の上流部分と下流部分は、上流のオリゴヌクレオチドセットおよび下流のオリゴヌクレオチドセットのメンバーとともにハイブリダイゼーションのために標的化することができる。

30

【0109】

上流のプライマーセットの第1のオリゴヌクレオチドは、第1の核酸鎖とハイブリダイズすることができる。下流のプライマーセットの第2のオリゴヌクレオチドは、第2の核酸鎖とハイブリダイズすることができる。オリゴヌクレオチドプライマーは、1以上のコドンセットを含むことができ、核酸テンプレート配列の一部とハイブリダイズするために設計することができる。それらのオリゴヌクレオチドの使用は、PCR後のPCR生成物(すなわち、核酸カセット)に2以上のコドンセットを導入することができる。VNARDメインをコードする核酸配列の領域とハイブリダイズするオリゴヌクレオチドプライマーは、アミノ酸置換のために標的化されたCDR残基をコードする部分を含む。

40

【0110】

上流および下流のオリゴヌクレオチドセットはまた、オリゴヌクレオチド配列内に制限部位を含むために合成することができる。それらの制限部位は、追加のVNAR配列を有

50

する発現ベクター内に核酸カセット（すなわち、PCR反応生成物）の挿入を促進できる。

【0111】

タンパク質発現

本発明の抗原特異的抗原結合分子をコードする核酸配列は、核酸構築物に存在してもよい。このような核酸構築物は、ベクターの形態、例えば、発現ベクターであることができ、とりわけ、染色体の、エピソームの、およびウイルス由来のベクター、例えば、バクテリア由来の、バクテリオファージ由来の、トランスポゾン由来の、酵母エピソーム由来の、挿入エレメント由来の、酵母染色体エレメント由来の、バクテリオウイルス、SV40のようなパポウイルス、ワクチニアウイルス、アデノウイルス、牛痘ウイルス、仮性狂犬病ウイルスおよびレトロウイルスのようなウイルス由来のベクター、ならびに、プラスミドおよびバクテリオファージ遺伝エレメント、例えば、コスミドおよびファージミドのような、これらの組み合わせ由来のベクターを含むことができる。一般的に、宿主内でポリペプチドを発現するために核酸を維持、増殖または発現するために適切な任意のベクターは、この点について発現のために使用することができる。

10

【0112】

核酸構築物は、適切には、核酸の発現を制御するプロモーターまたはその他の調節配列を含むことができる。核酸の発現を制御するプロモーターおよびその他の調節配列は、同定されており、当技術分野で公知である。当業者は、全体のプロモーターまたはその他の調節配列を利用する必要がないであろうことが分かるであろう。最小の必須な調節エレメントだけが要求されるであろうし、実際、このようなエレメントは、キメラ配列またはその他のプロモーターを構築するために使用できる。必須の要件は、もちろん、組織および/または時間的特異性を維持することである。プロモーターは、任意の適切な公知のプロモーター、例えば、ヒトサイトメガロウイルス（CMB）プロモーター、CMV最初期（immediate early）プロモーター、HSVチミジンキナーゼ、SV40 earlyおよびlateプロモーター、または腫瘍ウイルス（RSV）のようなレトロウイルスLTRsのプロモーターおよびマウスメタロチオネイン-Iプロモーターのようなメタロチオネインプロモーターであってよい。プロモーターは、プロモーター活性のために構成される最小を含むことができ、例えば、CMVプロモーターの最小配列である。好ましくは、プロモーターは、核酸配列に隣接している。

20

30

【0113】

本明細書において、核酸構築物は、ベクターの形態でありうる。ベクターは、それらでトランスフェクトされた（または形質転換された）細胞を選別可能な、および好ましくは、異種DNAを組み込んだベクターを含む細胞の選別が可能で、1以上の発現マーカーをしばしば含む。適切なスタートおよびストップシグナルは、一般的に存在するであろう。

【0114】

ベクターは、pETのような、任意の適切な発現ベクターでありうる。ベクターは、必要に応じて、例えば、選択マーカー（例えば、抗生物質耐性、蛍光など）、開始および終結配列を含む、転写制御配列およびプロモーター、そのような追加の制御配列を含むことができる。

40

【0115】

プロモーターは、例えば、CMVプロモーター、ヒトホスホグリセリン酸キナーゼ（hPGK）プロモーターのような、本発明の核酸配列によってコードされるタンパク質の発現を引き起こすための任意のプロモーターでありうる。

【0116】

このようなベクターは、宿主細胞に存在するであろう。本発明の核酸構築物の発現に適した宿主細胞の代表的な例は、ウイルスベクター；バクテリア細胞、例えば、連鎖球菌（Streptococci）、ブドウ球菌（Staphylococci）、大腸菌（E. coli）、ストレプトマイセス（Streptomyces）および枯草菌（Bacillus subtilis）；酵母細胞のような、単細胞（single cell

50

s)、例えば、出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)、およびコウジカビ (*Aspergillus*) 細胞；昆虫細胞、例えば、ショウジョウバエ (*Drosophila*) S2 およびスポドプテラ (*Spodoptera*) 細胞、動物細胞、例えば、CHO、COS、C127、3T3、PHK.293、およびBowesメラノーマ細胞ならびにその他の適切なヒト細胞；ならびに植物細胞、例えば、シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) に核酸のカプセル化を可能にするウイルスパッケージングセルを含む。適切には、宿主細胞は、真核細胞であり、例えば、CHO細胞またはHEK293細胞である。

【0117】

宿主細胞への発現ベクターの導入は、リン酸カルシウムトランスフェクション、DEAE-デキストラン媒介トランスフェクション、マイクロインジェクション、カチオン性-リピッド-媒介トランスフェクション、エレクトロポレーション、形質導入、スクレープローディング、パリスティック導入、感染、またはその他の方法により達成できる。このような方法は、Sambrook et al, *Molecular Cloning, a Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)* のような、多くの標準的な実験室マニュアルに記載されている。

10

【0118】

成熟タンパク質は、適切なプロモーターの制御下、CHO細胞のような哺乳類細胞、酵母、バクテリア、またはその他の細胞を含む、宿主細胞内で発現することができる。無細胞翻訳系 (*Cell-free translation systems*) は、本発明の第3の態様の核酸構築物に由来するRNAを用いてこのようなタンパク質を生成するために使用できる。原核生物および真核生物で用いるための適切なクローニングおよび発現ベクターは、Sambrook et al, *Molecular Cloning, a Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)* に記載されている。

20

【0119】

本発明はまた、本明細書に記載の発明のポリヌクレオチドおよび/またはベクターのいずれかを含む宿主細胞を提供する。本発明によれば、本明細書における、適切な宿主細胞内に当該分子をコードする核酸配列を発現する工程を含む、本発明の抗原特異的抗原結合分子の製造方法を提供する。

30

【0120】

タンパク質は、硫酸アンモニウムまたはエタノール沈殿、酸抽出、陰イオンまたは陽イオン交換クロマトグラフィー、ホスホセルロースクロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー、レクチンおよび/またはヘパリンクロマトグラフィーを含む標準的な方法により組換え細胞培養から回収し、精製することができる。治療のため、核酸構築物 (例えば組換えベクターの形態) は、Sambrook et al, *Molecular Cloning, a Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)* に記載のカラムクロマトグラフィーのような、当技術分野で公知の技術により生成することができる。

40

【0121】

したがって、本発明のこの態様は、宿主細胞で発現することにより組み換えられた融合タンパク質の製造、ペプチド結合、水素もしくは塩結合、または化学的架橋による、発現した融合タンパク質の精製を含む本発明の融合タンパク質の調製方法にも及ぶ。本発明のこの態様のいくつかの実施形態において、融合タンパク質は、例えば、二量体または三量体などの多量体を可能にする水素または塩結合を用いて調製することができるであろう。

50

【 0 1 2 2 】

ライブラリとしてのタンパク質発現

タンパク質のライブラリの形態におけるタンパク質発現は、任意の適切な技術により達成することができる。ライブラリのタンパク質の発現の一つの方法は、2013年4月23日に出願されたUS 61/815,043からの優先権を主張する2014年4月23日に出願された同時係属中の国際特許出願番号PCT/EP2014/058251にて記載されている(参照により引用される)。

【 0 1 2 3 】

例として、核酸カセットは、生成された標的化アミノ酸置換を含むVNARの一部または全体の発現のための任意の適切なベクターにクローニングすることができる。核酸カセットは、ウイルスコートタンパク質のすべてまたは一部と融合した(例えば、融合タンパク質を作製すること)VNAR鎖配列の一部または全体を生産でき、粒子または細胞の表面に提示されるベクターにクローニングすることができる。いくつかのタイプのベクターは利用可能であり、本発明を実施するために使用できる一方、比較的容易に構築することができ、容易に増幅することができるため、ファージミドベクターが、本明細書で使用するための好ましいベクターである。ファージミドベクターは、プロモーター、シグナル配列、表現型選択遺伝子、複製部位の起点、およびその他の必要なコンポーネントを含む様々なコンポーネントを通常含む。

10

【 0 1 2 4 】

他の実施形態、この際、特定の変異アミノ酸の組み合わせが発現できる場合において、核酸カセットは、VNAR配列のすべてまたは一部をコードでき、および変異アミノ酸の組み合わせをコードできる配列を含む。それらの変異アミノ酸または変異アミノ酸の組み合わせを含む抗原特異的抗原結合分子の製造のため、核酸カセットは、追加のVNAR配列、例えば様々なCDR、フレームワークおよび/または超可変領域のすべてまたは一部を含む発現ベクターに挿入することができる。それらの追加配列はまた、ウイルスコートタンパク質コンポーネントをコードし、よって融合タンパク質を製造できる配列のような、その他の核酸配列と融合することができる。

20

【 0 1 2 5 】

本発明の一つの態様は、遺伝子融合をコードする核酸配列を含む複製可能な発現ベクターを含み、この際、遺伝子融合は、ウイルスコートタンパク質のすべてまたは一部へ融合した、VNAR配列および第2のVNAR配列を含む融合タンパク質をコードする。ベクターは、様々なコンポーネントを含むことができ、好ましくは、異なるベクター間のVNAR配列の移動を可能にするため、および/または異なるフォーマットにおける融合タンパク質のディスプレイを提供するために構築される。

30

【 0 1 2 6 】

ベクターの例は、ファージベクターを含む。ファージベクターは、ファージの複製およびファージ粒子の形成を可能にするファージの複製起点を有する。ファージは、好ましくは、M13、f1、fd、Pf3ファージもしくはそれらの派生体のような繊維状ファージ、またはラムダ、21、phi80、82、424、434など、もしくはそれらの派生体のようなラムダ様ファージである。

40

【 0 1 2 7 】

ウイルスコートタンパク質の例は、感染性タンパク質PIII、メジャーコートタンパク質PVIII、p3、Soc(T4)、Hoc(T4)、(バクテリオファージラムダの)gpD、マイナーバクテリオファージコートタンパク質6(pVI)(繊維状ファージ; Hufton et al, J Immunol Methods, (1999), 231, (1-2): 39-51)、M13バクテリオファージメジャーコートタンパク質(P8)のバリエーション(Weiss et al, Protein Sci (2000) 9 (4): 647-54)を含む。融合タンパク質は、ファージの表面に提示することができ、適切なファージシステムは、M13K07ヘルパーファージ、M13R408、M13-VCS、およびPhi X 174、pJuf0ファージ

50

システム (Pereboev et al J Virol. (2001); 75 (15): 7107-13)、ならびにハイパーファージ (Rondot et al Nat Biotechnol. (2001); 19(1): 75-8) を含む。好ましいヘルパーファージは、M13K07であり、好ましいコートタンパク質は、M13ファージ遺伝子IIIコートタンパク質である。好ましい宿主は、E. coliであり、E. coliのプロテアーゼ欠損株である。fth1ベクター (Enshell-Selijffers et al., Nucleic Acids Res. (2001); 29(10): E50-0) のような、ベクターは、融合タンパク質の発現に有用でありうる。

【0128】

発現ベクターはまた、各VNARまたはそのフラグメントをコードするDNAへと融合した分泌シグナル配列を有することができる。この配列は、一般的には、遺伝子の5'のすぐに位置しており、したがって、融合タンパク質のアミノ末端で転写されるであろう。しかし、あるケースでは、シグナル配列は、分泌されるタンパク質をコードする遺伝子の5'以外の部位に位置することが示されている。この配列は、バクテリア細胞の内膜にわたり結合しているタンパク質をターゲットにする。シグナル配列をコードするDNAは、シグナル配列を有するタンパク質をコードする任意の遺伝子から制限エンドヌクレアーゼ断片として得ることができる。適切な原核生物のシグナル配列は、例えば、LamBまたはOmpF (Wong et al, Gene, (1983) 68, 1931)、MalE、PhoAをコードする遺伝子およびその他の遺伝子から得ることができる。

【0129】

本発明を実施するための好ましい原核生物のシグナル配列は、Chang et al (Gene 55, 189 (1987)) に記載のE. coli耐熱性エンテロトキシンII (STII) シグナル配列、およびMalEである。

【0130】

ベクターはまた、融合タンパク質の発現を駆動するためのプロモーターを通常含む。原核生物のベクターで最も一般的に用いられるプロモーターは、lacZプロモーターシステム、アルカリホスファターゼphoAプロモーター (Ap)、バクテリオファージXP Lプロモーター (温度感受性プロモーター)、tacプロモーター (lacリプレッサーにより調節されるハイブリッドtrp-lacプロモーター)、トリプトファンプロモーター、およびバクテリオファージT7プロモーターを含む。一般的なプロモーターの説明は、上記Sambrook et al. のセクション17を参照。それらは、最も一般的に用いられるプロモーターであるが、その他の適切な微生物のプロモーターも同様に、使用することができる。

【0131】

ベクターはまた、その他の核酸配列を含むことができ、例えば、ファージまたは細胞の表面に発現した融合タンパク質の検出または精製に有用でありうる、gDタグ、c-Mycエピトープ、ポリ-ヒスチジンタグ、蛍光タンパク質 (例えば、GFP)、または、-ガラクトシダーゼタンパク質をコードする配列である。

【0132】

例えば、gDタグをコードする核酸配列はまた、融合タンパク質を発現する細胞またはウイルスのポジティブまたはネガティブ選択を提供する。いくつかの実施形態において、gDタグは、好ましくは、ウイルスコートタンパク質コンポーネントに融合しないVNAR配列に融合される。例えば、ポリヒスチジンタグをコードする核酸配列は、免疫組織化学作用を用いて特異的抗原に結合するVNAR配列を含む融合タンパク質を同定するために有用である。抗原結合を検出するのに有用なタグは、ウイルスコートタンパク質コンポーネントに結合しないVNAR配列またはウイルスコートタンパク質コンポーネントに融合するVNAR配列のいずれかに融合することができる。

【0133】

本発明を実施するために用いられるベクターの別の有用なコンポーネントは、表現型選

10

20

30

40

50

択遺伝子である。典型的な表現型選択遺伝子は、宿主細胞に抗生物質耐性を付与するタンパク質をコードする遺伝子である。実例として、アンピシリン耐性遺伝子（AMP^r）、およびテトラサイクリン耐性遺伝子（Tet^r）が、この目的のために容易に利用される。

【0134】

ベクターはまた、ユニークな制限部位および抑制可能なストップコドンを含む核酸配列を含む。ユニークな制限部位は、異なるベクターと発現システムとの間のVNAR配列の移動のために有用である。抑制可能なストップコドンは、融合タンパク質の発現レベルを制御し、可溶性VNARの精製を容易にするために有用である。例えば、アンバーストップコドンは、ファージディスプレイを可能にするためにsupE宿主内でGlnとして読むことができ、一方、non-supE宿主では、ファージコートタンパク質への融合をせず、可溶性VNARフラグメントを生成するためにストップコドンとして読まれる。それらの合成配列は、ベクター内の1以上のVNAR配列に融合することができる。

10

【0135】

目的の配列、例えば、変異アミノ酸を有するCDRをコードする核酸をベクターシステムから容易に取り除き、別のベクターシステムに入れることができるベクターシステムを用いることが便利であろう。例えば、適切な制限部位は、VNARをコードする核酸配列の除去を容易にするためにベクターシステムで操作できる。制限配列は、ベクター内で唯一であるために通常選択され、効率的な切除と新たなベクターへのライゲーションを容易にする。VNAR配列は、その後、ウイルスコートタンパク質またはその他の配列タグのような、外来の融合配列なしで、ベクターから発現することができる。

20

【0136】

VNAR配列をコードする核酸（gene1）とウイルスコートタンパク質コンポーネント（gene2）との間に、終止またはストップコドンをコードするDNAを挿入してもよく、かかる終止コドンは、UAG（アンバー）、UAA（オーカー）およびUGA（オパール）を含む（Microbiology, Davis et al., Harper & Row, New York, 1980, pp. 237, 245-47 and 374）。野生型宿主細胞で発現した終止またはストップコドンは、連結したgene2タンパク質なしで、gene1タンパク質生成物の合成をもたらす。しかし、サプレッサー宿主細胞での増殖は、検出可能な量の融合タンパク質の合成をもたらす。このようなサプレッサー宿主細胞は、よく知られており、記載されており、例えば、E. coliサプレッサー株である（Bullock et al., BioTechniques 5: 376-379 (1987)）。任意の許容できる方法は、このような終止コドンを融合ポリペプチドをコードするmRNAに配置するために用いることができる。

30

【0137】

抑制可能なコドンは、VNAR配列をコードする第1の遺伝子と、少なくともファージコートタンパク質の一部をコードする第2の遺伝子との間に挿入することができる。また、抑制可能な終止コドンは、VNAR配列内の最後のアミノ酸トリプレットまたはファージコートタンパク質内の最初のアミノ酸を置き換えることにより融合部位に隣接して挿入することができる。抑制可能な終止コドンは、二量体化ドメインのC-末端にまたはその後位置することができる。抑制可能なコドンを含むプラスミドがサプレッサー宿主細胞内で増殖した場合、ポリペプチドおよびコートタンパク質を含む融合ポリペプチドの検出可能な生成物をもたらす。プラスミドが、非サプレッサー宿主細胞内で増殖した場合、VNAR配列は、挿入された抑制可能なトリプレットUAG、UAA、またはUGAでの終止により、ファージコートタンパク質への融合なしで実質的に合成される。非サプレッサー細胞において、抗体可変領域は、合成され、さもないと宿主の膜に固定される、融合ファージコートタンパク質の不在により、宿主細胞から分泌される。

40

【0138】

本発明の抗原特異的抗原結合分子

50

本発明の特定の実施形態において、抗原特異的抗原結合分子は、図9で示される群から選択されるアミノ酸配列を有する。

【0139】

本発明の一実施形態において、抗原特異的抗原結合分子は、HGMPにより提供されるBLASTコンピュータプログラムのデフォルトパラメータを用いて、50%の同一性、または少なくとも60%、70%、80%、90%、95%もしくは99%の同一性を有する配列を含む、図9、または任意の変異体、類似体、誘導体もしくはそのフラグメントで表されるアミノ酸配列である。本発明の一実施形態において、抗原特異的抗原結合分子は、ヒト化される。約20%から約85%のヒト化、例えば約20%から約60%のヒト化で本発明のヒト化結合分子を提供することが便利であろう。VNARDメインのヒト化は、かねてより行われており(WO 2013/167883; Kovalenka, O. V., et al., J. Biol. Chem., 2012. 288(24): p. 17408-17419)、機能性のロスを最小限に抑えて、ヒト抗体フレームワークに対するアミノ酸残基の同一性率を増加する能力を例示している。アブラツノザメに由来した、抗ヒトアルブミン結合VNARE6は、ヒト化され(E06 patent reference; Kovalenka, O. V., et al., J. Biol. Chem., 2012. 288(24): p. 17408-17419)、標的への結合能力を維持している。ELSS1ライブラリ(2Vおよび5Vとして知られる)からの融合アイソタイプフレームワークはまた、アブラツノザメに由来しており、そのため、E06のフレームワークに対して、図9A(1D12)の例えば抗ヒトICSLのフレームワーク残基にわたり92%の同一性である。合成抗ヒトICOSLドメインは、同じ方法を用いてヒト化できるであろうことが予測されるであろう。同じことが、ヒト化もされている、抗HELDメイン、5A7に類似する、テンジクザメタイプドメインである免疫化抗ヒトICOSLドメインにも当てはまる(WO 2013/167883; Kovalenka, O. V., et al., J. Biol. Chem., 2012. 288(24): p. 17408-17419)。

【0140】

抗原特異的抗原結合分子は、本明細書に記載の分子の製造のためのプロセスの間、精製および/または単離で補助することができる使用に先立ち追加の切断されたN末端またはC末端配列を含むであろう。例えば、分子のC末端の(Ala)₃(His)₆。

【0141】

いくつかの、例えば、5から20、もしくは1から5、もしくは1から3、2、1のアミノ酸残基が置換され、削除されもしくは任意の組み合わせで付加された、またはアミノ酸残基が、置換されず、削除されずもしくは任意の組み合わせで付加されないタンパク質のアミノ酸配列を有する変異体、類似体、誘導体およびフラグメントもまた、本発明に含まれる。それらの中でも特に好ましくは、サイレント置換、付加および削除であり、これらは、本発明のタンパク質の特性や活性を変化させない。また、これに関して特に好ましくは、本発明のタンパク質の特性が、オリジナルの形態に対し変異体の形態で保存される保存的置換である。変異体はまた、本発明による抗原特異的抗原結合分子を含む、融合タンパク質を含む。

【0142】

上述したように、本発明の変異体の例は、1以上のアミノ酸と1以上のその他のアミノ酸との置換があるタンパク質を含む。当業者は、さまざまなアミノ酸が類似した特性を有することを認識している。物質の1以上のかかるアミノ酸は、物質の望ましい活性を阻害または排除することなく、1以上のその他のかかるアミノ酸によって、しばしば置換することができる。このような物質は、「非保存(non-conservative)」アミノ酸置換と呼ばれている。

【0143】

したがって、アミノ酸のグリシン、アラニン、バリン、ロイシンおよびイソロイシンは

10

20

30

40

50

、互いに、しばしば置換されうる（脂肪族側鎖を有するアミノ酸）。これらの可能な置換から、グリシンおよびアラニンが、互いに置換するために用いられ（それらが比較的短い側鎖を有するため）、バリン、ロイシンおよびイソロイシンが、互いに置換するために用いられる（それらが疎水性であるより大きな脂肪族鎖を有するため）ことが好ましい。しばしば互いに置換されうるその他のアミノ酸は、フェニルアラニン、チロシンおよびトリプトファン（芳香族側鎖を有するアミノ酸）；リジン、アルギニンおよびヒスチジン（塩基性側鎖を有するアミノ酸）；アスパラギン酸およびグルタミン酸（酸性の側鎖を有するアミノ酸）；アスパラギンおよびグルタミン（アミド側鎖を有するアミノ酸）；ならびにシステインおよびメチオニン（側鎖を含む硫黄を有するアミノ酸）を含む。この性質を有する置換は、しばしば「保存的（conservative）」または「半保存的（semi-conservative）」アミノ酸置換と呼ばれる。

10

【0144】

アミノ酸の削除または挿入はまた、上記融合タンパク質のアミノ酸配列に対してなされうる。したがって、例えば、ポリペプチドの活性に実質的に影響を与えない、または少なくともともそのような活性を排除しないアミノ酸は、削除することができる。このような削除は、いまだ活性を保持しながら、全体の長さおよびポリペプチドの分子量を減らすことができるので、有利でありうる。このことは、減らすという特定の目的、例えば、投与レベルを減らすことができるために必要なポリペプチドの量を可能にする。

【0145】

上記融合タンパク質の配列に対するアミノ酸の挿入もまた、なされうる。このことは、本発明の物質の性質を変化するためになされるであろう（例えば、融合タンパク質に関連して上記で説明したように、同定、精製または発現をアシストするために）。

20

【0146】

本発明の融合タンパク質の配列に対するアミノ酸変化は、任意の適切な技術を用いて、例えば、部位特異的突然変異誘発法を用いることによりなされうる。

【0147】

本発明の範囲内のアミノ酸の置換または挿入は、天然または非天然アミノ酸を用いてすることができる。天然または合成アミノ酸を用いるであろうとなかろうと、Lアミノ酸だけが存在することが好ましい。

【0148】

本発明のタンパク質は、追加のN末端および/またはC末端アミノ酸配列を有することができる。このような配列は、さまざまな理由、例えばグリコシル化のために供することができる。

30

【0149】

融合タンパク質は、融合タンパク質の構造要素を提供する異種ペプチドまたはタンパク質配列に融合した本発明の抗原特異的抗原結合分子を含むことができる。その他の実施形態において、融合タンパク質は、生物学的活性を有する分子と融合した本発明の抗原特異的抗原結合分子を含むことができ、すなわち薬理的に有用な活性を有する治療用タンパク質である。分子は、ペプチドもしくはタンパク質配列、またはそのたの生物学的に活性な分子でありうる。

40

【0150】

例えば、抗原特異的抗原結合分子は、ポリアミノ酸配列、例えば複数のヒスチジン残基もしくは複数のリジン残基（適切には、2、3、4、5、もしくは6残基）、または免疫グロブリンドメイン（例えば、Fcドメイン）でありうる異種ペプチド配列に融合することができる。

【0151】

異種ペプチド配列へのリファレンスは、マウスおよびヒトのような、その他の哺乳類種からの配列およびその他のVNARドメインに由来する任意の異種ペプチド配列を含む。

【0152】

融合タンパク質が生物学的活性を有する分子と融合した本発明の抗原特異的抗原結合分

50

子を含む場合、生物学的に活性な部分は、酵素、免疫グロブリン、サイトカインまたはそれらのフラグメントのような生物学的活性を有するペプチドまたはタンパク質でありうる。また、生物学的に活性な分子は、抗生物質、抗ガン薬、NSAID、ステロイド、鎮痛剤、トキシンまたはその他の薬剤的に活性な剤でありうる。抗ガン薬は、細胞毒性または細胞増殖抑制薬を含むことができる。

【0153】

いくつかの実施形態において、融合タンパク質は、その他の免疫グロブリン可変もしくは定常領域、またはその他の本発明の抗原特異的抗原結合分子に融合した本発明の抗原特異的抗原結合分子を含むことができる。言い換えると、本発明の抗原特異的抗原結合分子の融合は、可変長、例えば、二量体、三量体、四量体またはそれ以上の高次多量体（すなわち、五量体、六量体、七量体、八量体、九量体もしくは十量体またはそれ以上）でありうる。特定の実施形態において、単量体VNARサブユニットの多量体として表すことができる。

10

【0154】

例えば、VNAR CDRが追加のペプチド配列に融合する場合、前記追加のペプチド配列は、ウイルス粒子または細胞の表面の1以上の融合ポリペプチドの相互作用を提供できる。したがって、これらのペプチド配列は、「二量体形成領域(dimerization domains)」とすることができる。二量体形成領域は、少なくとも1以上の二量体化配列、もしくは少なくともシステイン残基を含む一つの配列またはその両方を含むことができる。適切な二量体化配列は、両親媒性ヘリックスを有するタンパク質の二量体化配列を含み、前記ヘリックスにおいて、疎水性残基は、規則的に配置され、各タンパク質の疎水性残基の相互作用によって二量体を形成することができ；かかるタンパク質およびタンパク質の部分は、例えば、ロイシンジッパー領域を含む。

20

【0155】

二量体化ドメインはまた、1以上のシステイン残基（例えば、二量体化ドメインの抗体ヒンジ配列の含有により提供される）を含むことができる。前記ヒスチジン残基は、1以上のジスルフィド結合の形成によって二量体化を提供できる。一実施形態において、ストップコドンは、二量体化ドメイン後に存在し、二量体化ドメインは、少なくとも一つのシステイン残基を含む。二量体化ドメインは、好ましくは、抗体可変または定常ドメインとウイルスコートタンパク質コンポーネントとの間に位置される。

30

【0156】

本発明の融合タンパク質において、抗原特異的抗原結合分子は、融合タンパク質のその他のエレメントとリンカー部分を介して直接融合または結合できる。前記リンカーは、ペプチド、ペプチド核酸、またはポリアミド結合でありうる。適切なポリペプチドリリンカーは、複数のアミノ酸残基、例えば、(Gly)₄、(Gly)₅、(Gly)₄Ser、(Gly)₄(Ser)(Gly)₄のような、4、5、6、7、8、9、10、15、20もしくは25のアミノ酸、もしくはそれらの組み合わせ、またはそれらの多量体（たとえば、二量体、三量体、もしくはそれ以上）を含みうる。例えば、適切なリンカーは、(GGGGS)₃でありうる。また、リンカーは、(Ala)₃(His)₆またはその多量体を含む。HGMPにより提供されたBLASTコンピュータプログラムのデフォルトパラメータを用いて、少なくとも50%、60%、70%、80%、90%、95%または99%の同一性を有する配列もまた含まれる。

40

【0157】

いくつかの実施形態において、ベクターは、コートタンパク質に融合した単一VNAR-ファージポリペプチドをコードする。これらの場合において、ベクターは、特定のプロモーターの制御下、一つのトランスクリプトを発現する、「モノシストロニック(monocistronic)」であると考えられる。

【0158】

このようなベクターの具体例は、アルカリホスファターゼ(AP)またはTacプロモーターを利用して、ドメイン間のリンカーペプチドを有する、VNAR領域をコードする

50

モノシストロニック配列の発現を駆動する。シストロニック配列は、5'末端で、E. coli MalEまたは耐熱性エンテロトキシンII (STII)シグナル配列と、およびその3'末端でウイルスコートタンパク質(例えば、pIIIタンパク質)のすべてまたは部分と結合することができる。ベクターはさらに、第2の可変ドメイン配列とウイルスコートタンパク質配列との間に、その3'末端に二量体化ドメイン(例えば、ロイシンジッパー)をコードする配列を含むことができる。二量体化ドメインを含む融合ポリペプチドは、2つのポリペプチドの複合体を形成するために二量体化することができる。

【0159】

その他の場合において、VNAR配列(複数のVNAR配列またはフラグメント)は、別のポリペプチドとして発現することができ、したがってベクターは「バイシストロニック」であり、別のトランスクリプトを発現できる。これらのベクターにおいて、PtacまたはPhoAプロモーターのような、適切なプロモーターは、バイシストロニックメッセージの発現を駆動するために用いることができる。例えば、第1のVNAR配列をコードする、第1のシストロンは、5'末端でE. coli MalEまたは耐熱性エンテロトキシンII (STII)シグナル配列と、および3'末端でgDタグをコードする核酸配列と結合することができる。例えば、第2のVNAR配列をコードする、第2のシストロンは、5'末端でE. coli MalEまたは耐熱性エンテロトキシンII (STII)シグナル配列と、および3'末端でウイルスコートタンパク質のすべてまたは部分と結合することができる。

10

【0160】

例えば、ベクターは、5'末端でE. coli MalEまたは耐熱性エンテロトキシンII (STII)シグナル配列と、および3'末端でgDタグをコードする核酸配列と、制御可能に結合されたVNAR配列をコードする第1のシストロンの発現を駆動するPtacまたはPhoA (AP)プロモーターのような適切なプロモーターを、含むことができる。第2のシストロンは、例えば、5'末端でE. coli MalEまたは耐熱性エンテロトキシンII (STII)シグナル配列と、および少なくともウイルスコートタンパク質の部分が続く、IgGヒンジ配列およびロイシンジッパー配列を含む二量体化ドメインを有する3'末端と、作動可能に結合されたその他のVNAR配列をコードする。

20

【0161】

VNAR配列の融合ポリペプチドは、様々なフォーマットで細胞、ウイルスまたはファージミド粒子の表面にディスプレイすることができる。これらのフォーマットは、一本鎖フラグメントおよび多価の形態のこれらのフラグメントを含む。前記多価の形態は、二量体、またはそれ以上の多量体でありうる。多価の形態のディスプレイは、それらが、一般的に低い親和性クローンの同定につながり、また選択過程の間、稀なクローンのより効果的な選別を可能にする、1以上の抗原結合部位を有するため、便利であろう。

30

【0162】

本発明の記載により構築されたベクターは、増幅および/または発現のために宿主細胞に導入される。ベクターは、エレクトロポレーション、リン酸カルシウム沈殿などを含む標準の形質転換法を用いて宿主細胞に導入できる。ベクターがウイルスのような感染粒子である場合、前記ベクター自体が、宿主細胞への侵入を提供する。標準的な手順による遺伝子融合およびファージ粒子の生成をコードする複製可能な発現ベクターを含む宿主細胞のトランスフェクションは、融合タンパク質がファージ粒子の表面にディスプレイされたファージ粒子を提供する。

40

【0163】

複製可能な発現ベクターは、複数の方法を用いて宿主細胞に導入される。一実施形態において、ベクターは、細胞を用いて導入できる。細胞は、必要に応じて、約6~48時間(またはOD600=0.6~0.3まで)、約37°Cで、標準培養液中で培養増殖され、その後、前記液は、遠心分離され、上清を除去する(例えばデカント)。最初の精製は、好ましくは、バッファー液(例えば、1.0mM HEPES pH7.4)中で細胞ペレットを再懸濁することにより、その後再遠心分離および上清の除去を行う。結果とし

50

て得られた細胞ペレットは、希釈グリセロール（例えば、5～20% v/v）中で再懸濁され、再度細胞ペレットを形成するために再遠心分離され、上清を除去する。最終的な細胞濃度は、水または希釈グリセロール中で細胞ペレットを再懸濁し、所望の濃度にするにより得られる。

【0164】

エレクトロポレーションの間、より高いDNA濃度（約10倍）の使用は、形質転換の効率を増加し、宿主細胞にて形質転換されたDNA量を増加する。高い細胞濃度の使用はまた、効率を増加する（約10倍）。より多い量の転移DNAは、より多くの多様性を有し、より多くの数のコンビナトリアルライブラリのユニークなメンバーを表す、より大きなライブラリを生成する。形質転換細胞は、一般的に、抗生物質を含む培地での成長により選択される方法論における様々な置換および変異を有する、標的抗原バインダーを同定するためのファージディスプレイの使用は、当技術分野において十分に確立されている。一つのアプローチは、融合ポリペプチドをコードする遺伝子融合と制御可能に連結した転写調節エレメントを含む変異の複製可能なベクターのファミリーを構築すること、適切な宿主細胞を形質転換すること、ファージ粒子の表面の融合ポリペプチドをディスプレイするファージ粒子を形成するために形質転換細胞を培養することを含み、少なくとも粒子の集団の一部が、選択のプロセスにおいて結合しない粒子に関連して粒子から結合する前記粒子のサブセットを増やし、および豊かにすることを目的として、標的と結合するために、組み換えファージ粒子と標的抗原とを接触させることによって、選択（*selection*）またはソート（*sorting*）を伴うプロセスが続く。選択したプールは、異なるまたは同じストリンジェンシーを有する同じ標的のソートの別のラウンドのために宿主細胞を感染させることによって増幅することができる。結果として得られた変異体のプールは、その後、新規高親和性結合タンパク質を同定するために標的抗原に対してスクリーニングされる。

10

20

【0165】

これらの新規高親和性結合タンパク質は、治療薬として、アンタゴニストもしくはアゴニストとして、ならびに/または診断および研究試薬として有用でありうる。

【0166】

変異のアミノ酸を含む抗体可変ドメインのような融合ポリペプチドは、ファージ、ファージミド粒子、または細胞の表面で発現することができ、その後、通常目的の抗原である標的抗原に結合する融合ポリペプチドのグループのメンバーの能力のために選択および/またはスクリーニングされる。

30

【0167】

このような融合タンパク質は、化学合成経路と同様に、宿主細胞または無細胞系での発現による組み換え技術を含む、任意の適切な経路によって調製することができる。

【0168】

ICOSL特異的なライブラリメンバーの選択

標的へのバインダーの選択プロセスはまた、タンパク質Lのような抗体可変ドメインまたはファージ上にディスプレイされる抗体もしくは抗体フラグメントへ結合するタグ特異的抗体への親和性を有する一般的なタンパク質のソートを含むことができ、このことは、正しく折りたたまれた抗体フラグメント（融合ペプチド）をディスプレイするライブラリメンバーを豊かにするために使用できる。

40

【0169】

標的ICOSLタンパク質は、天然ソースから単離することができ、または当技術分野で知られている手順による組み換え法により調製することができる。親和性のための選択（ソート）の2つの主な戦略は、(i) 固体支持法（*solid-support method*）またはプレートソート（*plate sorting*）もしくは固定された標的ソート（*immobilized target sorting*）；および(ii) 溶液結合法（*solution-binding method*）である。

【0170】

50

固体支持法のために、標的タンパク質は、アガロースビーズ、アクリルアミドビーズ、ガラスビーズ、セルロース、さまざまなアクリルコポリマー、ヒドロキシアルキルメタクリレートゲル、ポリアクリルおよびポリメタアクリルコポリマー、ナイロン、中性およびイオン性のキャリアなどのような当技術分野で知られている適切な固体または半固体マトリクスと結合することができる。

【0171】

マトリクスへの標的抗原の結合後、固定化された標的は、固定化された標的抗原と少なくともファージ粒子の集団のサブセットとの結合に適した条件下、融合ポリペプチドを発現するライブラリと接触される。通常、pH、イオン強度、温度などを含む、前記条件は、生理的条件を模倣するであろう。固定化された標的への結合粒子（「バインダー（binders）」）は、洗浄によって標的と結合しないこれらの粒子から分離される。洗浄条件は、高親和性バインダーを除いたすべてを除去するために調節することができる。バインダーは、様々な方法によって固定化された標的から解離することができる。これらの方法は、野生型リガンドを用いた競争的解離（例えば、過剰な標的抗原）、pHの変化および/またはイオン強度、ならびに当技術分野で公知の方法を含む。バインダーの選択は、通常、適切な溶出材、例えば、0.1 M HCLのような酸またはリガンドによる親和性マトリクスからの溶出を含む。リガンドの濃度を増加することによる溶出は、親和性を増加する提示された結合分子を溶出するであろう。

10

【0172】

バインダーは、単離することができ、その後、バインダー（および例えば、ウイルス粒子がファージミドである場合、必要であればヘルパーファージ）であるウイルス粒子で細胞に感染させることにより適切な宿主細胞内で再増幅することができ、宿主細胞は、所望の融合ペプチドをディスプレイする粒子の増幅に適した条件下、培養される。ファージ粒子は、次に、回収され、選択プロセスは、標的抗原のバインダーがある程度充実するまで1回以上繰り返される。任意の数のラウンドの選択またはソートを用いることができる。選択またはソート手順の一つは、タンパク質Lのような一般的な親和性タンパク質またはgDタンパク質またはポリヒスチンタグに対する抗体のような提示されたポリペプチドに存在するポリペプチドタグに対する抗体に結合するバインダーの単離を含むことができる。別の選択方法は、従来溶液ソート法に対して改善された効率を有する溶液相ソートを可能にする「溶液結合法」である。溶液結合法は、ランダムライブラリからオリジナルのバインダーを見つけるために、または特定の結合クローンまたはクローンのグループの親和性を改善するために設計されたライブラリから改善されたバインダーを見つけるために使用されている。前記方法は、ファージまたはファージミド粒子（ライブラリ）に提示されたもののような、複数のポリペプチドと、標識またはタグ分子と融合した標的抗原とを接触させることを含む。前記タグは、ビオチンまたは特定のバインダーが利用可能なその他の部分でありうる。溶液相のストリンジェンシーは、第1の溶液結合相における標識標的抗原の濃度低減を用いることによって、変化することができる。

20

30

【0173】

さらにストリンジェンシーを増加するために、第1の溶液結合相は、第1の溶液相における標識標的との最初の結合後、高濃度の非標識抗原を有する第2の溶液結合相を続けることができる。通常、標識標的に対して100~1000倍の非標識標的は、第2の相（もし含まれるなら）において用いられる。第1の溶液相のインキュベーションの時間の長さは、平衡に到達するために数分から1時間またはそれ以上の間で変えることができる。第1の相における結合のため、より短い時間の使用は、バイアスをつけるまたはファストオンレート（fast on-rate）を有するバインダーを選択するであろう。第1の相における時間の長さおよびインキュベーションの温度は、ストリンジェンシーを増加するために変化することができる。このことは、ゆっくりと標的から外れること（オフレート（off-rate））を有するバインダーのための選択バイアスを提供する。

40

【0174】

複数のポリペプチド（ファージ/ファージミド粒子で提示された）と標的抗原とを接触

50

させた後、標識標的と結合したファージまたはファージミド粒子は、結合していないファージから分離される。結合の溶液相からの粒子 - 標的混合物は、標識標的部分と接触させること、および短時間（例えば、2～5分）で標識標的部分に結合した分子への結合を可能にすることにより単離される。標識標的抗原の最初の濃度は、約0.1 nMから約1000 nMの範囲でありうる。結合粒子は、溶出され、次のラウンドのソートのために増やすことができる。複数ラウンドのソートは、各ラウンドのソートについて、より低い濃度の標識標的抗原を用いることが好ましい。

【0175】

例えば、この要素は経験的におよび/または実施する者の希望に合わせるために決定することができるが、約100から250 nMの標識標的抗原を用いた最初のソートまたは選択は、広範囲の親和性を捕えるために十分でなければならない。第2のラウンドの選択において、約25から100 nMの標識標的抗原を用いることができる。第3のラウンドの選択において、約0.1から25 nMの標識標的抗原を用いることができる。例えば、100 nMのバインダーの親和性を改善するために、20 nMで開始し、その後5および1 nM標識標的へと進め、その後、約0.1 nMの標識標的抗原のような、さらに低い濃度へと続くことが望ましいであろう。

10

【0176】

本明細書において、固体支持法および溶液ソート法の組み合わせは、望ましい特性を有するバインダーを単離するために、有利に用いることができる。数ラウンドでの標的抗原の選択/ソート後、選択したプールからの個々のクローンのスクリーニングは、一般的に、望ましい性質/特性を有する特異的なバインダーを同定するために実施される。好ましくは、スクリーニングのプロセスは、ライブラリ候補の高いスループットスクリーニングを可能にするために自動化システムにより行われる。

20

【0177】

2つの主なスクリーニング方法は、下記に記載する。しかし、その他の方法もまた、用いることができる。第1のスクリーニング方法は、固定化された標的抗原を用いたファージELISAアッセイを含み、非結合クローンから特異的な結合クローンの同定を提供する。特異性は、標的コートウェル (coated well) およびBSAまたはその他の非標的タンパク質コートウェル上のクローンの同時定量により決定することができる。

30

【0178】

一例では、複数のポリペプチドを含む複製可能な発現ベクターのライブラリを生成すること；結合に適した条件下で、ライブラリを標的抗原および少なくとも一つの前記非標的抗原と接触させること；非バインダーからライブラリ内のポリペプチドバインダーを分離すること；標的抗原へ結合し、非標的抗原へ結合しないバインダーを同定すること；標的抗原からバインダーを溶出させること；および特異的な抗原へ結合するポリペプチドバインダーを含む複製可能な発現ベクターを増幅することによって、抗体可変ドメインのライブラリから特異的な標的抗原に結合する抗体可変ドメインを選択する方法が含まれる。

【0179】

別の例では、高いスループット方法において、低い親和性を有するクローンから高い親和性を有するクローンのためのスクリーニングを提供する親和性スクリーニングアッセイが含まれる。前記アッセイにおいて、各クローンは、簡単に標的コートウェルに適用する前に（例えば、5～15分）、しばらくの間（例えば、30～60分）、特定の濃度の標的抗体との最初のインキュベーションありとなしの両方でアッセイされる。その後、結合ファージは、例えば、抗M13 HRPコンジュゲートを用いて、通常ファージELISA法により測定される。一つのウェルは標的とあらかじめインキュベートされ、別のウェルは、標的抗原とあらかじめインキュベートされない、これら2つのウェルの結合シグナルの比は、親和性の指標である。第1のインキュベーションのための標的の濃度の選択は、興味のある親和性の範囲による。例えば、10 nMより高い親和性を有するバインダーが望ましい場合、第1のインキュベーションにおいて、1000 nMの標的がよく用いられる。バインダーが特定のラウンドのソート（選択）から発見された場合、それらのク

40

50

ローンは、高い親和性を有するバインダーを同定するために親和性スクリーニングアッセイでスクリーニングすることができる。

【0180】

上記ソート/選択法のいずれかの組み合わせは、役に立つものとして採用することができる。例えば、一実施形態において、ポリペプチドバインダーは、固定化標的抗原へ結合するために最初に選択される。

【0181】

固定化標的抗原へ結合するポリペプチドバインダーは、その後、増幅し、標的抗原への結合および非標的抗原への結合の欠如についてのスクリーニングすることができる。特異的に標的抗原へ結合するポリペプチドバインダーは、増幅される。これらのポリペプチドバインダーは、次に、コンプレックスを形成するための標識標的抗原の濃度と接触することによって、より高い親和性のために選択することができ、この際、標識標的抗原の濃度範囲は、約0.1 nMから約1000 nMであり、前記コンプレックスは、標的抗原上のラベルへ結合する剤と接触することによって単離される。ポリペプチドバインダーは、その後、標識標的抗原から溶出され、必要に応じて、選択のラウンドは繰り返され、一回ごとに、より低濃度の標識標的抗原が用いられる。この選択方法を用いて単離された高い親和性ポリペプチドバインダーは、次に、例えば、溶液相ELISAアッセイまたはスポット競合ELISAアッセイを用いて高い親和性についてのスクリーニングをすることができる。

【0182】

バインダーが標的抗原への結合によって同定された後、核酸を抽出できる。抽出されたDNAは、その後、E. coli 宿主細胞を形質転換するために直接使用することができ、または代わりに、コード配列は、例えば、適切なプライマーによるPCRを用いて増幅することができ、典型的な配列決定法により配列決定することができる。バインダーの可変ドメインのDNAは、消化された制限酵素であり得、そしてタンパク質発現のためにベクターに挿入することができる。

【0183】

その他の選択の適切な方法は、1以上の多様なCDR領域を有する複数のポリペプチドを生成すること、結合に適した条件下、複数のポリペプチドと標的抗原とを接触させることにより標的抗原へのバインダーのための複数のポリペプチドをソートすること；標的抗原へのバインダーを結合していないバインダーから分離すること；バインダーを単離すること；および高い親和性のバインダーを同定することを含むことができる。必要に応じて、ポリペプチドは、標的抗原のソートと組み合わせ、バインダーをソートするために用いることができるgD、poly-hisまたはFLAGのようなポリペプチドタグと融合することができる。

【0184】

別の例は、VNARのライブラリから標的抗原へ結合する抗原特異的抗原結合分子を選択することを含み：a) 複数の本発明のポリペプチドを含む複製可能な発現ベクターのライブラリを生成すること；b) 結合に適した条件下、ライブラリを固定化された標的抗原と接触させることによりライブラリから標的抗原へのポリペプチドバインダーを単離すること；c) 非バインダーからライブラリ内のポリペプチドバインダーを分離することおよび標的抗原からバインダーを溶出すること；d) ポリペプチドバインダーを有する複製可能な発現ベクターを増幅すること；ならびにe) 必要に応じて、ステップa - dを少なくとも2回繰り返すこと、を含む。

【0185】

方法としては、さらに：f) 混合物を精製するために結合に適した条件下、0.1 nMから1000 nMの範囲の標識標的抗原の濃度を有するポリペプチドバインダーを含む増幅した複製可能な発現ベクターをインキュベートすること；g) 前記混合物と標的抗原上のラベルへ結合する固定化された剤とを接触させること；h) 標識標的抗原へ結合したポリペプチドバインダーを分離することおよび標識標的抗原からポリペプチドバインダーを

10

20

30

40

50

溶出すること；i) ポリペプチドバインダーを含む複製可能な発現ベクターを増幅すること；ならびにj) 必要に応じて、一回ごとに、より低濃度の標識標的抗原を用いて、ステップf - iを少なくとも2回繰り返すこと、を含むことができる。必要に応じて、前記方法は、過剰の非標識標的抗原を混合物に加えることおよび標識標的抗原から低親和性のバインダーを溶出するのに十分な時間、インキュベートすることを含むことができる。

【0186】

別の例は、複製可能な発現ベクターのライブラリから標的抗原への高い親和性のバインダーを単離または選択する方法を含み：a) 複数の本発明のポリペプチドを含む複製可能な発現ベクターのライブラリを生成すること；b) 標的抗原へのポリペプチドバインダーを単離するため、ライブラリと少なくとも約0.1 nMから1000 nMの濃度の標的抗原とを接触させること；c) 標的抗原からポリペプチドバインダーを分離することおよびポリペプチドバインダーを含む複製可能な発現ベクターを増幅すること；d) 必要に応じて、最も低い濃度の標的抗原へ結合するポリペプチドバインダーを単離するために、一回ごとに、より低濃度の標的抗原でステップa - cを少なくとも2回繰り返すこと；e) 標的抗原の複数の異なる希釈でのポリペプチドバインダーをインキュベートすることによって、高い親和性のため最も低い濃度の標的抗原へ結合するポリペプチドバインダーを選択することおよびポリペプチドバインダーのIC50を決定すること；ならびにf) 約0.1 nMから200 nMの標的抗原に対する親和性を有するポリペプチドバインダーを同定すること、を含む。

【0187】

別の例は、複数の本発明のポリペプチドを含む複製可能な発現ベクターのライブラリからポリペプチドバインダーを選択するためのアッセイを含み：a) 結合に適した条件下、ポリペプチドバインダーと標識標的抗原とのコンプレックスを形成するために、ライブラリを0.1 nMから1000 nMの範囲の標識標的抗原の濃度で接触させること；b) コンプレックスを単離することおよび標識標的抗原からポリペプチドバインダーを分離すること；c) ポリペプチドバインダーを含む複製可能な発現ベクターを増幅すること；d) 必要に応じて、一回ごとに、より低い濃度の標的抗原を用いて、ステップa - cを少なくとも2回繰り返すこと、を含む。

【0188】

必要に応じて、前記方法は、過剰の非標識抗原をポリペプチドバインダーおよび標的抗原のコンプレックスへ追加することを、さらに含むことができる。好ましい実施形態において、前記工程のステップは、2回繰り返され、選択の第1のラウンドにおける標的の濃度は、約100 nMから250 nMであり、選択の第2のラウンドにおいて、約25 nMから100 nMであり、選択の第3のラウンドにおいて、約0.1 nMから25 nMである。

【0189】

目的の結合タンパク質を同定するその他の可能性のあるルートは、本発明の複数のポリペプチドを含む複製可能な発現ベクターのライブラリをスクリーニングする方法を含み：a) ポリペプチドが標的抗原へ結合するのに適した条件下での標的抗原の濃度でライブラリの第1のサンプルをインキュベートすること；b) 標的抗原を有さないライブラリの第2のサンプルをインキュベートすること；c) ポリペプチドが固定化された標的抗原へ結合するのに適した条件下、第1および第2のサンプルそれぞれを固定化された標的抗原と接触させること；d) 各サンプルに対して固定化された標的抗原へ結合したポリペプチドの量を検出すること；e) 第2のサンプルからの結合したポリペプチドの量に対する第1のサンプルからの結合したポリペプチドの量の比を算出することによって標的抗原に対するポリペプチドの親和性を決定すること、を含む。

【0190】

ライブラリはまた、特異的な標的への結合についておよび非標的抗原への結合の欠如についてスクリーニングすることができる。一つの態様において、別の実施形態は、VNARのライブラリからの特異的な標的抗原へ結合する抗体可変ドメインについてのスクリー

10

20

30

40

50

ニング方法を提供し：a) 本発明の複数のポリペプチドを含む複製可能な発現ベクターのライブラリを生成すること；b) 結合に適した条件下、ライブラリと標的抗原および少なくとも一つの非標的抗原とを接触させること；c) 非バインダーからライブラリ内のポリペプチドバインダーを分離すること；d) 標的抗原に結合し、非標的抗原に結合しないバインダーを同定すること；e) 標的抗原からバインダーを溶出すること；ならびにf) 特異的な抗原に結合するポリペプチドバインダーを含む複製可能な発現ベクターを増幅すること、を含む。

【0191】

上記ソート/選択方法のいずれかの組み合わせは、スクリーニング方法と組み合わせることができる。例えば、一実施形態において、ポリペプチドバインダーは、最初に、固定化された標的抗原への結合のために選択される。

10

【0192】

固定化された標的抗原へ結合するポリペプチドバインダーは、その後、増幅することができ、標的抗原への結合についておよび非標的抗原への結合の欠如についてスクリーニングすることができる。特異的に標的抗原へ結合するポリペプチドバインダーは、増幅される。これらのポリペプチドバインダーは、その後、コンプレックスを形成するための標識標的抗原の濃度で接触させることによって、より高い親和性のために選択することができ、この際、前記標識標的抗原の濃度は、約0.1 nMから1000 nMであり、前記コンプレックスは、標的抗原上の標識へ結合する剤と接触させることによって単離される。その後、ポリペプチドバインダーは、標識標的抗原から単離され、必要に応じて、選択のラウンドは繰り返され、1回ごとに、より低い濃度の標識標的抗原が用いられる。この選択方法を用いて単離された高い親和性のポリペプチドバインダーは、その後、例えば、溶液相ELISAアッセイまたはスポット競合ELISAアッセイを用いて、高い親和性についてスクリーニングすることができる。

20

【0193】

薬剤組成物および使用

本発明によれば、本発明の抗原特異的抗原結合分子の薬剤組成物を提供する。かかる組成物は、当該抗原特異的抗原結合分子を含む融合タンパク質を含む。

【0194】

前記薬剤組成物はまた、治療用タンパク質、またはそのフラグメントへ融合した本発明の抗原特異的抗原結合分子を含むことができる。前記治療用タンパク質は、ホルモン、増殖因子（例えば、TGF、上皮成長因子（EGF）、血小板由来増殖因子（PDGF）、神経成長因子（NGF）、コロニー刺激因子（CSF）、肝細胞増殖因子、インスリン様成長因子、胎盤増殖因子）；分化因子；血液凝固因子（例えば、VIIa因子、VII因子、IX因子、フォンヴィレブランド因子またはプロテインC）または血液凝固カスケードからの別のタンパク質（例えば、アンチトロンピン）；サイトカイン、例えばインターロイキン（例えば、IL1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、IL-13、IL-14、IL-15、IL-16、IL-17、IL-18、IL-19、IL-20、IL-21、IL-22、IL-23、IL-24、IL-25、IL-26、IL-27、IL-28、IL-29、IL-30、IL-31、IL-32もしくはIL-33またはインターフェロン（例えば、IFN-、IFN- およびIFN-）、腫瘍壊死因子（TNF）、IFN- 誘導因子（IGIF）、骨形成タンパク質（BMP、例えば、BMP-1、BMP-2、BMP-3、BMP-4、BMP-4、BMP-5、BMP-6、BMP-7、BMP-8、BMP-9、BMP10、BMP-11、BMP-12、BMP-13）；インターロイキンレセプターアンタゴニスト（例えば、IL-1ra、IL-1RII）；ケモカイン（例えば、MIPs（マクロファージ炎症性タンパク質）例えば、MIP1 およびMIP1；MCPs（単球走化性タンパク質）例えば、MCP1、2もしくは3；RANTES（regulated upon activation normal T-cell expressed and secret

30

40

50

e d)) ; 栄養因子 ; サイトカインインヒビター ; サイトカインレセプター ; 酵素、例えば、フリーラジカル捕捉酵素、例えば、スーパーオキシドジスムターゼもしくはカタラーゼもしくはプロドラッグ変換酵素 (例えば、アンギオテンシン変換酵素、デアミナーゼ、デヒドロゲナーゼ、レダクターゼ、キナーゼおよびホスファターゼ) ; ペプチドミメティック ; プロテアーゼインヒビター ; メタロプロテイナーゼの組織インヒビター (T I M P s、例えば、T I M P 1、T I M P 2、T I M P 3 もしくは T I M P 4) またはセルピン (セリンプロテアーゼのインヒビター) でありうる。

【 0 1 9 5 】

本発明の他の実施形態において、融合タンパク質中の治療用タンパク質は、F a b、F c、F (a b ')₂ (化学的に結合した F (a b ')₂ 鎖を含む)、F a b '、s c F v (その多量体の形態、すなわち d i - s c F v、または t r i - s c F v を含む)、s d A b、または B i T E (b i - s p e c i f i c T - c e l l e n g a g e r) を含む、抗体、またはその操作された (e n g i n e e r e d) フラグメントでありうる。抗体フラグメントはまた、その他の V N A R 型フラグメント (I g N A R 分子) と同じく、複数のドメインおよびそのフラグメントを含む。本発明の抗原特異的結合分子は、単量体もしくは二量体もしくは三量体または多量体であり得、同じもしくは異なる標的および / または同じもしくは異なるエピトープに結合可能な同種または異種でありうる。言い換えると、前記抗原特異的結合分子は、単一特異性、二重特異性、三重特異性、または多重特異性でありうる。本発明の異種の抗原特異的結合分子への言及は、同じ標的上の異なるエピトープへの結合を意味する。操作されたフラグメントはまた、本発明の抗原特異的結合分子の F c 融合および抗体の F c フラグメントを含む。

10

20

【 0 1 9 6 】

薬剤組成物は、治療用タンパク質へ融合した、いくつかの本発明の抗原特異的結合分子、例えば、二量体、三量体、またはより高次の多量体、すなわち、二、三、四、五、六、七、もしくは八量体から構成することができる。

【 0 1 9 7 】

治療用タンパク質への本発明の抗原特異的結合分子の融合は、タンパク質上の任意の都合の良い部位であるうし、N 末端、C 末端および / または N / C 末端融合でありうる。本発明の一実施形態において、本発明の抗原特異的結合分子の融合は、治療用タンパク質の N 末端および C 末端の両方である。

30

【 0 1 9 8 】

本発明の薬剤組成物は、任意の適切で薬学的に許容される担体、希釈剤、アジュバントまたはバッファー溶液を含むことができる。前記組成物は、さらに薬学的に活性な剤を含むことができる。かかる担体は、これらに限定されないが、生理食塩水、緩衝生理食塩水、デキストロース、リポソーム、水、グリセロール、エタノールおよびそれらの組み合わせを含むことができる。

【 0 1 9 9 】

かかる組成物は、示されるように、さらに薬学的に活性な剤を含むことができる。追加の剤は、治療用化合物、例えば、抗炎症剤、細胞毒性剤、細胞増殖抑制剤または抗生物質でありうる。かかる追加の剤は、それを必要とする患者への投与に適した形態で存在するであろうし、かかる投与は、同時、個別または逐次的でありうる。成分は、適切な指示書を含むであろうキットの形態で調製することができる。

40

【 0 2 0 0 】

薬剤組成物は、例えば、経口、局所、静脈内、筋肉内、鼻腔内または皮内経路などによる投与を含む患者の疾患を治療するのに効果的な任意の効果的で、便利な方法で投与することができる。治療においてまたは予防薬として、前記活性な剤は、注入可能な組成物として、例えば、滅菌水分散液、好ましくは等張の滅菌水分散液として個体に投与することができる。

【 0 2 0 1 】

哺乳類、特にヒトへの投与のため、活性剤の日用量は、0 . 0 1 m g / k g 体重から、

50

典型的には約 1 mg / kg、2 mg / kg または 4 mg / kg までであろうことが予想される。いずれにしても、医師は、個体の年齢、体重、性別および応答を含む要因に依存するであろう個体に最も適した実際の投与量を決定するであろう。上述の用量は、平均ケースの例である。もちろん、より多いまたは少ない用量が有益である例があり、これらは本発明の範囲内である。

【0202】

本発明によれば、薬剤で使用するための本発明の抗原特異的抗原結合分子を提供する。したがって、本発明のこの態様は、必要とする患者への疾患を治療するための薬剤の製造におけるそのような本発明の抗原特異的抗原結合分子の使用にまで及ぶ。本発明の抗原特異的抗原結合分子はまた、本発明の薬剤組成物に関連して、上記で定義したような抗原特異的抗原結合分子を含む融合タンパク質を調製するために用いることができる。

10

【0203】

かかる使用はまた、治療上有効な用量の、本発明の抗原特異的抗原結合分子を含む、本明細書に記載の薬剤組成物の患者への投与を含む治療を必要とする患者における疾患の治療方法を含む。

【0204】

本明細書において、用語「治療 (treatment)」は、ヒトまたは非ヒト動物に利益をもたらすことができるいかなるレジームを含む。獣医学における非ヒト動物の治療は、馬およびコンパニオンアニマル (例えば、猫および犬) を含む、家畜ならびにヒツジ、ヤギ、ブタ、ウシおよびウマのファミリーのメンバーを含む農場 / 農業動物にまで及ぶ。治療は、既存の状態または疾患に関する治療的処置または、予防的なもの (予防的治療) でありうる。治療は、遺伝性または後天性疾患の治療でありうる。治療は、急性または慢性状態の治療でありうる。治療は、炎症および / または癌に関連した状態 / 疾患の治療でありうる。本発明の抗原特異的抗原結合分子は、制限されないが、変形性関節症、強皮症、腎疾患、慢性関節リウマチ、炎症性腸疾患、多発性硬化症、アテローム性動脈硬化症、または炎症性疾患を含む、疾患の治療に用いることができる。

20

【0205】

本発明の抗原特異的抗原結合分子はまた、患者における疾患状態の性質を調べるために用いることができる。抗原特異的抗原結合分子は、X線、ガンマ線、もしくはPETスキャンのような画像技術または類似のものを用いて被験者の身体における疾患の部位の画像を用意するために用いることができる。したがって、本発明は、適切に検出可能な標識抗原特異的抗原結合分子の被験者への投与およびその後の被験者の身体のスキャンを含む被験者における疾患の部位を画像化する方法にまで及ぶ。また、被験者への前記分子の投与は、分子の投与に続く被験者からのサンプルを分析することによって試験結果を提供することができる。

30

【0206】

また、抗原特異的抗原結合分子は、in vivo サンプルまたは患者の身体内での標的分析物の存在をアッセイするために用いることができる。前記サンプルは、細胞、組織、血液、血漿、唾液、涙、精液、脳脊髄液 (CSF) および / またはミルクなどの身体からの任意の生物学的サンプルでありうる。かかる方法は、適切に検出可能な標識抗原特異的抗原結合分子の目的のサンプルへの添加を含むことができる。適切に検出可能な標識抗原特異的抗原結合分子の標的分析物への結合は、その後、標準的な酵素結合免疫吸着測定法 (ELISA) および / または放射免疫測定 (RIA) 法に従って、蛍光、放射能などのような任意の適切な方法によって検出することができる。

40

【0207】

かかる実施形態は、本発明の抗原特異的抗原結合分子の患者への投与、または前記抗原特異的抗原結合分子のサンプルへの添加を含む、患者の疾患または医学的状态を診断する方法を含むことができる。

【0208】

抗原特異的抗原結合分子は、目的の分子の免疫親和性精製におけるさらなる用途を見出

50

することができる。適切には、本発明の抗原特異的抗原結合分子は、目的の分子が結合解除可能に抗原特異的抗原結合分子へ結合するために目的の分子を含むサンプルが通過または導入された基質に結合させることができる。免疫親和性精製のかかる方法は、例えば、治療物質のような、十分に純粋な形態で調製することは困難であろう生物学的ソースまたは化学反応からの物質のバイオプロセスにおける用途を見出すことができる。

【0209】

抗原特異的抗原結合分子が結合することができる基質は、ビーズまたはパウダーの形態であるポリマーを含むカラム、プレート（例えば、マルチウェルプレート）、マイクロ流体システムでありうる。かかる基質は、シリコン、ガラスまたはプラスチック材料のような、必要に応じてチップの形態である、任意の適切な不活性物質から構成されるであろう。いくつかの構成において、同じまたは異なる抗原特異的な複数の抗原特異的抗原結合分子をかかるとする基質上に置くことは便利であろう。物質を抗原特異的抗原結合分子へ結合させた後、基質は、非結合材料を除去するために洗浄することができ、その後、精製物質は適切な方法によって溶出させることができる。

【図面の簡単な説明】

【0210】

本願において、図の番号は以下を参照する。

【図1】図1は、テンジクザメにおけるこのタンパク質免疫原への免疫応答を高める能力を示す免疫化サメの血清からのヒトICOSL特異的な力価を示す。ネガティブコントロールは、ミルクであった。

【図2】図2は、ポジティブなセレクションヒットからのモノクローナル可溶性ペリプラズム発現タンパク質で行われた細胞ベース中和アッセイを示す。低いシグナルは、hICOSLへのポジティブな結合およびレセプターリガンド相互作用の結果として得られる阻害を示すものである。ポジティブな中和クローンは、灰色の楕円形で強調表示される。標的に対するたった1ラウンドの選択後、hICOSL特異的なポジティブヒットの充実は、およそ60%のリガンド（ICOSL）のレセプター（ICOS）への結合をブロックする能力を示し、さらなる分析のために進められたことで明らかであった。公知の中和150kDa mAbクローンは、黒で示され、アッセイのポジティブコントロールとしてここでは用いられた。

【図3】図3は、合成ライブラリELSS1から単離された抗hICOSL VNARDドメインの結合を示す。VNARDドメインは、CHO細胞を発現するhICOSLへの精製Fc融合物として結合について評価された。また、2Vとして知られるネガティブ（非結合）VNAR-Fcを含む。

【図4】図4は、hICOSLもしくはmICOSLのいずれか一方を発現するCHO細胞、または親のCHO細胞に対する合成および免疫ライブラリの両方から単離されたヒットの選択性を示す。ポジティブクローンは、可溶性タンパク質として発現し、FACSベースアッセイを用いて、親の細胞と比べた、細胞表面発現標的への結合のためにテストされた。ポジティブ抗hICOSLおよび抗mICOSL mAbsは、ポジティブ細胞結合が検出された際の予測されるシフトを示すために、ポジティブコントロールとして含まれた。野生型コントロールは、ナイーブな非結合コントロールドメインであるVNAR 2Vである。図4Aは、実施例1に記載のhICOSL免疫ライブラリから単離されたポジティブヒットであるドメイン1~16を示す。図4Bは、hICOSLに対するELSS1から単離された合成ライブラリ由来のヒットの選択性を示す。

【図5】図5は、可溶性タンパク質結合ELISAによる、複数の異なる抗原（hICOSL、HSA、TNF- α 、KLH、MPBS、TG、HELおよびBSA）に対する抗hICOSL VNARヒットの選択性を例示するデータを示す。暗い領域は、高レベルの結合を示す；バックグラウンド結合は、グレーで示される。ポジティブコントロール抗HSAおよび抗hICOSL結合クローンは、図に示されるとおりELISAsに組み込まれた。

【図6-1】図6は、T-100 Biacoreで分析された、単離されたリード（1

10

20

30

40

50

e a d) クローンの親和性を示す。図 6 A は、発現し、精製された F c 構築物および結合のキネティクスとして、7つのリード免疫化抗 h I C O S L V N A R クローンの各々からのセンサーグラム (s e n s o g r a m s) を示す。2 V - F c は、ネガティブコントロールとして用いられた。

【図 6 - 2】図 6 は、T - 1 0 0 B I A c o r e で分析された、単離されたリード (l e a d) クローンの親和性を示す。図 6 B は、リード合成ライブラリおよび免疫ライブラリ由来のクローンの計算された K D 値を一覧にした。

【図 7 - 1】図 7 は、可溶性 I C O S と細胞発現 I C O S L との間の相互作用を阻害するために合成ライブラリおよび免疫ライブラリから単離された抗 I C O S L V N A R ドメインの能力を示す。精製された F c 融合 V N A R ドメインは、細胞ベースアッセイにおいて、発現され、精製され、滴定された。減少した吸収レベルは、ポジティブな中和を示す。ネガティブコントロールは、V N A R ドメイン、2 V - F C であった。図 7 A は、免疫ライブラリからのリード抗 h I C O S L V N A R ドメインの結果を示す。

【図 7 - 2】図 7 は、可溶性 I C O S と細胞発現 I C O S L との間の相互作用を阻害するために合成ライブラリおよび免疫ライブラリから単離された抗 I C O S L V N A R ドメインの能力を示す。精製された F c 融合 V N A R ドメインは、細胞ベースアッセイにおいて、発現され、精製され、滴定された。減少した吸収レベルは、ポジティブな中和を示す。ネガティブコントロールは、V N A R ドメイン、2 V - F C であった。図 7 B は、合成ライブラリからのこれらのリードの結果を示す。

【図 8】図 8 は、抗 I C O S L V N A R が一次ヒト T 細胞増殖アッセイに組み込まれた際に測定された I C 5 0 値を示す。1 C 8、1 C 4、1 G 5、1 A 1、2 D 4、1 H 2 および 1 D 1 2 は、すべて E L S S 1 から単離された V N A R ドメインであり、F c フォーマットに再フォーマットされ、精製された。商業的に利用可能な h I C O S L 抗体、m A b 1 6 5 は、ポジティブコントロールである。結果は、ドナー 4 5 0 およびドナー 4 5 2 として知られている 2 つの独立したドナーから示される。

【図 9 - 1】図 9 は、合成 (クローン 1 A 9、1 C 8、1 D 1 2、2 B 6、2 D 3、2 D 4、2 E 8、1 G 5、1 H 0 2、1 A 1、1 C 0 4、1 A 6、1 B 2、2 C 1 0、2 C 7、2 G 6、3 E 8、3 G 1 1、4 B 5、4 G 1、5 A 1 2、5 B 1 0、5 B 9、5 C 1、5 E 6、5 F 3、5 F 6 および 5 G 1) および免疫 (クローン 1、2、8、1 1、1 2、1 3 および 1 7) ライブラリの両方から単離された、全てのポジティブ抗 h I C O S L V N A R クローンのアミノ酸および核酸配列の両方を一覧表示する。図 9 A は、合成ライブラリ由来の抗 h I C O S L V N A R ドメインのアミノ酸配列を一覧表示する。

【図 9 - 2】図 9 は、合成 (クローン 1 A 9、1 C 8、1 D 1 2、2 B 6、2 D 3、2 D 4、2 E 8、1 G 5、1 H 0 2、1 A 1、1 C 0 4、1 A 6、1 B 2、2 C 1 0、2 C 7、2 G 6、3 E 8、3 G 1 1、4 B 5、4 G 1、5 A 1 2、5 B 1 0、5 B 9、5 C 1、5 E 6、5 F 3、5 F 6 および 5 G 1) および免疫 (クローン 1、2、8、1 1、1 2、1 3 および 1 7) ライブラリの両方から単離された、全てのポジティブ抗 h I C O S L V N A R クローンのアミノ酸および核酸配列の両方を一覧表示する。図 9 A は、合成ライブラリ由来の抗 h I C O S L V N A R ドメインのアミノ酸配列を一覧表示する。

【図 9 - 3】図 9 は、合成 (クローン 1 A 9、1 C 8、1 D 1 2、2 B 6、2 D 3、2 D 4、2 E 8、1 G 5、1 H 0 2、1 A 1、1 C 0 4、1 A 6、1 B 2、2 C 1 0、2 C 7、2 G 6、3 E 8、3 G 1 1、4 B 5、4 G 1、5 A 1 2、5 B 1 0、5 B 9、5 C 1、5 E 6、5 F 3、5 F 6 および 5 G 1) および免疫 (クローン 1、2、8、1 1、1 2、1 3 および 1 7) ライブラリの両方から単離された、全てのポジティブ抗 h I C O S L V N A R クローンのアミノ酸および核酸配列の両方を一覧表示する。図 9 B は、合成ライブラリ由来の抗 h I C O S L V N A R ドメインの核酸配列を一覧表示する。

【図 9 - 4】図 9 は、合成 (クローン 1 A 9、1 C 8、1 D 1 2、2 B 6、2 D 3、2 D 4、2 E 8、1 G 5、1 H 0 2、1 A 1、1 C 0 4、1 A 6、1 B 2、2 C 1 0、2 C 7、2 G 6、3 E 8、3 G 1 1、4 B 5、4 G 1、5 A 1 2、5 B 1 0、5 B 9、5 C 1、5 E 6、5 F 3、5 F 6 および 5 G 1) および免疫 (クローン 1、2、8、1 1、1 2、

10

20

30

40

50

13および17)ライブラリの両方から単離された、全てのポジティブ抗hICOSL VNARクローンのアミノ酸および核酸配列の両方を一覧表示する。図9Bは、合成ライブラリ由来の抗hICOSL VNARDメインの核酸配列を一覧表示する。

【図9-5】図9は、合成(クローン1A9、1C8、1D12、2B6、2D3、2D4、2E8、1G5、1H02、1A1、1C04、1A6、1B2、2C10、2C7、2G6、3E8、3G11、4B5、4G1、5A12、5B10、5B9、5C1、5E6、5F3、5F6および5G1)および免疫(クローン1、2、8、11、12、13および17)ライブラリの両方から単離された、全てのポジティブ抗hICOSL VNARクローンのアミノ酸および核酸配列の両方を一覧表示する。図9Bは、合成ライブラリ由来の抗hICOSL VNARDメインの核酸配列を一覧表示する。

10

【図9-6】図9は、合成(クローン1A9、1C8、1D12、2B6、2D3、2D4、2E8、1G5、1H02、1A1、1C04、1A6、1B2、2C10、2C7、2G6、3E8、3G11、4B5、4G1、5A12、5B10、5B9、5C1、5E6、5F3、5F6および5G1)および免疫(クローン1、2、8、11、12、13および17)ライブラリの両方から単離された、全てのポジティブ抗hICOSL VNARクローンのアミノ酸および核酸配列の両方を一覧表示する。図9Bは、合成ライブラリ由来の抗hICOSL VNARDメインの核酸配列を一覧表示する。

【図9-7】図9は、合成(クローン1A9、1C8、1D12、2B6、2D3、2D4、2E8、1G5、1H02、1A1、1C04、1A6、1B2、2C10、2C7、2G6、3E8、3G11、4B5、4G1、5A12、5B10、5B9、5C1、5E6、5F3、5F6および5G1)および免疫(クローン1、2、8、11、12、13および17)ライブラリの両方から単離された、全てのポジティブ抗hICOSL VNARクローンのアミノ酸および核酸配列の両方を一覧表示する。図9Cは、免疫ライブラリ由来の抗hICOSL VNARDメインのアミノ酸配列を一覧表示する。

20

【図9-8】図9は、合成(クローン1A9、1C8、1D12、2B6、2D3、2D4、2E8、1G5、1H02、1A1、1C04、1A6、1B2、2C10、2C7、2G6、3E8、3G11、4B5、4G1、5A12、5B10、5B9、5C1、5E6、5F3、5F6および5G1)および免疫(クローン1、2、8、11、12、13および17)ライブラリの両方から単離された、全てのポジティブ抗hICOSL VNARクローンのアミノ酸および核酸配列の両方を一覧表示する。図9Dは、免疫ライブラリ由来の抗hICOSL VNARDメインの核酸配列を一覧表示する。

30

【図9-9】図9は、合成(クローン1A9、1C8、1D12、2B6、2D3、2D4、2E8、1G5、1H02、1A1、1C04、1A6、1B2、2C10、2C7、2G6、3E8、3G11、4B5、4G1、5A12、5B10、5B9、5C1、5E6、5F3、5F6および5G1)および免疫(クローン1、2、8、11、12、13および17)ライブラリの両方から単離された、全てのポジティブ抗hICOSL VNARクローンのアミノ酸および核酸配列の両方を一覧表示する。図9Dは、免疫ライブラリ由来の抗hICOSL VNARDメインの核酸配列を一覧表示する。

【図9-10】図9は、合成(クローン1A9、1C8、1D12、2B6、2D3、2D4、2E8、1G5、1H02、1A1、1C04、1A6、1B2、2C10、2C7、2G6、3E8、3G11、4B5、4G1、5A12、5B10、5B9、5C1、5E6、5F3、5F6および5G1)および免疫(クローン1、2、8、11、12、13および17)ライブラリの両方から単離された、全てのポジティブ抗hICOSL VNARクローンのアミノ酸および核酸配列の両方を一覧表示する。図9Dは、免疫ライブラリ由来の抗hICOSL VNARDメインの核酸配列を一覧表示する。

40

【図10-1】図10は、合成および免疫ライブラリ両方から単離された全てポジティブな抗hICOSL VNARクローンからのCDR1およびCDR3アミノ酸配列を一覧表示する。図10Aは、合成ライブラリから単離されたものを一覧表示する。ポジティブヒットは、すべて上記の異種および異なるアイソタイプフレームワーク融合物である。

【図10-2】図10は、合成および免疫ライブラリ両方から単離された全てポジティブ

50

な抗hICOSL VNARクローンからのCDR1およびCDR3アミノ酸配列を一覧表示する。図10Aは、合成ライブラリから単離されたものを一覧表示する。ポジティブヒットは、すべて上記の異種および異なるアイソタイプフレームワーク融合物である。

【図10-3】図10は、合成および免疫ライブラリ両方から単離された全てポジティブな抗hICOSL VNARクローンからのCDR1およびCDR3アミノ酸配列を一覧表示する。図10Bは、免疫ライブラリから単離されたものを一覧表示する。ポジティブヒットは、すべて上記の異種および異なるアイソタイプフレームワーク融合物である。

【図10-4】図10は、合成および免疫ライブラリ両方から単離された全てポジティブな抗hICOSL VNARクローンからのCDR1およびCDR3アミノ酸配列を一覧表示する。図10Cは、ELSS2合成VNARライブラリから単離されたICOSLポジティブなVNARクローンの配列を示す。ポジティブヒットは、すべて上記の異種および異なるアイソタイプフレームワーク融合物である。

【図11】図11は、アルブミン結合VNARDメイン(E6)への分子融合として再フォーマットされたときの標的への抗ICOSL VNARDメインの結合を示す。図11Aは、抗マウスICOSL VNARDメイン、抗ヒトICOSL VNARDメインへの(GGGG)₄アミノ酸ストレッチを介して連結したCC3、抗ヒト血清アルブミンVNARDメイン、E6への(GGGG)₄アミノ酸ストレッチを介して連結した2D4からなる三量体VNARDメイン融合タンパク質の結合を示す。発現した三量体融合タンパク質は、ELISAによりmICOSL、hICOSLおよびHSAへの結合のためにテストされた。濃度依存曲線は、各標的への結合が達成され、よってタンパク質融合が三官能であることを示す。図11Bは、分子の融合物の順番が抗mICOSLおよび抗hICOSL VNARDメイン間でNおよびC末端の両方で融合されたE6の結果により変更される三量体変異体を示す。この配向性において、すべてのVNARDメインによるそれらの特異的な標的への結合もまた示される。

【図12】図12は、受託番号O75144で、2014年4月16日に記録された、hICOSLのGenBankデータベース配列を示す(Version O75144.2 GI:19855066; DBSOURCE UniProtKB: locus ICOSL_HUMAN, accession O75144)。

【実施例】

【0211】

本発明はまた、例示の目的のためだけであり、本発明を制限するものとして解釈されるべきではない下記の実施例を参照して、さらに説明される。

【0212】

使用する略語: VNAR、可変新規抗原レセプター(Variable Novel Antigen Receptor); scFv、一本鎖抗体フラグメント(single chain antibody fragment); FW、フレームワーク(frame work); HV、超可変ループ(Hypervariable loop); CDR、相補性決定領域(complementarity determining region); SOE-PCR、スライス-パイ-オーバーラップエクステンションポリメラーゼ連鎖反応(splice-by-overlap extension polymerase chain reaction)。

【0213】

実施例1: ELSS1合成VNARライブラリのバイオパニングによる抗h-ICOSL VNARDメインの単離

抗h-ICOSL VNARDメインを単離するために、ELSS1合成ライブラリ(2013年4月23日出願されたUS61/815,043からの優先権を主張する2014年4月23日出願された同時係属中の国際特許出願番号PCT/EP2014/058251の記載(参照により引用される)により調製された)は、単量体のヒトICOSLに対してソリッドステートおよびプレコートビーズベース法の両方を用いてスクリーニングされた。ポジティブヒットは、両方の方法を用いて得られた。簡単には、ソリッ

10

20

30

40

50

ドステート選択は、下記のとおり実施された：イムノチューブは、4 ml PBS中で所望の濃度の標的抗原でコートされた。前記チューブは、その後、シールされ、回転しながら4で一晚、インキュベートのために放置した。PBSで3回洗浄後、1時間、2% (w/v) M-PBSでチューブをブロックした。1時間、回転しながらM-PBS (2% (w/v) 最終濃度) 中で0.5~1 mlのインプットファージをブロックした。その後、ブロックしたファージをチューブに加え、2% (w/v) M-PBSで4 mlとし、1時間、20 rpmで回転しながらインキュベートし、さらに1時間、インキュベーション (静置) した。非結合ファージは、破棄され、チューブは、5~10回、PBSTで洗浄され、その後、PBSで5~10回洗浄された。ファージは、10分まで、20 rpmで回転しながら、1 mlの100 mMトリエチルアミンの添加によって溶出された。アウトプットファージ溶液は、0.5 mlの1 M Tris-HCl (pH 7.5) の添加により中和された。溶出されたファージは、10 mlのmid-log ER 2738細胞に加えられ、混合され、攪拌なしで37 30分、インキュベートされ、その後、15分間2,500 x gで遠心分離された。ペレットは、1 mlの2 x TY-Gに再懸濁され、TYE-GAアガーを含むBio-Assay dishに広げられ、一晚30でインキュベートされた。

10

【0214】

プレコートビーズベースアッセイのため、抗原は、製造者の指示に従いビオチン化した。ビオチン化した材料は、30 µlのDynabeads M-280 Streptavidin (Invitrogen) と、30分間、20 rpmのR/T回転でインキュベートされた。プレデコレートされた (pre-decorated) ビーズでのライブラリ選択は、主にソリッドステート選択と同じ上記の方法を用いて行われ、インプットファージおよびDynabeadsは、1時間、R/Tで回転しながら4% (w/v) M-PBSでプレブロックされ、ファージは、その後、1時間、R/Tで回転しながらブロックされたビーズの添加、次に、1時間、20 rpmのR/Tで抗原コートビーズの添加によってはずされた。PBSTで5回の洗浄後、結合ファージは、400 µlの100 mM TEA中で、8分間、回転することによって溶出され、200 µlの1 M Tris-HCl (pH 7.5) の添加によって中和された。溶出されたファージのE.coli感染は、ソリッドステート選択で記載したように行われた。

20

【0215】

可溶性VNARタンパク質のペリプラズム発現は、以下のように行われた；一晚培養の選択されたコロニーは、播種され、5時間、250 rpmで、1 ml/wellの2 x TY、0.1% グルコース、100 µg/mlのアンピシリンを含むディープウェルプレート (Greiner, Bio-One) で増殖された。転写は、1 mM IPTGの添加により誘導され、一晚、28 および250 rpmでインキュベートされた。ディープウェルプレートは、10分間、3200 rpmで遠心分離され、結果として得られたペレットは、200 µlの氷冷TESバッファー、その後200 µlの氷冷1:5 TESバッファーに再懸濁された。氷上での30分間のインキュベーション後、遠心分離は、結果として得られた上清に存在する可溶性VNARとともに繰り返された。発現は、イムノプレート (Nunc, Thermo Scientific) 上にコートされた1 µg/mlの抗原および検出抗体としてのanti-c-myc-HRP (Invitrogen) を用いて、標準結合ELISAを介して評価された。可溶性発現モノクローナルは、96ウェルベース細胞中和アッセイにおいて、特異的に標的に結合する能力およびレセプター、ICOSに結合することから標的をブロックする能力の両方のために評価された。リガンド-レセプター中和アッセイは、以下のように行われた；CHO細胞発現ヒトICOSレセプターは、96ウェル細胞培養プレート (Greiner, Bio-One) 中のDMEM/F12+5% FBS培地で培養密度まで増殖された。hICoSL-hFc (450 ng/mlでの20 µl) は、1時間、DMEM/F12+2% FBS中の40 µlの抗hICoSL-VNARドメインでプレインキュベートされ、その後、細胞に添加された。16、1時間のインキュベーション後、細胞は、DMEM/F12+2

30

40

50

。影付きの楕円形で強調されたクローンは、次へ進み、配列決定された。

【0220】

実施例4：hICOSLに対する合成ライブラリおよび免疫ライブラリ由来のVNARヒットの*in vitro*での結合および選択性

ポジティブな結合および中和ユニークドメインは、さらなる分析のために、以下のようにFcフォーマットに変換された：選択されたポジティブな単量体のVNARDメインは、制限部位およびHEK293懸濁培養におけるPEIを介する一過性発現後、発現したタンパク質のタンパク質A親和性精製を促進したプロクプライエタリFc哺乳類発現ベクターをクローニングするために適合性のあるフランキング配列を導入するプライマーでPCR増幅された。VNAR Fc融合タンパク質の発現レベルは、一般的に、無結成培地を用いて、リットル当たり50~70mgの範囲であった。基本的に、発現後の細胞デブリは、遠心分離および0.2μmろ過により条件培地から除かれ、その後、上記で詳述したアフィニティークロマトグラフィーにより、タンパク質は、PBSで平衡化したSuperdex200 26/60サイズ排除カラムを通過させることにより最後の精製工程にかけられた。SECからの溶出したピークは、Amicon限外ろ過ユニットを用いて濃縮され、タンパク質濃度は、UV分光法によって決定された。生成されたFcタンパク質は、次に、図3に示す細胞表面発現hICOSLへの結合のために評価された。

10

【0221】

抗hICOSL VNARDメインの選択性は、以下のように実施されたFCASアッセイを用いて評価された：親の、mICOSLおよびhICOSLリガンド発現CHO細胞は、PBSで洗浄され、37、10~15分間、PBSおよび5%EDTAの添加によってフラスコから除かれた。細胞は、フラスコの表面に対して上下へのピペティングにより単分散され、1200rpmでスピンドウンされ、5%FCSをプラスしたDMEMに再懸濁された。細胞は、0.5~1×10⁶の密度/ウェルで、96ウェルU底プレートに等分された。細胞は、30分間、16で、HEK293 VNAR-hFc発現タンパク質を含む100μl組織培養上清とインキュベートされ、その後、2%FCSをプラスしたPBSで3回洗浄された。細胞は、その後、30分間、16で、1μg/mlのanti-hFc-biotin(eBioscience)100μlでインキュベートされた。2%FCSをプラスしたPBSで3回洗浄した後、streptavidin-APC(eBioscience)は、30分間、16で1μg/ml添加された。2%FCSをプラスしたPBSで1回洗浄した後、細胞は、400μlの2%FCSをプラスしたPBSに再懸濁され、FACS-Canto-2での分析のためにFACSチューブに移された。図4aは、合成ライブラリ由来の抗hICOSL VNARDメインのFACS分析を示し、図4bは、免疫ライブラリ由来のドメインのFACS分析を示す。データを合わせると、左への読み出しにおけるシフトによって示されるヒトICOSL発現CHO細胞への結合が明らかであることを示す。

20

30

【0222】

合成ライブラリ由来の抗hICOSL VNARDメインの選択性はまた、図5で例示されるように、複数の無関係なタンパク質に対してELISAを結合することによって、明確に示される。すべてのポジティブな抗hICOSLクローンの結合は、左側の暗い影によって視覚化される。他に含まれる標的；ヒト血清アルブミン(HSA)、腫瘍壊死因子(TNF)、キーホールリンペットヘモシアニン(KLH)、ミルクリン酸生理食塩水(MPBS)、サイログロブリン(TG)、ニワトリ卵黄リゾチーム(HEL)またはウシ血清アルブミン(BSA)への非結合は、検出可能である。HSAに対するポジティブコントロールが含まれ、ポジティブな結合を示す暗い領域として明確に示すことができる。

40

【0223】

ヒットの親和性測定は、単量体およびFcフォーマット両方のポジティブリードで実施された(図6)：すべてのBIACore分析は、T-100バイオセンサー、series S CM5 chips、アミンカップリングキット、pH4、4.5、5.0お

50

よび 5.5 の 10 mM 酢酸ナトリウム固定化バッファー、10X HBS - プランニングバッファーならびに 50 mM の NaOH (GE Healthcare) を用いて行われた。アッセイ条件は、物質移動、結合活性および再結合のイベントを最小限にするために設定された。標的化リガンド固定化プログラム (targeted ligand immobilization program) は、それぞれ pH 4 のフローセル (Fc) 2 および 3 での精製された hICOSL-Fc (R & D Systems) および hICOSL モノマーの約 1000 応答単位 (RU) を固定化するためにセットされた。精製された VNAR タンパク質は、最終濃度の範囲 (グローバルフィット分析を用いた反応速度定数の計算のために 600 ~ 37.5 mM から開始する 2 倍希釈) となるように HBS - プランニングバッファーに溶出された。各濃度は、5 mM の NaOH での 5 秒間再生パルスに続き、3 分間、30 ml / 分の速い流速で注入され、5 分間解離された。各濃度のためのリファレンス減算 (subtracted) センサーグラムは、BIAcore T100 評価ソフトウェア (1.1.1) を用いて分析された。

10

【0224】

実施例 5 : hICOSL に対するヒットの *in vitro* での機能的検証

抗 hICOSL-Fc ヒットの *in vitro* での有効性は、2 つのセルベースアッセイにより測定された。第 1 は、実施例 1 に記載のリガンド - レセプター中和アッセイであった。合成および免疫ライブラリ両方からの精製された抗 hICOSL-Fc VNAR ドメインは、中和アッセイにて滴定され、ICOSL - ICOS 相互作用を特異的にブロックする能力を示した (図 7 A および B)。実施された第 2 のセルベース機能性アッセイは、健全なドナーから単離された初代ヒト T 細胞を用いる T 細胞増殖アッセイであった。その方法は、簡単には以下のとおりである : 最初のプレートコートのために、PBS 中の 1 μ g / ml の抗 huCD3 クローン OKT3 (eBioscience cat. # 16 - 5889 aCD3) と 10 μ g 抗 hIgG (Jackson ImmunoResearch cat. # 109 - 006 - 098) とを、合計 100 μ l / ウェルとなるように加えた。4 で一晩放置し、その後溶液をウェルから除き、ウェルを PBS で 2 回洗浄する。第 2 のコーティングのために、PBS 中の 4 μ g / ml の hB7 - 2 . Ig (R & D Systems cat. # 141 - B2 - 100) と 500 ng の hICOSL . Ig (R & D Systems cat. # 165 - B7 - 100) とを 100 μ l / ウェルとなるように加える。3 時間、室温で放置し、その後、PBS で 2 回洗浄する。アッセイプレートのすべてのウェルに 50 μ l 培地を加える。CD4 + T 細胞は、 2×10^6 cells / ml となるように溶出させ、試験抗体は、所望の最終濃度の 3 倍となるように溶出させた。各ウェルの 50 μ l 培地に対し、50 μ l の抗体溶液および 50 μ l の細胞懸濁液は、 1×10^5 cells / ウェルの最終濃度で、150 μ l / ウェルの最終的な量となるように添加された。サンプルは、3 日間放置され、その後、3 日目に 6 ~ 8 時間、1 μ Ci / ウェルの 3 Hチミジンでパルスされ、数が計測された。図 8 は、2 つの独立したドナーから単離された T 細胞を用いて合成ライブラリからの抗 hICOSL VNAR ドメインの計算されたポテンシー (IC50 値) を示す。

20

30

【0225】

実施例 5 : 分子融合タンパク質としての抗 ICOSL VNAR ドメインの再フォーマット

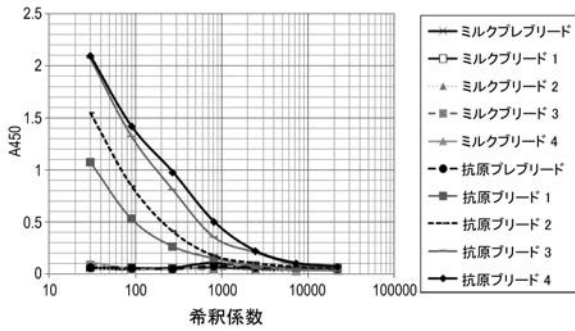
合成ライブラリ、ELSS1 から単離された抗 ICOSL ドメインは、(GGGS)₄ アミノ酸ストレッチと結合した三量体の融合生成物を生成するためにタンデムにクローニングすることができ、発現することができ、精製することができ、ELISA による 3 つの個別標的すべてへ結合することを示すことができる。図 11 は、抗ヒト ICOSL VNAR ドメイン、2D4、および抗 HSA 特異的 VNAR ドメイン、E6 (WO2013 / 167883 の記載のように調製した) の両方へ融合した、抗マウス ICOSL VNAR ドメイン CC3 (2013 年 4 月 23 日に出願された US61 / 815,043 からの優先権を主張する 2014 年 4 月 23 日に出願された同時係属中の国際特許出願番号 PCT / EP2014 / 058251 にて記載されている (参照により引用される) 方法

40

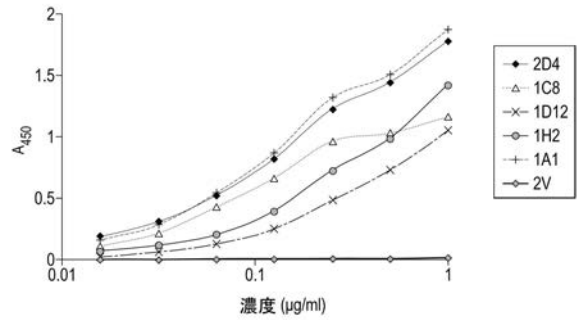
50

に従って調製された)を用いる3量体構築物の2つの異なる配向性を例示する。3つのV N A Rドメインのすべては、単一の分子融合タンパク質として結合した場合、標的へ結合する能力を保持している。

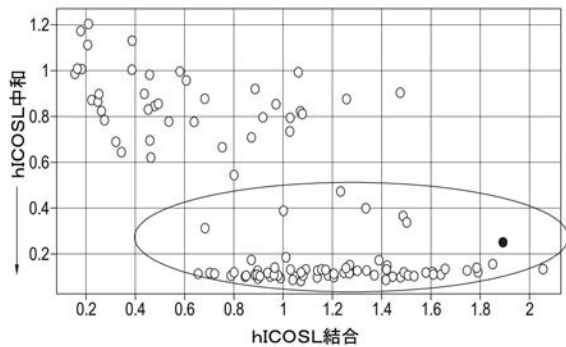
【 図 1 】



【 図 3 】



【 図 2 】



【 図 4 】

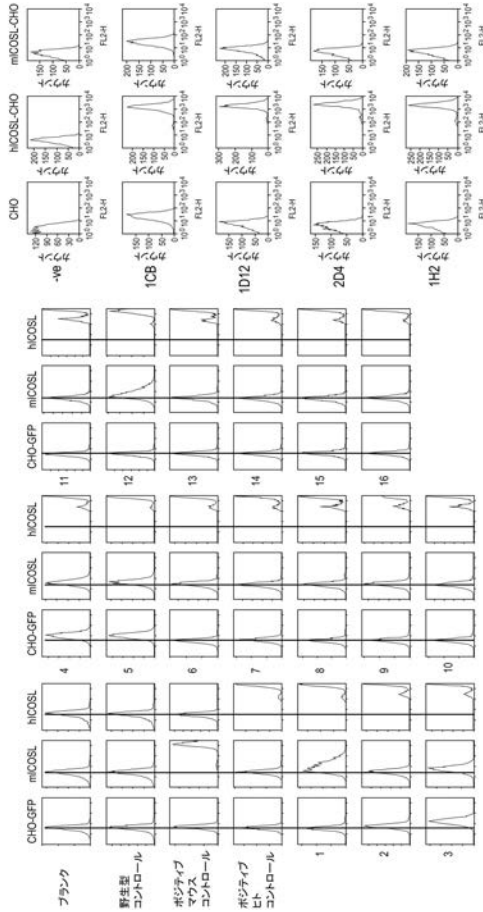
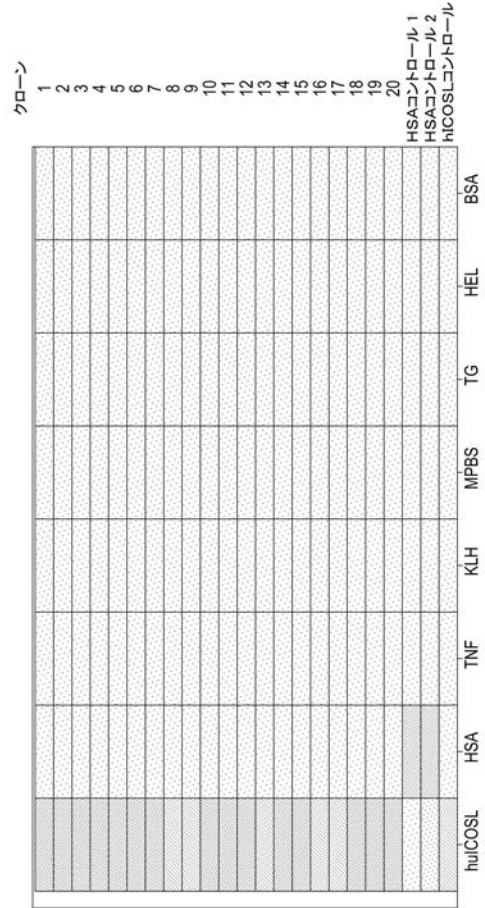


図4B

図4A

【 図 5 】



【 図 6 - 1 】

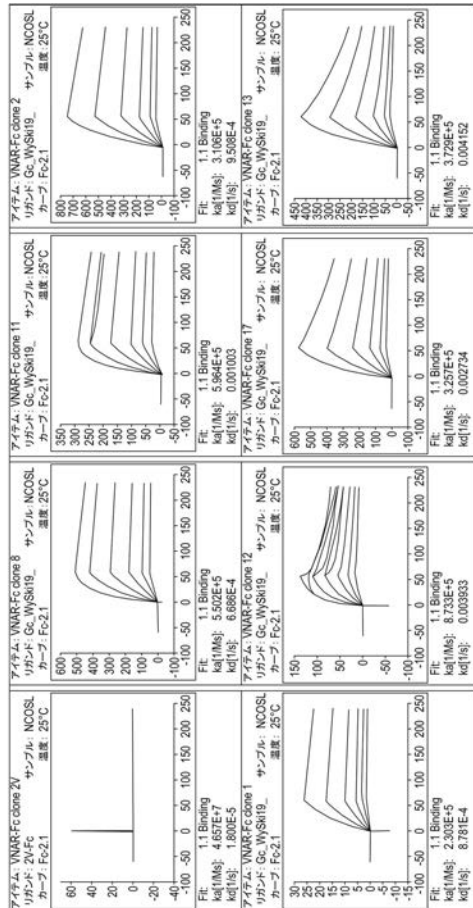


図6A

【 図 6 - 2 】

ソース	フォーマット	クローン	KD (nM)	
合成	単量体	1A7	61.7	
		1A1	14.5	
		1A4	102.2	
		1C4	17.9	
		1G5	31.7	
		1H2	29.5	
		2V	-	
		Fc	1A1	9
			1C4	47.6
			1C8	18
			1D12	1.8
			2D4	116
			1H2	116
免疫化	1	3.8		
	8	1.2		
	2	3.1		
	13	11.1		
	17	8.4		
	11	1.7		
	12	4.5		
	2V	-		

図6B

【 図 7 - 1 】

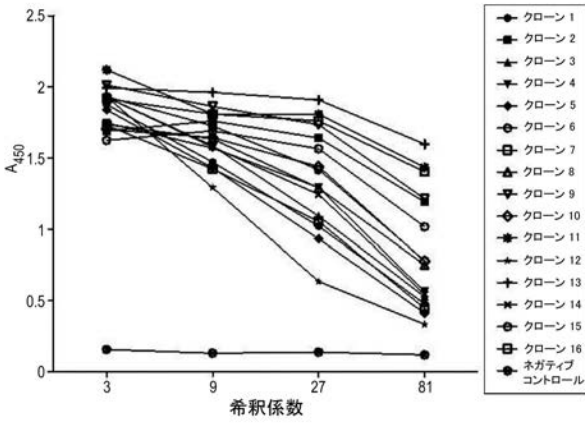


図7A

【 図 7 - 2 】

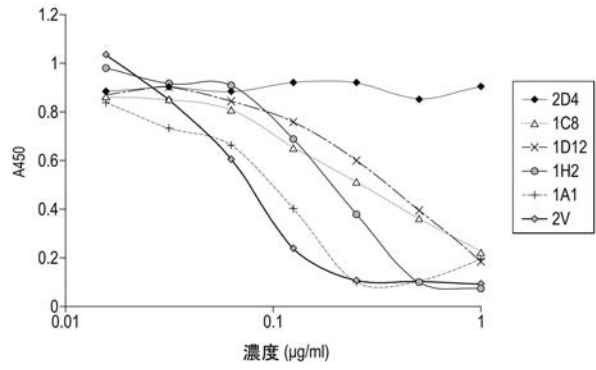


図7B

【 図 8 】

	IC50 pM	
	ドナー 450	ドナー 452
hN-1C8-hFC	11	7
hN-1C4-hFC	77	32
hN-1G5-hFC	52	95
hN-1A1-hFC	14	8
hN-2D4-hFC	8	9
hN-1H2-hFC	42	35
hN-1D12-hFC	140	215
mab165	57	88

【 図 9 - 1 】

1A9 ASVDPFRRAKETGESHINCLVDTQKMLDTSFRKRFQFTTMRMSIGRVSINMGAKSFSRLKDLTVALDSATTCRAQGEPIFERHEDTIGAGTVLTN
 1C8 ASVDPFRRAKETGESHINCLVDTQKMLDTSFRKRFQFTTMRMSIGRVSINMGAKSFSRLKDLTVALDSATTCRAQGEPIFERHEDTIGAGTVLTN
 1D12 TWVDPFRRAKETGESHINCLVDTQKMLDTSFRKRFQFTTMRMSIGRVSINMGAKSFSRLKDLTVALDSATTCRAQGEPIFERHEDTIGAGTVLTN
 2B6 TWVDPFRRAKETGESHINCLVDTQKMLDTSFRKRFQFTTMRMSIGRVSINMGAKSFSRLKDLTVALDSATTCRAQGEPIFERHEDTIGAGTVLTN
 2D4 TWVDPFRRAKETGESHINCLVDTQKMLDTSFRKRFQFTTMRMSIGRVSINMGAKSFSRLKDLTVALDSATTCRAQGEPIFERHEDTIGAGTVLTN
 2D8 TWVDPFRRAKETGESHINCLVDTQKMLDTSFRKRFQFTTMRMSIGRVSINMGAKSFSRLKDLTVALDSATTCRAQGEPIFERHEDTIGAGTVLTN
 2E8 TWVDPFRRAKETGESHINCLVDTQKMLDTSFRKRFQFTTMRMSIGRVSINMGAKSFSRLKDLTVALDSATTCRAQGEPIFERHEDTIGAGTVLTN
 1G5 ASVDPFRRAKETGESHINCLVDTQKMLDTSFRKRFQFTTMRMSIGRVSINMGAKSFSRLKDLTVALDSATTCRAQGEPIFERHEDTIGAGTVLTN
 1H2 TWVDPFRRAKETGESHINCLVDTQKMLDTSFRKRFQFTTMRMSIGRVSINMGAKSFSRLKDLTVALDSATTCRAQGEPIFERHEDTIGAGTVLTN
 1A1 TWVDPFRRAKETGESHINCLVDTQKMLDTSFRKRFQFTTMRMSIGRVSINMGAKSFSRLKDLTVALDSATTCRAQGEPIFERHEDTIGAGTVLTN
 1C4 ASVDPFRRAKETGESHINCLVDTQKMLDTSFRKRFQFTTMRMSIGRVSINMGAKSFSRLKDLTVALDSATTCRAQGEPIFERHEDTIGAGTVLTN
 1A6 TWVDPFRRAKETGESHINCLVDTQKMLDTSFRKRFQFTTMRMSIGRVSINMGAKSFSRLKDLTVALDSATTCRAQGEPIFERHEDTIGAGTVLTN
 1B2 TWVDPFRRAKETGESHINCLVDTQKMLDTSFRKRFQFTTMRMSIGRVSINMGAKSFSRLKDLTVALDSATTCRAQGEPIFERHEDTIGAGTVLTN
 2C10 ASVDPFRRAKETGESHINCLVDTQKMLDTSFRKRFQFTTMRMSIGRVSINMGAKSFSRLKDLTVALDSATTCRAQGEPIFERHEDTIGAGTVLTN

図9A

【 9 - 1 0 】

クローン18
 GCTCGATGGACCAACCCGAGTCACTAACAAGAGAGGGGCGAATCATGACCATCAATGTGTCTACGAGANTGAGAGCTATGCAATGGGACGACGCTGGTATC
 GAAAAAATGGGGCTCAACACAGGAGAGCATATCGAAAAGTGGCCATATGTTGAACAGTTAAGAGGGATCGAAGCTCTTTTGTGAGATTAGTGTACAGT
 TGAAGAGGTGGCAGGTATGTTGGCTCACTTTCTGGTGGGGGGGGGGAGTGTGACTTCCCTACAGCTGTGCTTCCAGGCTATGCTGATGCGGAGATGGACTG
 CCTGACTGTGANT

クローン20
 GCTCGATGGACCAACCCGAGTCACTAACAAGAGAGGGGCGAATCATGACCATCAATGTGTCTACGAGANTGAGAGGTAATGGGACGACGCTGGTATC
 CGAAAAATGGGGCTCAACACAGGAGAGCATATCGAAAAGTGGCCATATGTTGAACAGTTAAGAGGGATCGAAGCTCTTTTGTGAGATTAGTGTACAG
 TTGAAGAGGTGGCAGGTATGTTGGCTCACTTTCTGGTGGGGGGGGGGAGTGTGACTTCCCTACAGCTGTGCTTCCAGGCTATGCTGATGCGGAGATGGACT
 GTGCTGACTGTGANT

9D (つづき)

【 1 0 - 1 】

ソース	CDR1	CDR3
1A9	WRKWLQ	GPIYFETWHDV
1C8	PQNWQA	VFLNPNWDPHWY
1D12	GYGLAA	WWDVPPQRWEPIVSNWY
2B6	SPTGTF	PYYQINDWHDV
2D3	WTTWVG	QTFWWMQWHLNHWY
2D4	DYGLFS	FTWPEWEDRWFRPWY
2E8	NYAWFS	LYPGWKNPWNFWY
1G5	RYAWFS	QVLFQAQAVWTDV
1H02	GYGWYA	WNPWFQNEELWY
1A1	YTIWVT	LYYQNRREFDV
1C04	DVWYDH	QVLSMNGKQWQY
1A6	SYGLEA	WSYPLELNGRFRFPWY
1B2	DYGLEA	HIFWTEAYWY

10A

【 1 0 - 2 】

2C10	GYGLAA	WVNFQYMNNSWIFWY
2C7	KYGWYS	GPPVPSGGLDV
3E8	SYALYS	FNIGVFNWADV
3G11	GYGWFS	WKLEPHSAQWQDV
4B5	VKTPWE	NFPWNVQALDV
4G1	LGYWVH	SGIARQTQKDV
5A12	LHSWST	FYMSTGSFPYPFW
5B10	WKQVVA	ELFIYNW
5B9	EVRHWM	GFAWHYFWM
5C1	GYGLAS	QLNWNNRQAPRHW
5E6	QEQNVA	QILAPPPYQDV
5F3	YHWWIQ	GPVWFHMLW
5F6	WLPFDY	RWPILQLWHW
5G1	QHLWEVY	WNPVYFQW

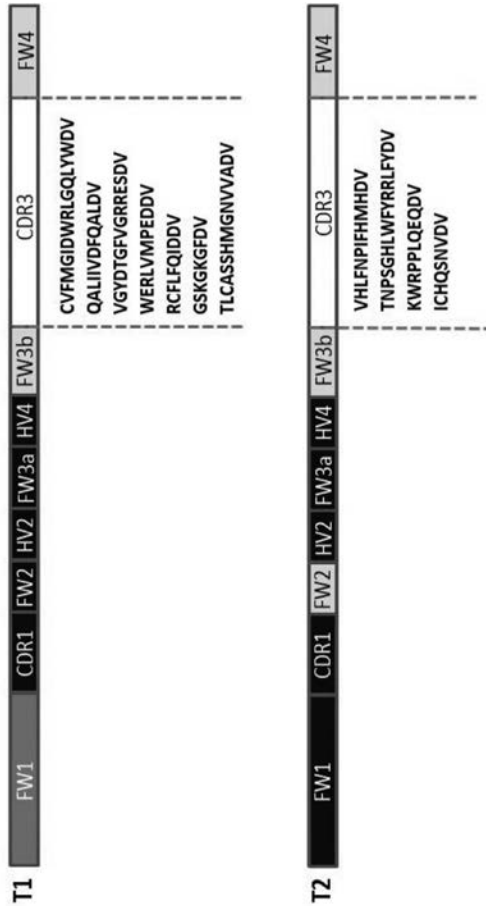
10A (つづき)

【 1 0 - 3 】

ソース	CDR1	CDR3
クローン1	SYALGS	TDTVRIYSCDYLCAINGHRDAA
クローン2	SAALVR	GAFCDYGCALPYAA
クローン8	GASLGS	GAFCDYGCALPYAA
クローン10	SYALGS	FPGVGRSCDFPYSICALHGYYA
クローン11	NYALGS	WRGISPCDYPYSICALVGYAA
クローン12	SYALGS	WRAGGSCDFPYSICALVGYAA
クローン13	IYALGS	PTQFTGIKSCDYIHLCSFFPAA
クローン17	SYALGS	FPGVGGGSCDFPYSICALHGYYA
クローン18	SYALGS	FPGVGRSCDFPYSICALHGYYA
クローン20	RGELGS	PTPFTGIKSCDYIHLCSFFPAA

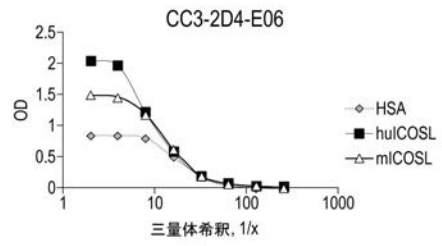
10B

【 1 0 - 4 】

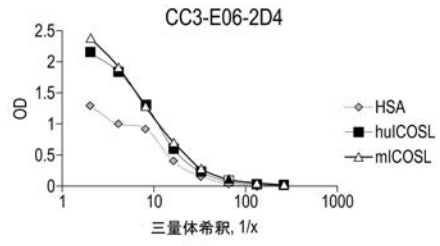


10C

【 1 1 】



11A



11B

【 1 2 】

1 mrlgspglf llfsslradt qekevramvg sdvelscap egsrfdlndv yyywqtsek
 61 tvtyhipqn sslenvsry mralmpag mlrgdfsrl fmvtpdeqk fhclvlsqsl
 121 gfgqevlsvev tlhvaansv pvvsaphsp qdeltfctis ingyprnvy winktdnsl
 181 dqalqndvtf lnmrglydvv svlriartps vnigccienv llqqlntvgs qtndigerd
 241 kitenpvstg eknaatwsil avlcllvva vaigwvcrdr clqhsyagaw avspeteltg
 301 hv

【配列表】

2016524592000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2014/058276

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C12N15/13 C07K16/00 C07K16/18 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EP0-Internal, BIOSIS, CAB Data, Sequence Search, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X, P	WO 2013/167883 A1 (UNIV ABERDEEN [GB]) 14 November 2013 (2013-11-14) claims 1-16	1-18
X	US 2011/129473 A1 (PANIAGUA-SOLIS JORGE F [MX] ET AL) 2 June 2011 (2011-06-02) sequence 7	1-18
X	WO 03/014161 A2 (UNIV ABERDEEN [GB]; UNIV MARYLAND [US]; DOOLEY HELEN [US]; PORTER ANDR) 20 February 2003 (2003-02-20) cited in the application claims 1-24	1-18
	----- -/--	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.
* Special categories of cited documents :		
A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier application or patent but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art *&* document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report	
16 September 2014	24/09/2014	
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Hornig, Horst	

4

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP2014/058276

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:
- a. (means)
- on paper
- in electronic form
- b. (time)
- in the international application as filed
- together with the international application in electronic form
- subsequently to this Authority for the purpose of search
2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2014/058276**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
1-18
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2014/058276

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2005/118629 A1 (DIATECH PTY LTD [AU]; NUTTAL STEWART [AU]; STRELTSOV VICTOR [AU]; GRIF) 15 December 2005 (2005-12-15) cited in the application sequence 25	1-18
A	----- DOOLEY H ET AL: "Selection and characterization of naturally occurring single-domain (IgNAR) antibody fragments from immunized sharks by phage display", MOLECULAR IMMUNOLOGY, PERGAMON, GB, vol. 40, no. 1, 1 September 2003 (2003-09-01), pages 25-33, XP003013541, ISSN: 0161-5890 cited in the application the whole document	1-18
A	----- HELEN DOOLEY ET AL: "First molecular and biochemical analysis of in vivo affinity maturation in an ectothermic vertebrate", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, vol. 103, no. 6, 7 February 2006 (2006-02-07), pages 1846-1851, XP002675675, ISSN: 0027-8424 the whole document	1-18
A	----- SHAO ET AL: "Rapid isolation of IgNAR variable single-domain antibody fragments from a shark synthetic library", MOLECULAR IMMUNOLOGY, PERGAMON, GB, vol. 44, no. 4, 1 January 2007 (2007-01-01), pages 656-665, XP005622948, ISSN: 0161-5890 the whole document	1-18
A	----- LIU ET AL: "Selection of cholera toxin specific IgNAR single-domain antibodies from a naive shark library", MOLECULAR IMMUNOLOGY, PERGAMON, GB, vol. 44, no. 7, 26 November 2006 (2006-11-26), pages 1775-1783, XP005792710, ISSN: 0161-5890 cited in the application the whole document	1-18
	----- -/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2014/058276

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>LIU JINNY L ET AL: "Isolation of anti-toxin single domain antibodies from a semi-synthetic spiny dogfish shark display library", BMC BIOTECHNOLOGY, BIOMED CENTRAL LTD. LONDON, GB, vol. 7, no. 1, 19 November 2007 (2007-11-19), page 78, XP021035661, ISSN: 1472-6750 cited in the application the whole document</p>	1-18
A	<p>NUTTALL S D ET AL: "ISOLATION OF THE NEW ANTIGEN RECEPTOR FROM WOBEGONG SHARKS, AND USE AS A SCAFFOLD FOR THE DISPLAY OF PROTEIN LOOP LIBRARIES", MOLECULAR IMMUNOLOGY, PERGAMON, GB, vol. 38, no. 4, 1 August 2001 (2001-08-01) , pages 313-326, XP001152503, ISSN: 0161-5890 cited in the application the whole document</p>	1-18
A	<p>NUTTALL S D ET AL: "A naturally occurring NAR variable domain binds the Kgp protease from Porphyromonas gingivalis", FEBS LETTERS, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 516, no. 1-3, 10 April 2002 (2002-04-10), pages 80-86, XP004349053, ISSN: 0014-5793 cited in the application the whole document</p>	1-18
A	<p>NUTTALL S D ET AL: "Isolation and characterization of an IgNAR variable domain specific for the human mitochondrial translocase receptor Tom70", EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, WILEY-BLACKWELL PUBLISHING LTD, GB, vol. 270, no. 17, 1 September 2003 (2003-09-01), pages 3543-3554, XP003013540, ISSN: 0014-2956 cited in the application the whole document</p>	1-18

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2014/058276

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>NUTTALL S D ET AL: "Selection and affinity maturation of IgNAR variable domains targeting Plasmodium falciparum AMA1", PROTEINS: STRUCTURE, FUNCTION, AND BIOINFORMATICS, JOHN WILEY & SONS, INC, US, vol. 55, no. 1, 1 April 2004 (2004-04-01), pages 187-197, XP003013539, ISSN: 0887-3585, DOI: 10.1002/PROT.20005 cited in the application the whole document</p>	1-18
A	<p>----- FENNELL B J ET AL: "Dissection of the IgNAR V Domain: Molecular Scanning and Orthologue Database Mining Define Novel IgNAR Hallmarks and Affinity Maturation Mechanisms", JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, ACADEMIC PRESS, UNITED KINGDOM, vol. 400, no. 2, 9 July 2010 (2010-07-09), pages 155-170, XP027087958, ISSN: 0022-2836 [retrieved on 2010-06-14] the whole document</p>	1-18
X,P	<p>----- KOVALENKO O V ET AL: "Atypical Antigen Recognition Mode of a Shark Immunoglobulin New Antigen Receptor (IgNAR) Variable Domain Characterized by Humanization and Structural Analysis", JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY FOR BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY, INC, BETHESDA, MD, USA, vol. 288, no. 24, 14 June 2013 (2013-06-14), pages 17408-17419, XP002700029, ISSN: 1083-351X [retrieved on 2013-04-30] the whole document</p> <p>-----</p>	1-18

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2014/058276

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2013167883 A1	14-11-2013	US 2013302250 A1 WO 2013167883 A1	14-11-2013 14-11-2013
US 2011129473 A1	02-06-2011	US 2011129473 A1 US 2014044716 A1 WO 2011056056 A2	02-06-2011 13-02-2014 12-05-2011
WO 03014161 A2	20-02-2003	AT 459651 T AU 2002319544 B2 AU 2008229871 A1 CA 2457636 A1 CA 2763913 A1 DK 1419179 T3 EP 1419179 A2 EP 2202243 A2 EP 2277913 A2 EP 2277914 A2 EP 2281837 A2 ES 2337986 T3 JP 5133494 B2 JP 2005515165 A PT 1419179 E US 2005043519 A1 US 2012064074 A1 WO 03014161 A2	15-03-2010 10-07-2008 06-11-2008 20-02-2003 20-02-2003 21-06-2010 19-05-2004 30-06-2010 26-01-2011 26-01-2011 09-02-2011 03-05-2010 30-01-2013 26-05-2005 16-03-2010 24-02-2005 15-03-2012 20-02-2003
WO 2005118629 A1	15-12-2005	AU 2005250055 A1 AU 2008229687 A1 AU 2009201692 A1 CA 2567655 A1 DK 1751181 T3 EP 1751181 A1 EP 2330120 A2 EP 2330121 A2 JP 2008511286 A JP 2011244822 A US 2009148438 A1 US 2012003214 A1 WO 2005118629 A1	15-12-2005 30-10-2008 21-05-2009 15-12-2005 26-11-2012 14-02-2007 08-06-2011 08-06-2011 17-04-2008 08-12-2011 11-06-2009 05-01-2012 15-12-2005

International Application No. PCT/ EP2014/ 058276

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-18(partially)

An ICOSL specific antigen binding molecule comprising an amino acid sequence represented by the formula (I):
 A-X-B-Y-C (I) wherein A- is SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO:4 or SEQ ID NO: 7, X is a CDR1 region of 6 or 7 amino acid residues, B - is SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 5 or SEQ ID NO: 8 Y is a CDR3 region of 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 or 21 amino acid residues, C is SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 6, or SEQ ID NO: 9 or a sequence at least 50% homologous thereto, in which SEQ ID NO: 1 is
 TRVDQTPRTATKETGESLTINCVLDT, TRVDQTPRTATKETGESLTINCWTGA, SEQ ID NO: 2 is
 TSWFRKNPGTTDWERMSIGGRYVESVNGAKSFLRIKDLTVADSATYYCKA or TSWFRKNPGTTDWERMSIGGRYVESVNGAKSFLRIKDLTVADSATYICRA, SEQ ID NO: 3 is DGAGTVLTVN, SEQ ID NO: 4 is
 ASVNQTPRTATKETGESLTINCVLDT, SEQ ID NO: 5 is
 TYWYRKNPGSSNQERISISGRWESVKNRTMSFSLRIKDLTVADSATYYCKA or TYWYRKNPGSSNQERISISGRYVESVKNRTMSFSLRIKDLTVADSATYICRA, SEQ ID NO: 6 is YGAGTVLTVN, SEQ ID NO: 7 is
 ARVDQTPRSVTKETGESLTINCVLDP or ARVDQTPRSVTKETGESLTINCVLRA or ARVDQTPRSVTKETGESLTINCVLDP or ARVDQTPRSVTKETGESLTINCVLRES, SEQ ID NO: 8 is
 TCWYRKKSGSTNEESISKGGRWENSGSKSFLRINDLTVEDGGTYRCGA or TCWSRKKSGSTNEESISKGGRYVEWNSGSKSFLRINDLTVEDGGTYRCGL, TCWTRKKSGSTNEESISKGGRYVETVNSGSKSFLRINDLTVEDGGTYRCAL, TCWYRKKSGSTNEESISKGGRWETVNSGSKSFLRINDLTVEDGGTYRCGV, TCWYRKKSGSTNEESISKGGRYVETVNSGSKSFLRINDLTVEDGGTYRCGH, TCWYRKKSGSTNEESISKGGRYVE1VNSGSKSFLRISDLTVEDGGTYRCGH, SEQ ID NO: 9 is CGGGWVN, CGGGTAVTVN, CGDGTAVTVN, or CGDGTAVTVN; where the CDR3 region is a CDR3 region GPIYFETWHDV (1A9) shown in Fig. 10A-10C and where the CDR1 region is a CDR1 region WKWLQ (1A9) as shown in Fig. 10A-10B (i.e. SEQ ID NO. 16);
 a fusion protein comprising said ICOSL specific antigen binding molecule; a nucleic acid encoding said ICOSL specific antigen binding molecule; a host cell comprising a vector comprising said nucleic acid; a process for the production of said ICOSL specific antigen binding molecule; a pharmaceutical comprising said ICOSL specific antigen binding molecule; said ICOSL specific antigen binding molecule or said fusion protein for use in medicine;

2. claims: 1-18(partially)

Idem as invention 1 but limited to the CDR3 region VFLNPWDWPHWY (1C8) shown in Fig. 10A-10C and/or where the CDR1 region is PQNWQA (1C8) as shown in Fig. 10A-10B;

3-48. claims: 1-18(partially)

International Application No. PCT/ EP2014/ 058276

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Idem as invention 1 but limited to each single CDR3 region shown in Fig. 10A-10C and/or to each single CDR1 region is as shown in Fig. 10A-10B (Invention 3 is limited to CDR3 WWDVPQRWEPVSNYWY (1D12) and CDR1 GYGLAA (1D12); Invention 4 is limited to CDR3 PYYQYNDWHDV (2B6) and CDR1 is SPTGTF (2B6); Invention 48 is limited to CDR3 ICHQSNVDV;

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード(参考)
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10	
C 1 2 P	21/08 (2006.01)	C 1 2 P	21/08	
C 0 7 K	19/00 (2006.01)	C 0 7 K	19/00	
C 1 2 P	21/02 (2006.01)	C 1 2 P	21/02	C
A 6 1 K	38/00 (2006.01)	A 6 1 K	37/02	
A 6 1 P	37/02 (2006.01)	A 6 1 P	37/02	
A 6 1 P	43/00 (2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 0 5
G 0 1 N	33/53 (2006.01)	G 0 1 N	33/53	D

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, T M), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, R S, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, H R, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG , NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

(72)発明者 フィンレイ, ウィリアム ジェームス ジョナサン
アイルランド, ダブリン 8, ポートベロ, ウィンザー テラス 2 3

(72)発明者 ダーマンイン - シーハン, アルフレッド
アイルランド, ダブリン 1, ドミニク ストリート, ボルトン スクエア 3 3

F ターム(参考) 4B024 AA01 BA41 BA61 CA01 CA04 CA09 CA11 CA20 DA02 DA20
EA05 GA11 HA01
4B064 CA10 CA12 CA19 CC24 DA01
4B065 AA26X AA91X AA98X AB01 AB05 AB10 AC14 BA02 BD50 CA24
CA25 CA44
4C084 AA02 AA07 BA01 BA41 CA53 NA14 ZB071 ZB072 ZB212 ZC412
4H045 AA10 AA30 BA10 BA15 BA18 BA20 BA41 CA40 DA50 EA20
EA22 FA74 GA26

专利名称(译)	将治疗性靶特异性VNAR结构域分离至ICOSL		
公开(公告)号	JP2016524592A	公开(公告)日	2016-08-18
申请号	JP2016509455	申请日	2014-04-23
申请(专利权)人(译)	阿伯丁大学的大学学院		
[标]发明人	バレルキャロラインジェーン フィンレイウィリアムジェームスジョナサン ダーマンインシーハンアルフレッド		
发明人	バレル, キャロライン ジェーン フィンレイ, ウィリアム ジェームス ジョナサン ダーマンイン-シーハン, アルフレッド		
IPC分类号	C07K16/28 C12N15/09 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12P21/08 C07K19/00 C12P21/02 A61K38/00 A61P37/02 A61P43/00 G01N33/53		
CPC分类号	A61P37/02 A61P43/00 C07K16/005 C07K16/18 C07K16/2827 C07K2317/20 C07K2317/565 C07K2317/567 C07K2317/569 C07K2317/73 C07K2317/76 C07K2317/92 A61K49/0002 A61K2039/505 C07K16/28 C07K16/2803 C07K16/40 C07K2317/14 C07K2317/24 C12N15/1037 G01N33/6872 G01N2333/70532		
FI分类号	C07K16/28.ZNA C12N15/00.A C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12P21/08 C07K19/00 C12P21/02.C A61K37/02 A61P37/02 A61P43/00.105 G01N33/53.D		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/BA41 4B024/BA61 4B024/CA01 4B024/CA04 4B024/CA09 4B024/CA11 4B024/CA20 4B024/DA02 4B024/DA20 4B024/EA05 4B024/GA11 4B024/HA01 4B064/CA10 4B064/CA12 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA01 4B065/AA26X 4B065/AA91X 4B065/AA98X 4B065/AB01 4B065/AB05 4B065/AB10 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/BD50 4B065/CA24 4B065/CA25 4B065/CA44 4C084/AA02 4C084/AA07 4C084/BA01 4C084/BA41 4C084/CA53 4C084/NA14 4C084/ZB071 4C084/ZB072 4C084/ZB212 4C084/ZC412 4H045/AA10 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA15 4H045/BA18 4H045/BA20 4H045/BA41 4H045/CA40 4H045/DA50 4H045/EA20 4H045/EA22 4H045/FA74 4H045/GA26		
优先权	61/815043 2013-04-23 US		
其他公开文献	JP2016524592A5 JP6591964B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供了从免疫的和合成的分支下衍生的文库分离的ICOSL特异性抗原结合分子。特别地,本发明涉及特异性结合并中和人诱导的共刺激配体(ICOSL)活性的鲨鱼可变新抗原受体(VNAR)结构域。从两个独立的来源中分离出中和的VNAR域;一个免疫的豚鼠文库和一个合成的棕色狗鱼框架融合文库。该分子可以配制成药物组合物并用于医学中。

【图2】

