

(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2009-545322

(P2009-545322A)

(43) 公表日 平成21年12月24日(2009.12.24)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B 0 2 4
C 1 2 P 21/02 (2006.01)	C 1 2 P 21/02 C	4 B 0 6 4
C O 7 K 19/00 (2006.01)	C O 7 K 19/00	4 B 0 6 5
C O 7 K 14/46 (2006.01)	C O 7 K 14/46	4 C 0 8 5
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 H 0 4 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 53 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2009-522978 (P2009-522978)
 (86) (22) 出願日 平成19年7月27日 (2007.7.27)
 (85) 翻訳文提出日 平成21年3月25日 (2009.3.25)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2007/074620
 (87) 国際公開番号 W02008/016854
 (87) 国際公開日 平成20年2月7日 (2008.2.7)
 (31) 優先権主張番号 60/835,033
 (32) 優先日 平成18年8月2日 (2006.8.2)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

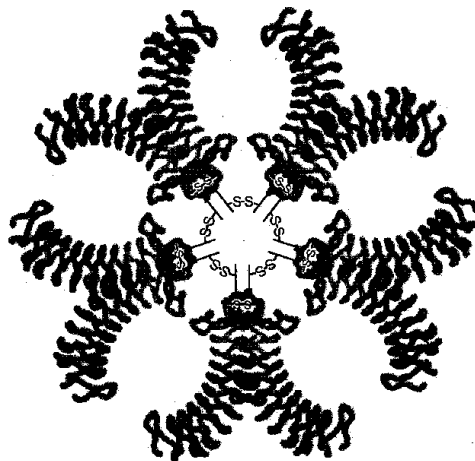
(71) 出願人 506385335
 ザ ユーエービー リサーチ ファウンデーション
 アメリカ合衆国 アラバマ 35294-0117, バーミングハム, 3アール
 ディー アベニュー サウス 1530,
 エービー 770
 (74) 代理人 100078282
 弁理士 山本 秀策
 (74) 代理人 100062409
 弁理士 安村 高明
 (74) 代理人 100113413
 弁理士 森下 夏樹

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 規定された抗原特異性の可溶性モノクローナル可変性リンパ球受容体に関連する方法および組成物

(57) 【要約】

開示されるのは、可変性リンパ球受容体 (VLR) に関連する組成物および方法である。より詳細には、開示されるのは、可溶性、モノクローナル、多価形態を含む、各種抗原特異的ポリペプチド、並びに、該ポリペプチドの使用法、該抗原特異的ポリペプチドに結合する抗体、および、該ポリペプチドをコードする核酸、ベクター、および発現システムである。炭疽菌などの病原体、血液型決定基などの炭水化物に選択的に結合する、抗原特異的ポリペプチドが、具体的に開示される。



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

可溶性モノクローナル抗原特異的ポリペプチドを作製する方法であって：

a．抗原特異的ポリペプチドであって、N末端ロイシンリッチリピート（LRRNT）と、一つ以上のロイシンリッチリピート（LRR）と、C末端ロイシンリッチリピート（LRCCT）と、アルファヘリックスを含む連結ペプチドとを含む、該抗原特異的ポリペプチドをコードするcDNAクローンを単離すること；

b．培養媒体において、工程（a）のcDNAクローンで細胞をトランスフェクトすること；および、

c．該培養媒体から該抗原特異的ポリペプチドを単離すること、
を含む方法。

10

【請求項 2】

前記抗原特異的ポリペプチドが標的タンパク質に結合する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記抗原特異的ポリペプチドが標的炭水化物に結合する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記抗原特異的ポリペプチドが標的病原体に結合する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

前記cDNAクローンを含む安定な細胞系統を生成する工程をさらに含む、請求項 1 から 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

20

【請求項 6】

請求項 1 の方法によって作製される、可溶性モノクローナル抗原特異的ポリペプチド。

【請求項 7】

前記ポリペプチドが、配列番号：5、47、49、51、53、55、57、59、および61から成る群から選ばれるアミノ酸配列を含む、請求項 6 に記載の、可溶性モノクローナル抗原特異的ポリペプチド。

【請求項 8】

前記ポリペプチドが、配列番号20のアミノ酸配列を含む、請求項 6 に記載の可溶性モノクローナル抗原特異的ポリペプチド。

【請求項 9】

複数の抗原特異的ポリペプチドを含む多価タンパク質であって、各抗原特異的ポリペプチドが：

- a．N末端ロイシンリッチリピート（LRRNT）、
- b．一つ以上の、内部のロイシンリッチリピート（LRR）、
- c．C末端ロイシンリッチリピート（LRCCT）、および
- d．アルファヘリックスを含む連結ペプチド

を含む、多価タンパク質。

30

【請求項 10】

最大10個の抗原特異的ポリペプチドを含む、請求項 9 に記載の多価タンパク質。

【請求項 11】

前記抗原特異的ポリペプチドが標的タンパク質に結合する、請求項 9 または 10 に記載の多価タンパク質。

40

【請求項 12】

前記抗原特異的ポリペプチドが標的炭水化物に結合する、請求項 9 または 10 に記載の多価タンパク質。

【請求項 13】

前記抗原特異的ポリペプチドが標的病原体に結合する、請求項 9 または 10 に記載の多価タンパク質。

【請求項 14】

前記抗原特異的ポリペプチドが可溶性である、請求項 9 または 10 に記載の多価タンバ

50

ク質。

【請求項 15】

抗原特異的ポリペプチドであって：

- a．N末端ロイシンリッチリピート（LRRNT）、
- b．一つ以上の、ロイシンリッチリピート（LRR）、
- c．C末端ロイシンリッチリピート（LRCCT）、および

d．連結ペプチドであって、該連結ペプチドは、アルファヘリックスを含み、標的炭水化物に特異的に結合する、連結ペプチドを含む、抗原特異的ポリペプチド。

【請求項 16】

10

前記標的炭水化物が血液型決定基である、請求項 15 に記載の抗原特異的ポリペプチド。

【請求項 17】

前記血液型決定基が H 決定基である、請求項 16 に記載の抗原特異的ポリペプチド。

【請求項 18】

前記抗原特異的ポリペプチドが、配列番号 20 のアミノ酸配列を含む、請求項 16 に記載の抗原特異的ポリペプチド。

【請求項 19】

血液型を決定する方法であって：

- a．検出可能に標識された請求項 16 に記載の抗原特異的ポリペプチドに血液サンプルを接触させること；および、
- b．該血液サンプルにおいて一つ以上の細胞に結合した標識抗原特異的ポリペプチドを検出することを含み、該標識の有無が血液型を示す、方法。

20

【請求項 20】

血液型を決定する方法であって：

- a．請求項 16 に記載の第 1 抗原特異的ポリペプチドに血液サンプルを接触させることであって、該第 1 抗原特異的ポリペプチドは、検出可能に第 1 標識によって標識され、かつ、第 1 血液決定基に対して特異的であること；
- b．第 2 抗原特異的ポリペプチドに前記血液サンプルを接触させることであって、該第 2 抗原特異的ポリペプチドは、検出可能に第 2 標識によって標識され、かつ、第 2 血液決定基に対して特異的であること；および、
- c．該血液サンプルにおいて一つ以上の細胞に結合する、標識第 1 および第 2 抗原特異的ポリペプチドを検出することを含み、前記第 1 および第 2 標識の有無が血液型を示す、方法。

30

【請求項 21】

請求項 15 に記載の抗原特異的ポリペプチドを作製する方法であって：

- a．ヤツメウナギまたはヌタウナギに前記標的炭水化物を投与すること；
- b．該ヤツメウナギまたはヌタウナギのリンパ球から抗原特異的タンパク質をコードする RNA を単離すること；
- c．工程（b）の該単離 RNA から、抗原特異的タンパク質をコードする cDNA を増幅すること；
- d．工程（c）の該 cDNA を発現ベクターにクローンすること；
- e．該発現ベクターで形質転換した宿主細胞において工程（d）の cDNA を発現させること；
- f．工程（e）の cDNA クローンを単離すること；
- g．工程（f）の cDNA クローンで培養細胞をトランスフェクトすること；
- h．該標的炭水化物に対する結合能力に関して培養上清をスクリーニングすること；および、
- i．該上清から、該標的炭水化物に結合する該抗原特異的タンパク質を単離すること、を含む方法。

40

50

【請求項 22】

請求項 21 に記載の方法によって作製される、抗原特異的タンパク質。

【請求項 23】

請求項 22 に記載の抗原特異的タンパク質をコードする核酸。

【請求項 24】

請求項 23 に記載の核酸を含む発現ベクター。

【請求項 25】

請求項 24 に記載の発現ベクターを含む培養細胞。

【請求項 26】

抗原特異的ポリペプチドであって：

10

- a. N 末端ロイシンリッチリピート (LRRNT)、
- b. 一つ以上の、ロイシンリッチリピート (LRR)、
- c. C 末端ロイシンリッチリピート (LRCCT)、および

d. 連結ペプチドであって、該連結ペプチドは、アルファヘリックスを含み、*Bacillus anthracis* の細胞表面ポリペプチドに特異的に結合する、連結ペプチドを含む、抗原特異的ポリペプチド。

【請求項 27】

前記 *Bacillus anthracis* の細胞表面ポリペプチドが BclA である、請求項 26 に記載の抗原特異的ポリペプチド。

20

【請求項 28】

前記結合ポリペプチドが、配列番号：5、22、47、49、51、53、55、57、59、および 61 から成る群から選ばれるアミノ酸配列を有する、請求項 26 に記載の抗原特異的ポリペプチド。

【請求項 29】

サンプルにおいて *Bacillus anthracis* の存在を検出する方法であって：

- a. 検出可能に標識された請求項 26 または 27 に記載の抗原特異的ポリペプチドに、該サンプルを接触させること；および、
- b. 該サンプルに結合した標識抗原特異的ポリペプチドを検出することを含み、該標識の存在は、該サンプルにおける *Bacillus anthracis* の存在を示す、方法。

30

【請求項 30】

対象において *Bacillus anthracis* の病原性を低減させる方法であって、該対象に、請求項 26 に記載の抗原特異的ポリペプチドを投与することを含む、方法。

【請求項 31】

請求項 26 または 27 に記載の抗原特異的ポリペプチドを作製する方法であって：

- a. 該細胞表面 *Bacillus anthracis* ポリペプチドを、ヤツメウナギまたはヌタウナギに投与すること；
- b. 該ヤツメウナギまたはヌタウナギのリンパ球から抗原特異的タンパク質をコードする RNA を単離すること；
- c. 工程 (b) の該単離 RNA から、抗原特異的タンパク質をコードする cDNA を増幅すること；
- d. 工程 (c) の該 cDNA を発現ベクターにクローンすること；
- e. 該発現ベクターで形質転換した宿主細胞において工程 (d) の cDNA を発現させること；
- f. 工程 (e) の cDNA クローンを単離すること；
- g. 工程 (f) の cDNA クローンで培養細胞をトランスフェクトすること；
- h. 該細胞表面 *Bacillus anthracis* ポリペプチドに対する結合能力

40

50

に関して培養上清をスクリーニングすること；および、

i . 該上清から、該細胞表面 B a c i l l u s a n t h r a c i s ポリペプチドに結合する該抗原特異的タンパク質を単離すること、を含む方法。

【請求項 3 2】

請求項 2 6 に記載の抗原特異的ポリペプチドをコードする核酸。

【請求項 3 3】

請求項 3 2 に記載の核酸を含む発現ベクター。

【請求項 3 4】

請求項 3 3 に記載の発現ベクターを含む培養細胞。

10

【請求項 3 5】

抗原特異的ポリペプチドであって：

a . N 末端ロイシンリッチリピート (L R R N T)、

b . 一つ以上のロイシンリッチリピート (L R R)、

c . C 末端ロイシンリッチリピート (L R C C T)、および

d . 連結ペプチドであって、該連結ペプチドは、アルファヘリックスを含み、ウイルス抗原に特異的に結合する、連結ペプチド、を含む、抗原特異的ポリペプチド。

【請求項 3 6】

前記ウイルス抗原がヒト免疫不全ウイルス (H I V) である、請求項 3 5 に記載の抗原特異的ポリペプチド。

20

【請求項 3 7】

前記ウイルス抗原が、H I V エンベロープタンパク質 g p 1 2 0 である、請求項 3 5 に記載の抗原特異的ポリペプチド。

【請求項 3 8】

前記ウイルス抗原がインフルエンザである、請求項 3 5 に記載の抗原特異的ポリペプチド。

【請求項 3 9】

サンプルにおいてウイルスの存在を検出する方法であって：

a . 検出可能に標識された請求項 3 5 に記載の抗原特異的ポリペプチドに、該サンプルを接触させること；および、

30

b . 該サンプルに結合する標識抗原特異的ポリペプチドを検出することを含み、該標識の存在は、該サンプルにおける該ウイルスの存在を示す、方法。

【請求項 4 0】

対象においてウイルスの病原性を低減させる方法であって、該対象に、請求項 3 5 に記載の抗原特異的ポリペプチドを投与することを含む方法。

【請求項 4 1】

請求項 3 5 に記載の抗原特異的ポリペプチドを作製する方法であって：

a . ヤツメウナギまたはヌタウナギに前記ウイルス抗原を投与すること；

b . 前記ヤツメウナギまたはヌタウナギのリンパ球から抗原特異的タンパク質をコードする R N A を単離すること；

40

c . 工程 (b) の単離 R N A から、抗原特異的タンパク質をコードする c D N A を増幅すること；

d . 工程 (c) の c D N A を発現ベクターにクローンすること；

e . 該発現ベクターによって形質転換した宿主細胞において工程 (d) の c D N A を発現させること；

f . 工程 (e) の c D N A クローンを単離すること；

g . 工程 (f) の c D N A クローンで培養細胞をトランスフェクトすること；

h . 該ウイルス抗原に対する結合能力に関して該培養上清をスクリーニングすること；および、

50

i . 該上清から、該ウイルス抗原に結合する該抗原特異的タンパク質を単離すること、を含む方法。

【請求項 4 2】

請求項 3 5 に記載の抗原特異的タンパク質をコードする核酸。

【請求項 4 3】

請求項 4 2 に記載の核酸を含む発現ベクター。

【請求項 4 4】

請求項 4 3 に記載の発現ベクターを含む培養細胞。

【請求項 4 5】

抗原特異的ポリペプチドに選択的に結合する抗体であって：

10

- a . N 末端ロイシンリッチリピート (L R R N T) 、
- b . 一つ以上のロイシンリッチリピート (L R R) 、
- c . C 末端ロイシンリッチリピート (L R C C T) 、および
- d . アルファヘリックスを含む連結ペプチド

を含む、抗体。

【請求項 4 6】

前記抗体が検出可能成分によって標識される、請求項 4 5 に記載の抗体。

【請求項 4 7】

前記抗体が 4 C 4 または 6 C 3 である、請求項 4 5 または 4 6 に記載の抗体。

【請求項 4 8】

20

抗原特異的ポリペプチドを作製する方法であって：

- a . ヤツメウナギまたはヌタウナギに標的抗原を投与すること；
- b . 該ヤツメウナギまたはヌタウナギのリンパ球から抗原特異的タンパク質をコードする R N A を単離すること；
- c . 工程 (b) の単離 R N A から、抗原特異的タンパク質をコードする c D N A を増幅すること；
- d . 工程 (c) の c D N A を発現ベクターにクローンすること；
- e . 該発現ベクターで形質転換した宿主細胞において工程 (d) の c D N A を発現させること；
- f . 工程 (e) の c D N A クローンを単離すること；
- g . 工程 (f) の c D N A クローンで培養細胞をトランスフェクトすること；
- h . 該抗原に対する結合能力に関して培養上清をスクリーニングすること；および、
- i . 該上清から、該抗原に結合する該抗原特異的タンパク質を単離すること、を含む方法。

30

【請求項 4 9】

前記抗原が、タンパク質、病原体、炭水化物、脂質、糖脂質、および糖タンパク質から成る群から選ばれる、請求項 4 8 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【背景技術】

【0 0 0 1】

40

関連出願への相互参照

本願は、2006年8月2日に出願された米国特許出願第60/835,033号に対する優先権を主張する。米国特許出願第60/835,033号は、本明細書中に参考として援用される。

【0 0 0 2】

発明の背景

最近、無顎脊椎動物が、可変性リンパ球受容体 (V L R) と呼ばれる、抗原特異的受容体を有することが明らかにされた。これらの V L R は、適応性免疫に関与するが、有顎脊椎動物に見られる免疫グロブリン型抗原受容体とははっきり異なる。V L R は、クローン的に多様であり、ロイシンリッチな反復 (L R R) モジュールを含む。V L R は、以前に

50

、ヤツメウナギまたはヌタウナギから単離され、G P I アンカーを有し、膜結合型であることが知られる。しかしながら、上記の特徴のために、大規模なV L R生産のために利用が可能な細胞系統は無かった。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0003】

発明の要旨

本明細書において具体的に例示し、広範囲に記載するように、本出願は、抗原特異的ポリペプチド、およびそれに関連する方法および組成物に関する。本出願はさらに、可溶性、モノクローナルV L Rを作製する方法に関する。これらの方法は、V L Rの大規模生産のために商業的に有用である。さらに、本出願において提供されるものは、これらの方法によって作製されるV L Rであって、例えば、ただし、例示のためであって、限定のためではないが、炭疽菌、H I V、およびインフルエンザなどの病原体に対して特異的なV L R、および、血液型決定因子などの炭水化物に対して特異的なV L Rなどである。さらに提供されるものは、V L Rに対する抗体、および、V L Rをコードする核酸である。V L Rの使用法、V L Rをコードする核酸、およびV L Rに対する抗体も開示される。

10

【0004】

前述の一般的記述、および下記の詳細な説明はいずれも、単に例示および説明のためのものであって、特許請求の範囲を限定するものではないことを理解しなければならない。

20

【0005】

本明細書に組み込まれ、その一部を構成する付属の図面は、いくつかの実施態様を例示し、その説明と相俟って、V L R、およびそれに関連する方法および組成物の原理を説明するのに役立つ。

【図面の簡単な説明】

【0006】

【図1】図1 Aは、ヤツメウナギ血清から単離されたV L R、および培養媒体から単離されたV L Rのウェスタンブロットである。血液は、ヤツメウナギ幼生から、抗凝固剤としてのE D T Aの存在下に収集した。血液細胞は、1, 0 0 0 g 5分の遠心によってペレット状とし、次いで、血漿上清を取り出した。この血漿を、還元剤、2 - メルカプト - エタノール(2 - M E)によって処理するか、または未処理のままとし、次いで、S D S - P A G Eゲルに負荷した(左パネル)。図1 Aの右パネルでは、クローンされたV L R c D N AをH E K - 2 9 3 T細胞にトランスフェクトした。トランスフェクションの48時間後、トランスフェクト細胞から培養媒体を収集し、2 - M E前処置をして、またはせずに、S D S - P A G Eに負荷した。V L R発現を、抗V L R m A b(4 C 4)によるウェスタンブロットによって検出した。図1 Bは、多価V L Rのモデルである。

30

【図2】抗原特異的V L R作製法の模式図である。

【図3】トランスフェクトされたH E K - 2 9 3細胞から分泌された多価V L Rのウェスタンブロットである。図3 Aは、S D S - P A G Eゲル負荷前に、2 - メルカプトエタノールで処理した、トランスフェクトH E K - 2 9 3細胞から調製した、界面活性剤可溶分解物使用の結果を示す。図3 Bは、トランスフェクションの48時間後、直接S D S - P A G Eゲルに負荷した、V L R形質転換細胞採取上清のウェスタンブロットである。V L R発現は、抗V L R m A b(4 C 4)によるウェスタンブロットティングによって検出した。図3 Cは、トランスフェクションの48時間後、S D S - P A G Eゲルに負荷前に、2 - メルカプトエタノールで処理した、V L R形質転換細胞採取上清のウェスタンブロットである。V L R発現は、抗V L R m A b(4 C 4)によるウェスタンブロットティングによって検出した。

40

【図4】いくつかのV L Rの結合特異性を特定する棒グラフである。V L RトランスフェクトH E K - 2 9 3細胞からの培養上清を、表示の抗原をコートした96ウェルプレートにおいてインキュベートした。V L R結合は、抗V L R m A b(4 C 4)、次いで、A P 接合ヤギ抗マウスI g二次抗体によって検出した。

50

【図5A】*B. anthracis*のBclA-CTD（配列番号1）および*B. cereus*のBclA-CTD（配列番号2）の整列。非保存的残基を、白色で強調する。

【図5B】BclAに結合する、VLR4可変域（配列番号3）、および、BclAに結合しない、VLR5可変域（配列番号4）の比較を示す配列整列。白は、アミノ酸差を示し、（*）は、積極的に選択されること、およびVLRソレノイド構造の内面へ配されることが予測される残基を示す。

【図6】ヤツメウナギVLRが、ヒトの血液型炭水化物抗原を認識することを実証するFACSヒストグラムを示す。結果は、ヒト赤血球によって免疫化されたヤツメウナギの血漿のみが、H抗原を生成するように酵素によってトランスフェクトされたCHO細胞を染色することを示す。

10

【図7】種々のLRドメインを表示する、完全長VLR-4（配列番号5）および完全長VLR-5（配列番号6）の配列整列である。

【図8A】抗原特異的モノクローナルVLR-B抗体の生産法を示す模式図である。4から8週間、抗原の腹腔内（I.P.）注入によってヤツメウナギが免疫化されるところが示される。免疫化後、抹消血からパッフィーコートリンパ球を単離し、全体RNAを調製した。5'および3'定常域に対し特異的なプライマーによるPCRによってVLR-B cDNAを単離し、これを、哺乳動物発現ベクターにクローンしてライブラリーを構築した。VLR-B cDNAを、HEK-293T細胞に一過性にトランスフェクトし、トランスフェクト細胞の上清を用いて、ELISAまたはフローサイトメトリーによって、抗原結合に関してスクリーニングした。

20

【図8B】抗原特異的モノクローナルVLR-B抗体の生産法を示す模式図である。は、マウスモノクローナル抗体（mAb）生産・対・ヤツメウナギモノクローナルVLR-B（mVLR-B）抗体生産に必要とされる時間投資を示す。

【図9-1】図9Aは、*B. anthracis*のBclAに対して特異的な、モノクローナルVLR-B抗体の生産を示す。プレートに、組み換えBclA-CTD-GST、またはGSTタンパク質を塗布し、次いで、VLR-BトランスフェクトHEK-293T細胞の上清と共にインキュベートした。VLR-B結合は、抗VLR-B mAb（4C4）、および、AP-接合ヤギ抗マウスポリクローナルAbによって検出した。図9Bは、*B. anthracis*のBclAに対して特異的な、モノクローナルVLR-B抗体の生産を示す。胞子を、ポリ-L-リシン処理プレートに吸着させ、次いで、VLR-Bトランスフェクト細胞上清と共にインキュベートした。VLR-B結合は、図10Aに記載するように、ELISAによって検出した。

30

【図9-2】図9Cは、*B. anthracis*のBclAに対して特異的な、モノクローナルVLR-B抗体の生産を示す。胞子を、VLR-Bトランスフェクト細胞上清と共にインキュベートし、次いで、抗VLR-B mAb（4C4）、およびFITC-接合ヤギ抗マウスポリクローナルAbで染色した。VLR-B染色を、フローサイトメトリーによって分析した（BD FACSscan（商標）（BD Biosciences, San Jose, CA））。図9Dは、*B. anthracis*由来のBclA-CTD（配列番号1）、および*B. cereus* TのBclA-CTD（配列番号2）の配列整列を示す。溶媒暴露アミノ酸差には、黒陰影を、埋没アミノ酸差には、灰色陰影を施す。図9Eは、*B. anthracis*のBclA-CTD三次構造の表面画像を示す。*B. anthracis*および*B. cereus*の間に見られるアミノ酸配列の差には、黒陰影を施す。

40

【図10】組み換えVLR-Bを集結させて、ジスルフィド結合マルチマー複合体としたことを示す。図10Aは、VLR4トランスフェクトHEK-293T細胞からの上清を、BclA-CTD接合セファロースビーズと共にインキュベートし、次いで洗浄し、指示の条件による溶出について調べた（TEA = トリエチルアミン、EtGlycol = エチレングリコール）。VLR4溶出は、抗VLR-B mAb（4C4）によるウェスタンブロッティングによって検出した。図10Bは、大規模精製のために、安定なトランスフェクト細胞上清から、BclA-CTDアフィニティー精製によってVLR4を精製し

50

、トリエチルアミン pH 11.5 によって溶出した。精製 VLR 4 を、非還元性 8 % SDS - PAGE によって分離し、Gel code blue 染色によって検出した。図 10 C は、5、6、7、8、10、および 12 % の未加工ポリアクリルアミドゲルにおける、精製組み換え VLR 4、および高分子量タンパク質標準 (Amersham Biosciences) の相対的移動度を測定し、これを用いて Ferguson プロットを構築し、マルチマー VLR 4 の分子量を推定した。図 10 D は、部分的還元条件下で、VLR - 4 含有上清をウェスタンブロットすることによって、モノマー、ダイマー、およびオリゴマーを検出した。

【図 11 - 1】図 11 は、オリゴマー集結のためには、VLR - B のシステインリッチ C 末端が必要であることを示す。図 11 A は、VLR 4 野生型 (WT) および GPI - stop トランスフェクト HEK - 293 T 細胞からの上清を、非還元性 10 % SDS - PAGE ゲルで分離し、抗 VLR mAb (4C4)、次いで、HRP 接合ヤギ抗マウスポリクロナール抗体によってウェスタンブロットした。図 11 B は、VLR 4 を、HEK - 293 T 細胞上清から精製し、還元性 SDS - PAGE によって分離し、Gel code blue 染色し、メスを用いて切り出した。切り出した VLR 4 バンドは、イオドアセタミドによってアルキル化し、トリプシンで消化した。このトリプシン処理ペプチドを、RP - HPLC によって分離し、ESI - MS / MS によって分析した。質量スペクトラムには Y - イオンが示される。

【図 11 - 2】図 11 は、オリゴマー集結のためには、VLR - B のシステインリッチ C 末端が必要であることを示す。図 11 C は、VLR 4 WT および GPI - stop 構築体の模式図である。MS / MS によって特定された典型的ペプチドが、配列上の黒線によって示される (配列番号 40)。図 11 D は、オリゴマー集結のためには、VLR - B のシステインリッチ C 末端が必要であることを示す。Bcl A - 1 - island 塗布プレートに対する、VLR 4 WT および GPI - stop の結合の EISA 結果を示すグラフである。

【図 12 A】図 12 は、陥凹面における超可変アミノ酸の部位指向性突然変異誘発による VLR 5 アビディティの修飾を示す。図 12 A は、高アビディティ抗 Bcl A - CT D VLR - B 抗体 (vBA 41 (配列番号 41)、vBA 191 (配列番号 42)、および VLR 4 (配列番号 43))、および、低アビディティ抗 Bcl A - CT D VLR - B 抗体 (VLR 5 (配列番号 44)) の複数配列整列である。超可変位置はボックスで囲まれ、高アビディティ VLR - B 抗体によって利用される共通残基と異なる、VLR 5 のアミノ酸は、陰影で示されるが、それらのアミノ酸が超可変位置に存在する場合、あるパターンを示す。超可変位置以外での配列差は、グレイの陰影で示される。

【図 12 B】図 12 は、陥凹面における超可変アミノ酸の部位指向性突然変異誘発による VLR 5 アビディティの修飾を示す。図 12 B は、VLR 5 の陥凹面のモデルである。VLR 5 によって利用されるアミノ酸・対・高アビディティ抗 Bcl A - CT D VLR - B 抗体の共通配列における不一致は、陰影で示され、A と同じパターンを描く。例えば、図 12 A の位置 13 における H 周辺のパターンは、図 12 B において同じパターンで陰影で示される円に一致する。図 12 A の位置 34 における Y 周辺のパターンは、図 12 B において同じパターンで陰影で示される円に一致する。図 12 A の位置 37 における T 周辺のパターンは、図 12 B において同じパターンで陰影で示される円に一致する。図 12 A の位置 80 における Q 周辺のパターンは、図 12 B において同じパターンで陰影で示される円に一致する。図 12 A の位置 82 における S 周辺のパターンは、図 12 B において同じパターンで陰影で示される円に一致する。図 12 A の位置 106 における W 周辺のパターンは、図 12 B において同じパターンで陰影で示される円に一致する。

【図 12 C】図 12 は、陥凹面における超可変アミノ酸の部位指向性突然変異誘発による VLR 5 アビディティの修飾を示す。図 12 C は、VLR - B 抗体の相対的アビディティを、表面プラズモン共鳴 (Biacore 3000) によって測定した。Bcl A - 1 - island を、Biacore CM5 チップに共有的に接合し、次いで、タンパク質発現に関して正規化した、VLR トランスフェクト細胞上清をチップの上に流した

10

20

30

40

50

。チップは、各結合サイクル後にトリエチルアミン pH 11.5 によって再生した。

【図 1 3】抗 H 抗原モノクローナル VLR-B (vRBC-36 (配列番号 20)) 抗原結合部位のモデルである。この vRBC-36 モデルは、ヌタウナギ VLR-B (PDB 特定番号: 206R) の結晶構造データに対し、SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/>) を用いて相同性に基づくモデル作製によって構築した。超可変アミノ酸位置は、濃いグレイで強調した。矢印は、他の炭水化物成分から H 抗原を識別する、フコース糖の接触面であると考えられる、陥凹面上の凹部を示す。

【図 1 4 A】図 1 4 は、ヒトの O 血液型赤血球による免疫化後生産される VLR-B 抗体の分析を示す。図 1 4 A は、漸増する、ヒトの O 型赤血球によって免疫化される動物の血球凝集反応を示す。血液サンプルは、免疫化前、および免疫化の 28 日後に取得した。免疫化は、1 および 14 日目に行った。

【図 1 4 B】図 1 4 は、ヒトの O 血液型赤血球による免疫化後生産される VLR-B 抗体の分析を示す。図 1 4 B は、抗 VLR-B モノクローナル抗体、またはコントロールモノクローナル抗体を塗布したビーズによる血漿吸着前、または後の、血球凝集反応力価を示す。誤差バーは、平均の標準誤差を示す。

【図 1 4 C】図 1 4 は、ヒトの O 血液型赤血球による免疫化後生産される VLR-B 抗体の分析を示す。図 1 4 C は、免疫化ヤツメウナギ血漿対マウス抗 H モノクローナル抗体の H 抗原活性を比較するフローサイトメトリー分析を示す。染色は、H 抗原を発現する、 $\alpha 1, 2$ -フコシルトランスフェラーゼ CHO 形質転換細胞において示される。非トランスフェクト CHO 細胞では反応性は観察されなかった。

【図 1 4 D】図 1 4 は、ヒトの O 血液型赤血球による免疫化後生産される VLR-B 抗体の分析を示す。図 1 4 D は、H 抗原担持 CHO 細胞による吸着によって、H 抗原特異的 VLR 抗体を枯渇すると、血漿から血球凝集反応が除去されることを示す。H 抗原反応性 VLR の枯渇は、VLR の血漿レベルにはほとんど影響を及ぼさない。

【図 1 5】図 1 5 は、H 抗原に対する、組み換え VLR 抗体の特異性を示す。図 1 5 A は、H 抗原を生産するように $\alpha 1, 2$ -フコシルトランスフェラーゼによって、またはベクターのみによってトランスフェクトした CHO 細胞を、抗-H mAb によって、または H 抗原に対して特異的な VLR-B によってトランスフェクトした HEK 293T 細胞から得られた上清によって染色した。灰色は、未染色細胞を表し、中が空虚な黒色は、mAb または VLR 抗体によって染色される細胞を表す。図 1 5 B は、ジスルフィド結合を還元するための 2-メルカプトエタノールによる処理前、または処理後の、ヤツメウナギ血漿のウェスタンブロットを示す。

【図 1 6】図 1 6 は、*B. anthracis exosporium* による免疫化に対する VLR 抗体の反応を示す。免疫化ヤツメウナギ (黒色バー) および非免疫化ヤツメウナギ (白色バー) の血漿サンプルを、ELISA によってアッセイした。図 1 6 A は、抗原用量要求の評価を示す。1 (○)、0.1 (■)、または 0.01 (▲) μg の *B. anthracis exosporium* による、2 回の腹腔内免疫化の前 (x)、および後における、BclA に対する、VLR 抗体の反応。ブースター免疫化は 2 週間後に与え、4 週時に血漿サンプルを得た。図 1 6 B は、VLR 抗体反応が、孢子コートタンパク質 BclA の C 末端ドメイン (BclA-CTD) を指向することを示す。図 1 6 C は、*anthracis exosporium* (1 μg) による 2 回の免疫化後の、*B. anthracis* 孢子コートタンパク質 BclA に対する、VLR 抗体の特異性を示す。誤差バーは、平均の標準誤差を示す。

【図 1 7 A】図 1 7 は、VLR-B⁺ リンパ球の組織分布を示す。図 1 7 A は、種々の器官における VLR-B⁺ リンパ球の免疫組織化学的分析を示す。パラフィン切片を、ヘマトキシリンエオジン (上段)、または、発色源として DAB を用いて抗 VLR mAb (下段) で染色した。

【図 1 7 B】図 1 7 は、VLR-B⁺ リンパ球の組織分布を示す。図 1 7 B は、鰓領域の大血管 (A の上段左パネルの鰓底部の大血管に対応) 内の VLR-B⁺ リンパ球の、免疫

10

20

30

40

50

組織化学的特定を示す。

【図 17C】図 17 は、VLR-B⁺リンパ球の組織分布を示す。図 17C は、血液、腎臓、および盲腸由来のリンパ球による VLR 発現の免疫蛍光分析を示す。ヒストグラムは、種々の組織から単離された「リンパ球ゲート」における細胞の分析を示す。

【図 17D】図 17 は、VLR-B⁺リンパ球の組織分布を示す。図 17D は、血液サンプルの「リンパ球ゲート」から選別された VLR-B⁺および VLR-B⁻細胞の、透過型電子顕微鏡 (EM) 撮影：安静 VLR-B⁺リンパ球 (上段) および、特徴的な核裂溝を有する血小板 (下段) の顕微鏡写真を示す。

【図 18】VLR-B⁺および VLR-B⁻リンパ球集団の遺伝子発現プロファイルを示す。「リンパ球ゲート」における細胞について、蛍光活性化細胞ソーティングによって単離した VLR-B⁺および VLR-B⁻細胞の定量的 PCR 分析。

【図 19】図 19 は、anthrax exosporium によって超免疫化されたヤツメウナギにおける、VLR-B⁺リンパ球のリンパ芽球様反応を示す。図 19A は、ゲート選択されない血液白血球・対・VLR-B⁺細胞の、前方および側方光散乱特性のフローサイトメトリ分析を示す。超免疫原用量の B. anthracis exosporium (> 25 μg) のブースター注入 14 日後に、動物から血液サンプルを得た。図 19B は、VLR-B の細胞表面発現を示す。anthrax exosporium による超免疫化後、VLR-B 発現レベルに低下が認められた。

【図 20】図 20 は、B. anthracis exosporium による免疫化の前後における、VLR-B⁺細胞の頻度分析を示す。図 20A は、未処置および免疫化動物から得られた血液サンプルにおける VLR-B⁺細胞であって、4C4 抗 VLR モノクローナル抗体および蛍光標識胞子によって共染色された細胞のフローサイトメトリ分析を示す。図 20B は、B. anthracis exosporium による免疫化 (28 日) 前後における、炭疽菌胞子結合細胞のパーセントを示す。

【図 21】図 21 は、B. anthracis exosporium による免疫化によって誘発される、VLR-B 分泌細胞の特徴を示す。1 μg の exosporium によるブースター免疫の 14 日後、13 cm のヤツメウナギ幼生 6 匹から得た、プール細胞をソートした。図 21A は、異なる光散乱特性を持つ、VLR-B⁺および VLR-B⁻細胞集団における、VLR-B 抗体分泌細胞の ELISPOT アッセイを示す。BclA anthrax コートタンパク質に対して特異的な VLR-B 抗体を分泌する細胞は、比較的大型の VLR-B 担持細胞のサブ集団に認められた。図 21B は、大型の、VLR-B⁺生産細胞の EM 分析は、それらが、拡張型粗面小胞体を持つ、プラズマ細胞様形態を有することを示す。

【図 22】非マイトジェン用量の anthrax exosporium による注入後の、未処置および免疫化ヤツメウナギの比較。免疫化ヤツメウナギには、1 μg の anthrax exosporium を 2 度注入した。この用量の炭疽菌は、リンパ芽球様形質転換は誘発しないが、BclA-CTD に対する特異的免疫反応は生成する。

【図 23】インフルエンザウイルスによって免疫化されたヤツメウナギが、免疫原に対して特異的な VLR を生産することを示す。1:50 希釈のヤツメウナギ血漿について ELISA を実行した。

【図 24】HIV ウイルス様粒子 (VLP) は、HIV エンベロープタンパク質 gp120 サブユニットに対して特異的な VLR-B 抗体を生産する。ELISA プレートに、精製組み換え HIV gp120 でコートし、一晚インキュベートし、次に、未処置ヤツメウナギ血漿、または HIV VLP 免疫化ヤツメウナギ血漿とインキュベートした。Gp120 結合 VLR-B 抗体は、抗 VLR-B mAb (4C4)、および、アルカリフォスファターゼ接合ヤギ抗マウス IgG ポリクローナル抗体によって検出した。

【発明を実施するための形態】

【0007】

詳細な説明

無顎脊椎動物の適応免疫系は、クローン的に多様なリンパ球によって構成される。それ

10

20

30

40

50

らは、有顎脊椎動物によって利用される免疫グロブリンV、D、およびJ遺伝子サブユニットではなく、ロイシンリッチ反復(LRR)遺伝子セグメントの集合体から得られる可変性リンパ球受容体(VLR)を発現するので、従来Vリンパ球と呼ばれている。無顎脊椎動物(*agnathans*)の、既存の二つの代表種であるヤツメウナギおよびヌタウナギにおいて、二つのVLR遺伝子、VLR-AおよびVLR-Bが特定されている。生殖系列VLR遺伝子は、介在配列によって隔てられる、不変のN末端およびC末端配列に対するコード領域のみしか持たず、カノニカルスプライス部位を欠如するという点で不完全である。リンパ球系統細胞の発達の際、側接するLRRモジュラーユニットが、この不完全VLR遺伝子の中に継時的に挿入され、同時に、遺伝子変換機構を介して介在配列が削除されて、成熟VLR遺伝子を生成する。この遺伝子変換過程は、最近特定された、活性誘発デアミナーゼ/アポリポタンパク質B編集触媒タンパク質(AID-APOBEC)ファミリーのメンバーで、リンパ球限定発現メンバーによって触媒される可能性がある。

10

【0008】

VLR-B+リンパ球(VB細胞)は、ヤツメウナギ適応免疫系体液部門の主要成分を構成する。本明細書において記載するように、特定の抗原、例えば、*B. anthracis exosporium*、またはヒト赤血球によってヤツメウナギを免疫化すると、プラズマ細胞様細胞の分化、および、それらによる、抗原特異的VLR-B抗体の分泌が誘発される。ストーク領域のほとんどを欠く、ヌタウナギVLR-Bの構造分析によって、超可変アミノ酸は、受容体の陥凹表面に集中し、ここに恐らく抗原結合部位を形成するのであろうとする、従来のモデル予想が確認された。分泌されるVLR-B抗体は、有顎脊椎動物の抗体と同様に機能し、そのため、抗原刺激は、エフェクター分子としてのVLR-Bの分泌を招き、これが抗原に結合し、恐らくは、中和、オプソニン作用、およびその他の機構によって、感染の排除を推進する。

20

【0009】

モノクローナル抗体は、有顎脊椎動物の適応免疫系が持つ、いかなるものであれ、ほとんど全ての外来分子を認識可能とする、驚くべき能力を利用する、貴重な研究および治療ツールである。本明細書において記載するように、モノクローナル抗体と同様の特性を有する、既知の特異性の、可溶性VLR-Bクローンを生成するために、無顎類適応免疫系の膨大な多様性レパートリーの利用が可能である。本明細書に記載されるのは、規定された抗原特異性の、可溶性、組み換えモノクローナルVLR-B抗体の生産法である。

30

【0010】

本明細書において提供されるのは、抗原特異的ポリペプチドの、規模調節可能な作製法、より具体的には、可溶の、モノクローナルな、抗原特異的ポリペプチド、例えば、VLRの作製法である。さらに提供されるのは、特異的VLR、多価VLR、およびVLRに対する抗体を含む組成物、および、該組成物を使用する方法である。

【0011】

可溶性モノクローナル抗原特異的ポリペプチドの作製法は：(1)抗原特異的ポリペプチドであって、N末端ロイシンリッチリピート(LRRNT)、一つ以上のロイシンリッチリピート(LRR)、C末端ロイシンリッチリピート(LRCC)、および、アルファヘリックスを含む連結ペプチドを含む、抗原特異的ポリペプチドをコードするcDNAクローンを単離する工程；(2)培養媒体において該cDNAクローンによって細胞をトランスフェクトする工程；および、(3)該培養媒体から該抗原特異的ポリペプチドを単離する工程、を含む。さらに具体的には、抗原特異的タンパク質の作製法は：(1)ヤツメウナギまたはヌタウナギに、標的抗原(例えば、標的炭水化物、標的タンパク質、標的病原体、標的糖タンパク質、標的脂質、標的糖脂質など)を投与すること；(2)該ヤツメウナギまたはヌタウナギのリンパ球から、抗原特異的タンパク質をコードするRNAを単離すること；(3)該単離RNAから、抗原特異的タンパク質をコードするcDNAを増幅すること；(4)該cDNAを発現ベクターにおいてクローンすること；(5)該発現ベクターによって形質転換された細菌において該発現ベクターを発現させること；(6

40

50

）cDNAクローンを単離すること；（７）該単離cDNAクローンによって培養細胞をトランスフェクトすること；（８）標的抗原に結合する能力に関して培養上清をスクリーニングすること；および（９）該標的抗原に結合する上清から抗原特異的タンパク質を単離すること、を含む。抗原は、抗原特異的VLRを生産するのに十分な量として投与することが可能である。例えば、0.01、0.1、1、2、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、75、または100μgの抗原、または、0.01と100μg以上の間の任意の量の抗原を、ヤツメウナギまたはヌタウナギに投与することが可能である。

【0012】

必要に応じて、単離cDNAクローンは、可溶性VLRの形成を妨げる配列をコードしない。LRRCT領域では、約50%のVLRクローンは：KNWIVQHASICVN-（P/L）-X-（S/Y/N/H）-GGVDNVK（配列番号7）、またはKNWIVQHASICVN-（P/L）-XX-（S/Y/N/H）-GGVDNVK（配列番号8を含む。上記配列式において、（P/L）は、その位置に、Pか、Lのいずれかがあることを意味し、Xは、任意のアミノ酸を意味し、（S/Y/N/H）は、その位置に、S、Y、N、またはHのいずれかがあることを意味する。これらの配列によって、分泌されるが、膜結合性であるVLRが得られる。配列番号7または8を持たないVLRは、単に膜結合性であるにすぎない。この配列を含む任意のcDNAクローンにおいて膜固定を阻止または抑制するために、当該技術分野において通常の錬度を有する当業者に公知の方法を用いて、配列番号7または8に突然変異を起こすことも可能である。さらに提供されるものは、本明細書に記載される方法によって作製される、可溶性、モノクローナルの、抗原特異的ポリペプチドである。したがって、可溶性VLRは、配列番号7または8を含むか、あるいは、配列番号7または8において、膜固定を抑制または阻止する突然変異を含む。可溶性VLRは、必要に応じて、膜貫通ドメイン、GPⅠアンカー、疎水性尾部、ストーク領域、または、これらの領域の任意の組み合わせを欠如する。

【0013】

可変性リンパ球受容体、すなわちVLRは、ある構造的特徴および機能を有する、抗原特異的ポリペプチドである。VLRは、1-12個のロイシンリッチリピートを含み、適応免疫において機能することが示されている。より詳細には、VLRは、N末端ロイシンリッチリピート（LRRNT）、一つ以上のロイシンリッチリピート（LRR）（本明細書では内部LRRと呼ぶ）、C末端ロイシンリッチリピート（LRRCT）、および、アルファヘリックスを含む連結ペプチドを含む。VLRの長さは、僅かに約130アミノ酸を含むこともあるし、あるいは、約225個ものアミノ酸を含むこともある。このポリペプチド、およびコード核酸の一般構造および特定配列の例が、国際出願PCT/US2005/0179号；Pancer and Cooper（2006）Annual Review Immunology 24：497-518，Alder et al（2005）Science 310：1892-93；Pancer et al.（2005）P.N.A.S. 102（9224-29）に記載される。なお、これらの文書それぞれについて、その中に教示されるVLR、およびVLRの使用法に関して、その全体を参照することにより本明細書に含める。さらに、各種領域（シグナルペプチド、LRRNT、LRR、LRRCT、連結ペプチド、ストーク、および疎水性尾部を含む）の数多くの例が、これらの参考文献の中に見出すことが可能であり、これらの参考文献も、VLR領域に関する参照によって同様に本明細書に含める。

【0014】

必要に応じ、VLRの連結ペプチドは、LRRCTのN末端側に、より具体的には、内部LRRとLRRCTとの間に配される。したがって、本明細書において開示されるのは、LRRNT、一つ以上の内部LRR、連結ペプチド、およびLRRCTを、この順に含むVLRである。さらに開示されるのは、VLRであって、LRRNTとLRRCTの間の内部LRR領域が、1、2、3、4、5、6、7、8、または9個のロイシンリッチリピートを含み、LRR1が、LRRNTに隣接、または近接して配されるVLRである。

本明細書で用いる L R R 1、2、3、4、5、6、7、8、または9は、L R R N T から L L R C T に向かって連続的に連なると考えられる。したがって、本明細書に開示されるのは、L R R N T、1、1 - 2、1 - 3、1 - 4、1 - 5、1 - 6、1 - 7、1 - 8、または1 - 9 L R R、連結ペプチド、および L R R C T をこの順に含む V L R である。

【0015】

ロイシンリッチリピート、すなわち L R R は、通常、タンパク質 - タンパク質相互作用に与る、複数のロイシン残基を含む、短い配列モチーフである。L R R は、例えば、位置2、5、7、12、16、21、および24に、ロイシン、またはその他の脂肪族残基を含む。しかしながら、ロイシンまたは他の脂肪族残基は、位置2、5、7、12、16、21、および24の残基に加えて、または、それらの残基の代わりに、他の位置においても出現することが可能であることが理解され、かつ、本発明の考慮の対象とされる。例えば、ロイシンは、位置2ではなく、位置3に出現することが可能である。さらに、構造的に、L R R モチーフは、 β -シート構造を形成することが理解される。したがって、例えば、L R R N T、5個の別々の L R R、L R R C T、および連結ペプチドを含む開示のポリペプチドは、7個の β シート構造、および、連結ペプチドのアルファヘリックスを含むと考えられる。

10

【0016】

各内部 L R R の長さおよび配列は、その V L R における他の内部 L R R から変動することが可能であると同時に、L R R N T および L R R C T から変動することが可能である。例えば、V L R は、L R R N T、1から9個の L R R、連結ペプチド、および L R R C T を含み、その際、第1内部 L R R は L R R 1であり、L R R 1が、約20よりも少ないアミノ酸を含むことが可能である。さらに開示されるのは、L R R 1が約18個のアミノ酸を含む V L R である。必要に応じて、V L R はさらに、L R R 2から9のそれぞれが約25よりも少ないアミノ酸長である L R R 2から9を含む。さらに開示されるのは、L R R 2から9のそれぞれが約24アミノ酸を含む V L R である。L R R 1から9は、任意の V L R において、長さおよび特定のアミノ酸配列において同じであっても、異なってもよい。

20

【0017】

L R R N T および L R R C T と表示される末端 L R R は、通常、各内部 L R R よりも長い。L R R N T および L R R C T は、不変領域（同様の可変性リンパ球受容体に比べ、該ポリペプチドの残余部分に対しほとんど変動を持たない領域）を含む。可変領域は、受容体に特異性を付与するが、不変領域、および、受容体全体に共通の構造的類似性は、保護的免疫機能の維持を助ける。V L R は、約40未満のアミノ酸を含む L R R N T を含むことが可能である。したがって、L R R N T は、必要に応じて、一つ以上の、保存的アミノ酸置換の存在下または不在下に、アミノ酸配列 C P S Q C S C（配列番号9）、C P S R C S C（配列番号10）、C P A Q C S C（配列番号11）、C P S Q C L C（配列番号12）、C P S Q C P C（配列番号13）、N G A T C K K（配列番号14）、または N E A L C K K（配列番号15）を含む L R R N T を含むことが可能である。

30

【0018】

さらに開示されるのは、L R R C T であって、長さが、約60未満のアミノ酸、必要に応じて40から60個のアミノ酸である L R R C T を含む V L R である。特に、具体的に開示されるのは、V L R であって、その L R R C T が、一つ以上の、保存的アミノ酸置換の存在下または不在下に、アミノ酸配列 T N T P V R A V T E A S T S P S K C P（配列番号16）、S G K P V R S I I C P（配列番号17）、S S K A V L D V T E E E A A E D C V（配列番号18）、または、Q S K A V L E I T E K D A A S D C V（配列番号19）を含む V L R である。

40

【0019】

通常、V L R の連結ペプチドは、15未満のアミノ酸長の短いペプチドで、アルファヘリックスを含む。したがって、例えば、具体的に開示されるのは、アルファヘリックスを含む、10、11、12、13、14、および15アミノ酸長の連結ペプチドである。連

50

結ペプチドは、V L Rの構造成分を、それ自身を含めてL R R C Tに連結する働きをする。

【 0 0 2 0 】

本明細書に記載するV L Rは、ちょうど抗体が、抗原または介在因子に選択的に結合するのと同様に、抗原または介在因子に選択的に結合する。選択的に結合する、または特異的に結合するとは、V L Rが、他の抗原または介在因子を、部分的にまたは完全に排除して、一介在因子または抗原に結合することを意味する。結合するとは、アッセイ法の背景の、少なくとも約1 . 5 倍の、検出可能な結合を意味する。選択的または特異的結合においては、このような検出可能な結合が、任意の抗原または介在因子に対しては検出可能であるが、コントロール抗原または介在因子に対しては検出されない。

10

【 0 0 2 1 】

V L Rは、天然性であってもよいし、非天然性であってもよい。V L Rの断片または変異体であって、抗原または介在因子に選択的に結合するV L Rの能力を保持する、断片または変異体下記に記載される。したがって、V L Rは、抗体という用語同様、種々の特異性を有する、種々の改変体を含む。V L Rは、本明細書に記載されるインビトロアッセイ、または類似の方法を用いて所望の活性に関して試験され、その後、その治療、診断、または他の精製活性が、公知の試験法にしたがって試験される。例えば、活性および/または特異性を試験するために、E L I S A、ドットプロット、ウェスタンプロット分析、およびその他の試験法を使用することが可能である。V L Rは、V L Rを直接標識することによって検出してもよいし、あるいは、二次抗体と同様、V L Rに結合する二次V L R、またはV L Rに結合する抗体を用いて検出してもよい。その際、該抗体または二次V L Rは、直接的または間接的に標識される。V L Rに対する抗体および標識は、下記にさらに詳細に記述される。

20

【 0 0 2 2 】

本明細書において提供されるものは、複数の抗原特異的ポリペプチドを含む多価タンパク質、例えば、複数のV L Rであって、各抗原特異的ポリペプチドが、N末端ロイシンリッチリピート(L R R N T)、一つ以上のロイシンリッチリピート(L R R)、C末端ロイシンリッチリピート(L R C C T)、および連結ペプチドを含み、連結ペプチドがアルファヘリックスを含む、V L Rである。本明細書で用いるL R R - 1という用語は、L R R N Tに続く第1 L R Rを指す。本明細書で用いるL R R Vという用語は、L R R可変体、すなわち、L R R - 1の後に続くが、L R R C Tの前に来るL R Rを指す。本明細書で用いる場合、L R R V。という用語は、L R R C Tの前に来る最後のL R Rである、L R R可変体末端を指す。しかしながら、V L Rが、L R R N T、1 L R R、およびL R R C Tを含む場合。L R R N TおよびL R R C Tの間のL R Rは、L R R - 1と表示される。図1に多価V L Rの模式図を示す。この多価タンパク質は、2から12(すなわち、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、または12)個の抗原特異的ポリペプチドを含む。この多価タンパク質は、標的タンパク質、標的炭水化物、標的糖タンパク質、標的プロテオグリカン、または標的病原体に結合する。多価タンパク質は、必要に応じて、各種の標的タンパク質、炭水化物、糖タンパク質、プロテオグリカン、病原体、または、それらの任意の組み合わせに結合するように設計される。例えば、二価タンパク質は、第1および第2抗原特異的ポリペプチドを含んでもよく、その際、第1抗原特異的ポリペプチドは、第1タンパク質、炭水化物、糖タンパク質、プロテオグリカン、または病原体に結合し、第2抗原特異的ポリペプチドは、第2タンパク質、炭水化物、糖タンパク質、プロテオグリカン、または病原体に結合する。同様に、三価タンパク質は、それぞれが異なる標的に結合する、第1、第2、および第3抗原特異的ポリペプチドを含み、四価タンパク質は、それぞれが異なる標的に結合する、第1、第2、第3、および第4抗原特異的ポリペプチドを含む。一例として、ある二価タンパク質は、H血液型決定基に結合する、第1抗原特異的ポリペプチド、および、AまたはB型決定基に結合する、第2抗原特異的ポリペプチドを含む。この多価タンパク質および/または抗原特異的ポリペプチドは、可溶性であることが好ましい。

30

40

50

【 0 0 2 3 】

さらに本明細書に提供されるのは、標的炭水化物、例えば、血液型決定基などに結合する抗原特異的ポリペプチドである。血液型決定基としては、例えば、A決定基、B決定基、またはH決定基が挙げられる。例として、H決定基に特異的に結合する抗原特異的ポリペプチドが提供される。さらに別の例として、H決定基に特異的に結合する抗原特異的ポリペプチドは、配列番号20のアミノ酸配列を含む。本明細書に提供されるのは、例えば、配列番号32を含む、配列番号20の抗原特異的ポリペプチドをコードすることが可能な核酸である。他の例として、一つ以上の、保存的アミノ酸置換を有する、配列番号20をコードする核酸が挙げられる。

【 0 0 2 4 】

炭水化物に結合する抗原特異的ポリペプチドは、標的炭水化物の特定、定量、単離、および画像化において多くの用途を有する。例として、本明細書で提供されるものは、血液型を決定する方法であって、ある血液型決定基に選択的に結合する抗原特異的ポリペプチドに血液サンプルを接触させることを含み、該抗原特異的ポリペプチドが、検出可能に（直接的、または間接的に）標識される方法である。血液サンプルにおいて一つ以上の細胞に結合した、この、標識抗原特異的ポリペプチドは検出される。標識の有無は、血液型を示す。したがって、例えば、H決定基に結合する、抗原特異的ポリペプチドを用いた場合、血液サンプルにおける標識の存在は、O血液型を示す。同様に、A決定基特異的ポリペプチドを用いた場合、標識の存在は、AまたはAB血液型のいずれかを示す。B決定基特異的ポリペプチドを用いた場合、標識の存在は、BまたはAB血液型のいずれかを示す。同じ血液サンプルについて、一つ以上の抗原特異的ポリペプチドを使用することが可能である。必要に応じて、抗原特異的ポリペプチドが異なる特異性を有する場合、各抗原特異的ポリペプチドに異なる標識を付着させることが可能である。したがって、H決定基に選択的に結合するVLRに対して、あるFITC標識を、直接または間接に連結し、一方、AまたはB決定基に選択的に結合するVLRに対し、異なる波長で蛍光を発する蛍光標識を直接または間接に連結することが可能である。

【 0 0 2 5 】

したがって、本明細書に提供されるものは、血液型を決定する方法であって：第1抗原特異的ポリペプチドであって、検出可能に第1標識によって標識され、かつ、第1血液決定基に対して特異的である、第1抗原特異的ポリペプチドに血液サンプルを接触させること；第2抗原特異的ポリペプチドであって、検出可能に第2標識によって標識され、かつ、第2血液決定基に対して特異的である、第2抗原特異的ポリペプチドに該血液サンプルを接触させること；および、該血液サンプル中の一つ以上の細胞に結合した、標識された第1および第2抗原特異的ポリペプチドを検出することを含み、第1および第2標識の有無が血液型を示す方法である。

【 0 0 2 6 】

さらに開示されるのは、介在因子、例えば、病原性因子であって、細菌、より詳細には、細菌が*Bacillus anthracis*である、病原体に選択的に結合するVLRである。より詳細には、本明細書に提供されるのは、*Bacillus anthracis*の細胞表面ポリペプチド、例えば、BclAに特異的に結合する、抗原特異的ポリペプチドである。さらに詳細には、この抗原結合ポリペプチドは、配列番号5（図7参照）、または配列番号22、47、49、51、53、55、57、59、または61のアミノ酸配列を有する。さらに提供されるのは、例えば、それぞれ、配列番号21、23、46、48、50、52、54、56、58、および60を含む、配列番号5、22、47、49、51、53、55、57、59、または、61をコードする核酸である。

【 0 0 2 7 】

病原体に対して選択的な、抗原結合ポリペプチドの使用法が、数多く提供される。病原体としては、任意の既知の病原体、例えば、細菌およびウイルスなどが挙げられる。例として、本明細書において提供されるのは、サンプルにおける*Bacillus anthracis*の存在を検出する方法であって、該サンプルを、*Bacillus anth*

10

20

30

40

50

r a c i s に結合する、検出可能に標識される、抗原特異的ポリペプチドに接触させることを含む方法である。サンプルに結合する、標識された、抗原特異的ポリペプチドは検出され、標識の存在は、サンプルにおける *B a c i l l u s a n t h r a c i s* の存在を示す。さらに提供されるのは、対象において *B a c i l l u s a n t h r a c i s* の病原性を低減する方法であって、該対象に、*B a c i l l u s a n t h r a c i s* に結合する抗原特異的ポリペプチドを投与することを含む方法である。

【 0 0 2 8 】

さらに、本明細書に提供されるのは、サンプルにおけるウイルスの存在を検出する方法であって、該サンプルを、該ウイルスに結合する、検出可能に標識される、抗原特異的ポリペプチドに接触させることを含む方法である。サンプルに結合する、標識された、抗原特異的ポリペプチドは検出され、標識の存在は、サンプルにおけるウイルスの存在を示す。さらに提供されるのは、対象においてウイルスの病原性を低減する方法であって、該対象に、ウイルスに結合する抗原特異的ポリペプチドを投与することを含む方法である。このウイルスは、例えば、H I V またはインフルエンザであってもよい。この抗原特異的ポリペプチドは、例えば、H I V エンベロープタンパク質 g p 1 2 0 に結合してもよい。

10

【 0 0 2 9 】

さらに、対象のサンプル、または他の生物学的液体（例えば、脳脊髄液）から病原体を除去する方法が提供される。この方法は、該サンプルを、該病原体に選択的に結合する、抗原特異的ポリペプチドに接触させることを含む。さらに提供されるのは、対象の血液における病原体の量を減少させる方法であって、該対象の血液の一部を、該病原体に選択的に結合する、抗原特異的ポリペプチドに接触させることを含む。必要に応じて、接触される血液は、取り出され、次いで、該対象に戻される。必要に応じて、抗原は、固相支持体に結合される。

20

【 0 0 3 0 】

さらに本明細書において提供されるのは、選ばれた抗原特異性を有する抗原特異的タンパク質、およびこれらの方法において有用な組成物を作製する方法であって、ヤツメウナギまたはヌタウナギに、一つ以上の標的抗原（例えば、標的炭水化物、標的タンパク質、標的病原体、標的糖タンパク質、標的脂質、標的糖脂質、標的細胞、および、それらの組み合わせ、例えば、二つの炭水化物、一つの炭水化物と一つのタンパク質など）を投与することを含む方法である。例として、本明細書に提供されるのは、血液型決定基に結合する、抗原特異的タンパク質を作製する方法であって、ヤツメウナギまたはヌタウナギに、血液型決定基を投与すること；該ヤツメウナギまたはヌタウナギのリンパ球から抗原特異的タンパク質をコードする R N A を単離すること；単離 R N A から、抗原特異的タンパク質をコードする c D N A を増幅すること；該 c D N A を発現ベクターにクローンすること；該発現ベクターによって形質転換した細菌において該発現ベクターを発現させること；c D N A クローンを単離すること；該 c D N A クローンによって培養細胞をトランスフェクトすること；該血液型決定基に対する結合能力に関して培養上清をスクリーニングすること；および、培養上清から、該血液型決定基に結合する抗原特異的タンパク質を単離すること、を含む方法である。それとは別に、抗原特異的タンパク質を生成するために、赤血球そのもの、例えば、ヒトの O 型赤血球を、ヤツメウナギまたはヌタウナギに投与してもよい。

30

40

【 0 0 3 1 】

もう一つの例として、*B a c i l l u s a n t h r a c i s* などの病原体に特異的に結合する V L R は、ヤツメウナギまたはヌタウナギに、*B a c i l l u s a n t h r a c i s* の細胞表面ポリペプチドを投与すること；該ヤツメウナギまたはヌタウナギのリンパ球から、抗原特異的タンパク質をコードする R N A を単離すること；単離 R N A から、抗原特異的タンパク質をコードする c D N A を増幅すること；該 c D N A を発現ベクターにクローンすること；該発現ベクターによって形質転換した細菌において該発現ベクターを発現させること；c D N A クローンを単離すること；該 c D N A クローンによって培養細胞をトランスフェクトすること；*B a c i l l u s a n t h r a c i s* の該細胞表面

50

ポリペプチドに対する結合能力に関して培養上清をスクリーニングすること；および、培養上清から、*Bacillus anthracis*の該細胞表面ポリペプチドに結合する抗原特異的タンパク質を単離すること、によって作製することが可能である。それとは別に、抗原特異的タンパク質を生成するために、病原体そのもの、例えば、*Bacillus anthracis*を、ヤツメウナギまたはヌタウナギに投与してもよい。

【0032】

病原体、例えば、HIVまたはインフルエンザなどのウイルスに特異的に結合するVLRは、ヤツメウナギまたはヌタウナギに、ウイルス抗原を投与すること；該ヤツメウナギまたはヌタウナギのリンパ球から、抗原特異的タンパク質をコードするRNAを単離すること；単離RNAから、抗原特異的タンパク質をコードするcDNAを増幅すること；該cDNAを発現ベクターにクローンすること；該発現ベクターによって形質転換した細菌において該発現ベクターを発現させること；cDNAクローンを単離すること；該cDNAクローンによって培養細胞をトランスフェクトすること；抗原結合能力に関して培養上清をスクリーニングすること；および、培養上清から、抗原に結合する抗原特異的タンパク質を単離すること、によって作製することが可能である。本発明で用いるウイルス抗原は、ウイルス、ウイルス様粒子、ウイルス断片、ウイルスによって発現されるポリペプチド、または、ヤツメウナギまたはヌタウナギにおいて抗原性反応を誘発する、ウイルスの、他の、任意の部分または成分を含む。

【0033】

抗原特異的ポリペプチド、および、その断片および変異体を作製する方法は、該抗原特異的ポリペプチド、またはその断片または変異体をコードする核酸を発現する安定な細胞系統を作製することを含む。安定な細胞系統は、種々の方法で生産することが可能である。例えば、安定な細胞系統は、VLR cDNA、および、選択可能マーカー、例えば、抗生物質に対する耐性をコードする遺伝子を同時発現する、発現ベクターによって細胞をトランスフェクトすることによって生産することが可能である。抗生物質選択の場合、発現ベクターをそのゲノムの中に安定に組み込んだ細胞は、抗生物質選択に対し耐性を示し、生き延びるが、一方、他の細胞は、抗生物質処理によって死滅する。限界希釈クローニングなどの方法によって最高レベルのVLR分泌を示す細胞について、サブクローンを確立してもよい。このようにして、本明細書に提供されるのは、抗原特異的ポリペプチドを作製する方法であって、安定細胞系統の細胞を、該細胞が、抗原特異的ポリペプチドを発現することを可能とする条件下で培養すること、および、該細胞または培養媒体から、抗原特異的ポリペプチドを単離すること、によって作製する方法である。

【0034】

さらに、VLR生産リンパ球の単離集団も提供される。本明細書で用いる場合、VLR生産リンパ球、VLR細胞、およびVLRリンパ球は、同義語として使用される。例えば、VLR-B+リンパ球の単離集団が提供される。下記の実施例において論じられるように、VLR-B+リンパ球は、VLR-B転写物を発現するが、VLR-A転写物は発現しない。必要に応じて、VLR-B+リンパ球は、TCR-様、CD-4様、および/またはTNFR14を発現する。VLR-A+細胞は、VLR-A転写物を発現するが、VLR-B転写物は発現しない。必要に応じて、VLR-A+細胞の単離集団は、CD45および/またはGATAを発現する。単離細胞集団は、例えば、フローサイトメトリー、または、VLR-BまたはVLR-A特異的抗体使用による、通例の実験手法を用いて取得することが可能である。さらに、抗原特異的VLR-B+細胞の単離集団が提供される。本明細書で用いる場合、用語、抗原特異的VLR-B+細胞とは、抗原特異的ポリペプチドを発現する細胞を指す。このような細胞は、例えば、抗原によってヤツメウナギまたはヌタウナギを免疫化すること、および、フローサイトメトリー、または、VLR-B抗体、例えば、本明細書において提供されるもの、例えば、4C4または6C3を用いて、VLR-B+細胞を単離することによって生産することが可能である。VLR-A+細胞も同様にして単離することが可能である。

【0035】

本明細書に提供されるのは、抗原特異的タンパク質をコードする核酸（例えば、単離核酸、例えば、RNAおよびDNAなど）である。VLRまたはその領域、および開示VLRの変異体および断片をコードすることが可能な核酸が、本明細書には開示される。VLRをコードすることが可能な核酸としては、例えば、ただしこれらに限定されないが、配列番号21、23、45、46、48、50、52、54、56、58、60、および32が挙げられる。LRRNTをコードすることが可能な核酸としては：

【0036】

【数1】

配列番号 24 (TGTCCTCGCAGTGTTTCGTGT),

10

配列番号 25 (TGTCCTCGCGGTGTTTCGTGT),

配列番号 26 (TGTCCTCGCAGTGTTTCGTGT),

配列番号 27 (TGTCCTCGCAGTGTTTGTGT),及び

配列番号 28 (TGTCCTCGCAGTGTCGTGT)

【0037】

が挙げられるが、ただしこれらに限定されない。LRRCTをコードすることが可能な核酸としては、配列番号29

【0038】

20

【数2】

(ACCAATACCCCGTCCGTGCGGTCACCGAGGCCAGCACTAGCCCCTCGAA

ATGCCCA)

【0039】

が挙げられるが、ただしこれに限定されない。核酸の例は、特異的ポリペプチド配列、およびその変異体および誘導体に関連する、全ての縮重配列を含む。本明細書において提供される核酸は、コード配列の相補体を含む。配列番号5、6、20、22、47、49、51、53、55、57、59、61の内のいずれか一つ、または、その任意の特定領域、例えば、LRRNT（例えば、配列番号9-15をコードする核酸）、LRR、LRRCT（例えば、配列番号16-19をコードする核酸）、または連結ペプチドをコードする核酸が提供される。より具体的には、本明細書に提供されるのは、配列番号21、23、45、46、48、50、52、54、56、58、60、および32、またはその縮重変異体または相補体を含む核酸である。

30

【0040】

さらに提供されるものは、高度に厳格な条件下で、配列番号21、23、45、46、48、50、52、54、56、58、60、または32、または、配列番号21、23、45、46、48、50、52、54、56、58、60、および32の相補体、の全てまたは任意の一部にハイブリダイズする配列を含む単離核酸である。このハイブリダイズ核酸のハイブリダイズ部分は、通常、少なくとも15（例えば、20、20、40以上）ヌクレオチド長である。ハイブリダイズ部分は、それがハイブリダイズする配列の一部に対し、少なくとも80%（例えば、90%、または95%）同一である。ハイブリダイズ核酸は、例えば、クローニングベクター、プライマー（例えば、PCRプライマー）、または診断プローブとして有用である。核酸の2本鎖またはハイブリッドの安定性は、プローブが標的DNAから解離する温度である、融解温度すなわちT_mとして表される。必要な厳格度条件を定義するために、この融解温度が使用される。プローブと同一ではなく、プローブと関連し、事実上同一な配列を特定しなければならない場合、ある特定の塩濃度において（例えば、SSC、またはSSPE）相同的ハイブリダイゼーションのみが起こる最低温度を先ず定めることが有用である。1%のミスマッチが、T_mにおいて1%の低下をもたらすと仮定すると、ハイブリダイゼーション反応の最終洗浄液の温度もそれに

40

50

応じて下げる（例えば、95%を超える同一性を有する配列を求める場合、最終洗浄温度は、5℃下げる）。実際には、 T_m の変化は、1%のミスマッチ当たり0.5と1.5の間であってよい。高度に厳格な条件は、 $5 \times \text{SSC} / 5 \times \text{デンハルト液} / 1.0\% \text{ SDS}$ において68℃でハイブリダイズし、 $0.2 \times \text{SSC} / 0.1\% \text{ SDS}$ において室温で洗浄することを含む。中等度に厳格な条件は、 $3 \times \text{SSC}$ において42℃で洗浄することを含む。プローブと標的核酸の間に最適レベルの同一性を実現するために、塩濃度および温度を変動させることが可能である。この条件に関する、さらに詳細な案内知識は、当該分野において、例えば、“*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*,” The Third Edition by Sambrook et al., Cold Spring Harbor Press, 2001において簡単に入手することが可能である。

10

【0041】

さらに提供されるのは、本明細書に教示される核酸に対し、80 - 99%の同一性（すなわち、80、81、82、... 99%）を有する核酸である。同一性パーセントを決定する方法は、当該技術分野で公知であり、アミノ酸と関連して後述される。

【0042】

開示されるものは、VLR遺伝子、または相当遺伝子と相互作用を持つことが可能なプライマーおよびプローブを含む組成物である。ある実施態様では、プライマーは、DNA増幅反応を支持するために用いられる。通常、プライマーは、配列特異的に伸長することが可能である。配列特異的なプライマーの伸長は、該プライマーがハイブリダイズするか、または他のやり方で会合する核酸分子の配列および/または組成が、該プライマーの伸長によって生産される産物の組成または配列を指令するか、または該組成または配列に影響を及ぼす、任意の方法を含む。したがって、配列特異的なプライマーの伸長としては、例えば、ただしこれらに限定されないが、PCR、DNA配列決定、DNA伸長、DNA重合、RNA転写、または逆転写が挙げられる。配列特異的にプライマーを増幅する技術および条件が好ましい。ある実施態様では、プライマーは、DNA増幅反応、例えば、PCR、または直接的配列決定のために使用される。ある実施態様では、プライマーはさらに、非酵素技術を用いて伸長させることも可能であること、その場合例えば、プライマーを伸長させるために使用されるヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチドは、化学的に反応して配列特異的にプライマーを伸長させるように修飾されることが理解される。本明細書において教示されるプライマーの例としては、例えば、ただしこれらに限定されないが、

20

30

【0043】

【数3】

5'-CCACCATGTGGATCAAGTGGATCGCC-3' (配列番号 30)

【0044】

および2)

【0045】

【数4】

40

5'-GAGAGCTAGCTCAACGTTTCCTGCAGAGGGC-3' (配列番号 31).

【0046】

が挙げられる。このようなプライマーはさらに、前述のハイブリダイゼーションプローブとして使用することが可能である。好ましくは、最適翻訳のために、第1プライマーは、開始コドンに先行する共通Kozak配列を含む。さらに、PCR産物が、平滑末端制限酵素部位にクローン可能となるように、5'リン酸化されることが好ましい。第2プライマーは、制限酵素部位を所有することが好ましい。次に、得られたPCR産物を、制限酵素によって消化し、発現ベクターにクローンすることが可能となる。第2プライマーにおける制限酵素部位は、NheI制限部位であることが好ましい。なぜなら、これらの部位

50

は、これまで特徴解明された V L R のいずれにも見出されていないからである。

【 0 0 4 7 】

さらに提供されるのは、V L R、またはその断片または変異体をコードする核酸を含む発現ベクターである。必要に応じて、これらの発現ベクターはさらに、V L R、またはその断片または変異体をコードする核酸に動作可能的に連結される発現調節配列を含む。したがって、提供されるのは、抗原特異的ポリペプチドをコードする核酸（例えば、配列番号 5 または 22 をコードする核酸）を含むベクターである。さらに提供されるのは、発現ベクターを含む培養細胞である。例えば、本明細書において提供されるのは、ベクターによってトランスフェクトされた培養細胞、または、抗原特異的ポリペプチド、またはその断片または変異体を発現する、該細胞の子孫である。好適な発現ベクターとしては、例えば、ただしこれらに限定されないが、p L P C X および p I R E S - P U R O 2（共に、C l o n t e c h L a b o r a t o r i e s , I n c . , M o u n t a i n V i e w , C A から販売される）が挙げられる。例えば、発現ベクターは、i n t e r n a l r i b o s o m e e n t r y s i t e (I R E S) 配列を利用することによって、同じ転写物から、V L R コード核酸と抗生物質耐性遺伝子の両方を含むことが可能である。これによって、安定細胞系統の効率的選択が可能となる。

10

【 0 0 4 8 】

本明細書に記載される V L R で、本明細書に記載される方法によって作製される V L R は、所望の機能が改善されるか、または維持される限り、修飾および変更することが可能である。必要に応じて、V L R の陥凹表面に配されるアミノ酸が修飾される。例えば、アビディティを上げるために、部位特異的突然変異誘発またはアフィニティ熟成によって、V L R 5（配列番号 6）を修飾することが可能である。アビディティを向上させた V L R 5 の変異体が提供される。上昇アビディティを伴う V L R 5 の変異体としては、例えば、V L R 5^{Y 5 5 R}、V L R 5^{W 1 2 7 Y}、および V L R 5^{Y 5 5 R / W 1 2 7 Y} が挙げられる。他の V L R も、本明細書に提供される方法を用いて同様に修飾することが可能である。複数の変異体を作成し、スクリーニングする方法としては、例えば、ファージ、酵母、細菌、またはリボソームディスプレイ技術によるインビトロアフィニティ突然変異誘発が挙げられる。

20

【 0 0 4 9 】

本明細書に開示される遺伝子およびポリペプチドの、任意の既知の変異体および誘導体、または、それらから生じる可能性のある変異体および誘導体を定義する方法は、既知の指定の配列に対する同一性に関して、それらの変異体および誘導体を定義することによって理解される。例えば、特異的に開示されるものは、指定配列に対し、少なくとも 70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99 パーセントの同一性を有する V L R 変異体である。当業者であれば、二つのタンパク質、または遺伝子などの核酸の同一性パーセントの決定法は簡単に理解するであろう。例えば、同一性が最高レベルとなるように二つの配列を整列した後、その同一性を計算することが可能である。

30

【 0 0 5 0 】

同一性パーセントを計算する、もう一つの方法は、公刊アルゴリズムによって実行することが可能である。比較のための配列同士の最適整列は、S m i t h a n d W a t e r m a n (1 9 8 1) A d v . A p p l . M a t h . 2 : 4 8 2 の局所相同性アルゴリズム、N e e d l e m a n a n d W u n s c h (1 9 7 0) J . M o l B i o l . 4 8 : 4 4 3 の相同整列アルゴリズム、P e a r s o n a n d L i p m a n (1 9 8 8) P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U . S . A . 8 5 : 2 4 4 4 の類似性探索法、これらのアルゴリズムのコンピュータ実装（G A P、B E S T F I T、F A S T A、および T F A S T A、W i s c o n s i n G e n e t i c s S o f t w a r e P a c k a g e , G e n e t i c s C o m p u t e r G r o u p , 5 7 5 S c i e n c e D r . , M a d i s o n , W I 実装）、または、目視によって実行してもよい。

40

50

【0051】

核酸については、同じタイプの同一性パーセントは、例えば、Zuker, M. Science 244: 48 - 52, 1989, Jaeger et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 7706 - 7710, 1989, Jaeger et al. Methods Enzymol. 183: 281 - 306, 1989に開示されるアルゴリズムによって取得することが可能である。なお、これらの文献を、少なくとも核酸整列および同一性パーセントの計算に関連する資料について、引用により本明細書に含める。上記方法のいずれも通常に使用することが可能であり、かつ、ある場合には、これら、各種の方法の結果が異なる場合があったにしても、これらの方法の少なくとも一つにおいて、同一性が見出された場合、それらの配列は、指定の同一性または類似性を有すると言ってもよいと考えられることが理解される。

10

【0052】

例えば、本明細書では、他の配列に対しある特定の同一性パーセントを有すると言及される配列は、前述の計算法の内の、任意の一つ以上の計算によって、言及された同一性を有する配列同士を指す。例えば、第1配列が、第2配列に対し、Zuker計算法を用いて80パーセントの同一性を有すると計算された場合、仮令、該第1配列が、他の計算法のいずれかによって計算した場合、第2配列に対し80パーセントの同一性を持たなくとも、該第1配列は、第2配列に対し、本明細書における定義にしたがって80パーセントの同一性を有する。

【0053】

VLR変異体および誘導体は、アミノ酸配列修飾体を含んでもよい。例えば、アミノ酸修飾体は、通常、三つのクラス：置換、挿入、または削除変異体の内の一つ以上に所属する。挿入体は、アミノおよび/またはカルボキシル末端融合体の外、単一または複数のアミノ酸残基による配列内挿入を含む。挿入体は、通常、アミノまたはカルボキシル末端融合体よりも、例えば、1から4残基だけ小さい挿入体である。削除体は、タンパク質配列からの一つ以上のアミノ酸残基の除去によって特徴づけられる。通常、たかだか約2から6個の残基が、タンパク質配列内部の任意の一部位において削除される。これらの変異体は、通常、そのペプチドをコードするDNAのヌクレオチドに対し部位特異的突然変異誘発し、それによって該変異体をコードするDNAを生産し、その後、組み換え細胞培養体において該DNAを発現することによって調製される。既知の配列を有するDNAの指定部位に置換突然変異を作製するための技術、例えば、M13プライマー突然変異誘発、およびPCR突然変異誘発は、周知されている。アミノ酸置換は、通常単一残基を含むが、同時に異なるいくつかの位置において起こってもよく；挿入は、通常、約1から10アミノ酸残基の桁で行われ；削除は、約1から30残基の範囲である。削除または挿入は、隣接ペアとして行われること、すなわち、2残基の削除、または2残基の挿入が行われることが好ましい。最終構築体に到達するために、置換、削除、挿入、またはそれらの任意の組み合わせを組み合わせる。これらの突然変異は、配列を、読み枠から外してはならず、二次mRNA構造を生じる可能性のある相補性領域を創製しないものであることが好ましい。置換変異体は、少なくとも一つの残基が除去され、別の残基が、その位置に挿入されるものである。このような置換体は、下記の、保存的置換体を示す表1にしたがって作製される。

20

30

40

【0054】

【表 1】

表1 アミノ酸置換

元の残基	例示の置換	元の残基	例示の置換
Ala	Ser, Gly, Cys	Leu	Ile, Val, Met
Arg	Lys, Gln, Met, Ile	Lys	Arg, Gln, Met, Ile
Asn	Gln, His, Glu, Asp	Met	Leu, Ile, Val
Asp	Glu, Asn, Gln	Phe	Met, Leu, Tyr, Trp, His
Cys	Ser, Met, Thr	Ser	Thr, Met, Cys
Gln	Asn, Lys, Glu, Asp	Thr	Ser, Met, Val
Glu	Asp, Asn, Gln	Trp	Tyr, Phe
Gly	Pro, Ala	Tyr	Trp, Phe, His
His	Gln, Asn	Val	Ile, Leu, Met
Ile	Leu, Val, Met		

10

【0055】

置換性または削除性突然変異を用いて、N - グリコシル化 (A s n - X - T h r / S e r)、またはO - グリコシル化 (S e r または T h r) のための部位を挿入してもよい。システイン、またはその他の、不安定残基の削除が望ましい場合がある。可能なタンパク質分解部位、例えば、A r g の削除または置換は、例えば、塩基性残基の一つを削除するか、または、それを、グルタミルまたはヒスチジル残基によって置換することによって実現される。

20

【0056】

ある翻訳後誘導体は、発現ポリペプチドに対する組み換え宿主細胞の作用の結果である。グルタミルおよびアスパラギン残基は、しばしば翻訳後に脱アミド化されて、対応するグルタミルおよびアスパリル残基となる。それとは別に、これらの残基は、穏やかな酸性条件下で脱アミド化される。他の、翻訳後修飾としては、プロリンおよびリシンのヒドロキシル化、セリルまたはトレオニル残基のヒドロキシル基のリン酸化、リシン、アルギニン、およびヒスチジン側鎖のO - アミノ基のメチル化 (T . E . C r e i g h t o n (1 9 8 3) P r o t e i n s : S t r u c t u r e a n d M o l e c u l a r P r o p e r t i e s , W . H . F r e e m a n & C o . , S a n F r a n c i s c o p p 7 9 - 8 6)、N末端アミンのアセチル化、および、ある場合には、C末端カルボキシルのアミド化が挙げられる。

30

【0057】

本明細書に提供されるのは、抗原特異的ポリペプチド、またはV L Rに選択的に結合する抗体、または、抗原特異的タンパク質またはV L Rの断片または変異体に選択的に結合する抗体である。このような抗体は、V L R、またはV L R生産細胞を位置決めするために使用することが可能である。このような抗体としては、例えば、ストーク領域に選択的に結合する抗体、または、その一部が挙げられる。抗体は、モノクローナルであっても、ポリクローナルであってもよい。モノクローナル抗体は、ハイブリドーマ法、例えば、K o h l e r a n d M i l s t e i n , N a t u r e , 2 5 6 : 4 9 5 (1 9 7 5)、または、H a r l o w a n d L a n e (1 9 8 8) A n t i b o d i e s , A L a b o r a t o r y M a n u a l . C o l d S p r i n g H a r b o r P u b l i c a t i o n s , N e w Y o r kによって記載される方法によって調製してもよい。免疫化因子は、抗原特異的ポリペプチド、または、その任意の断片 (例えば、ストーク領域など)、またはその変異体であってもよい。

40

【0058】

クローンによって分泌されるモノクローナル抗体は、通例の免疫グロブリン精製法、例えば、タンパク質Aセファロース、タンパク質G、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析、またはアフィニティークロマトグラフィーによって、培養

50

媒体または腹水から単離または精製してよい。抗原特異的ポリペプチド、またはその断片または変異体に選択的に結合する抗体を選択するために、各種のイムノアッセイ方式を用いてよい。例えば、標的と選択的に免疫反応する抗体を選択するのに、通常、固相E L I S A免疫アッセイが使用される。選択的結合を決定するために使用することが可能な、イムノアッセイの方式および条件の記述に関しては、Harlow and Lane, Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Publications, New York, (1988)を参照されたい。モノクローナル抗体の結合アフィニティーは、例えば、Munson et al., Anal. Biochem., 107: 220 (1980)のScatchard分析によって決定することが可能である。

10

【0059】

さらに提供されるのは、抗原特異的ポリペプチドに選択的に結合する、キメラ抗体、単一鎖抗体、およびハイブリッド抗体（例えば、二重または複数の抗原またはエピトープ特異性を有するもの）、抗体接合体、および抗体断片（例えば、F(ab')₂、Fab'、Fabなどで、ハイブリッド断片を含む）である。

【0060】

V L R、およびV L Rに対する抗体は、検出可能なタグまたは標識に直接または間接に連結されてもよい。検出可能なタグまたは標識は、インビトロまたはインビボにおいて、画像法または検出法によって可視化することが可能であるならば、いずれのタグであってもよい。この検出可能タグは、放射線不透過物質、放射性標識、化学発光標識、蛍光標識、または磁気標識であってもよい。検出可能タグは、ガンマ線発射体、ベータ線発射体、およびアルファ線発射体、ガンマ線発射体、ポジトロン発射体、X線発射体、および蛍光発射体から成る群から選んでもよい。適切な蛍光化合物としては、フルオレセインナトリウム、フルオレセインイソチオシアネート、フィコエリスリン、およびテキサスレッドスルフォニルクロリド、アロフィコシアニン(A P C)、Cy 5 - P E、C Y 7 - A P C、およびカスケードイエローが挙げられる。必要に応じて、組織化学技術、E L I S A様アッセイ、共焦点顕微鏡検査、蛍光検出、セルソーティング法、核磁気共鳴、ラジオイムノシンチグラフィ、X線撮影法、ポジトロン放射断層撮影法、軸方向コンピュータ断層撮影法、磁気共鳴画像法、および超音波画像法を用いて、検出可能タグを可視化することが可能である。

20

30

【0061】

標識またはタグは、V L Rまたは抗体に直接結合させてもよいし、あるいはそれとは別に、標識またはタグは、該標識に直接連結される、分子または他の介在因子を用いて間接的に連結させてもよい。例えば、V L Rまたは抗体をビオチニル化し、蛍光標識ストレプトアビジンなどの、後続検出可能標識を加えて、該ビオチンに結合させることも可能である。ビオチンは、当該技術分野で既知のいくつかの技術のいずれかを用いて検出される。例えば、ビオチンは、蛍光標識アビジンと結合させることによって検出することが可能であり、アビジンは、各結合事象と関連する信号を増すために、フィコエリスリンまたは連鎖蛍光標識によって標識される。

【0062】

必要に応じて、抗原特異的ポリペプチドまたはV L R、またはその断片または変異体、または、該抗原特異的ポリペプチドまたはV L Rに対する抗体は、固相支持体、または可動固相支持体、例えば、スライド、培養皿、マルチウェルプレート、カラム、チップ、アレイ、またはビーズに結合される。アレイとしては、一つ以上のマルチウェル配列手段、例えば、マイクロプレートまたはスライドが挙げられる。可動固相支持体とは、一組の、別々に標識される微小球またはビーズを指す。この微小球は、ポリスチレンジビニールベンゼン・ビーズであることが好ましい。特異的蛍光染料によってマークされ、特異的蛍光プロフィールを有する、数組の微小球が、例えば、Luminex Corporation (Austin, TX) から市販されている。

40

【0063】

50

さらに提供されるのは、複数のポリペプチド、核酸、または抗体である。この複数体は、選ばれたポリペプチド、核酸、または抗体に関して均一であっても、不均一であってもよい。必要に応じて、ポリペプチドの L R R は、ポリペプチドの間で高度に変動的である。したがって、この複数体は、内部 L R R の変動性に応じて、異なる結合特異性を有するポリペプチドを含むことが可能である。

【 0 0 6 4 】

さらに提供されるのは、ポリペプチド（可溶性、または、膜結合形）、核酸、または抗体、あるいは、ポリペプチド、核酸、または抗体を付着させた、安定であるか、または可動の固相支持体を包含する容器を含むキットである。

【 0 0 6 5 】

このポリペプチドおよび核酸は、種々の技術において使用することが可能である。例えば、このポリペプチドは、画像化ツールとして、かつ、治療剤として、選ばれた介在因子の検出、選ばれた介在因子の活動の阻止、介在因子の精製のために使用することが可能である。

【 0 0 6 6 】

本明細書で提供されるのは、ポリペプチドまたは核酸、および薬学的に受容可能な担体を含む組成物である。この組成物は、インビボにおいて投与することも可能である。組成物は、経口的に、非経口的（例えば、静脈内）に、筋肉内注入によって、腹腔内注入によって、経皮的に、体外的に、局所的などによって投与してよい。必要とされる組成物の正確な量は、被験者によってまちまちであり、該被験者の人種、年齢、体重、および一般的状態、処置されるアレルギー障害の程度、使用される特定の核酸またはベクター、その投与方式などに応じて変動する。したがって、各組成物の正確な量を特定することは不可能である。しかしながら、当該技術分野において通常の錬度を有する当業者であれば、本明細書の教示が得られれば、通例の実験操作を用いるだけで適切な量を決定することが可能である。

【 0 0 6 7 】

使用する場合、組成物の非経口投与は、一般に、注入によって特徴づけられる。注入剤は、溶液または懸濁液のいずれかなど通例の形状、注入前に溶液または懸濁液とするのに好適な固体形状、または乳液として調製することが可能である。非経口投与のための、比較的最近改定された方法は、一定投与が持続されるように、徐放または持続放出システムの使用を含む。例えば、米国特許第 3, 6 1 0, 7 9 5 号を参照されたい。なお、これを、引用により本明細書に含める。

【 0 0 6 8 】

物質は、溶液、懸濁液（例えば、微粒子、リボソーム、または細胞の中に取り込まれる）形状を取ってもよい。これらは、抗体、受容体、または受容体リガンドを介して、特定の細胞型を標的としてもよい。

【 0 0 6 9 】

薬学的に受容可能とは、生物学的に、またはその他の観点において有害でない物質を意味する、すなわち、その物質は、いかなる有害な生物学的作用も引き起こすことなく、または、それが含まれる製薬組成物の、他のいずれの成分とも破滅的相互作用を持つことなく、該ポリペプチドと共に被験者に投与することが可能である。当然ながら、当業者に周知されるように、担体は、活性成分の変性を、例えあるとしてもそれを最小化するように、副作用を、例えあるとしてもそれを最小化するように選ばれる。適切な担体およびその処方、Remington: The Science and Practice of Pharmacy (21st ed.) ed. David B. Troy, publ. Lippicott Williams & Wilkins 2005 に記載される。通常、処方を等張とするために、処方の中に、適切量の、薬学的に受容可能な塩が使用される。薬学的に受容可能な担体の例としては、例えば、ただしこれらに限定されないが、生理的食塩水、リンゲル液、およびデキストロース液が挙げられる。溶液の pH は、約 5 から約 8 であることが好ましく、より好ましくは約 7 から約 7.5 である。

10

20

30

40

50

【 0 0 7 0 】

製薬組成物は、選ばれた分子の外に、担体、増粘剤、希釈剤、バッファー、防腐剤、界面活性剤などを含んでもよい。製薬組成物はさらに、一つ以上の活性成分、例えば、抗菌剤、抗炎症剤、麻酔剤などを含んでもよい。

【 0 0 7 1 】

非経口投与のための調剤は、滅菌水性または非水性溶液、懸濁液、および乳液を含む。非水性溶媒の例としては、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、オリーブ油などの植物油、エチルオレエートなどの注入可能な有機エステル類がある。水性担体としては、水、アルコール/水溶液、乳液または懸濁液、例えば、生理的食塩水およびバッファー媒体などが挙げられる。非経口ベヒクルとしては、塩化ナトリウム液、リンゲルデキストロース、デキストロースおよび塩化ナトリウム、乳酸添加リンゲル液、または固定油が挙げられる。静注ベヒクルとしては、液体および栄養補給剤、電解質補給剤（例えば、リンゲルデキストロース系のもの）などが挙げられる。さらに、防腐剤、およびその他の添加剤、例えば、抗菌剤、抗酸化剤、キレート剤、および不活性ガスなどが存在してもよい。

10

【 0 0 7 2 】

局所投与用処方は、軟膏、ローション、クリーム、ゲル、点滴剤、坐剤、スプレー、液体、および散剤を含んでもよい。通例の製剤担体、水性、粉末状、または油性基材、増粘剤なども、必要であるか、望ましい場合がある。

20

【 0 0 7 3 】

経口投与用組成物としては、散剤または顆粒剤、水性または非水性媒体における懸濁液または溶液、カプセル、粉末剤、または錠剤が挙げられる。増粘剤、芳香剤、希釈剤、乳化剤、分散支援剤、または結合剤が望ましい場合がある。

【 0 0 7 4 】

さらに、この可変性リンパ球受容体、および可変性リンパ球受容体断片および変異体は、該可変性リンパ球受容体または可変性リンパ球受容体断片または変異体をコードする、核酸調剤（例えば、DNAまたはRNA）として、患者または被験者に投与され、そのために、該患者または被験者自身の細胞が、該核酸を摂取し、コードされる、その可変性リンパ球受容体、または可変性リンパ球受容体断片を生産、分泌することが可能とされる。

30

【 0 0 7 5 】

インビトロまたはインビボのいずれかにおいて細胞に核酸を送達するために使用することが可能な組成物および方法はいくつかある。これらの方法および組成物は、大きく二つのクラスに分割される：ウイルス系送達システム、および非ウイルス系送達システムである。例えば、核酸は、いくつかの直接的送達システム、例えば、電気穿孔、リポフェクション、リン酸カルシウム沈殿、プラスミド、ウイルスベクター、ウイルス核酸、ファージ核酸、ファージ、コスミドを通じて、または、細胞、または陽イオンリポソームなどの担体における遺伝材料の転送を通じて送達することが可能である。ウイルスベクター、化学的トランスフェクション因子などの、適切なトランスフェクション手段、または、電気穿孔および、DNAの直接的拡散などの物理的・力学的方法は、例えば、Wolff, J. A., et al., Science, 247, 1465 - 1468, (1990); および、Wolff, J. A. Nature, 352, 815 - 818 (1991) に記載される。転送ベクターは、細胞中に核酸を送達するために使用されるか（例えば、プラスミド）、または、遺伝子を送達するための一般的戦略の一部として、例えば、組み換えレトロウイルスまたはアデノウイルスの一部として (Ram et al. Cancer Res. 53: 83 - 88, (1993)) 使用されるものであれば、いずれのヌクレオチド構築体であってもよい。本明細書で用いるプラスミドまたはウイルスベクターは、開示核酸、例えば、VLRを、細胞中に変性させることなく輸送する介在因子であり、送達される細胞における該遺伝子の発現を実現するプロモーターを含む。ウィルルベクターは、例えば、アデノウイルス、アデノ近縁ウイルス、ヘルペスウイルス、ワクシニアウイルス、ポリオウイルス、エイズウイルス、神経向性ウイルス、シンドビスおよびその他のR

40

50

NAウイルス、例えば、HIVバックボーンを有するこれらのウイルスである。その外、これらのウイルスを、ベクターとして使用するのに好適なものとする特性を共有するものであれば、いずれのウイルス族も好まれる。レトロウイルスとしては、げっ歯類マロネイ白血病ウイルス、MMLV、およびベクターとしてMMLVの、所望の特性を発現するレトロウイルスが挙げられる。

【0076】

開示されるのは、本開示の方法および組成物のために使用されるか、それらと組み合わせて使用されるか、その調製のために使用されるか、または、それらの生産物となる物質、組成物、および成分である。これら、およびその他の物質が、本明細書に開示されるが、これらの物質の組み合わせ、サブセット、相互作用、グループなどが開示される場合、これらの化合物の、種々の、個別の、全体的組み合わせおよび順列のそれぞれについて特異的参照は、はっきりそれと開示されないかも知れないが、本明細書では、それぞれが、特異的に考慮の対象とされ、記載されることを理解しなければならない。例えば、あるVLRが開示、考察され、そのVLRを含むいくつかの分子に対して実行が可能ないくつかの修飾が考察される場合、そのVLRおよび可能な修飾体の全ての組み合わせおよび順列のそれぞれが、特に指定してその逆と表示されない限り、特異的に考慮の対象とされる。したがって、分子A、B、およびCのクラスと同時に、分子D、E、およびFのクラスが開示され、かつ、組み合わせ分子A-Dの例が開示された場合、例え各組み合わせ分子が個別に言及されなくとも、それぞれが、個別に、全体として考慮の対象とされる。したがって、この例では、組み合わせA-E、A-F、B-D、B-E、B-F、C-D、C-E、およびC-Fのそれぞれが特異的に考慮の対象とされるので、これらは、A、B、およびC；D、E、およびF；および例示の組み合わせA-Dの開示から、開示されたものと見なさなければならない。同様に、これらの、任意のサブセットまたは組み合わせも、特異的に考慮の対象とされ、開示される。したがって、例えば、A-E、B-F、およびC-Eのサブグループも特異的に考慮の対象とされるので、これらは、A、B、およびC；D、E、およびF；および例示の組み合わせA-Dの開示から、開示されたものと見なさなければならない。この概念は、本出願の全ての局面、例えば、ただしこれらに限定されないが、開示の成分の作製法および使用法における工程にも当てはまる。したがって、実行可能な、種々の追加工程が、本出願を通じて議論される場合、それら追加工程のそれぞれが、開示の方法の、任意の特異的实施態様、または実施態様の組み合わせと関連して実行が可能であること、かつ、そのような組み合わせのそれぞれが考慮の対象とされ、開示されたものと見なされることを理解しなければならない。

【0077】

本明細書で用いる対象とは、脊椎動物、さらに具体的には哺乳類（例えば、ヒト、ウマ、ブタ、ウサギ、イヌ、ヒツジ、ヤギ、非ヒト霊長類、ウシ、ネコ、モルモット、またはげっ歯類）、魚、鳥、または爬虫類または両生類であってもよい。この用語は、特定の年齢または性別を指定しない。したがって、男女を問わず、成人および新生児対象の外、胎児も、その範囲に含まれることが意図される。本明細書で用いる場合、患者、対象は相互交換的に使用してよく、病気または障害を抱える対象を指すことが可能である。患者または対象という用語は、ヒトおよび獣医学的对象を含む。

【0078】

本明細書および付属の特許請求項で用いる場合、単数形、ある、および該は、文脈からはっきりと別様に示されない限り、複数の参照物を含む。したがって、例えば、あるVLRに対する参照は、二つ以上のVLRなどの混合物を含む。

【0079】

本明細書で用いる場合、単離または精製という用語は、組成物（例えば、ポリペプチド、細胞、または核酸）であって、該組成物が天然において通常関連する物質から、事実上切り離された組成物を含む。ポリペプチド、またはその断片は、例えば、天然供給源からの抽出、該ポリペプチドをコードする組み換え核酸の発現（例えば、細胞、または無細胞翻訳システムにおいて）、または該ポリペプチドの化学的合成によって取得することが可

能である。

【0080】

本明細書では、範囲は、約一つの特定値から、および/または、約もう一つの特定値までと表される場合がある。このように範囲が表される場合、もう一つの実施態様は、該一つの特定値、および/または、該他の特定値までを含む。同様に、数値が、先行詞約の使用によって近似値として表される場合、該特定値がもう一つの実施態様を形成することを理解しなければならない。さらに、範囲のそれぞれの端末点は、他の端末点と関連しても、他の端末点と独立しても、意味を持つことを理解しなければならない。

【0081】

任意の、または必要に応じてとは、後述の事象または状況は起こっても、起こらなくともよいこと、記載は、前記事象または状況が起こる場合、および、それが起こらない場合を含むことを意味する。

【0082】

本明細書で用いる場合、ポリペプチド、タンパク質、およびペプチドは相互交換的に使用されて、アミノ酸配列を指す。

【0083】

本明細書を通じて、種々の公刊物が参照される。本発明の関わる当該技術分野の状態をより完全に記述するために、これら公刊物の開示の全体を、参照により本出願に含める。さらに、開示の参照文献は、該参照文献の依拠する文章において議論され、該参照文献の中に含まれる資料に関して、参照により個別的、特異的に本明細書に含まれる。

【0084】

開示され、記載される、本発明の化合物、組成物、物品、デバイス、および/または方法は、別様に指定されない限り、特定の合成法、特定の組み換え生物工学的方法に限定されないし、または、別様に指定されない限り、当然変動する可能性のある、特定の試薬に限定されるものでもない。

【実施例】

【0085】

下記の実施例は、本出願において特許請求される化合物、組成物、物品、デバイス、および/または方法が、どのように作製され、評価されるかに関し、その完全な開示および記述を、当該技術分野において通常の錬度を有する当業者に提供するために記載されるもので、純粋に例示的であることが意図され、範囲において限定的であることを意図するものではない。数字（例えば、量、温度など）に関して正確性を確保するよう努力してはいるが、若干の誤差および偏倚は斟酌されなければならない。別様に指示しない限り、部は重量部であり、温度は であるか、または周囲温であり、圧は、大気圧か、またはその近傍である。

【0086】

実施例1 *Bacillus anthracis* に特異的に結合する VLR

Bacillus anthracis *exosporium* 免疫化ヤツメウナギから、VLR 陽性リンパ球を収集し、その RNA を単離した。プライマーを用いて VLR cDNA を増幅し、これを発現ベクターにクローンし、細菌に転送した。選ばれたコロニーを、VLR 特異的プライマーによる PCR によって選別した。PCR 産物の不均一サイズは、VLR cDNA ライブラリーの多様性を示した。個別コロニーからプラスミドを精製し、HEK-293 細胞をトランスフェクトし、界面活性剤可溶性細胞分解物を、還元条件下に抗 VLR mAb によるウェスタンブロッティングによって、VLR 発現について調べた。発現された、最初の 6 個の VLR は、その構成 LRR モジュールの変動数による、種々のサイズの（図 3A、3B、および 3C）、モノマー VLR ユニットから構成されていた。トランスフェクト HEK-293 細胞の培養上清を、分泌 VLR の存在について調べてみると、これら 6 個の VLR クローンの内三つの産物が同時に分泌されていた。非還元条件下では、分泌 VLR は、ヤツメウナギ血漿に見られる VLR マルチマーと同様の分子量を持つマルチマーである（図 3B）。2-メルカプトエタノールの存在下では

10

20

30

40

50

、分泌 V L R は還元されて、ヤツメウナギ血漿由来の V L R モノマーユニットとほぼ同じ分子量を持つモノマーとされた (図 3 C)。これらのトランスフェクション実験を繰り返したところ、V L R - 2、- 4、および - 5 は培養上清において検出されたが、V L R - 1、- 3、および - 6 は検出されなかった。DNA 配列分析から、分泌と、C 末端 L R R におけるペプチドモチーフの間には相関のあることが示唆された。

【0087】

組み換え V L R が、トランスフェクト H E K - 293 の培養上清へ分泌されるため、E L I S A によって、抗原結合に関して V L R クローンをスクリーニングすることが可能となる。B c l A の C 末端ドメインは、B . a n t h r a c i s e x o s p o r i u m 免疫化マウスから得られるモノクローナル抗体によって認識される主要ドメインである。B c l A はさらに、免疫化ヤツメウナギの血漿中のポリクローナル V L R によって認識される。したがって、E L I S A プレートウェルに、下記の抗原：精製組み換え B c l A - C T D、野生型 B a c i l l u s a n t h r a c i s 胞子、B c l A - 欠損 B a c i l l u s a n t h r a c i s 胞子、および、その B c l A - C T D が、B a c i l l u s a n t h r a c i s の B c l A - C T D と 15 アミノ酸 (134 個の内) だけ異なる B a c i l l u s c e r e u s 由来の胞子を塗布した。V L R 4 でトランスフェクトされた H E K - 293 細胞の上清は、組み換え B c l A - C T D および野生型 B . a n t h r a c i s 胞子と特異的に反応した (図 4)。V L R 4 は、B c l A 欠損 B . a n t h r a c i s 胞子、または、B . a n t h r a c i s B c l A に対し広汎な相同性を有する、B . c e r e u s B c l A タンパク質を認識しない (図 4)。

10

20

【0088】

注目すべきことに、V L R 4 と V L R 5 は、僅かに 20 アミノ酸しか違わないのに、前者は B c l A - C T D を認識し、後者は認識しない (図 5 A)。アミノ酸差は、V L R のソレノイド構造の内面に置かれ、進化時選択されると予測された位置に認められた (A l d e r , e t a l . , S c i e n c e 310 : 1970 , 2005)。V L R - 4 トランスフェクト細胞は、膜結合 V L R と、分泌される V L R マルチマーの両方を発現する (図 1 A)。

【0089】

実施例 2 H 血液型決定基に特異的に結合する V L R

ヤツメウナギを、 1×10^7 個の、O 型ヒト赤血球によって、週に 1 回 4 週間免疫化した。最後の免疫化の 1 週後、ヤツメウナギ血漿を収集した。さらに、二つの C H O 細胞系統を用いた。すなわち、一方は、C H O 細胞の表面に H 抗原を生成するために $\alpha 1, 2$ -フコシルトランスフェラーゼでトランスフェクトしたもの、他方は、ベクターのみでトランスフェクトしたものである (P r i e t o e t a l . , J . B i o l . C h e m . 1997 J a n 24 ; 272 (4) : 2089 - 97)。細胞はまず、ヤツメウナギ血漿の 1 : 10 希釈液、または、H 抗原に対して特異的な、モノクローナル抗体 92 F R A 2 の 1 : 50 希釈液においてインキュベートした。全ての細胞を洗浄し、次に、ヤツメウナギ血漿とインキュベートしたこれらの細胞を、V L R 分子を認識する m A b 4 C 4 においてインキュベートし、次いで洗浄した。全細胞を、ヤギ抗マウス R P E 二次抗体によって染色し、次いで二度洗浄した。F A C S ヒストグラムは、ヒト赤血球で免疫化したヤツメウナギからの血漿のみが、酵素でトランスフェクトした C H O 細胞を染色することを示す (図 6)。したがって、ヤツメウナギ V L R は、炭水化物抗原を認識した。

30

40

【0090】

実施例 3 規定された抗原特異性の、ヤツメウナギモノクローナル V L R - B 抗体の生産と特徴解明

抗原特異的 V L R - B クローンの単離。 V L R 生産性ヤツメウナギ細胞またはハイブリドーマ培養における制限を克服するために、完全長 V L R - B c D N A でトランスフェクトした H E K - 293 T 細胞を利用して、組み換えオリゴマー V L R - B 抗体を、組織培養上清に自発的に分泌する異種発現システムを開発した。H E K - 293 T 細胞による V L R - B クローンの分泌によって、ハイブリドーマスクリーニングと同様の方法原理

50

を用い、抗原結合に関して多数のクローンをスクリーニングするための手段が得られた。この手順は、生物学実験室において利用可能な技術による抗原特異的 V L R - B クローンの単離を可能とするが、モノクロナール抗体生産に匹敵する時間投資を必要とする (図 8 A および 8 B)。ヤツメウナギ幼生を、2 週間に 1 回、合計 8 週免疫化し、次いで、F A C S により、血液サンプルから、V L R - B ⁺ リンパ球の F A C S 単離を行った。選別した V L R - B ⁺ リンパ球から R N A を単離し、V L R - B 転写体の定常域に対して特異的なプライマーによる P C R によって V L R - B c D N A を増幅した。この V L R - B c D N A を、哺乳類発現ベクターにクローンし、H E K - 2 9 3 T 細胞の一過性トランスフェクションに用いた。次に、抗原特異的 V L R - B 抗体を生産するクローンを特定するために、組織培養上清を、E L I S A およびフローサイトメトリーによってスクリーニングした。

10

【 0 0 9 1 】

免疫原として *B . a n t h r a c i s e x o s p o r i u m* を選んだ。その理由は、本明細書に記載するように、B c l A 胞子コートタンパク質の C 末端ドメイン (C T D) が、インビボ反応において V L R - B 抗体によって認識される、主要な免疫反応エピトープだからである。2 4 ウェルプレートにおいて、単一コロニー由来の精製プラスミドによって H E K - 2 9 3 T 細胞を一過性にトランスフェクトした。これにより、各ウェルは、V L R - B c D N A の単一クローンを表す。*B . a n t h r a c i s e x o s p o r i u m* 免疫化ヤツメウナギ由来の V L R - B c D N A を含む精製プラスミドをこのようにトランスフェクトし、上清を、B c l A - C T D 結合に関してスクリーニングしたところ、2 1 2 個のクローンの内 1 4 個 (6 . 6 %) が、B c l A - C T D を認識するが、G S T コントロールタンパク質は認識しない、V L R - B 抗体を分泌した。1 4 個の抗原反応性クローンの内 8 個が、背景を 1 0 倍上回るレベルにおいて B c l A - C T D を認識した (図 9 A)。これらの組み換え V L R - B 抗体の特異性は、*B . a n t h r a c i s*、および二つのごく近縁の *B a c i l l u s* 種、*B . c e r e u s* および *B . t h u r i n g i e n s i s* に対する結合によって評価した。V L R - B 抗体は、*B . a n t h r a c i s* 胞子とは反応するが、*B . c e r e u s*、*B . t h u r i n g i e n s i s*、または B c l A 欠損 *B . a n t h r a c i s* 胞子とは反応しないことが判明した (図 9 B)。B c l A - C T D 組み換えタンパク質を認識する V L R - B 抗体の内一例のみ (v B a 4 9) が、*B . a n t h r a c i s* 胞子を認識しなかった。E L I S A によって、胞子と反応することが認められた組み換え V L R - B 抗体は全て、フローサイトメトリーによる免疫蛍光アッセイにおいて *B . a n t h r a c i s* 胞子を特異的に認識した (図 9 C)。

20

30

【 0 0 9 2 】

B . a n t h r a c i s 胞子を認識する、7 個の組み換え V L R - B 抗体のいずれも、近縁 *B a c i l l u s* 種の胞子とは反応しなかった。これは、*B . a n t h r a c i s* B c l A - C T D は、*B . c e r e u s* B c l A - C T D とは、1 3 4 のアミノ酸位置の僅かに 1 4 において異なるだけであるにも拘わらずそうであった。ただし、溶媒暴露されるのは 1 4 の内僅かに 9 だけである (図 1 0 D)。さらに、B c l A - C T D 配列の不一致は、化学的に近似のアミノ酸を含む。溶媒暴露アミノ酸差を、B c l A - C T D の結晶構造座標軸の上にプロットすると、このアミノ酸差は、凝集せずに、分子表面に分散することが注目された。V L R - B 抗体が、これら不一致アミノ酸の全てに接触するとは考えられないから、V L R - B 抗体は、ごく少数の微妙なアミノ酸変動に基づいて近縁タンパク質を識別することが可能なのであろうと我々は考える。

40

抗原アフィニティークロマトグラフィーによる V L R - B 抗体の精製。E L I S A および免疫蛍光アッセイによって、V L R - B 抗体が、簡単に B c l A - C T D 抗原を検出できることから、抗原に対する V L R - B 抗体の相互作用は、アフィニティークロマトグラフィーによる精製を促進するほど十分な強度および安定性を有することが示唆された。したがって、V L R - 4 抗体を生産する H E K - 2 9 3 T 細胞クローンからの上清を、B c l A - C T D に共有的に接合させたセファローズビーズと共にインキュベートした。次に、B c l A - C T D ビーズから V L R 4 を溶出するのに必要な条件を、抗原コートビーズ

50

から V L R 4 を解離することが可能な処理である、5 M L i C l、3.5 M M g C l₂、0.1 M グリシン p H 2.5、0.1 M H C l、50 % エチレングリコール、0.1 M トリエチルアミン p H 11.5、および 0.1 M N a O H、p H 12.5、0.1 M トリエチルアミン p H 11.5、および 0.1 M N a O H p H 12.5 を用いて調べた (図 10 A)。p H 条件の勾配を調べることによって、我々は、B c l A - C T D から組み換え V L R 4 抗体を解離するためには、p H 11.0 が必要であることを見出した。V L R 4 結合および溶出の最適条件を決定した後、V L R 4 分泌細胞の安定クローンを選んで拡張し、より大量の V L R - 4 抗体を取得し、これを、B c l A - C T D アフィニティークロマトグラフィーによって精製し、0.1 M トリエチルアミン p H 11.5 によって溶出した。この精製 V L R 4 抗体は、厳しい溶出条件にも拘わらず抗原結合能力を保持し、かつ、抗原反応性を失うことなく、p H 7.2 M O P S バッファー生理的食塩水において 4 で > 6 ヶ月保存された。

【0093】

V L R 4 抗体の、二つの分子量形が、B c l A - C T D アフィニティークラムから溶出したが、これらはいずれも、非還元性 S D S - P A G E ゲルにおいて 225 k D a 標準よりも大きかった (図 10 B)。両タンパク質のバンドは、精製前の上清、および、抗原アフィニティークラムからの溶出液において、抗 V L R - B m A b (4 C 4) によるウェスタンブロッティングによって検出された。分子量についてさらに正確な推定値を得るために、組み換え V L R 4 抗体および分子量標準の相対的移動度を、未加工アクリルアミドゲル (5、6、7、8、10、および 12 %) において測定し、このデータを用いて F e r g u s o n プロットを構築した (図 10 C)。この方法によって、大きい方の V L R 4 バンドは、約 400 k D a の分子量を有することが示された。モノマーの分子量は、40 k D a であると推定された。したがって、このオリゴマーは、10 個のサブユニットから構成されることが示唆される。同様に、より分子量の低い V L R 4 オリゴマーは、8 個の V L R サブユニットを含むと推定された。比較的低濃度の還元剤に暴露された上清のウェスタンブロットには、約 80 k D a の部分的に還元されたバンドが観察された。これは、該オリゴマー V L R - B 抗体が、ダイマーサブユニットから構成される可能性のあることを示唆する (図 10 D)。これらの所見から、ヤツメウナギ V L R - B 抗体の四元構造は、I g M とまったく同様の、ダイマーの、ジスルフィド連結ペンタマーまたはテトラマーから構成されるモデルが創製された (図 1 B)。

V L R - B 抗体集合体の分析。 V L R - B 細胞表面分子は、G P I 連結によってリンパ球表面に繫留される。V L R - B 抗体を分泌する、プラズマ細胞様細胞はさらに、細胞表面 V L R - B を発現する。細胞表面におけるこの G P I - 連結 V L R - B が、フォスホリパーゼによって解放される場合、オリゴマー形成のために使用されるシステインは、G P I 切断部位に対し N 末端側に配置されていなければならない。なぜならば、G P I 切断部位に対するアミノ酸 C 末端は、E R における G P I 付加によって取り除かれると考えられるからである。この問題を評価するために、開始コドンから G P I 切断部位まで V L R 4 抗体をコードする構築体 (V L R 4^{G P I - s t o p}) を、H E K - 293 T 細胞において発現させた。得られた野生型 V L R 4 (V L R 4^{W T}) および V L R 4^{G P I - s t o p} 分子を非還元性 S D S - P A G E によって分離し、その分子量を、抗 V L R - B m A b (4 C 4) によるウェスタンブロッティングによって求めた。この分析から、V L R 4^{W T} は、> 225 k D a の分子量を有するが、一方、V L R 4^{G P I - s t o p} 分子は、約 40 k D a モノマーとして移動することが確かめられた (図 11 A)。この所見から、V L R - B オリゴマー形成に使用されるシステインは、G P I 切断部位の C 末端側に配置されることが示唆された。

【0094】

分泌された V L R 4 のシステインリッチ C 末端が、E R における処理の際に、G P I 切断によって除去されるかどうかを決めるために、精製 V L R 4 抗体を還元性 S D S - P A G E によって分離し、G e l c o d e B l u e 染色によって可視化した。これにより、V L R 4 抗体は、イオドアセタミドによってアセチル化される前に、アクリルアミドゲル

10

20

30

40

50

から除去され、そのため、ジスルフィド結合の再形成およびトリプシンによる消化が阻止された。次に、このトリプシン処理ペプチドを、逆相クロマトグラフィーによって分離し、MS/MSによって配列決定した。この分析から、全体システインリッチペプチド配列は、VLR4抗体分泌形のC末端中に存在することが明らかにされた。これは、マルチマーVLR4抗体は、GPI-連結前駆体からは得られないことを示す。これらの実験の結果はさらに、オリゴマー形成に与るシステインは、VLR-B抗体の、比較的疎水性の高いC末端に配されることを示す(図11Bおよび図11C)。

【0095】

モノマーとしてのVLR4^{GPI-stop}の分泌は、個別のVLR4抗体ユニットによる抗原結合の寄与を調べることを可能にする。このELISA評価では、Bc1A-CTD塗布ウェルを、オリゴマーVLR4^{Wt}またはモノマーVLR4^{GPI-stop}抗体を含む上清と共にインキュベートした。オリゴマーVLR4抗体は、Bc1A-CTDとの緊密な相互作用を示す、強力な結合信号を誘発したが、一方、VLR4抗体のモノマー形は、Bc1A-CTDと相互作用を示したが、背景を上回る、かろうじて検出可能な信号を生成した(図11D)。これらの複合結果から、VLR-Bモノマーユニットの抗原結合親和性は比較的低いが、オリゴマーVLR-B抗体の抗原結合活性は比較的高いことが示された。

VLR-B抗原結合部位。VLR-Bの陥凹面は、各一つが、LRR-NT、LRR1、LRR-V(単数または複数)、LRR_{ve}、およびLRR-CPに由来する、平行なβ鎖から構成される。陥凹面の、このβ鎖が、従来から抗原結合部位であると想定されていた。なぜなら、もっとも高い配列変動性が、その場所に観察されたからである。したがって、抗原結合に与るアミノ酸残基が、VLR-B陥凹面のβ鎖に配置されるかどうかを調べた。多数のBc1A-CTD特異的VLR-Bクローンの利用が可能であることによって、部位指向性突然変異誘発による本試験のための手段が得られた。Bc1A-CTDに対する組み換えVLR-B抗体の内、四つは、高い配列同一性を示した。これらの内三つは、高いアビディティでBc1A-CTDに結合したが(VLR4、vBA41、vBA191)、他のもの(VLR5)の、この抗原に対する結合は弱かった。結合の弱いVLR5抗体は、高アビディティ抗Bc1A-CTDクローンの共通配列に対し、陥凹面における、20個の、可能な超可変アミノ酸位置の内の、6箇所(H34、Y55、T58、Q101、S103、W127)において異なっていた(図12Aおよび図12B)。この所見は、これら6個のアミノ酸残基の内の一つ以上が、VLR5のアビディティ低下に与ることを示唆し、かつ、Bc1A-CTD抗原に対し高い結合アビディティを有する組み換えVLR-B抗体によって利用される、対応アミノ酸に、これらの残基を変えることによって、VLR5のアビディティを上昇させることが可能かもしれないことを意味する。

【0096】

VLR4、VLR5^{Wt}、およびVLR5抗原結合部位突然変異体(VLR5^{H34N}、VLR5^{Y55R}、VLR5^{T58I}、VLR5^{Q101H}、VLR5^{S103A}、およびVLR5^{W127Y})の相対的結合活性を測定するために、表面プラズモン共鳴を用いた。このアッセイは、Biacoreチップに共有的に結合させたBc1A-CTDの上に、各種VLR-B抗体を含む、トランスフェクト細胞上清を流すことによって実行した。VLR5^{Wt}と比べると、Bc1A-CTDに対してより高い結合を示す上昇反応は、VLR5^{Y55R}およびVLR5^{W127Y}において明白であった(図12C)。他の突然変異VLR5抗体は、VLR5^{Wt}と等価であるか、または、やや弱い結合アビディティを示した。

【0097】

抗体残基Y55、W127は、共に、VLR5のVLR5陥凹面の中心に軸揃えされることが予想されているが、これらの残基のいずれかの突然変異は、VLR5の結合アビディティの上昇をもたらした(図12B)。これらの残基が、抗原結合において共同的に機能するのかどうかを調べるために、VLR5の二重変異体(Y55R/W127Y)を

10

20

30

40

50

、B c l A - C T D に対する結合に関して、表面プラズモン共鳴によって調べた（図 1 2 C）。Y 5 5 および W 1 2 7 両方の突然変異は、V L R 5 の結合活性の上昇をもたらした。

【 0 0 9 8 】

抗 H 抗原モノクローナル V L R - B (m V L R - B) (v R B C - 3 6) 抗原結合部位のモデルを作製した（図 1 3）。この v R B C - 3 6 モデルは、ヌタウナギ V L R - B (P D B 特定番号：2 0 6 R) の結晶構造データに対し、S W I S S - M O D E L (<http://swissmodel.expasy.org/>) を用いて相同性に基づくモデル作製によって構築した。超可変アミノ酸位置は、紫色で強調した。赤矢印は、他の炭水化物成分から H 抗原を識別する、フコース糖の接触面であると考えられる、陥凹面上の凹部を示す。表 2 は、各 L R R 分子の超可変残基によってコードされるアミノ酸を掲げる。

【 0 0 9 9 】

【表 2】

表 2 抗 H 抗原 m V L R - B の超可変残基によってコードされるアミノ酸

LRR	残基
LRRNT	SRDT (配列番号 33)
LRR1	DHYI (配列番号 34)
LRRV	SGYE (配列番号 35)
LRRV	TGDV (配列番号 36)
LRRV	CCFE (配列番号 37)
LRRVe	QDAH (配列番号 38)
LRR-CP	GFYH (配列番号 39)

【 0 1 0 0 】

実施例 4 無顎脊椎動物における V L R 抗体反応

材料および方法

動物の維持および免疫化。L a m p r e y S e r v i c e s (L u d i n g t o n , M I) によって供給された海産ヤツメウナギ幼生 (1 1 - 1 5 c m) を、砂を敷いたアクアリウムにおいて 1 6 - 1 8 に維持し、ビール醸造酵母で飼養した。0 . 1 g / L M S 2 2 2 (S i g m a , S t . L o u i s , M O) に浸すことによって麻酔したヤツメウナギの腹腔内に、精製 B a c i l l u s a n t h r a c i s e x o s p o r i u m 、赤血球、L P S 、または組み換えタンパク質を注入した。

【 0 1 0 1 】

抗 V L R モノクローナル抗体および組み換え V L R 抗体。E . c o l l i (大腸菌) に おいて生産した、組み換え V L R - B 不変性ストーク領域タンパク質によってマウスを超免疫化した後、関連領域リンパ節細胞を、非生殖的 A g 8 . 6 5 3 ミエローマ変異細胞と融合することによって、2 種類のマウスモノクローナル抗体を生成した。V L R - B 特異性を有する抗体を生産する、二つのハイブリドーマクローン、6 C 3 (I g M) および 4 C 4 (I g G 2 b) は、E L I S A およびフローサイトメトリースクリーニングによって特定した。生細胞の免疫蛍光染色、および、固定切片の免疫組織化学的染色によって、この 6 C 3 および 4 C 4 抗体は、ヤツメウナギの血液および組織において同じリンパ球集団を認識することが示された。さらに、4 C 4 抗体は、ウェスタンブロッティングによって、V L R - B タンパク質と反応した。ヒト H 抗原特異性を有する、組み換え V L R - B モノクローナル抗体 (m V L R - R B C 3 6) は、O 血液型赤血球によって免疫化したヤツメウナギの白血球の RNA を単離し、S u p e r s c r i p t I I I (I n v i t r o g e n , C a r l s b a d , C A ,) によって c D N A を生産することによって取得した。次に、V L R - B 座位に対して特異的なプライマーを用いて、一次的および入れ子型 P C R を実行し、次いで、ベクター p I R E S p u r o 2 (C l o n e t e c h , M o u n t a i n V i e w , C A) に P C R アンプリコンをクローンし、細菌を形質転換した。

単一コロニーからプラスミドDNAを単離し ($n = 272$) (Qiagen, Valencia, CA)、次いで、これを、LipofectAMINE (Invitrogen, Carlsbad, CA) と共にHEK 293T細胞にトランスフェクトした。トランスフェクションの3日後、CHO細胞の表面にH抗原を生成する $\alpha 1, 2$ -フコシルトランスフェラーゼの構築体で安定にトランスフェクトしたCHO細胞を染色する能力に基づいて、HEK 293T細胞の上清を、H抗原特異性に関して調べた。

【0102】

免疫組織化学、免疫蛍光分析、および電子顕微鏡観察。1 g/L MS222に浸してヤツメウナギを屠殺し、組織および血液サンプルを得た。免疫組織学のために、1 cmの死体切り身を固定し、パラフィンに包埋した。切片を脱パラフィンし、100%、95%、および70%エタノールに連続浸漬し、6C3抗VLR抗体染色については0.01 Mクエン酸 (pH 6) に、4C4抗体染色については0.01 M EDTA (pH 8) に15 psiで10分間切片を加熱することによって抗原回収を行った。次に、切片を、3%過酸化水素で5分間処理し、次いで、3%ヤギ血清で30分ブロックした。処理した組織切片を、前記一次抗体の一方で覆い、室温で1時間インキュベートし、次いで、Trisバッファー生理的食塩水で洗浄し、ビオチニル化二次抗体およびストレプトアビジン-HRP (Signet Laboratories, Dedham, MA) をそれぞれ20分かけて加え、次いで、発色性標識化のためにジアミノベンジジン基質 (BioGenex, San Ramon, CA) を加えた。カウンターステインのために、標識化スライドを、短時間、Mayerのヘマトキシリンエオジンに浸し、エタノールとキシレンの連続浴を通じて脱水し、次いで、カバースリップを被せた。免疫蛍光分析のために同じプロトコルを用いた。ただし、カバースリップは、二次抗体の添加後、DAPIマウント媒体含有Prolong Gold (Invitrogen, Carlsbad, CA) によって布置した。電子顕微鏡観察のために、ソートした血球を、カコジル酸ナトリウム、または、2.5%グルタルアルデヒド含有Sorsensonバッファー中に、4で4時間再懸濁した。次いで、1%四酸化オスミウム中で1時間固定し、漸増濃度のアセトンシリーズ中で脱水し、エポキシ樹脂に包埋した。

【0103】

抗原およびVLR抗体アッセイ。BSA免疫化とは、下記のベヒクル：滅菌0.66% PBSで、注入前4時間タンパク質によって200 μ gのAl(OH)₃を吸収させたもの、または、メーカーのプロトコルにしたがって調製された、RibbiおよびTiterrmax Gold (Sigma, St. Louis, MO) アジュバント含有乳剤、の内の一方の50 μ lに溶解した10 μ gのBSAの注入である。BSA塗布ビーズのために、カルボジイミドキットをメーカーのプロトコル (Polysciences, Warrington, PA) にしたがって用い、BSAを、1ミクロンのカルボン酸ポリスチレンビーズに接合し、注入前に、リボポリサッカリド、リボタイコ酸、およびペプチドグリカン (Invitrogen, San Diego, CA) を加えた。B6マウス、または、ヒトの血液型Oのドナーから赤血球を得、注入前に3回洗浄した。抗体アッセイのために、種々の希釈度でヤツメウナギ血漿と混合した、洗浄赤血球 (5×10^6) を、円錐形底部のマイクロウェルプレートに1時間沈着させ、プレートを80°で2分傾斜させた後、凝集を目視で評価した。以前に記載した通りに (Alder et al., Science 310: 1970-3 (2005)) ELISAを行った。H抗原とのVLRの反応性は、 $\alpha 1, 2$ -フコシルトランスフェラーゼのための構築体、またはベクター単独によって安定にトランスフェクトされたCHO細胞を、試験血漿サンプルとインキュベートすることによって決定した。次に、このCHO細胞を、4C4 mAbおよびヤギ抗マウスIg (H+L) - RPE (Southern Biotech, Birmingham, AL) と、それぞれ10分間インキュベートすることによって染色し、次いで、Cyan (商標) フローサイトメーター (Cytomation, Fort Collins, CO) を用いて免疫蛍光を分析した。血漿VLR吸着のために、試験サンプルを、セファロースに接合させた4C4抗VLR mAbと混合するか、または、CHO細胞

10

20

30

40

50

胞 (3×10^6) を、4 で1時間パラホルムアルデヒドによって固定した。ビーズまたは細胞を回転沈着させ、上清を新しい試験管に移し、次いで、凝集またはウェスタンブロットアッセイによって抗原反応性を分析する前に、上記吸着過程を繰り返した。蛍光性胞子によってヤツメウナギリンパ球を染色するために、 4×10^6 のリンパ球を、4C4抗VLRモノクローナル抗体、およびAlexa488 (Invitrogen, Carlsbad, CA) で標識した 4×10^6 の胞子と、氷上で10分混ぜ合わせた。次に、細胞を洗浄し、ヤギ抗マウスIg (H+L) - RPEを氷上で10分加え、次いで2回洗浄した。次に、Cyan (商標) フローサイトメーター (Cytomation, Fort Collins, CO) においてフローサイトメトリ分析を行った。

【0104】

VLR分泌細胞のELISPOT分析。96ウェルプレート (Millipore, Billerica, MA) のマイクロウェルに、 $50 \mu\text{g/ml}$ の組み換えBclA C末端ドメインタンパク質 (参照) $100 \mu\text{l}$ を塗布し、4 で一晩放置し、次いで、PBSに溶解した1%BSAによって37 で2時間ブロックし、10%FBS、L-グルタミン、ペニシリン、ストレプトマイシン、インスリン、およびトランスフェリンを添加した、IDMEM (Mediatech, Herndon, VA) に試験細胞懸濁液を加え、5%CO₂ において25 で18時間インキュベートした。次に、細胞をPBSで洗浄し、次いで、1%BSAに溶解した $1 \mu\text{g/ml}$ のVLR抗体を加え、37 で1時間インキュベートした。ウェルをPBS-0.5% tweenで洗浄した後、西洋ワサビペルオキシダーゼ (Southern Biotech, Birmingham, AL) に接合させたヤギ抗マウスを加え、37 で1時間インキュベートし、次いで、このウェルを、PBS-tweenで1回、PBSで3回洗浄した。次に、AECペルオキシダーゼ基質 (Moss Inc, Pasadena, MD) を加え、1時間インキュベートし、次いで、脱イオン水で洗浄し、Immunospot 2.0ソフトウェア (Cellular Technology Ltd., Cleveland, OH) を用いてVLR抗体スポットをカウントした。

【0105】

ウェスタンブロット。血漿サンプル ($1 \mu\text{l}$) を、2-メルカプトエタノールの存在下または不在下に、10%SDS PAGEゲル上で電気泳動し、次いで、ニトロセルロース膜に転送し、これを、3%ミルクでブロックし、次に、4C4抗VLR mAbと1時間インキュベートした。次いで、膜を、PBS-0.5% tweenで5回洗浄し、次に、ヤギ抗マウスHRP (Southern Biotech, Birmingham, AL) を加え、1時間後に最終洗浄を行った。SuperSignal化学発光キット (Pierce, Rockford, IL) を用いて、VLR-抗体接合体を検出した。

【0106】

定量的PCR。メーカーのプロトコールにしたがって、オン・カラムDNA消化 (Qiagen, Valencia, CA) と共にTrizol (Invitrogen, Carlsbad, CA) およびRNeasyを用いて、VLR-B+およびVLR-B-選別細胞からRNAを抽出した。第1鎖cDNAは、Superscript III (Invitrogen, Carlsbad, CA) と共にランダムヘキサマーを用いて生成した。スプライス部位が既知の場合は、7900HT ABI Prism (Applied Biosystems, Foster City, CA) においてSYBR Greenを用い、スプライス部位において設計されたプライマーによって定量的PCRを実行した。

【0107】

結果

モデルタンパク質抗原に対するVLR-B抗体反応の分析。本実施例は、ヤツメウナギのVLR-B抗体の検出のために、VLR-Bストーク領域特異的モノクローナル抗体6C3 (IgM異性形) および4C4 (IgG2b異性形) を用いる。まず、比較的大型の海産ヤツメウナギ幼生 (約13cm長) を、可溶性ウシ血清アルブミン (BSA) (1

10

20

30

40

50

0 μ g) によって免疫化した。BSAは、未修飾形であるか、ミヨウバン沈殿させたものであるか、または、いずれも油中水乳剤において細菌産物を含む、市販のアジュバント、Ribi (登録商標) (Ribi Immunochem Research, Inc., Hamilton, MT) および Titermax (登録商標) (CytRx Corporation, Los Angeles, CA) と混ぜ合わせたものである。他の免疫化用として、BSAをポリスチレンビーズの表面に接合し、このビーズ 1×10^8 個を、そのまま、または、リボポリサッカリド、リボタイコ酸、またはペプチドグリカンそれぞれの 1 μ g と共に注入した。anthrax exosporiumタンパク質に対する強力なVLR体液反応を誘発する免疫化プロトコルを用いた：一次免疫化の2週間後、ブースター免疫化を行い、4週目に試験するために血漿サンプルを収集した。これらのBSA免疫化法のいずれも、ELISAで検出することが可能な、VLR-B抗体の生産をもたらさなかった ($n = 30$ 、1免疫化群当たり4 - 5匹)。さらに免疫化ヤツメウナギは、anthrax exosporiumによるヤツメウナギの免疫化後観察される、循環リンパ球のリンパ芽球様形質転換の反応を示さなかった。したがって、モデルタンパク質免疫原としてのBSAは、凝集形であれ、固相基質表面への塗布であれ、アジュバントと共に投与した場合でも、VLR-B抗体反応を誘発しなかった。

【0108】

ヤツメウナギは、哺乳類赤血球に反応し凝集性VLR-B抗体を生産する。赤血球凝集反応におけるVLR抗体の可能な役割を調べるために、マウス、またはヒトの赤血球のいずれかによって、ヤツメウナギを腹腔内注入によって免疫化した。以前の報告の通り、抗原用量依存性で、ドナー赤血球免疫原に対して特異的な赤血球凝集反応が誘発された (図14A、表3)。

【0109】

【表3】

表3 ヒトまたはマウス赤血球に対する凝集反応の特異性

赤血球免疫原 ^a	赤血球凝集力価の逆数	
	ヒト	マウス
ヒト 1	400	0
ヒト 2	800	0
ヒト 3	1600	0
マウス 1	0	3200
マウス 2	0	1600
マウス 3	0	400

【0110】

a 0 および 14 日目に、3匹のヤツメウナギ幼生を、 1×10^7 個のヒトまたはマウス赤血球によって免疫化し、血漿サンプルを28日目に取得した。

【0111】

赤血球凝集が、VLR-B抗体によって仲介されるかどうかを決定するために、抗-VLR-B抗体を塗布したセファロースビーズを用いて、血漿サンプルからVLR-B抗体を除去した。抗-VLR-B塗布ビーズによる吸着は、大多数の凝集素を取り除くが、一方、無関係の特異性を持つコントロール抗体によって塗布されたビーズは、目立った作用を持たないことが判明した (図14B)。これらの所見は、赤血球免疫化ヤツメウナギによって作製される血球凝集素は、VLR-B抗体であることを示す。

【0112】

O血液型赤血球に対するVLR-B抗体の、炭水化物H抗原特異性。以前の研究から

、ヒトの、O血液型赤血球によって免疫化されたヤツメウナギによって作製される凝集素は、この血液型を決める、三糖の細胞表面H抗原に対して特異的であることが示唆された。VLR-B抗体の、H抗原特異性を調べるために、H三糖を生成する、 $\alpha 1, 2$ -フコシルトランスフェラーゼ酵素によって安定にトランスフェクトされるCHO細胞を用いた。O血液型赤血球によって免疫化された動物は、三糖H抗原を発現するCHO細胞を認識するVLR-B抗体を生産することが示された(図14C)。一方、それらの動物は、ベクターのみによってトランスフェクトされたコントロールCHO細胞を認識するVLR抗体を生産しなかった。さらに、H抗原陽性CHO細胞による、免疫血漿サンプルの吸着は、VLR-B抗体プールの血漿レベルに対し目立った影響を及ぼすことなく、凝集性VLR抗体を除去した(図14D)。これらの所見から、H三糖決定基が、O血液型赤血球に対するヤツメウナギの反応の、主要抗原決定基であることが確かめられた。これらの所見はさらに、この体液性反応は、主に、VLR-B抗体の生産によるものであることを示し、かつ、この抗原に対する反応として生産されたVLR-B抗体は、循環性VLR-B抗体プールの僅少部分しか含まないことを明らかにする。

10

20

30

40

50

【0113】

H抗原特異的VLR-B抗体は、ジスルフィド結合マルチマーである。VLR-B抗体の、赤血球凝集能力から、その多価性が推測された。これらの抗体の組成を調べるため、H抗原特異性を有する、組み換えVLR-B抗体を生成した。このために、免疫化動物の血液リンパ球から、VLR-cDNAライブラリーを調製し、個別VLR-Bクローンを、HEK 293T細胞にトランスフェクトした。トランスフェクト細胞を、抗原特異的VLR-Bの生産クローンについてスクリーニングすると、H抗原⁺CHO細胞とは反応するが、H抗原⁻CHO細胞とは反応しないVLR抗体を生産する、一クローンが特定された(図15A)。この組み換えVLR抗体による抗原結合は、あらかじめ可溶性H抗原とインキュベートすることによって抑制された。ウェスタンブロット分析から、このVLR抗体は、ジスルフィド結合によって一緒に連結される、複数の、個別の、 ~ 35 kDaのVLR-Bサブユニットによって構成される、大型の、 > 250 kDaのマルチマータンパク質であることが明らかになった(図15B)。

【0114】

炭疽菌VLR-B抗体反応の用量依存性および抗原特異性。本明細書に記載する通り、*Bacillus anthracis exosporium*によって免疫化したヤツメウナギは、孢子表面タンパク質BclAに対するVLR抗体を生産した。VLR-B抗体反応を惹起するために必要とされる抗原用量要求を定め、エпитープ特異性を決定するために、この反応を調べた。免疫原用量を増大させていくと、BclA表面タンパク質に対するVLR-B抗体について、より高い力価の生産がもたらされた(図16A)。

【0115】

炭疽菌免疫化マウスは、主に、BclAのC末端ドメイン(CTD)に対する抗体を作製するという所見に基づき、BclA-CTD決定基に対するヤツメウナギの反応を調べた。さらに、免疫化ヤツメウナギによって生産されるVLR-抗体は、BclA-CTDとは反応するが、コントロールタンパク質とは反応しないことが認められた(図16B)。さらに、VLR-B抗体反応は、主に、*B. anthracis*の非交差性抗原決定基を指向するようである。なぜなら、近縁の*B. thuringiensis*および*B. cereus*孢子に対しては、ごく僅かの反応性しか検出されなかったからである(図16C)。注目すべきことに、*B. cereus*のBclAタンパク質は、*B. anthracis*のBclAタンパク質とは、そのアミノ酸の僅か10%において異なるに過ぎない。これらの所見は、*anthrax exosporium*に対するヤツメウナギVLRの反応は、用量依存性で、きわめて特異的であり、かつ、主に、BclA表面タンパク質のCTD抗原決定基を焦点的に指向することを示す。

【0116】

ヤツメウナギにおけるVLR-B⁺リンパ球の組織分布。免疫化に対する、ヤツメウナギ体液反応の細胞基盤を調べるために、VLR-Bの不変ストーク領域に対して特異的

な2種類の抗体を用い、免疫組織化学的染色によってVLR-B⁺細胞の組織分布を調べた。6C3抗VLR-Bモノクローナル抗体を用いると、二つの造血器官である腎臓および盲腸の外、鰓にもVLR-B⁺細胞の点状局在が観察された。VLR-B⁺リンパ球は、幼生のフィルター摂食段階では、最終鰓切痕から始まり総排泄腔で終わる、真っ直ぐな管である小腸の上皮では検出されなかった。その長さの大部分において、小腸は、血液で満たされた洞を縁取る造血系統細胞によって主に構成される盲腸の上に、引き伸ばされた馬蹄状に折りたたまれる。VLR-B⁺リンパ球は、盲腸全体に分散することが認められるが、このVLR-B⁺リンパ球は、他の組織のVLR-B⁺リンパ球よりも、より大きな形態的多様性、および染色強度の変動性を示した(図17A)。腎臓では、小型のVLR-B⁺リンパ球が、他の造血細胞と互いに混じりあい、これらは、腎臓体長のほとんどに亘って広がり、ヤツメウナギ小腸の側壁および背側壁に接する。VLR-B⁺リンパ球は、腎臓のもっとも腹側の面においてもっとも多量であった。陽性染色細胞の密度という点では、鰓がVLR-B⁺リンパ球の最大の蓄積を示した。VLR-B⁺細胞は、鰓基部に局在する血管内に特に豊富であった。これらの血管内リンパ球の免疫蛍光染色パターンは、広汎な細胞内VLR-Bの蓄積を示唆した(図17B)。さらに、組織切片におけるVLR-B染色は、循環VLR-B抗体の豊富なプールを反映して、血管および洞の内面にそって一貫して明白であったが、血管外の細胞間空間では明白ではなかった。

10

【0117】

血液、腎臓、および盲腸から調製したばかりの生細胞懸濁液を染色することによって、VLR-B担持細胞の分布をさらに調べた。免疫蛍光フローサイトメトリーによってリンパ球様細胞を調べるために光散乱特性を用いると、「リンパ球ゲート」における血球の15-35%がVLR-B⁺であり、腎臓細胞懸濁液では、約50%がVLR-B⁺であり、盲腸では、15-30%がVLR-B⁺であった(図17C)。血液および腎臓のVLR-B⁺細胞は、一貫して、比較的高レベルのVLR-Bを発現するが、一方、盲腸のVLR-B⁺細胞は、細胞表面VLR-Bについて、より大きなバラツキ、およびより低いレベルを示した。

20

【0118】

VLR-B⁺リンパ球形態および遺伝子発現プロファイル。「リンパ球ゲート」内のVLR-B⁺細胞、およびVLR-B⁻細胞を、蛍光活性細胞ソーティングによって単離し、透過型電子顕微鏡検査によって調べた。これらの実験におけるVLR-B⁺細胞は、周辺部に集中する圧縮クロマチンであって、比較的小数の、識別可能な小器官、例えば、ミトコンドリアを含む、狭い、細胞原形質辺縁によって囲まれるクロマチンを含む、比較的大型の核を含む点で、有顎脊椎動物の小型リンパ球に近似する。対照的に、「リンパ球ゲート」におけるVLR-B⁻細胞の大多数は、血小板状形態、すなわち、深い核裂溝および比較的多量の細胞原形質で特徴づけられる形態を示した(図17D)。

30

【0119】

さらに、単離されたVLR-B⁺およびVLR-B⁻細胞集団を用いて、それらの遺伝子発現プロファイルを比較した。この分析では、精製VLR-B⁺細胞は、VLR-B転写物を発現するが、VLR-A転写物は発現しないことが判明した。逆に、「リンパ球ゲート」におけるVLR-B⁻細胞は、VLR-A転写物を発現したが、VLR-B転写物は発現しなかった(図18)。ヤツメウナギの免疫細胞機能と連結する可能性を有すると、近年知られるようになった遺伝子の発現を比較してみると、CD45およびGATAは、VLR-B⁻集団において比較的高レベルで発現することが認められたが、一方、TCR様、CD4様、およびTNFR14遺伝子は、VLR-B⁺リンパ球において比較的高レベルで発現された。これらの結果は、VLR-B⁺細胞、およびVLR-A⁺細胞は、異なるリンパ球集団を代表することを示し、リンパ系細胞は、TCR様およびCD4様遺伝子を優先的に発現することを確認し、かつ、TNFR14遺伝子も、リンパ球によって優先的に発現される可能性のあることを示唆する。

40

【0120】

インビボ抗原刺激に対するVLR-B⁺リンパ球の反応。 抗原およびフィトマイトジ

50

エンのカクテルによってヤツメウナギを免疫化したところ、広汎なリンパ芽球様反応が誘発されることが示された。この種のリンパ芽球様反応は、大用量 ($> 2 \mu\text{g}$) の *anthrax exosporium* をヤツメウナギ幼生の腹腔内に注入することによって再現された。これらの動物からの血球を、抗 VLR-B 抗体で染色すると、大型の、リンパ芽球様細胞の多くは、VLR-B⁺ であることが認められたが、反面、細胞表面 VLR-B のレベルは著明に低下した (図 19 B)。この結果から、十分な用量として与えられると、*anthrax exosporium* は、ヤツメウナギリンパ球のマイトジェンとして作動することが可能であることが示唆された。

【0121】

特異的抗原反応を細胞レベルで評価するために、*anthrax exosporium* による免疫化の前後において、抗原結合細胞の頻度を求めた。これらの実験では、抗原結合 VLR-B⁺ 細胞を検出するために、蛍光標識炭疽菌胞子を用いた。未処置動物では、VLR-B 担持細胞の、小さなサブ集団 (約 1%) が、*B. anthracis* または *B. cereus* 胞子に結合することが認められた一方、*B. anthracis exosporium* による免疫化後、*B. anthracis* 結合 VLR-B⁺ 細胞は、4 倍の増加が観察されたが (図 20 A および 20 B)、*B. cereus* 結合細胞の頻度は不変であった。

【0122】

抗原刺激に反応して VLR-B 抗体を分泌する細胞を特定するために、免疫化ヤツメウナギの細胞の、VLR-B⁺ サブ集団、および VLR-B⁻ サブ集団を、その光散乱特性に基づいて分離し、BclA-CTD 抗原に対する VLR-B 抗体の分泌能力に関して、ELISPOT アッセイによって、それらサブ集団を評価した。血液、腎臓、および盲腸から単離した細胞を 18 時間培養し、次いで、VLR-B 抗体分泌に関してそれら进行评估した。BclA-CTD 特異的抗体を分泌する細胞は、もっとも高い前方、側方光散乱特性を有する、VLR-B⁺ 細胞中にのみ認められた。これは、それらが、比較的大きな細胞形を有することを示す所見である (図 21 A)。大型の VLR-B 生産細胞を、透過型電子顕微鏡検査による評価のために単離すると、多数の小器官を含有する広い細胞原形質、および、粗面小胞体の拡張ネットワークを特徴とする、プラズマ細胞様形態を持つことが判明した (図 21 B)。*anthrax exosporium* に対する典型的反応では、第 1 回免疫化の 4 週後、VLR-B 抗体分泌細胞は、血液でも、腎臓でももっとも大量となるが、盲腸では比較的少なかった。これらの所見から、有効量の免疫原による免疫化は、抗原特異的リンパ球に作用して、該細胞の、リンパ芽球様形質転換、増殖、および、抗原特異的 VLR-B 抗体を分泌する、プラズマ様細胞への分化を誘発することが示された。

【0123】

実施例 5 ヤツメウナギは、ウイルス免疫化に反応して VLR-B 抗体を生産する。

【0124】

インフルエンザウイルスとして、 $50 \mu\text{l}$ の 2/3 PBS に希釈した、 $25 \mu\text{g}$ の、フォルマリン固定インフルエンザウイルスの腹腔内注入によってヤツメウナギを免疫化した。2 週後、動物に、同量の免疫原による二次注入を実施した。二次免疫化の 2 週後、血漿サンプルを収集し、反応性について試験した。

【0125】

PBS に希釈した、 $10 \mu\text{g/mL}$ の、フォルマリンで殺したインフルエンザウイルスをプレートにコートし、4 で一晩インキュベートして ELISA を実行した。コントロールとして、精製アデノウイルスを用いてプレートにコートした。次に、プレートを洗浄し、3% BSA でブロックした。抗 VLR-B モノクローナル抗体 ($4 \text{C}4$)、次いで、酵素接合体を備えた二次抗体を用いて、VLR-B 抗体の検出を実行した。

【0126】

ウイルスの中和活性は、血球凝集抑制アッセイおよびブランク中和アッセイによって調べた。

10

20

30

40

50

【 0 1 2 7 】

図 2 3 に示すように、インフルエンザウイルスによって免疫化されたヤツメウナギは、免疫原に対して特異的な V L R を生産する。

【 0 1 2 8 】

表 4 は、免疫化および未処置ヤツメウナギの血漿における、インフルエンザウイルス血球凝集の抑制および中和力価を示す。

【 0 1 2 9 】

【 表 4 】

表4	血球凝集抑制力価	中和化アッセイ力価
未処置1	<20	<20
未処置2	<20	<20
Flu 1	<20	<20
Flu 2	<20	40
Flu 3	40	40
Flu 4	40	40
Flu 5	160	160

10

20

【 0 1 3 0 】

H I V ウイルスとして、2 5 μ g 当量の H I V エンベロープ (E n v) タンパク質が投与されるように、ウイルス様粒子 (V L P) を腹腔内に注入した。この初回免疫化の 2 週後、動物にブースター免疫を行った。ブースター免疫化の 2 週後、血漿を収集し、H I V に対する V L R - B 抗体の反応性を、E L I S A アッセイによって調べた。

【 0 1 3 1 】

E L I S A のために、1 μ g / m L の、可溶性 g p 1 2 0 をプレートにコートし、4 で一晩インキュベートした。次に、プレートを洗浄し、3 % B S A でブロックした。抗 V L R - B モノクローナル抗体 (4 C 4) 、次いで、酵素接合体を備えた二次抗体を用いて、V L R の検出を実行した。

30

【 0 1 3 2 】

図 2 4 に示すように、H I V V L P によって免疫化されたヤツメウナギは、H I V エンベロープタンパク質 g p 1 2 0 サブユニットに対して特異的な、V L R - B 抗体を生産する。

【 0 1 3 3 】

これらの結果から、ホルマリン固定インフルエンザウイルスまたは H I V V L P による免疫化は、ヤツメウナギにおいて強力な免疫反応を誘発し、抗原特異的 V L R - B 抗体の生産をもたらすことが実証された。インフルエンザの場合、免疫化動物から得られた血漿は、インビトロ実験において、生のインフルエンザウイルスによる赤血球の凝集およびプラーク形成を抑制した。V L R - B 抗体反応の標的である、H I V エンベロープタンパク質の g p 1 2 0 サブユニットは、C D 4 との相互作用を通じて、ウイルスの宿主細胞への侵入に与る。このため、大型 (4 0 0 k D a) の、マルチマー V L R - B 抗体の、H I V g p 1 2 0 との相互作用は、H I V エンベロープタンパク質の C D 4 との相互作用を阻止し、したがって、ウイルスの進入を防ぐと考えられる。

40

【 0 1 3 4 】

本明細書に記載される組成物および方法の範囲または精神から逸脱することなく、各種改変および変更を実行することが可能であることは、当業者には明白であろう。本明細書の考察、および本明細書に開示される組成物および方法の実地施行から、当業者には他の実施態様も明白となろう。

50

【 図 1 】

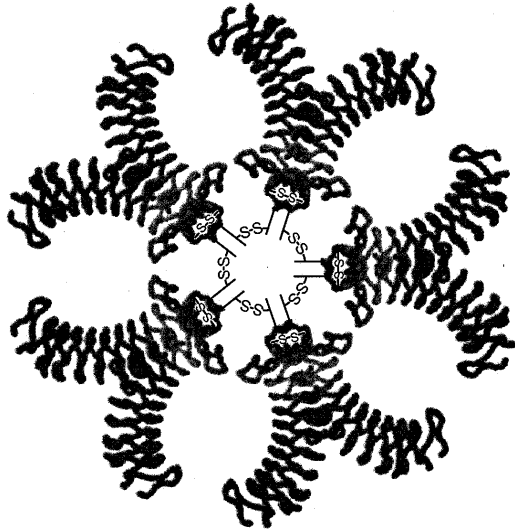


FIG. 1B

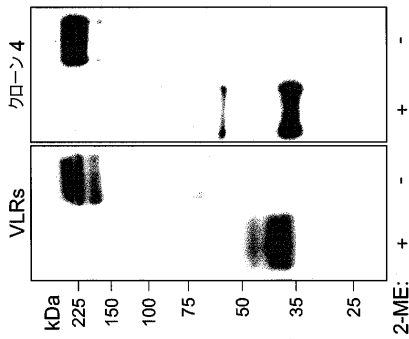


FIG. 1A

【 図 3 】

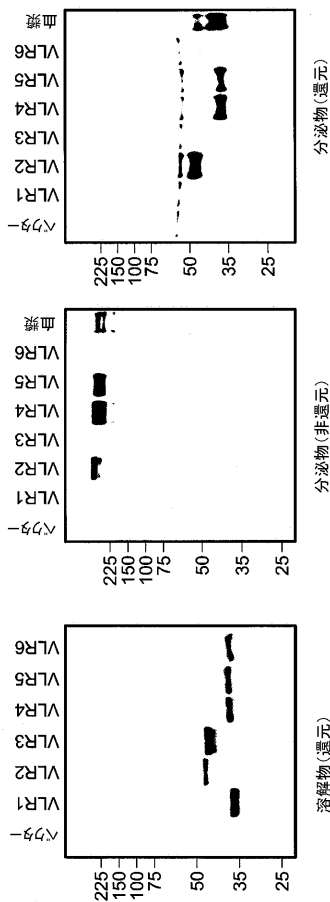


FIG. 3A

FIG. 3B

FIG. 3C

【 図 2 】

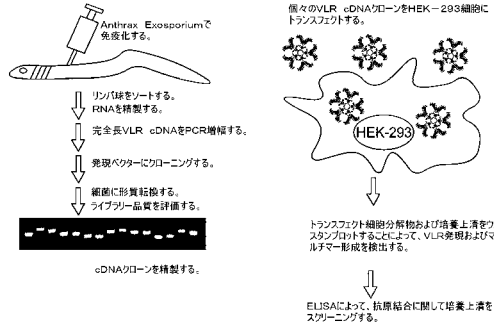


FIG. 2

【 図 4 】

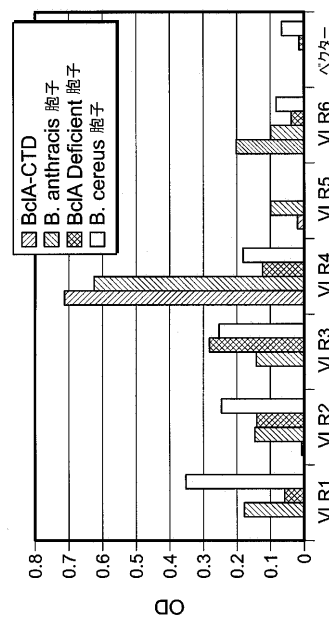


FIG. 4

【図 8 A】

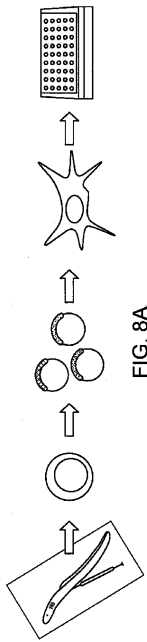


FIG. 8A

【図 8 B】

	免疫化	融合-選択	スクリーニング	限界希釈のローニング
mAb	4-8週	1-2週	1-2週	4-8週
mVLR-B	4-8週	1-2週	1-2週	1-2週

再形質転換-
トランスフェクション

スクリーニング

クロニング-
トランスフェクション

免疫化

FIG. 8B

【図 9 - 1】

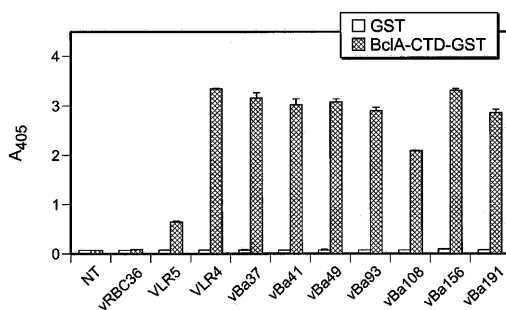


FIG. 9A

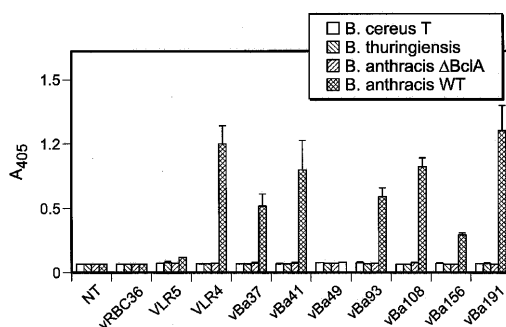


FIG. 9B

【図 9 - 2】

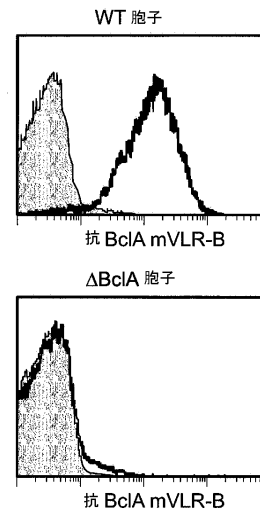


FIG. 9C

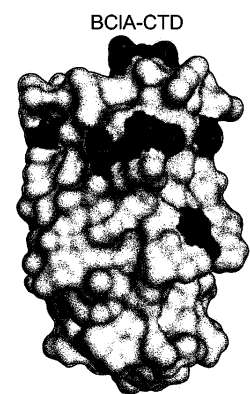


FIG. 9E

B. anthracis LGLPAGLYAFNSGGISLDLGLNPPVPFNTVGSQFG 35
 B. cereus T LGLPAGLYAFNSGGISLDLGLNPPVPFNTVGSQFG 35

B. anthracis TAISQLDADTFVISEETGFYKITVITATASVLGG 70
 B. cereus T TAISQLDADTFVISEETGFYKITVITATASVLGG 70

B. anthracis LTIQVNGVVPVGTGSLISLGAPIVQAITQITTT 105
 B. cereus T LTIQVNGVVPVGTGSLISLGAPIVQAITQITTT 105

B. anthracis PSLVEVIVTGLGLSLALGTSASIIIEKVA 134
 B. cereus T PSLVEVIVTGLGLSLALGTSASIIIEKVA 134

FIG. 9D

【図 10】

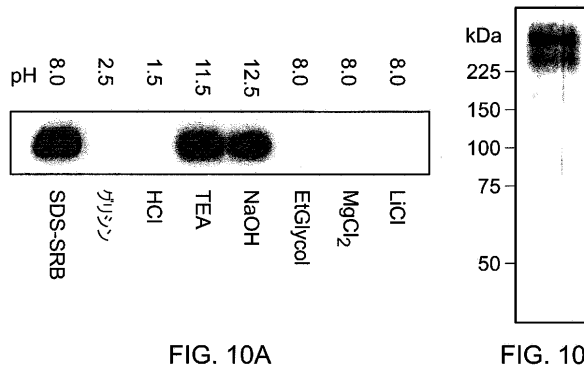


FIG. 10A

【図 11 - 1】

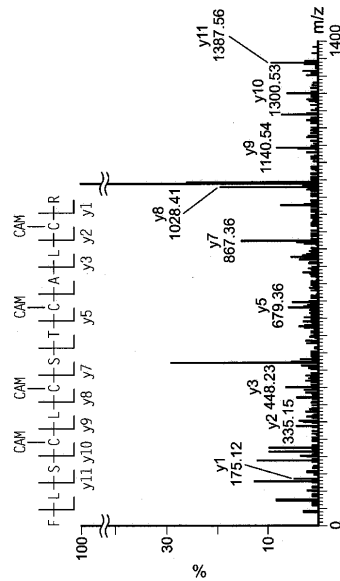


FIG. 11B

FIG. 11A

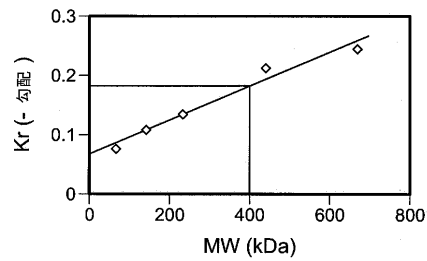


FIG. 10C

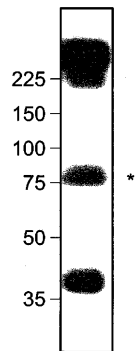


FIG. 10D

【図 11 - 2】

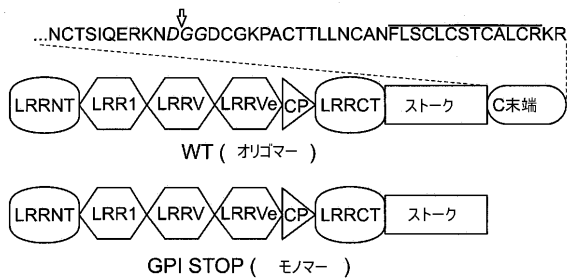


FIG. 11C

【図 12 A】

	<	LRRNT	>	LRR1
vBA41	CPSQCSCSGTD	WCHERRLASVPAEIPITTTKILRLV1		
vBA191	CPSQCSCSGTD	WCHERRLASVPAEIPITTTKILRLV1		
VL4	CPSQCSCSGTIT	WCHERRLASVPAEIPITTTKILRLV1		
VL5	CPSQCSCSGTIL	WCHERRLASVPAEIPITTTKILRLV1		

	<	LRRV	>	CP
vBA41	NOITKLEPGVFHSLTALTS	ELGQNLALTALPAGIFDK		
vBA191	NOITKLEPGVFDSLTLQTYL	ELAVNQLALTALPVGVDN		
VL4	NOITKLEPGVFDSLTLQTYL	ELAVNQLALTALPVGVDN		
VL5	NKTKLEPGVFDSLTLQTYL	ELAVNQLALTALPVGVDN		

	LRRVe	>	CP
vBA41	LTKLTALHINQLKSIIPRGAFDNLKSLTHIMLFNN		
vBA191	LTQLSLINHHINQLKNIIPRGAFDNLKSLTHIMLFNN		
VL4	LTKLTALHINQLKSIIPMGVFDNLKSLTHIMLFNN		
VL5	LTKLTALHINQLKSIIPRGAFDNLKSLTHIMLFNN		

FIG. 12A

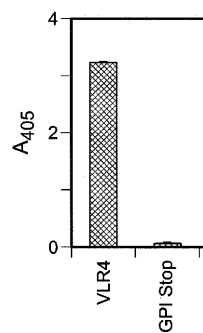


FIG. 11D

【図 1 2 B】

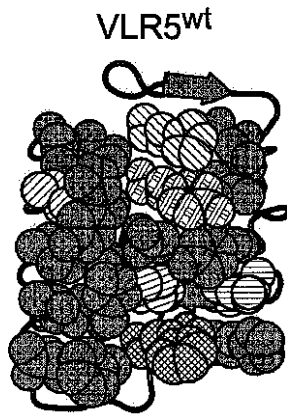


FIG. 12B

【図 1 3】

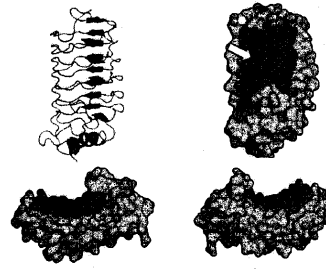


FIG. 13

【図 1 4 A】

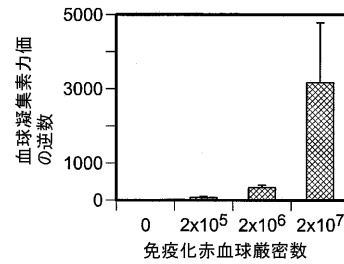


FIG. 14A

【図 1 2 C】

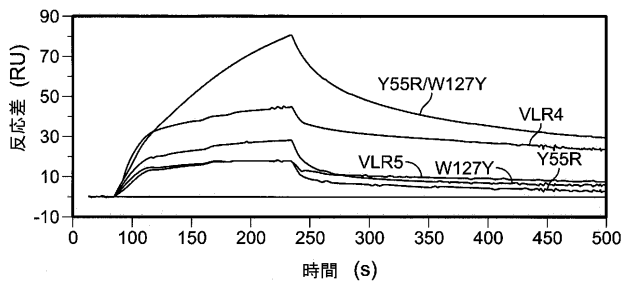


FIG. 12C

【図 1 4 B】

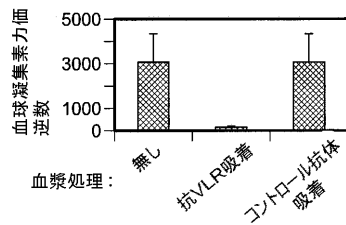


FIG. 14B

【図 1 4 D】

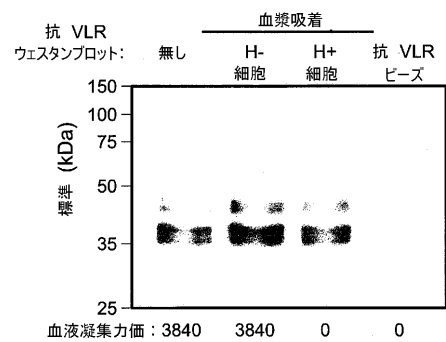


FIG. 14D

【図 1 4 C】

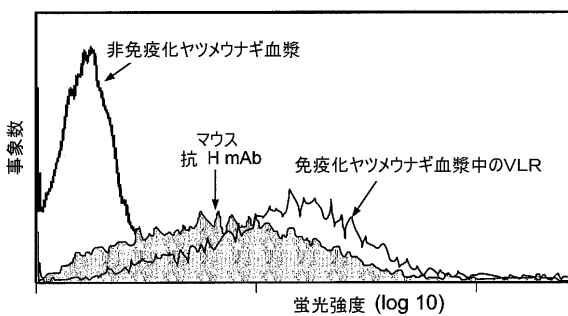


FIG. 14C

【図 1 5】

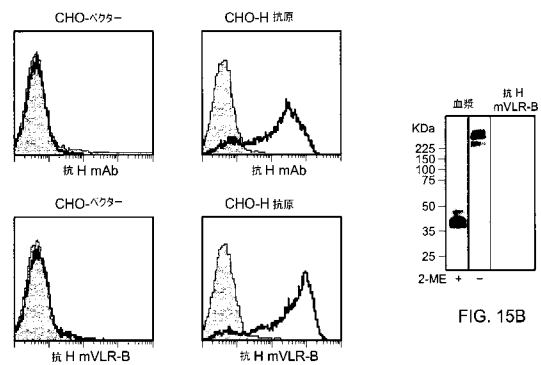


FIG. 15A

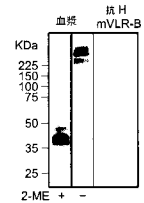


FIG. 15B

【図 16】

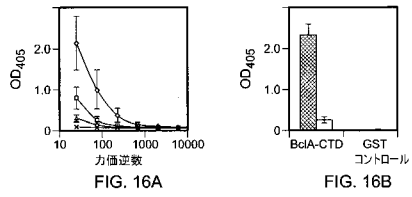


FIG. 16A

FIG. 16B

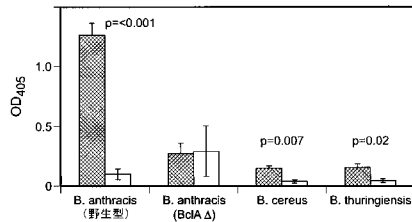


FIG. 16C

【図 17 A】

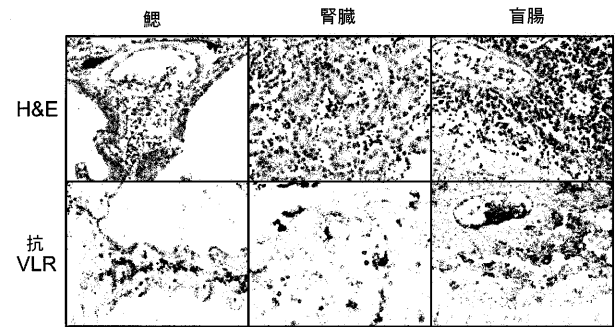


FIG. 17A

【図 17 B】

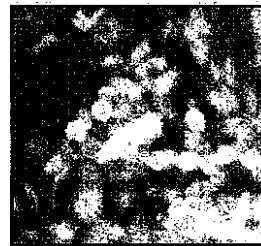


FIG. 17B

【図 17 C】

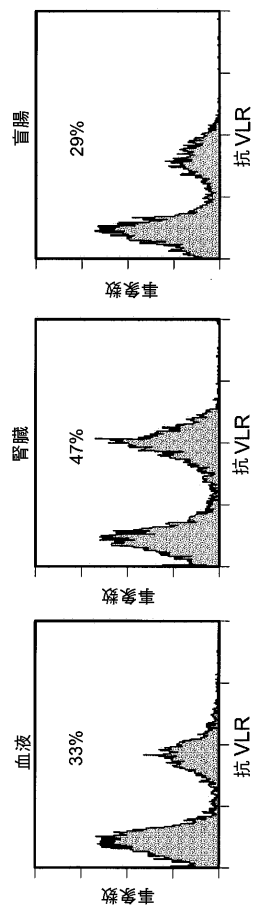


FIG. 17C

【図 17 D】

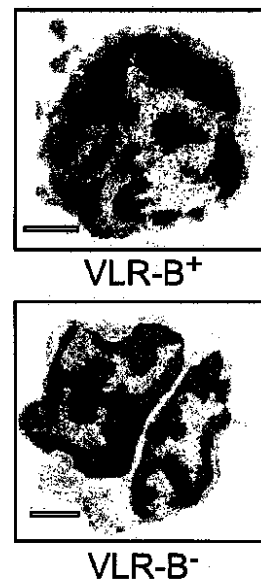
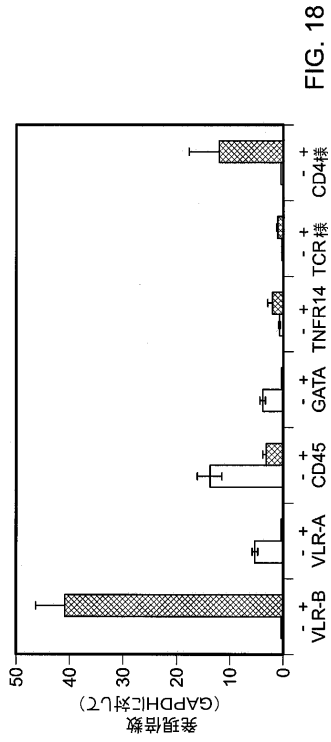


FIG. 17D

【図 18】



【図 19】

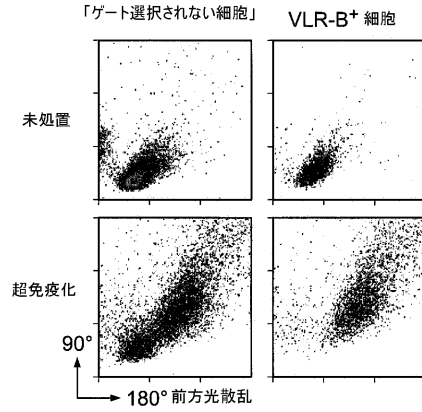


FIG. 19A

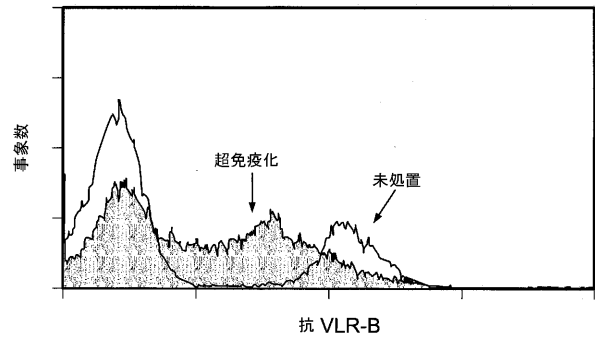


FIG. 19B

【図 20】

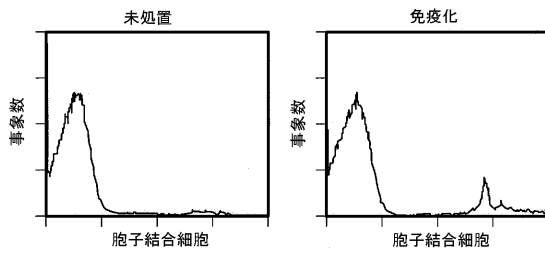


FIG. 20A

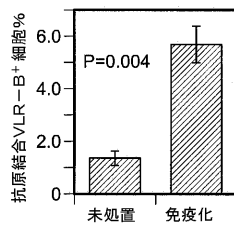


FIG. 20B

【図 21】

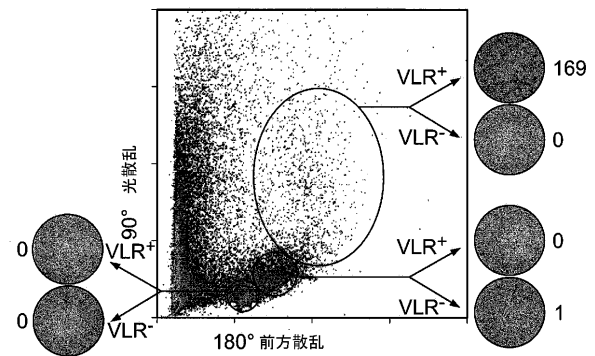
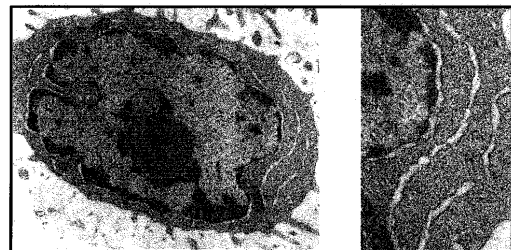


FIG. 21A



【図 2 2】

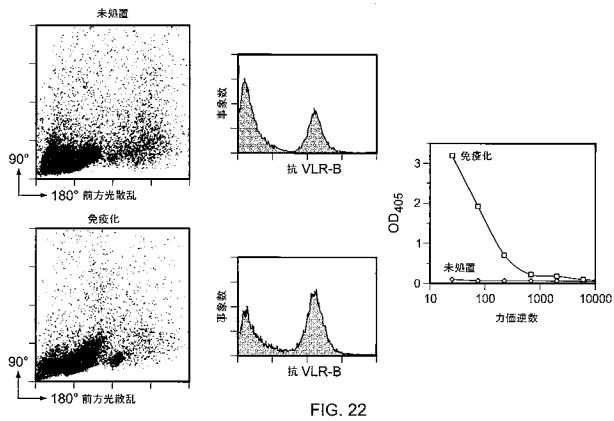


FIG. 22

【図 2 3】

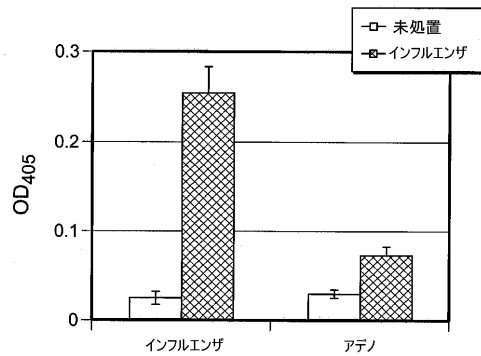


FIG. 23

【図 2 4】

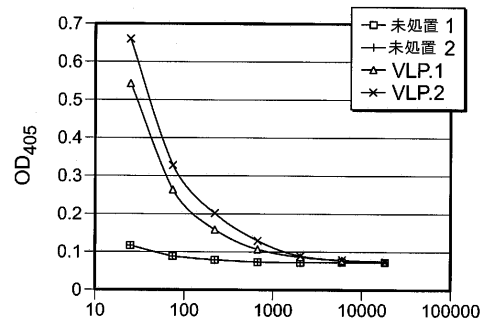


FIG. 24

【配列表】

2009545322000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US2007/074620
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
C07K 14/00(2006.01)i		
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) IPC 8 C07K 14/00, C12N 15/12, A61K 67/00		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean Utility Models and Applications for Utility Models since 1975 Japanese Utility Models and Applications for Utility Models since 1975		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) eKIPASS, WPI, USPTO, PAJ, NCBI, CAPLUS(STN), INSPECT "variable lymphocyte receptor, antigen specific, monoclonal, antigen, MHC, clone, transfection, polypeptide, culture, rearrangement, receptor, immunoglobulin, etc."		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Science. Vol.310(5756):1970-1973. (Alder, M.N., et al., US) 23 Dec 2005 "Diversity and function of adaptive immune receptors in a jawless vertebrate."	1-5,9-14,21,26,27,31-34,41,45-49
---	- see abstract; p.1970, the middle col., the 2nd paragraph ~ p.1971, the 1st paragraph; p.1972, the right col., the 2nd paragraph ~ p.1973; and Figs. 1 & 2	-----
A	- see Methods and Materials available as supporting material on Science Online.	7,8,18-20,28,29,39
A	Proc Natl Acad Sci U S A. Vol.102(26):9224-9229. (Pancer, Z., et al., US) 28 Jun 2005 "Variable lymphocyte receptors in hagfish."	1-5,7-14,18-21,26-29,31-34,39,41,45-49
A	- see abstract; and Figs. 3 & 4	
A	Cell. Vol.124(4):815-822. (Cooper, M.D., et al., US) 24 Feb 2006 "The evolution of adaptive immune systems."	1-5,7-14,18-21,26-29,31-34,39,41,45-49
A	- see abstract; p.817, the right col., the 2nd paragraph ~ p.819, the right col., the 1st paragraph; and Fig.2	
A	Trends Immunol. Vol.25(12):640-644. (Flajnik, M.F., US) Dec 2004 "Evolution of innate and adaptive immunity: can we draw a line?"	1-5,7-14,18-21,26-29,31-34,39,41,45-49
A	- see the whole document	
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ 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 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 08 JANUARY 2008 (08.01.2008)		Date of mailing of the international search report 09 JANUARY 2008 (09.01.2008)
Name and mailing address of the ISA/KR  Korean Intellectual Property Office 920 Dunsan-dong, Seo-gu, Daejeon 302-701, Republic of Korea Facsimile No. 82-42-472-7140		Authorized officer SHIN, Weon Hye Telephone No. 82-42-481-5591 

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2007/074620

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Trends Immunol. Vol.25(2):105-111. (Kasahara, M., et al., JP) Feb 2004 "On the origins of the adaptive immune system: novel insights from invertebrates and cold-blooded vertebrates." - see the whole document	1-5,7-14,18-21,26-29, 31-34,39,41,45-49
A	Semin Immunol. Vol.16(4):215-226. (Eason, D.D., et al., US) Aug 2004 "Mechanisms of antigen receptor evolution." - see the whole document	1-5,7-14,18-21,26-29, 31-34,39,41,45-49
A	Nat Rev Immunol. Vol.5(11):866-879. (Litman, G.W., et al., US) Nov 2005 "Reconstructing immune phylogeny: new perspectives." - see the whole document	1-5,7-14,18-21,26-29, 31-34,39,41,45-49
A	US 6903201 B2 (Padigaru, M., US) 07 Jun 2005 - see the whole document	1-5,7-14,18-21,26-29, 31-34,39,41,45-49
A	US 6521448 B1 (Edge, A.S.B., et al., US) 18 Feb 2003 - see the whole document	1-5,7-14,18-21,26-29, 31-34,39,41,45-49

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2007/074620

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.: 30 & 40
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 30 & 40 are directed to a method of reducing pathogenicity comprising administering to the subject the antigen specific polypeptide. Said Method, therefore, falls into the category of methods for treatment of the human body or animal body by surgery or therapy as well as diagnostic methods. [Article 17(2)(a)(i), Rule 39.1(iv) PCT]
2. ☒ Claims Nos.: 6,15-17,22-25,35-38 & 42-44
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:
Claims 6,15-17,22-25,35-38 & 42-44 are directed or referred to an antigen specific polypeptide without limiting the sequence and are considered too broad and so inadequately supported by the description that no meaningful search could be made.
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:

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 fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
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.:
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

Information on patent family members

International application No.

PCT/US2007/074620

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 6903201 B2	07.06.2005	CA 2433782 A1	11.07.2002
		EP 01383893 A2	28.01.2004
		JP 2005509400 T2	14.04.2005
		US 2004052806 A1	18.03.2004
		US 2006009634 A1	12.01.2006
		WO 02053742 A2	11.07.2002
US 6521448 B1	18.02.2003	AU 9107398 A1	08.03.1999
		CA 2301169 A1	25.02.1999
		EP 01007675 A1	14.06.2000
		US 6521448 B1	18.02.2003
		WO 9909167 A1	25.02.1999

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	1/19	(2006.01)	C 1 2 N	1/19
C 1 2 N	1/21	(2006.01)	C 1 2 N	1/21
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N	5/00
C 0 7 K	16/00	(2006.01)	C 0 7 K	16/00
A 6 1 K	39/00	(2006.01)	A 6 1 K	39/00
A 6 1 P	31/12	(2006.01)	A 6 1 P	31/12
A 6 1 P	31/18	(2006.01)	A 6 1 P	31/18
A 6 1 P	31/16	(2006.01)	A 6 1 P	31/16
G 0 1 N	33/53	(2006.01)	G 0 1 N	33/53
G 0 1 N	33/569	(2006.01)	G 0 1 N	33/569
C 1 2 P	21/08	(2006.01)	C 1 2 P	21/08

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, 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, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(72)発明者 クーパー, マックス ディー.

アメリカ合衆国 アラバマ 3 5 2 1 3, バーミンガム, カーライル ロード 3 2 2 8

(72)発明者 ヘリン, ブラントリー アール.

アメリカ合衆国 アラバマ 3 5 2 3 3, バーミンガム, 19ティールエイチ ストリート サウス 4 0 1, アpartment 4 1 8

(72)発明者 アルダー, マシュー エヌ.

アメリカ合衆国 アラバマ 3 5 2 1 0, バーミンガム, シーニック ビュー ドライブ 5 0 0 1

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 AA13 BA41 BA80 CA04 CA07 DA05 EA04 GA11

HA03

4B064 AG27 CA10 CA20 CE12 DA13

4B065 AA01X AA57X AA89X AA90X AA90Y AB01 AC14 BA02 CA24 CA44

CA46

4C085 AA03 CC21 DD62

4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 CA52 DA76 DA86 EA29 EA50

EA52 FA72 FA74 GA26

专利名称(译)	与具有确定抗原特异性的可溶性单克隆可变淋巴细胞受体相关的方法和组		
公开(公告)号	JP2009545322A	公开(公告)日	2009-12-24
申请号	JP2009522978	申请日	2007-07-27
[标]申请(专利权)人(译)	UAB研究基金会		
申请(专利权)人(译)	该Yuebi研究基金会		
[标]发明人	クーパーマックスディー ヘリンブランドリーアール アルダーマシューエヌ		
发明人	クーパー, マックス ディー. ヘリン, ブランドリー アール. アルダー, マシュー エヌ.		
IPC分类号	C12N15/09 C12P21/02 C07K19/00 C07K14/46 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C07K16/00 A61K39/00 A61P31/12 A61P31/18 A61P31/16 G01N33/53 G01N33/569 C12P21/08		
CPC分类号	C07K16/1278 C07K16/1018 C07K16/1063 C07K16/34 C07K2317/14 C07K2317/20 C07K2317/33 C07K2317/35 C07K2317/76		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C12P21/02.C C07K19/00 C07K14/46 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/00.A C07K16/00 A61K39/00.H A61P31/12 A61P31/18 A61P31/16 G01N33/53.K G01N33/569.L C12P21/08		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/AA13 4B024/BA41 4B024/BA80 4B024/CA04 4B024/CA07 4B024/DA05 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/HA03 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CE12 4B064/DA13 4B065/AA01X 4B065/AA57X 4B065/AA89X 4B065/AA90X 4B065/AA90Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA44 4B065/CA46 4C085/AA03 4C085/CC21 4C085/DD62 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA41 4H045/CA52 4H045/DA76 4H045/DA86 4H045/EA29 4H045/EA50 4H045/EA52 4H045/FA72 4H045/FA74 4H045/GA26		
代理人(译)	夏木森下		
优先权	60/835033 2006-08-02 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

公开了与可变淋巴细胞受体 (VLR) 相关的组合物和方法。更具体地，公开了多种抗原特异性多肽，包括可溶性，单克隆和多价形式，以及使用该多肽的方法，结合抗原特异性多肽的抗体，以及编码该多肽的核酸，载体和表达系统。。特别公开了选择性结合病原体 (如炭疽) 和碳水化合物 (如血型决定簇) 的抗原特异性多肽。

