

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6873119号
(P6873119)

(45) 発行日 令和3年5月19日(2021.5.19)

(24) 登録日 令和3年4月22日(2021.4.22)

(51) Int.Cl.	F 1
C 12 N 15/19	(2006.01)
C 12 N 15/62	(2006.01)
C 12 N 15/63	(2006.01)
C 07 K 16/00	(2006.01)
C 07 K 19/00	(2006.01)
	C 12 N 15/19 Z N A
	C 12 N 15/62 Z
	C 12 N 15/63 Z
	C 07 K 16/00
	C 07 K 19/00

請求項の数 15 (全 41 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2018-521291 (P2018-521291)
(86) (22) 出願日	平成28年10月24日 (2016.10.24)
(65) 公表番号	特表2018-533948 (P2018-533948A)
(43) 公表日	平成30年11月22日 (2018.11.22)
(86) 國際出願番号	PCT/EP2016/075536
(87) 國際公開番号	W02017/068180
(87) 國際公開日	平成29年4月27日 (2017.4.27)
審査請求日	令和1年10月24日 (2019.10.24)
(31) 優先権主張番号	62/245,943
(32) 優先日	平成27年10月23日 (2015.10.23)
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国(US)

(73) 特許権者	514322124 アポジエニックス アーゲー ドイツ連邦共和国 69120 ハイデル ベルク イム ノイエンハイマー フェル ト 584 1m Neuenheimer Feld 584, 69120 Heidelberg Germany
(74) 代理人	100108453 弁理士 村山 靖彦
(74) 代理人	100110364 弁理士 実広 信哉
(74) 代理人	100133400 弁理士 阿部 達彦

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】一本鎖LIGHT受容体アゴニストタンパク質

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

一本鎖融合ポリペプチドを含むLIGHT受容体アゴニストタンパク質であって、

- (i) 第1の可溶性LIGHTサイトカインドメイン、
- (ii) 第1のペプチドリンカー、
- (iii) 第2の可溶性LIGHTサイトカインドメイン、
- (iv) 第2のペプチドリンカー、並びに
- (v) 第3の可溶性LIGHTサイトカインドメイン、並びに
- (vi) 配列番号16及び19~24からなる群から選択されるヒンジリンカー、並びに
- (vii) 抗体Fc断片を含み、

抗体Fc断片(vii)が配列番号13で示されるアミノ酸配列又は配列番号13のアミノ酸1~217からなり、

抗体Fc断片(vii)がヒンジリンカー(vi)を介して第3のLIGHTサイトカインドメイン(v)のC末端に融合しており、

可溶性LIGHTサイトカインドメイン(i)、(iii)及び(v)がストークを含まない、LIGHT受容体アゴニストタンパク質。

【請求項2】

ストークを含まない第2及び/又は第3の可溶性LIGHTサイトカインドメインが、アミノ酸配列変異を含む、請求項1に記載のLIGHT受容体アゴニストタンパク質。

【請求項3】

10

20

可溶性LIGHTサイトカインドメインのうちの少なくとも1つが、配列番号1のヒトLIGHTサイトカインのアミノ酸E91又はN93又はP94で開始するN末端配列を有する可溶性LIGHTサイトカインドメインであり、E91又はN93又はP94が中性アミノ酸で置き換えられている、又は置き換えられていない、請求項1又は2に記載のLIGHT受容体アゴニストタンパク質。

【請求項4】

可溶性LIGHTサイトカインドメインが配列番号1のアミノ酸V240で終止し、及び/又は可溶性LIGHTサイトカインドメインがN93、N102、E115、T116、Q117、L118、G119、L120、C154、R172、Y173、E175、E176、E178、C187、R228、D229の位置に若しくは前記位置の2つ以上に変異を含み、若しくは前記位置に変異を含まない、請求項3に記載のLIGHT受容体アゴニストタンパク質。 10

【請求項5】

第1及び第2のペプチドリンカー(ii)及び(iv)が、独立に、グリコシリ化されている、又はグリコシリ化されていないアスパラギン残基を含む、又は含まない、3~8個のアミノ酸の長さのアミノ酸の長さを有する、請求項1から4のいずれか一項に記載のLIGHT受容体アゴニストタンパク質。

【請求項6】

プロテアーゼ切断部位を含む、若しくは含まないN末端シグナルペプチドドメインを更に含む、並びに/又は、認識/精製ドメインを含む、若しくは含まない、及び/若しくは認識/精製ドメインに連結されている、若しくは連結されていないC末端要素を更に含む、請求項1から5のいずれか一項に記載のLIGHT受容体アゴニストタンパク質。 20

【請求項7】

配列番号15及び25~35のいずれかのアミノ酸配列を含む、請求項1から6のいずれか一項に記載のLIGHT受容体アゴニストタンパク質。

【請求項8】

それぞれが配列番号27、29、30、31、32、33、34、又は35で示されるアミノ酸配列を有する2つのポリペプチドを含む、請求項1から7のいずれか一項に記載のLIGHT受容体アゴニストタンパク質。

【請求項9】

配列番号27、29、30、及び32のN156、配列番号31のN156及びN312、並びに配列番号33、34、及び35のN156及びN311のリストから選択される1つ又は複数のNグリコシリ化アスパラギン残基を含む、請求項8に記載のLIGHT受容体アゴニストタンパク質。 30

【請求項10】

ポリペプチドが更に翻訳後修飾されている、請求項1から9のいずれか一項に記載のLIGHT受容体アゴニストタンパク質。

【請求項11】

請求項1~10のいずれか一項に記載のLIGHT受容体アゴニストタンパク質をコードする核酸分子。

【請求項12】

請求項11に記載の核酸分子を含む発現ベクター。

【請求項13】

請求項11に記載の核酸分子又は請求項12に記載のベクターで形質転換された又はトランスフェクトされた細胞又は非ヒト生命体。 40

【請求項14】

請求項1から10のいずれか一項に記載のLIGHT受容体アゴニストタンパク質、請求項11に記載の核酸分子、又は請求項12に記載のベクターを活性薬剤として含み、1つ若しくは複数の薬学的に許容される担体、希釈剤、賦形剤及び/若しくはアジュバントを更に含む、又は含まない、医薬組成物又は診断用組成物。

【請求項15】

LIGHTサイトカインの機能不全によって引き起こされる、これに関連する、及び/又はこれに付随する障害の治療において用いるための、請求項14に記載の医薬組成物。 50

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

本発明は、3つの可溶性LIGHTドメイン及びFc断片を含む特異的LIGHT受容体アゴニストタンパク質、LIGHT受容体アゴニストタンパク質をコードする核酸分子、並びにその使用を提供する。LIGHT受容体アゴニストタンパク質は実質的に非凝集性であり、治療用、診断用、及び/又は研究用途に好適である。

【背景技術】**【0002】**

TNFスーパーファミリー(TNFSF)サイトカインの三量体化は、効率的な受容体結合及び活性化に必要であることが知られている。しかし、TNFスーパーファミリーサイトカインの三量体複合体を組み換えモノマー単位から調製することは困難である。10

【0003】

WO01/49866及びWO02/09055は、TNFサイトカイン及び多量体化成分、特にC1qタンパク質ファミリー又はコレクチンからのタンパク質を含む組み換え融合タンパク質を開示している。しかしこれらの融合タンパク質の不利益な点は、三量体化ドメインが通常大きな分子量を有すること、及び/又は三量体化がかなり非効率であることである。

【0004】

Schneiderら(J Exp Med 187 (1989)、1205 ~ 1213頁)は、TNFサイトカインの三量体はN末端に位置する安定化モチーフによって安定化されていると記載している。CD95Lにおいては、受容体結合ドメイン三量体の安定化はおそらく細胞膜付近に位置するN末端アミノ酸ドメインによって引き起こされている。20

【0005】

Shiraishiら(Biochem Biophys Res Commun 322 (2004)、197 ~ 202頁)は、CD95Lの受容体結合ドメインはN末端に位置する人工の ヘリカルコイルドコイル(ロイシンジッパー)モチーフによって安定化されているであろうと記載している。しかし、ポリペプチド鎖の相互の配向、例えば平行又は逆平行配向は予測困難であることが見出された。更に、コイルドコイルジッパーモチーフにおけるヘプタッドリピートの最適な数を決定することは困難である。更に、コイルドコイル構造はpH及び/又はイオン強度が変化した後で高分子量の凝集物を形成する傾向がある。30

【0006】

WO01/25277は、細胞受容体の細胞外リガンド結合ドメインに結合する一本鎖オリゴマーポリペプチドに関連し、このポリペプチドは少なくとも3つの受容体結合部位を含み、その少なくとも1つは細胞受容体のリガンド結合ドメインに結合でき、少なくとも1つは細胞受容体のリガンド結合ドメインに効果的に結合できず、それにより一本鎖オリゴマーポリペプチドは受容体に結合することができるが、受容体を活性化することはできない。例えば、モノマーはTNFファミリー、特にTNF- のサイトカインリガンドから誘導される。

【0007】

WO2005/103077は、TNFファミリーリガンドメンバーの少なくとも3つのモノマー及びTNFリガンドファミリーメンバーのモノマーを互いに連結する少なくとも2つのペプチドリンクーを含む一本鎖融合ポリペプチドを開示している。しかし最近の実験によって、これらの一本鎖融合ポリペプチドは望ましくない凝集を示すことが示されている。40

【0008】

WO2010/010051は、3つの可溶性TNFファミリーサイトカイン及び少なくとも2つのペプチドリンクーを含む一本鎖融合ポリペプチドを開示している。記載された融合ポリペプチドは実質的に非凝集性である。

【先行技術文献】**【特許文献】****【0009】**

【特許文献1】WO01/4986650

【特許文献 2】 WO02/09055

【特許文献 3】 WO01/25277

【特許文献 4】 WO2005/103077

【特許文献 5】 WO2010/010051

【特許文献 6】 米国特許公開第20090311253A1号

【非特許文献】

【0010】

【非特許文献 1】 Schneiderら (J Exp Med 187 (1989)、 1205 ~ 1213頁)

【非特許文献 2】 Shiraishiら (Biochem Biophys Res Commun 322 (2004)、 197 ~ 202頁)

【非特許文献 3】 Pharmacology、4版、Elsevier、2013年

10

【非特許文献 4】 Sambrookら (1989年)、 Molecular Cloning, A Laboratory Manual、Cold Spring Harbor Press

【非特許文献 5】 Ausubelら (1989年)、 Current Protocols in Molecular Biology、John Wiley & Sons

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0011】

インビボにおけるFcガンマRに基づく架橋(Fc-gamma-R based crosslinking)に依存しない高い生物学的活性、高い安定性を示し、効率的な組み換え生産を可能にする新規なLIGHT受容体アゴニストに対する当技術におけるニーズが存在する。更に、ヒトLIGHTはインビボで少なくとも3つの相互作用パートナー、即ちLT-ベータ-R、DcR3及びHVEMを有しているので、当技術においてヒトLIGHT受容体選択的生物製剤を創出する技術を可能にすることへのニーズがある。

20

【課題を解決するための手段】

【0012】

本発明は、インビボにおけるLIGHT受容体:LIGHT相互作用を模倣し、アゴニスト性モノクローナル抗体と比較して低いタンパク分解性及び短いインビボ半減期を示す特異的LIGHT受容体アゴニストタンパク質を提供する。

【0013】

本発明のLIGHT受容体アゴニストタンパク質は一般に、(i)第1の可溶性LIGHTサイトカイントメイン、(ii)第1のペプチドリンカー、(iii)第2の可溶性LIGHTドメイン、(iv)第2のペプチドリンカー、(v)第3の可溶性LIGHTドメイン、(vi)第3のペプチドリンカー(例えばヒンジリンカー)、及び(vii)抗体Fc断片を含む。

30

【0014】

1つの実施形態では、抗体Fc断片(vii)は第1のLIGHTドメイン(i)のN末端及び/又は第3のLIGHTドメイン(v)のC末端に位置している。別の実施形態では、抗体Fc断片は第3のLIGHTドメイン(v)のC末端に位置している。1つの実施形態では、ポリペプチドは実質的に非凝集性である。別の実施形態では、第2及び/又は第3の可溶性LIGHTドメインは、任意選択でアミノ酸配列変異を含む、N末端が短縮されたドメインである。

40

【0015】

1つの実施形態では、可溶性LIGHTドメインのうちの少なくとも1つ、特に可溶性LIGHTドメイン(iii)及び(v)のうちの少なくとも1つは、ヒトLIGHTのアミノ酸Glu91又はAsn93又はPro94で開始するN末端配列を有する可溶性LIGHTドメインであり、Glu91又はAsn93又はPro94は中性アミノ酸、例えばSer又はGlyで置き換えられていてもよい。別の実施形態では、可溶性LIGHTドメインのうちの少なくとも1つ、特に可溶性LIGHTドメイン(iii)及び(v)のうちの少なくとも1つは、(a)Asn93 ~ Ala95及び(b)(Gly/Ser)93 ~ Ala95から選択されるN末端配列を有する可溶性LIGHTドメインである。1つの実施形態では、可溶性LIGHTドメインはヒトLIGHTのアミノ酸Val240で終止し、及び/又は任意選択でN93、N102、E115、T116、Q117、L118、G119、L120、C154、R172、Y173、E175、E176、E178、C187、R228、D229の位置に1つ又は複数の変異を含む。1つの実施形態では、可溶性LIGHTドメイン(i)、(iii)及

50

び(v)は配列番号01のヒトLIGHTのアミノ酸Glu91～Val240を含む。

【0016】

1つの実施形態では、可溶性LIGHTドメインのうちの少なくとも1つ、特に少なくとも可溶性LIGHTドメイン(i)は、アミノ酸Glu91で開始するN末端配列を有する可溶性LIGHTドメインであり、Glu91はGlnで置き換えられていてもよい。

1つの実施形態では、第1及び第2のペプチドリンカー(ii)及び(iv)は、独立に、グリコシル化されていてもよいアスパラギン残基を任意選択で含む、3～8個のアミノ酸の長さ、特に3、4、5、6、7又は8個のアミノ酸の長さを有し、好ましくは、グリシン/セリンリンカーである。1つの実施形態では、第1及び第2のペプチドリンカー(ii)及び(iv)は配列番号2のアミノ酸配列からなる。別の実施形態では、ポリペプチドは、例えば配列番号17のN末端シグナルペプチドドメインを更に含む、プロテアーゼ切断部位を含んでもよい、並びに/又は、認識/精製ドメイン、例えば配列番号18のセリンリンカーに結合されたStrep-tagを含み及び/若しくはこれに連結されてもよいC末端要素を更に含む。

【0017】

1つの実施形態では、抗体Fc断片(vii)は、好ましくは配列番号16のヒンジリンカーを介して可溶性LIGHTドメイン(i)及び/又は(v)と融合している。別の実施形態では、抗体Fc断片(vii)は配列番号13又は14で示されるアミノ酸配列からなっている。

【0018】

1つの実施形態では、本発明の一本鎖融合ポリペプチドは配列番号15、及び25～32からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。

【0019】

1つの実施形態では、本発明は配列番号27で示されるアミノ酸配列をそれぞれ有する2つの一本鎖融合ポリペプチドの二量体を含むLIGHT受容体アゴニストタンパク質を提供する。1つの実施形態では、2つのポリペプチドは、各ポリペプチドの468、474、及び477位のシステイン残基の間に形成された3つの鎖間ジスルフィド結合によって共有結合で連結されている。

【0020】

1つの実施形態では、成熟ポリペプチド配列番号27、28、29、30及び32の156位のアスパラギン残基はNグリコシル化されている。

【0021】

別の実施形態では、ポリペプチド配列番号31の156位及び312位のアスパラギン残基は両方ともNグリコシル化されている。

【0022】

別の実施形態では、ポリペプチドは翻訳後に更に修飾されている。別の実施形態では、翻訳後修飾はE91QムテインのN末端グルタミンのピログルタメートへの修飾を含む。

【図面の簡単な説明】

【0023】

【図1】3つのLIGHTドメインI、II、III、可溶性LIGHTドメインを含む一本鎖融合ポリペプチドのドメイン構造を示す図である。

【図2】LIGHTの一般構造を表す概略図である。細胞膜、細胞内に位置するN末端、1.受容体結合ドメイン(RBD)の逆平行折り畳み、2.RBDと細胞膜との界面、3.プロテアーゼ切断部位。

【図3】追加のFab抗体断片を含む一本鎖融合ポリペプチドを示す図である。

【図4】3つのジスルフィド架橋を介してC末端で融合した2つのscFc融合ポリペプチドの二量体化を示す図である。

【図5】本発明の六価の一本鎖LIGHT受容体アゴニスト融合タンパク質の概略表現を示す図である。内部表面領域に存在するCH₂糖鎖(5)は通常、「オープンFcコンフォメーション遷移」の間、CH₂サブドメインをプロテアーゼから立体的に(2)遮蔽し、ヒンジ-鎖間ジスルフィド結合(4)は減少し、共有結合による鎖間リンクエージは破壊される。これにより、CH₂の解離と内部表面領域及び上側ヒンジのリジンK223(6)のプロテアーゼへの露出が可能

10

20

30

40

50

になる。CH3ドメイン(3)の相互親和性が高いために、「オープンステージ」における二量体結合は変化しないままである。(1)scLIGHT-RBD; (2)CH2ドメイン; (3)CH3ドメイン; (4)ヒンジ-システイン(左側:酸化されてジスルフィド架橋に、右側:遊離チオールを有する還元ステージ); (5)N297位(EU番号付け)に結合したCH2糖鎖; (6)上側ヒンジリジン(K223)【図6】Tosoh TSKゲルG3000SWxカラムを用いて1260 Infinity HPLCシステムで実施したプロテインA(A)及びプロテインB(B)の分析用サイズ排除クロマトグラフィーを示す図である。カラムには全体積20 μlで濃度0.94mg/ml(A)又は0.77mg/ml(B)のタンパク質をロードした。流量は0.5ml/分とした。16.239分(A)及び15.842分(B)に、単一の主ピークが観察される。

【発明を実施するための形態】

10

【0024】

本発明は、2つのペプチドリンカーによって連結された少なくとも3つの可溶性LIGHTドメイン、並びにN末端及び/又はC末端に抗体から誘導された二量体化ドメインを含む一本鎖融合ポリペプチドを提供する。本発明者らは二量体化ドメインによる2つの一本鎖融合ポリペプチドの二量体化によって、高い生物学的活性及び良好な安定性を提供する六価のLIGHT受容体アゴニストが得られることを発見した。

【0025】

好ましくは、一本鎖融合ポリペプチドは非凝集性である。「非凝集性」という用語は、製剤のモノマー含量が50%以上、好ましくは70%以上、より好ましくは90%以上であることを意味する。モノマー含量の凝集物含量に対する比は、サイズ排除クロマトグラフィー(SEC)を用いて凝集物の生成量を検討することによって決定できる。凝集に関する安定性は、異なった保存条件下、例えば4又は25で定義した期間、例えば2~3日から数日、数週間及び数か月の後、SECによって決定できる。融合タンパク質については、実質的に非凝集性と分類するためには、「モノマー」含量が4又は25の保存で数日、例えば10日、より好ましくは数週間、例えば2、3又は4週間、最も好ましくは数か月、例えば2又は3か月の期間の後で、上で定義した通りであることが好ましい。Fc融合タンパク質の場合の「モノマー」の定義に関して、2つのポリペプチド鎖の会合がFc部分によって促進され、得られた会合タンパク質の機能性単位が2つの鎖からなっている。Fc融合タンパク質の場合には、二量体化一本鎖融合ポリペプチドであるか否かに関わらず、この単位が「モノマー」と定義される。

20

【0026】

30

一本鎖融合ポリペプチドは、そのN末端及び/又はC末端に位置するさらなるドメインを含んでよい。さらなる融合ドメインの例は、例えばプロテアーゼ切断部位を含んでもよいN末端シグナルペプチドドメイン又は認識/精製ドメインを含み及び/又はこれに連結されているてもよいC末端要素である。好ましい実施形態によれば、融合ポリペプチドはリンカーを介して融合したStrep-tagをそのC末端に含む。短いセリンリンカーを含む例示的なStrep-tagを配列番号18に示す。

【0027】

本発明のLIGHT受容体アゴニストタンパク質は、LIGHTから誘導された3つの可溶性ドメインを含む。好ましくは、これらの可溶性ドメインはアレル多様体及び/又はその誘導体を含む哺乳類、特にヒトのLIGHTから誘導される。可溶性ドメインは、膜所在ドメインを含まない受容体結合ドメインを含むLIGHTの細胞外部分を含む。TNFスーパーファミリーの他のタンパク質と同様に、LIGHTは15~30アミノ酸のN末端部分、いわゆるストーク領域を介して膜に固定されている。ストーク領域は三量体化に寄与しており、細胞膜に対して一定の距離を提供している。しかし、ストーク領域は受容体結合ドメイン(RBD)の部分ではない。

40

【0028】

重要なことに、RBDはそのN末端及びC末端アミノ酸の特定の局在化によって特徴付けられる。前記アミノ酸は直接に隣接しており、三量体の軸に対して中央部に位置している。RBDの第1のN末端アミノ酸は、RBDのC末端アミノ酸と逆平行ベータストランドを形成して

50

いる(図2)。

【0029】

したがって、RBDの逆平行ベータストランドは細胞膜との界面を形成しており、このストランドはストーク領域のアミノ酸を介して細胞膜に連結され、その中に固定されている。LIGHT受容体アゴニストタンパク質の可溶性LIGHTドメインは、ストーク領域からのアミノ酸を何ら含まないLIGHTの受容体結合ドメインを含むことが極めて好ましい。そうでなければ、次の可溶性ドメインのN末端ストーク領域を補償するために可溶性ドメインの1つのC末端を次の可溶性ドメインのN末端に連結する長いリンカーが必要になり、それによって不安定性及び/又は凝集物の形成が生じることになる。

【0030】

そのような可溶性ドメインのさらなる利点は、RBDのN末端アミノ酸が抗薬剤抗体に接近できないことである。好ましくは、(i)第1の可溶性LIGHTサイトカインドメイン、(ii)第1のペプチドリンカー、(iii)第2の可溶性LIGHTドメイン、(iv)第2のペプチドリンカー、(v)第3の可溶性LIGHTドメインからなる一本鎖融合ポリペプチドは、その天然の対応物の三量体構成を模倣する順序付けられた構造を形成することができ、それにより、それぞれのLIGHT受容体のための少なくとも1つの機能性結合部位を含む。したがって、成分(i)~(v)を含む一本鎖融合ポリペプチドは、一本鎖LIGHT受容体結合ドメイン(scLIGHT-RBD)とも名付けられる。

【0031】

LIGHT受容体アゴニストタンパク質は、3つの機能性LIGHT受容体結合部位、即ちLIGHT受容体と複合体を形成し得るアミノ酸配列を含む。したがって、可溶性ドメインは対応するLIGHT受容体に結合することができる。1つの実施形態では、可溶性ドメインのうちの少なくとも1つは受容体を活性化することができ、それによりアポトーシス及び/又は増殖活性が影響される。さらなる実施形態では、可溶性ドメインの1つ又は複数が、受容体活性化能を有しないものとして選択される。

【0032】

可溶性LIGHTドメインは、配列番号1に示すように、ヒトLIGHTから誘導される。好ましくは、可溶性LIGHTドメインはヒトLIGHTから誘導され、特にアミノ酸91又は94から出発して、特に配列番号1のアミノ酸91~240又は94~240を含む。任意選択で、配列番号1のアミノ酸Glu91は、非荷電アミノ酸、例えばSer又はGlyで置き換えられていてもよく、又はグルタミンで置き換えられる。

【0033】

【表1】

Table 1:野生型ヒト LIGHT タンパク質の配列

配列番号	配列
1	MEESVVRPSVFVVDGQTDIPFTRLGRSHRRQSCSVARVGLGLLLLLMGAGLA VOGWFLQLQHWRILGEMVTRLPDGPAGSWEQLIQERRSHEVNPAAHLTGANSS LTGSGGPLLWETQLGLAFLRGLSYHDGALVVTKAGYYYIYSKVQLGGVG CPL GLASTITHGLYKRTPRYPEELELLVSQQSPCGRATSSSRVWWDSSFLGGVVH LEAGEEEVVVRVLDERLVRLRDGTRSYFGAFMV

【0034】

上に示したように、可溶性LIGHTドメインは配列番号1に示すように野生型配列を含んでもよい。しかし、これらの可溶性ドメインの1つ又は複数に変異、例えば可溶性ドメインの結合特性を変化させる(例えば増加させ又は減少させる)変異を導入することができることに注目されたい。1つの実施形態では、対応するサイトカイン受容体に結合できない可

10

20

30

40

50

溶性ドメインを選択することができる。

【0035】

本発明のさらなる実施形態では、可溶性LIGHTドメイン(i)はLIGHTの変異体又はその受容体結合ドメインを含み、それにより親和性が低下し、及び/又はLIGHT受容体の活性化が低下する。

【0036】

受容体結合及び/又は活性に影響するLIGHT-ムテイン

変異体は当業者に公知の任意の手法で生成させることができる。本明細書に述べるよう 10
に、置換はLIGHT、例えばヒトLIGHT(例えば配列番号1)、又はその受容体結合ドメインの少なくとも1つのアミノ酸に影響することがある。これに関し、好ましい置換は配列番号1のヒトLIGHTの以下のアミノ酸、即ちE115、T116、Q117、L118、G119、L120、R172、Y173、E175、E176、E178、R228、D229のうちの少なくとも1つに影響する。好ましい実施形態では、Y173はS、T、D、E、R又はFに変異している。

【0037】

ヒトLIGHTはインビボで少なくとも3つの異なった受容体/相互作用パートナー、即ちLT-ベータ-R、DcR3及びHVEMを有している。アミノ酸置換はLIGHT、例えばヒトLIGHTのLIGHT受容体結合又はLIGHT受容体誘起シグナリングに対する結合及び/又は活性に影響することがある。LIGHT受容体の結合及び/又は活性はプラスに、即ちより強く、より選択的に若しくはより特異的に、及び/又は受容体をより活性化させるように、影響されることがある。或いは、LIGHT受容体の結合又は活性はマイナスに、即ちより弱く、より非選択的に若しくはより非特異的結合に、及び/又は受容体があまり若しくは全く活性化されないように、影響されることがある。

したがって、1つの実施形態は本明細書に記載したLIGHT受容体アゴニストタンパク質であって、可溶性ドメインのうちの少なくとも1つが野生型LIGHTよりも少なくLIGHT受容体に結合し及び/又はこれを活性化するLIGHTの変異体又はその受容体結合ドメインを含む、LIGHT受容体アゴニストタンパク質である。

【0038】

本発明の一本鎖融合分子は3つの可溶性LIGHTドメイン、即ち成分(i)、(iii)及び(v)を含む。第2及び/又は第3の可溶性LIGHTドメインがアミノ酸配列の変異を含んでもよいN末端が短縮されたドメインである場合には、一本鎖LIGHT融合ポリペプチドの凝集に対する安定性が増大する。したがって、好ましくは第2及び第3の可溶性LIGHTドメインの両方は、N末端領域に、好ましくは可溶性LIGHTドメインのN末端の最初の5つのアミノ酸の中にアミノ酸配列変異を任意選択で含んでもよい、N末端が短縮されたドメインである。これらの変異は、中性アミノ酸、特にセリン又はグリシンによる塩基性アミノ酸の置き換えを含んでよい。

【0039】

これとは対照的に、第1の可溶性LIGHTドメインの選択はそれほど重要ではない。ここでは、全長のN末端配列を有する可溶性ドメインを用いてよい。しかし、第1の可溶性LIGHTドメインもN末端が短縮され、任意選択で変異した配列を有してよいことに注目されたい。

。

【0040】

本発明の更に好ましい実施形態では、可溶性LIGHTドメイン(i)、(iii)及び(v)は可溶性ヒトLIGHTドメインである。第1の可溶性LIGHTドメイン(i)は、天然の、短縮された、及び/又は変異した配列から選択してよい。したがって、第1の可溶性LIGHTドメイン(i)はヒトLIGHTのアミノ酸Glu91又はAla95から開始するN末端配列を有し、発現の間のピログルタメートの形成を可能にするためにGlu91は中性アミノ酸、例えばSer又はGly又はGlnによって置き換えられてもよい。第2及び第3の可溶性LIGHTドメイン(iii)及び(v)は、好ましくはヒトLIGHT(配列番号1)のアミノ酸Asn93又はPro94から開始する、短縮されたN末端配列を有し、Asn93は別のアミノ酸、例えばSer又はGlyで置き換えられてもよい。

【0041】

10

20

30

40

50

好ましくは、可溶性LIGHTドメイン(iii)及び(v)のN末端配列は、
(a)Asn93又はPro94

(b)(Gly/Ser)93

から選択される。

【0042】

可溶性LIGHTドメインは好ましくはヒトLIGHTのアミノ酸V240で終止する。ある実施形態では、LIGHTドメインは上記の内部変異を含んでよい。

【0043】

LIGHT受容体アゴニストタンパク質の成分(ii)及び(iv)は、それぞれ成分(i)と(iii)の間、又は成分(iii)と(v)の間に位置するペプチドリンカー要素である。可撓性のリンカー要素は3~8アミノ酸の長さ、特に3、4、5、6、7、又は8アミノ酸の長さを有する。リンカー要素は好ましくはグリシン/セリンリンカーであり、即ちペプチドリンカーは実質的にアミノ酸グリシン及びセリンからなる。可溶性サイトカインドメインがS又はGで開始する(N末端)場合には、リンカーはこのS又はGの前で終止する。

【0044】

リンカー(ii)及びリンカー(iv)は同じ長さである必要はないことに注目されたい。免疫原性の可能性を低減させるために、短いリンカーを用いることが好ましい。更に、短いリンカーは凝集物を形成する傾向が低減した一本鎖分子をもたらすことが見出された。一方、本明細書に開示したものより実質的に長いリンカーは不都合な凝集特性を示すことがある。

【0045】

所望であれば、リンカーはグリコシル化部位Asn-Xaa-Serを形成するアスパラギン残基を含んでよい。ある実施形態では、リンカーの1つ、例えばリンカー(ii)又はリンカー(iv)は、グリコシル化部位を含む。他の実施形態では、両方のリンカー(iv)がグリコシル化部位を含む。LIGHTアゴニストタンパク質の可溶性を増大させるため、及び/又は免疫原性の可能性を低減させるため、リンカー(ii)若しくはリンカー(iv)、又は両方がグリコシル化部位を含むことが好ましい。

【0046】

好ましいリンカー配列をTable 2(表2)に示す。好ましいリンカーはGSGSGNGS(配列番号2)である。別の好ましいリンカーはGSGS(配列番号11)である。

【0047】

10

20

30

【表2】

Table 2: リンカ一配列の例

配列番号	配列
2	GSGSGNGS
3	GSGSGSGS
4	GGSGSGSG
5	GGSGSG
6	GGSG
7	GGSGNGSG
8	GGNGSGSG
9	GGNGSG
10	GSGSGS
11	GSGS
12	GSG

10

20

30

【0048】

LIGHT受容体アゴニストタンパク質は、第1のLIGHTドメイン(i)のN末端及び/又は第3のLIGHTドメイン(v)のC末端に位置する抗体Fc断片ドメインを更に含む。好ましくは、抗体Fc断片ドメインは、インビボでFcガンマR受容体と相互作用する能力が低減している。好ましくは、抗体Fc断片ドメインは、配列番号13又は14で示されるアミノ酸配列を含むか、これからなる(Table 3(表3)参照)。配列番号13は野生型ヒトIGG1-Fcと比較してN297S変異を有しており、FcガンマR受容体と結合しない。配列番号14はグリコシル化(N297野生型)ヒトIGG1-Fcムテインであり、FcガンマR結合能が低減している。

【0049】

【表3】

Table 3:Fc 断片 ドメインの例

配列番号	配列	
13	PAPELLGGPSVFLPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYSSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	10
14	PAPPVAGPSVFLFPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	20

【0050】

グリコシル化部位の数及びインビボ安定性

グリコシル化部位の総数及び三次元における糖鎖の個別の場所はLIGHT受容体アゴニストタンパク質のインビボ安定性に影響する。更に、糖鎖の認識は末端サッカライドの局所的密度、糖鎖ツリーの分枝、及び糖鎖の互いの相対的な場所に依存する。

更に、部分的に分解した糖鎖はレクチンによって促進される機構によってLIGHT受容体アゴニストタンパク質のインビボ半減期を低下させる。グリコシル化部位の総数及び/又はそれらの分子表面上の相対的な位置を減少させることによって、得られる化合物ではこれらの機構が起こりにくくなり、半減期が増大する。好ましい実施形態では、タンパク質が接近できる表面に糖鎖パターンが接近することを避けるために、第1のリンカー(iii)はグリコシル化され、第2のリンカー(iv)はグリコシル化されない。好ましい実施形態では、配列番号2のリンカーと配列番号11のリンカーが結合されて1つのscLIGHT-RBDモジュールになる。

【0051】

Fc受容体に基づくインビボ架橋及びLIGHT受容体スーパークラスタリングに基づく毒性の可能性を避けるために、抗体CH2ドメイン糖鎖の除去が必要である。また、Fcによって促進されるADCC等の望ましくない機構が有毒事象をもたらすこともある。したがって、1つの実施形態では、本発明のLIGHT受容体アゴニストタンパク質におけるグリコシル化部位の総数は、CH2グリコシル化部位、特にNグリコシル化部位の除去によって減少し、これにより配列番号15のN297S等価変異を含むLIGHT受容体アゴニストタンパク質(プロテインA)(EU番号付けシステムによる)が非グリコシル化CH2ドメインを生成する。本発明の別の実施形態では、可溶性LIGHTドメイン(i)、(iii)及び(v)の1つ又は複数は、N102がアスパラギン酸、セリン又はグリシンに変換されてもよく、それによりLIGHT受容体アゴニスト融合タンパク質のグリコシル化部位の数が更に減少する。好ましい実施形態では、N102[D,S,G]変異は、本発明のアゴニストLIGHT受容体アゴニスト融合タンパク質の可溶性LIGHTドメイン(iii)及び(v)に限られる。

【0052】

CH2ドメイン不安定化は追加のヒンジシスティンによって補償される

内部表面領域に存在するCH2(重鎖定常ドメイン2)-グリコシル化は通常、「オープンFcコンフォメーション遷移」の間、サブドメインをプロテアーゼから遮蔽し、ヒンジ-鎖間

10

20

30

40

40

50

ジスルフィド結合は減少し、共有結合による鎖間リńケージは破壊される(図5)。これにより、CH₂の解離と内部表面領域のプロテアーゼへの露出が可能になる。配列番号15のN297S等価変異を有するFcドメインを含むLIGHT受容体アゴニストタンパク質(プロテインA)(EU番号付けシステムによる)は非グリコシル化CH₂ドメインを生成し、したがってプロテアーゼ消化の対象となりやすく、野生型のCH₂グリコシル化を有する等価構造よりも安定性が低い。これは、宿主細胞のプロテアーゼが存在し、長期にわたって構造に接近するUSP/DSP/保存の間の化合物の安定性に影響する。したがって、ある実施形態では、LIGHT受容体アゴニストはCH₂グリコシル化部位を有しないが、各ポリペプチド鎖のリンカー配列(例えばGSGSGNGS、配列番号2)中のグリコシル化部位を含む。

本発明の好ましい実施形態によれば、抗体Fc断片ドメインはヒンジ-リンカー要素を介して融合している。ヒンジ-リンカー要素は10~30アミノ酸の長さ、特に15~25アミノ酸の長さ、例えば22アミノ酸の長さを有する。「ヒンジ-リンカー」という用語は、ヒンジ-リンカー要素がドメインに結合して生物学的に活性なコンフォメーションを保持することができるために十分な長さを有する任意のリンカーを含む。ヒンジ-リンカー要素は好ましくは本明細書において「Igヒンジ領域」と称する免疫グロブリンのヒンジ領域配列を含む。「Igヒンジ領域」という用語は、1つ又は複数のシステイン残基、例えばジスルフィド結合が免疫グロブリンの2つの重鎖を連結する2つのシステイン残基を含む、天然に産生するIgヒンジ領域配列の一部と配列同一性又は類似性を共有するアミノ酸配列を含む任意のポリペプチドを意味する。

【0053】

ヒンジ領域の誘導体及び類似体は変異によって得ることができる。本明細書で言及する誘導体又は類似体は、欠失、挿入、及び/又は置換に帰せられる1つ又は複数のアミノ酸配列の相違を有することを除いて野生型(又は天然に産生するタンパク質)の全長配列と配列同一性又は類似性を共有するアミノ酸配列を含むポリペプチドである。

【0054】

個別のLIGHT受容体アゴニストタンパク質におけるオープンFcコンフォメーションを有する分子の数は、ヒンジ領域に存在する鎖間ジスルフィド結合の数に依存する。したがって、1つの実施形態では、CH₂グリコサイトの除去による影響を改善するために、第3のシステイン(EU番号付けシステムによるC225)を、本発明のLIGHT受容体アゴニストタンパク質のヒンジ領域に導入した。

【0055】

ヒンジ領域におけるリジンのグリシンへの変換により、タンパク質分解安定性が増大する1つの実施形態では、本発明のLIGHT受容体アゴニストタンパク質は、上側ヒンジのリジン(EU番号付けシステムによるK223)のグリシンへの変異を更に含み、これによりこの部位におけるタンパク質分解プロセシングが低減され、したがって融合タンパク質の全体としての安定性が向上する。ヒンジ領域内における上述の第3のシステイン(EU番号付けシステムによるC225)の導入と上述のリジンのグリシンへの変異(EU番号付けシステムによるK223G)を併せることによって、本発明のLIGHT受容体アゴニストタンパク質の全体としての安定化がもたらされる。

上述のシステイン(C225)及びリジンのグリシンへの変異(K223G)を含む特に好ましいヒンジ-リンカー要素は、配列番号16(Table 4(表4))で示されるアミノ酸配列を含み、又はこれからなる。

【0056】

LIGHT受容体アゴニストタンパク質はN末端シグナルペプチドドメインを更に含んでよく、それにより好適な宿主細胞中でのプロセシング、例えば細胞外分泌が可能になる。好ましくは、N末端シグナルペプチドドメインはプロテアーゼ切断部位、例えばシグナルペプチダーゼ切断部位を含み、それにより発現の後又は発現の間に除去されて成熟したタンパク質が得られる。特に好ましいN末端シグナルペプチドドメインは配列番号17(Table 4(表4))で示されるアミノ酸配列を含む。

【0057】

更に、LIGHT受容体アゴニストタンパク質は、認識/精製ドメイン、例えばFLAGドメイン、Strep-tag若しくはStrep-tag IIドメイン、及び/又はポリHisドメインを含み、又はこれに結合した、例えば1~50、好ましくは10~30アミノ酸の長さを有するC末端要素を更に含んでもよい。好ましい実施形態によれば、融合ポリペプチドは配列番号18(Table 4(表4))に示す短いセリンリンカーを介してC末端に融合したStrep-tagを含む。

【0058】

好ましいヒンジ-リンカー要素(配列番号16、19~24)、好ましいN末端シグナルペプチドドメイン(配列番号17)、及びセリンリンカー-Strep-tag(配列番号18)をTable 4(表4)に示す。

【0059】

【表4】

10

Table 4:例示的なドメイン及びリンカー

配列番号	配列
16	GSSSSSSSSGSCDKTHTCPPC
17	METDTLLVFVLLVWVPAGNG
18	SSSSSSAWSHPQFEK
19	GSSSSSSSGSCDKTHTCPPC
20	GSSSSSSGSCDKTHTCPPC
21	GSSSSSGSCDKTHTCPPC
22	GSSSGSCDKTHTCPPC
23	GSSSGSCDKTHTCPPCGS
24	GSSSGSCDKTHTCPPCGSGS

20

【0060】

本発明の1つの実施形態では、融合ポリペプチドは2つの異なったペプチドリンカー要素によって融合された3つの可溶性LIGHTドメインを含む。第1のリンカー要素(ii)は配列番号2からなる。第2のリンカー要素(iv)は配列番号11からなる。第1の可溶性LIGHTドメイン(i)は配列番号1のヒトLIGHTのアミノ酸91~240からなり、可溶性LIGHTドメイン(iii)及び(v)は配列番号1のヒトLIGHTのアミノ酸94~240からなる。得られるscLIGHT-RBD配列モジュールをTable 5B(表6)の配列番号36に示す。

30

【0061】

本発明の別の実施形態では、融合ポリペプチドは配列番号2のペプチドリンカー要素によって融合された3つの可溶性LIGHTドメインを含む。第1の可溶性LIGHTドメイン(i)は配列番号1のヒトLIGHTのアミノ酸91~240からなり、可溶性LIGHTドメイン(iii)及び(v)は配列番号1のヒトLIGHTのアミノ酸93~240からなる。得られるscLIGHT-RBD配列モジュールをTable 5B(表6)の配列番号39に示す。

40

【0062】

本発明の別の実施形態では、融合ポリペプチドは配列番号2のペプチドリンカー要素によって融合された3つの可溶性LIGHTドメインを含む。第1の可溶性LIGHTドメイン(i)は配列番号1のヒトLIGHTのアミノ酸91~240からなり、可溶性LIGHTドメイン(iii)及び(v)は配列番号1のヒトLIGHTのアミノ酸94~240からなる。得られるscLIGHT-RBD配列モジュールをTable 5B(表6)の配列番号40に示す。

【0063】

LIGHT-Fcの好ましい構成

更に、融合ポリペプチドは、配列番号16のヒンジリンカーを介して可溶性LIGHTドメイ

50

ン(v)にC末端で融合した配列番号13の抗体Fc断片ドメインを含む。発明者らは驚くべきことに、この特定の融合ポリペプチドが二価のアゴニスト抗LIGHT受容体-mABと比較して改善された生物学的活性を提供し、223位にリジン及びCH2ドメインにN297S変異(EU番号付けによる)を含む同様の融合タンパク質と比較して長期の安定性を有していることを見出した。本発明のLIGHT受容体アゴニストタンパク質の例示的な実施形態のアミノ酸配列は、配列番号27で示される。

【0064】

更に、融合ポリペプチドは、例えば配列番号17のN末端シグナルペプチドドメインを含んでもよい。本発明のLIGHT受容体アゴニストタンパク質の特定の例を配列番号25に示す。
10

【0065】

別の好ましい実施形態によれば、融合ポリペプチドは配列番号18に示す短いセリンリンカーを介して本発明のポリペプチドに融合したC末端Strep-tagを更に含んでもよい。本発明のこの態様によれば、Fc断片は好ましくは配列番号13又は14に示すアミノ酸配列からなる。

【0066】

更に、Fc断片は、例えば配列番号13のアミノ酸1~127を含む短いFc断片からなってもよい。C末端Strep-tagを含む融合ポリペプチドの特に好ましい例を配列番号15に示す(プロテインA)。

【0067】

配列番号15、25、及び26に示す例示的なLIGHT受容体アゴニストタンパク質は、それぞれ各配列のアミノ酸1~20にN末端シグナルペプチドドメインを含む。それぞれの場合に、成熟タンパク質はアミノ酸21で開始する。本発明の成熟した例示的なLIGHT受容体アゴニストタンパク質(シグナルペプチドなし)は、配列番号27~35で示される。
20

【0068】

上記の例示的なLIGHT受容体アゴニストタンパク質をTable 5(表5)に示す。

【0069】

配列番号27で示されるLIGHT受容体アゴニストは、グリコシル化部位(CH2領域のEU番号付けシステムによるN297S変異が非グリコシル化CH2ドメインを提供する)の総数が減少し、ヒンジ領域における鎖間ジスルフィド結合の数が増加し、上部ヒンジのリジンのグリシンへの変異(EU番号付けシステムによるK223G)が生じている。追加の第2のリンカー(iv)は短縮されており、モジュール(iii)及び(v)はN末端が短縮されているので、それにより、全てのプロモーターの解離が低減し、プロテアーゼに対するタンパク質の安定性が増大する。これらの変化により、分解の可能性及びLIGHT受容体のスーパークラスタリング(付随する毒性を伴う)が減少する。
30

【0070】

配列番号30に示すLIGHT受容体アゴニストは配列番号27と同じ配置を含むが、可溶性LIGHTドメイン(i)にE91Q変異を有し、それによりピログルタメートの形成が可能になり、アミノペプチダーゼに対してN末端が保護され、その結果、製造及び保存中のタンパク質の全体の安定性が向上している。
40

【0071】

配列番号32に示すLIGHT受容体アゴニストは配列番号30と同じ配置を含むが、第3のペプチドリンカー(vi)が短縮されており、それにより可溶性LIGHTドメイン(v)とFcドメイン(viii)との間のドメイン間距離が低減しており、そのためプロテアーゼに対するタンパク質の安定性が向上している。

【0072】

本発明の1つの実施形態によれば、一本鎖LIGHT融合ポリペプチドドメインは、任意選択でE91Q変異を含む可溶性ドメイン(i)を有する配列番号39に示すscLIGHT-RBDモジュールを含む。ドメイン(i)にE91Qムテイン、配列番号16のヒンジリンカー、及び配列番号13の抗体Fc断片を含む本発明のLIGHT受容体アゴニストタンパク質の特定の例を配列番号30に示
50

す。

【0073】

【表5A】

Table 5: 例示的な LIGHT 受容体アゴニストタンパク質

配列番号	配列	
25 プロテイン A Strep なし	METDTLLVFVLLVVVPAGNGEVNPAAHLTGANSSLTGGGPLLWETQLGLAFLR GLSYHDGALVVTKAGYYYIYSKVQLGGVGCPPLGLASTITHGLYKRTPRYPEELE LLVSQQSPCGRATSSSRVWWDSSFLGGVVHLEAGEEEVVVRVLDERLVRLRDGTR SYFGAFMVGSGSGNGSPAHLTGANSSLTGGGPLLWETQLGLAFLRGLSYHDG ALVVTKAGYYYIYSKVQLGGVGCPPLGLASTITHGLYKRTPRYPEELELLVSQGS PCGRATSSSRVWWDSSFLGGVVHLEAGEEEVVVRVLDERLVRLRDGTRSFGAFM VGSGSPAHLTGANSSLTGGGPLLWETQLGLAFLRGLSYHDGALVVTKAGYYY IYSKVQLGGVGCPPLGLASTITHGLYKRTPRYPEELELLVSQSPCGRATSSSRV WWDSSFLGGVVHLEAGEEEVVVRVLDERLVRLRDGTRSFGAFMVGSSSSSSSG SCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVNAKTKPREEQYSSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQOPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPGK	10
15 プロテイン A SEQ36 +SEQ13 (FC) +シグナル +Strep	METDTLLVFVLLVVVPAGNGEVNPAAHLTGANSSLTGGGPLLWETQLGLAFLR GLSYHDGALVVTKAGYYYIYSKVQLGGVGCPPLGLASTITHGLYKRTPRYPEELE LLVSQQSPCGRATSSSRVWWDSSFLGGVVHLEAGEEEVVVRVLDERLVRLRDGTR SYFGAFMVGSGSGNGSPAHLTGANSSLTGGGPLLWETQLGLAFLRGLSYHDG ALVVTKAGYYYIYSKVQLGGVGCPPLGLASTITHGLYKRTPRYPEELELLVSQGS PCGRATSSSRVWWDSSFLGGVVHLEAGEEEVVVRVLDERLVRLRDGTRSFGAFM VGSGSPAHLTGANSSLTGGGPLLWETQLGLAFLRGLSYHDGALVVTKAGYYY IYSKVQLGGVGCPPLGLASTITHGLYKRTPRYPEELELLVSQSPCGRATSSSRV WWDSSFLGGVVHLEAGEEEVVVRVLDERLVRLRDGTRSFGAFMVGSSSSSSSG SCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVNAKTKPREEQYSSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQOPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPGSSSSSAWSHPQFEK	20 30 40

【0074】

【表 5 B】

26	METDTLLVFVLLVVVPAGNGEVNPAAHLTGANSSLTGSGGPLLWETQLGLAFLR GLSYHDGALVVTKAGYYYIYSKVQLGGVGCPGLASTITHGLYKRTPRYPEELE LLVSQQSPCGRATSSSRVWWDSSFLGGVVHLEAGEEVVVRVLDERLVRLRDGTR SEQ36 +SEQ14 (FC) +シグナル Strep なし	10
	SYFGAFMVGSGSGNGSPAHLTGANSSLTGSGGPLLWETQLGLAFLRGLSYHDG ALVVTKAGYYYIYSKVQLGGVGCPGLASTITHGLYKRTPRYPEELELLVSQOS PCGRATSSSRVWWDSSFLGGVVHLEAGEEVVVRVLDERLVRLRDGTRSFGAFM VGSGSPAHLTGANSSLTGSGGPLLWETQLGLAFLRGLSYHDGALVVTKAGYYY IYSKVQLGGVGCPGLASTITHGLYKRTPRYPEELELLVSQOSPCGRATSSSRV WWDSSFLGGVVHLEAGEEVVVRVLDERLVRLRDGTRSFGAFMVGSSSSSSSG SCDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPPKDLMISRTPEVTCVVVDVSHEDEV KFNWYVDGVEVHNAAKTPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKG LPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGOPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK	
27	EVNPAAHLTGANSSLTGSGGPLLWETQLGLAFLRGLSYHDGALVVTKAGYYYIY SKVQLGGVGCPGLASTITHGLYKRTPRYPEELELLVSQOSPCGRATSSSRVWW SEQ36 +SEQ13 (FC) シグナルなし Strep なし グリコシル化な し	20
	DSSFLGGVVHLEAGEEVVVRVLDERLVRLRDGTRSFGAFMVGSGSGNGSPAHH LTGANSSLTGSGGPLLWETQLGLAFLRGLSYHDGALVVTKAGYYYIYSKVQLGG VGCPGLASTITHGLYKRTPRYPEELELLVSQOSPCGRATSSSRVWWDSSFLGG VVHLEAGEEVVVRVLDERLVRLRDGTRSFGAFMVGSGSPAHLTGANSSLTGS GGPLLWETQLGLAFLRGLSYHDGALVVTKAGYYYIYSKVQLGGVGCPGLASTI THGLYKRTPRYPEELELLVSQOSPCGRATSSSRVWWDSSFLGGVVHLEAGEEVV VRVLDERLVRLRDGTRSFGAFMVGSSSSSSSGCDKTHTCPPCPAPELLGGP SVFLFPPPKDLMISRTPEVTCVVVDVSHEDEPEVKFNWYVDGVEVHNAAKTPR EEQYSSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREP QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGOPENNYKTPPVLD DGSFFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	

【 0 0 7 5 】

【表 5 C】

28	<u>EVNPAAHLTGANSSLTGSGGPLLWETQLGLAFLRGLSYHDGALVVTKAGYYYYIY</u> SKVQLGGVGCPPLGLASTITHGLYKRTPRYPEELELLVSQQSPCGRATSSRVWW DSSFLGGVVHLEAGEEEVVVRVLDERLVRLRDGTRSFGAFMVGSGSGNGSPA AH LTGANSSLTGSGGPLLWETQLGLAFLRGLSYHDGALVVTKAGYYYYIYSKVQLGG VGCPLGLASTITHGLYKRTPRYPEELELLVSQQSPCGRATSSRVWWDSSFLGG VVHLEAGEEEVVVRVLDERLVRLRDGTRSFGAFMVGSGSPAALTGANSSLGS GGPLLWETQLGLAFLRGLSYHDGALVVTKAGYYYYIYSKVQLGGVGCPPLGLAS TI THGLYKRTPRYPEELELLVSQQSPCGRATSSRVWWDSSFLGGVVHLEAGEEV VRVLDERLVRLRDGTRSFGAFMVGSSSSSSSGSCDKTHTCPPCPAPELLGGP SVFLFPPPKDKTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPR EQYSSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPVLD S DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGSSSSSA W SHPQFEK	10
29	EVNPAAHLTGANSSLTGSGGPLLWETQLGLAFLRGLSYHDGALVVTKAGYYYYIY SKVQLGGVGCPPLGLASTITHGLYKRTPRYPEELELLVSQQSPCGRATSSRVWW DSSFLGGVVHLEAGEEEVVVRVLDERLVRLRDGTRSFGAFMVGSGSGNGSPA AH LTGANSSLTGSGGPLLWETQLGLAFLRGLSYHDGALVVTKAGYYYYIYSKVQLGG VGCPLGLASTITHGLYKRTPRYPEELELLVSQQSPCGRATSSRVWWDSSFLGG VVHLEAGEEEVVVRVLDERLVRLRDGTRSFGAFMVGSGSPAALTGANSSLGS GGPLLWETQLGLAFLRGLSYHDGALVVTKAGYYYYIYSKVQLGGVGCPPLGLAS TI THGLYKRTPRYPEELELLVSQQSPCGRATSSRVWWDSSFLGGVVHLEAGEEV VRVLDERLVRLRDGTRSFGAFMVGSSSSSSSGSCDKTHTCPPCPAPPVAGPS VFLFPPPKDKTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPRE EQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	20
30	EVNPAAHLTGANSSLTGSGGPLLWETQLGLAFLRGLSYHDGALVVTKAGYYYYIY SKVQLGGVGCPPLGLASTITHGLYKRTPRYPEELELLVSQQSPCGRATSSRVWW DSSFLGGVVHLEAGEEEVVVRVLDERLVRLRDGTRSFGAFMVGSGSGNGSPA AH LTGANSSLTGSGGPLLWETQLGLAFLRGLSYHDGALVVTKAGYYYYIYSKVQLGG VGCPLGLASTITHGLYKRTPRYPEELELLVSQQSPCGRATSSRVWWDSSFLGG VVHLEAGEEEVVVRVLDERLVRLRDGTRSFGAFMVGSGSPAALTGANSSLGS GGPLLWETQLGLAFLRGLSYHDGALVVTKAGYYYYIYSKVQLGGVGCPPLGLAS TI THGLYKRTPRYPEELELLVSQQSPCGRATSSRVWWDSSFLGGVVHLEAGEEV VRVLDERLVRLRDGTRSFGAFMVGSSSSSSSGSCDKTHTCPPCPAPPVAGPS VFLFPPPKDKTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPRE EQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	30
		40

【0076】

【表 5 D】

30 27 と同じ E91Q イン	QVNPAAHLTGANSSLTGGGPLIWETQLGLAFLRGLSYHDGALVVTKAGYYYYIY SKVQLGGVGCPPLGLASTITHGLYKRTPRYPEELELLVSQQSPCRATSSRVWW DSSFLGGVVHLEAGEEVVVRVLDERLVRLRDGTRSYFGAFMVGSNSPAAH LTGANSSLTGGGPLIWETQLGLAFLRGLSYHDGALVVTKAGYYYYIYSKVQLGG VGCPLGLASTITHGLYKRTPRYPEELELLVSQQSPCRATSSRVWWDSSFLGG VVHLEAGEEVVVRVLDERLVRLRDGTRSYFGAFMVGSNSPAAHLTGANSSLTGS GGPLLWETQLGLAFLRGLSYHDGALVVTKAGYYYYIYSKVQLGGVGCPPLGLASTI THGLYKRTPRYPEELELLVSQQSPCRATSSRVWWDSSFLGGVVHLEAGEEVV VRVLDERLVRLRDGTRSYFGAFMVGSNSSSSSSGCDKTHTCPPCPAPELLGGP SVFLFPPPKDKTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDEVKFNWYVDGVEVNAKTKPR EEQYSSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREP QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQOPENNYKTPPVLD DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	10 20
31 プロテインB SEQ 39 With L1 8mer L2: 8mer	QVNPAAHLTGANSSLTGGGPLIWETQLGLAFLRGLSYHDGALVVTKAGYYYYIY SKVQLGGVGCPPLGLASTITHGLYKRTPRYPEELELLVSQQSPCRATSSRVWW DSSFLGGVVHLEAGEEVVVRVLDERLVRLRDGTRSYFGAFMVGSNSPAAH LTGANSSLTGGGPLIWETQLGLAFLRGLSYHDGALVVTKAGYYYYIYSKVQLGG VGCPLGLASTITHGLYKRTPRYPEELELLVSQQSPCRATSSRVWWDSSFLGG VVHLEAGEEVVVRVLDERLVRLRDGTRSYFGAFMVGSNSGNSNPAAHLTGAN SSLTGSGGPLIWETQLGLAFLRGLSYHDGALVVTKAGYYYYIYSKVQLGGVGCP GLASTITHGLYKRTPRYPEELELLVSQQSPCRATSSRVWWDSSFLGGVVHLE AGEEVVVRVLDERLVRLRDGTRSYFGAFMVGSNSSSSSSGCDKTHTCPPCPAP ELLGGPSVFLFPPPKDKTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYSSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAK GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQOPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	30

【 0 0 7 7 】

【表 5 E】

32	QVNPAAHLTGANSSLTGSGGPLLWETQLGLAFLRGLSYHDGALVVTKAGYYYIY SKVQLGGVGCPGLASTITHGLYKRTPRYPEELELLVSQQSPCGRATSSSRVWW DSSFLGGVVHLEAGEEVVVRVLDERLVRLRDGTRSYFGAFMVGSGSGNGSPA LTGANSSLTGSGGPLLWETQLGLAFLRGLSYHDGALVVTKAGYYYIYSKVQLGG VGCPLGLASTITHGLYKRTPRYPEELELLVSQQSPCGRATSSSRVWWDSSFLGG VVHLEAGEEVVVRVLDERLVRLRDGTRSYFGAFMVGSGSPAHLTGANSSLTG GGPLLWETQLGLAFLRGLSYHDGALVVTKAGYYYIYSKVQLGGVGCPGLASTI THGLYKRTPRYPEELELLVSQQSPCGRATSSSRVWWDSSFLGGVVHLEAGEEV VRVLDERLVRLRDGTRSYFGAFMVG <u>gsssssgs</u> CDKTHTCPCPAPELLGGPSVF LFPPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSCHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYSSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGNGQPENNYK TTPPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQOGNVFCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	10
33	EVNPAAHLTGANSSLTGSGGPLLWETQLGLAFLRGLSYHDGALVVTKAGYYYIY SKVQLGGVGCPGLASTITHGLYKRTPRYPEELELLVSQQSPCGRATSSSRVWW DSSFLGGVVHLEAGEEVVVRVLDERLVRLRDGTRSYFGAFMVG <u>gsssssgs</u> CDKTHTCPCPA LTGANSSLTGSGGPLLWETQLGLAFLRGLSYHDGALVVTKAGYYYIYSKVQLGG VGCPLGLASTITHGLYKRTPRYPEELELLVSQQSPCGRATSSSRVWWDSSFLGG VVHLEAGEEVVVRVLDERLVRLRDGTRSYFGAFMVG <u>gsssssgs</u> CDKTHTCPCPA LTGSGGPLLWETQLGLAFLRGLSYHDGALVVTKAGYYYIYSKVQLGGVGCPGL ASTITHGLYKRTPRYPEELELLVSQQSPCGRATSSSRVWWDSSFLGGVVHLEAG EEVVVRVLDERLVRLRDGTRSYFGAFMVG <u>gssssssssgg</u> CDKTHTCPCPA LGGPSVFLFPPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSCHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYSSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQOGNVFCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	20
リンクー1+2	EVNPAAHLTGANSSLTGSGGPLLWETQLGLAFLRGLSYHDGALVVTKAGYYYIY SKVQLGGVGCPGLASTITHGLYKRTPRYPEELELLVSQQSPCGRATSSSRVWW	
8mer	DSSFLGGVVHLEAGEEVVVRVLDERLVRLRDGTRSYFGAFMVG <u>gsssssgs</u> CDKTHTCPCPA LTGANSSLTGSGGPLLWETQLGLAFLRGLSYHDGALVVTKAGYYYIYSKVQLGG	
RBD モジュール	VGCPLGLASTITHGLYKRTPRYPEELELLVSQQSPCGRATSSSRVWWDSSFLGG	
2 及び 3 で N93	VVHLEAGEEVVVRVLDERLVRLRDGTRSYFGAFMVG <u>gsssssgs</u> CDKTHTCPCPA LTGSGGPLLWETQLGLAFLRGLSYHDGALVVTKAGYYYIYSKVQLGGVGCPGL	
欠失	ASTITHGLYKRTPRYPEELELLVSQQSPCGRATSSSRVWWDSSFLGGVVHLEAG EEVVVRVLDERLVRLRDGTRSYFGAFMVG <u>gssssssssgg</u> CDKTHTCPCPA LGGPSVFLFPPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSCHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYSSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQOGNVFCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	30

【表5F】

34	QVNPAAHLTGANSSLTGSGGPLLWETQLGLAFLRGLSYHDGALVVTKAGYYYIY	
SEQ33	SKVQLGGVGCPLGLASTITHGLYKRTPRYPEELELLVSQQSPCRATSSSRVWW	
N 末端アミノ酸 E→Q に交換	DSSFLGGVVHLEAGEEVVVRVLDERLVRLRDGTRSYFGAFMV GSGSGNGSPAAH	10
	LTGANSSLTGSGGPLLWETQLGLAFLRGLSYHDGALVVTKAGYYYIYSKVQLGG	
	VGCPLGLASTITHGLYKRTPRYPEELELLVSQQSPCRATSSSRVWWDSSFLGG	
	VVHLEAGEEVVVRVLDERLVRLRDGTRSYFGAFMV GSGSGNGSPAAH LTGANSS	
	LTGSGGPLLWETQLGLAFLRGLSYHDGALVVTKAGYYYIYSKVQLGGVGCPLGL	
	ASTITHGLYKRTPRYPEELELLVSQQSPCRATSSSRVWWDSSFLGGVHVLEAG	
	EEVVVRVLDERLVRLRDGTRSYFGAFMV GSSSSSSSSGCDKTHCPCPAPEL	
	LGGPSVFLFPPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSCHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK	
	TKPREE <u>QYSSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ</u>	
	PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPP	
	VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	
35	EVNPAAHLTGANSSLTGSGGPLLWETQLGLAFLRGLSYHDGALVVTKAGYYYIY	20
Seq33	SKVQLGGVGCPLGLASTITHGLYKRTPRYPEELELLVSQQSPCRATSSSRVWW	
短いヒンジリン カ一	DSSFLGGVVHLEAGEEVVVRVLDERLVRLRDGTRSYFGAFMV GSGSGNGSPAAH	
	LTGANSSLTGSGGPLLWETQLGLAFLRGLSYHDGALVVTKAGYYYIYSKVQLGG	
	VGCPLGLASTITHGLYKRTPRYPEELELLVSQQSPCRATSSSRVWWDSSFLGG	
	VVHLEAGEEVVVRVLDERLVRLRDGTRSYFGAFMV GSGSGNGSPAAH LTGANSS	
	LTGSGGPLLWETQLGLAFLRGLSYHDGALVVTKAGYYYIYSKVQLGGVGCPLGL	
	ASTITHGLYKRTPRYPEELELLVSQQSPCRATSSSRVWWDSSFLGGVHVLEAG	
	EEVVVRVLDERLVRLRDGTRSYFGAFMV gsssssgs CDKTHCPCPAELLGG	
	PSVFLFPPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSCHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTP	
	REE <u>QYSSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE</u>	
	PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPPVLD	
	SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	
36	EVNPAAHLTGANSSLTGSGGPLLWETQLGLAFLRGLSYHDGALVVTKAGYYYIY	30
Seq33	SKVQLGGVGCPLGLASTITHGLYKRTPRYPEELELLVSQQSPCRATSSSRVWW	
短いヒンジリン カ二	DSSFLGGVVHLEAGEEVVVRVLDERLVRLRDGTRSYFGAFMV GSGSGNGSPAAH	
	LTGANSSLTGSGGPLLWETQLGLAFLRGLSYHDGALVVTKAGYYYIYSKVQLGG	
	VGCPLGLASTITHGLYKRTPRYPEELELLVSQQSPCRATSSSRVWWDSSFLGG	
	VVHLEAGEEVVVRVLDERLVRLRDGTRSYFGAFMV GSGSGNGSPAAH LTGANSS	
	LTGSGGPLLWETQLGLAFLRGLSYHDGALVVTKAGYYYIYSKVQLGGVGCPLGL	
	ASTITHGLYKRTPRYPEELELLVSQQSPCRATSSSRVWWDSSFLGGVHVLEAG	
	EEVVVRVLDERLVRLRDGTRSYFGAFMV gsssssgs CDKTHCPCPAELLGG	
	PSVFLFPPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSCHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTP	
	REE <u>QYSSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE</u>	
	PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPPVLD	
	SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	

【表6】

Table 5B: 例示的な scLIGHT-RBD モジュール

36	EVNPAAHLTGANSSLTGGPPLLWETQLGLAFLRGLSYHDGALVVTKAGYYY IYSKVQLGGVGCPPLGLASTITHGLYKRTPRYPEELELLVSQQSPCRATSSS RVWDSSFLGGVVHLEAGEEEVVVRVLDERLVRLRDGTRSYFGAFMVGSGSGN GSPAHAHLTGANSSLTGGPPLLWETQLGLAFLRGLSYHDGALVVTKAGYYYI YSKVQLGGVGCPPLGLASTITHGLYKRTPRYPEELELLVSQQSPCRATSSSR VWWDSSFLGGVVHLEAGEEEVVVRVLDERLVRLRDGTRSYFGAFMVGSGSPAA HLTGANSSLTGGPPLLWETQLGLAFLRGLSYHDGALVVTKAGYYYIYSKVQ LGGVGCPPLGLASTITHGLYKRTPRYPEELELLVSQQSPCRATSSSRVWWDS SFLGGVVHLEAGEEEVVVRVLDERLVRLRDGTRSYFGAFMV	10
39	EVNPAAHLTGANSSLTGGPPLLWETQLGLAFLRGLSYHDGALVVTKAGYYY IYSKVQLGGVGCPPLGLASTITHGLYKRTPRYPEELELLVSQQSPCRATSSS RVWDSSFLGGVVHLEAGEEEVVVRVLDERLVRLRDGTRSYFGAFMVGSGSGN GSNPAAHLTGANSSLTGGPPLLWETQLGLAFLRGLSYHDGALVVTKAGYYY IYSKVQLGGVGCPPLGLASTITHGLYKRTPRYPEELELLVSQQSPCRATSSS RVWDSSFLGGVVHLEAGEEEVVVRVLDERLVRLRDGTRSYFGAFMVGSGSGN GSNPAAHLTGANSSLTGGPPLLWETQLGLAFLRGLSYHDGALVVTKAGYYY IYSKVQLGGVGCPPLGLASTITHGLYKRTPRYPEELELLVSQQSPCRATSSS RVWDSSFLGGVVHLEAGEEEVVVRVLDERLVRLRDGTRSYFGAFMV	20
40	EVNPAAHLTGANSSLTGGPPLLWETQLGLAFLRGLSYHDGALVVTKAGYYY IYSKVQLGGVGCPPLGLASTITHGLYKRTPRYPEELELLVSQQSPCRATSSS RVWDSSFLGGVVHLEAGEEEVVVRVLDERLVRLRDGTRSYFGAFMVGSGSGN GSPAHAHLTGANSSLTGGPPLLWETQLGLAFLRGLSYHDGALVVTKAGYYYI YSKVQLGGVGCPPLGLASTITHGLYKRTPRYPEELELLVSQQSPCRATSSSR VWWDSSFLGGVVHLEAGEEEVVVRVLDERLVRLRDGTRSYFGAFMVGSGSGNG SPAHAHLTGANSSLTGGPPLLWETQLGLAFLRGLSYHDGALVVTKAGYYYIY SKVQLGGVGCPPLGLASTITHGLYKRTPRYPEELELLVSQQSPCRATSSSRV WWDSFLGGVVHLEAGEEEVVVRVLDERLVRLRDGTRSYFGAFMV	30

【 0 0 8 0 】

更に、scLIGHT-RBDモジュール(配列番号36、39及び配列番号40)が、Table 2(表2)に記載したリンカー(配列番号2~12)を用いてN末端又はC末端に融合された追加的なドメインを有する融合タンパク質を生成させるためによく適合していることに注目しなければならない。

〔 0 0 8 1 〕

本発明のLIGHT受容体アゴニストタンパク質の上で提示した実施形態は、本発明の可溶性受容体アゴニストタンパク質の安定性に影響する構築原理若しくは凝集抵抗性に対処し

、又は受容体アゴニストタンパク質の受容体結合及び活性を調節する。

【0082】

医薬品における活性薬剤としての物質の適合性を記述するためのさらなる重要な特性は、その薬物動態学的プロファイル(PKプロファイル)である。薬物動態学は体内における薬物の配置の研究であり、薬物の血漿中濃度の変化に焦点を当てている。任意の所与の薬物及び用量について、血漿中濃度は吸収、分布及び排泄のプロセスに応じて変動する。血漿中薬物濃度の時間依存性低下及び体内からのその最終的な排泄は主として薬物の生体内変化及び排出に依存し、一般にインビボ半減期として測定される(Pharmacology、4版、Elsevier、2013年)。

【0083】

病原体又は腫瘍に対する免疫応答を形成する事象の経過を理解することにより、本発明のLIGHT受容体アゴニストタンパク質の有利なPKプロファイルを決定することができる。抗原を有する病原体又はまさに腫瘍に対する免疫応答は、いくつかの相に分けることができる。それぞれの相は、特徴的な経過期間及び通常特別の組織で起こる事象を示す。特に、準備相はリンパ球が二次的なリンパ器官において腫瘍関連抗原に提示される免疫応答の初期の事象を説明している。T細胞及びB細胞はそれぞれ、それらのT細胞又はB細胞受容体を通して抗原を認識するために、抗原提示細胞(APC)と細胞-細胞コンジュゲートを形成する必要がある。抗原認識に成功した場合には、リンパ球はAPCによってLIGHT等の共刺激分子にも提示される。抗原と共に刺激分子の両方の提示がAPC/リンパ球コンジュゲートの界面で起こるので、コンジュゲートは数分又はごく短時間で分離し、この相互作用の寿命はかなり短い。抗原認識及びLIGHT等の分子との共刺激の後、リンパ球が活性化されて拡張相に入り、ここでリンパ球が増殖して腫瘍に対する免疫応答を開始する。

【0084】

二次リンパ器官におけるAPCとリンパ球の物理的相互作用が短いことに鑑みて、LIGHT受容体経路を標的とした組み換え生物製剤によって誘導される共刺激シグナルの寿命は短いことが望ましいと考えられる。実際、共刺激シグナルに長時間曝露しているとリンパ球が超活性化状態になり、全身的毒性の影響を及ぼす可能性がある。したがって、免疫系の共刺激経路を標的とする生物製剤の好ましいPKプロファイルは、数時間又はおそらく1日の範囲の比較的短い終末半減期を示す。これは、通常数日又は1週間以上の終末半減期を示す同じ経路を標的とする抗体とは対照的である。まとめると、数時間の範囲の半減期を有する、免疫系の共刺激経路を活性化する生物製剤は、刺激抗体と比較して、その一時的な活性に関して天然のリガンドにより近い。このことは、いくつかの免疫刺激抗体による治療の間に観察される毒性効果の可能性に対してプラスの寄与をする。

したがって、さらなる実施形態では、本発明のLIGHT受容体アゴニストタンパク質は、4日未満、3日未満、2日未満、1日未満の短い終末半減期を有する。

【0085】

本発明のさらなる態様は、本明細書に記載したLIGHT受容体アゴニストタンパク質をコードする核酸分子に関する。核酸分子はDNA分子、例えば二本鎖若しくは一本鎖DNA分子、又はRNA分子であってよい。核酸分子は、LIGHT受容体アゴニストタンパク質又はその前駆体、例えば好ましくはLIGHT受容体アゴニストタンパク質のN末端及び/又はC末端に位置する分泌又は精製のためのシグナル配列又は他の異種のアミノ酸部分を含んでもよいLIGHT受容体アゴニストタンパク質のプロ-又はプレ-プロフォームをコードする。異種アミノ酸部分は、プロテアーゼ切断部位、例えばファクターX3、トロンビン又はIgAプロテアーゼ切断部位を介して第1及び/又は第2のドメインに連結されてもよい。本発明の核酸配列の特定の例を配列番号37としてTable 6(表7)に示す。この核酸分子は配列番号25の融合ポリペプチドをコードするオープンリーディングフレームを含む。

【0086】

10

20

30

40

【表 7 A】

Table 6: 例示的な LIGHT 受容体アゴニストタンパク質の核酸配列

配列番号	配列
37	AAGCTTAGGGATAACAGGGTAATAGCCGCCACCATGGAGACTGACACCCCTG CTGGTGTTCGTGCTGGTCTGGGTGCCTGCAGGAAATGGAGAAGTGAACC CCGCCGCCCATCTGACCGGCCTAACAGCAGCCTGACAGGTTCTGGCGGACC CCTCCTGTGGGAGACACAACCTGGGCCTGGCCTTGAGGGCCTGAGCTAC CATGATGGCGCCCTGGTGGTACCAAGGCCGGCTACTACTACATCTATTCCA AGGTCCAGCTCGGAGGCCTGGGATGCCCTCTGGACTGGCCTCCACCATCAC CCACGGCCTGTACAAGCGGACCCCTAGGTACCCCGAGGAACCTGGAACTGCTC GTCTCCAACAGAGCCCTTGCAGGCAGGGCTACCTCCAGCAGGGTGTGGT GGGACTCCAGCTTCCCTGGGAGGCCTGGTCCACCTGGAGGCTGGAGAAGAAGT GGTGGTGCAGGCTGGACGAAAGGCTGGTGGAGGCTCAGGGACGGCACCCGG TCCTACTTTGGAGCCTTATGGTGGCTCCGGATCTGGTAACGGCAGCCCCG CTGCTCATCTGACAGGCCTAACAGCAGCCTGACAGGCAGGGAGGCCCTCT GCTGTGGAAACACAGCTGGGCCTGGCCTTCTGAGGGCCTGTCCATCAC GATGGAGCCCTGGTGGTGACCAAAGCCGGCTATTACTATATCTACAGCAAGG TGCAGCTGGCGGAGTGGATGTCCTCTGGGCCTGGCCTCCACCATCACACA CGGACTGTATAAGCGGACACCTAGGTATCCGAAGAGCTGGAGCTCCTGGT TCCCAGCAAAGCCCTGTGGAAGGGCTACCTCCAGCAGCAGGGTCTGGTGGG ACTCCTCCCTGGCGGCGTGGTCCATCTGGAGCTGGCAGGAGGTGGTGGG GGTAGGGTCCTGGATGAGAGGCTGGTCAAGGCTGGAGGATGGCACCCGGTCC TATTTGGCGCTTCATGGTGGCTCTGGTAGCCCTGCCGCCACCTGACAG GAGCCAACAGCAGCCTGACAGGAAGCGGCGGCCCTGCTGTGGAGACCCA ACTGGGCCTGGCCTTCCTGGGGCCTCCTACACGACGGCGCTCTGGT GTGACCAAGGCCGGCTATTATTATCTACTCCAAAGTCCAGCTGGAGGCG TCGGCTGTCCTCTGGACTGGCTCCACCATCACCATGGCCTGTACAAAAG GACCCCTAGGTACCCGAAGAGTTAGAACTGCTGGTCTCCAGCAGTCCCCT TGCAGGAAGGGCCACAAGCAGCAGCCGGTGTGGTGGACTCCAGCTTCTGG GCGGAGTGGTGCACCTGGAAGCCGGAGAGGAGGTGAGGTGAGGTCAGGGCCTGG TGAAAGGCTGGTGCAGGCTGAGGGATGGCACCAGGTCTATTGCGCCTTC
	10
	20
	30
	40

【0087】

【表7B】

	ATGGTCggatcctcgagTTCATCGTCCTCATCCGGCTCATGTGATAAGACCC ACACCTGCCCTCCCTGTCCTGCCCCCTGAGCTGCTGGCGGACCTTCTGTGTT CCTGTTCCCCCCCAGCCTAAGGACACCCTGATGATCTCCAGGACCCCTGAG GTGACCTGTGTGGTGGACGTGTCACGAAGATCCGAGGTGAAGTTCA ACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTCCACAACGCCAAGACCAAGCCTAGGGA GGAGCAGTACAGCTCCACCTACCGGGTGGTGTGTGCTGACCGTGCTGCAC CAGGATTGGCTGAACGGAAAGGAGTATAAGTGTAAAGGTCTCCAACAAGGCC TGCCTGCCCTCATCGAGAAAACCATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCTCGGA GCCTCAGGTGTACACCCCTGCCTCCTAGCAGGGAGGAGATGACCAAGAACAG GTGTCCCTGACCTGTCTGGTAAGGGCTTCTACCCTCCGATATGCCGTGG AGTGGGAGTCTAATGCCAGCCCGAGAACAACTACAAGACCAAGCCCTCTGT GCTGGACTCTGACGGCTCCTCTTGTACTCCAAGCTGACCGTGGACAAG TCCAGATGGCAGCAGGGCAACGTGTTCTCCTGCTCCGTGATGCACGAGGCC TGCACAATCACTACACCCAGAAGTCCCTGTCTGAGTCCGGCAAGTAATA ggcgcgcc
10	
20	

【0088】

核酸分子は発現制御配列、例えば所望の宿主細胞中での核酸分子の発現を可能にする発現制御配列に作動可能に連結されてよい。核酸分子はベクター、例えばプラスミド、バクテリオファージ、ウイルスベクター、染色体統合ベクター等に位置してよい。好適な発現制御配列及びベクターの例は、例えばSambrookら(1989年)、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press及びAusubelら(1989年)、Current Protocols in Molecular Biology、John Wiley & Sons又はそれらの最近の版に記載されている。

【0089】

本発明のLIGHT受容体アゴニストタンパク質をコードする核酸配列を発現するために種々の発現ベクター/宿主細胞系を用いることができる。好適な宿主細胞には、これだけに限らないが、細菌、例えば大腸菌(*E.coli*)等の原核細胞、酵母細胞等の真核宿主細胞、昆虫細胞、植物細胞若しくは動物細胞、好ましくは哺乳類細胞、及びより好ましくはヒト細胞が含まれる。更に、本発明は上記の核酸分子で形質変換された又はトランスフェクトされた非ヒト生命体に関する。そのようなトランスジェニック生命体は、同種組み換え等の公知の遺伝子伝達の方法によって作成することができる。

【0090】

本発明のさらなる態様は、全て本明細書に記載した少なくとも1つのLIGHT受容体アゴニストタンパク質、それをコードするそれぞれの核酸、又は形質転換された若しくはトランスフェクトされた細胞を活性薬剤として含む医薬組成物又は診断用組成物に関する。

【0091】

別の態様では、本発明は本明細書に開示するLIGHT受容体アゴニストタンパク質並びに1つ又は複数の薬学的に許容される担体、希釈剤、賦形剤及び/又はアジュバントを含む医薬組成物を提供する。別の態様では、本発明はLIGHT受容体アゴニストタンパク質をコードする核酸分子を提供する。別の実施形態では、本発明は核酸分子を含む発現ベクターを提供する。別の実施形態では、本発明は核酸分子を含む細胞を提供する。さらなる実施形態では、細胞は真核細胞である。別の実施形態では、細胞は哺乳類細胞である。別の実施

10

20

30

40

50

形態では、細胞はチャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞である。他の実施形態では、細胞はCHO-DBX11、CHO-DG44、CHO-S、及びCHO-K1細胞からなる群から選択される。他の実施形態では、細胞はVero、BHK、HeLa、COS、MDCK、HEK-293、NIH-3T3、W138、BT483、Hs578T、HTB2、BT20、T47D、NS0、CRL7030、Hs78Bst、PER.C6、SP2/0-Ag14、及びハイブリドーマ細胞からなる群から選択される。

【0092】

別の態様では、本発明はLIGHT関連疾患又は障害を有する対象を処置する方法を提供し、本方法は対象に有効量のLIGHT受容体アゴニストタンパク質を投与するステップを含む。1つの実施形態では、LIGHT受容体アゴニストタンパク質は単独で投与される。別の実施形態では、LIGHT受容体アゴニストタンパク質は第2の薬剤の投与の前、これと同時に、又はその後に投与される。別の実施形態では、疾患又は障害は腫瘍、感染症、炎症、代謝性疾患、自己免疫障害、退行性疾患、アポトーシス関連疾患、及び移植拒絶反応からなる群から選択される。1つの実施形態では、腫瘍は固形腫瘍である。1つの実施形態では、腫瘍は肉腫、食道がん、及び胃がんからなるがんの群から起こる。別の実施形態では、腫瘍はユーワング肉腫又は線維肉腫から起こる。別の実施形態では、腫瘍は非小細胞肺癌(NSCLC)、肺がん、結腸直腸がん、乳がん、卵巣がん、頭頸部がん、及び小細胞肺がん(SCLC)からなるがんの群から起こる。別の実施形態では、腫瘍はリンパ腫瘍である。1つの実施形態では、腫瘍は血液腫瘍である。別の実施形態では、腫瘍は非ホジキンリンパ腫、白血病、急性リンパ球性白血病(ALL)、急性骨髓性白血病(AML)、B細胞リンパ腫、バーキットリンパ腫、慢性骨髓球性白血病(CML)、慢性リンパ球性白血病(CLL)、又はヘアリー細胞白血病から起こる。別の実施形態では、自己免疫障害はリウマチ性疾患、関節性疾患、又はリウマトイド及び関節炎疾患である。さらなる実施形態では、疾患又は障害はリウマチ性関節炎である。別の実施形態では、退行性疾患は神経退行性疾患である。さらなる実施形態では、神経退行性疾患は多発性硬化症である。

【0093】

1つの実施形態では、第2の薬剤は化学療法剤、放射線薬剤、又は生物学的薬剤である。1つの実施形態では、第2の薬剤はゾベリシブ、イブルチニブ、ナビトクラックス、及びベネトクラックスからなる群から選択される。別の実施形態では、第2の薬剤はアポトーシス薬剤である。1つの実施形態では、アポトーシスの第2の薬剤はボルテゾミブ、アザシチジン、ダサチニブ、及びゲフィチニブからなる群から選択される。特定の実施形態では、本明細書に開示する医薬組成物は静脈内又は皮下投与によって患者に投与される。他の実施形態では、開示した医薬組成物は経口、非経口、筋肉内、関節内、気管支内、腹内、関節包内、軟骨内、空腔内、腔内、大脳内、脳室内、結腸内、頸管内、消化管内、肝内、心筋内、骨内、骨盤内、心膜内、腹腔内、胸膜内、前立腺内、肺内、直腸内、腎内、網膜内、髄腔内、滑液内、胸腔内、子宮内、膀胱内、ボーラス、経膣、直腸、頬内、舌下腺、鼻内、又は経皮投与によって患者に投与される。

【0094】

1つの実施形態では、LIGHT受容体アゴニストタンパク質は単回ボーラスとして投与される。別の実施形態では、LIGHT受容体アゴニストタンパク質はいくつかの分割用量で投与してよい。LIGHT受容体アゴニストタンパク質は約0.1～100mg/kgで投与することができる。1つの実施形態では、LIGHT受容体アゴニストタンパク質は約0.1～0.5、0.1～1、0.1～10、0.1～20、0.1～50、0.1～75、1～10、1～15、1～7.5、1.25～15、1.25～7.5、2.5～7.5、2.5～15、5～15、5～7.5、1～20、1～50、7～75、1～100、5～10、5～15、5～20、5～25、5～50、5～75、10～20、10～50、10～75及び10～100mg/kgからなる群から選択される用量で投与することができる。他の実施形態では、LIGHT受容体アゴニストタンパク質は約0.1～100mg/mlで医薬組成物中に存在する。1つの実施形態では、LIGHT受容体アゴニストタンパク質は約0.1～0.5、0.1～1、0.1～10、0.1～20、0.1～50、0.1～75、1～10、1～20、1～50、1～75、1～100、5～10、5～15、5～20、5～25、5～50、5～75、10～20、10～50、10～75、又は10～100mg/mlからなる群から選択される量で医薬組成物中に存在する。他の実施形態では、治療有効量のLIGHT受容体アゴニストタンパク質が対象に投与される

10

20

30

40

50

。別の実施形態では、予防有効量のLIGHT受容体アゴニストタンパク質が対象に投与される。

【0095】

本明細書において用いる「LIGHT関連疾患又は障害」という用語は、有効量のLIGHT受容体アゴニストを、それを必要とする対象に投与することによって改善される任意の疾患又は障害である。全て本明細書に記載した少なくとも1つのLIGHT受容体アゴニストタンパク質、それをコードするそれぞれの核酸、又は形質転換された若しくはトランスフェクトされた細胞は、治療、例えばLIGHTの機能不全によって引き起こされる、これに関連する、及び/又はこれに付随する障害、特に腫瘍等の増殖性障害、例えば固形又はリンパ腫瘍、感染症、炎症、代謝性疾患、自己免疫障害、例えばリウマトイド及び/又は関節炎疾患、退行性疾患、例えば多発性硬化症等の神経退行性疾患、アポトーシス関連疾患又は移植拒絶反応の予防及び/又は処置において用いられる。10

【0096】

本明細書において用いる「LIGHTの機能不全」という用語は、LIGHTの正常な機能又は発現から逸脱したLIGHTの任意の機能又は発現、例えばLIGHTの正常な生理学的発現レベルと比較したLIGHT遺伝子又はタンパク質の過発現、LIGHT遺伝子又はタンパク質の低減した又は破壊された発現、LIGHTの正常な生理学的活性又は結合と比較したLIGHTの増加した活性、LIGHTの低減した又は破壊された活性、任意の結合パートナー、例えば受容体、特にLIGHT受容体若しくは別のサイトカイン分子に対するLIGHTの増加した結合、任意の結合パートナー、例えば受容体、特にLIGHT受容体若しくは別のサイトカイン分子に対する減少した又は破壊された結合として理解されたい。20

【0097】

種々の実施形態では、LIGHT受容体を標的とすることによって処置することができる障害に罹患したヒト対象を処置する方法が提供され、本方法は本明細書に開示したLIGHT受容体アゴニストタンパク質をヒト対象に投与するステップを含み、それによりヒト対象における標的(単数又は複数)の活性に対する効果はアゴニスト性であり、1つ又は複数の症状が改善され、及び/又は処置が達成される。本明細書で提供されるLIGHT受容体アゴニストタンパク質は、乳腺、結腸、直腸、肺(例えば小細胞肺がん「SCLC」及び非小細胞肺がん「NSCLC」)、中咽頭、下咽頭、食道、胃、脾、肝、胆嚢及び胆管、小腸、尿路(腎、膀胱及び尿路上皮等)、女性生殖器官(頸管、子宮、及び卵巣、並びに絨毛腫及び妊娠性絨毛性疾患等)、男性生殖器官(前立腺、精嚢、精巣及び生殖細胞腫瘍等)、内分泌腺(甲状腺、副腎、及び下垂体)、及び皮膚の癌腫、並びに血管腫、黒色腫、肉腫(骨及び軟組織から生じるもの並びにカポジ肉腫を含む)、脳腫瘍、神経、眼、及び髄膜(星状細胞腫、神経膠腫、膠芽腫、網膜芽腫、神経腫、神経芽腫、神経鞘腫、及び髄膜腫を含む)、造血器悪性疾患から生じる腫瘍、急性白血病、急性リンパ芽球性白血病(ALL)、急性骨髓性白血病(AML)、B細胞リンパ腫、バーキットリンパ腫、慢性骨髓球性白血病(CML)、慢性リンパ球性白血病(CLL)、ヘアリー細胞白血病、ホジキン及び非ホジキンリンパ腫、DLBCL、濾胞性リンパ腫、造血器悪性疾患、カポジ肉腫、悪性リンパ腫、悪性組織球増殖症、悪性黒色腫、多発性骨髓腫、腫瘍隨伴症候群/悪性疾患の高カルシウム血症、又は固形腫瘍を含む原発及び転移がんに罹患したヒトを処置するために用いることができる。30

【0098】

本明細書に開示したLIGHT受容体アゴニストタンパク質及び薬学的に許容される担体を含む医薬組成物が提供される。いくつかの実施形態では、医薬組成物は障害を処置するための少なくとも1つの追加的な治療薬剤を含む。例えば、追加的な薬剤は治療剤、化学療法剤、造影剤、細胞毒性剤、血管新生阻害剤、キナーゼ阻害剤(これだけに限らないが、KDR及びTIE-2阻害剤を含む)、共刺激分子モジュレーター又は免疫チェックポイント阻害剤(これだけに限らないが、抗B7.1、抗B7.2、抗B7.3、抗B7.4、抗CD28、抗B7RP1、CTLA4-Ig、抗CTLA-4、抗PD-1、抗PD-L1、抗PD-L2、抗ICOS、抗LAG-3、抗Tim-3、抗VISTA、抗HVEM、抗BTLA、LIGHT融合タンパク質、抗CD137、抗CD137L、抗OX40、抗OX40L、抗CD70、抗CD27、抗GAL9、抗A2AR、抗KIR、抗IDO-1、抗CD20を含む)、樹状細胞/抗原提示細胞モジュレ40
50

ーター(これだけに限らないが、抗CD40抗体、抗CD40L、抗DC-SIGN、抗Dectin-1、抗CD301、抗CD303、抗CD123、抗CD207、抗DNGR1、抗CD205、抗DCIR、抗CD206、抗ILT7を含む)、Toll様受容体のモジュレーター(これだけに限らないが、抗TLR-1、抗TLR-2、抗TLR-3、抗TLR-4、抗TLR-4、抗TLR-5、抗TLR-6、抗TLR-7、抗TLR-8、抗TLR-9を含む)、接着分子プロックター(これだけに限らないが、抗LFA-1抗体、抗E/L選択抗体、小分子阻害剤を含む)、抗サイトカイン抗体又はその機能性断片(これだけに限らないが、抗IL-18、抗TNF、又は抗IL-6/サイトカイン受容体抗体を含む)、二重特異性再指向T細胞又はNK細胞の細胞毒性(これだけに限らないが、BiTE(登録商標)を含む)、キメラT細胞受容体(CAR-T)に基づく治療、T細胞受容体(TCR)に基づく治療、治療用がんワクチン、メトトレキセート、シクロスボリン、ラパマイシン、FK506、検出可能なラベル又はレポーター、TNFアンタゴニスト、抗リウマチ剤、筋弛緩剤、麻酔剤、非ステロイド抗炎症剤(NSAID)、鎮痛剤、麻酔剤、鎮静剤、局所麻酔剤、神経筋プロックター、抗微生物剤、乾癬治療剤、コルチコステロイド、タンパク同化ステロイド、エリスロポエチン、免疫付与剤、免疫グロブリン、免疫抑制剤、成長ホルモン、ホルモン補充薬剤、放射性医薬品、抗うつ剤、抗精神病薬、興奮剤、喘息薬、ベータアゴニスト、吸入ステロイド、エピネフリン又はアナログ、サイトカイン、又はサイトカインアンタゴニストであってよい。
【0099】

ある実施形態では、がんを処置する方法において、又は本明細書に記載した腫瘍からの転移の予防若しくは阻止において、LIGHT受容体アゴニストタンパク質は単独で、又は1つ又は複数の追加的な薬剤、例えば化学療法剤、放射線薬剤、又は生物学的薬剤と組み合わせて用いることができる。いくつかの実施形態では、薬剤には以下の、13-시스-レチノイン酸、2-CdA、2-クロロデオキシアデノシン、5-アザシチジン、5-フルオロウラシル、5-FU、6-メルカプトプリン、6-MP、6-TG、6-チオグアニン、アブラキサン、アキュテーン(登録商標)、アクチノマイシン-D、アドリアマイシン(登録商標)、アドルシル(登録商標)、アフィニトル(登録商標)、アグリリン(登録商標)、アラコート(登録商標)、アルデスロイキン、アレムツズマブ、ALIMTA、アリトレチノイン、アルカバン-AQ(登録商標)、アルケラン(登録商標)、全トランスレチノイン酸、アルファインターフェロン、アルトレタミン、アメトプロリン、アミフォスチン、アミノグルテチミド、アナグレリド、アナンドロン(登録商標)、アナストロゾール、アラビノシルシトシン、アラ-Cアラネスプ(登録商標)、アレディア(登録商標)、アリミデックス(登録商標)、アロマシン(登録商標)、アラノン(登録商標)、三酸化ヒ素、アルゼラ(商標)、アスピラギナーゼ、ATRA、アバスチン(登録商標)、アザシチジン、BCG、BCNU、ベンダムスチン、ベバシズマブ、ベキサロテン、BEXXAR(登録商標)、ビカルタミド、BiCNU、ブレノキサン(登録商標)、ブレオマイシン、ボルテゾミブ、ブスルファン、ブスルフェックス(登録商標)、C225、カルシウムロイコボリン、カムパス(登録商標)、カムブトサル(登録商標)、カムブトセシン-11、カペシタビンカラク(商標)、カルボプラチニン、カルムスチン、カルムスチンウェーファ、カソデックス(登録商標)、CC-5013、CCI-779、CCNU、CDDP、CeeNU、セルビジン(登録商標)、セツキシマブ、クロラムブシル、シスプラチニン、シトロボラムファクター、クラドリビン、コーチゾン、コスメゲン(登録商標)、CPT-11、シクロホスファミド、シタドレン(登録商標)、シタラビン、シタラビンリポソーマル、シトサル-U(登録商標)、シトキサン(登録商標)、ダカルバジン、ダコゲン、ダクチノマイシン、ダルベポエチンアルファ、ダサチニブ、ダウノマイシン、ダウノルビシン、ダウノルビシン塩酸、ダウノルビシンリポソーマル、ダウノキソーム(登録商標)、デカドロン、デシタビン、デルタ-コルテフ(登録商標)、デルタゾン(登録商標)、デニロイキン、ディフティトックス、デポシト(商標)、デキサメタソン、デキサメタソンアセテート、デキサメタソンリン酸ナトリウム、デキサソン、デキストラゾキサン、DHAD、DIC、ディオデックス、ドセタキセル、ドキシリ(登録商標)、ドキソルビシン、ドキソルビシンリポソーマル、ドロキシア(商標)、DTIC、DTIC-ドーム(登録商標)、デュラロン(登録商標)、ヅベリシブ、エフデックス(登録商標)、エリガード(商標)、エレンス(商標)、エロキサチン(商標)、エルスパル(登録商標)、エムシト(登録商標)、エビルビシン、エポエチンアルファ、エルビツックス、エルロチニブ、エルウィナL-アスパラ
10
20
30
40
50

ギナーゼ、エストラムスチン、エチオールエトポホス(登録商標)、エトボシド、エトボシドリン酸塩、ユーレキシン(登録商標)、エベロリムス、エビスタ(登録商標)、エキセメスタン、ファレストン(登録商標)、ファスロデックス(登録商標)、フェマラ(登録商標)、フィルグラスチム、フロクスウリジン、フルダラ(登録商標)、フルダラビン、フルオロブレックス(登録商標)、フルオロウラシル、フルオロウラシル(クリーム)、フルオキシメステロン、フルタミド、フォリン酸、FUDR(登録商標)、フルベストラント、ゲフィニチブ、ゲムシタビン、ゲムツズマブオゾガマイシン、ゲムザール、グリーベック(商標)、グリアデル(登録商標)ウェーファ、GM-CSF、ゴセレリン、顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(G-MCSF)、ハロテスチン(登録商標)、ハーセプチン(登録商標)、ヘキサドロール、ヘキサレン(登録商標)、ヘキサメチルメラミン、HMM、ヒカムチン(登録商標)、ヒドレア(登録商標)、ヒドロコートアセテート(登録商標)、ヒドロコーチゾン、ヒドロコーキゾンリン酸ナトリウム、ヒドロコーキゾンコハク酸ナトリウム、ヒドロコートンリン酸、ヒドロキシ尿素、イブルチニブ、イブリツモマブ、イブリツモマブチウキセタン、イダマイシン(登録商標)、イダルビ
シンイフェックス(登録商標)、インターフェロンアルファ、インターフェロンアルファ-2b(PEGコンジュゲート)、イフオスファミド、インターロイキン-11(IL-11)、インターロイキン-2(IL-2)、イマチニブメシレート、イミダゾールカルボキサミド、イントロンA(登録商標)、イピリムマブ、イレッサ(登録商標)、イリノテカン、イソトレチノイン、イキサベピロン、イキセムプラ(商標)、KADCYCLA(登録商標)、キドロラーゼ(t)ラナコート(登録商標)、ラパチニブ、L-アスパラギナーゼ、LCR、レナリドミド、レトロゾール、ロイコボリン、ロイケラン、ロイキン(商標)、ロイプロリド、ロイコクリスチン、ロイスタチン(商標)、リリルマブ、リポソーマルAra-C、リキッドプレッド(登録商標)、ロムスチン、L-PAM、L-ザルコリシン、ルプロン(登録商標)、ルプロンデボ(登録商標)、マツラン(登録商標)、マキシデックス、メクロレタミン、メクロレタミン塩酸、メドラロン(登録商標)、メドロール(登録商標)、メガス(登録商標)、メゲストロール、メゲストロール酢酸、MEK阻害剤、メルファラン、メルカプトプリン、メスナ、メスネックス(商標)、メソトレキセート、メソトレキセートナトリウム、メチルプレドニソロン、メチコルテン(登録商標)、マイトイマイシン、マイトイマイシン-C、ミトキサントロンM-プレドニソール(登録商標)、MT-C、MTX、ムスタルゲン(登録商標)、ムスチン、ムタマイシン(登録商標)、ミレラン(登録商標)、ミロセル(商標)、ミロタルグ(登録商標)、ナビトクラックス、ナベルビン(登録商標)、ネララビン、ネオサル(登録商標)、ニューラスタ(商標)、ニューメガ(登録商標)、ニュー・ポゲン(登録商標)、ネキサバル(登録商標)、ニランドロン(登録商標)、ニロチニブ、ニルタミド、ニペント(登録商標)、ナイトロジエンマスターードノバルデックス(登録商標)、ニボルマブ、ノバントロン(登録商標)、エヌプレート、オクトレオチド、オクトレオチド酢酸、オファツムマブ、オンコスパル(登録商標)、オンコビン(登録商標)、オンタック(登録商標)、オンキサル(商標)、オブレルベキン、オラプレッド(登録商標)、オラソング(登録商標)、オキサリプラチン、パクリタキセル、パクリタキセルタンパク質結合、パミドロナート、パニツムマブ、パントレチン(登録商標)、パラプラチン(登録商標)、パゾパニブ、ペディアプレッド(登録商標)、PEGインターフェロン、ペガスパルガーゼ、ペグフィルグラスチム、PEG-INTRON(商標)、PEG-L-アスパラギナーゼ、PEMETREXED、ペムブロリズマブ、ペントスタチン、ペルツズマブ、フェニルアラニンマスターード、ピジリズマブ、プラチノール(登録商標)、プラチノール-AQ(登録商標)、プレドニソロン、プレドニソーン、プレロン(登録商標)、プロカルバジン、PROCERIT(登録商標)、プロロイキン(登録商標)、カルムスチンインプラントを伴うプロリフェプロスパン20、プリネットール(登録商標)、BRAF阻害剤、ラロキシフェン、レブリミド(登録商標)、リューマトレックス(登録商標)、リツキサン(登録商標)、リツキシマブ、ロフェロン-A(登録商標)、ロミプロスチム、ルベックス(登録商標)、ルビドマイシン塩酸、サンドスタチン(登録商標)、サンドスタチンLAR(登録商標)、サルグラモスチム、ソル-コルテフ(登録商標)、ソル-メドロール(登録商標)、ソレフェニブ、SPRYCEL(商標)、STI-571、STIVAGRA(商標)、ストレプトゾシン、SU1248、スニチニブ、ステント(登録商標)、タモキシフェンタルセバ(登録商標)、タルグ
10
20
30
40
50

レチン(登録商標)、タシグナ(登録商標)、タキソール(登録商標)、タキソテレ(登録商標)、テモダル(登録商標)、テモゾロミドテムシロリムス、テニポシド、TESPA、サリドマイド、サロミド(登録商標)、テラシス(登録商標)、チオグアニン、チオグアニンタブロイド(登録商標)、チオホスホアミド、チオブレックス(登録商標)、チオテバ、TICE(登録商標)、トポサル(登録商標)、トポテカン、トレミフェン、トリセル(登録商標)、トシツモマブ、トラスツズマブ、トレアンダ(登録商標)、トレメリムマブ、トレチノイン、トレキサル(商標)、トリセノックス(登録商標)、TSPA、TYKERB(登録商標)、ウレルマブ、VCR、ベクチビックス(商標)、ベルバン(登録商標)、ベルカード(登録商標)、ベネットクラックス、Ve Pesid(登録商標)、ベサノイド(登録商標)、ビアジュール(商標)、ビダザ(登録商標)、ビンプラスチン、ビンプラスチン硫酸、ビンカサルPfs(登録商標)、ビンクリスチン、ビノレルピン、ビノレルピン酒石酸、VLB、VM-26、ボリノstatt、ボトリエント、VP-16、ブモン(登録商標)、キセロダ(登録商標)、ザノサル(登録商標)、ゼバリン(商標)、ジネカード(登録商標)、ゾラデックス(登録商標)、ゾレドロン酸、ゾリンザ、若しくはゾメタ(登録商標)、及び/又は同様の経路を標的とし、本明細書に特に挙げていない他の任意の薬剤が含まれ得る。

【0100】

組み合わされた治療計画の一部として2つ以上の物質又は成分を用いる場合は、これらは同じ投与経路を介して又は異なった投与経路を介して、実質的に同時に又は別の時に(例えば実質的に同時に、継続して、又は交互の計画に従って)投与することができる。物質又は成分が同じ投与経路を介して同時に投与される場合には、当業者には明らかなように、これらは異なった医薬品製剤若しくは組成物として、又は組み合わされた医薬品製剤若しくは組成物の一部として、投与してよい。

【0101】

また、組み合わされた治療計画の一部として2つ以上の活性物質又は成分を用いる場合には、物質又は成分のそれぞれを、その化合物又は成分をそのまま用いるのと同じ量で、同じ計画に従って投与してよく、そのような併用は相乗効果をもたらすことも、もたらさないこともある。しかし、2つ以上の活性物質又は成分の併用によって相乗効果が得られる場合には、投与すべき物質又は成分の1つ、2つ以上、又は全ての量を減少させ、しかも所望の治療作用を得ることも可能である。これは、例えば1つ以上の物質又は成分をその通常の量で用いた場合にその使用に伴う望ましくない副作用を避け、制限し、又は低減させ、しかも所望の薬学的又は治療的効果を得るために有用である。

【0102】

本出願に従って用いる治療計画の効果は、臨床医には明らかなように、関連する疾患又は障害についてそれ自体、公知の任意の様式で、決定し、及び/又は追跡することができる。臨床医は、適切にかつケースバイケースで、特定の治療計画を変更し又は改変することによって、所望の治療効果を達成し、望ましくない副作用を避け、制限し、又は低減させ、及び/又は一方で所望の治療効果を達成することと他方で望ましくない副作用を避け、制限し、又は低減させることとのバランスを達成することができる。

【0103】

一般に、治療計画は所望の治療効果が達成されるまで、及び/又は所望の治療効果が維持されている間、実行されることになる。この場合も、この期間は臨床医によって決定され得る。

【0104】

種々の実施形態では、1つ又は複数のLIGHT受容体アゴニストタンパク質を含む医薬組成物が単独で、又は予防薬、治療薬、及び/若しくは薬学的に許容される担体と組み合わせて、本明細書に提供される。種々の実施形態では、本明細書に開示する医薬組成物の使用の非限定的な例には、障害の診断、検出、及び/又はモニタリング、障害若しくはその1つ又は複数の症状の予防、治療、処置、及び/又は改善、並びに/又は研究が含まれる。医薬組成物の単独の、又は予防薬、治療薬、及び/若しくは薬学的に許容される担体と組み合わせた製剤は当業者には公知である(米国特許公開第20090311253A1号)。

【0105】

本明細書で用いる「有効量」という語句は、LIGHTの機能不全に関連する又はLIGHT関連疾患又は障害に関連する1つ又は複数のパラメーターにおける検出可能な(例えばベースラインから少なくとも約5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、又はそれを超える)改善をもたらすLIGHTアゴニストタンパク質の量を意味する。

【0106】

本明細書で提供する治療薬を投与する方法には、これだけに限らないが、経口投与、非経口投与(例えば皮内、筋肉内、腹腔内、静脈内及び皮下)、硬膜外投与、腫瘍内投与、粘膜投与(例えば鼻内及び経口経路)、及び肺内投与(例えば吸入器又は噴霧器を用いて投与するエアロゾル化合物)が含まれる。特定の投与経路のための医薬組成物の製剤並びに種々の投与方法のために必要な材料及び手技は利用可能であり、当業者には公知である(米国特許公開第20090311253A1号)。

10

【0107】

種々の実施形態では、投与計画は最適の所望の応答(例えば治療応答又は予防応答)が得られるように調節される。例えば、単回ボーラスを投与してもよく、経時的にいくつかの分割用量を投与してもよく、又は治療状況の要求による指示を受けて用量を比例的に減少させ又は増加させてもよい。いくつかの実施形態では、投与を容易にし、用量を均一にするために、非経口組成物を用量単位形態に製剤化してもよい。「用量単位形態」という用語は、処置すべき哺乳類対象のための単位用量として適した物理的に分離された単位を意味し、各単位は必要な薬学的担体に関連する所望の治療効果を得るために算出された所定量の活性化合物を含む。

20

本明細書で提供するLIGHT受容体アゴニストタンパク質の治療又は予防有効量の例示的で非限定的な範囲は、約0.1～100mg/kg(例えば約0.1～0.5、0.1～1、0.1～10、0.1～20、0.1～50、0.1～75、1～10、1～15、1～7.5、1.25～15、1.25～7.5、2.5～7.5、2.5～15、5～15、5～7.5、1～20、1～50、7～75、1～100、5～10、5～15、5～20、5～25、5～50、5～75、10～20、10～50、10～75若しくは10～100mg/kg、又はその間の任意の濃度)である。いくつかの実施形態では、LIGHT受容体アゴニストタンパク質は医薬組成物中に治療有効濃度で、例えば約0.1～100mg/mlの濃度(例えば約0.1～0.5、0.1～1、0.1～10、0.1～20、0.1～50、0.1～75、1～10、1～20、1～50、1～75、1～100、5～10、5～15、5～20、5～25、5～50、5～75、10～20、10～50、10～75若しくは10～100mg/ml、又はその間の任意の濃度)で存在する。用量値は緩和すべき病状の型及び/又は重篤度によって変動することに注目されたい。いかなる特定の対象に対しても、特定の用量計画は個別の必要性及び/又は組成物を投与する者若しくは投与を監督する者の専門的判断によって時とともに調節できること、並びに本明細書で説明する用量範囲は例示的のみであって特許を請求する組成物の範囲又は実施を限定することを意図していないことを更に理解されたい。

30

【実施例】

【0108】

(実施例1)

LIGHT受容体アゴニストタンパク質の製造

40

A) アミノ酸Met1～Gly20

Igカッパシグナルペプチド、アミノ酸Gly20の後の推定されるシグナルペプチダーゼ切断部位

B) アミノ酸Glu21～Val170

ヒトLIGHTの第1の可溶性サイトカインドメイン(LIGHT、配列番号1のアミノ酸91～240)

C) アミノ酸Gly171～Ser178

配列番号2の第1のペプチドリンカー要素

D) アミノ酸Pro179～Val325

ヒトLIGHTの第2の可溶性サイトカインドメイン(LIGHT、配列番号1のアミノ酸94～240)

E) アミノ酸Gly326～Ser329

50

配列番号11の第2のペプチドリンカー要素

F) アミノ酸Pro330～Val476

ヒトLIGHTリガンドの第3の可溶性サイトカインドメイン(LIGHT、配列番号1のアミノ酸94～240)

G) アミノ酸Gly477～Cys497

配列番号16のヒンジリンカー要素

H) アミノ酸Pro498～Lys715

配列番号13の抗体Fc断片ドメイン

【0109】

上記のLIGHT受容体アゴニストタンパク質を配列番号25に示す。

10

【0110】

示されたリンカーを、例えば配列番号3～12に示すように、他の好ましいリンカーで置き換えてよい。

【0111】

示されたヒンジリンカー要素を、例えば配列番号19～24に示すように、他の好ましいヒンジリンカーで置き換えてよい。

【0112】

第1及び第2のペプチドリンカーは同一でなくてもよいことに注目されたい。

【0113】

シグナルペプチド配列(A)は、他の任意の好適な、例えば哺乳類のシグナルペプチド配列で置き換えてよい。

20

【0114】

1.2 ポリペプチドをコードする遺伝子カセット

合成遺伝子は好適な宿主細胞、例えば昆虫細胞又は哺乳類細胞における発現のためのコードンの使用に鑑みて最適化される。好ましい核酸配列を配列番号37に示す。

【0115】

(実施例2)

発現及び精製

2.1 融合ポリペプチドのクローニング、発現及び精製

上述の融合タンパク質は、下記の方法によって2つの異なった真核宿主細胞内で組み換えにより発現される。

30

【0116】

LIGHT受容体アゴニスト融合タンパク質の小スケール発現の方法

上述のLIGHT受容体アゴニスト融合タンパク質の初期の解析のため、10%のFBS、100unit/mlのペニシリン及び100[μg/ml]のストレプトマイシンを補ったDMEM+GlutaMAX(GibCo)中で増殖させたHek293細胞に、融合ポリペプチドのための発現カセット及び好適な選択マーカー、例えばプラスチシン、プロマイシン又はヒグロマイシン耐性遺伝子を含む機能性発現カセットを含むプラスミドを一時的にトランスフェクトする。これらの例では、最終生成物を得るために複数のポリペプチド鎖が必要な場合には、トランスフェクションの間、発現カセットは1つのプラスミドに結合するか、異なったプラスミドの上に位置することになる。トランスフェクションの3日後に組み換え融合ポリペプチドを含む細胞培養上清が回収され、300Xでの遠心で清澄化され、続いて0.22 μmの無菌フィルターで濾過される。

40

【0117】

LIGHT受容体アゴニスト融合タンパク質の大スケール発現及び精製の方法

インビオで用いるLIGHT受容体アゴニスト融合タンパク質の大スケール発現のため、上述のタンパク質をコードする合成DNAカセットを、適切な選択マーカー(例えばプラスチシン、プロマイシン又はヒグロマイシン耐性遺伝子を含む機能性発現カセット)及び宿主細胞ゲノム中でトランスクリプション活性の挿入部位の数を増大させるために好適な遺伝要素を含む真核細胞発現ベクターに挿入する。配列を検証した発現ベクターを、懸濁に適

50

合したチャイニーズハムスター卵巣細胞(CHO-S、Invitrogen)にエレクトロポレーションによって導入する。トランスフェクトした細胞に、トランスフェクション後3日間、適切な選択圧を適用することになる。選択圧の下に培養を続けることにより、ベクター由来の耐性遺伝子を有する生存細胞を回収する。選択した細胞プールを、軌道振盪インキュベーター(100rpm、振盪長50mm)中、37 及び7%CO₂雰囲気下、化学的に定義された培地(PowerCH02-CD、Lonza)中で安定的に増殖させ、個別の上清をELISAアッセイによって分析し、上述のタンパク質及びタンパク質の產生の前に浸透フラスコ(軌道振盪器、100rpm、振盪長50mm)中で増殖した最大の特異的產生能を有する細胞プールを検出する。

【 0 1 1 8 】

実験室スケールのタンパク質產生のため、個別の細胞プールを、Waveバイオリアクター 10/50EHT(GE-Healthcare)中、37 及び7%CO₂雰囲気下、化学的に定義された培地(PowerCH 02-CD、Lonza)中で7~12日間、培養する。基本培地は4mMのグルタマックスを添加したPowerCH02-CDである。生細胞濃度0.3~0.4×10e6細胞/ml及び以下の設定(5リットル又は10リットルのバッグについて)振盪頻度18rpm、振盪角7°、気流0.2~0.3L/分、7%CO₂、36.5でWave培養を開始する。Wave培養の間、細胞培養液にPowerFeed A(Lonza)を2回、通常2日目(20%供給)及び5日目(30%供給)に供給する。2回目の供給の後、振盪頻度を22rpmに、また振盪角を8°に増加させる。

【 0 1 1 9 】

バイオリアクターは通常7日目と12日目の間に、細胞の生存率が80%未満に低下した際に回収する。最初に、手動のデプスフィルターシステム(Millipore Millistak Pod、MC0HC 0.054m²)を用いて培養上清を清浄化する。Strep-tagを結合したタンパク質については、アビジンを加えて最終濃度を0.5mg/Lにする。最後に、ボトルトップフィルター(0.22 μm、PES、Corning)を用いてLIGHT受容体アゴニスト融合タンパク質を含む培養上清を無菌濾過し、さらなる処理まで2~8 に保存する。

【 0 1 2 0 】

アフィニティ精製のため、ストレプトアクチニセファロースをカラムに充填し(ゲルベッド2ml)、15mlの緩衝液W(100mM Tris-HCl、150mM NaCl、pH8.0)又はPBS pH7.4で平衡化し、細胞培養上清を流量約4ml/分でカラムに加える。続いてカラムを15mlの緩衝液Wで洗浄し、7×1mlの緩衝液E(100mM Tris-HCl、150mM NaCl、2.5mMデスチオビオチン、pH8.0)を加えることによって、結合したポリペプチドを段階的に溶出させる。或いは、2.5mMのデスチオビオチンを含むPBS pH7.4をこのステップに用いてもよい。

【 0 1 2 1 】

ストレプトアクチニセファロース系の方法の代わりに、アフィニティリガンドとして固定化されたプロテインAを含むカラムとAktaクロマトグラフィーシステム(GE-Healthcare)を用いるアフィニティ精製が実施される。融合タンパク質のFcドメインに高いアフィニティを有する固相材料:MABSelect Sure(商標)(GE-Healthcare)を選択した。簡単に述べると、洗浄緩衝液-1(20mM Pi、95mM NaCl、pH7.2)で平衡化したHiTrap MabSelectSureカラム(CV=5ml)に、清浄化した細胞培養上清を、ロード量がカラムベッド1mlあたり融合タンパク質10mgを超えないようにロードする。カラム体積の10倍(10CV)の上述の平衡緩衝液でカラムを洗浄し、次いでカラム体積の4倍(4CV)の洗浄緩衝液-2(20mM Pi、95ml NaCl、pH8.0)でカラムを洗浄して、宿主細胞タンパク質及び宿主細胞DNAを除去する。次いでカラムを溶出緩衝液(20mM Pi、95mM NaCl、pH3.5)で溶出させ、各分画がカラムベッド体積(5ml)に等しい体積を有する10個の分画まで溶出液を収集する。各分画を等体積の上述の洗浄緩衝液-2で中和する。線速度を150cm/時に設定し、上述のアフィニティクロマトグラフィー法の間、一定に保つ。溶出分画のタンパク質量を定量し、ピーク分画を超濾過によって濃縮し、サイズ排除クロマトグラフィー(SEC)によって更に精製する。

【 0 1 2 2 】

上述の方法を用い、組み換えLIGHT受容体アゴニスト融合タンパク質(プロテインA、配列番号15及びプロテインB、配列番号31)をCHO-S細胞で発現し、アフィニティクロマトグラフィーによって精製した。

10

20

30

40

50

【0123】

いずれもグリコシル化された、非対称リンカー及び短縮されたLIGHTドメインを有するプロテインA(配列番号15)並びに対称リンカーを有するプロテインB(配列番号31)の分析用サイズ排除クロマトグラフィーを図6に示す。

【0124】

SECはTosoh TSKgel G3000SWx1カラムを用い、1260 Infinity HPLCシステムで実施した。カラムにはタンパク質を0.94mg/ml(A)又は0.77mg/ml(B)の濃度、全量20μlでロードした。流量は0.5ml/分とした。16.24分にプロテインA(図6、パートA)、15.84分にプロテインB(図6、パートB)の単一の主ピークが観察される。その結果、プロテインBはグリコシル化されたリンカー(iv)によってより大きな見かけの分子量を有する。両方のタンパク質はAF Cのみによって調製しており、凝集物がないので高い溶解性を示す。内部分子量標準(BioR ad社SEC Standard)を用いることによって、それぞれの保持時間からプロテインA及びプロテインBの分子量を内挿することができる。

【0125】

精製した融合ポリペプチドの自然の条件下における見かけの分子量を決定するため、Superdex 200カラムに既知の分子量の標準タンパク質をロードした。標準タンパク質の溶出体積に基づいて較正曲線をプロットし、精製した融合ポリペプチドの見かけの分子量を決定した。LIGHT受容体アゴニスト融合タンパク質を含むFcドメインはSuperdex 200カラムから典型的には見かけの分子量約160~180kDaで溶出し、成熟LIGHT受容体アゴニスト融合ポリペプチドのFcドメインによるホモ二量体化が確認された。

【0126】

(実施例3)

温度安定性の決定

高温におけるプロテインA(scLIGHT-RBD-Fc)の安定性を評価した。そのため、このタンパク質を指定された温度でインキュベーター中に10分曝し、次いで氷冷した。次いでその受容体HVEMに対する結合活性を以下のELISAアッセイによって評価した。

【0127】

プレートをHVEM-Fcによってコートした。プロテインA(熱処理及び非処理対照)をプレートに加え、次いでStrep-Tactin-HRPを用いてそのStrep-tagを検出した。非処理対照の結合活性を100%とした。100%未満の値は受容体に対する結合活性の喪失を示す。

【0128】

濃度75ng/mlにおけるプロテインAの温度安定性評価の結果を以下にまとめる。

【0129】

【表8】

	プロテインA (scLIGHT-RBD-Fc) 受容体への相対的結合[%]
対照	100
50°C	87
60°C	91
70°C	95
80°C	91

【0130】

驚くべきことに、プロテインA(scLIGHT-RBD-Fc)は高温に曝されても非常に安定である。80℃で10分のインキュベーションでも、受容体HVEMへの結合の関連のある減少は見られなかった。

10

20

30

40

50

【0131】

(実施例4)

三価の対照タンパク質

六価のLIGHT受容体アゴニスト融合タンパク質とバクテリオファージRB69-FOLDONで安定化された三価のLIGHT-RBDとの間の相対的結合を比較するため、CHO-S細胞中でプロテインX(配列番号38)を発現し、以前のセクションに記載したように精製した。以下の実施例ではSECで精製したタンパク質を対照として用いた。プロテインX(配列番号38)の配列をTable 7(表9)に示す。プロテインXのアミノ酸1~20はシグナルペプチドを表し、成熟タンパク質はアミノ酸Glu51から開始する。このタンパク質は、それぞれが1つの可溶性LIGHTドメイン(配列番号1のE91~V240)を含む3つの同一のポリペプチドからなっており、この会合体は可撓性リンカーとともにLIGHTのC末端に融合したバクテリオファージRB69のフィブリチンの三量体化ドメインによって安定化されている。

【0132】

【表9】

Table 7:シグナルペプチドを含む三価の対照タンパク質

配列番号	配列
38 (プロテインX)	METDTLLVFVLLWWVPAGNGEVNPAAHILTGANSSLTGSGGPLLWETQLGLAFL RGLSYHDGALVVTKAGYYYIYSKVQLGGVGCPGLASTITHGLYKRTPRYPEE LELLVSQQSPCGRATSSSRVWWDDSSFLGGVVHLEAGEEVVVRVLDERLVRLRD GTRS YFGAFMVGSGSSGSSGSGSYIEDAPSDGKFYVRKDGA WVELPTASGP SSSSSSAWSHPQFEK.

【0133】

(実施例5)

制限プロテアーゼ消化によるLIGHT受容体アゴニストタンパク質のインピトロ安定性の決定

実施例1に記載したように、検討すべき全てのLIGHT受容体アゴニストタンパク質を発現し、六価のFc融合タンパク質として精製する。セットは、CH2ドメインのN297S変異(EU番号付けシステムによる)、及び3つのジスルフィド架橋の生成が可能で、更に上部ヒンジのリジン(EU番号付けシステムによるK223)がグリシンに変異(K223G)して欠落しているヒンジ領域を含むLIGHT受容体アゴニストタンパク質を含んでいる。制限プロテアーゼ消化アッセイにおいて、3つのジスルフィドを可能にするヒンジの文脈でN297S変異及びK223G変異を同時に含む上述のLIGHT受容体アゴニストタンパク質を、2つのジスルフィド又は3つのジスルフィドのいずれかを可能にするヒンジ領域の文脈でN297S変異を含むがK223野生型は存在するLIGHT受容体アゴニストタンパク質と比較することになる。

更に、4アミノ酸に還元された第2のリンカー要素(iv)及び短縮されたヒンジ要素(vi)を有するLIGHT受容体アゴニストタンパク質を検討する。両方の組み換え戦略(3つのジスルフィドを可能にするヒンジ領域の文脈でのN297SとK223Gの変異の組合せ)及びリンカー要素の短縮(iv及びvi)は、それぞれの分子の安定性に影響する可能性がある。

本発明の異なったLIGHT受容体アゴニストタンパク質の安定性は、インピトロの制限プロテアーゼ消化によって取り扱うことができる。この分析のため、上述のLIGHT受容体アゴニストタンパク質を、異なった時間、異なった温度(例えば4、25、37)で、低濃度のプロテアーゼ(例えばトリプシン、V8プロテアーゼ)とともにインキュベートする。続いて、特定のタンパク分解断片の定量及びその外観を時間にわたって異なった方法、例えばSDS-PAGE、分析用SEC又は当技術で公知の分析用マススペクトリー法(例えばナノRP-HPLC-ESI-MSMS)によって測定することができる。検討するタンパク質はその配列の大部分を

10

20

30

40

50

共通して有するので、個別のタンパク質から時間にわたって特定のタンパク分解断片がより速く出現し、その量が多いことを用いて、その相対的安定性を判定し、互いに順位を付けることができる。検討した上述のLIGHT受容体アゴニストタンパク質のプロテアーゼに基づくデコイ動力学に関して、そのタンパク分解安定性に関する以下の順序が予想される。

【 0 1 3 4 】

N297S及びK223G並びに3つのジスルフィドを可能にするヒンジ領域を含むLIGHT受容体アゴニストタンパク質は同時に、ヒンジ領域にN297Sと野生型K223とを含むLIGHT受容体アゴニストタンパク質と比較して長期の安定性を有している。ヒンジリンカーとして配列番号21を含むLIGHT受容体アゴニストタンパク質は、ヒンジリンカー要素として配列番号16を含むLIGHT受容体アゴニストタンパク質と比較して長期の安定性を有している。

10

【 0 1 3 5 】

(実施例6)

半減期の決定

プロテインA分子は3つの鎖間ジスルフィド結合によって共有結合で連結された2つのポリペプチドからなっており、ヒンジリンカーにK223G変異、並びにFc領域にN297S変異(EU番号付けシステムによる)を含み、その結果、CH2ドメインは非グリコシル化されている。精製されたプロテインAのマウスにおける半減期を試験した。

【 0 1 3 6 】

雌CD1マウスに1.0mg/kgのプロテインAを単回静脈内ボーラス注射として投与した。適用の前(投与前)、及び試験物質投与後312時間まで、全血を採取した。血清を調製し、試料は血清濃度の決定まで-80°で保存した。

20

【 0 1 3 7 】

マウス血清中のプロテインA濃度の定量を、Table 8(表10)に示すHVEMアゴニストを検出するELISAアッセイで行なった。プレートは HVEM -Fcでコートした。次いで、その受容体 HVEMに特異的に結合するLIGHT構築物を、StrepTactin-HRPを用いるStrep-tagによって検出した。ELISAアッセイは参照プロテインAを較正及び対照試料として用いて行った。標準濃度の測定データを用い、5パラメーターフィットで較正曲線を作成した。これにより、それぞれのマウス血清試料中の未知のプロテインAの濃度の決定ができた。

【 0 1 3 8 】

30

平均血清濃度及び非コンパートメント薬物動態学データ解析のための薬物動態学評価プログラムPK Solutionsバージョン2.0(Summit Research Services, Montrose, CO)を用いて薬物動態学パラメーターを算出した。PK Solutionsは自動化されたエクセルをベースとしたアプリケーションであり、例えば静脈内又は血管外経路の投与に続く生物学的試料の分析で得られた濃度-時間データから薬物動態学パラメーターを計算する。PK Solutionsは特定のコンパートメントモデルを全く仮定せずに結果を算出する。

【 0 1 3 9 】

薬物動態学評価の結果をTable 8(表10)にまとめる。

【 0 1 4 0 】

【表10】

Table 8:CD-1マウスにおける予備的なPK研究の結果:1mg/kgのプロテインAの単回静脈内投与

脈内投与

	プロテインA
t_{max} (h)	0.083
C_{max} (μ g/ml)	12.8
t_{last} (h)	192
C_{last} (μ g/ml)	0.141
$t_{1/2 E}$ (h)	36.47
$t_{1/2 E}$ (d)	1.52
AUC_{0-t} (μ g*h/ml)	346
AUC_{0-inf} (μ g*h/ml)	353

10

20

【0141】

結果は、プロテインAがマウスにおいて36.47時間と驚くほど短い終末半減期を有していることを示している。LIGHT受容体アゴニストタンパク質との共刺激による刺激は短いことが望ましいので、この短い半減期は好ましい治療選択肢の要素となる。

【0142】

(実施例7)

安定性/凝集試験

30

実施例2に記載したように分析用SECによってモノマー及び凝集物の含量を決定する。この特定の目的のため、生理学的pHで生理学的食塩濃度を含む緩衝液(例えば0.9% NaCl、pH 7.4、PBS pH7.4)中で分析を行なう。典型的な凝集分析はSuperdex200カラム(GE Healthcare)で行なう。このカラムは10~800kDaの範囲のタンパク質を分離する。

【0143】

天然条件下における精製された融合ポリペプチドの見かけの分子量を決定するため、Superdex200カラムに既知分子量の標準タンパク質をロードする。標準タンパク質の溶出体積に基づいて較正曲線をプロットし、未知分子量の精製された融合タンパク質の見かけの分子量を溶出体積に基づいて算出する。

【0144】

40

可溶性の非凝集タンパク質のSEC分析により、典型的には定義された溶出体積に明確な单一のタンパク質ピーク(OD 280nm又はOD 214nmで測定)が示される。この溶出体積は特定のタンパク質の見かけの天然の分子量に対応する。Fc融合タンパク質の場合の「モノマー」の定義に関して、2つのポリペプチド鎖の会合がタンパク質のFc部分によって促進され、機能性単位は2つの鎖からなるタンパク質である。Fc融合タンパク質の場合には、二量体化一本鎖融合ポリペプチドであるか否かに関わらず、2つのFc連結ポリペプチド鎖を含むこの単位が「モノマー」と定義される。

【0145】

タンパク質の凝集が起こった場合には、SEC分析はより低い保持体積にさらなるタンパク質のピークを示す。タンパク質オリゴマーは凝集の種として働く可能性があり、高含量

50

のオリゴマーはタンパク質の凝集をもたらす可能性がある。高分子量のオリゴマー及び凝集物はSuperdex200カラムのボイド体積に溶出し、その天然の分子量に関してSECで分析することができない。

【0146】

LIGHT受容体アゴニスト融合タンパク質の精製された製剤は、定義されたモノマータンパク質のみ及び極めて少量のオリゴマータンパク質のみを含むことが好ましい。特定のLIGHT受容体アゴニスト融合タンパク質製剤の凝集/オリゴマー化の程度はSEC分析に基づき、定義されたモノマー及びオリゴマー/凝集物分画のそれぞれについてのOD280ダイアグラムのピーク面積を算出することによって決定される。全ピーク面積に基づいて、定義されたモノマータンパク質の百分率は以下のように算出される。

10

$$\text{モノマー含量 [\%]} = [\text{モノマータンパク質のピーク面積}] / [\text{全ピーク面積}] \times 100$$

【0147】

(実施例8)

三価及び六価のLIGHT受容体リガンド構築物のQCM分析による平衡結合定数の決定

三価及び六価のプロテインX及びプロテインAの平衡結合定数(K_D)は、自動化バイオセンサーシステム(Attana A100)によって決定される動的結合データ(k_{on} 及び k_{off})に基づいて算出される。A100により、クオーツ結晶マイクロバランス(QCM)手法に基づいてリアルタイムで分子間相互作用を検討することができる。

この目的のため、カルボキシル活性化QCMチップの表面にヒトLIGHT受容体を固定化する。続いて、三価又は六価のプロテインX又はプロテインAをそれぞれ、異なった濃度(例えば0.5、1、2、5及び10 μg/ml)で被分析物質として用いて、リガンド-受容体結合(k_{on})及び解離(k_{off})の動的結合データを解析する。解析はリアルタイムで行なわれ、対応する K_D を算出することができる。 $K_D = k_{off} / k_{on}$ 。

20

QCM解析から、三価のプロテインXは対応する固定化LIGHT受容体に低いnM範囲の K_D で結合し、 K_D の予想値は1~100nMであることが示される。しかし、プロテインAの六価の構築物は対応する固定化LIGHT受容体に対してpM範囲の高い結合親和性を示し、 K_D の予想値は1~1000pMである。動的結合データ(k_{on} 及び k_{off})の共通の特徴は六価の構築物が三価の構築物と比較してより速い k_{on} を示すことである。更に、六価のリガンドは三価のリガンドと比較すればより遅い解離(k_{off})が一般に観察される。

【0148】

30

(実施例9)

ヒト乳癌及び結腸癌細胞における三価及び六価のLIGHT受容体リガンド構築物によるアポトーシスの誘導

ヒト乳がん細胞株MDA-MB-231及びヒト結腸がん細胞株HT-29を、種々の量のIFN (1~100U/ml)と組み合わせた種々の濃度(0.1ng/ml ~ 100 μg/ml)のプロテインX及びプロテインAとインキュベートする。細胞を37 °CでIFN 及びプロテインX又はプロテインAの存在下で、24時間、48時間又は72時間インキュベートする。それぞれの時点での細胞を収穫し、フローサイトメトリー分析のために処理して、ヨウ化プロピジウム(PI)のDNA等の二本鎖核酸への結合及びアネクシンVの上方制御を評価する。PIの結合とアネクシンVの上方制御の両方は、アポトーシスによる細胞死の誘導の重要な指標である。

40

【0149】

IFN 又はプロテインA又はプロテインX単独で培養した細胞と比較して、プロテインA及びプロテインXは両方ともPI及びアネクシンV二重陽性細胞集団を顕著に増大させるという意味で、プロテインA及びプロテインXによって発揮される補助的な効果が観察されることが予想される。この補助的な効果はMDA-MB-231細胞及びHT-29細胞の両方で正しく維持されているようであるが、HT-29細胞の場合により顕著である。これは、プロテインX及びプロテインAがIFN の存在下で、ある種のヒトがん細胞株のアポトーシスを加速し得ることを暗示している。

【0150】

(実施例10)

50

ヒトインビトロT細胞増殖アッセイ

健常なドナーの末梢血から全(ヒト)T細胞をネガティブ選択及び磁性ビーズ(パンT細胞分離キット、Miltenyi Biotec社)によって精製し、CFSE(フローサイトメトリー用CellTrace(商標)CFSE Cell Proliferation Kit、ThermoFisher社)で染色し、ウェルあたり 2×10^6 細胞で24ウェルプレートに播種した。細胞を培地のみ、可溶性抗CD3抗体(クローナーOKT3、 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$)のみ、抗CD3抗体及び抗CD28抗体(クローナー28.2、 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$)、又は抗CD3抗体及びそれぞれ10、100又は $1000\text{ng}/\text{ml}$ の成熟プロテインA(配列番号27)と、37℃で5日間インキュベートした。

【0151】

5日目に細胞を洗浄し、DAPI(死細胞を除外するため)及び特異抗体で染色した。Guava EasyCyte 12 フローサイトメーター(EMD Millipore社)を用いるフローサイトメトリーにより、前方散乱(FSC又はサイズ)及びCFSE希釈(増殖の測定)の発現を測定した。データ解析はFlowJo 10.1ソフトウェア(FlowJo ,LLC社)を用い、試料あたり最低1万個の記録した事象について行なった。正しいゲート位置を決定するため培地対照を用いて前方散乱及びCFSEについてゲーティングすることによって、応答する細胞の百分率を決定した。細胞のサイズが増大したか、CFSEレベルが低下した細胞を、応答する細胞としてラベルした。1人のドナーからの2つの生物学的複製物の個別のデータを下表「T細胞活性化の定量」に示す。これらの結果はさらなるドナーからの結果と一致する。

【0152】

このデータは、インビトロにおけるヒトT細胞のプロテインAによる処理によって、抗体刺激のみと比較してT細胞の活性化及び増殖が増大することを明白に示している。

【0153】

【表11】

T細胞活性化の定量:

インビトロでのプロテインAによる処理の後のヒトT細胞活性化		
	応答した細胞の%	
刺激	試料1	試料2
培地	3	3
抗 CD3	56	62
抗 CD3/28	87	85
抗 CD3+プロテインA $10\text{ng}/\text{ml}$	69	58
抗 CD3+プロテインA $100\text{ng}/\text{ml}$	68	66
抗 CD3+プロテインA $1000\text{ng}/\text{ml}$	59	57

【符号の説明】

【0154】

- 1 scLIGHT-RBD
- 2 CH2ドメイン
- 3 CH3ドメイン
- 4 ヒンジ-システイン
- 5 N297位に結合したCH2糖鎖
- 6 上側ヒンジリジン(K223)

10

20

30

40

【図1】

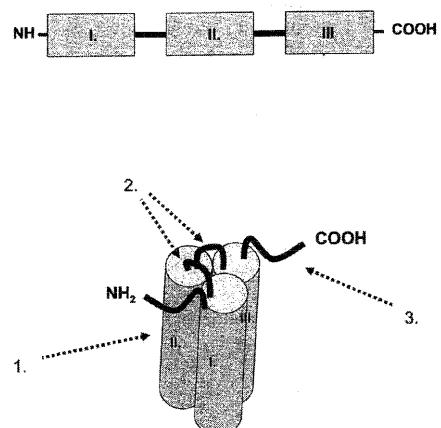


Figure 1

【図2】

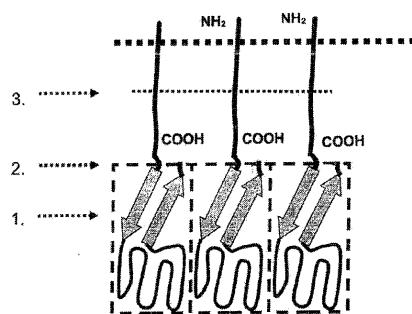


Figure 2

【図3】

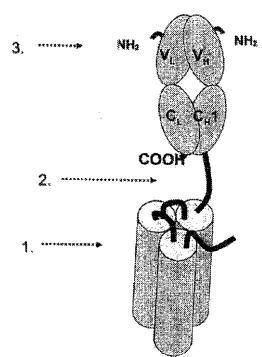


Figure 3

【図4】

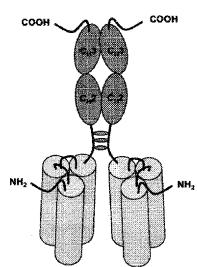
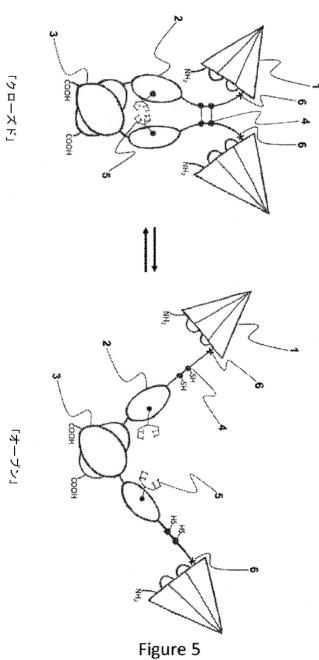


Figure 4

Figure 4

【図5】



【図6】

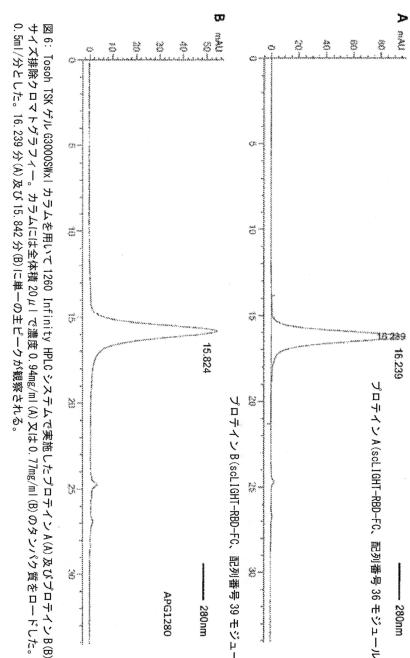


Figure 6

【配列表】

0006873119000001.app

 フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I	
C 1 2 N	1/15	(2006.01)	C 1 2 N	1/15
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	5/10
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 P	35/00
A 6 1 P	31/00	(2006.01)	A 6 1 P	31/00
A 6 1 P	29/00	(2006.01)	A 6 1 P	29/00
A 6 1 P	37/06	(2006.01)	A 6 1 P	37/06
A 6 1 P	3/00	(2006.01)	A 6 1 P	3/00
A 6 1 K	38/16	(2006.01)	A 6 1 K	38/16

(72)発明者 クリストイアン・ギーフェルス
ドイツ・6 9 2 2 1 ・ドッセンハイム・ブリュッテンヴェーク・1 2

(72)発明者 オリヴァー・ヒル
ドイツ・6 9 2 3 9 ・ネッカーシュタイナッハ・グライナー・シュトラーセ・4 0

(72)発明者 マイノルフ・ティーマン
ドイツ・6 9 1 9 8 ・シュリースハイム・メリッセンヴェーク・1 8

(72)発明者 ティム・シュニーダー
ドイツ・9 7 9 9 9 ・イガースハイム・タウバーヴェーク・2

審査官 坂井田 京

(56)参考文献 特表2 0 1 1 - 5 2 8 5 6 2 (J P , A)
特表2 0 0 8 - 5 3 7 9 4 1 (J P , A)
国際公開第2 0 1 4 / 2 0 2 7 7 3 (WO , A 1)

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)

C 0 7 K	1 / 0 0 - 1 9 / 0 0
C 1 2 N	1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0
UniProt / GeneSeq	
GenBank / EMBL / DDBJ / GeneSeq	
Capulus / WPI DS / MEDLINE / EMBASE / BIOSIS (STN)	