

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7549536号
(P7549536)

(45)発行日 令和6年9月11日(2024.9.11)

(24)登録日 令和6年9月3日(2024.9.3)

(51)国際特許分類		F I		
C 0 7 K	14/01 (2006.01)	C 0 7 K	14/01	Z N A
C 0 7 K	19/00 (2006.01)	C 0 7 K	19/00	
C 1 2 N	15/34 (2006.01)	C 1 2 N	15/34	
C 1 2 N	15/62 (2006.01)	C 1 2 N	15/62	Z
C 1 2 N	15/63 (2006.01)	C 1 2 N	15/63	Z
		請求項の数 40		(全88頁) 最終頁に続く
(21)出願番号	特願2020-569166(P2020-569166)	(73)特許権者	524246920	
(86)(22)出願日	令和1年6月14日(2019.6.14)		アミル テラピューティクス エスエールエル	
(65)公表番号	特表2021-527407(P2021-527407 A)		ベルギー国 4 0 0 0 リエージュ, ブ	
(43)公表日	令和3年10月14日(2021.10.14)		ールヴァール パティエンス エ ボージ	
(86)国際出願番号	PCT/US2019/037179	(74)代理人	100078282	
(87)国際公開番号	WO2019/241628		弁理士 山本 秀策	
(87)国際公開日	令和1年12月19日(2019.12.19)	(74)代理人	100113413	
審査請求日	令和4年5月24日(2022.5.24)		弁理士 森下 夏樹	
(31)優先権主張番号	62/685,757	(74)代理人	100181674	
(32)優先日	平成30年6月15日(2018.6.15)		弁理士 飯田 貴敏	
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(74)代理人	100181641	
(31)優先権主張番号	62/749,499		弁理士 石川 大輔	
(32)優先日	平成30年10月23日(2018.10.23)	(74)代理人	230113332	
	最終頁に続く		弁護士 山本 健策	最終頁に続く

(54)【発明の名称】 全般的アミロイド相互作用モチーフ (G A I M)

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

配列番号16のアミノ酸配列のバリエントを含むポリペプチドであって、前記バリエントが：

- a) 任意のアミノ酸でのT50の置換およびH55T；
- b) N137G；
- c) N142A；
- d) R143VおよびQ144N；または
R143V、Q144N、およびA146V；または
R143V、Q144N、およびA146T；または
R143V、Q144N、およびA146K；ならびに
- e) Q156V、G157N、ΔT158、ΔD159、ΔP160、およびV161G；または
Q156Y、G157N、ΔT158、ΔD159、ΔP160、およびV161G；または
G157N、ΔT158、ΔD159、ΔP160、およびV161G；または
ΔT158、ΔD159、ΔP160、およびV161G
- から選択されるアミノ酸変化の1つまたは複数のセットによって配列番号16とは異なり、前記バリエントが必要に応じて：
- f) ΔM1；または

Δ M 1 および Δ A 2 ; ならびに

g) シス테인以外の任意のアミノ酸での N 3 8 の置換 ; または

シス테인以外の任意のアミノ酸での N 3 8 の置換、およびシス테인以外の任意のアミノ酸での G 4 0 の置換 ; または

シス테인、トレオニン、もしくはセリン以外の任意のアミノ酸での G 4 0 の置換から選択されるアミノ酸変化の 1 つまたは複数のセットによって配列番号 1 6 とはさらに異なるポリペプチド。

【請求項 2】

前記 T 5 0 置換が、T 5 0 G、T 5 0 H、T 5 0 K、および T 5 0 R からなる群から選択される、請求項 1 に記載のポリペプチド。

【請求項 3】

前記 T 5 0 置換が T 5 0 H である、請求項 2 に記載のポリペプチド。

【請求項 4】

前記バリエーションが、少なくとも Δ M 1 および Δ A 2 によって配列番号 1 6 とは異なる、請求項 1 に記載のポリペプチド。

【請求項 5】

前記バリエーションが、少なくとも N 1 3 7 G および / または N 1 4 2 A によって配列番号 1 6 とは異なる、請求項 1 から 4 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 6】

前記バリエーションが :

a) 任意のアミノ酸での T 5 0 の置換、および H 5 5 T ; ならびに

b) R 1 4 3 V および Q 1 4 4 N ; または

R 1 4 3 V、Q 1 4 4 N、および A 1 4 6 V ; または

R 1 4 3 V、Q 1 4 4 N、および A 1 4 6 T ; または

R 1 4 3 V、Q 1 4 4 N、および A 1 4 6 K

から選択されるアミノ酸変化の 1 つまたは複数のセットによって配列番号 1 6 とはさらに異なる、請求項 4 に記載のポリペプチド。

【請求項 7】

前記 T 5 0 置換が、T 5 0 G、T 5 0 H、T 5 0 K、および T 5 0 R からなる群から選択される、請求項 6 に記載のポリペプチド。

【請求項 8】

前記 T 5 0 置換が T 5 0 H である、請求項 7 に記載のポリペプチド。

【請求項 9】

配列番号 1 6 の前記バリエーションが、配列番号 1 9、配列番号 2 0、配列番号 2 1、配列番号 2 2、配列番号 2 3、配列番号 2 4、配列番号 2 5、および配列番号 2 6 からなる群から選択される、請求項 1 に記載のポリペプチド。

【請求項 10】

免疫グロブリン定常領域をさらに含む、請求項 1 から 9 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項 11】

前記免疫グロブリン定常領域配列が、ヒト I g G の F c 部分である、請求項 10 に記載のポリペプチド。

【請求項 12】

請求項 1 から 9 のいずれか一項に記載のポリペプチドおよびヒト I g G の F c 部分からなる、請求項 11 に記載のポリペプチド。

【請求項 13】

前記ヒト I g G がヒト I g G 1 である、請求項 12 に記載のポリペプチド。

【請求項 14】

a) 配列番号 2 9 ;

b) 配列番号 3 0 ;

10

20

30

40

50

- c) 配列番号 3 1 ;
- d) 配列番号 3 2 ;
- e) 配列番号 3 3 ;
- f) 配列番号 3 4 ;
- g) 配列番号 3 5 ; および
- h) 配列番号 3 6 ;

から選択されるアミノ酸配列からなるポリペプチドであって、
前記ポリペプチドが、必要に応じて：

- i) $\Delta M 1$; または
 $\Delta M 1$ および $\Delta A 2$; ならびに
- j) $\Delta K 4 8 5$

から選択されるアミノ酸変化の 1 つまたは複数のセットを有するポリペプチド。

【請求項 1 5】

請求項 1 から 1 4 のいずれか一項に記載のポリペプチドおよび薬学的に許容される担体を含む医薬組成物。

【請求項 1 6】

請求項 1 から 1 4 のいずれか一項に記載のポリペプチドをコードする核酸を含むポリヌクレオチド。

【請求項 1 7】

前記ポリペプチドをコードする前記核酸が、配列番号 3 7、配列番号 3 8、配列番号 3 9、配列番号 4 0、配列番号 4 1、配列番号 4 2、配列番号 4 3、および配列番号 4 4 から選択される配列を含む、請求項 1 6 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 1 8】

前記ポリペプチドをコードする前記核酸が、配列番号 4 5、配列番号 4 6、配列番号 4 7、配列番号 4 8、配列番号 4 9、配列番号 5 0、配列番号 5 1、および配列番号 5 2 から選択される配列からなる、請求項 1 6 に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 1 9】

請求項 1 6 から 1 8 のいずれか一項に記載の核酸を含むベクター。

【請求項 2 0】

請求項 1 9 に記載のベクターを含む宿主細胞。

【請求項 2 1】

昆虫細胞、真菌細胞、植物細胞、細菌細胞、哺乳動物細胞、およびトランスジェニック動物細胞からなる群から選択される、請求項 2 0 に記載の宿主細胞。

【請求項 2 2】

HEK 293 細胞、HEK 293 由来細胞、CHO 細胞、CHO 由来細胞、HeLa 細胞、および COS 細胞からなる群から選択される、請求項 2 1 に記載の宿主細胞。

【請求項 2 3】

アミロイドに結合するタンパク質を作製する方法であって、請求項 1 9 に記載のベクター中の核酸によってコードされるタンパク質を発現させるステップ、および前記発現されたタンパク質を単離するステップを含む方法。

【請求項 2 4】

アミロイドを低減させる、アミロイド形成を阻害する、アミロイド凝集を阻害する、または毒性オリゴマーを除去および／もしくはその形成を防止することを必要とする対象においてアミロイドを低減させる、アミロイド形成を阻害する、アミロイド凝集を阻害する、または毒性オリゴマーを除去および／もしくはその形成を防止するための医薬の製造における、請求項 1 から 1 4 のいずれか一項に記載のポリペプチド、または請求項 1 5 に記載の医薬組成物の使用。

【請求項 2 5】

前記アミロイドまたはオリゴマーが、アンドロゲン受容体；アポリポタンパク質 A I ；アポリポタンパク質 A I I ；アポリポタンパク質 A I V ；アポ血清アミロイド A ；A β ；

10

20

30

40

50

A B r i ; A D a n ; アトロフィン-1 ; 心房性ナトリウム利尿因子 ; アタキシン ; カルシトニン ; γ-クリスタリン ; シスタチン C ; フィブリノゲン ; ゲルソリン ; ハンチンチン ; インスリン ; 膵島アミロイドポリペプチド ; 免疫グロブリンカッパ軽鎖 ; 免疫グロブリンラムダ軽鎖 ; ケラトエピセリン ; ケラチン ; ラクタヘドリン ; ラクトフェリン ; リゾチーム ; 肺サーファクタントタンパク質 C ; メディン ; 歯原性エナメル芽細胞関連タンパク質 ; プリオンタンパク質 ; プロカルシトニン ; プロラクチン ; セメノゲリン I ; 血清アミロイド A ; スーパーオキシドジスムターゼ I ; β2-ミクログロブリン ; T A T A ボックス結合タンパク質 ; タウ ; トランスサイレチン ; および α-シヌクレインから選択されるタンパク質を含む、請求項 2 4 に記載の使用。

【請求項 2 6】

アルツハイマー病 ; 早期発症型アルツハイマー病 ; 後期発症型アルツハイマー病 ; 発症前アルツハイマー病 ; A L アミロイドーシス ; 筋萎縮性側索硬化症 (A L S) ; 筋萎縮性側索硬化症 / パーキンソニズム認知症複合 ; 嗜銀顆粒性認知症 ; 大動脈中膜アミロイドーシス ; A p o A I アミロイドーシス ; A p o A I I アミロイドーシス ; A p o A I V アミロイドーシス ; 心房アミロイドーシス ; イギリス型 / デンマーク型認知症 ; 白内障 ; 大脳皮質基底核変性症 ; 逆まつげに関連する角膜アミロイドーシス ; シスタチン C プラーク関連疾患 ; シスタチン C プラーク関連冠動脈疾患 ; シスタチン C プラーク関連腎疾患 ; 皮膚苔癬アミロイドーシス ; ボクサー認知症 ; 歯状核赤核-淡蒼球ルイ体萎縮症 ; 石灰化を伴うびまん性神経原線維変化病 ; レヴィー小体認知症 ; ダウン症候群 ; 家族性アミロイド心筋症 (F A C) ; 家族性アミロイドポリニューロパチー (F A P) ; 家族性イギリス型認知症 ; 家族性デンマーク型認知症 ; 家族性脳症 ; 家族性地中海熱 ; フィブリノゲンアミロイドーシス ; フィンランド型遺伝性アミロイドーシス ; パーキンソニズムを伴う前頭側頭型認知症 ; 前頭側頭葉変性症 (F T L D) ; 前頭側頭葉認知症 ; ハレルフォルデン-スパッツ病 ; 血液透析関連性アミロイドーシス ; 遺伝性脳アミロイド血管症 ; アミロイドーシスを伴う遺伝性脳出血 ; 遺伝性格子状角膜ジストロフィー ; ハンチントン病 ; アイスランド型遺伝性脳アミロイド血管症 ; 封入体筋炎 ; 注射部位限局性アミロイドーシス ; 膵島アミロイドポリペプチドアミロイドーシス ; リゾチームアミロイドーシス ; 多発性骨髄腫 ; 筋強直性ジストロフィー ; ニーマン・ピック病 C 型 ; 神経原線維変化を伴う非グアム型運動ニューロン疾患 ; パーキンソン病 ; 末梢性アミロイドーシス ; ピック病 ; 下垂体プロラクチノーマ ; 脳炎後パーキンソニズム ; プリオンタンパク質脳アミロイド血管症 ; プリオン媒介性疾患 ; クールー ; クロイツフェルト・ヤコブ病 (C J D) ; ゲルストマン・ストロイスラー・シャインカー病 (G S S) ; 致死性家族性不眠症 (F F I) ; スクレイピー ; 海綿状脳症 ; 肺泡タンパク症 ; 進行性皮質下グリオーシス ; 進行性核上麻痺 ; 老年性全身性アミロイドーシス ; 血清 A A アミロイドーシス ; 球脊髄性筋萎縮症 ; 脊髄小脳失調症 (S C A 1 、 S C A 3 、 S C A 6 、 または S C A 7) ; 亜急性硬化性全脳炎 ; 全身性アミロイドーシス ; 家族性アミロイドーシス ; 野生型アミロイドーシス ; 神経原線維変化優位型認知症 ; およびタウオパチーから選択される疾患を処置するための医薬の製造における、請求項 1 から 1 4 のいずれか一項に記載のポリペプチド、または請求項 1 5 に記載の医薬組成物の使用。

【請求項 2 7】

前記疾患が、パーキンソン病、アルツハイマー病、およびハンチントン病から選択される、請求項 2 6 に記載の使用。

【請求項 2 8】

前記疾患がアルツハイマー病である、請求項 2 7 に記載の使用。

【請求項 2 9】

前記疾患が、クロイツフェルト・ヤコブ病、クールー、致死性家族性不眠症、およびゲルストマン・ストロイスラー・シャインカー病から選択されるプリオン媒介性疾患である、請求項 2 6 に記載の使用。

【請求項 3 0】

アミロイドを低減させる、アミロイド形成を阻害する、アミロイド凝集を阻害する、ま

10

20

30

40

50

たは毒性オリゴマーを除去および／もしくはその形成を防止することを必要とする対象においてアミロイドを低減させる、アミロイド形成を阻害する、アミロイド凝集を阻害する、または毒性オリゴマーを除去および／もしくはその形成を防止する方法における使用のための、請求項 1 から 14 のいずれか一項に記載のポリペプチドを含む組成物、または請求項 15 に記載の医薬組成物。

【請求項 3 1】

前記アミロイドまたはオリゴマーが、アンドロゲン受容体；アポリポタンパク質 A I；アポリポタンパク質 A I I；アポリポタンパク質 A I V；アポ血清アミロイド A；A β ；A B r i；A D a n；アトロフィン-1；心房性ナトリウム利尿因子；アタキシン；カルシトニン； γ -クリスタリン；シスタチン C；フィブリノゲン；ゲルソリン；ハンチンチン；インスリン；膵島アミロイドポリペプチド；免疫グロブリンカップ軽鎖；免疫グロブリンラムダ軽鎖；ケラトエピセリン；ケラチン；ラクタヘドリン；ラクトフェリン；リゾチーム；肺サーファクタントタンパク質 C；メディン；歯原性エナメル芽細胞関連タンパク質；プリオンタンパク質；プロカルシトニン；プロラクチン；セメノゲリン I；血清アミロイド A；スーパーオキシドジスムターゼ I； β 2-ミクログロブリン；T A T A ボックス結合タンパク質；タウ；トランスサイレチン；および α -シヌクレインから選択されるタンパク質を含む、請求項 30 に記載の使用のための組成物または医薬組成物。

【請求項 3 2】

疾患の処置を必要とする対象において、疾患の処置における使用のための請求項 1 から 14 のいずれか一項に記載のポリペプチドを含む組成物、または請求項 15 に記載の医薬組成物であって、前記疾患が、アルツハイマー病；早期発症型アルツハイマー病；後期発症型アルツハイマー病；発症前アルツハイマー病；A L アミロイドーシス；筋萎縮性側索硬化症（A L S）；筋萎縮性側索硬化症／パーキンソニズム認知症複合；嗜銀顆粒性認知症；大動脈中膜アミロイドーシス；A p o A I アミロイドーシス；A p o A I I アミロイドーシス；A p o A I V アミロイドーシス；心房アミロイドーシス；イギリス型／デンマーク型認知症；白内障；大脳皮質基底核変性症；逆まつげに関連する角膜アミロイドーシス；シスタチン C プラーク関連疾患；シスタチン C プラーク関連冠動脈疾患；シスタチン C プラーク関連腎疾患；皮膚苔癬アミロイドーシス；ボクサー認知症；歯状核赤核-淡蒼球ルイ体萎縮症；石灰化を伴うびまん性神経原線維変化病；レヴィー小体認知症；ダウン症候群；家族性アミロイド心筋症（F A C）；家族性アミロイドポリニューロパチー（F A P）；家族性イギリス型認知症；家族性デンマーク型認知症；家族性脳症；家族性地中海熱；フィブリノゲンアミロイドーシス；フィンランド型遺伝性アミロイドーシス；パーキンソニズムを伴う前頭側頭型認知症；前頭側頭葉変性症（F T L D）；前頭側頭葉認知症；ハレルフォルデン-スパッツ病；血液透析関連性アミロイドーシス；遺伝性脳アミロイド血管症；アミロイドーシスを伴う遺伝性脳出血；遺伝性格子状角膜ジストロフィー；ハンチントン病；アイスランド型遺伝性脳アミロイド血管症；封入体筋炎；注射部位限局性アミロイドーシス；膵島アミロイドポリペプチドアミロイドーシス；リゾチームアミロイドーシス；多発性骨髄腫；筋強直性ジストロフィー；ニーマン・ピック病 C 型；神経原線維変化を伴う非グアム型運動ニューロン疾患；パーキンソン病；末梢性アミロイドーシス；ピック病；下垂体プロラクチノーマ；脳炎後パーキンソニズム；プリオンタンパク質脳アミロイド血管症；プリオン媒介性疾患；クールー；クロイツフェルト・ヤコブ病（C J D）；ゲルストマン・ストロイスラー・シャインカー病（G S S）；致死性家族性不眠症（F F I）；スクレイピー；海綿状脳症；肺胞タンパク症；進行性皮質下グリオーシス；進行性核上麻痺；老年性全身性アミロイドーシス；血清 A A アミロイドーシス；球脊髄性筋萎縮症；脊髄小脳失調症（S C A 1、S C A 3、S C A 6、または S C A 7）；亜急性硬化性全脳炎；全身性アミロイドーシス；家族性アミロイドーシス；野生型アミロイドーシス；神経原線維変化優位型認知症；およびタウオパチーから選択される、組成物または医薬組成物。

【請求項 3 3】

前記疾患が、パーキンソン病、アルツハイマー病、およびハンチントン病から選択され

10

20

30

40

50

る、請求項 3 2 に記載の使用のための組成物または医薬組成物。

【請求項 3 4】

前記疾患がアルツハイマー病である、請求項 3 3 に記載の使用のための組成物または医薬組成物。

【請求項 3 5】

前記疾患が、クロイツフェルト・ヤコブ病、クールー、致死性家族性不眠症、およびゲルストマン・ストロイスラー・シャインカー病から選択されるプリオン媒介性疾患である、請求項 3 2 に記載の使用のための組成物または医薬組成物。

【請求項 3 6】

請求項 1 から 1 4 のいずれか一項に記載のポリペプチドおよび検出可能な標識を含む、アミロイドイメージング剤。

10

【請求項 3 7】

前記検出可能な標識が、蛍光標識または放射標識、例えば、 ^{18}F 、 ^{11}C および ^{123}I を含む、請求項 3 6 に記載のアミロイドイメージング剤。

【請求項 3 8】

前記イメージング剤が、アミロイドタンパク質を検出することができ、誤って折り畳まれたおよび／もしくは凝集したタンパク質に関連する疾患を診断することができる、請求項 3 6 または 3 7 に記載のアミロイドイメージング剤。

【請求項 3 9】

対象の試料におけるアミロイド沈着を検出するための、請求項 3 6 または 3 7 に記載のアミロイドイメージング剤の *in vitro* 使用。

20

【請求項 4 0】

タンパク質ミスフォールディング、タンパク質凝集または神経変性性疾患の *in vivo* 診断において使用するための、請求項 3 6 または 3 7 に記載のアミロイドイメージング剤を含む組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本出願は、その開示の全体が参照により本明細書に組み込まれる、2018年6月15日に出願された米国仮特許出願第62／685,757号、および2018年10月23日に出願された米国仮特許出願第62／749,499号の優先権を主張する。

30

【0002】

本発明は、部分的または完全に脱免疫され、先行技術と比較して優れた効力、優れた構造安定性、およびアミロイドタンパク質に対して増加した結合特異性を実証するような、繊維状バクテリオファージ遺伝子3タンパク質（「g3p」、「p3」または「pIII」としても知られる）の全般的アミロイド相互作用モチーフ（GAIM）のバリエーションを含むポリペプチドに関する。そのようなポリペプチドをコードする核酸分子および構築物、そのような核酸分子によって形質転換された宿主細胞、ならびにそのようなポリペプチドを組換えによって作製する方法が包含される。加えて、本発明は、本明細書に開示されるポリペプチドを含む診断用組成物および医薬組成物、アミロイド凝集体を検出するためおよび／または誤って折り畳まれたおよび／もしくは凝集したタンパク質に関連する疾患を診断するための診断用組成物の使用、ならびにアミロイド量を減少させるため、凝集を防止するため、アミロイドを脱凝集するため、またはその他の形で誤って折り畳まれたおよび／もしくは凝集したアミロイドタンパク質に関連する疾患、例えば全身性および末梢性のアミロイド疾患、神経変性性タウオパチーを含む神経変性疾患、および伝染性海綿状脳症（プリオン関連疾患）を処置もしくは防止するための医薬組成物の治療的および／または予防的使用に関する。本発明のポリペプチドは、融合タンパク質およびそのアミロイド結合部分を含む。

40

【背景技術】

【0003】

50

バクテリオファージ g 3 p は、アミロイド線維に直接結合し、バクテリオファージ媒介性のアミロイド脱凝集（例えば、リモデリング）は、この最初の結合ステップに依存する。例えば、その全体が参照により本明細書に組み込まれる、WO 2 0 1 3 / 0 8 2 1 1 4 A 1 を参照されたい。本発明者らは以前に、アミロイド結合、アミロイド脱凝集、および／またはアミロイド凝集体の形成の防止にとって必要な g 3 p の最小配列を同定した。同書。この最小配列は、g 3 p の N 1 および N 2 ドメインを含む全般的アミロイド相互作用モチーフ（G A I M）によって包含され、アミロイドタンパク質に結合することおよび／またはアミロイドタンパク質を脱凝集することが可能である g 3 p ポリペプチド（その変異体、断片、融合タンパク質、またはその医薬組成物を含む）の生成をもたらす。その全体が参照により本明細書に組み込まれる、同書；WO 2 0 1 4 / 0 5 5 5 1 5 A 1 号を参照されたい。WO 2 0 1 3 / 0 8 2 1 1 4 A 1 および WO 2 0 1 4 / 0 5 5 5 1 5 A 1 に開示される g 3 p ポリペプチドは、誤って折り畳まれたおよび／または凝集したアミロイドタンパク質に関連する疾患の防止または処置にとって有効である。同書。しかし、これらの g 3 p ポリペプチドはまた、患者において望ましくない免疫応答を誘発し得るヒト T 細胞エピトープも含む。したがって、天然の g 3 p に存在する 5 つの T 細胞エピトープのうち最大 4 つを除去する変異を含む、部分的に脱免疫された g 3 p ポリペプチドを開発した。その全体が参照により本明細書に組み込まれる WO 2 0 1 4 / 1 9 3 9 3 5 A 1 を参照されたい。

【0004】

さらに、アミロイドに結合し、アミロイド関連疾患または状態の検出、診断、防止、または処置にとって有用である g 3 p ポリペプチドを動物細胞において組換えによって産生することは、潜在的 N グリコシル化部位が存在するために制限された。このように、潜在的 N グリコシル化部位が 1 つまたは複数の変異によって除去された、部分的に脱免疫された g 3 p ポリペプチドを含む改善された g 3 p ポリペプチドが生成された。その全体が参照により本明細書に組み込まれる、WO 2 0 1 6 / 0 9 0 0 2 2 A 8 を参照されたい。

これらの進歩にもかかわらず、より安定、強力、および特異的であり、ならびに完全またはほぼ完全に脱免疫された g 3 p ポリペプチドが当技術分野でなお必要である。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0005】

【文献】国際公開第 2 0 1 3 / 0 8 2 1 1 4 号

【文献】国際公開第 2 0 1 4 / 0 5 5 5 1 5 号

【文献】国際公開第 2 0 1 4 / 1 9 3 9 3 5 号

【文献】国際公開第 2 0 1 6 / 0 9 0 0 2 2 号

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0006】

これら一連の治療的品質を有するポリペプチドを生成することは、少なくとも部分的に g 3 p ポリペプチドにおけるある特定の逆相関のため、これまで重大な課題をもたらしてきた。第 1 に、g 3 p ポリペプチドの完全な脱免疫にとって必要である T 細胞エピトープ 2 を除去する本発明者らのこれまでの試みは、一貫してアミロイド結合能の低減をもたらした。第 2 に、G A I M の N 1 - N 2 ドメインの安定性を増加させる本発明者らのこれまでの試みもまた、一貫してアミロイド結合活性の低減を引き起こした。例えば、超安定化 G A I M バリエーションである P B 1 1 3 は、不良なアミロイド結合能を示す。第 3 に、N 2 ドメインの不安定性により、可溶性タンパク質様の非アミロイド基質、粘着性のモルテングロビュール構造および非アミロイド線維性ポリマー、例えばコラーゲンおよびエラスチンとの無差別な相互作用が駆動される。このように、アミロイド結合活性を増加させるために N 2 を脱安定化すれば特異性が犠牲となり、オフターゲット結合を回避するために N 2 を安定化すればアミロイドに対する結合が犠牲となる。意外にも、G A I M バリエーションおよびその融合体を含む融合タンパク質を「オープン安定化（open-stabilized）」コン

フォメーションで生成することによって、3つ全ての逆相関が克服された。

【0007】

先行技術とは異なり、本明細書に記載されるオープン安定化ポリペプチドは、タンパク質の安定性および結合特異性を維持しながら多様なアミロイドに対して強力なアミロイド結合活性およびリモデリング活性を実証している。このように、一部の態様では、本発明は、少なくとも部分的に脱免疫され、優れたアミロイド結合活性、アミロイド結合特異性、およびアミロイドリモデリング活性を有する、GAIMのオープン安定化バリエーション（GAIM）、GAIM-免疫グロブリン（GAIM-Ig）融合タンパク質、またはその医薬組成物に関する。一部の態様では、これらのオープン安定化GAIMバリエーション、GAIM-Ig融合タンパク質、またはその医薬組成物は、強力かつ特異的なアミロイド結合を犠牲にすることなく、構造安定性を犠牲にすることなく完全に脱免疫される。本明細書に記載されるオープン安定化GAIMバリエーションおよびGAIM-Ig融合体は、脳および末梢臓器におけるアミロイドに会合して（engaging）除去することが可能であり、誤って折り畳まれたおよび／または凝集したアミロイドタンパク質に関連する疾患を検出、診断、防止、発症を遅らせる、および／または処置する優れた能力を有する新規ポリペプチドセットを構成する。

10

【0008】

本発明の追加の目的および利点は、以下の説明に部分的に記載され、説明から明白であるか、または本発明の実践によって学習することができる。本発明の目的および利点は、添付の特許請求の範囲に特に指摘した要素および組合せによって実現および達成される。前述の一般的説明および以下の詳細な説明はいずれも例示的で単なる説明に過ぎず、特許請求される本発明を制限しないと理解される。

20

特定の実施形態では、例えば以下の項目が提供される。

（項目1）

配列番号16の開始アミノ酸配列のバリエーションを含むポリペプチドであって、前記バリエーションが：

a) 任意のアミノ酸でのT50の置換およびH55T；

b) N137G；

c) N142A；

d) R143VおよびQ144N；または

R143V、Q144N、およびA146V；または

R143V、Q144N、およびA146T；または

R143V、Q144N、およびA146K；ならびに

e) Q156V、G157N、ΔT158、ΔD159、ΔP160、およびV161G；または

Q156Y、G157N、ΔT158、ΔD159、ΔP160、およびV161G；または

G157N、ΔT158、ΔD159、ΔP160、およびV161G；または

ΔT158、ΔD159、ΔP160、およびV161G

から選択されるアミノ酸変化の1つまたは複数のセットによって配列番号16とは異なり、前記バリエーションが必要に応じて：

30

40

f) ΔM1；または

ΔM1およびΔA2；ならびに

g) システイン以外の任意のアミノ酸でのN38の置換；または

システイン以外の任意のアミノ酸でのN38の置換、およびシステイン以外の任意のアミノ酸でのG40の置換；または

システイン、トレオニン、もしくはセリン以外の任意のアミノ酸でのG40の置換

から選択されるアミノ酸変化の1つまたは複数のセットによって配列番号16とはさらに異なるポリペプチド。

（項目2）

50

前記 T 5 0 置換が、T 5 0 G、T 5 0 H、T 5 0 K、および T 5 0 R からなる群から選択される、項目 1 に記載のポリペプチド。

(項目 3)

前記 T 5 0 置換が T 5 0 H である、項目 2 に記載のポリペプチド。

(項目 4)

前記バリエントが、少なくとも Δ M 1 および Δ A 2 によって配列番号 1 6 とは異なる、項目 1 に記載のポリペプチド。

(項目 5)

前記バリエントが、少なくとも N 1 3 7 G および / または N 1 4 2 A によって配列番号 1 6 とは異なる、項目 1 から 4 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

(項目 6)

前記バリエントが：

a) 任意のアミノ酸での T 5 0 の置換、および H 5 5 T ; ならびに

b) R 1 4 3 V および Q 1 4 4 N ; または

R 1 4 3 V、Q 1 4 4 N、および A 1 4 6 V ; または

R 1 4 3 V、Q 1 4 4 N、および A 1 4 6 T ; または

R 1 4 3 V、Q 1 4 4 N、および A 1 4 6 K

から選択されるアミノ酸変化の 1 つまたは複数のセットによって配列番号 1 6 とはさらに異なる、項目 4 に記載のポリペプチド。

(項目 7)

前記 T 5 0 置換が、T 5 0 G、T 5 0 H、T 5 0 K、および T 5 0 R からなる群から選択される、項目 6 に記載のポリペプチド。

(項目 8)

前記 T 5 0 置換が T 5 0 H である、項目 7 に記載のポリペプチド。

(項目 9)

配列番号 1 6 の前記バリエントが、配列番号 1 9、配列番号 2 0、配列番号 2 1、配列番号 2 2、配列番号 2 3、配列番号 2 4、配列番号 2 5、および配列番号 2 6 からなる群から選択される、項目 1 に記載のポリペプチド。

(項目 1 0)

免疫グロブリン定常領域をさらに含む、項目 1 から 9 のいずれか一項に記載のポリペプチド。

(項目 1 1)

前記免疫グロブリン定常領域配列が、ヒト I g G の F c 部分である、項目 1 0 に記載のポリペプチド。

(項目 1 2)

項目 1 から 9 のいずれか一項に記載のポリペプチドおよびヒト I g G の F c 部分から本質的になる、項目 1 1 に記載のポリペプチド。

(項目 1 3)

前記ヒト I g G がヒト I g G 1 である、項目 1 2 に記載のポリペプチド。

(項目 1 4)

a) 配列番号 2 9 ;

b) 配列番号 3 0 ;

c) 配列番号 3 1 ;

d) 配列番号 3 2 ;

e) 配列番号 3 3 ;

f) 配列番号 3 4 ;

g) 配列番号 3 5 ; および

h) 配列番号 3 6 ;

から選択されるアミノ酸配列から本質的になるポリペプチドであって、

前記バリエントが、必要に応じて：

10

20

30

40

50

身性アミロイドーシス；血清A Aアミロイドーシス；球脊髄性筋萎縮症；脊髄小脳失調症（SCA1、SCA3、SCA6、またはSCA7）；亜急性硬化性全脳炎；全身性アミロイドーシス；家族性アミロイドーシス；野生型アミロイドーシス；神経原線維変化優位型認知症；およびタウオパチーから選択される疾患を処置する方法。

（項目19）

前記疾患が、パーキンソン病、アルツハイマー病、およびハンチントン病から選択される、項目18に記載の方法。

（項目20）

前記疾患がアルツハイマー病である、項目19に記載の方法。

（項目21）

前記疾患が、クロイツフェルト・ヤコブ病、クールー、致死性家族性不眠症、およびゲルストマン・ストロイスラー・シャインカー症候群から選択されるプリオン媒介性疾患である、項目18に記載の方法。

（項目22）

項目1から14のいずれか一項に記載のポリペプチドをコードする核酸を含むオリゴヌクレオチド。

（項目23）

前記ポリペプチドをコードする前記核酸が、配列番号37、配列番号38、配列番号39、配列番号40、配列番号41、配列番号42、配列番号43、および配列番号44から選択される配列を含む、項目22に記載のオリゴヌクレオチド。

（項目24）

前記ポリペプチドをコードする前記核酸が、配列番号45、配列番号46、配列番号47、配列番号48、配列番号49、配列番号50、配列番号51、および配列番号52から選択される配列からなる、項目22に記載のオリゴヌクレオチド。

（項目25）

項目22から24のいずれか一項に記載の核酸を含むベクター。

（項目26）

項目25に記載のベクターを含む宿主細胞。

（項目27）

昆虫細胞、真菌細胞、植物細胞、細菌細胞、哺乳動物細胞、およびトランスジェニック動物細胞からなる群から選択される、項目26に記載の宿主細胞。

（項目28）

HEK293細胞、HEK293由来細胞、CHO細胞、CHO由来細胞、HeLa細胞、およびCOS細胞からなる群から選択される、項目27に記載の宿主細胞。

（項目29）

アミロイドに結合するタンパク質を作製する方法であって、項目25に記載のベクター中の核酸によってコードされるタンパク質を発現させるステップ、および前記発現されたタンパク質を単離するステップを含む方法。

（項目30）

項目25に記載のベクター中の核酸によってコードされるタンパク質を発現させ、前記発現されたタンパク質を単離することによって産出される、アミロイドに結合するタンパク質。

（項目31）

項目26～28のいずれか一項に記載の宿主細胞を培養することによって発現される、項目30に記載のタンパク質。

【図面の簡単な説明】

【0009】

【図1】図1Aは、GAIM N1およびN2ドメインの三次構造（PDB構造2G3Pを使用して示される）のグラフ表示である。部位特異的変異誘発に付されたβ鎖は、濃灰色で示されている。矢印は、N1中の極性残基およびN2中の疎水性残基の位置を示す。

10

20

30

40

50

図 1 B は、本発明の G A I M - I g 融合体のグラフ表示である。図 1 C は、G A I M 二量体のグラフ表示である。

【 0 0 1 0 】

【図 2】図 2 は、f A β 4 2 中の G A I M - 相互作用配列を示す水素 / 重水素 (H / D) 交換試験の結果を表す図である。

【 0 0 1 1 】

【図 3 A】図 3 A は、f d ファージに由来する g 3 p の N 1 部分のアミノ酸配列の対応する部分 (配列番号 1) および I F 1 ファージに由来する g 3 p の対応する N 1 部分を比較する図である (配列番号 2)。白抜き四角は、上部に、P B 1 0 6 のアミノ酸 2 3 ~ 2 8 (D D K T L D ; 配列番号 3) および G A I M 足場 P B 1 2 0 (P B 1 0 6 に由来する)、下部に、本発明のオープン安定化 G A I M - I g 融合体中に存在する E G D S (配列番号 4) 置換 (E G D S = 配列番号 4) を表す。図 3 B は、G A I M N 1 および N 2 ドメインの三次構造のグラフ表示である (P D B 構造 2 G 3 P を使用して示される)。図 3 B 中の白抜き四角は、f d g 3 p 中の配列番号 3 の位置を示す。図 3 C は、N 2 ドメインの安定化に関係している 3 つの緩慢折り畳みループ (「ターン」とも呼ばれる) のグラフ表示である。T 1 = ターン 1 (F Q N N ; 配列番号 5) ; T 2 = ターン 2 (R Q G A ; 配列番号 6) ; T 3 = ターン 3 (Q G T D P V K ; 配列番号 7)。以下で実証されるように、変異誘発によって T 1、T 2 または T 3 のうち 1 つまたはそれより多くを除去することは、N 2 ドメインを安定化する。図 3 D は、T 5 0 の選択アミノ酸置換に基づく結合および安定性の変化を表す図である。

【図 3 B】同上。

【図 3 C】同上。

【図 3 D】同上。

【 0 0 1 2 】

【図 4 A】図 4 A および 4 B は、G A I M 二量体または単量体と比較した G A I M - I g 融合体の熱融解実験から得た代表的なデータを示す図である。熱融解は、S Y P R O (登録商標) O r a n g e 結合によってモニターした。第 1 の転移、T m 1 は、正規化蛍光強度からの非線形フィッティングによって算出した。

【図 4 B】同上。

【 0 0 1 3 】

【図 5 A】図 5 A および 5 B は、2 9 5 n m (図 5 A) および 2 8 0 n m (図 5 B) で励起された、0 M グアニジン塩酸 (G u H C l) (破線)、2 M G u H C l (実線) および 5 M G u H C l (点線) での G A I M の蛍光発光スペクトルを表す図である。図 5 C は、G u H C l による G A I M 二量体の平衡アンフォールディングを表す図である。図 5 C は、2 つの転移、1 M と 2 M G u H C l の間の第 1 の転移および 2 M と 4 M G u H C l の間の第 2 の転移を表す図である。3 4 0 n m (励起 2 8 0 n m) での相対蛍光強度を、種々の濃度の G u H C l でプロットした。図 5 D は、1 . 5 M G u H C l での N 2 ドメインアンフォールディングを表す図である。図 5 E は、2 . 6 M G u H C l での N 1 ドメインアンフォールディングを表す図である。

【図 5 B】同上。

【図 5 C】同上。

【図 5 D】同上。

【図 5 E】同上。

【 0 0 1 4 】

【図 6 A】図 6 A および 6 B は、アミロイド結合をモジュレートする G A I M 残基のマッピングを表す図である。図 6 A は、T m 1 と相関する G A I M バリエーションの A β 4 2 線維結合力を示す散布図である (スピアマン相関係数 = 0 . 7 0 3、p < 0 . 0 0 0 1)。図 6 B は、T m 1 と相関する G A I M バリエーションの f タウ線維結合力 (ftau fiber-binding potency) を示す散布図である (スピアマン相関係数 = 0 . 8 7 8、p < 0 . 0 0 0 1)。f タウ結合が不十分なバリエーションには、E L I S A において飽和に到達しないバリアン

トについての曲線のあてはめにおける不正確性のため、 $EC_{50} = 1000 \text{ nM}$ が与えられている。図6Aおよび図6Bの両方について、GAIM足場PB120は、灰色三角によって表され、バリエーションは、丸によって表されている。Tm1の低下は、GAIMのよりオープンなコンフォメーションを示し、結果として、結合が増加するのに対し、より高いTm1を有する安定化されたバリエーションは、結合活性を失う傾向がある。

【図6B】同上。

【0015】

【図7A】図7Aおよび7Bは、選択GAIM-Ig融合タンパク質のアミロイド結合を示す図である。図7Aは、GAIM足場（黒丸）およびその安定化バリエーションのアミロイド結合を比較する。FQGN、VNGVおよびQGGKは、それぞれ、配列番号8~10である。図7Bは、オープン安定化（超安定化ではない）GAIM-Ig融合タンパク質の優れた結合を示す。オープン安定化ポリペプチド（右端に示される、超安定化ポリペプチドPB113以外）が、白抜き四角内に示されている。

【図7B】同上。

【0016】

【図8A】図8A~8Dは、代表的なオープン安定化GAIM-Ig融合体の、種々のAβ線維への結合（丸）を、対照足場の、それらのAβ線維への結合（四角）と比較して示す図である。図8Aは、Aβ3-42-Pyro線維への結合を示し；図8Bは、Aβ1-42 E22Q線維への結合を示し；図8Cは、Aβ11-42線維への結合を示し；図8Dは、Aβ11-42-Pyro線維への結合を示す。これらの実験に使用される凝集体は、長い無分岐線維（Aβ1-42 E22Q線維）から高度にジグザグ状のコンフォーマー（Aβ3-42-Pyro線維）まで極めて多様な形態を示す。Pyro=ピログルタミン酸。

【図8B】同上。

【図8C】同上。

【図8D】同上。

【0017】

【図9】図9は、コラーゲンへのオフターゲット結合に対するN2安定化変異の効果を示す図である。FQGN=配列番号8、VNGV=配列番号9、QGGK=配列番号10。

【0018】

【図10A】図10A~10Dは、Aβ42線維と共にインキュベートされた、種々のGAIM-Ig融合タンパク質のリモデリング効率を取り扱う図である。図10Aは、6E10 MA bによって達成されたリモデリングとの比較をさらに示す。丸=平均；バー=標準偏差。図10Bは、Aβ42結合と、種々のGAIM-Ig融合タンパク質によるリモデリングの間の相関をさらに実証する。オープン安定化GAIM-Ig融合体は、濃灰色の逆三角形によって表される。GAIM足場は、薄灰色の上向き三角形によって表される。丸は、他の試験されたGAIM-Ig融合体を表す。図10Cは、GAIM足場のリモデリング効率（三角）または線維単独（四角）に対して、代表的なオープン安定化ポリペプチド（丸）のリモデリング効率を比較する。バー=標準偏差。より大きなリモデリング効率は、尿素における線維のより大きな溶解（例えば、より低いThT蛍光）によって実証される。図10Dは、37℃で6日間の0.8 μM PB108とのインキュベーションの前（左）および後（右）のAβ42線維を示す透過型電子顕微鏡（TEM）画像を示す。

【図10B】同上。

【図10C】同上。

【図10D】同上。

【0019】

【図11A】図11A~11Cは、タウ線維と共にインキュベートされた種々のGAIM-Ig融合タンパク質のリモデリング効率を取り扱う図である。図11Aは、代表的なオープン安定化GAIM-Ig融合タンパク質PB108および超安定化融合タンパク質P

B 1 1 3 のリモデリング効率を比較する。リモデリングは、処置された凝集体のタウ K L 単量体および二量体の存在によって（中間のパネル）示される。図 1 1 B は、異なる濃度の融合タンパク質での、2 つの代表的なオープン安定化 G A I M - I g 融合タンパク質および G A I M 足場のリモデリング効率を比較する。エラーバーは、3 つの独立実験から得た標準偏差を表す。図 1 1 C は、3 7 ° C で 3 日間の 1 0 0 n M P B 1 0 8 とのインキュベーションの前（左）および後（右）のタウ K L 線維を示す T E M 画像を示す図である。

【図 1 1 B】同上。

【図 1 1 C】同上。

【0 0 2 0】

【図 1 2 A】図 1 2 A ~ 1 2 D は、本発明の G A I M - I g 融合タンパク質によるアミロイド集合の阻害を表す図である。エラーバーは、3 つまたはそれより多い独立実験から得た標準偏差を表す。図 1 2 A は、A β 4 2 線維集合の濃度依存性阻害を示す。P B 1 2 0 （対照足場）は、丸によって、P B 1 0 8 は、四角によって、P B 1 1 6 は、三角によって表される。図 1 2 B は、2 5 0 n M の G A I M 融合体での A β 4 2 線維集合の阻害を比較する。図 1 2 C は、タウ K L 線維集合の濃度依存性阻害を示す。P B 1 2 0 （対照足場）は丸によって、P B 1 0 8 は四角によって、P B 1 1 6 は三角によって表される。図 1 2 D は、2 5 0 n M の G A I M 融合体でのタウ K L 線維集合の阻害を比較する。

【図 1 2 B】同上。

【図 1 2 C】同上。

【図 1 2 D】同上。

【発明を実施するための形態】

【0 0 2 1】

配列の簡単な説明

配列番号 1 = A E T V E S C L A K P H T E N S F T N V W K D D K T L D R Y A N

【0 0 2 2】

配列番号 2 = A T T D A E C L S K P A F D G T L S N V W K E G D S R Y A N

【0 0 2 3】

配列番号 3 = D D K T L D ; 配列番号 4 = E G D S

【0 0 2 4】

配列番号 5 = F Q N N ; 配列番号 6 = R Q G A ; 配列番号 7 = Q G T D P V K ; 配列番号 8 = F Q G N ; 配列番号 9 = V N G V ; 配列番号 1 0 = Q G G K

【0 0 2 5】

配列番号 1 1 =

10

20

30

40

50

【化 1】

MAETVESCLAKPHTENSFTNVWKDDKTLDRYANYEGCLWNAGGVVCTGDET
QCYGTWWPIGLAIPENEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSKPPEYGDTPIPGYTYI
NPLDGTYPGTEQNPANPNPSLEESQPLNTFMFQNNRFRNRQGALTVYTGT
TQGTDPVKTYYYQYTPVSSRAMYDAYWNGKFRDCAFHSGFNEDPFVCEYQQQ
SSDLPQPPANAGGESGGGSGGGSEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSGGGSGS
GARS DKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWVDVSHE
DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC
KVS NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS
DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV
MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

10

20

【0 0 2 6】

配列番号 1 2 =

【化 2】

MAETVESCLAKPHTENSFTNVWKDDKTLDRYANYEGCLWNAGGVVCTGDE
TQCYGTWWPIGLAIPENEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSKPPEYGDTPIPGYTYI
NPLDGTYPGTEQNPANPNPSLEESQPLNTFMFQNNRFRNRQGALTVYTGT
TQGTDPVKTYYYQYTPVSSRAMYDAYWNGKFRDCAFHSGFNEDPFVCEYQQQ
SSDLPQPPANAGGESGGGSGGGSEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSGGGSGS
G

30

【0 0 2 7】

配列番号 1 3 =

【化 3 - 1】

MAETVESCLAKPHTENSFTNVWKDDKTLDRYANYEGCLWNAGGVVCTGDET
QCYGHWVPIGLAIPENEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSKPPEYGDTPIPGYTYI
NPLDGTYPGTEQNPANPNPSLEESQPLNTFMFQNNRFRNRQGALTVYTGT

40

50

【化 3 - 2】

TQGTDPVKTYYYQYTPVSSRAMYDAYWNGKFRDCAFHSGFNEDPFVCEYQQQ
SSDLPQPPANAGGESGGGSGGGSEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSGGGSGS
GARSDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE
DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC
KVSNAKALPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS
DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV
MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

10

【0 0 2 8】

配列番号 1 4 =

【化 4】

MAETVESCLAKPHTENSFTNVWKDDKTLDYANYEGCLWNAGGWWCTGDE
TQCYGHHWPIGLAIPENEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSGGGSGS
INPLDGTYPGTEQNPANPNPSLEESQPLNTFMFQNNRFRNRQGALTVYTGTF
TQGTDPVKTYYYQYTPVSSRAMYDAYWNGKFRDCAFHSGFNEDPFVCEYQQQ
SSDLPQPPANAGGESGGGSGGGSEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSGGGSGS
G

20

30

【0 0 2 9】

配列番号 1 5 =

40

50

【化 5】

MAETVESCLAKPHTENSFTNVWKEGDSRYANYEGCLWNAGGVVCTGDETQ
CYGHWPIGLAIPENEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSKPPEYGDTPIPGYTYIN
PLDGTYPGTEQNPANPNPSLEESQPLNTFMFQNNRFRNRQGALTVYTGFT
QGTDPVKTYQYTPVSSRAMYDAYWNGKFRDCAFHSGFNEDPFVCEYQQQS
SDLPQPPANAGGESGGGSGGGSEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSGGGSGSG
ARSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWVDVSHEDP
EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI
AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVM
HEALHNHYTQKSLSLSPGK

10

20

【0 0 3 0】

配列番号 1 6 =

【化 6】

MAETVESCLAKPHTENSFTNVWKEGDSRYANYEGCLWNAGGVVCTGDETQ
CYGHWPIGLAIPENEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSKPPEYGDTPIPGYTYIN
PLDGTYPGTEQNPANPNPSLEESQPLNTFMFQNNRFRNRQGALTVYTGFT
QGTDPVKTYQYTPVSSRAMYDAYWNGKFRDCAFHSGFNEDPFVCEYQQQS
SDLPQPPANAGGESGGGSGGGSEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSGGGSGSG

30

【0 0 3 1】

配列番号 1 7 =

40

50

【化 7】

MAETVESSLAKPHIEGSFTNVWKDDKTLDWYANYEGILWKATGVVVITGDETQ
VYAIWWPVGLAIPENEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSKPPEYGDTPIPGYIYNP
LDGTYPGTEQNPANPNPSLEESHPLNTFMFQGNRFRNRQGALTVYTGFTQ
GTDPVKTYYYQYTPVSSRAMYDAYWNGKFRDVAFHSGFNEDPLVAEYQGQLS
YLPQPPANAGGESGGGSGGGSEGGGSEGGGSEGGGSGGGSGSGA
RSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE
VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA
VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMH
EALHNHYTQKSLSLSPGK

10

20

【0 0 3 2】

配列番号 1 8 =

【化 8】

MAETVESSLAKPHIEGSFTNVWKDDKTLDWYANYEGILWKATGVVVITGDETQ
VYAIWWPVGLAIPENEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSKPPEYGDTPIPGYIYNP
LDGTYPGTEQNPANPNPSLEESHPLNTFMFQGNRFRNRQGALTVYTGFTQ
GTDPVKTYYYQYTPVSSRAMYDAYWNGKFRDVAFHSGFNEDPLVAEYQGQLS
YLPQPPANAGGESGGGSGGGSEGGGSEGGGSEGGGSGGGSGSG

30

【0 0 3 3】

配列番号 1 9 =

【化 9 - 1】

MAETVESCLAKPHTENSFTNVWKEGDSRYANYEGCLWNAGGVVCTGDETQ

【化 9 - 2】

CYGHWWPIGLAIPENEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSKPPEYGDTPIPGYTYIN
PLDGTYPGTEQNPANPNPSLEESQPLNTFMFQGNRFRNRQGALTVYTGFT
QGTDPVKTYYYQYTPVSSRAMYDAYWNGKFRDCAFHSGFNEDPFVCEYQGQS
SDLPQPPANAGGESGGGSGGGSEGGGSEGGGSEGGGSGGGSGSG

40

【0 0 3 4】

配列番号 2 0 =

50

【化 1 0】

MAETVESCLAKPHTENSFTNVWKEGDSRYANYEGCLWNAGGVVCTGDETQ
CYGHWPIGLAIPENEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSKPPEYGDTPIPGYTYIN
PLDGTYPGTEQNPANPNPSLEESQPLNTFMFQNNRFRNVNGVLTVYTGTFT
QGTDPVKTYYYQYTPVSSRAMYDAYWNGKFRDCAFHSGFNEDPFVCEYQQQS
SDLPQPPANAGGESGGGSGGGSEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSGGGSGSG

10

【0 0 3 5】

配列番号 2 1 =

【化 1 1】

MAETVESCLAKPHTENSFTNVWKEGDSRYANYEGCLWNAGGVVCTGDETQ
CYGHWPIGLAIPENEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSKPPEYGDTPIPGYTYIN
PLDGTYPGTEQNPANPNPSLEESQPLNTFMFQGNRFRARQGALTVYTGTFT
QGTDPVKTYYYQYTPVSSRAMYDAYWNGKFRDCAFHSGFNEDPFVCEYQQQS
SDLPQPPANAGGESGGGSGGGSEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSGGGSGSG

20

【0 0 3 6】

配列番号 2 2 =

【化 1 2】

MAETVESCLAKPHTENSFTNVWKEGDSRYANYEGCLWNAGGVVCTGDETQ
CYGHWPIGLAIPENEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSKPPEYGDTPIPGYTYIN
PLDGTYPGTEQNPANPNPSLEESQPLNTFMFQNNRFRVNGVLTVYTGTFT
QGTDPVKTYYYQYTPVSSRAMYDAYWNGKFRDCAFHSGFNEDPFVCEYQQQS
SDLPQPPANAGGESGGGSGGGSEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSGGGSGSG

30

【0 0 3 7】

配列番号 2 3 =

【化 1 3 - 1】

MAETVESCLAKPHTENSFTNVWKEGDSRYANYEGCLWNAGGVVCTGDEHQ
CYGTWWPIGLAIPENEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSKPPEYGDTPIPGYTYINP

40

【化 1 3 - 2】

LDGTYPGTEQNPANPNPSLEESQPLNTFMFQGNRFRARQGALTVYTGTFTQ
GTDPAVKTYYYQYTPVSSRAMYDAYWNGKFRDCAFHSGFNEDPFVCEYQQQSS
DLPQPPANAGGESGGGSGGGSEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSGGGSGSG

50

【 0 0 3 8 】

配列番号 2 4 =

【 化 1 4 】

MAETVESCLAKPHTENSFTNVWKEGDSRYANYEGCLWNAGGVVCTGDEHQ
CYGTWWPIGLAIPENEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSKPPEYGDTPIPGYTYINP
LDGTYPGTEQNPANPNPSLEESQPLNTFMFQNNRFRVNGVLTVYTGTFTQ
GTDPVKTYQYTPVSSRAMYDAYWNGKFRDCAFHSGFNEDPFVCEYQGQSS
DLPQPPANAGGESGGGSGGGSEGGGSEGGGSEGGGSGGGSGSG

10

【 0 0 3 9 】

配列番号 2 5 =

【 化 1 5 】

MAETVESCLAKPHTENSFTNVWKEGDSRYANYEGCLWNAGGVVCTGDEHQ
CYGTWWPIGLAIPENEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSKPPEYGDTPIPGYTYINP
LDGTYPGTEQNPANPNPSLEESQPLNTFMFQGNRFRNRQGALTVYTGTFTQ
GTDPVKTYQYTPVSSRAMYDAYWNGKFRDCAFHSGFNEDPFVCEYQGQSS
DLPQPPANAGGESGGGSGGGSEGGGSEGGGSEGGGSGGGSGSG

20

【 0 0 4 0 】

配列番号 2 6 =

【 化 1 6 】

MAETVESCLAKPHTENSFTNVWKEGDSRYANYEGCLWAAGGVVCTGDEHQ
CYGTWWPIGLAIPENEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSKPPEYGDTPIPGYTYINP
LDGTYPGTEQNPANPNPSLEESQPLNTFMFQGNRFRNRQGALTVYTGTFTQ
GTDPVKTYQYTPVSSRAMYDAYWNGKFRDCAFHSGFNEDPFVCEYQGQSS
DLPQPPANAGGESGGGSGGGSEGGGSEGGGSEGGGSGGGSGSG

30

【 0 0 4 1 】

配列番号 2 7 = G G G G S ; 配列番号 2 8 = G G G S

【 0 0 4 2 】

配列番号 2 9 =

40

MAETVESCLAKPHTENSFTNVWKEGDSRYANYEGCLWNAGGVVCTGDETQCY
GHWPIGLAIPENEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSKPPEYGDTPIPGYTYINPLDG
TYPGTEQNPANPNPSLEESQPLNTFMFQGNRFRNRQGALTVYTGFTQGDPV
KTTYQYTPVSSRAMYDAYWNGKFRDCAFHSGFNEDPFVCEYQGQSSDLPQPPA
NAGGESGGGSGGGSEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSGGGSGSGARS DKTHTC
PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI
SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN
YKTTTPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS
PGK

20

配列番号 3 0 =

MAETVESCLAKPHTENSFTNVWKEGDSRYANYEGCLWNAGGVVCTGDETQCY
GHWVPIGLAIPENEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSKPPEYGDTPIPGYTYINPLDG
TYPGTEQNPANPNPSLEESQPLNTFMFQNNRFRNVNGVLTVYTGTFTQGTDPV
KTTYQYTPVSSRAMYDAYWNGKFRDCAFHSGFNEDPFVCEYQGQSSDLPQPPA
NAGGESGGGSGGGSEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSGGGSGSGARS DKTHTC
PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI
SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN
YKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS
PGK

40

配列番号 3 1 =

MAETVESCLAKPHTENSFTNVWKEGDSRYANYEGCLWNAGGVVCTGDETQCY
GHWWPIGLAIPENEGGGSEGGGSEGGGSEGGGTPPEYGDTPIPGYTYINPLDG

【化 1 9 - 2】

TYPPGTEQNPANPNPSLEESQPLNTFMFQGNRFRARQGALTVYTGTFTQGTD
KTYQYTPVSSRAMYDAYWNGKFRDCAFHSGFNEDPFVCEYQQGSSDLPQPPA
NAGGESGGGSGGGSEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSGGGSGSGARSDKTHTC
PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT
SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN
YKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLS
PGK

10

【0 0 4 5】

配列番号 3 2 =

【化 2 0】

MAETVESCLAKPHTENSFTNVWKEGDSRYANYEGCLWNAGGVVCTGDETQCY
GHWPIGLAIPENEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSGGGSGSGARSDKTHTC
TYPPGTEQNPANPNPSLEESQPLNTFMFQNNRFRVNGVLT
KTYQYTPVSSRAMYDAYWNGKFRDCAFHSGFNEDPFVCEYQQGSSDLPQPPA
NAGGESGGGSGGGSEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSGGGSGSGARSDKTHTC
PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT
SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN
YKTTTPVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLS
PGK

20

30

【0 0 4 6】

配列番号 3 3 =

【化 2 1 - 1】

MAETVESCLAKPHTENSFTNVWKEGDSRYANYEGCLWNAGGVVCTGDEHQC
YGTWWPIGLAIPENEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSGGGSGSGARSDKTH
GTYPGTEQNPANPNPSLEESQPLNTFMFQGNRFRARQGALTVYTGTFTQGTDP
VKTYQYTPVSSRAMYDAYWNGKFRDCAFHSGFNEDPFVCEYQQGSSDLPQPP
ANAGGESGGGSGGGSEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSGGGSGSGARSDKTH

40

50

【化 2 1 - 2】

CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT
ISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN
NYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL
SPGK

10

【0 0 4 7】

配列番号 3 4 =

【化 2 2】

MAETVESCLAKPHTENSFTNVWKEGDSRYANYEGCLWNAGGVVCTGDEHQC
YGTWPIGLAIPENEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSKPPEYGDTPIPGYTYINPLD
GTYPGTEQNPANPNPSLEESQPLNTFMFQNNRFRAVNGVLTVYTGFTQGTDP
VKTTYQYTPVSSRAMYDAYWNGKFRDCAFHSGFNEDPFVCEYQQQSSDLPQPP
ANAGGESGGGSGGGSEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSGGGSGSGARS DKHTHT
CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT
ISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN
NYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL
SPGK

20

30

【0 0 4 8】

配列番号 3 5 =

40

50

【化 2 3 - 1】

MAETVESCLAKPHTENSFTNVWKEGDSRYANYEGCLWNAGGVVCTGDEHQ
YGTWWPIGLAIPENEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSKPPEYGDTPIPGYTYINPLD
GTYPPGTEQNPANPNPSLEESQPLNTFMFQGNRFRNRQGALTVYTGFTQGTD
VKYYQYTPVSSRAMYDAYWNGKFRDCAFHSGFNEDPFVCEYQQSSDLPQPP
ANAGGESGGGSGGGSEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSGGGSGSGARSDKHT
CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWVDVSHEDPEVKFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT
ISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN

10

【化 2 3 - 2】

NYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL
SPGK

20

【0 0 4 9】

配列番号 3 6 =

【化 2 4】

MAETVESCLAKPHTENSFTNVWKEGDSRYANYEGCLWAAGGVVCTGDEHQCY
GTWWPIGLAIPENEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSKPPEYGDTPIPGYTYINPLDG
TYPPGTEQNPANPNPSLEESQPLNTFMFQGNRFRNRQGALTVYTGFTQGTD
KTYQYTPVSSRAMYDAYWNGKFRDCAFHSGFNEDPFVCEYQQSSDLPQPPA
NAGGESGGGSGGGSEGGGSEGGGSEGGGSEGGGSGGGSGSGARSDKHTC
PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVWVDVSHEDPEVKFNWYVDG
VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT
ISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN
YKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS
PGK

30

40

【0 0 5 0】

配列番号 3 7 =

50

【化 2 5 - 1】

ATGGCCGAAACCGTGGAATCATGTCTGGCGAAGCCCCATACCGAGAACTCCT
TCACCAACGTCTGGAAAGAGGGGCGACAGCCGCTACGCCAACTACGAGGGCT
GCCTGTGGAACGCCGGTGGAGTGGTCGTCTGCACCGGGGATGAGACTCAGT
GCTACGGACACTGGGTGCCTATCGGACTGGCCATTCCCGAGAACGAGGGGG
GTGGTAGCGAAGGCGGCGGATCGGAAGGCGGAGGATCTGAGGGAGGGGGA
ACCAAGCCTCCGGAATACGGCGACACTCCGATCCCCGGGTATACGTACATCA
ATCCGCTGGACGGGACCTACCCGCCTGGAAGTGAACACCTTCATGTTCCAAGG
GAACCGCTTCAGGAACAGACAGGGAGCGCTGACCGTGTACTGACCTTTC
ACACAAGGCACCGACCCCGTCAAGACCTACTACCAGTACACTCCTGTGTCCTC
GCGGGCTATGTACGATGCGTACTGGAATGGGAAGTTTCGGGACTGCGCTTTC

10

20

【化 2 5 - 2】

CACTCCGGCTTCAACGAGGATCCATTTCGTGTGCGAATATCAGGGCCAGAGCT
CCGACCTCCCCCAACCCCTGCAAACGCCGGCGGAGAATCCGGAGGGGGAT
CAGGAGGCGGAAGCGAAGGGGGTGGATCCGAAGGAGGCGGATCCGAGGGT
GGAGGCTCCGAAGGGGGAGGCTCTGGTGGTGGCTCCGGATCGGGA

30

【0 0 5 1】

配列番号 3 8 =

40

50

【化 2 6】

ATGGCCGAAACCGTGGAATCATGTCTGGCGAAGCCCCATACCGAGAACTCCT
TCACCAACGTCTGGAAAGAGGGCGACAGCCGCTACGCCAACTACGAGGGCT
GCCTGTGGAACGCCGGTGGAGTGGTCGTCTGCACCGGGGATGAGACTCAGT
GCTACGGACACTGGGTGCCTATCGGACTGGCCATTCCCGAGAACGAGGGGG
GTGGTAGCGAAGGCCGGCGGATCGGAAGGCCGAGGATCTGAGGGAGGGGGA
ACCAAGCCTCCGGAATACGGCGACACTCCGATCCCCGGGTATACGTACATCA
ATCCGCTGGACGGGACCTACCCGCCTGGAAGTGAACACCTTCATGTTCCAAAAC
CAAACCCTAGCCTCGAGGAATCCCAGCCGTTGAACACCTTCATGTTCCAAAAC
AACCGCTTCAGGAACGTGAACGGAGTGCTGACCGTGTACACTGGCACCTTCA
CACAAGGCACCGACCCCGTCAAGACCTACTACCAGTACACTCCTGTGTCCTC
GCGGGCTATGTACGATGCGTACTGGAATGGGAAGTTTCGGGACTGCGCTTTC
CACTCCGGCTTCAACGAGGATCCATTCGTGTGCGAATATCAGGGCCAGAGCT
CCGACCTCCCCCAACCCCTGCAAACGCCGGCGGAGAATCCGGAGGGGGAT
CAGGAGGCGGAAGCGAAGGGGGTGGATCCGAAGGAGGCGGATCCGAGGGT
GGAGGCTCCGAAGGGGGAGGCTCTGGTGGTGGCTCCGGATCGGGA

10

20

30

【0 0 5 2】

配列番号 3 9 =

【化 2 7 - 1】

ATGGCCGAAACCGTGGAATCATGTCTGGCGAAGCCCCATACCGAGAACTCCT
TCACCAACGTCTGGAAAGAGGGCGACAGCCGCTACGCCAACTACGAGGGCT
GCCTGTGGAACGCCGGTGGAGTGGTCGTCTGCACCGGGGATGAGACTCAGT
GCTACGGACACTGGGTGCCTATCGGACTGGCCATTCCCGAGAACGAGGGGG

40

50

【化 2 7 - 2】

GTGGTAGCGAAGGCGGCGGATCGGAAGGCGGAGGATCTGAGGGAGGGGGA
ACCAAGCCTCCGGAATACGGCGACACTCCGATCCCCGGGTATACGTACATCA
ATCCGCTGGACGGGACCTACCCGCCTGGAAGTGAACACCTTCATGTTCCAAGG
GAACCGCTTCAGGGCTAGACAGGGAGCGCTGACCGTGTACACTGGCACCTTC
ACACAAGGCACCGACCCCGTCAAGACCTACTACCAGTACACTCCTGTGTCCTC
GCGGGCTATGTACGATGCGTACTGGAATGGGAAGTTTCGGGACTGCGCTTTC
CACTCCGGCTTCAACGAGGATCCATTCTGTGTGCGAATATCAGGGCCAGAGCT
CCGACCTCCCCCAACCCCTGCAAACGCCGGCGGAGAATCCGGAGGGGGAT
CAGGAGGCGGAAGCGAAGGGGGTGGATCCGAAGGAGGCGGATCCGAGGGT
GGAGGCTCCGAAGGGGGAGGCTCTGGTGGTGGCTCCGGATCGGGA

10

20

【0 0 5 3】

配列番号 4 0 =

【化 2 8 - 1】

ATGGCCGAAACCGTGGAATCATGTCTGGCGAAGCCCCATACCGAGAACTCCT
TCACCAACGTCTGGAAAGAGGGCGACAGCCGCTACGCCAACTACGAGGGCT
GCCTGTGGAACGCCGGTGGAGTGGTCGTCTGCACCGGGGATGAGACTCAGT
GCTACGGACACTGGGTGCCTATCGGACTGGCCATTCCCGAGAACGAGGGGG
GTGGTAGCGAAGGCGGCGGATCGGAAGGCGGAGGATCTGAGGGAGGGGGA
ACCAAGCCTCCGGAATACGGCGACACTCCGATCCCCGGGTATACGTACATCA
ATCCGCTGGACGGGACCTACCCGCCTGGAAGTGAACACCTTCATGTTCCAAAAC
CAAACCCTAGCCTCGAGGAATCCCAGCCGTTGAACACCTTCATGTTCCAAAAC
AACCGCTTCAGGGCCGTGAACGGAGTGCTGACCGTGTACACTGGCACCTTCA
CACAAGGCACCGACCCCGTCAAGACCTACTACCAGTACACTCCTGTGTCCTC
GCGGGCTATGTACGATGCGTACTGGAATGGGAAGTTTCGGGACTGCGCTTTC
CACTCCGGCTTCAACGAGGATCCATTCTGTGTGCGAATATCAGGGCCAGAGCT
CCGACCTCCCCCAACCCCTGCAAACGCCGGCGGAGAATCCGGAGGGGGAT

30

40

50

【化 2 8 - 2】

CAGGAGGCGGAAGCGAAGGGGGTGGATCCGAAGGAGGCGGATCCGAGGGT
GGAGGCTCCGAAGGGGGAGGCTCTGGTGGTGGCTCCGGATCGGGA

【0 0 5 4】

配列番号 4 1 =

【化 2 9】

ATGGCCGAAACCGTGGAATCATGTCTGGCGAAGCCCCATACCGAGAACTCCT
TCACCAACGTCTGGAAAGAGGGCGACAGCCGCTACGCCAACTACGAGGGCT
GCCTGTGGAACGCCGGTGGAGTGGTCGTCTGCACCGGGGATGAGCACCAGT
GCTACGGAACTTGGGTGCCTATCGGACTGGCCATTCCCGAGAACGAGGGGG
GTGGTAGCGAAGGCGGCGGATCGGAAGGCGGAGGATCTGAGGGAGGGGGA
ACCAAGCCTCCGGAATACGGCGACACTCCGATCCCCGGGTATACGTACATCA
ATCCGCTGGACGGGACCTACCCGCCTGGAAGTGGAGCAGAACCCGGCCAACC
CAAACCCTAGCCTCGAGGAATCCCAGCCGTTGAACACCTTCATGTTCCAAGG
GAACCGCTTCAGGGCTAGACAGGGAGCGCTGACCGTGTACACTGGCACCTTC
ACACAAGGCACCGACCCCGTCAAGACCTACTACCAGTACACTCCTGTGTCCTC
GCGGGCTATGTACGATGCGTACTGGAATGGGAAGTTTCGGGACTGCGCTTTC
CACTCCGGCTTCAACGAGGATCCATTCGTGTGCGAATATCAGGGCCAGAGCT
CCGACCTCCCCCAACCCCTGCAAACGCCGGCGGAGAATCCGGAGGGGGAT
CAGGAGGCGGAAGCGAAGGGGGTGGATCCGAAGGAGGCGGATCCGAGGGT
GGAGGCTCCGAAGGGGGAGGCTCTGGTGGTGGCTCCGGATCGGGA

10

20

30

【0 0 5 5】

配列番号 4 2 =

40

50

【化 3 0 - 1】

ATGGCCGAAACCGTGGAATCATGTCTGGCGAAGCCCCATACCGAGAACTCCT
TCACCAACGTCTGGAAAGAGGGCGACAGCCGCTACGCCAACTACGAGGGCT
GCCTGTGGAACGCCGGTGGAGTGGTCGTCTGCACCGGGGATGAGCACCACT
GCTACGGAACCTTGGGTGCCTATCGGACTGGCCATTCCCGAGAACGAGGGGG
GTGGTAGCGAAGGCGGCGGATCGGAAGGCGGAGGATCTGAGGGAGGGGGA
ACCAAGCCTCCGGAATACGGCGACACTCCGATCCCCGGGTATACGTACATCA

10

【化 3 0 - 2】

ATCCGCTGGACGGGACCTACCCGCCTGGAAGTGAAGCAGAACCCGGCCAACC
CAAACCTAGCCTCGAGGAATCCCAGCCGTTGAACACCTTCATGTTCCAAAAC
AACCGCTTCAGGGCCGTGAACGGAGTGCTGACCGTGTACACTGGCACCTTCA
CACAAGGCACCGACCCCGTCAAGACCTACTACCAGTACACTCCTGTGTCCTC
GCGGGCTATGTACGATGCGTACTGGAATGGGAAGTTTCGGGACTGCGCTTTC
CACTCCGGCTTCAACGAGGATCCATTCGTGTGCGAATATCAGGGCCAGAGCT
CCGACCTCCCCCAACCCCTGCAAACGCCGGCGGAGAATCCGGAGGGGGAT
CAGGAGGCGGAAGCGAAGGGGGTGGATCCGAAGGAGGCGGATCCGAGGGT
GGAGGCTCCGAAGGGGGAGGCTCTGGTGGTGGCTCCGGATCGGGA

20

30

【 0 0 5 6】

配列番号 4 3 =

40

50

【化 3 1 - 1】

ATGGCCGAAACCGTGGAATCATGTCTGGCGAAGCCCCATACCGAGAACTCCT
TCACCAACGTCTGGAAAGAGGGCGACAGCCGCTACGCCAACTACGAGGGCT
GCCTGTGGAACGCCGGTGGAGTGGTCGTCTGCACCGGGGATGAGCATCAGT
GCTACGGAACCTGGGTGCCTATCGGACTGGCCATTCCCGAGAACGAGGGGG
GTGGTAGCGAAGGCGGCGGATCGGAAGGCGGAGGATCTGAGGGAGGGGGA
ACCAAGCCTCCGGAATACGGCGACACTCCGATCCCCGGGTATACGTACATCA
ATCCGCTGGACGGGACCTACCCGCCTGGAAGTGAACACCTTCATGTTCCAAGG
GAACCGCTTCAGGAACAGACAGGGAGCGCTGACCGTGTAACTGGCACCTTC
ACACAAGGCACCGACCCCGTCAAGACCTACTACCAGTAACTCCTGTGTCCTC
GCGGGCTATGTACGATGCGTACTGGAATGGGAAGTTTCGGGACTGCGCTTTC
CACTCCGGCTTCAACGAGGATCCATTCGTGTGCGAATATCAGGGCCAGAGCT
CCGACCTCCCCCAACCCCTGCAAACGCCGGCGGAGAATCCGGAGGGGGAT
CAGGAGGCGGAAGCGAAGGGGGTGGATCCGAAGGAGGCGGATCCGAGGGT

10

20

【化 3 1 - 2】

GGAGGCTCCGAAGGGGGAGGCTCTGGTGGTGGCTCCGGATCGGGA

30

【0 0 5 7】

配列番号 4 4 =

40

50

【化 3 2】

ATGGCCGAAACCGTGGAATCATGTCTGGCGAAGCCCCATACCGAGAACTCCT
TCACCAACGTCTGGAAAGAGGGCGACAGCCGCTACGCCAACTACGAGGGCT
GCCTGTGGGCGCCGGTGGAGTGGTCGTCTGCACCGGGGATGAGCATCAGT
GCTACGGAACCTGGGTGCCTATCGGACTGGCCATTCCCGAGAACGAGGGGG
GTGGTAGCGAAGGCGGCGGATCGGAAGGCGGAGGATCTGAGGGAGGGGGA
ACCAAGCCTCCGGAATACGGCGACACTCCGATCCCCGGGTATACGTACATCA
ATCCGCTGGACGGGACCTACCCGCCTGGAAGTGGAGCAGAACCCGGCCAACC
CAAACCCTAGCCTCGAGGAATCCCAGCCGTTGAACACCTTCATGTTCCAAGG
GAACCGCTTCAGGAACAGACAGGGAGCGCTGACCGTGTACACTGGCACCTTC
ACACAAGGCACCGACCCCGTCAAGACCTACTACCAGTACACTCCTGTGTCCTC
GCGGGCTATGTACGATGCGTACTGGAATGGGAAGTTTCGGGACTGCGCTTTC
CACTCCGGCTTCAACGAGGATCCATTCGTGTGCGAATATCAGGGCCAGAGCT
CCGACCTCCCCCAACCCCTGCAAACGCCGGCGGAGAATCCGGAGGGGGAT
CAGGAGGCGGAAGCGAAGGGGGTGGATCCGAAGGAGGCGGATCCGAGGGT
GGAGGCTCCGAAGGGGGAGGCTCTGGTGGTGGCTCCGGATCGGGA

10

20

30

【 0 0 5 8】

配列番号 4 5 =

【化 3 3 - 1】

ATGGCCGAAACCGTGGAATCATGTCTGGCGAAGCCCCATACCGAGAACTCCT
TCACCAACGTCTGGAAAGAGGGCGACAGCCGCTACGCCAACTACGAGGGCT
GCCTGTGGAACGCCGGTGGAGTGGTCGTCTGCACCGGGGATGAGACTCAGT
GCTACGGACACTGGGTGCCTATCGGACTGGCCATTCCCGAGAACGAGGGGG
GTGGTAGCGAAGGCGGCGGATCGGAAGGCGGAGGATCTGAGGGAGGGGGA
ACCAAGCCTCCGGAATACGGCGACACTCCGATCCCCGGGTATACGTACATCA
ATCCGCTGGACGGGACCTACCCGCCTGGAAGTGGAGCAGAACCCGGCCAACC

40

50

【化 3 3 - 2】

CAAACCCTAGCCTCGAGGAATCCCAGCCGTTGAACACCTTCATGTTCCAAGG
GAACCGCTTCAGGAACAGACAGGGAGCGCTGACCGTGTACACTGGCACCTTC
ACACAAGGCACCGACCCCGTCAAGACCTACTACCAGTACACTCCTGTGTCCTC
GCGGGCTATGTACGATGCGTACTGGAATGGGAAGTTTCGGGACTGCGCTTTC
CACTCCGGCTTCAACGAGGATCCATTCTGTGTGCGAATATCAGGGCCAGAGCT
CCGACCTCCCCCAACCCCTGCAAACGCCGGCGGAGAATCCGGAGGGGGAT
CAGGAGGCGGAAGCGAAGGGGGTGGATCCGAAGGAGGCGGATCCGAGGGT
GGAGGCTCCGAAGGGGGAGGCTCTGGTGGTGGCTCCGGATCGGGAGCCAG
ATCTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCACGACCTGAACTCCTGGGG
GGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTC
CCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCC
TGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAG
ACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTC
CTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGG
TCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAA
GGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAG
ATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCA
GCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACCTACA
AGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAA
GCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCC
GTGATGCACGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGT
CTCCGGGTAAATGA

10

20

30

40

【0 0 5 9】

配列番号 4 6 =

【化 3 4 - 1】

ATGGCCGAAACCGTGGAATCATGTCTGGCGAAGCCCCATACCGAGAACTCCT
TCACCAACGTCTGGAAAGAGGGCGACAGCCGCTACGCCAACTACGAGGGCT

50

【化 3 4 - 2】

GCCTGTGGAACGCCGGTGGAGTGGTCGTCTGCACCGGGGATGAGACTCAGT
GCTACGGACACTGGGTGCCTATCGGACTGGCCATTCCCGAGAACGAGGGGG
GTGGTAGCGAAGGCGGCGGATCGGAAGGCGGAGGATCTGAGGGAGGGGGA
ACCAAGCCTCCGGAATACGGCGACACTCCGATCCCCGGGTATACGTACATCA
ATCCGCTGGACGGGACCTACCCGCCTGGAAGTGAAGCAGAACCCGGCCAACC
CAAACCCTAGCCTCGAGGAATCCCAGCCGTTGAACACCTTCATGTTCCAAAAC
AACCGCTTCAGGAACGTGAACGGAGTGCTGACCGTGTAAGTGGACCTTCA
CACAAGGCACCGACCCCGTCAAGACCTACTACAGTACACTCCTGTGTCTC
GCGGGCTATGTACGATGCGTACTGGAATGGGAAGTTTCGGGACTGCGCTTTC
CACTCCGGCTTCAACGAGGATCCATTCTGTGCGAATATCAGGGCCAGAGCT
CCGACCTCCCCCAACCCCTGCAAACGCCGGCGGAGAATCCGGAGGGGGAT
CAGGAGGCGGAAGCGAAGGGGGTGGATCCGAAGGAGGCGGATCCGAGGGT
GGAGGCTCCGAAGGGGGAGGCTCTGGTGGTGGCTCCGGATCGGGAGCCAG
ATCTGACAAACTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGG
GGACCGTCAGTCTTCTCTCCCCCAAAACCAAGGACACCCTCATGATCTC
CCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCC
TGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAG
ACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTC
CTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGG
TCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAA
GGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAG
ATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCA
GCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACA
AGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAA
GCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCC

10

20

30

40

【化 3 4 - 3】

GTGATGCACGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGT
CTCCGGGTAAATGA

【0 0 6 0】

配列番号 4 7 =

50

【化 3 5 - 1】

ATGGCCGAAACCGTGGAATCATGTCTGGCGAAGCCCCATACCGAGAACTCCT
TCACCAACGTCTGGAAAGAGGGCGACAGCCGCTACGCCAACTACGAGGGCT
GCCTGTGGAACGCCGGTGGAGTGGTCGTCTGCACCGGGGATGAGACTCAGT
GCTACGGACACTGGGTGCCTATCGGACTGGCCATTCCCGAGAACGAGGGGG
GTGGTAGCGAAGGCGGCGGATCGGAAGGCGGAGGATCTGAGGGAGGGGGA
ACCAAGCCTCCGGAATACGGCGACACTCCGATCCCCGGGTATACGTACATCA
ATCCGCTGGACGGGACCTACCCGCCTGGAAGTGAACACCTTCATGTTCCAAGG
GAACCGCTTCAGGGCTAGACAGGGAGCGCTGACCGTGTACACTGGCACCTTC
ACACAAGGCACCGACCCCGTCAAGACCTACTACCAGTACACTCCTGTGTCCTC
GCGGGCTATGTACGATGCGTACTGGAATGGGAAGTTTCGGGACTGCGCTTTC
CACTCCGGCTTCAACGAGGATCCATTCTGTGTGCGAATATCAGGGCCAGAGCT
CCGACCTCCCCCAACCCCTGCAAACGCCGGCGGAGAATCCGGAGGGGGAT
CAGGAGGCGGAAGCGAAGGGGGTGGATCCGAAGGAGGCGGATCCGAGGGT
GGAGGCTCCGAAGGGGGAGGCTCTGGTGGTGGCTCCGGATCGGGAGCCAG
ATCTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGG
GGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTC
CCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCC
TGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAG
ACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTC
CTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGG
TCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAA

10

20

30

40

50

【化 3 5 - 2】

GGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAG
ATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCA
GCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACA
AGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAA
GCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCC
GTGATGCACGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGT
CTCCGGGTAAATGA

10

【0 0 6 1】

配列番号 4 8 =

20

30

40

50

【化 3 6 - 1】

ATGGCCGAAACCGTGGAATCATGTCTGGCGAAGCCCCATACCGAGAACTCCT
TCACCAACGTCTGGAAAGAGGGCGACAGCCGCTACGCCAACTACGAGGGCT
GCCTGTGGAACGCCGGTGGAGTGGTCGTCTGCACCGGGGATGAGACTCAGT
GCTACGGACACTGGGTGCCTATCGGACTGGCCATTCCCGAGAACGAGGGGG
GTGGTAGCGAAGGCGGCGGATCGGAAGGCGGAGGATCTGAGGGAGGGGGA
ACCAAGCCTCCGGAATACGGCGACACTCCGATCCCCGGGTATACGTACATCA
ATCCGCTGGACGGGACCTACCCGCCTGGAAGTGAACACCTTCATGTTCCAAAAC
AACCGCTTCAGGGCCGTGAACGGAGTGCTGACCGTGTAAGTGGCACCTTCA
CACAAGGCACCGACCCCGTCAAGACCTACTACAGTACACTCCTGTGTCCTC
GCGGGCTATGTACGATGCGTACTGGAATGGGAAGTTTCGGGACTGCGCTTTC
CACTCCGGCTTCAACGAGGATCCATTCGTGTGCGAATATCAGGGCCAGAGCT
CCGACCTCCCCCAACCCCTGCAAACGCCGGCGGAGAATCCGGAGGGGGAT
CAGGAGGCGGAAGCGAAGGGGGTGGATCCGAAGGAGGCGGATCCGAGGGT
GGAGGCTCCGAAGGGGGAGGCTCTGGTGGTGGCTCCGGATCGGGAGCCAG
ATCTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGG
GGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTC

10

20

30

40

50

【化 3 6 - 2】

CCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCC
TGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAG
ACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTC
CTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGG
TCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAA
GGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAG
ATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCA
GCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACCTACA
AGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAA
GCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCC
GTGATGCACGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGT
CTCCGGGTAAATGA

10

20

【0 0 6 2】

配列番号 4 9 =

【化 3 7 - 1】

ATGGCCGAAACCGTGGAATCATGTCTGGCGAAGCCCCATACCGAGAACTCCT
TCACCAACGTCTGGAAAGAGGGCGACAGCCGCTACGCCAACTACGAGGGCT
GCCTGTGGAACGCCGGTGGAGTGGTCGTCTGCACCGGGGATGAGCACCAGT
GCTACGGAACTTGGGTGCCTATCGGACTGGCCATTCCCGAGAACGAGGGGG
GTGGTAGCGAAGGCGGCGGATCGGAAGGCGGAGGATCTGAGGGAGGGGGA
ACCAAGCCTCCGGAATACGGCGACACTCCGATCCCCGGGTATACGTACATCA
ATCCGCTGGACGGGACCTACCCGCCTGGAAGTGGAGCAGAACCCGGCCAACC
CAAACCCTAGCCTCGAGGAATCCCAGCCGTTGAACACCTTCATGTTCCAAGG
GAACCGCTTCAGGGCTAGACAGGGAGCGCTGACCGTGTACACTGGCACCTTC
ACACAAGGCACCGACCCCGTCAAGACCTACTACCAGTACACTCCTGTGTCCTC
GCGGGCTATGTACGATGCGTACTGGAATGGGAAGTTTCGGGACTGCGCTTTC
CACTCCGGCTTCAACGAGGATCCATTCTGTGTGCGAATATCAGGGCCAGAGCT

30

40

50

【化 3 7 - 2】

CCGACCTCCCCCAACCCCTGCAAACGCCGGCGGAGAATCCGGAGGGGGAT
CAGGAGGCGGAAGCGAAGGGGGTGGATCCGAAGGAGGCGGATCCGAGGGT
GGAGGCTCCGAAGGGGGAGGCTCTGGTGGTGGCTCCGGATCGGGAGCCAG
ATCTGACAAACTCACACATGCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGG
GGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTC
CCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCC
TGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAG
ACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTC
CTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGG
TCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAA
GGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAG
ATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCA
GCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACA
AGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAA
GCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCC
GTGATGCACGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGT
CTCCGGGTAAATGA\

10

20

30

【 0 0 6 3】

配列番号 5 0 =

【化 3 8 - 1】

ATGGCCGAAACCGTGGAATCATGTCTGGCGAAGCCCCATACCGAGAACTCCT
TCACCAACGTCTGGAAAGAGGGCGACAGCCGCTACGCCAACTACGAGGGCT
GCCTGTGGAACGCCGGTGGAGTGGTCGTCTGCACCGGGGATGAGCACCAGT
GCTACGGAACTTGGGTGCCTATCGGACTGGCCATTCCCGAGAACGAGGGGG
GTGGTAGCGAAGGCGGCGGATCGGAAGGCGGAGGATCTGAGGGAGGGGGA
ACCAAGCCTCCGGAATACGGCGACACTCCGATCCCCGGGTATACGTACATCA
ATCCGCTGGACGGGACCTACCCGCCTGGAAGTGGAGCAGAACCCGGCCAACC

40

50

【化 3 8 - 2】

CAAACCCTAGCCTCGAGGAATCCCAGCCGTTGAACACCTTCATGTTCCAAAAC
AACCGCTTCAGGGCCGTGAACGGAGTGCTGACCGTGTACACTGGCACCTTCA
CACAAGGCACCGACCCCGTCAAGACCTACTACCAGTACACTCCTGTGTCCTC
GCGGGCTATGTACGATGCGTACTGGAATGGGAAGTTTCGGGACTGCGCTTTC
CACTCCGGCTTCAACGAGGATCCATTCTGTGTGCGAATATCAGGGCCAGAGCT
CCGACCTCCCCCAACCCCTGCAAACGCCGGCGGAGAATCCGGAGGGGGAT
CAGGAGGCGGAAGCGAAGGGGGTGGATCCGAAGGAGGCGGATCCGAGGGT
GGAGGCTCCGAAGGGGGGAGGCTCTGGTGGTGGCTCCGGATCGGGAGCCAG
ATCTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGG
GGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTC
CCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCC
TGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAG
ACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTC
CTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGG
TCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAA
GGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAG
ATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCA
GCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACCTACA
AGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAA
GCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCC
GTGATGCACGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGT
CTCCGGGTAAATGA

10

20

30

40

【0 0 6 4】

配列番号 5 1 =

【化 3 9 - 1】

ATGGCCGAAACCGTGGAATCATGTCTGGCGAAGCCCCATACCGAGAACTCCT
TCACCAACGTCTGGAAAGAGGGCGACAGCCGCTACGCCAACTACGAGGGCT

50

【化 3 9 - 2】

GCCTGTGGAACGCCGGTGGAGTGGTCTGCACTGGGGATGAGCACCAGT
GCTACGGAACCTGGGTGCCTATCGGACTGGCCATTCCCAGAACGAGGGGG
GTGGTAGCGAAGGCGGCGGATCGGAAGGCGGAGGATCTGAGGGAGGGGGA
ACCAAGCCTCCGGAATACGGCGACACTCCGATCCCCGGGTATACGTACATCA
ATCCGCTGGACGGGACCTACCCGCCTGGAAGTGGAGCAGAACCCGGCCAACC
CAAACCCTAGCCTCGAGGAATCCCAGCCGTTGAACACCTTCATGTTCCAAGG
GAACCGCTTCAGGAACAGACAGGGAGCGCTGACCGTGTACACTGGCACCTTC
ACACAAGGCACCGACCCCGTCAAGACCTACTACCAGTACACTCCTGTGTCCTC
GCGGGCTATGTACGATGCGTACTGGAATGGGAAGTTTCGGGACTGCGCTTTC
CACTCCGGCTTCAACGAGGATCCATTCTGTGTGCGAATATCAGGGCCAGAGCT
CCGACCTCCCCAACCCCTGCAAACGCCGGCGGAGAATCCGGAGGGGGAT
CAGGAGGCGGAAGCGAAGGGGGTGGATCCGAAGGAGGCGGATCCGAGGGT
GGAGGCTCCGAAGGGGGAGGCTCTGGTGGTGGCTCCGGATCGGGAGCCAG
ATCTGACAAACTCACACATGCCACCGTGCCACGACCTGAACTCCTGGGG
GGACCGTCAGTCTTCCTCTCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTC
CCGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCC
TGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAG
ACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTC
CTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGG
TCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGGCCAAA
GGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAG
ATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCA
GCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACA
AGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAA
GCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCC

10

20

30

40

【化 3 9 - 3】

GTGATGCACGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGT
CTCCGGGTAAATGA

【0 0 6 5】

配列番号 5 2 =

50

【化 4 0 - 1】

ATGGCCGAAACCGTGGAATCATGTCTGGCGAAGCCCCATACCGAGAACTCCT
TCACCAACGTCTGGAAAGAGGGCGACAGCCGCTACGCCAACTACGAGGGCT
GCCTGTGGGCCGCCGGTGGAGTGGTCGTCTGCACTGGGGATGAGCACCAGT
GCTACGGAACCTGGGTGCCTATCGGACTGGCCATTCCCGAGAACGAGGGGG
GTGGTAGCGAAGGCGGCGGATCGGAAGGCGGAGGATCTGAGGGAGGGGGA
ACCAAGCCTCCGGAATACGGCGACACTCCGATCCCCGGGTATACGTACATCA
ATCCGCTGGACGGGACCTACCCGCCTGGAAGTGGAGCAGAACCCGGCCAACC
CAAACCCTAGCCTCGAGGAATCCCAGCCGTTGAACACCTTCATGTTCCAAGG
GAACCGCTTCAGGAACAGACAGGGAGCGCTGACCGTGTACACTGGCACCTTC
ACACAAGGCACCGACCCCGTCAAGACCTACTACCAGTACACTCCTGTGTCCTC
GCGGGCTATGTACGATGCGTACTGGAATGGGAAGTTTCGGGACTGCGCTTTC
CACTCCGGCTTCAACGAGGATCCATTCTGTGTGCGAATATCAGGGCCAGAGCT
CCGACCTCCCCCAACCCCTGCAAACGCCGGCGGAGAATCCGGAGGGGGAT
CAGGAGGCGGAAGCGAAGGGGGTGGATCCGAAGGAGGCGGATCCGAGGGT
GGAGGCTCCGAAGGGGGAGGCTCTGGTGGTGGCTCCGGATCGGGAGCCAG
ATCTGACAAAACCTCACACATGCCACCGTGCCACGACCTGAACTCCTGGGG
GGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCAAACCAAGGACACCCTCATGATCTC
CCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCC
TGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAG
ACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTC
CTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGG
TCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAA

10

20

30

40

50

【化 4 0 - 2】

GGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAG
ATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCA
GCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACA
AGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAA
GCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCC
GTGATGCACGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGT
CTCCGGGTAAATGA

10

【0 0 6 6】

配列番号 5 3 = H H H H H H ; 配列番号 5 4 = E D G S

定義

【0 0 6 7】

本明細書で使用される用語は、一般的に当技術分野で、本発明の文脈内で、および各用語が使用される特定の文脈においてその通常の意味を有する。本発明の組成物および方法、ならびにそれらを作製および使用する方法の記載にあたって追加の指針を実践者に提供するために、ある特定の用語を以下にまたは本明細書の他所で考察する。冠詞「1つの (a)」および「1つの (an)」は、冠詞の文法上の目的語の1つまたは1つより多く（すなわち少なくとも1つ）を指す。用語「または」は、本文が明白に示していない限り、用語「および／または」を意味し、それらと互換的に使用される。本出願では、単数形の使用は、具体的にそうでないと述べていない限り、複数形を含む。さらに、用語「含む (comprising)」ならびに「含む (comprises)」および「含む (comprised)」などの他の形態の使用も限定的ではない。本明細書に記載されるいかなる範囲も、エンドポイントおよびエンドポイント間の全ての値を含むと理解される。

20

【0 0 6 8】

用語「g 3 p」を、単独でまたは「g 3 p 由来」または「g 3 p 融合体」などの用語で使用する場合、アミロイドに対する結合能を保持している g 3 p の断片、バリエント、および変異体を含む任意の野生型または組換え繊維状ファージ g 3 p タンパク質を指す。これらの用語は、任意の特定の繊維状バクテリオファージ g 3 p に限定されないと解釈すべきである。

30

【0 0 6 9】

用語「繊維状バクテリオファージ」、「バクテリオファージ」、および「ファージ」は、本明細書において互換的に使用され、野生型および組換え繊維状バクテリオファージの両方を含む。

40

【0 0 7 0】

本明細書で使用される場合、用語「野生型繊維状バクテリオファージ」は、自然界で見出される繊維状バクテリオファージ、任意のヌクレオチドまたはアミノ酸配列データベースにおいて「野生型」として示されている繊維状バクテリオファージ、市販されており「野生型」として特徴付けられる繊維状バクテリオファージ、および継代の間に前述のいずれかと比較して非組換え変異を獲得した繊維状バクテリオファージを指す。

【0 0 7 1】

本明細書で使用される場合、用語「ドメイン」は、例えばポリペプチド鎖の部分で構成される独立してフォールディングされた構造を含む、いくつかの特有の物理的特色または特有の役割を有するポリペプチドまたはタンパク質の領域を意味する。ドメインは、ポリ

50

ペプチドの特有の物理的特色の配列を含有してもよく、またはその結合特徴を保持する物理的特色の断片を含有し得る（例えば、第2のドメインに結合する能力を保持する）。ドメインは、別のドメインと会合してもよい。例えば、g3p N2ドメインは、F-p i l iに結合し、g3p N1ドメインはT o l Aに結合する。

【0072】

本明細書で使用される場合、「全般的アミロイド相互作用モチーフ」または「GAIM」は、分子の内部表面を裏打ちする疎水性および極性残基の両方の組合せを使用してアミロイド結合を媒介する2ドメインポリペプチド（g3pのN1およびN2ドメイン）を指す。GAIM単量体のN1およびN2ドメインは、芳香族アミノ酸の非対称分布を有する。GAIM N2ドメインは、11個のチロシン（Tyr）残基、および1つの露出したトリプトファン（Trp）残基を含有し；N1ドメインは、3個のTrpおよび3個のTyr残基を含有する。N1およびN2ドメインは、逆馬蹄形コンフォメーション（inverted horseshoe conformation）をとり、水素結合の複雑なネットワークによってクローズドコンフォメーション（ロックされたコンフォメーション（locked conformation））で一緒に保持される（Weininger et al., 2009）。ドメイン間リンカーにおけるプロリンのcis-trans異性体化は、水素結合の進行性切断および2つのドメインの部分的開口をもたらす。GAIMのN1およびN2ドメインの「開口性の」再配列により、N1のβ鎖4および5（極性残基を含む）、ならびにN2のβ鎖9および10（芳香族／疎水性残基を含む）が露出し、アミロイドに結合することが可能となる。図1Aを参照されたい。

【0073】

本明細書で使用される場合、「対照足場」または「GAIM足場」は、配列番号11のアミノ酸配列を有するGAIM-Ig融合タンパク質PB120に対応する。GAIM足場のGAIM部分は、配列番号12のアミノ酸配列を有する。PB120は、配列番号13のアミノ酸配列を有するPB106に由来する。PB106のGAIM部分は、配列番号14のアミノ酸配列を有する。

【0074】

本明細書で使用される場合、「PB106+EDGS」（「EDGS」は配列番号54として開示される）は、配列番号15によって提供されるアミノ酸配列を有するオープンコンフォメーションのポリペプチドを表す。「PB106+EDGS」（「EDGS」は配列番号54として開示される）のGAIM部分は、配列番号16のアミノ酸配列を有する。

【0075】

本明細書で使用される場合、「超安定化」GAIMまたはGAIM融合体は、配列番号17のアミノ酸配列を有するGAIM-Ig融合体PB113を指す。PB113のGAIM部分は、配列番号18のアミノ酸配列を有する。

【0076】

用語「GAIM-Ig融合体」、「GAIM-Ig融合タンパク質」、および「GAIM融合体」は、本明細書において互換的に使用され、免疫グロブリン定常領域に直接または低分子リンカーによって接続されたg3p GAIMドメインを含むポリペプチドを指す。図1Bに示すように、本発明のGAIM-Ig融合体のFc領域が二量体化し、免疫グロブリン定常領域に直接または低分子リンカーによって結合した2コピーのGAIMを含む複合体をもたらす。本発明のGAIM融合体は、シグナル配列をさらに含み得る。本発明は、任意の免疫グロブリン定常領域、例えばIgG（例えば、IgG1、IgG2、IgG3、またはIgG4）、IgD、IgA、IgE、またはIgMの免疫グロブリン定常領域とのGAIM融合体を企図する。一部の態様では、GAIM-Ig融合体は、オープン安定化GAIM-Ig融合体である。一部の態様では、GAIM-Ig融合体は、部分的または完全に脱免疫されている。

【0077】

本明細書で使用される「GAIM二量体」は、本明細書に記載されるGAIM-Ig融

合体の2つのGAIMドメインを指す。GAIM二量体は、図1Cによってグラフ表示される。

【0078】

用語「オープン安定化融合体」、「オープン安定化GAIM-Ig融合体」、「オープン安定化バリエーション」、「および「オープン安定化GAIM-Igバリエーション」は、本明細書において互換的に使用され、融合体のGAIM部分に少なくとも1つのオープンコンフォメーション変異および少なくとも1つの安定化変異を含むGAIM-Ig融合体を指す。本明細書に記載されるオープン安定化バリエーションのオープンコンフォメーション変異は、配列番号3 (DDKTL D；配列番号13および配列番号15に関してアミノ酸24～29) の、配列番号4 (EGDS) での置換である。安定化変異は、例えば配列番号5 (FQNN；配列番号13に関してアミノ酸137～140；配列番号15に関してアミノ酸135～138) の、配列番号8 (FQGN) での置換、配列番号6 (RQGA；配列番号13に関してアミノ酸145～148；配列番号15に関してアミノ酸143～146) の、配列番号9 (VNGV) での置換、配列番号7 (QGTDPVK；配列番号13に関してアミノ酸158～164；配列番号15に関してアミノ酸156～162) の、配列番号10 (QGGK) への置換、またはその組合せから選択されるN2安定化変異であり得る。他のN2安定化変異を以下に記載する。本明細書に記載されるオープン安定化融合体は、1つまたは複数の置換、挿入、または欠失をさらに含み得る。例えば、オープン安定化GAIM-Ig融合体は、免疫原性を低減もしくは消失させるように、潜在的グリコシル化部位を除去するように、またはアミロイドタンパク質に対する結合活性もしくは特異性をさらにモジュレートするようにさらに改変され得る。

【0079】

本明細書で使用される場合、所定のアミノ酸配列「から本質的になる」本発明のGAIM-Ig融合タンパク質は、融合体のGAIMドメインとFcドメインとを接続する低分子リンカー、N末端シグナル配列もしくはその断片、N末端メチオニンの欠失 ($\Delta M1$)、またはN末端メチオニンとアラニンとの両方の欠失 ($\Delta M1$ および $\Delta A2$)、および／または融合体のFcドメインのC末端リシン (K) の欠失をさらに含み得る。

【0080】

本明細書で使用される場合、「低分子リンカー (small linker)」は、GAIM-Ig融合体のGAIMドメインとFcドメインとを接続する、最大25アミノ酸長のペプチドリリンカーを指す。以下にさらに説明するように、GAIM-Ig融合体のGAIMとFcドメインとを接続する例示的な「低分子リンカー」は、GSに富む配列を含み得るか、またはアミノ酸配列ARSを含み得る。

【0081】

本明細書で使用される場合、「シグナル配列」は、本発明のポリペプチドのN末端に存在するおよそ16～30アミノ酸の短いペプチドを指す。例えば、シグナル配列は、GenBank Ref Seq NP_510891.1の18アミノ酸のN末端配列を含み得る。シグナル配列は、本発明のポリペプチドを分泌するために真核細胞によって使用される。これは、典型的に分泌前にポリペプチドから切断され、したがって典型的に分泌されたポリペプチドには存在しない。

【0082】

用語「アミロイド」または「アミロイド線維」は、本明細書においていくつかの異なるタンパク質のいずれかのミスフォールディングまたは凝集によって形成され、線維軸に対して垂直にスタッキングされた β シートの規則正しい配置を含む三次構造に関する一般的用語として使用される。Sunde et al., J. Mol Biol. (1997) 273:729-39。

【0083】

本明細書で使用される場合、アミロイドは、以下のタンパク質：アンドロゲン受容体；アポリポタンパク質A I；アポリポタンパク質A I I；アポリポタンパク質A I V；アポ血清アミロイドA；A β ；ABri；ADan；アトロフィン-1；心房性ナトリウム利尿因子；アタキシン；カルシトニン； γ -クリスタリン；シスタチンC；フィブリノゲン

；ゲルソリン；ハンチンチン；インスリン；膵島アミロイドポリペプチド；免疫グロブリン
ンカップ軽鎖；免疫グロブリンラムダ軽鎖；ケラトエピセリン；ケラチン；ラクタヘドリン；
ラクトフェリン；リゾチーム；肺サーファクタントタンパク質C；メディン；歯原性
エナメル芽細胞関連タンパク質；プリオンタンパク質；プロカルシトニン；プロラクチン
；セメノゲリンI；血清アミロイドA；スーパーオキシドジスムターゼI； β 2-ミクロ
グロブリン；TATAボックス結合タンパク質；タウ；トランスサイレチン；および α -
シヌクレイン、または上記の組合せのいずれかから形成することができる。本明細書で使
用される場合、アミロイドはまた、上記のタンパク質のいずれかのランケート型または
翻訳後改変型から形成することもできる。「アミロイド」または「アミロイド線維」は、
アミロイドの異なるまたは複数のコンフォメーションまたは形態を含む。

10

【0084】

本明細書で使用される場合、「毒性オリゴマー」は、典型的にはアミロイドの形成経路
上にある単量体の小さい集合または凝集体を指す。

【0085】

例示的なアミロイドは、アルツハイマー病において形成されるアミロイド β 凝集体を含
み、これはペータアミロイドペプチド「A β 」、ヒトアミロイド前駆体タンパク質（h
APP）から切断された39～43アミノ酸の内部断片を含む。A β は、ランケート型
および翻訳後修飾型を含む。例えば、A β 40は、A β の短い形態であり、より原線維形
成性のアイソフォームA β 42は、長い形態である。A β のさらなる例には、Nランケー
ト型A β 11-42、A β 11-42-Pyrro、A β 3-42-Pyrro、およびA
1-42-E22Q-Dutch変異が挙げられるがこれらに限定されない。Levy et
al, 1990; Van Broeckhoven et al, 1990を参照されたい。他の例示的なアミロイ
ドタンパク質には、 α -シヌクレイン（パーキンソン病に関連する）、ハンチンチン（ハ
ンチントン病に関連する）、タウ（アルツハイマー病に関連する）、プリオンタンパク質
の異常なコンフォメーション、PrP^{Sc}、ならびに免疫グロブリン軽鎖（カップまたは
ラムダ）、トランスサイレチン、ゲルソリン、および膵島アミロイドポリペプチドを含む
がこれらに限定されない様々なアミロイドーシス疾患に関連するアミロイドが挙げられる
。追加の例は、本説明を通して提供され、当業者に公知である（例えば、Aguzzi (2010
)、およびEichner and Radford, Mol. Cell (2011) 43:8-18を参照されたい）。
タンパク質またはペプチドが明記されていなければ、用語「アミロイド」または「アミロ
イド線維」の使用は、任意の特定のタンパク質、形態、疾患、または状態に限定されないと
解釈すべきである。

20

30

【0086】

用語「ペータアミロイドペプチド」は、「 β アミロイドペプチド」、「 β AP」、「 β
A」、および「A β 」と同義である。これらの用語は全て、ヒトアミロイド前駆体タンパ
ク質（hAPP）に由来するアミロイド形成ペプチドを指す。

【0087】

本明細書で使用される場合、「PrPタンパク質」、「PrP」、および「プリオン」
は、適切な条件下でタンパク質ミスフォールディング疾患の原因である凝集体の形成を誘
導することが可能なポリペプチドを指す。例えば、正常な細胞プリオンタンパク質（Pr
P^C）は、適切な条件下で疾患、例えばウシ海綿状脳症（BSE）（狂牛病）、ネコのネ
コ海綿状脳症、クールー、クロイツフェルト・ヤコブ病（CJD）、ゲルストマン・スト
ロイスラー・シャインカー病（GSS）、および致死性家族性不眠症（FFI）を含むが
これらに限定されない疾患の原因である対応するスクレイピーアイソフォーム（PrP^{Sc}
）に変換される。

40

【0088】

本明細書で使用される場合、「誤って折り畳まれたおよび／または凝集したアミロイド
タンパク質に関連する疾患」には、アルツハイマー病；早期発症型アルツハイマー病；後
期発症型アルツハイマー病；発症前アルツハイマー病；ALアミロイドーシス；筋萎縮性
側索硬化症（ALS）；筋萎縮性側索硬化症／パーキンソニズム認知症複合；嗜銀顆粒性

50

認知症；大動脈中膜アミロイドーシス；ApoAⅠアミロイドーシス；ApoAⅡアミロイドーシス；ApoAⅢアミロイドーシス；ApoAⅣアミロイドーシス；心房アミロイドーシス；イギリス型／デンマーク型認知症；白内障；大脳皮質基底核変性症；逆まつげに関連する角膜アミロイドーシス；シスタチンCプラーク関連疾患；シスタチンCプラーク関連冠動脈疾患；シスタチンCプラーク関連腎疾患；皮膚苔癬アミロイドーシス；ボクサー認知症；歯状核赤核－淡蒼球ルイ体萎縮症；石灰化を伴うびまん性神経原線維変化病；レヴィー小体認知症；ダウン症候群；家族性アミロイド心筋症（FAC）；家族性アミロイドポリニューロパチー（FAP）；家族性イギリス型認知症；家族性デンマーク型認知症；家族性脳症；家族性地中海熱；フィブリノゲンアミロイドーシス；フィンランド型遺伝性アミロイドーシス；パーキンソニズムを伴う前頭側頭型認知症；前頭側頭葉変性症（FTLD）；前頭側頭葉認知症；ハレルフォルデン－スパッツ病；血液透析関連性アミロイドーシス；遺伝性脳アミロイド血管症；アミロイドーシスを伴う遺伝性脳内出血；遺伝性格子状角膜ジストロフィー；ハンチントン病；アイスランド型遺伝性脳アミロイド血管症；封入体筋炎；注射部位限局性アミロイドーシス（Injection-localized amyloidosis）；臍島アミロイドポリペプチドアミロイドーシス；リゾチームアミロイドーシス；多発性骨髄腫；筋強直性ジストロフィー；ニーマン・ピック病C型；神経原線維変化を伴う非グアム型運動ニューロン疾患；パーキンソン病；末梢性アミロイドーシス；ピック病；下垂体プロラクチノーマ；脳炎後パーキンソニズム；プリオンタンパク質脳アミロイド血管症；プリオン媒介性疾患；クールー；クロイツフェルト・ヤコブ病（CJD）；ゲルストマン・ストロイスラー・シャインカー病（GSS）；致死性家族性不眠症（FFI）；スクレイピー；海綿状脳症；肺胞タンパク症；進行性皮質下グリオーシス；進行性核上麻痺；老年性全身性アミロイドーシス；血清AAアミロイドーシス；球脊髄性筋萎縮症；脊髄小脳失調症（SCA1、SCA3、SCA6、またはSCA7）；亜急性硬化性全脳炎；全身性アミロイドーシス；家族性アミロイドーシス；野生型アミロイドーシス；神経原線維変化優位型認知症；およびタウオパチーが挙げられるがこれらに限定されない。例えば、Chiti & Dobson, *Ann Rev Biochem* (2006) 75:333-66;およびJosephs et al., *Acta Neuropathol* (2011) 122:137-153を参照されたい。これらの疾患の症状または重症度を処置するかまたは低減させるために、アミロイド凝集体形成（すなわち、誤って折り畳まれたおよび／または凝集したタンパク質）を防止および／または低減させることが大いに必要である。

【0089】

本明細書で使用される場合、「アミロイドを低減させる」ポリペプチド、組成物、製剤、または核酸は、以下の1つまたは複数を行う：アミロイド形成を阻害する、アミロイド脱凝集を引き起こす、アミロイドリモデリングを引き起こす、アミロイドクリアランスを促進する、アミロイド凝集を阻害する、毒性オリゴマーの形成を遮断および／または防止する、および／または毒性オリゴマーのクリアランスを促進する。

【0090】

本発明のまたは「脱凝集する」もしくは「脱凝集を媒介する」と記載されるポリペプチド、核酸、または組成物は、既に形成された凝集体を低減させる。脱凝集は、フィルタートラップアッセイ（Wanker et al., *Methods Enzymol* (1999) 309:375-86）または当技術分野で公知の他の方法によって測定することができる。フィルタートラップアッセイを使用して、凝集体を検出し、本発明の組成物によって媒介される脱凝集をモニターすることができる。脱凝集は、脱凝集剤の漸増濃度の存在下で、染色の減少によって示されるフィルター上のアミロイドの保持の減少として検出される。

【0091】

「アミロイドによる損傷からニューロンを保護する」と記載される本発明のポリペプチド、核酸、または組成物は、新規アミロイドの蓄積を防止する、および／または毒性オリゴマーの形成を防止する。「アミロイドによる損傷からニューロンを保護する」と記載される本発明の産物または組成物を、予防的に摂取してもよい。産物または組成物がアミロイドによる損傷からニューロンを保護するか否かは、その全体が参照により本明細書に組

み込まれるWO2014/055515に記載されるニューロン細胞培養細胞傷害アッセイによって測定され得る。

【0092】

アミロイドを「リモデリングする」と記載される本発明のポリペプチド、核酸、または組成物は、原線維コンフォーマーのアモルファス凝集体への部分的または完全な変換を引き起こす。リモデリングは、尿素を使用する変性試験（例えば、A β の形態に関して）またはサルコシル溶解度アッセイ（例えば、タウの形態に関して）によって測定され得る。リモデリングの増加は、アミロイドがチオフラビンT（ThT）に結合しないまたは結合できず、その結果ThT蛍光が低減することによって検出され得る。リモデリングはまた、透過型電子顕微鏡法（TEM）を使用して検出してもよい。

10

【0093】

「アミロイド凝集を阻害する」と記載される本発明のポリペプチド、核酸、または組成物は、アミロイドの凝集を部分的または完全に防止する。アミロイド凝集の阻害は、ThT蛍光アッセイによって測定され得る（例えば、より低い蛍光は、より低いパーセンテージのアミロイド凝集を示す）。

【0094】

本明細書においてバクテリオファージ、タンパク質、ポリペプチド、またはアミノ酸配列に関連して使用される用語「バリエント」（例えば、GAIMバリエント）は、参照物質と比較して少なくとも1つのアミノ酸の差（置換、挿入、または欠失である少なくとも1つの変異）を含有する対応する物質を指す。ある特定の実施形態では、「バリエント」は、参照配列と比較して高いアミノ酸配列相同性、ならびに／または保存的アミノ酸置換、欠失、および／もしくは挿入を有する。一部の実施形態では、バリエントは、参照配列と比較して25個以下、20個以下、17個以下、15個以下、12個以下、10個以下、9個以下、8個以下、7個以下、6個以下、5個以下、4個以下、3個以下、2個以下、または1個以下のアミノ酸の差を有する。本明細書に記載されるバリエントは、参照配列と比較してアミロイド結合活性、アミロイド結合特異性、および／またはタンパク質の品質を保存し得るか、または増加させ得る。本明細書に記載されるバリエントは、脱グリコシル化され得る。本明細書に記載されるバリエントは、免疫原性を低減させ得るか、または消失させ得る。

20

【0095】

「保存的置換」は、第1のアミノ酸の、g3pタンパク質またはg3pのアミロイド結合性断片の化学的、物理的、および／または機能的特性を実質的に変化させない第2のアミノ酸による置換を指す（例えば、g3pタンパク質またはアミロイド結合性断片は、同じ電荷、構造、極性、疎水性／親水性を保持し、ならびに／またはアミロイドの認識、結合、および／もしくは低減能などの機能を保存する）。そのような保存的アミノ酸改変は、アミノ酸側鎖置換基の相対的類似性、例えばその疎水性、親水性、電荷、サイズなどに基づく。保存的置換として互換可能であり、および様々な前述の特徴を考慮に入れるアミノ酸の例示的なセットは、当業者に周知であり、アルギニンおよびリシン；グルタミン酸およびアスパラギン酸；セリンおよびトレオニン；グルタミンおよびアスパラギン；ならびにバリン、ロイシン、およびイソロイシンを含む。

30

【0096】

用語「免疫原性の」または「免疫原性」は、本明細書において、組成物に曝露されている哺乳動物において組成物が免疫応答を誘発する能力を指すために使用される。一部の態様では、本発明は、低減された免疫原性を有するか、または完全に脱免疫されたポリペプチドまたは組成物に関する。完全な脱免疫は、それらのエピトープ配列における1つまたは複数の変異によって、天然のGAIMアミノ酸配列に存在するT細胞認識エピトープの5つ全てを除去することを示す。そのような脱免疫変異は、エピトープにおける1つもしくは複数のアミノ酸残基の置換、挿入、もしくは欠失を構成し得るか、またはエピトープ配列の部分的もしくは完全な欠失を構成し得る。

40

G3pの全般的アミロイド相互作用モチーフ（GAIM）およびそのGAIM-Ig融合体

50

【0097】

全般的アミロイド相互作用モチーフ (GAIM) は、g3pのN1およびN2ドメインを含む2ドメインポリペプチドである。GAIM N2ドメインは、3つの別個の構造エレメント：構造がN1に類似する球状部分 (Holliger et al. (1999) J Mol Biol, 288:649-57)、アルファヘリックス、およびN1ドメインとH結合の広範なネットワークを形成する無秩序な領域からなる。N2ヒンジ領域はまた、いくつかのプロリン残基も含有し、そのうちの1つ (P213) は、GAIMをオープンなT_oLA結合コンピテント状態で維持することに関係している。GAIM単量体のN1およびN2ドメインは、芳香族アミノ酸の非対称分布を有する。GAIM N2ドメインは、11個のチロシン (Tyr) 残基および1個の露出したトリプトファン (Trp) 残基を含有し；N1ドメインは、3個のTrpおよび3個のTyr残基を含有する。このように、チロシンおよびトリプトファン残基の内因性の蛍光によってそれぞれ、N2およびN1ドメインにおけるコンフォメーションの変化の特異的モニタリングが可能となり (Martin and Schmid (2003) J Mol Biol, 405:989-1003)、GAIMのオープンコンフォメーションの検出が可能となる。

10

【0098】

H/D交換試験は、GAIMが、Aβ42線維の中心コアに結合することを示している。図2によって実証されるように、H/D交換試験はまた、GAIMが、原線維コアにおいて不連続な配列に会合し、芳香族残基 (例えば、Aβ42における残基17~25) および脂肪族残基 (例えば、Aβ42における残基31~40) に富む配列の両方に結合することも示している。これは、アミロイド集合の強力な阻害およびアモルファス凝集体への線維の効率的なリモデリングをもたらす (Krishnan et al. (2014) J Mol Biol, 426:2500-19)。

20

【0099】

一部の態様では、ポリペプチドまたはポリペプチドを含む組成物は、GAIMバリエーションを含む。一部の実施形態では、GAIMバリエーションは、参照配列と比較して25個以下のアミノ酸の差を有する。一部の実施形態では、GAIMバリエーションは、参照配列と比較して17個以下のアミノ酸の差を有する。一部の実施形態では、GAIMバリエーションは、参照配列と比較して10個以下のアミノ酸の差を有する。一部の実施形態では、バリエーションは、参照配列と比較して7個以下のアミノ酸の差を有する。一部の実施形態では、参照配列は、配列番号12 (PB120のGAIM部分) である。一部の実施形態では、参照配列は、配列番号14 (PB106のGAIM部分) である。一部の実施形態では、参照配列は、配列番号16 (「PB106+EDGS」のGAIM部分 (「EDGS」は配列番号54に開示される)) である。

30

【0100】

特に明記していなければ、全てのGAIMアミノ酸配列のナンバリングは、配列番号16のアミノ酸配列に基づき、全てのGAIM-Igアミノ酸配列ナンバリングは、短いリンカーARSによってC末端でヒトIgG1-Fcアミノ酸配列に融合された配列番号16を構成する、配列番号15のアミノ酸配列に基づく。

【0101】

本発明のポリペプチドは、本明細書に記載されるGAIMバリエーションのいずれかを含む。本明細書に開示されるGAIMバリエーションは、配列番号3 (DDKTL D；配列番号13に対してアミノ酸24~29) の、配列番号4 (EGDS) での置換を含む。この置換は、参照配列である配列番号16に存在し、オープンコンフォメーション (「オープン」または「アンロックド」) GAIMバリエーションを有する本発明のGAIMバリエーションをもたらす。

40

【0102】

本発明のGAIMバリエーションはまた、(i) 代替のT細胞エпитープ1-脱免疫変化、(ii) T細胞エпитープ2-脱免疫変化、および(iii) N2安定化変化から選択されるアミノ酸変化の少なくとも1つの追加のセットも含む。

50

【0103】

一部の実施形態では、アミノ酸変化の少なくとも1つの他のセットは、アミロイド親和性を増加させるが、なおもT細胞エピトープ1が脱免疫されている。参照の配列番号16では、脱免疫されたT細胞エピトープ1は、アミノ酸G47からH55に及ぶ。その配列中のH55が脱免疫を引き起こす；野生型g3p（この中で、T細胞エピトープ1は脱免疫されない）は、対応する位置でトレオニンを有する。配列番号16のアミノ酸55でトレオニンからヒスチジンへの変化を含むg3pポリペプチドバリエーションでは、アミロイド親和性は有意なままであるが、野生型と比較すると、この親和性はいくぶん低減されている。興味深いことに、天然のg3pに存在する配列YGTは、TolA結合モチーフであることが報告されている（S Pommier et al, J. Bacteriol. (2005), 187 (21), pp. 7526-34）。理論に拘束されたくないが、本発明者らは、GAIM-アミロイド結合がg3p-TolA結合と類似のアミノ酸相互作用を必要とし得ると考えている。このように、本発明者らは、H55T置換を作製すること（例えば、野生型T細胞エピトープ1配列に復帰させること）によって、および脱免疫に影響を及ぼす、新たに再生されたT細胞エピトープ中の代替の置換を調べることによって、配列番号16における53YGT55配列の再生を探索した。本発明者らは、T50置換が、アミロイド親和性に影響を及ぼすことなくT細胞エピトープ1の脱免疫を引き起こすことを見出した。したがって、一部の実施形態では、本発明のGAIMバリエーションは、H55T置換を伴うT50置換を含む。これらの実施形態の一部の態様では、T50置換は、T50R、T50K、T50G、またはT50Hである。これらの実施形態の少なくとも1つの態様では、T50置換はT50Hである。

10

20

【0104】

一部の実施形態では、アミノ酸変化の少なくとも1つの他のセットは、アミロイド親和性を有意に変化させることなくT細胞エピトープ2を脱免疫する。参照の配列番号16では、T細胞エピトープ2は、アミノ酸M134からN142に及び（その全体が参照により本明細書に組み込まれる米国特許第9,988,444B2号および米国特許出願公開番号2018/0207231A1号を参照されたい）、対応する野生型g3p配列と比較して不変である。本発明の前では、本発明者らは、アミロイド結合を有意に低減させることなく、および／または得られたGAIMの安定性を有意に減少させることなくこのエピトープを脱免疫することは不可能であった。本発明者らは今では、N142および／またはN137の、別のアミノ酸での置換が、アミロイドの結合または安定性に有意な影響を及ぼすことなくT細胞エピトープ2を脱免疫することを発見した。このように、一部の実施形態では、本発明のGAIMバリエーションは、N142の置換を含む。これらの実施形態の一部の態様では、N142置換はN142Aである。代替の実施形態では、本発明のGAIMバリエーションは、N137の置換を含む。これらの実施形態の一部の態様では、N137置換はN137Gである。他の代替の実施形態では、本発明のGAIMバリエーションは、N137の置換およびN142の置換を含む。これらの実施形態の一部の態様では、N137置換はN137Gであり、N142置換はN142Aである。

30

【0105】

一部の実施形態では、アミノ酸変化の少なくとも1つの他のセットは、N2の安定性を増加させる。これらの変化は、図3Cに表すように、アミノ酸135～138（FQNN；配列番号5；ターン1）、143～146（RQGA；配列番号6；ターン2）、および156～162（QGTD PVK；配列番号7；ターン3）に及ぶ、配列番号16に存在するいわゆる緩慢折り畳みループの1つまたは複数を標的とする。本発明者らは、これらの領域の1つもしくは複数におけるある特定のアミノ酸置換および／または欠失がGAIMにおけるN2の安定性を増加させることを発見した。このように、一部の実施形態では、アミノ酸変化の少なくとも1つの他のセットは：（i）N137G；（ii）R143V、Q144N、および必要に応じてA146V、A146T、またはA146K；ならびに（iii）V161G、T158、D159、およびP160の欠失、必要に応じてQ156VまたはQ156Y、および必要に応じてG157Nから選択される。上記で

40

50

提供したように、ターン1での緩慢折り畳みループを除去することによってN2を安定化するN137G置換もまた、T細胞エピトープ2を脱免疫する。これらの実施形態の一部の態様では、GAIMバリエントは、ターン1、ターン2、およびターン3のうちの1つのみにアミノ酸変化を含み、例えば：(i) N137G；(ii) R143V、Q144N、および必要に応じてA146V、A146T、またはA146K；ならびに(iii) V161G、T158、D159、およびP160の欠失、必要に応じてQ156VまたはQ156Y、および必要に応じてG157Nのうちの1つを含む。これらの実施形態の一部の態様では、GAIMバリエントは、ターンの少なくとも2つにアミノ酸変化を含み、例えば、(i) N137G；(ii) R143V、Q144N、および必要に応じてA146V、A146T、またはA146K；ならびに(iii) V161G、T158、D159、およびP160の欠失、必要に応じてQ156VまたはQ156Y、および必要に応じてG157Nのうちの2つを含む。これらの実施形態の一部の態様では、アミノ酸変化はN137Gであり、アミノ酸135～138の配列番号8をもたらす。これらの実施形態の一部の態様では、アミノ酸変化は、R143V、Q144N、およびA146Vであり、アミノ酸143～146の配列番号9をもたらす。これらの実施形態の一部の態様では、アミノ酸変化は、T158、D159、およびP160の欠失、ならびに置換V161Gであり、アミノ酸156～162の置換として配列番号10をもたらす。これらの実施形態の少なくとも1つの態様では、GAIMバリエントは、ターンの3つ全てにアミノ酸変化を含まない。

【0106】

一部の実施形態では、本発明のポリペプチドは、上記の代替のT細胞エピトープ1脱免疫変化のいずれかから選択されるアミノ酸変化の少なくとも1つのセット、および上記のT細胞エピトープ2脱免疫変化のいずれかから選択されるアミノ酸変化の少なくとも1つのセットを有するGAIMバリエントを含む。

【0107】

一部の実施形態では、GAIMバリエントは、上記の代替のT細胞エピトープ1脱免疫変化のいずれかから選択されるアミノ酸変化の少なくとも1つのセット、および上記のN2安定化変化のいずれかから選択されるアミノ酸変化の少なくとも1つのセットを有する。

【0108】

一部の実施形態では、GAIMバリエントは、上記のT細胞エピトープ2脱免疫変化のいずれかから選択されるアミノ酸変化の少なくとも1つのセット、および上記のN2安定化変化のいずれかから選択されるアミノ酸変化の少なくとも1つのセットを有する。

【0109】

一部の実施形態では、GAIMバリエントは、上記の代替のT細胞エピトープ1脱免疫変化のいずれかから選択されるアミノ酸変化の少なくとも1つのセット、上記のT細胞エピトープ2脱免疫変化のいずれかから選択されるアミノ酸変化の少なくとも1つのセット、および上記のN2安定化変化のいずれかから選択されるアミノ酸変化の少なくとも1つのセットを有する。

【0110】

上述のタイプの変化の各々に関するアミノ酸変化の特定のセットの選択は、その所定のタイプに関して本明細書に記載される変化のいずれかから作製することができる。アミノ酸変化のセットの非限定的な例は、表1に見出すことができる。

10

20

30

40

50

【表 1】
表 1.配列番号 16と比較したオープン安定化 GAIM-Ig 融合体の変異

GAIM-Ig 融合 タンパク質	配列 番号	T 細胞 エピトープ 1 変異*	T 細胞 エピトープ 2 変異	N2 安定化 変異	グリコシル化 シグナル変異***
PB108	29	なし	N137G**	N137G	なし
PB122	30	なし	なし	R143V Q144N A146V	なし
PB116	31	なし	N137G N142A	N137G	なし
PB114	32	なし	N142A	R143V Q144N A146V	なし
PB109	33	T50H H55T	N137G N142A	N137G	なし
PB110	34	T50H H55T	N142A	R143V Q144N A146V	なし
PB105	35	T50H H55T	N137G	N137G	なし
PB127	36	T50H H55T	N137G	N137G	N38A

*配列番号 16 の T 細胞エピトープ 1 を、野生型 g3p と比較して T55H 置換によって脱免疫する。
オープン安定化 GAIM-Ig 融合体における T 細胞エピトープ 1 の変異は、代替の脱免疫置換を表す。
**N137G 置換は T 細胞エピトープ 2 を脱免疫し、N2 ドメインを安定化する。
***配列番号 16 は、野生型 g3p と比較して T40G 変異によって脱グリコシル化されている。
オープン安定化 GAIM-Ig 融合体における潜在的グリコシル化シグナルの変異は、追加の脱グリコシル化置換を表す。

【0111】

本発明のポリペプチドは、脱グリコシル化 GAIM バリエントを含む。参照配列である配列番号 16 は、それが野生型 g3p と比較して T40G 変異を含むことから脱グリコシル化され、このように NAG に対する天然の NAT グリコシル化シグナルを変化させる。他の脱グリコシル化 g3p 変異体および／またはバリエントの例は、米国特許出願公開第 2018／0207231A1 号に見出すことができる。しかし、天然のグリコシル化シグナルにおいて異なるおよび／または追加の脱グリコシル化変異を有する GAIM バリエントもまた、本発明の一部である。例えば、X が任意のアミノ酸である 3 アミノ酸配列 NX (T／S) は、公知のグリコシル化シグナルである。そのような配列中のアスパラギン (N) をシステイン以外の任意のアミノ酸に置換すると、グリコシル化シグナルを破壊する。同様に、そのような配列中のトレオニン (T) またはセリン (S) をシステイン以外の任意のアミノ酸に置換しても、グリコシル化シグナルを破壊する。

【0112】

このように、一部の実施形態では、本明細書に記載される G A I M バリエーションは、配列番号 16 と比較して N 38 の、システイン以外の任意のアミノ酸での置換を含み、さらに代替の T 細胞エпитープ 1 脱免疫変化、T 細胞エпитープ 2 脱免疫変化、および／または N 2 安定化変化のうちの 1 つまたは複数を含む。これらの実施形態の一部の態様では、N 38 の置換は N 38 A である。これらの実施形態の一部の態様では、G A I M バリエーションは、G 40 の、システイン以外の任意のアミノ酸への置換をさらに含む。

【0113】

一部の代替の実施形態では、本明細書に記載される G A I M バリエーションは、配列番号 16 と比較して G 40 の、システイン、トレオニン、またはセリン以外の任意のアミノ酸での置換を含み、さらに T 細胞エпитープ 1 脱免疫変化、T 細胞エпитープ 2 脱免疫変化、および／または N 2 安定化変化のうちの 1 つまたは複数を含む。

10

【0114】

配列番号 16 は、N 末端アミノ酸 M 1 および A 2 を含む。動物細胞株における G A I M の組換えによる産生は、M 1、または M 1 および A 2 の両方を欠損する（「N 末端トランケーション」）ポリペプチドをもたらす得る。そのような N 末端トランケーションは、アミロイド結合活性に影響を及ぼさない。このように、一部の実施形態では、G A I M バリエーションは、必要に応じて配列番号 16 のアミノ酸 1（ $\Delta M 1$ ）、またはアミノ酸 1 および 2（ $\Delta M 1$ および $\Delta A 2$ ）の両方を欠如し、それに加えて T 細胞エпитープ 1 脱免疫変化、T 細胞エпитープ 2 脱免疫変化、および／または N 2 安定化変化のうちの 1 つまたは複数を含む。本明細書で使用される場合、アミノ酸 1 またはアミノ酸 1 もしくは 2 の両方を欠如する G A I M バリエーションは、N 末端トランケーション（すなわち、翻訳後の除去）または欠失変異を指し得る。

20

【0115】

一部の実施形態では、G A I M バリエーションは、置換 N 137 G を含む配列番号 16 のバリエーションである。これらの実施形態の一部の態様では、G A I M バリエーションは、アミノ酸 1 を欠如する（例えば、 $\Delta M 1$ ）。これらの実施形態の一部の態様では、G A I M バリエーションは、アミノ酸 1 および 2 を欠如する（例えば、 $\Delta M 1$ および $\Delta A 2$ ）。これらの実施形態の一部の態様では、G A I M バリエーションはさらに、N 38 の、システイン以外の任意のアミノ酸での置換、G 40 の、システイン、トレオニン、もしくはセリン以外の任意のアミノ酸での置換、または N 38 の、システイン以外の任意のアミノ酸での置換と G 40 の、システイン以外の任意のアミノ酸での置換との両方を含む。これらの実施形態の少なくとも 1 つの態様では、N 38 置換は N 38 A である。

30

【0116】

一部の実施形態では、G A I M バリエーションは、R 143 V、Q 144 N、および必要に応じて A 146 V、A 146 T、または A 146 K を含む配列番号 16 のバリエーションである。ある特定の実施形態では、G A I M バリエーションは、R 143 V、Q 144 N、および A 146 V を含む配列番号 16 のバリエーションである。これらの実施形態の一部の態様では、G A I M バリエーションはさらに、アミノ酸 1 を欠如する（例えば、 $\Delta M 1$ ）。これらの実施形態の一部の態様では、G A I M バリエーションはさらに、アミノ酸 1 および 2 を欠如する（例えば、 $\Delta M 1$ および $\Delta A 2$ ）。これらの実施形態の一部の態様では、G A I M バリエーションはさらに、N 38 の、システイン以外の任意のアミノ酸での置換、G 40 の、システイン、トレオニン、もしくはセリン以外の任意のアミノ酸での置換、または N 38 の、システイン以外の任意のアミノ酸での置換と G 40 の、システイン以外の任意のアミノ酸での置換との両方を含む。これらの実施形態の少なくとも 1 つの態様では、N 38 置換は N 38 A である。

40

【0117】

一部の実施形態では、G A I M バリエーションは、T 50 の、他の任意のアミノ酸での置換、置換 H 55 T、および置換 N 137 G を含む配列番号 16 のバリエーションである。これらの実施形態の少なくとも 1 つの態様では、T 50 の置換は、T 50 H、T 50 G、T 50 K、および T 50 R から選択される。これらの実施形態の少なくとも 1 つの態様では、T

50

50の置換はT50Hである。これらの実施形態の一部の態様では、GAIMバリエントはさらに、(i) N142A置換を含む；(ii) N38および／またはG40の脱グリコシル化変異を含む；(iii) アミノ酸1またはアミノ酸1および2の両方を欠如する；または(iv) その任意の組合せである。例えば、これらの実施形態の一部の態様では、GAIMバリエントは、アミノ酸1を欠如する（例えば、ΔM1）。これらの実施形態の一部の態様では、GAIMバリエントは、アミノ酸1および2を欠如する（例えば、ΔM1およびΔA2）。これらの実施形態の一部の態様では、GAIMバリエントはさらに、N38の、システイン以外の任意のアミノ酸での置換、G40の、システイン、トレオニン、もしくはセリン以外の任意のアミノ酸での置換、またはN38の、システイン以外の任意のアミノ酸での置換とG40の、システイン以外の任意のアミノ酸での置換との両方を含む。これらの実施形態の少なくとも1つの態様では、N38置換はN38Aである。

10

【0118】

ある特定の実施形態では、GAIMバリエントは、置換N137GおよびN142Aを含む配列番号16のバリエントである。これらの実施形態の一部の態様では、GAIMバリエントはさらに、(i) T50の、他の任意のアミノ酸での置換ならびに置換H55Tを含む；(ii) N38および／またはG40の脱グリコシル化変異を含む；(iii) アミノ酸1またはアミノ酸1および2の両方を欠如する；または(iv) その任意の組合せである。これらの実施形態のある特定の態様では、T50の置換は、T50H、T50G、T50K、およびT50Rから選択される。これらの実施形態の少なくとも1つの態様では、T50の置換はT50Hである。これらの実施形態の一部の態様では、GAIMバリエントは、アミノ酸1を欠如する（例えば、ΔM1）。これらの実施形態の一部の態様では、GAIMバリエントは、アミノ酸1および2を欠如する（例えば、ΔM1およびΔA2）。これらの実施形態の一部の態様では、GAIMバリエントはさらに、N38の、システイン以外の任意のアミノ酸での置換、G40の、システイン、トレオニン、もしくはセリン以外の任意のアミノ酸での置換、またはN38の、システイン以外の任意のアミノ酸での置換とG40の、システイン以外の任意のアミノ酸での置換との両方を含む。これらの実施形態の少なくとも1つの態様では、N38置換はN38Aである。

20

【0119】

ある特定の実施形態では、GAIMバリエントは、以下の置換：N142A、R143V、Q144N、および必要に応じてA146V、A146T、またはA146Kを含む配列番号16のバリエントである。ある特定の実施形態では、GAIMバリエントは、以下の置換：N142A、R143V、Q144N、およびA146Vを含む配列番号16のバリエントである。これらの実施形態の一部の態様では、GAIMバリエントはさらに、(i) T50の、他の任意のアミノ酸での置換、ならびに置換H55Tを含む；(ii) N38および／またはG40の脱グリコシル化変異を含む；(iii) アミノ酸1もしくはアミノ酸1および2の両方を欠如する；または(iv) その任意の組合せである。これらの実施形態の一部の態様では、T50の置換は、T50H、T50G、T50K、およびT50Rから選択される。これらの実施形態の少なくとも1つの態様では、T50の置換はT50Hである。これらの実施形態の一部の態様では、GAIMバリエントは、アミノ酸1を欠如する（ΔM1）。これらの実施形態の一部の態様では、GAIMバリエントは、アミノ酸1および2を欠如する（ΔM1およびΔA2）。これらの実施形態の一部の態様では、GAIMバリエントはさらに、N38の、システイン以外の任意のアミノ酸での置換、G40の、システイン、トレオニン、もしくはセリン以外の任意のアミノ酸での置換、またはN38の、システイン以外の任意のアミノ酸での置換とG40の、システイン以外の任意のアミノ酸での置換との両方を含む。これらの実施形態の少なくとも1つの態様では、N38置換はN38Aである。

30

40

【0120】

ある特定の実施形態では、GAIMバリエントは、以下の置換：ΔT158、ΔD159、ΔP160、V161G、および必要に応じて(i) Q156VもしくはQ156Y、および／または(ii) G157Nを含む配列番号16のバリエントである。これらの

50

実施形態のある特定の態様では、G A I Mバリエントは、以下の置換：Δ T 1 5 8、Δ D 1 5 9、Δ P 1 6 0、および V 1 6 1 Gを含む配列番号 1 6 のバリエントである。これらの実施形態の一部の態様では、G A I Mバリエントはさらに、(i) T 5 0 の、他の任意のアミノ酸での置換、ならびに置換 H 5 5 T を含む；(i i) N 3 8 および／または G 4 0 の脱グリコシル化変異を含む；(i i i) アミノ酸 1 またはアミノ酸 1 および 2 の両方を欠如する；または(i v) その任意の組合せである。これらの実施形態の一部の態様では、T 5 0 の置換は、T 5 0 H、T 5 0 G、T 5 0 K、および T 5 0 R から選択される。これらの実施形態の少なくとも 1 つの態様では、T 5 0 の置換は T 5 0 H である。これらの実施形態の一部の態様では、G A I Mバリエントは、アミノ酸 1 を欠如する(Δ M 1)。これらの実施形態の一部の態様では、G A I Mバリエントは、アミノ酸 1 および 2 を欠如する(Δ M 1 および Δ A 2)。これらの実施形態の一部の態様では、G A I Mバリエントはさらに、N 3 8 の、システイン以外の任意のアミノ酸での置換、G 4 0 の、システイン、トレオニン、もしくはセリン以外の任意のアミノ酸での置換、または N 3 8 の、システイン以外の任意のアミノ酸での置換と G 4 0 の、システイン以外の任意のアミノ酸での置換との両方を含む。これらの実施形態の少なくとも 1 つの態様では、N 3 8 置換は N 3 8 A である。

【 0 1 2 1 】

少なくとも 1 つの実施形態では、本発明のポリペプチドは、配列番号 1 9 のアミノ酸配列を有する G A I Mバリエントを含む。少なくとも 1 つの実施形態では、本発明のポリペプチドは、配列番号 2 0 のアミノ酸配列を有する G A I Mバリエントを含む。少なくとも 1 つの実施形態では、本発明のポリペプチドは、配列番号 2 1 のアミノ酸配列を有する G A I Mバリエントを含む。少なくとも 1 つの実施形態では、本発明のポリペプチドは、配列番号 2 2 のアミノ酸配列を有する G A I Mバリエントを含む。少なくとも 1 つの実施形態では、本発明のポリペプチドは、配列番号 2 3 のアミノ酸配列を有する G A I Mバリエントを含む。少なくとも 1 つの実施形態では、本発明のポリペプチドは、配列番号 2 4 のアミノ酸配列を有する G A I Mバリエントを含む。少なくとも 1 つの実施形態では、本発明のポリペプチドは、配列番号 2 5 のアミノ酸配列を有する G A I Mバリエントを含む。少なくとも 1 つの実施形態では、本発明のポリペプチドは、配列番号 2 6 のアミノ酸配列を有する G A I Mバリエントを含む。

【 0 1 2 2 】

上記の G A I Mバリエントのいずれかを、直接または短いリンカーによって C 末端で免疫グロブリン定常領域に融合し、G A I M-I g 融合タンパク質をもたらすことができる。本明細書に記載される G A I M-I g 融合タンパク質の免疫グロブリン定常領域は、I g G (I g G 1、I g G 2、I g G 3、および I g G 4 を含む)、I g A、I g D、I g E、または I g M の免疫グロブリン定常領域であり得る。一部の態様では、免疫グロブリン定常領域は I g G である。ある特定の態様では、I g G は I g G 1 である。他の態様では、I g G は I g G 2 である。一部の実施形態では、免疫グロブリン定常領域は、ヒト免疫グロブリン定常領域である。一部の実施形態では、免疫グロブリン定常領域は、ヒト I g G の F c 部分、またはその断片である。本発明の融合タンパク質にとって適したヒト I g G の F c 部分は、野生型または改変 F c 部分を含む。例えばヒト I g G の適した改変 F c 部分は、融合タンパク質を安定化させ、および／または野生型 F c と比較してその半減期を増加させ得る。改変 F c の非限定的な例は、米国特許第 7, 0 8 3, 7 8 4 号、米国特許第 7, 2 1 7, 7 9 7 号、米国特許第 7, 2 1 7, 7 9 8 号、米国特許出願第 1 4 / 2 1 4, 1 4 6 号、および WO-1 9 9 7 0 3 4 6 3 1 号に開示される改変 F c を含む。少なくとも 1 つの実施形態では、免疫グロブリン定常領域は、ヒト I g G 1 の F c 部分である。少なくとも 1 つの実施形態では、免疫グロブリン定常領域はヒト I g G 2 の F c 部分である。一部の実施形態では、G A I M-I g 融合タンパク質の免疫グロブリン定常領域は、C 末端リシン (例えば、K 4 8 5) を含む。他の実施形態では、G A I M-I g 融合体は、C 末端リシンを欠如する (例えば、Δ K 4 8 5)。

【 0 1 2 3 】

一部の実施形態では、G A I M－I g 融合タンパク質は、本明細書で開示される任意の G A I M バリエーションを含むポリペプチドおよびヒト I g G（例えば、ヒト I g G 1）の F c 部分から本質的になる。少なくとも 1 つの実施形態では、G A I M－I g 融合タンパク質は、配列番号 19 に記載される配列と少なくとも 95%、96%、97%、98%、または 99% 同一である配列、およびヒト I g G（例えば、ヒト I g G 1）の F c 部分から本質的になる。本実施形態の一部の態様では、G A I M－I g 融合タンパク質の G A I M 部分のアミノ酸配列は、配列番号 19 に記載される配列と 10～15、1～10、または 1～5 個の保守的置換によって異なる。本実施形態の他の態様では、G A I M－I g 融合タンパク質は、配列番号 19 およびヒト I g G（例えば、ヒト I g G 1）の F c 部分から本質的になる。例えば、一部の態様では、G A I M－I g 融合タンパク質は、配列番号 29（P B 108）のアミノ酸配列から本質的になる。本実施形態の他の態様では、G A I M－I g 融合タンパク質は、配列番号 29 のバリエーションが、アミノ酸 1（Δ M 1）、アミノ酸 1 および 2（Δ M 1 および Δ A 2）、アミノ酸 485（Δ K 485）、アミノ酸 1 および 485（Δ M 1 および Δ K 485）、またはアミノ酸 1、2、および 485（Δ M 1、Δ A 2、および Δ K 485）を欠如する該バリエーションから本質的になる。

【0124】

少なくとも 1 つの実施形態では、G A I M－I g 融合タンパク質は、配列番号 20 に記載される配列と少なくとも 95%、96%、97%、98%、または 99% 同一である配列、およびヒト I g G（例えば、ヒト I g G 1）の F c 部分から本質的になる。本実施形態の一部の態様では、G A I M－I g 融合タンパク質の G A I M 部分のアミノ酸配列は、配列番号 20 に記載される配列と 10～15、1～10、または 1～5 個の保守的置換によって異なる。本実施形態の他の態様では、G A I M－I g 融合タンパク質は、配列番号 20 およびヒト I g G（例えば、ヒト I g G 1）の F c 部分から本質的になる。例えば、一部の態様では、G A I M－I g 融合タンパク質は、配列番号 30（P B 122）のアミノ酸配列から本質的になる。本実施形態の他の態様では、G A I M－I g 融合タンパク質は、配列番号 30 のバリエーションが、アミノ酸 1（Δ M 1）、アミノ酸 1 および 2（Δ M 1 および Δ A 2）、アミノ酸 485（Δ K 485）、アミノ酸 1 および 485（Δ M 1 および Δ K 485）、またはアミノ酸 1、2、および 485（Δ M 1、Δ A 2、および Δ K 485）を欠如する該バリエーションから本質的になる。

【0125】

少なくとも 1 つの実施形態では、G A I M－I g 融合タンパク質は、配列番号 21 に記載される配列と少なくとも 95%、96%、97%、98%、または 99% 同一である配列、およびヒト I g G（例えば、ヒト I g G 1）の F c 部分から本質的になる。本実施形態の一部の態様では、G A I M－I g 融合タンパク質の G A I M 部分のアミノ酸配列は、配列番号 21 に記載される配列と 10～15、1～10、または 1～5 個の保守的置換によって異なる。本実施形態の他の態様では、G A I M－I g 融合タンパク質は、配列番号 21 およびヒト I g G（例えば、ヒト I g G 1）の F c 部分から本質的になる。例えば、一部の態様では、G A I M－I g 融合タンパク質は、配列番号 31（P B 116）のアミノ酸配列から本質的になる。本実施形態の他の態様では、G A I M－I g 融合タンパク質は、配列番号 31 のバリエーションが、アミノ酸 1（Δ M 1）、アミノ酸 1 および 2（Δ M 1 および Δ A 2）、アミノ酸 485（Δ K 485）、アミノ酸 1 および 485（Δ M 1 および Δ K 485）、またはアミノ酸 1、2、および 485（Δ M 1、Δ A 2、および Δ K 485）を欠如する該バリエーションから本質的になる。

【0126】

少なくとも 1 つの実施形態では、G A I M－I g 融合タンパク質は、配列番号 22 に記載される配列と少なくとも 95%、96%、97%、98%、または 99% 同一である配列、およびヒト I g G（例えば、ヒト I g G 1）の F c 部分から本質的になる。本実施形態の一部の態様では、G A I M－I g 融合タンパク質の G A I M 部分のアミノ酸配列は、配列番号 22 に記載される配列と 10～15、1～10、または 1～5 個の保守的置換によって異なる。本実施形態の他の態様では、G A I M－I g 融合タンパク質は、配列番号

22 およびヒトIgG（例えば、ヒトIgG1）のFc部分から本質的になる。例えば、一部の態様では、GAIM-Ig融合タンパク質は、配列番号32（PB114）のアミノ酸配列から本質的になる。本実施形態の他の態様では、GAIM-Ig融合タンパク質は、配列番号32のバリエーションが、アミノ酸1（ΔM1）、アミノ酸1および2（ΔM1およびΔA2）、アミノ酸485（ΔK485）、アミノ酸1および485（ΔM1およびΔK485）、またはアミノ酸1、2、および485（ΔM1、ΔA2、およびΔK485）を欠如する該バリエーションから本質的になる。

【0127】

少なくとも1つの実施形態では、GAIM-Ig融合タンパク質は、配列番号23に記載される配列と少なくとも95%、96%、97%、98%、または99%同一である配列およびヒトIgG（例えば、ヒトIgG1）のFc部分から本質的になる。本実施形態の一部の態様では、GAIM-Ig融合タンパク質のGAIM部分のアミノ酸配列は、配列番号23に記載される配列と10~15、1~10、または1~5個の保守的置換によって異なる。本実施形態の他の態様では、GAIM-Ig融合タンパク質は、配列番号23およびヒトIgG（例えば、ヒトIgG1）のFc部分から本質的になる。例えば、一部の態様では、GAIM-Ig融合タンパク質は、配列番号33（PB109）のアミノ酸配列から本質的になる。本実施形態の他の態様では、GAIM-Ig融合タンパク質は、配列番号33のバリエーションが、アミノ酸1（ΔM1）、アミノ酸1および2（ΔM1およびΔA2）、アミノ酸485（ΔK485）、アミノ酸1および485（ΔM1およびΔK485）、またはアミノ酸1、2、および485（ΔM1、ΔA2、およびΔK485）を欠如する該バリエーションから本質的になる。

【0128】

少なくとも1つの実施形態では、GAIM-Ig融合タンパク質は、配列番号24に記載される配列と少なくとも95%、96%、97%、98%、または99%同一である配列、およびヒトIgG（例えば、ヒトIgG1）のFc部分から本質的になる。本実施形態の一部の態様では、GAIM-Ig融合タンパク質のGAIM部分のアミノ酸配列は、配列番号24に記載される配列と10~15、1~10、または1~5個の保守的置換によって異なる。本実施形態の他の態様では、GAIM-Ig融合タンパク質は、配列番号24およびヒトIgG（例えば、ヒトIgG1）のFc部分から本質的になる。例えば、一部の態様では、GAIM-Ig融合タンパク質は、配列番号34（PB110）のアミノ酸配列から本質的になる。一部の態様では、GAIM-Ig融合タンパク質は、配列番号34のバリエーションが、アミノ酸1（ΔM1）、アミノ酸1および2（ΔM1およびΔA2）、アミノ酸485（ΔK485）、アミノ酸1および485（ΔM1およびΔK485）、またはアミノ酸1、2、および485（ΔM1、ΔA2、およびΔK485）を欠如する該バリエーションから本質的になる。

【0129】

少なくとも1つの実施形態では、GAIM-Ig融合タンパク質は、配列番号25に記載される配列と少なくとも95%、96%、97%、98%、または99%同一である配列、およびヒトIgG（例えば、ヒトIgG1）のFc部分から本質的になる。本実施形態の一部の態様では、GAIM-Ig融合タンパク質のGAIM部分のアミノ酸配列は、配列番号25に記載される配列と10~15、1~10、または1~5個の保守的置換によって異なる。本実施形態の他の態様では、GAIM-Ig融合タンパク質は、配列番号25およびヒトIgG（例えば、ヒトIgG1）のFc部分から本質的になる。例えば、一部の態様では、GAIM-Ig融合タンパク質は、配列番号35（PB105）のアミノ酸配列から本質的になる。本実施形態の他の態様では、GAIM-Ig融合タンパク質は、配列番号35のバリエーションが、アミノ酸1（ΔM1）、アミノ酸1および2（ΔM1およびΔA2）、アミノ酸485（ΔK485）、アミノ酸1および485（ΔM1およびΔK485）、またはアミノ酸1、2、および485（ΔM1、ΔA2、およびΔK485）を欠如する該バリエーションから本質的になる。

【0130】

少なくとも1つの実施形態では、G A I M-I g 融合タンパク質は、配列番号26に記載される配列と少なくとも95%、96%、97%、98%、または99%同一である配列、およびヒトI g G（例えば、ヒトI g G1）のFc部分から本質的になる。本実施形態の一部の態様では、G A I M-I g 融合タンパク質のG A I M部分のアミノ酸配列は、配列番号26に記載される配列と10~15、1~10、または1~5個の保存的置換によって異なる。本実施形態の他の態様では、G A I M-I g 融合タンパク質は、配列番号26およびヒトI g G（例えば、ヒトI g G1）のFc部分から本質的になる。例えば、一部の態様では、G A I M-I g 融合タンパク質は、配列番号36（P B 1 2 7）のアミノ酸配列から本質的になる。本実施形態の他の態様では、G A I M-I g 融合タンパク質は、配列番号36のバリエーションが、アミノ酸1（Δ M 1）、アミノ酸1および2（Δ M 1 および Δ A 2）、アミノ酸485（Δ K 485）、アミノ酸1および485（Δ M 1 および Δ K 485）、またはアミノ酸1、2、および485（Δ M 1、Δ A 2、および Δ K 485）を欠如する該バリエーションから本質的になる。

【0131】

本発明の一部の態様では、本明細書に記載されるG A I M-I g 融合体のG A I M部分およびI g 部分は、低分子リンカーによって接続される。一部の実施形態では、低分子リンカーは、グリシン、セリン、および／またはトレオニンに富み、少なくとも80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%のグリシン、セリン、および／またはトレオニンを含む。一部の実施形態では、低分子リンカーは、少なくともまたは約50%、55%、60%、70%、もしくは75%のグリシン、セリン、および／またはトレオニンを含む。一部の実施形態では、低分子リンカーは、実質的にまたは完全にグリシン、セリン、および／またはトレオニンで構成される。G A I M-I g 融合体の低分子リンカーは、最大25アミノ酸長、例えば1~5アミノ酸長、1~20アミノ酸長、5~10アミノ酸長、5~25アミノ酸長、または10~25アミノ酸長であり得る。低分子リンカーは、例えば1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、または25アミノ酸を有し得る。一部の実施形態では、低分子リンカーは、ヒトT細胞エпитープを含有せず、G A I Mバリエーションまたはそれが結合するFcドメインのいずれかを有するヒトT細胞エпитープを作製しない。例示的な低分子リンカーは、様々な数の配列G G G G S（4 G S；配列番号27）またはG G G S（3 G S；配列番号28）のリピート、例えばそのような配列の2、3、4から5個のリピートを有するリンカーを含む。例示的な低分子リンカーは、1つまたは複数のリシン残基を含み得る。他の例示的な低分子リンカーは、アミノ酸配列A R Sを含む。

【0132】

本明細書で開示されるG A I M-I g 融合体は、先行技術に対していくつかの利点を実証する。アルツハイマー病（A D）の脳におけるA βの病的形態を同定することをねらいとする研究は、不溶性プラークおよび可溶性A βの両方が、NおよびC末端トランケート型A βペプチドの不均一な集団からなり（Wildburger et al., (2017) Sci Rep 7: 9520）、構造的に多様なコンフォメーションを形成する（Condello et al. (2018) PNAS, 115:E782-91; Rasmussen et al. (2017) PNAS, 114:13018-23; Liu et al. (2016) Sci Rep, 6:33079）ことを示している。同様に、N末端トランケート型A β断片の大部分が、アミロイド斑の主要な部分を構成することも観察されている（Wildburger et al., (2017) Sci Rep 7:9520）。しかし、アミロイド凝集またはミスフォールディングに対する抗体関連治療の大部分は、少なくとも部分的にそれらがN末端トランケート型または改変型のアミロイドに有効に会合できないために臨床では成功していない。本発明のG A I M-I g 融合体は、これらの融合体が、様々なA β凝集体、異なる形態および凝集特性を有する凝集体であっても会合することが可能であることから、多様なアミロイドタンパク質を標的とすることができる組成物のこれまでのアンメットニーズに取り組む。

【0133】

本明細書に開示される G A I M-I g 融合体は、他の凝集体の中でも、その両方がアルツハイマー病に臨床に関連している、トランケート型 11-42 A β 凝集体および／または翻訳後改変ピログルタメート A β 凝集体に結合する。表 2 および 3 にさらに示すように、本発明の G A I M-I g 融合体は、A β 凝集体、N 末端トランケート型 A β 凝集体、タウ、トランスサイレチン (TTR) の複数のコンフォーマー、および多様な形態の免疫グロブリン軽鎖 (LC) 凝集体を含むがこれらに限定されない複数のタイプのアミロイドタンパク質を標的とする。これらの標的は、本明細書に記載される疾患のリスクがあるかまたは疾患に罹っている患者において見出されるアミロイドタンパク質を含む。

【0134】

先行技術の抗体関連治療もまた、それらがリン酸化タウの凝集を遮断できないことおよび／またはタウが脳の 1 つの領域から他の領域へと広がるのを遮断できないことから、臨床において不成功であり得る。本発明のオープン安定化 G A I M-I g 融合体は、この必要性に取り組む。本発明の G A I M-I g 融合体は、タウのリモデリングを引き起こし、このようにタウ凝集体が可溶性タウを播種するのを防止し、タウ凝集体の伝播を遮断する。

【0135】

併せて考慮すると、本明細書に開示される G A I M-I g 融合体は、病的なアミロイド凝集体を防止または除去する独自のアプローチを表す。先行技術の代替物と比較すると、本明細書に記載されるオープン安定化 G A I M 融合体は、より大きい効力、構造の安定性、ならびに A β およびタウ線維を含むアミロイドに対する特異性を示し、同様に、部分的または完全に脱免疫されている。

ポリペプチドの調製

【0136】

本発明のポリペプチド（例えば、融合タンパク質を含む 1 つまたは複数の G A I M バリエーションを含むポリペプチド）は、当技術分野で周知の技術を使用して合成することができる。例えば、本発明のポリペプチドは、細胞において組換えによって合成することができる（例えば、Sambrook et al. 1989, Molecular Cloning A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y., および Ausubel et al. 1989, Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y. を参照されたい）。あるいは、本発明のポリペプチドは、固相合成などの公知の合成方法を使用して合成することができる。合成技術は、当技術分野で周知である（例えば、Merrifield, 1973, Chemical Polypeptide, (Katsouyannis and Panayotis eds.) pp. 335-61; Merrifield 1963, J. Am. Chem. Soc. 85:2149; Davis et al. 1985, Biochem. Intl. 10:394; Finn et al. 1976, The Proteins (3d ed.) 2:105; Erikson et al. 1976, The Proteins (3d ed.) 2:257; 米国特許第 3, 941, 763 号を参照されたい。あるいは、最終構築物は、組換えによって産生された融合タンパク質と本質的に同じ機能を共有し得るが、単純にライゲーションケミストリーなどの非組換え技術を使用して産生してもよい。融合タンパク質の成分は、g3p 発現および g3p 変異に関して記載した同じ一般的方法論を使用して調製され得る。

【0137】

一部の実施形態では、ポリペプチドを、融合したポリペプチドの精製を容易にするペプチドなどのマーカー配列に融合させてもよい（単独で、または別のタンパク質との融合もしくは担体分子の組込みに加えて）。マーカーアミノ酸配列は、中でもヘキサヒスチジンペプチド（配列番号 53）、例えば pQE ベクターにおいて提供されるタグ（Qiagen、Mississauga、Ontario、Canada）であり得、その多くが市販されている。Gentz et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (1989) 86:821-824 に記載されているように、例えばヘキサヒスチジン（配列番号 53）は、融合タンパク質の簡便な精製を提供する。精製にとって有用な別のペプチドタグであるヘマグルチニン（HA）タグは、インフルエンザ HA タンパク質に由来するエピトープに対応する（Wilson et al., (1984) Cell 37:767）。

医薬組成物

【0138】

一部の実施形態では、本発明は、本明細書に記載されるG A I Mバリエーションを含む任意のポリペプチドを、必要に応じて薬学的に許容される担体、希釈剤、または賦形剤と一緒に含む医薬組成物を提供する。「医薬組成物」は、生理的に適した担体および／または賦形剤を有する本明細書に記載される組成物の治療有効量を指す。医薬組成物は、生物に対して有意な刺激を引き起こさない。語句「生理的に適した担体」および「薬学的に許容される担体」は、生物に対して有意な刺激を引き起こさず、投与した組成物の生物活性および特性を抑止しない担体または希釈剤を指すために互換的に使用され得る。用語「賦形剤」は、活性成分の投与をさらに容易にするために医薬組成物に添加される不活性物質を指す。例には、食塩水、炭酸カルシウム、リン酸カルシウム、様々な糖および様々なタイプのデンプン、セルロース誘導体、ゼラチン、植物油、ポリエチレングリコール、および例えばポリソルベート20を含む界面活性剤が挙げられるがこれらに限定されない。

10

【0139】

本発明に従って使用するための医薬組成物は、活性成分を薬学的に使用することができる組成物に加工するのを容易にする賦形剤および補助剤を含む1つまたは複数の生理的に許容される担体を使用して、慣習的な様式で製剤化され得る。適切な製剤は、選択される投与経路および送達される組成物の性質（例えば、ポリペプチドのサイズおよび溶解度）に依存する。これらの実施形態の一態様では、医薬組成物は、患者の血流に注射または注入するために製剤化される。これらの実施形態の別の態様では、医薬組成物は、例えば直接髄内、髄腔内、または脳室内注射によって患者の脳または中枢神経系に直接投与するために製剤化される。

20

【0140】

本明細書に記載される組成物は、非経口投与、例えばボーラス注射または持続的注入のために製剤化され得る。非経口投与のための医薬組成物は、水溶性型の組成物の水性液剤を含む。加えて、活性成分の懸濁剤は、油性または水基剤の注射用懸濁剤として調製され得る。適した親油性溶媒または媒体は、脂肪油、例えばゴマ油、または合成脂肪酸エステル、例えばオレイン酸エチル、トリグリセリド、もしくはリポソームを含む。水性注射用懸濁剤は、懸濁液の粘度を増加させる物質、例えばカルボキシメチルセルロースナトリウム、ソルビトール、またはデキストランを含有し得る。必要に応じて、懸濁剤はまた、適した安定剤、または活性成分の溶解度を増加させて高濃度溶液の調製を可能にする作用剤（agent）（例えば、ポリソルベート（Tween（登録商標）20）などの界面活性剤）も含有し得る。送達表面（すなわち、IVバッグ、カテーテル、針など）への本発明のポリペプチドの吸着を防止するために、タンパク質基剤の作用剤、例えばアルブミンを使用してもよい。

30

【0141】

経口投与の場合、医薬組成物は、本明細書に記載されるポリペプチドを当技術分野で周知の薬学的に許容される担体と組み合わせることによって製剤化することができる。

【0142】

製剤は、必要に応じて追加の保存剤と共に、単位剤形、例えばバイアル、アンプル、または多用量容器で提供され得る。組成物は、懸濁剤、液剤、または油性または水性ビヒクル中の乳剤であってもよく、懸濁化剤、安定剤、および／または分散剤などの製剤化剤を含有してもよい。単回剤形は、液体または固体剤形であり得る。単回剤形を、改変することなく患者に直接投与してもよく、または投与前に希釈もしくは再構成してもよい。ある特定の実施形態では、単回剤形は、ボーラス形態、例えば単回注射、複数の錠剤、カプセル剤、丸剤などを含む経口用量を含む単回経口用量として投与され得る。代替の実施形態では、単回剤形は、一定期間にわたって、例えば注入によってまたは埋め込みポンプ、例えばICVポンプを介して投与され得る。後者の実施形態では、単回剤形は、G A I Mバリエーションを含むポリペプチドの適切な量を予め充填した注入バッグまたはポンプリザーバーであり得る。あるいは、注入バッグまたはポンプリザーバーは、G A I Mバリエーションを

40

50

含むポリペプチドの適切な用量を注入バッグまたはポンプリザーバー溶液と混合することによって、患者に投与する直前に調製され得る。

【0143】

本発明の別の態様は、本発明の医薬組成物を調製する方法を含む。薬物の製剤化のための技術は、例えば、その全体が参照により本明細書に組み込まれる、"Remington's Pharmaceutical Sciences," Mack Publishing Co., Easton, Pa., latest editionに見出され得る。

【0144】

本発明の文脈における使用にとって適した医薬組成物は、活性成分が、意図される目的を達成するために有効な量で含有される組成物を含む。

【0145】

治療的または診断的に有効な量の決定は、特に本明細書に提供する詳細な開示に照らし、十分に当業者の能力範囲内である。

【0146】

投薬量および間隔は、特定の脳の疾患、障害、または状態を処置または診断するために十分であるファージディスプレイ媒体の脳内レベル（最小有効濃度、MEC）を提供するために個々に調整され得る。MECは、各調製物に関して異なるが、*in vitro*データから推定することができる。MECを達成するために必要な投薬量は、個々の特徴に依存する。

【0147】

投薬間隔もまた、MEC値を使用して決定することができる。調製物は、その時間の10～90%にわたって、好ましくはその時間の30～90%の間で、最も好ましくはその時間の50～90%でMECを超える脳内レベルを維持するレジメンを使用して投与すべきである。

【0148】

処置される疾患の重症度および応答性に応じて、投与は、単回または複数回投与であり得、処置過程は、数日から数週間、または治癒が起こるまで、または疾患状態の減少が達成されるまで持続し得る。

【0149】

投与される組成物の量は、当然、処置または診断される対象、罹患の重症度、主治医の判断などに依存する。

【0150】

本発明の組成物は、所望される場合、活性成分を含有する1つまたは複数の単位剤形を含有し得るパックまたはディスペンサーデバイス、例えばFDAが承認したキットとして提示され得る。パックは、例えば金属またはプラスチックホイル、例えばブリストアックを含み得る。パックまたはディスペンサーデバイスに、投与のための指示を添付することができる。パックまたはディスペンサーにはまた、医薬品の製造、使用、または販売を規制する政府当局によって指示された形態で容器に関連する表示（notice）を収容することができ、表示は、組成物の形態、またはヒトもしくは動物用の投与に関する当局による承認を反映している。そのような表示は例えば、処方薬に関して米国食品医薬品局によって承認されたラベル表示または承認された製品の添付文書の表示であり得る。適合する医薬担体中で製剤化された本発明の調製物を含む組成物もまた、本明細書にさらに詳述するように調製され、適切な容器に入れられ、適応疾患の処置のためにラベルを貼付され得る。

治療的使用

【0151】

本発明の別の態様は、トランスサイレチン、免疫グロブリン軽鎖（カッパまたはラムダ）、 $fA\beta 42$ 、 $f\alpha syn$ 、 fNM 、または $f\tau au$ のいずれかを伴うそれらの疾患を含むがこれらに限定されない、誤って折り畳まれたおよび／または凝集したアミロイドタンパク質に関連する1つまたは複数の疾患の処置における本発明のポリペプチド、核酸分子、または組成物のいずれかの使用に関する。

【0152】

処置の文脈において、用語「患者」、「対象」、および「レシピエント」は、互換的に使用され、ヒトならびに他の哺乳動物を含む。一部の実施形態では、患者は、タンパク質ミスフォールディング疾患に関連するバイオマーカーに対して陽性であるヒトである。一実施形態では、患者は、フロルベタピルによるPETイメージングによって検出した場合に、 β -アミロイド沈着物を示す。

【0153】

用語「処置する」およびその同根語は、疾患の1つまたは複数の臨床症状を示す患者における疾患の進行を低減する、遅らせる、または逆転させることを指す。「処置する」はまた、疾患の1つまたは複数の(one more)臨床症状を示す患者における疾患の症状を低減する、遅らせる、または逆転させることを指す。一実施形態では、患者は、フロルベタピルによるPETイメージングによって検出した場合に、 β -アミロイド沈着物を示し、 β -アミロイド沈着物の数は、処置によって低減される。一実施形態では、患者は、本発明のポリペプチドまたはポリペプチド組成物によって検出した場合に β -アミロイド沈着物を示し、 β -アミロイド沈着物の数は、処置によって低減されるかまたは維持される。別の実施形態では、患者は、PETイメージングによって検出した場合に任意のタイプのアミロイド沈着物を示し、患者の認知機能は処置によって改善する。認知機能の改善は、McKhann et al., Alzheimer's & Dementia 7(3):263-9 (2011)の方法および検査によってアッセイされ得る。

【0154】

「予防」または「防止」(本明細書において互換的に使用される)は、処置することとは異なり、いずれかの臨床症状の発症前に個体へのポリペプチド、核酸、または組成物の投与を指す。本発明のポリペプチド、核酸、またはその組成物のいずれかを使用する予防が包含される。予防は、単に1つまたは複数の遺伝子マーカーに基づいて、疾患のリスクが増加していることが既知の個体または疾患を発症することが確実である個体に関係し得る。様々なタンパク質ミスフォールディング疾患に関して、多くの遺伝子マーカーが同定されている。例えば、hAPPにおいてスウェーデン型変異、インド型変異、またはロンドン型変異のうちの1つまたは複数を有する個体は、早期発症型アルツハイマー病を発症するリスクが増加しており、そのため、予防の候補者である。同様に、ハンチンチン遺伝子においてトリヌクレオチドCAGリピートを有する個体、特に36個またはそれより多くのリピートを有する個体は、最終的にハンチントン病を発症し、そのため、予防の候補者である。

【0155】

誤って折り畳まれたおよび／または凝集したアミロイドタンパク質に関連するまたはそれによって特徴付けられる疾患は、誤って折り畳まれたアミロイドタンパク質、凝集したアミロイドタンパク質、または誤って折り畳まれたおよび凝集したアミロイドタンパク質の両方に関連する(例えば、それによって引き起こされるかまたは少なくとも部分的に相関する)疾患を包含する。アミロイドを形成し得るペプチドまたはタンパク質は、上記の通りである。例えば、一部の実施形態では、アミロイドは、 $A\beta 40$ 、 $A\beta 42$ 、Nトラнкеート型 $A\beta 11-42$ 、 $A\beta 11-42-Pyro$ 、 $A\beta 3-42-Pyro$ 、 $A\beta 1-42-E22Q$ -オランダ型変異、またはそれらの組合せを含むがこれらに限定されない $A\beta$ によって形成される。一部の実施形態では、アミロイドは、プリオンタンパク質、例えば PrP^{Sc} によって形成される。一部の実施形態では、アミロイドは、トランスサイレチンによって形成される。一部の実施形態では、アミロイドは、免疫グロブリン軽鎖、例えば免疫グロブリンカッパ軽鎖および／または免疫グロブリンラムダ軽鎖によって形成される。一部の実施形態では、アミロイドは、タウによって形成される。一部の実施形態では、アミロイドは、 α -シヌクレインによって形成される。

【0156】

誤って折り畳まれたおよび／または凝集したアミロイドタンパク質に関連するかまたはそれによって特徴付けられる疾患は上記の通りである。上記の誤って折り畳まれたおよび／

10

20

30

40

50

または凝集したアミロイドタンパク質疾患の多くは中枢神経系（CNS）で起こる。CNSにおいて起こる疾患の非限定的な例は、パーキンソン病；アルツハイマー病；以下の臨床症状：行動異常型FTD（bvFTD）、進行性非流暢性失語（PNFA）、および意味性認知症（SD）を有する患者を含む前頭側頭型認知症（FTD）；前頭側頭葉変性症（FTLD）；およびハンチントン病である。本発明のポリペプチド、核酸、および組成物は、中枢神経系（CNS）で起こる誤って折り畳まれたおよび／または凝集したアミロイドタンパク質によって特徴付けられる疾患を処置するために使用され得る。

【0157】

タンパク質のミスフォールディングおよび／または凝集はまた、CNSの外部でも起こり得る。アミロイドーシスA（AA）（前駆体タンパク質は、血清中の急性期アポリポタンパク質、すなわちSAAである）および多発性骨髄腫（前駆体タンパク質は免疫グロブリン軽鎖および／または重鎖である）は、CNSの外部で起こる2つの広く公知のタンパク質ミスフォールディングおよび／または凝集タンパク質疾患である。他の例は、 $\alpha 2$ -ミクログロブリン、トランスサイレチン（例えば、FAP、FAC、SSA）、（アポ）血清AA、アポリポタンパク質AI、AII、およびAIV、ゲルソリン（例えば、FAPのフィンランド型）、免疫グロブリン軽鎖（カップまたはラムダ）、リゾチーム、フィブリノゲン、シスタチンC（例えば、脳アミロイド血管症、アイスランド型アミロイドーシスを伴う遺伝性脳出血）、カルシトニン、プロカルシトニン、膵島アミロイドポリペプチド（例えば、IAPPアミロイドーシス）、心房性ナトリウム利尿因子、プロラクチン、インスリン、ラクタヘドリン、ケラトエピセリン、ラクトフェリン、歯原性エナメル芽細胞関連タンパク質、およびセメノゲリンIによって形成されるアミロイドを伴う疾患を含む。本発明のポリペプチド、核酸、および組成物は、CNS外部で起こるタンパク質のミスフォールディングおよび／または凝集を伴う疾患を処置するために使用され得る。

【0158】

誤って折り畳まれたおよび／または凝集したアミロイドタンパク質に関連するまたはそれによって特徴付けられる疾患もまた、タウ病変を伴い得る。Lee et al., Annu. Rev. Neurosci. 24:1121-159 (2001)において論評されている。タウタンパク質は、中枢および末梢神経系ニューロンの両方の軸索において発現される微小管関連タンパク質である。神経変性性タウオパチー（時にタウオパチーと呼ばれる）が包含される。タウオパチーの例には、アルツハイマー病、筋萎縮性側索硬化症／パーキンソニズム認知症複合、嗜銀顆粒性認知症、大脳皮質基底核変性症、クロイツフェルト・ヤコブ病、ボクサー認知症、石灰化を伴うびまん性神経原線維変化病、ダウン症候群、第17染色体に連鎖するパーキンソニズムを伴う前頭側頭型認知症を含む前頭側頭型認知症、ゲルストマン・ストロイスラー・シャインカー病、ハレルフォルデン-スパッツ病、筋強直性ジストロフィー、ニーマン・ピック病C型、神経原線維変化を伴う非グアム型運動ニューロン疾患、ピック病、脳炎後パーキンソニズム、プリオンタンパク質脳アミロイド血管症、進行性皮質下グリオーシス、進行性核上麻痺、亜急性硬化性全脳炎、および神経原線維変化優位型認知症が挙げられる。これらの疾患の一部はまた、原線維アミロイド β ペプチドの沈着も含み得る。例えば、アルツハイマー病は、アミロイド β 沈着およびタウ病変の両方を示す。同様に、プリオン媒介性疾患、例えばクロイツフェルト・ヤコブ病、プリオンタンパク質脳アミロイド血管症、およびゲルストマン・ストロイスラー・シャインカー症候群もまた、タウ病変を有し得る（may have also have tau lesions）。このように、ある疾患が「タウオパチー」であることを示している場合、その疾患が、他の神経変性または誤って折り畳まれたおよび／または凝集したアミロイドタンパク質疾患の分類または群分けから除外されると解釈してはならず、これらの分類または群分けは便宜上提供されているに過ぎない。本発明のポリペプチドおよび組成物は、神経変性疾患ならびにタウ病変を伴う疾患を処置するために使用され得る。

【0159】

一部の実施形態では、ポリペプチド、医薬組成物、または製剤は、アミロイドの存在に関連する症状を示すか、またはタンパク質ミスフォールディング疾患に関連するバイオマ

10

20

30

40

50

一カーに対して陽性である患者におけるアミロイドを低減させる方法であって、本明細書に記載される医薬組成物または製剤の有効量を患者に投与するステップを含む方法において使用するためのものである。一部の実施形態では、ポリペプチド、医薬組成物、または製剤は、アミロイドの存在に関連する症状を示すか、またはタンパク質ミスフォールディング疾患に関連するバイオマーカーに対して陽性である患者におけるアミロイドレベルを維持する方法であって、本明細書に記載される医薬組成物または製剤の有効量を患者に投与するステップを含む方法において使用するためのものである。これらの実施形態の一部の態様では、バイオマーカーは β -アミロイドであり、これは、放射性医薬であるフロルベタピル (AV-45, Elil Lilly) によって検出することができる。これらの実施形態の一部の態様では、投与経路は髄腔内注射もしくは注入、直接脳室内注射もしくは注入、実質内注射もしくは注入、または静脈内注射もしくは注入である。

【0160】

一部の実施形態では、ポリペプチド、医薬組成物、または製剤は、患者におけるアミロイドを脱凝集またはリモデリングする方法において使用するためのものである。一部の実施形態では、ポリペプチド、医薬組成物、または製剤は、脳におけるアミロイド形成を低減させる方法において使用するためのものである。一部の実施形態では、本発明のポリペプチド、医薬組成物、または製剤は、脳におけるアミロイドクリアランスを促進する方法において使用するためのものである。一部の実施形態では、本発明のポリペプチド、医薬組成物、または製剤は、脳におけるアミロイド凝集を阻害する方法において使用するためのものである。一部の実施形態では、本発明のポリペプチド、医薬組成物、または製剤は、脳における毒性オリゴマーを除去する方法において使用するためのものである。一部の実施形態では、本発明のポリペプチド、医薬組成物、または製剤は、脳における毒性オリゴマーの形成を防止する方法において使用するためのものである。一部の実施形態では、本発明のポリペプチド、医薬組成物、または製剤は、アミロイドによる損傷からニューロンを保護する方法において使用するためのものである。一部の実施形態では、ポリペプチド、医薬組成物、または製剤は、 α -シヌクレイン凝集体の細胞-細胞間伝播を低減させる方法において使用するためのものである。一部の実施形態では、ポリペプチド、医薬組成物、または製剤は、 α -シヌクレイン凝集体の細胞-細胞間伝播を遮断する方法において使用するためのものである。これらの実施形態の一部の態様では、ポリペプチド、医薬組成物、または製剤は、それを必要とする患者に髄腔内注射もしくは注入、直接脳室内注射もしくは注入、実質内注射もしくは注入、または静脈内注射もしくは注入によって投与される。

【0161】

一部の実施形態では、本発明のポリペプチド、医薬組成物、または製剤は、脳におけるA β アミロイド沈着物の脱凝集を引き起こす方法であって、それを必要とする患者の脳にポリペプチド、医薬組成物、または製剤の有効量を直接注射し、こうして脳におけるA β アミロイド沈着の低減を引き起こすステップを含む方法において使用するためのものである。他の実施形態では、本発明のポリペプチド、医薬組成物、または製剤は、脳におけるA β アミロイド沈着物の脱凝集を引き起こす方法であって、それを必要とする患者にポリペプチド、医薬組成物、または製剤の有効量を静脈内送達によって注射し、こうして脳におけるA β アミロイド沈着物の低減を引き起こすステップを含む方法において使用するためのものである。

【0162】

一実施形態では、アミロイドによる損傷からニューロンを保護するために使用するための本発明の医薬組成物または製剤は、予防的に投与される。

【0163】

一部の実施形態では、患者は、タンパク質ミスフォールディングおよび／または凝集疾患に関連するバイオマーカーに対して陽性である。一実施形態では、バイオマーカーは β -アミロイドであり、 β -アミロイドを検出するために使用される作用剤は、フロルベタピル (AV45, Elil Lilly) である。

【0164】

先行技術の抗体に基づく治療（例えば、6E10）とは異なり、本明細書に記載される G A I M－I g 融合体は、非構造化または部分的構造化 N 末端残基ではなくてアミロイドのコアを標的とし、優れたリモデリング活性を実証する（図 10A）。このように、一部の実施形態では、本発明のポリペプチド、医薬組成物、または製剤は、アミロイドをリモデリングする方法において使用するためのものである。これらの実施形態の一部の態様では、投与経路は、髄腔内注射もしくは注入、直接脳室内注射もしくは注入、実質内注射もしくは注入、または静脈内注射もしくは注入である。

【0165】

一般的に、本明細書に開示されるポリペプチドは、M13ファージ、g3p、または先行技術に開示される g3p のバリエーションもしくは融合タンパク質と少なくとも同程度に有効にアミロイドに結合する。一部の実施形態では、本明細書に開示されるポリペプチドは、M13ファージ、g3p、または先行技術に開示される g3p のバリエーションもしくは融合タンパク質より有効にアミロイドに結合する。一部の実施形態では、本明細書に開示されるポリペプチドは、M13ファージ、g3p、または先行技術に開示される g3p のバリエーションもしくは融合タンパク質より有効にアミロイドをリモデリングする。一部の実施形態では、本明細書に開示されるポリペプチドは、M13ファージ、g3p、または先行技術に開示される g3p のバリエーションもしくは融合タンパク質より有効にアミロイド凝集を阻害する。一部の実施形態では、本明細書に開示されるポリペプチドは、M13ファージ、g3p、または先行技術に開示される g3p のバリエーションもしくは融合タンパク質より有効に毒性オリゴマーを除去する。一部の実施形態では、本明細書に開示されるポリペプチドは、M13ファージ、g3p、または先行技術に開示される g3p のバリエーションもしくは融合タンパク質より有効に α -シヌクレイン凝集体の細胞-細胞間伝播を低減させる。一部の実施形態では、本明細書に開示されるポリペプチドは、M13ファージ、g3p、または先行技術に開示される g3p のバリエーションもしくは融合タンパク質より有効にアミロイドを検出する。一部の実施形態では、本明細書に開示されるポリペプチドは、M13ファージ、g3p、または先行技術に開示される g3p のバリエーションもしくは融合タンパク質より有効に、誤って折り畳まれたおよび／または凝集したアミロイドタンパク質に関連する疾患を防止する。一部の実施形態では、本明細書に開示されるポリペプチドは、M13ファージ、g3p、または先行技術に開示される g3p のバリエーションもしくは融合タンパク質より有効に、誤って折り畳まれたおよび／または凝集したアミロイドタンパク質に関連する疾患を処置する。一部の実施形態では、本明細書に開示されるポリペプチドは、M13ファージ、g3p、または先行技術に開示される g3p のバリエーションもしくは融合タンパク質と比較して患者においてより小さい免疫応答を誘発する。少なくとも 1 つの実施形態では、本明細書に開示されるポリペプチドは、患者において免疫応答を誘発しない。

【0166】

別の実施形態では、上記の疾患のいずれも、本発明の核酸分子（すなわち、低減された免疫原性を示すかまたは免疫原性を示さず、アミロイドに結合する能力、アミロイドを脱凝集／リモデリングする能力、および／またはアミロイドの凝集を阻害する能力を保有する G A I M バリエーションを含むポリペプチドをコードする）を、単独でまたは適した担体、例えば脂質ナノ粒子、ポリマー担体、またはベクター、例えばウイルスベクターに会合させて任意の適した経路、例えば吸入および静脈内注入によって患者に直接投与することによって処置され得る。G A I M バリエーションを含むポリペプチドをコードする核酸分子は、DNA または RNA であり得る。

診断

【0167】

診断用組成物が、本発明によって包含され、上記の本発明のポリペプチドのいずれも（例えば、G A I M バリエーションを含むポリペプチド、例えば、G A I M－I g 融合体を含むポリペプチドを含み得る。したがって、一部の実施形態では、本明細書において記載され

10

20

30

40

50

るポリペプチド、医薬組成物および製剤は、本明細書において記載される種々の疾患と関連する診断適用において使用される。例えば、本発明のポリペプチドの、アミロイドタンパク質への結合は、結合しているアミロイドタンパク質を検出するために使用され得る。同様に、本発明のポリペプチドの結合は、*in vivo*または*in vitro*でイメージング剤として使用される場合、タンパク質ミスフォールディング、タンパク質凝集または本明細書において記載される神経変性性疾患の診断の一部であり得る。

【0168】

一部の実施形態では、本明細書において記載されるポリペプチドはアミロイドイメージング剤として使用され、ここで、アミロイドイメージング剤はアミロイドタンパク質を検出でき、誤って折り畳まれたおよび／もしくは凝集したアミロイドタンパク質に関連する疾患を診断できる。本明細書において記載されるポリペプチドは、線維の種類にかかわらずアミロイドと結合するので、それらは、任意のアミロイド凝集体（ $A\beta$ 、タウ、 α -シヌクレイン、トランスサイレチン、免疫グロブリン軽鎖など）を画像化および検出でき、幅広いアミロイド関連疾患および状態を診断し得る。一部の実施形態では、アミロイドイメージング剤として使用されるポリペプチドは、検出可能な標識をさらに含む。

【0169】

種々の標識が、タンパク質を標識するための標準技術を使用して本明細書において記載されるようなGAIMバリエーションを含むポリペプチドに結合され得る。標識の例として、蛍光標識および放射標識が挙げられる。使用され得る様々な放射標識があるが、一般に、標識は、それだけには限らないが、 ^{18}F 、 ^{11}C および ^{123}I を含む放射標識から選択されることが多い。これらおよび他の放射性同位元素は、周知の化学反応を使用してタンパク質に結合され得る。一実施形態では、標識は、陽電子放射型断層撮影（PET）を使用して検出される。しかし、放射性同位元素の検出のための任意の他の適した技術も、放射性トレーサを検出するために使用され得る。

【0170】

本発明のポリペプチドおよび組成物は、 β -アミロイドに特異的であるイメージング剤、例えば、F18-AV-45、Eli Lillyなどと組み合わせて診断用イメージング剤として使用され得る。 β -アミロイド特異的イメージング剤と一緒に本発明の診断用組成物の使用は、分別検出に基づく非 β -アミロイド凝集体の検出をもたらすので、一実施形態では、本発明の診断用組成物は、非 β -アミロイド凝集体を検出するために β -アミロイドイメージング剤と組み合わせてイメージング剤として使用される。

【0171】

一部の実施形態では、本明細書において記載されるポリペプチドまたはその組成物は、脳を含むCNSにおいて β -アミロイドを検出するために使用される。

【0172】

本発明の診断用組成物は、治療用組成物のために記載される同一経路を使用して投与され得る。一部の実施形態では、投与の経路は、髄腔内注射もしくは注入、直接脳室内注射もしくは注入、実質内注射もしくは注入または静脈内注射もしくは注入である。

組換え技術

【0173】

一部の態様では、本発明は、本発明のポリペプチドをコードする核酸配列を含むオリゴヌクレオチドに関する。例えば、本発明は、本明細書に開示されたような免疫グロブリン定常領域に直接または低分子リンカーによって結合されたGAIMバリエーションを含むポリペプチドを含むGAIMバリエーションを含むポリペプチドをコードする核酸配列に関する。一般に、GAIMバリエーションまたはGAIM-Ig融合体を含むポリペプチドをコードする核酸は、従来の組換えDNA技術、例えば、変異体GAIMドメインのクローニング、直接DNA合成を使用して、または例えば、M13配列をプローブとして使用してライブラリーから対応するDNAを単離することによって調製される。例えば、Sambrook et al. 1989, Molecular Cloning A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y.; Ausubel et al. 1989, Current Protocols in Molecular

Biology, Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y.を参照されたい。G A I MバリエーションまたはG A I M-I g融合体を含むポリペプチドをコードする核酸はまた、以下の実施例に提供されるように調製され得る。

【0174】

組換えによる産生のために、本発明の核酸配列のいずれも、挿入されたコード配列の転写および翻訳に必要なエレメントを含有する、またはRNAウイルスベクターの場合には、複製および翻訳に必要なエレメントを含有する、適当な発現ベクター中に挿入され得る。コード核酸は、適切なリーディングフレームでベクター中に挿入される。したがって、本発明は、本発明の核酸を含むベクターを提供する。このようなベクターとして、それだけには限らないが、DNAベクター、ファージベクター、ウイルスベクター、レトロウイルスベクターなどが挙げられる。ベクターは、例えば、バキュロウイルス、カリフラワーモザイクウイルス、タバコモザイクウイルス、R i プラスミドまたはT i プラスミドを含み得る。本発明の核酸をクローニングするための適当なベクターの選択は、発現を実施するための選択された宿主細胞とのベクターの適合性についての周知の知識を使用して当業者によって行われ得る。これは、哺乳動物細胞、植物細胞、昆虫細胞、細菌細胞、真菌細胞、トランスジェニック動物細胞などのいずれかにおいて行われ得る。本明細書において記載されるポリペプチドを産生するのに適した例示的哺乳動物細胞として、それだけには限らないが、HEK293細胞、HEK293由来細胞、CHO細胞、CHO由来細胞、HeLa細胞、およびCOS細胞が挙げられる。例示的細菌細胞として、それだけには限らないが、E. coli細胞が挙げられる。例示的植物細胞として、それだけには限らないが、ウキクサ細胞が挙げられる。例えば、米国特許第8,022,270号を参照されたい。これらの細胞種の各々のための適当なベクターは、当技術分野で周知であり、一般に、市販されている。限定されない例示的トランスフェクション法は、Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press (2001)に記載されている。核酸は、当技術分野で公知の方法に従って所望の宿主細胞に一過性にまたは安定にトランスフェクトされ得る。

【0175】

少なくとも1つの実施形態では、核酸は、配列番号19のアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする。少なくとも1つの実施形態では、核酸は、配列番号20のアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする。少なくとも1つの実施形態では、核酸は、配列番号21のアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする。少なくとも1つの実施形態では、核酸は、配列番号22のアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする。少なくとも1つの実施形態では、核酸は、配列番号23のアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする。少なくとも1つの実施形態では、核酸は、配列番号24のアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする。少なくとも1つの実施形態では、核酸は、配列番号25のアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする。少なくとも1つの実施形態では、核酸は、配列番号26のアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする。

【0176】

少なくとも1つの実施形態では、核酸は、配列番号19およびヒトIgGのFc部分（例えば、ヒトIgG1）から本質的になるポリペプチドをコードする。少なくとも1つの実施形態では、核酸は、配列番号20およびヒトIgGのFc部分（例えば、ヒトIgG1）から本質的になるポリペプチドをコードする。少なくとも1つの実施形態では、核酸は、配列番号21およびヒトIgGのFc部分（例えば、ヒトIgG1）から本質的になるポリペプチドをコードする。少なくとも1つの実施形態では、核酸は、配列番号22およびヒトIgGのFc部分（例えば、ヒトIgG1）から本質的になるポリペプチドをコードする。少なくとも1つの実施形態では、核酸は、配列番号23およびヒトIgGのFc部分（例えば、ヒトIgG1）から本質的になるポリペプチドをコードする。少なくとも1つの実施形態では、核酸は、配列番号24およびヒトIgGのFc部分（例えば、ヒトIgG1）から本質的になるポリペプチドをコードする。少なくとも1つの実施形態では、核酸は、配列番号25およびヒトIgGのFc部分（例えば、ヒトIgG1）から本

質的になるポリペプチドをコードする。少なくとも1つの実施形態では、核酸は、配列番号26およびヒトIgGのFc部分（例えば、ヒトIgG1）から本質的になるポリペプチドをコードする。

【0177】

一部の実施形態では、核酸は、配列番号29のアミノ酸配列から本質的になるポリペプチド（PB108）をコードする。一部の実施形態では、核酸は、配列番号30のアミノ酸配列から本質的になるポリペプチド（PB122）をコードする。一部の実施形態では、核酸は、配列番号31のアミノ酸配列から本質的になるポリペプチド（PB116）をコードする。一部の実施形態では、核酸は、配列番号32のアミノ酸配列から本質的になるポリペプチド（PB114）をコードする。一部の実施形態では、核酸は、配列番号33のアミノ酸配列から本質的になるポリペプチド（PB109）をコードする。一部の実施形態では、核酸は、配列番号34のアミノ酸配列から本質的になるポリペプチド（PB110）をコードする。一部の実施形態では、核酸は、配列番号35のアミノ酸配列から本質的になるポリペプチド（PB105）をコードする。一部の実施形態では、核酸は、配列番号36のアミノ酸配列から本質的になるポリペプチド（PB127）をコードする。上記のように、これらの実施形態は、バリエーションは、アミノ酸1（ΔM1）、アミノ酸1および2（ΔM1およびΔA2）、アミノ酸485（ΔK485）、アミノ酸1および485（ΔM1およびΔK485）またはアミノ酸1、2および485（ΔM1、ΔA2およびΔK485）を欠如する、配列番号29、30、31、32、33、34、35または36のバリエーションをコードする核酸を包含する。

【0178】

一部の実施形態では、本発明のポリペプチドをコードする核酸は、配列番号37を含む。一部の実施形態では、核酸は、配列番号38を含む。一部の実施形態では、核酸は、配列番号39を含む。一部の実施形態では、核酸は、配列番号40を含む。一部の実施形態では、核酸は、配列番号41を含む。一部の実施形態では、核酸は、配列番号42を含む。一部の実施形態では、核酸は、配列番号43を含む。一部の実施形態では、核酸は、配列番号44を含む。一部の実施形態では、配列番号37、38、39、40、41、42、43または44のいずれかを含む核酸は、IgG（例えば、ヒトIgG1またはIgG2）のFc部分をコードする核酸をさらに含む。少なくとも1つの実施形態では、オープン安定化GAIMバリエーションをコードする核酸およびIgGのFc部分をコードする核酸は、低分子リンカーをコードする核酸によって接続される。少なくとも1つの実施形態では、核酸は、低分子リンカーARSをコードする。一部の実施形態では、核酸は、シグナル配列をさらにコードする。一部の実施形態では、核酸は、GenBank RefSeq NP_510891.1の18アミノ酸のN末端配列を有するシグナル配列をさらにコードする。

【0179】

少なくとも1つの実施形態では、本発明のポリペプチドをコードする核酸は、配列番号45である。少なくとも1つの実施形態では、核酸は、配列番号46である。少なくとも1つの実施形態では、核酸は、配列番号47である。少なくとも1つの実施形態では、核酸は、配列番号48である。少なくとも1つの実施形態では、核酸は、配列番号49である。少なくとも1つの実施形態では、核酸は、配列番号50である。少なくとも1つの実施形態では、核酸は、配列番号51である。少なくとも1つの実施形態では、核酸は、配列番号52である。

【0180】

形質転換に使用されるベクターは、普通、形質転換体を同定するために使用される選択マーカーを含有する。細菌系では、これは、抗生物質耐性遺伝子、例えば、アンピシリンまたはカナマイシンを含み得る。培養哺乳動物細胞において使用するための選択マーカーとして、ネオマイシン、ハイグロマイシンおよびメトトレキサートなどの薬物に対する耐性を付与する遺伝子が挙げられる。選択マーカーは、増幅可能な選択マーカーであり得る。1つの増幅可能な選択マーカーとして、DHFR遺伝子がある。別の増幅可能なマーカー

ーとして、DHFR^r eDNAがある (Simonsen and Levinson, PNAS (1983) 80:2495)。選択マーカーは、Thilly(Mammalian Cell Technology, Butterworth Publishers, Stoneham, MA)に総説されており、選択マーカーの選択は、十分に当業者のレベルの範囲内である。発現系の発現エレメントは、その強度および特異性が変わる。利用される宿主／ベクター系に応じて、構成および誘導プロモーターを含む多数の適した転写および翻訳エレメントのいずれも、発現ベクターにおいて使用され得る。例えば、細菌系においてクローニングする場合、誘導プロモーター、例えば、バクテリオファージ入のpL、pLac、ptrp、ptac (ptrp-lacハイブリッドプロモーター) などが使用され得る；昆虫細胞系においてクローニングする場合には、バキュロウイルス多面体プロモーター (baculovirus polyhedron promoter) などのプロモーターが使用され得る；植物細胞 (plant cell) 系においてクローニングする場合には、植物細胞のゲノムに由来するプロモーター (例えば、熱ショックプロモーター；RUBISCOの小サブユニットのプロモーター；クロロフィルa／b結合タンパク質のプロモーター) または植物ウイルスに由来するプロモーター (例えば、CaMVの35S RNAプロモーター；TMVのコートタンパク質プロモーター) が使用され得る；哺乳動物細胞系においてクローニングする場合には、哺乳動物細胞のゲノムに由来するプロモーター (例えば、メタロチオネインプロモーター) または哺乳動物ウイルスに由来するプロモーター (例えば、アデノウイルス後期プロモーター；ワクシニアウイルス7.5Kプロモーター) が使用され得る；複数のコピーの発現産物を含有する細胞株を作製する場合には、適当な選択マーカーと共にSV40-、BPV-およびEBV-ベースのベクターが使用され得る。植物発現ベクターが使用される場合には、本発明の発現産物の線形のまたは非環状形態をコードする配列の発現は、いくつかのプロモーターのうちいずれかによって駆動され得る。例えば、CaMVの35S RNAおよび19S RNAプロモーターなどのウイルスプロモーター (Brisson et al., Nature (1984) 310:511-514) またはTMVのコートタンパク質プロモーター (Takamatsu et al., EMBO J (1987) 6:307-311) が使用され得る；あるいは、RUBISCOの小サブユニットなどの植物プロモーター (Coruzzi et al., EMBO J. (1984) 3:1671-1680; Broglie et al., Science (1984) 224:838-843) または熱ショックプロモーター、例えば、ダイズhsp17.5-Eもしくはhsp17.3-B (Gurley et al., Mol. Cell. Biol. (1986) 6:559-565) も使用され得る。これらの構築物は、Tiプラスミド、Riプラスミド、植物ウイルスベクター、直接DNA形質転換、マイクロインジェクション、エレクトロポレーションなどを使用して植物細胞中に導入され得る。例えば、Weissbach & Weissbach 1988, Methods for Plant Molecular Biology, Academic Press, NY, Section VIII, pp. 421-463;およびGrierson & Corey 1988, Plant Molecular Biology, 2d Ed., Blackie, London, Ch. 7-9を参照されたい。本発明のタンパク質を産生するために使用され得る1つの昆虫発現系では、Autographa californica核多角体病ウイルス (AcNPV) が、外来遺伝子を発現するためのベクターとして使用される。ウイルスは、Spodoptera frugiperda細胞において成長する。コード配列は、ウイルスの非必須領域 (例えば、多面体遺伝子) 中にクローニングされ、AcNPVプロモーター (例えば、多面体プロモーター) の制御下に置かれ得る。コード配列の挿入の成功は、多面体遺伝子の不活性化および排除されない組換えウイルス、すなわち、多面体遺伝子によってコードされるタンパク質性コートを欠くウイルスの生成をもたらす。これらの組換えウイルスは、Spodoptera frugiperda細胞に感染するために使用され、挿入された遺伝子が発現される。例えば、Smith et al., J. Viral. (1983) 46:584;米国特許第4,215,051号を参照されたい。この発現系のさらなる例は、Ausubel et al., eds. 1989, Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 2, Greene Publish. Assoc. & Wiley Interscienceにおいて見出すことができる。

【0181】

哺乳動物宿主細胞では、いくつかのウイルスベースの発現系のいずれも使用され得る。

10

20

30

40

50

アデノウイルスが、発現ベクターとして使用される場合には、コード配列は、アデノウイルス転写／翻訳制御複合体、例えば、後期プロモーターおよび三分節リーダー配列にライゲーションされ得る。この融合遺伝子は、次いで、*in vitro*または*in vivo*組換えによってアデノウイルスゲノム中に挿入され得る。ウイルスゲノムの非必須領域（例えば、領域E1またはE3）における挿入は、感染宿主において生存可能な、ペプチドを発現可能である組換えウイルスをもたらす（例えば、Logan & Shenk, PNAS (1984) 81:3655を参照されたい）。あるいは、ワクシニア7.5 Kプロモーターが使用され得る（例えば、Mackett et al., PNAS (1982) 79:7415; Mackett et al., J. Virol. (1984) 49:857; Panicali et al., PNAS (1982) 79:4927）。他のウイルス発現系として、アデノ随伴ウイルスおよびレンチウイルスが挙げられる。

10

【0182】

別の実施形態では、本発明は、本発明の核酸を含有するベクターを有する宿主細胞を提供する。宿主細胞に本発明のベクターをトランスフェクトまたは形質転換する、またはその他の形で入れる方法は、当技術分野で公知である。ベクターを有する細胞は、適当な条件下で培養されると、本発明のポリペプチドを産生する。上記のように、適した宿主細胞として、それだけには限らないが、哺乳動物細胞、トランスジェニック動物細胞、植物細胞、昆虫細胞、細菌細胞および真菌細胞が挙げられる。例えば、適した宿主細胞として、それだけには限らないが、HEK293細胞、HEK293由来細胞、CHO細胞、CHO由来細胞、HeLa細胞およびCOS細胞が挙げられる。

【0183】

20

核酸構築物（例えば、ベクター）を含む宿主細胞を、適当な成長培地で成長させる。本明細書で使用される場合、用語「適当な成長培地」とは、細胞の成長に必要な栄養分を有する培地を意味する。本発明の組換えによって産生されたポリペプチドは、当技術分野で公知の技術を使用して培養培地から単離され得る。

【0184】

本発明のポリペプチドの組換え産生のために使用されるベクターおよび細胞の具体例は、以下の実施例に示される。

【実施例】

【0185】

(実施例1)

30

タウK18P301L発現、精製および線維集合

P213L変異を有するタウー441(2N4R)の残基244~372に対応するヒトタウK18P301L断片を、タウーMTBRについて記載されたとおりに発現させ、精製した(Krishnan et al. (2014) J Mol Biol, 426:2500-19)。2mM DTTを含有する0.1M酢酸ナトリウムpH7.0バッファー中の40μMのタウK18P301L単量体に、40μMの低分子量ヘパリン(Fisher Scientific)を添加することおよび37℃で3日間インキュベートすることによって、タウーK18P301L線維を集合させた。線維形成は、チオフラビンT(ThT)によって確認した。

(実施例2)

Aβ線維集合

40

【0186】

Aβ1-42(rPeptide)、Nトランケート型Aβ11-42(Bachem)、Aβ11-42-Pyro(AnaSpec)、Aβ3-42-Pyro(AnaSpec)およびAβ1-42-E22Q(AnaSpec)を、ヘキサフルオロイソプロパノール(HFIP)に溶解し、透明溶液が生じるまで室温で24時間インキュベートした。ペプチド溶液を、真空下で1時間乾燥させた。Stine et al., 2003によって記載されたとおりに線維を集合させた。100マイクログラムのAβペプチドを、40μLのDMSOに溶解し、10mM HCl溶液で1140μLに希釈し、500rpmで振盪しながら37℃で24時間インキュベートした。線維形成は、ThTによって確認した。

(実施例3)

50

G A I M-I g 融合タンパク質の作製

【0187】

対照足場 P B 1 2 0 の部位特異的な変異誘発を、G A I Mドメインの内溝に面するβ鎖において実施した(図1A)。これらのβ鎖、N1ドメイン中の4および5ならびにN2ドメイン中の9および10は、閉じた状態のG A I Mにおいてドメイン間相互作用を促進し、G A I M中のアミロイド結合モチーフと一部重複するとこれまでに示されている(Krishnan et al. (2014) J Mol Biol、426:2500-19) T o l A結合部位の露出を防ぐ(Hoffman-Thoms et al. (2013) J Biol Chem、288:12979-91)。さらに、N1-N2ドメイン集合に関与するN2-ヒンジ領域中の部位およびF線毛結合にとって重要なN2中の特定の領域を変異させて(Weininger et al. (2009) PNAS、106:12335-40; Deng and Perham (2002) J Mol Biol、319:603-14)、ファージ感染の際にG A I Mアミロイド結合活性がその機能を変換する方法を調べた。

【0188】

G A I M-I g 融合タンパク質を、E x p i 2 9 3 (商標)発現系(Thermo Fisher Scientific)を、製造業者の指示に従って使用して発現させた。タンパク質の精製を、20mMリン酸ナトリウム、pH7.0中のHiTrap(登録商標)MabSelect(商標) SuRe(商標)カラム(GE Healthcare Lifesciences)で、それに続いて、AKTA(商標)Pure FPLCシステムを使用する20CVにわたるpH4.0からpH3.6への20mM酢酸ナトリウムでの勾配溶出によって実施した。融合タンパク質をD-PBS pH7中で透析し、フィルター滅菌した(Ultrafree(登録商標)-MCスピンカラム、Millipore)。MES SDSランニングバッファー(Thermo Fisher Scientific)と、それに続くInstantBlue(商標)染色溶液(Expedeon)を用いるNuPAGE(商標)4~12% Bis-Trisゲルシステムによってタンパク質純度を解析した。さらに、UltiMate(商標)3000 UHPLC集束システム(ThermoFisher Scientific)中のTSKgel(登録商標)G3000SW XL、7.8mm ID×30cm、5μMカラム(TOSOH BIOSCIENCES)を使用し、分析用SECを使用して、G A I M I g G-融合体の純度を評価した。各試料について、7.5μgのタンパク質をSECカラムに注入し、0.5mL/分の流速でD-PBS移動相において分離を実施した。Chromelon(商標)7ソフトウェアを使用してピーク純度を解析した。ATUMによってG A I M I g G-融合体バリエーションを合成した。

(実施例4)

G A I M二量体の作製

【0189】

37℃で2時間、免疫グロブリンヒンジで融合体を特異的に切って、2つのジスルフィド結合によって連結されたG A I M二量体をもたらすF a b R I C A T O R (登録商標)(IdeS)酵素(Genovis)を使用して、G A I M-I g 融合体からG A I M二量体を生成した(図1C)。切断後、製造業者のプロトコールに従ってCapto(商標)AdhereによってFcから分離した。G A I M二量体の純度は、MES SDSランニングバッファーで分離されたNuPAGE(商標)4~12% Bis-Trisゲルシステムで確認した。G A I M二量体(0.5μM)を、漸増濃度のグアニジン(Sigma)を有する100mMリン酸カリウム、pH7.0中、25℃で2時間インキュベートした。蛍光を、10mmセル中、280nmで励起後310nmおよび340nmで、ならびに295nmで励起後360nmで測定した。グアニジン塩酸濃度に対する蛍光発光の線形依存を仮定する2つの状態のフォールディングモデルを使用してデータを解析した。SDS-PAGEゲルでの予測された分子サイズおよびFc断片のクリアランスを確認した後、タンパク質を、アンフォールディング研究に付した。

(実施例5)

S Y P R O (登録商標) O r a n g e 結合アッセイによってモニターされたG A I Mの熱

10

20

30

40

50

的アンフォールディング

【0190】

S Y P R O (登録商標) O r a n g e 結合アッセイを実施して、G A I Mドメイン分離およびN2ドメインの安定性をモニターした。S Y P R O (登録商標) O r a n g e は、水溶液中で折り畳まれたG A I Mのクローズドコンフォメーションに不十分に結合する。G A I Mの2つのドメインが解離し、疎水性残基が露出すると、色素が露出した疎水表面に結合し、蛍光の増加を示す。96ウェルプレートにおいて、P B S中1マイクロモル濃度のG A I M-I g 融合体を、×20過剰のS Y P R O (登録商標) O r a n g e (I n v i t r o g e n カタログ番号S-6650)と混合し、密閉した。0.24℃/分の速度で20℃から95℃に温度を連続増加させることによってR o c h e L i g h t C y c l e r (登録商標) 480RT-PCRにおいて、熱的アンフォールディングをモニターした。励起は、465nmに、発光を580nmに設定し、1の融解係数、10のクオント係数(quant factor)および2秒間の最大積分時間とした。蛍光シグナルの任意単位を、記録し、0~100のスケールに対して正規化した(Layton and Hellenga, 2011)。

【0191】

S Y P R O (登録商標) O r a n g e 結合によってモニターされたG A I M単量体の熱的アンフォールディングは、43℃の付近でのドメイン開口およびN2アンフォールディング転移に対応する単一転移を示した(図4A~4B)。実施例4に従って得られたG A I M二量体は、溶液中の単量体と同一の融解プロファイルを示したのに対し、溶液中のG A I M-I g 融合体は、熱的アンフォールディングの際に3つの別個の転移を示した(図4A~4B)。G A I M単量体および二量体においてみられるように(図4B)、第1の転移、T_{m1}は、44℃付近で生じた。64℃および81℃の2つの追加の転移は、F cドメインアンフォールディング転移と同様である(Traxlmayr et al., 2012, Biochim Biophys Acta, 1824:524-529)。G A I M特異的T_{m1}を比較することによって、G A I MおよびF cドメインは、独立したフォールディングドメインのままであり、キメラ分子中に新規構造要素は生成しないことが示された。

(実施例6)

G A I Mは、I g G融合二量体でその天然コンフォメーション安定性を保持する

【0192】

I g G融合体中のG A I Mのコンフォメーション安定性を、内部蛍光によるG A I M二量体のグアニジン塩酸(G u H C l)誘導性アンフォールディングを使用して調べた。G A I M二量体を実施例4に記載されたとおりに作製し、0、2および5M G u H C l溶液中、25℃で2時間平衡化した。295nmでのT r p残基の選択的励起は、0と2M濃度の間でG A I M二量体蛍光強度の最小変化を示し、発光λ_{max}(345nm)に変化はなかった(図5A)。5M G u H C lで、T r p蛍光は、15nmだけ赤色移動し(λ_{max}360nm)、蛍光強度は、0および2M試料の両方よりも有意に高かった。次いで、G A I M二量体を280nmで励起し(T r pおよびT y r残基)、蛍光発光スペクトルを記録した(図5B)。340nmでの蛍光発光強度は、0および2M G u H C lの間で低下し、次いで、5M G u H C lで同様のマージンだけ増加した。同様のスペクトル変化はまた、g3pにおいても観察され(Martin and Schmid, 2003, J Mol Biol, 328:863-75)、これは、G A I M-I g融合体バリエーション中のG A I Mは、天然g3p中のG A I Mの天然コンフォメーション安定性を保持していたことを示す。

【0193】

本発明者らは、G u H C lの濃度の範囲で310、340および360nmで蛍光発光強度を記録することによってG A I M二量体の詳細な変性プロファイルを作製した。G A I M二量体は、280nmで励起した場合に340nmで二相性変性プロファイルを示した(図5C)。第1の転移は、1~2M G u H C lの間で生じたが、次のものは2~3M G u H C lの間で生じた。次いで、本発明者らは、310nm(励起280nm)および360nm(励起295nm)変性プロファイルを、2つの状態のタンパク質アンフォー

ルディングモデルにフィッティングし（図5D～5E）、それぞれ、1.5Mおよび2.6M GuHClでN2およびN1ドメイン変性転移を算出した。1.5M GuHClでの第1の転移は、2つのドメインN1およびN2の分離ならびにより安定ではないN2ドメインの同時アンフォールディングを表す。第2の転移は、2.6M GuHClでのより安定なN1ドメインのアンフォールディングを表す。これらの値は、g3pにおけるこれまでに報告された変性転移に対応する（Martin and Schmid, 2003, J Mol Biol, 328:863-75）。したがって、これらのデータは、GAIM-Ig融合体中のGAIM二量体中の各GAIMが、独立したフォールディングユニットを形成し、繊維状ファージ由来のg3p先端タンパク質と同様のコンフォメーションをとることを示す。

（実施例7）

GAIM-Ig融合体は、A β およびタウ線維と結合する

【0194】

96ウェルMaxiSorp（登録商標）プレート（Thermo Fisher）中のウェルあたり50mM炭酸バッファー、pH9.6中の50マイクロリットルのA β 線維（0.8 μ M）またはタウK18P301L線維（1 μ M）を添加し、4℃で16時間インキュベートした。ウェルをDPBS-Tween（0.05%）で3回、DPBSで2回洗浄し、それに続いて、SuperBlock（商標）（Thermo Scientific）を用いて室温で1.5時間ブロッキングした。ウェルをPBSで3回洗浄した。GAIM-Ig融合体を、示された濃度で高濃度のPBS-T（14.7mM KH₂PO₄、80.6mM Na₂HPO₄・7H₂O、27mM KCl、1.38M NaCl、0.05% tween）に添加し、37℃で2時間インキュベートし、それに続いて、DPBS-Tween（0.05%）中で3回およびDPBSで3回洗浄した。0.2%ゼラチンを含有するDPBS-Tween（0.05%）で1:5000希釈したヒト特異的Fc-HRP抗体（Jackson ImmunoResearch、カタログ番号109-035-008）を、37℃で45分間添加した。DPBS-Tween（0.05%）中で2回洗浄し、DPBS中で2回洗浄した後、TMB溶液（Thermo Fisher）を用いてシグナルを発生させ、0.25N HClを添加することによって反応を停止させ、Tecan Infinite（登録商標）M1000 PROプレートリーダーを用いて450nmで吸光度を記録した。

【0195】

ELISAによって、GAIMの内溝に面するN1およびN2残基中の変異のほとんどは、A β 1-42線維結合に影響を及ぼすとわかった（図6A）。変異したGAIMバリエーションの結合活性は、0.7nM～175nM EC₅₀の範囲であり、fA β 42への結合親和性の250倍を超える変化に相当した。結合有効性（EC₅₀）と第1の融解転移（Tm1）の間には、強力な相関（P値10⁻⁴、r_s=0.703）があった。Tm1の低下は、結合が増加したGAIMのよりオープンなコンフォメーションを表し、より高いTm1を有する安定化されたバリエーションは、その結合活性を失う傾向がある。これは、ドメイン間相互作用が弱められると、GAIM中のアミロイド線維結合モチーフが露出することを示唆し、GAIM結合が温度依存性であることを示すこれまでのデータと一致する（Krishnan et al. (2014) J Mol Biol, 426:2500-19）。

【0196】

fA β 42に対する結合活性の変化が、他のアミロイドタンパク質へ移るかどうかを見分けるために、バリエーションのサブセットを、タウの微小管結合領域から形成されたアミロイド線維への結合についてELISAによって試験した。fA β 42およびfタウについてGAIM-Igバリエーションの結合活性（EC₅₀）を比較すること（P値10⁻⁴、r_s=0.878；図6B）によって、2種の異なるアミロイドについてGAIM-Igの結合活性において緊密な相関が示された（P値10⁻⁴、r_s=0.862）。

（実施例8）

安定化されたGAIM-Ig融合タンパク質にわたるオープン安定化GAIM-Ig融合タンパク質の優れた結合

10

20

30

40

50

【0197】

N2ドメインを安定化し、N1ドメインとのより強力な相互作用を支持するGAIM中のいくつかの変異は、アミロイド結合の減少につながった。Q₁₅₆GTDPVK₁₆₂ループ（配列番号7）を、QGGK（配列番号10）で置換することによるN2ドメインにおけるプロリン含有ループの排除によって、Tm₁が3.6℃だけ上昇し、fAβ₄₂結合の18倍の喪失をもたらした（図7A）。同様に、F₁₃₅QNN₁₃₈（配列番号5）のFQGN（配列番号8）への、およびR₁₄₃QGA₁₄₆（配列番号6）のVNGV（配列番号9）へのアミノ酸置換は、N2（Tm₁）をそれぞれ1.8℃および2.5℃だけ安定化した。これらの安定化バリエーションは、GAIM足場と比較してfAβ₄₂結合活性の低減を示した（図7A）。同様に、N2ヒンジサブドメインおよびN1の相互作用を安定化するQ₁₂₈H変異を導入することによって、線維結合が減少した（図7A）。Q₁₂₈Hは、わずかに1.4倍の増加を示したが、N2ドメイン中のT₁、T₂またはT₃の置換は、全てコラーゲンへの非特異的結合を低減した（図9）。このような変異体は、GAIMバリエーションのアミロイド結合活性の効力とその安定性の間の逆相関を示す。

【0198】

GAIMのよりオープンなコンフォメーションを作出するために、N1中のD₂₄DKTLD₂₉（配列番号3）ループ（図3A）を、繊維状ファージIF1由来の相同配列EGDS（配列番号4）で置き換え、N2安定化変異（例えば、図3Cにおいて示される1つまたは複数のターン／ループでの）と組み合わせて試験した。推定されるオープンな、N2安定化されたGAIMバリエーションを、タンパク質品質およびアミロイド結合活性について試験した。全てのオープン安定化バリエーションは、線維結合活性の改善を示し、EC₅₀ < 1.5 nMを有し；より露出した、到達可能なアミロイド線維結合部位と一致する（図7B）。1つの例外は、EGDS（配列番号4）バリエーションであり、組み合わされた3つのN2安定化変異の全て（F₁₃₅QGN₁₃₈、V₁₄₃NGV₁₄₆およびQ₁₅₆GGK₁₆₂）（それぞれ、配列番号8、9、10）を含有する超安定化N2を有し（PB₁₁₃；配列番号17；Tm₁ = 52.7℃）、fAβ₄₂結合活性の喪失をもたらす（図7B）。これは、ドメイン内相互作用を導入することまたはN2ドメインを過剰に安定化することのいずれかによる、GAIM中のアミロイド相互作用部位（複数可）をマスクするN2における主要な構造変化による可能性がある。線維結合が増加したオープン安定化バリエーションは、Tm₁およびfAβ₄₂結合間の相関を失い、これは、これらのバリエーションにおけるアミロイド結合部位（複数可）およびN2安定性のかい離（uncoupling）を示唆する。全てのEGDS-N2（配列番号4として開示される「EGDS」）安定化バリエーションは、SDS-PAGEによって良好なタンパク質品質を示し、サイズ排除クロマトグラフィー（SEC）によって単量体と示された。さらに、SECによって保持時間のシフトがあり、これは、よりオープンなGAIMコンフォーマー分子をさらに示した。

（実施例9）

GAIM-Ig融合体は、多様な形態を有する複数のアミロイドを標的とする

【0199】

オープン安定化GAIM-Ig融合体を、種々な種類およびコンフォメーションのAβ凝集体と会合する能力について試験した。種々の改変Aβペプチドを線維化し、これらの凝集体へのGAIM-Ig融合体の結合親和性を測定した。Nトランケート型Aβ₁₁₋₄₂、Aβ₁₁₋₄₂-Pyro、Aβ₃₋₄₂-PyroおよびAβ₁₋₄₂-E22Q-Dutch変異（Levy et al, 1990; Van Broeckhoven et al, 1990）を、Aβ₄₂と同一条件下で凝集させ、ThTによって（図8A～8D）、およびTEMによって（示されていないデータ）線維形成を検証した。これらのペプチドを使用して形成された凝集体は、極めて多様な形態を示した。例えば、pyro-gl₃₋₄₂は、その構造にいくつかの屈曲を有する線維を形成し、E22Qバリエーションは、滑らかな長線維を形成し、11～42ペプチドは、いくつかの短線維を形成する。ELISAによって、オープン安定化バリエーションPB₁₀₈および足場PB₁₂₀の両方とも、これらの線維と会合するとわかった。PB₁₀₈は、PB₁₂₀と比較して約20倍改善された種々の凝集

体への結合、 EC_{50} 0.9～1.9 nMを示した（図8A～8D）。同様に、他の試験されたオープン安定化GAIM-Ig融合体について、優れた結合が観察された（表2）。

【表2】

表2.オープン安定化 GAIM-Ig 融合体は、アミロイドタンパク質と結合し、それをリモデリングする。

GAIM-Ig 融合 タンパク質	fAβ42 結合 (nM)	fタウ KL 結合 (nM)	fAβ42 リモデリング (%)
PB108	1	15	87
PB122	1.3	24	80
PB116	0.8	7.0	82
PB114	0.9	8.7	86
PB109	0.8	5.2	82
PB110	0.9	7.6	92
PB105	0.8	ND*	ND
PB127	0.8	ND	ND

*ND=収集したデータなし

【表3】

表3.オープン安定化 GAIM-Ig 融合体は、種々のアミロイドタンパク質を標的とする。

結合標的	PB120 EC_{50} (nM)	PB108 EC_{50} (nM)
Aβ (1-42)	18.0	0.8 (SPRによる0.5nMの K_D)
Aβ (11-42)	24.3	0.9
Aβ3-42 PyroE3	24.1	1.1
Aβ11-42 PyroE11	40.6	1.9
Aβ1-42 E22Q	21.9	1.0
タウKL	59	14
野生型TTR	105	7
LCラムダ_1 (可変+定常)	ND*	24
LCラムダ_1 (可変)	ND	1.3
LCラムダ_2 (可変)	ND	19

*ND=収集したデータなし。結合は、特に断りのない限りELISAによって決定された。

【0200】

オープン安定化GAIM-Ig融合体の、種々な種類およびコンフォメーションのアミロイドタンパク質と結合する能力は、表2および3にさらに示されている。例えば、表2および3の両方とも、オープン安定化GAIM-Ig融合体のA β 42との、およびタウKLとの低いナノモル濃度の親和性での結合を示し、表3は、形態的に多様な免疫グロブリン軽鎖(LC)およびトランスサイレチン(TTR)凝集体との低いナノモル濃度の親和性でのその結合をさらに実証する。これらのデータは、対照足場と比較して多様な一群のアミロイド線維にわたる優れた標的化を示し、GAIMがA β 42線維において中央およびC末端配列と会合することを示すこれまでのNMR研究と一致する(Krishnan et al. (2014) J Mol Biol, 426:2500-19)。

10

(実施例10)

GAIM-Ig融合体は、アミロイドタンパク質と特異的に結合する

【0201】

非特異的結合を除外するために、GAIM-Ig融合体を高濃度(1.8 μ M、fA β 42のような真の基質のEC₅₀よりも100倍高い)で、コラーゲンのような他の線維性種とのオフターゲット結合について試験した。D-PBS中の、ウェルあたり225ナノグラムのヒトコラーゲン(Sigmaカタログ番号C5483)を、MaxiSorp(登録商標)96ウェルプレート(Thermo Fisher Scientific)上に、37°Cで16時間固定化し、それに続いて、SuperBlock(商標)(Thermo Fisher Scientific)中、室温で1時間ブロッキングした。PBS-Tween(0.05%)中、37°Cで1時間GAIM-Ig融合体をインキュベートした後、PBS-Tween(0.05%)中3×5分の洗浄を行った。ヒト特異的Fc-HRP抗体(Jackson ImmunoResearch、カタログ番号109-035-008)をPBS-Tween(0.05%)中で1:5000で37°Cで45分間添加した後、PBS-Tween(0.05%)中3×5分の洗浄およびPBS中2×5分の洗浄を行った。TMB溶液(Sigma)を用いてシグナルを発生させ、0.25N HClを添加することによって反応を停止させ、Tecan Infinite(登録商標)M1000 PROプレートリーダーを用いて450nmで吸光度を記録した。GAIM-Ig融合体は、ELISAによって、非アミロイド基質と最小の結合しか示さなかった(Krishnan et al. (2014) J Mol Biol, 426:2500-19)。

20

30

(実施例11)

オープン安定化GAIM-Ig融合体は、A β 線維の増強されたりモデリングを示す

【0202】

リモデリングアッセイを、低保持微量遠心管(low retention microfuge tube)(Fisher Scientific 02-681-320)中で実施した。これらのアッセイにおいて使用したバッファは、微生物成長を防ぐために0.05%ナトリウムアジドを含有する。いずれの試料においてもプロテアーゼ混入がないことを確かめるために、全てのリモデリングされた複合体をSDS-PAGEゲルで泳動し、何らかの脱凝集について調べた。<1 μ M線維を使用するアッセイについては、ウエスタンブロット解析を使用してタンパク質の品質を代わりに確認した。

40

【0203】

A β 42線維(2.5 μ M)をGAIM-Ig融合体バリエーションと共にまたは伴わずに37°Cで3日間共インキュベートした。次いで、複合体のアリコート、様々な濃度の尿素と共にインキュベートした。尿素中の複合体のThT蛍光を尿素濃度に対してプロットした。GAIM-Ig融合体処置を全く施していない線維と比較した、固定尿素濃度でのリモデリング効率をThT蛍光の喪失パーセントとしてプロットした。

【0204】

種々なA β 42線維結合効力を有するGAIM-Ig融合体を選択して、リモデリング効率が結合効力およびオープンコンフォメーション状態に依存しているかを調べた。図10Aは、同一条件および濃度下でA β 42線維と共にインキュベートした種々なGAIM

50

融合体のリモデリング効率を示す。低いナノモル濃度の $fA\beta 42$ 結合を有するオープン安定化バリエーションは、リモデリング活性の2倍～3倍の増加を示し、対照足場（35%）と比較して83%の平均リモデリング活性を有した。図10Bは、変更された $fA\beta 42$ 結合とリモデリング活性の間の正の相関を示し、その結果、優れた $A\beta$ 結合を有する $GAIM-Ig$ 融合体はまた、優れたリモデリング活性も示す。

【0205】

図10A～10Cならびに透過型電子顕微鏡データ（実施例13；図10Dを参照されたい）は、オープン安定化 $GAIM-Ig$ 融合体が、線維状構造物に単に固着すること、およびそれをマスクすることとは対照的に、アミロイド線維をリモデリングして、線維状構造物の喪失を引き起こすことをさらに実証する。例えば、漸増濃度の尿素中でインキュベートするが、 $GAIM-Ig$ 融合体に曝露されない場合には、 $A\beta 42$ 線維は、変性に抵抗し、ThT蛍光によって測定されるように1M尿素中で10%未満の構造変化しか示さない（図10C）。より高い尿素濃度では、ThT蛍光は、劇的に低下し、これは、線維状構造物の喪失を示唆する。対照的に、 $GAIM-Ig$ 融合体の化学量論未満の量で処置された線維は、1M尿素で30～90%低減したThT結合を示し始めた。この知見は、 $GAIM-Ig$ 融合体が、線維状構造物と結合し、ThTと結合できない状態へ変更することおよび $GAIM$ リモデリング活性は異なる $GAIM-Ig$ 融合体間で様々であることを示唆し、オープン安定化 $GAIM-Ig$ 融合体は、高いリモデリング活性を示している。

（実施例12）

オープン安定化 $GAIM-Ig$ 融合体は、タウK18P301L線維の増強されたリモデリングを示す

【0206】

タウ-K18P301L線維を $GAIM-Ig$ 融合体と共インキュベートすることによってリモデリングアッセイも実施して、凝集体のリモデリングが、アミロイドタンパク質にとって一般的であることを実証した。

【0207】

リモデリングアッセイを、低保持微量遠心管（Fisher Scientific 02-681-320）中で実施した。これらのアッセイにおいて使用したバッファは、微生物成長を防ぐために0.05%ナトリウムアジドを含有する。いずれの試料においてもプロテアーゼ混入がないことを確かめるために、全てのリモデリングされた複合体をSDS-PAGEゲルで泳動し、何らかの脱凝集について調べた。＜1 μ M線維を使用するアッセイについては、ウエスタンブロット解析を使用してタンパク質の品質を代わりに確認した。

【0208】

$fA\beta 42$ 線維とは異なり、タウ-K18P301L線維は、低濃度尿素溶液に容易に溶解する。したがって、タウ-K18P301Lに対する $GAIM-Ig$ 融合体のリモデリング効率は、サルコシル溶解度アッセイを使用して調べた。タウK18P301L線維（1 μ M）を、 $GAIM-Ig$ 融合体バリエーションと共にまたは伴わずに37℃で5日間共インキュベートした。線維および複合体を1%サルコシルと共にまたは伴わずに15分間インキュベートし、100,000gで30分間遠心沈殿させた。各試料から得た上清を注意深く回収し、4～12% NuPAGE（登録商標）ゲル（Invitrogen）上に載せた。タンパク質をニトロセルロースメンブレンに移し、タウK18P301Lについて探索した。Biorad Chemidoc（商標）システムを使用してゲルバンドを定量することによってリモデリングパーセントを算出した。

【0209】

タウ-K18P301Lを使用して *in vitro* で集合させた線維（ $GAIM-Ig$ 融合体に対して曝露されていない）は、1%サルコシルと共にインキュベートされた場合に溶解に対して耐性を示した。 $GAIM-Ig$ 融合体処置タウ-K18P301L線維は、1%サルコシルに未処置線維よりも容易に溶解し（図11A）、これは、これらの線

維もまた、 $fA\beta 42$ のようにリモデリングされ得ることを示す。様々な濃度のGAIM-Ig融合体と共にインキュベートすると、これらの線維は、濃度依存性に溶解した（図11B）。

【0210】

PB120のリモデリング効率を、オープン安定化GAIM-Ig融合体のリモデリング効率と比較した。PB113、感染力の低減した、超安定化、ジスルフィド不含GAIM (Kather et al., 2005, J Mol Biol, 354:666-78) は、 $A\beta 1-42$ またはタウ-K18P301L線維に対して結合活性を有さず（データは示さず）、陰性対照として加えた。オープン安定化GAIM-Ig融合タンパク質は、PB120と比較して増強されたリモデリング活性を示したのに対し（図11B）、PB113は、リモデリング活性を有していなかった（図11A）。

10

【0211】

本発明者らは、GAIM融合体が、試料と共にインキュベートした場合に、タウ-K18P301L線維をリモデリングし、可溶性タウK18P301L種を放出するかどうかを調べた。強力なリモデリングをもたらすGAIM融合体濃度（例えば、10~250 nM）では、サルコシル処置に付されていなかった複合体の上清中に可溶性種は見られず（図11A）、これは、GAIM融合体と結合する際に、リモデリングされた材料が、可溶性タウK18P301L種または単量体を遊離しないことを示唆する。

（実施例13）

オープン安定化GAIM-Ig融合体は、アミロイド線維に線維状構築物を喪失させる

20

【0212】

$A\beta 1-42$ 線維（15 μ lの20 μ M試料）を、炭素コーティングされた銅グリッド（Ted Pellaカタログ番号01844-F）に適用した。次いで、試料を0.5 mlの水で穏やかに洗浄し、反転し、2%酢酸ウラニル溶液の液滴上に浮かべた。30秒後、グリッドを取り出し、グリッドの過剰の液体を、濾紙を使用してグリッドのエッジから吸い上げて除くことによって乾燥させた。FEI Tecnai（商標）Spirit TEMを使用して、線維を画像化した。図10Dは、化学量論未満のオープン安定化GAIM-Ig融合体と共にインキュベートされた $A\beta 42$ 線維の代表的なTEM画像を示す。 $A\beta 42$ 線維は、オープン安定化GAIM-Ig融合体に曝露されると、その線維状構築物を失う（図10D）。同様に、TEM解析は、タウ-K18P301L線維が、オープン安定化GAIM-Ig融合体と共にインキュベートされるとその特徴的な線維状コンフォメーションを失うことを示す（図11C）。

30

（実施例14）

オープン安定化GAIM-Ig融合体は、アミロイド凝集の阻害の増加を示す

【0213】

オープン安定化GAIM-Ig融合タンパク質を、 $A\beta 42$ 単量体と共に37℃で10時間共インキュベートすることによる集合阻害活性について試験した。アミロイド線維形成をThT蛍光によって追跡し、GAIMを伴わない、ならびに陰性対照PB113の存在下での線維形成と比較した。

【0214】

40

100マイクログラムのHFIP処置 $A\beta 1-42$ (rPeptide) 単量体試料を、80 μ l DMSOに溶解し、ピペッティングによって完全に混合し、ボルテックス処理し、5.4 ml D-PBSで4.04 μ Mの最終 $A\beta 1-42$ 濃度に希釈した。GAIM-Ig融合体試料をPBSで10、2.5、0.63および0.16 μ Mの中間保存溶液に希釈した。80マイクロリットルの $A\beta 1-42$ 単量体溶液を、黒色丸底96ウェルプレート（LVL、カタログ番号225.LS.PP）の各ウェルに分配した。各GAIM-Ig融合体保存溶液の10マイクロリットルを、 $A\beta 1-42$ を含有するウェルに添加し、それに続いて、各ウェルあたり、3.2 μ Mの $A\beta 1-42$ および3.3 μ MのThTの最終濃度に対して10 μ l ThT（PBS中33 μ M）を添加した。プレートを透明フィルムで密閉し、430/485 nm（Ex/Em）でのThT蛍光を、37℃

50

でインキュベートし、20分毎に3秒の垂直振盪を行いながらTecan Infinite（登録商標）M1000 PROプレートリーダーにおいて20分毎に14時間記録した。各GAIM-Ig融合体濃度のAβ42凝集体のパーセンテージを、非処置Aβ42ウェル（陽性対照ウェル）に対して算出した。

【0215】

オープン安定化GAIM-Ig融合体は、示された濃度で10時間添加した場合に用量依存性集合阻害を示した（図12A）。オープン安定化融合体は、対照足場PB120と比較して増加した集合阻害活性をさらに示した（図12A～12B）。例えば、250nMで、代表的なオープン安定化GAIM-Ig融合体PB108およびPB116は、PB120と比較して、線維形成のブロッキングにおいて40～20%の増加を示した（図12B）。化学量論未満の量のオープン安定化GAIM-Ig融合体の、アミロイド線維形成を強力に遮断する能力は、融合体が、核生成依存性線維集合に関与する成長する線維またはシード中のコアβ鎖への結合によってアミロイド線維形成を遮断することを示唆する（Krishnan et al. (2014) J Mol Biol, 426:2500-19）。

【0216】

同様に、オープン安定化GAIM-Ig融合体は、タウ線維に対して用量依存性集合阻害を示した（図12C）。タウK18P301L集合反応は、0.1M酢酸ナトリウムpH7.0バッファー中の10μMのタウ単量体を、様々な濃度のGAIM融合体（0～500nM）の存在下で、2μMの低分子量ヘパリン（Fisher Scientific）と共に37℃で3日間インキュベートすることによって設定した。集合反応物のThT蛍光を、試料を、5μM ThT溶液で1μMに希釈することによって記録した。タウK18P301L集合に対するGAIMの阻害効果は、GAIM融合体を有さないタウK18P301Lの集合と比較することによって算出した。

【0217】

全長タウまたはMTBRもしくはK18などのトランケート型配列のin vitro線維集合は、核生成およびその後の集合を促進するために、ヘパリンの存在を必要とする。試験したGAIM融合体は、ヘパリンの存在下でfタウKL集合を阻害した。さらに、オープン安定化GAIM融合体は、核生成を、PB120と比較して3倍～5倍良好に遮断した（図12C～12D）。総合して、これらの結果は、オープン安定化GAIM融合体は、Aβおよびタウ経路上の中間体の両方と結合し、アミロイド凝集体の集合を阻害することを示す。

10

20

30

40

50

【図 3 C】

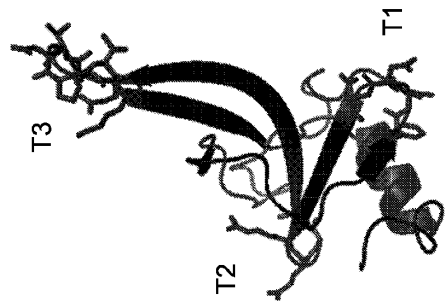


Fig. 3C

【図 3 D】

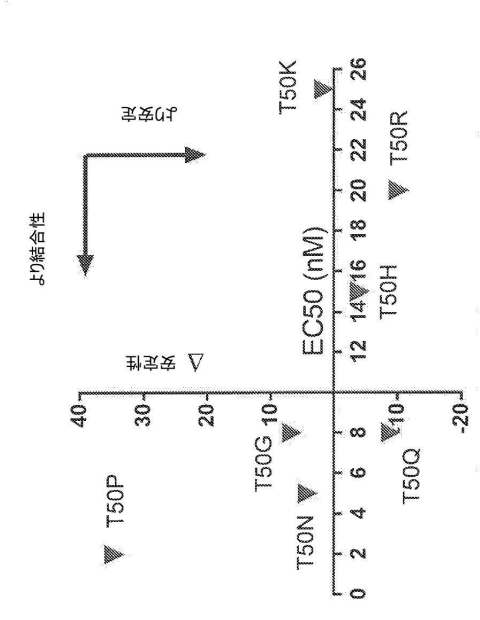


Fig. 3D

【図 4 A】

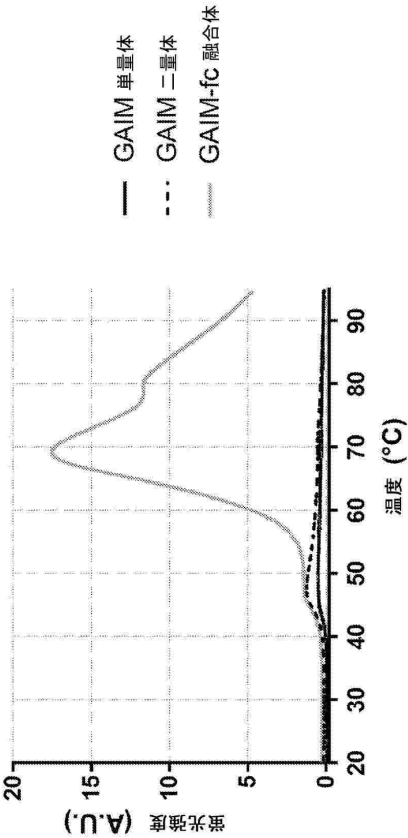


Fig. 4A

【図 4 B】

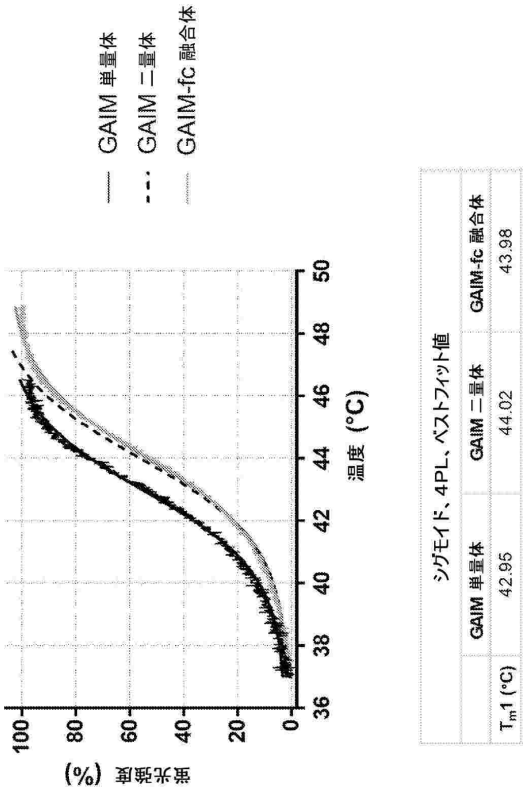


Fig. 4B

10

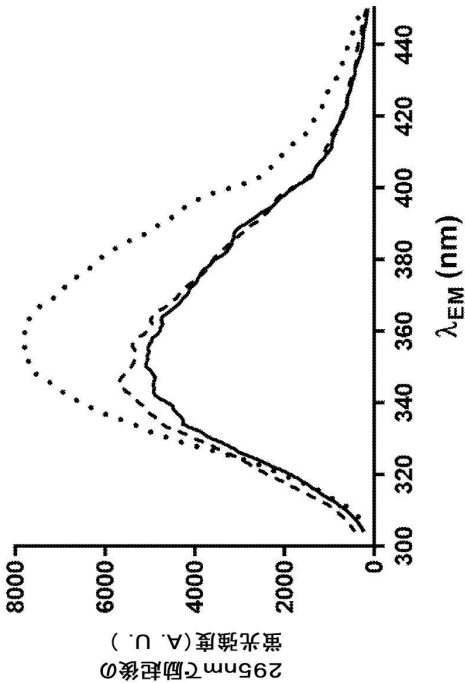
20

30

40

50

【図 5 A】



【図 5 B】

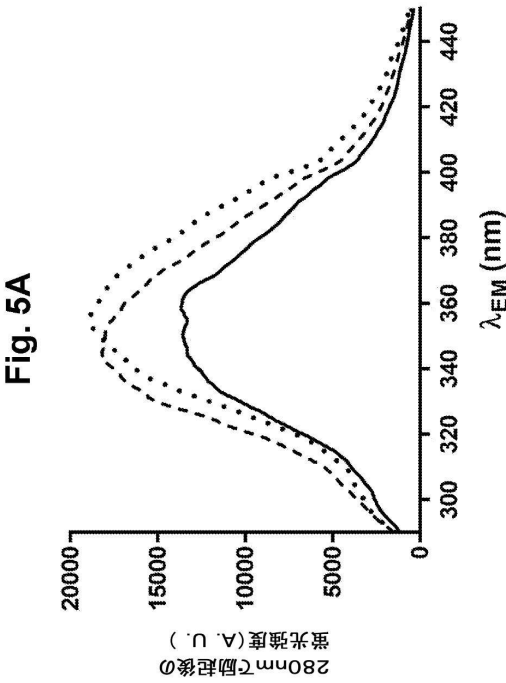
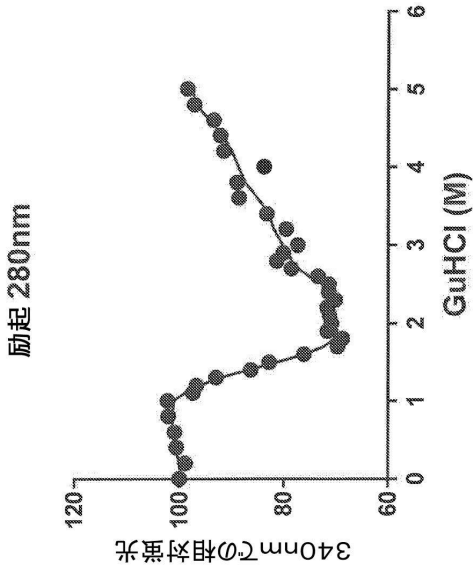


Fig. 5A

Fig. 5B

【図 5 C】



【図 5 D】

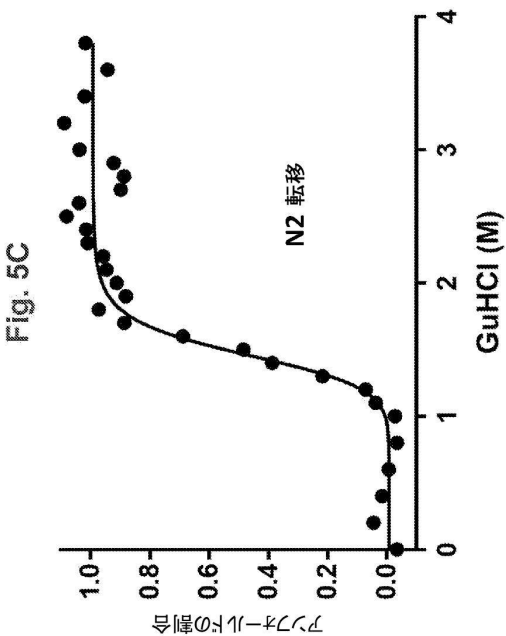


Fig. 5C

Fig. 5D

10

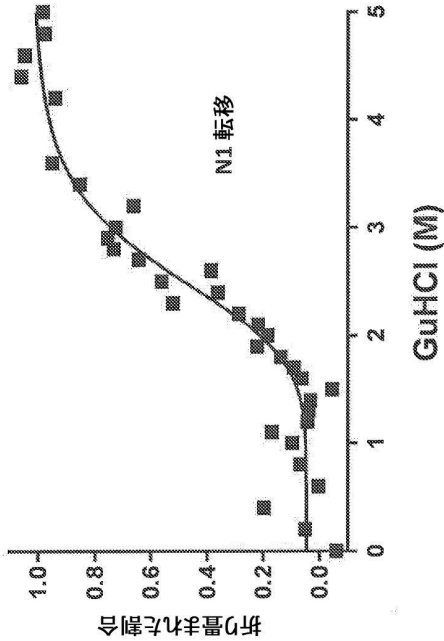
20

30

40

50

【図 5 E】



【図 6 A】

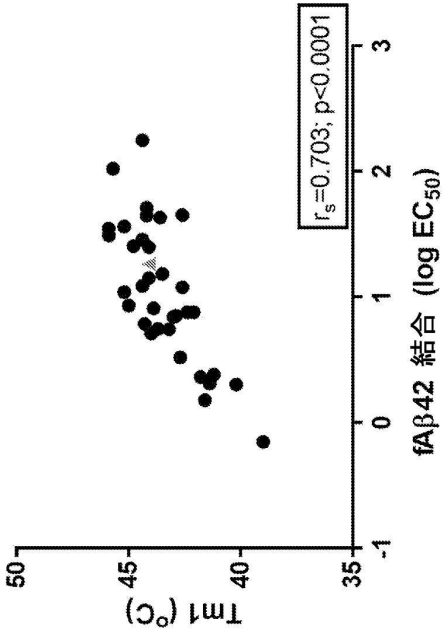
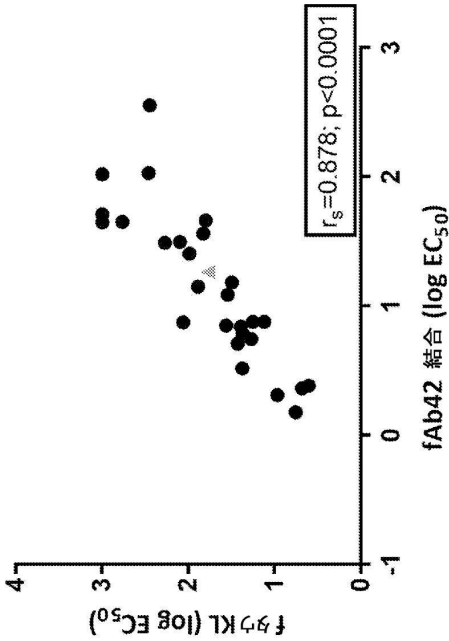


Fig. 5E

Fig. 6A

【図 6 B】



【図 7 A】

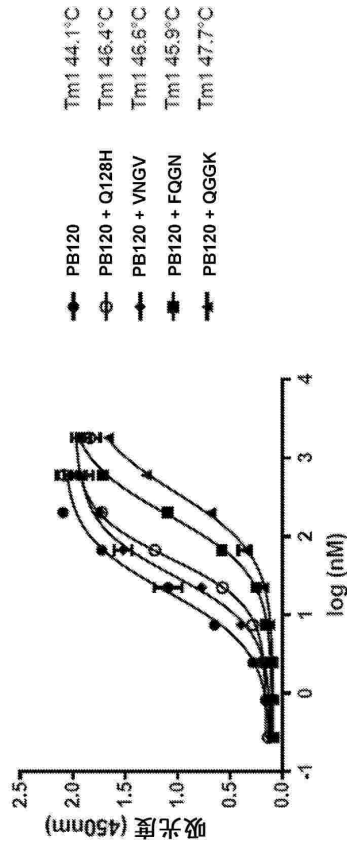


Fig. 6B

Fig. 7A

10

20

30

40

50

【図 7 B】

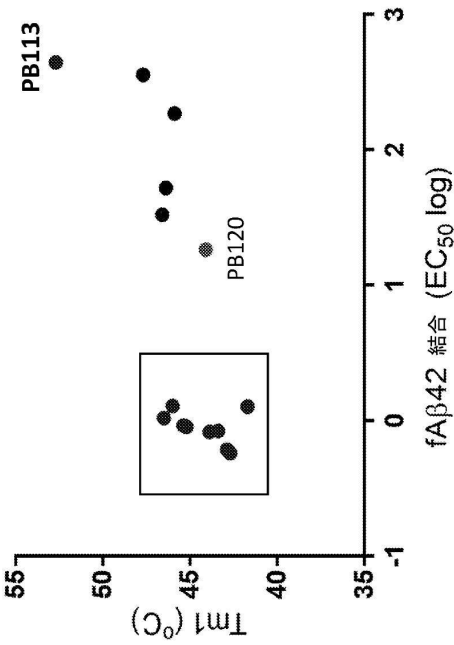


Fig. 7B

【図 8 A】

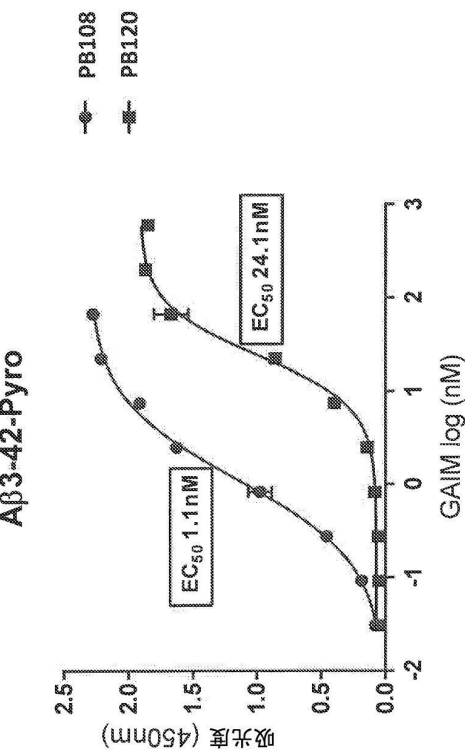


Fig. 8A

【図 8 B】

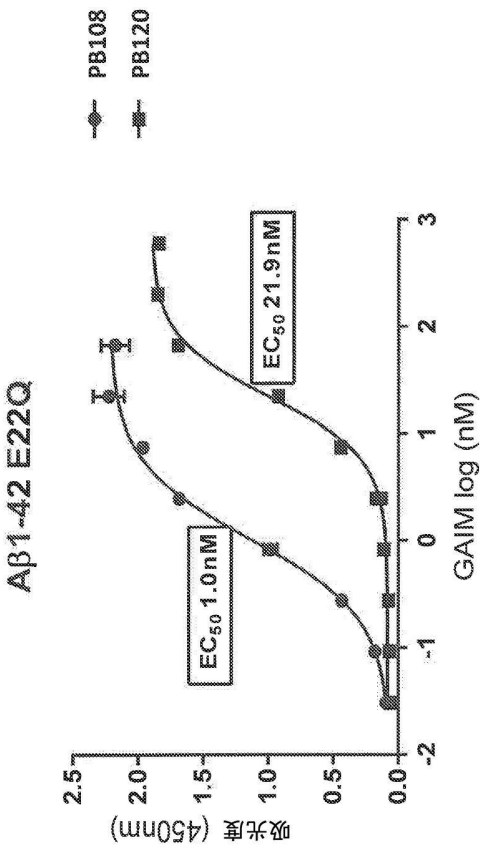


Fig. 8B

【図 8 C】

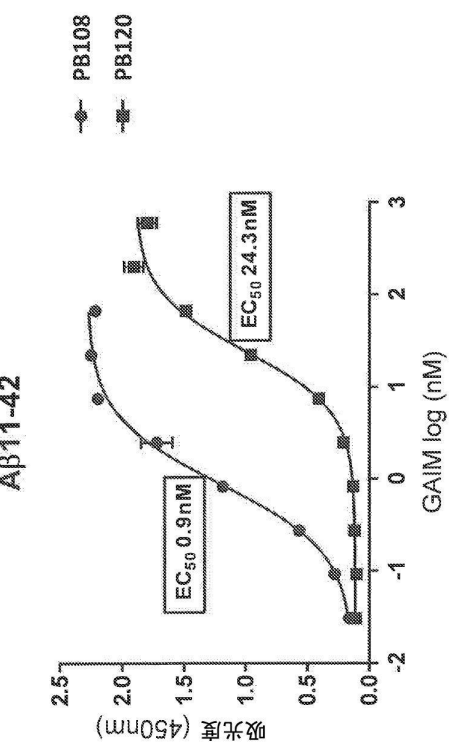


Fig. 8C

10

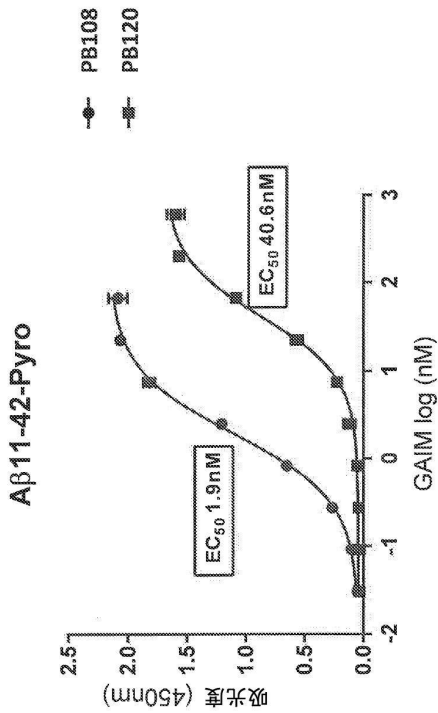
20

30

40

50

【図 8 D】



【図 9】

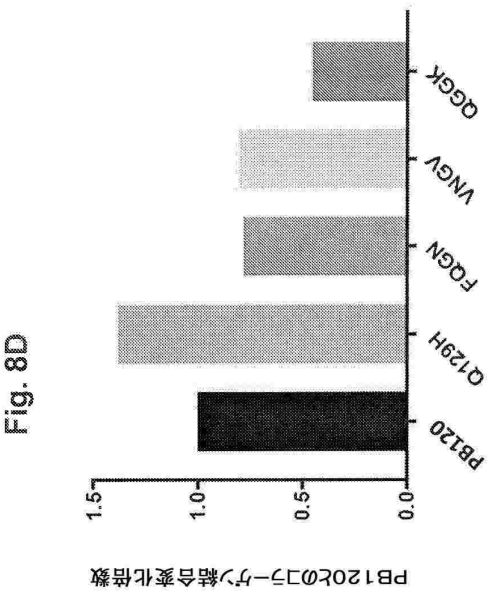
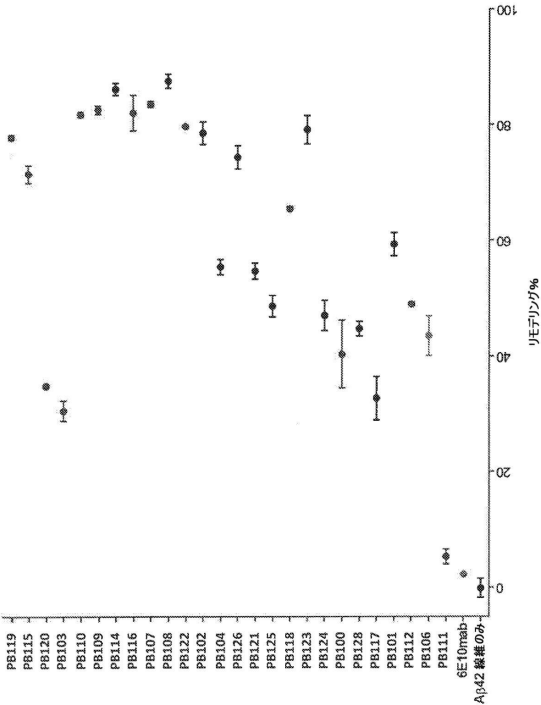


Fig. 9

10

20

【図 10 A】



【図 10 B】

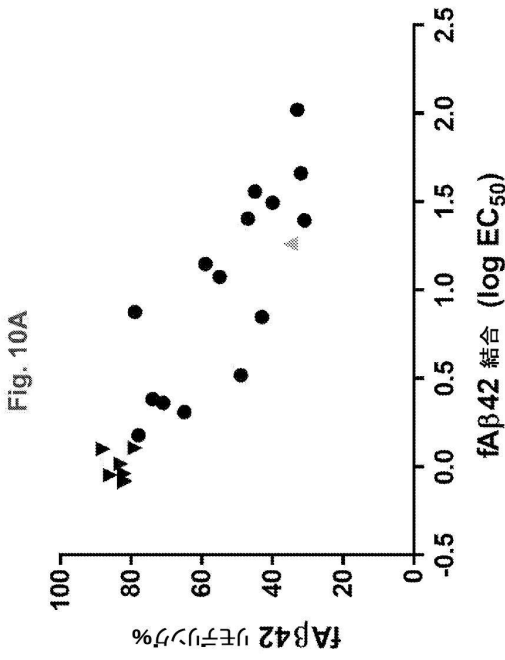


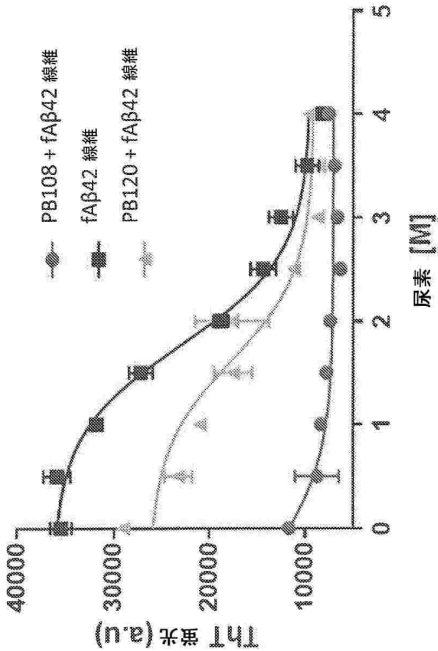
Fig. 10B

30

40

50

【図 1 0 C】



【図 1 0 D】

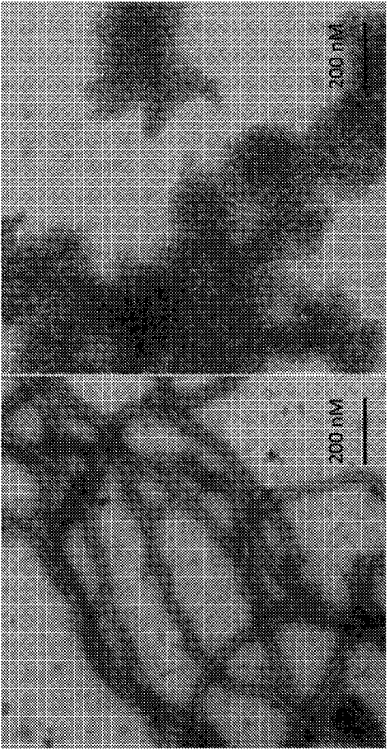
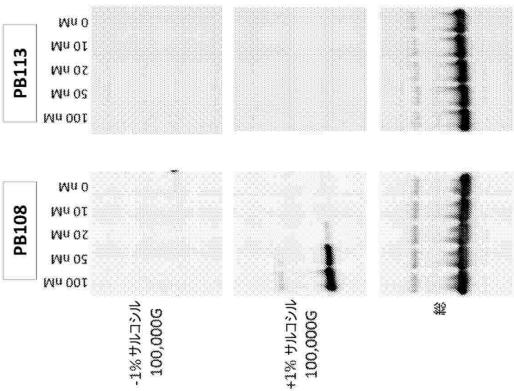


Fig. 10C

Fig. 10D

【図 1 1 A】



【図 1 1 B】

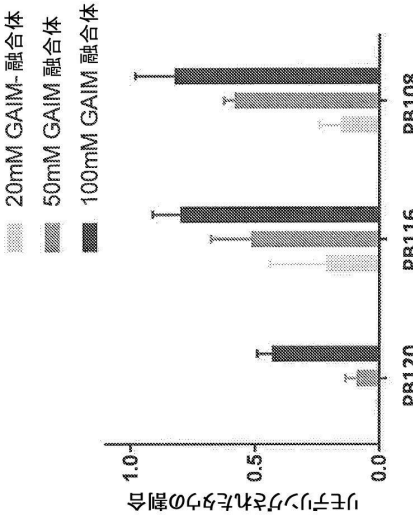


Fig. 11A

Fig. 11B

10

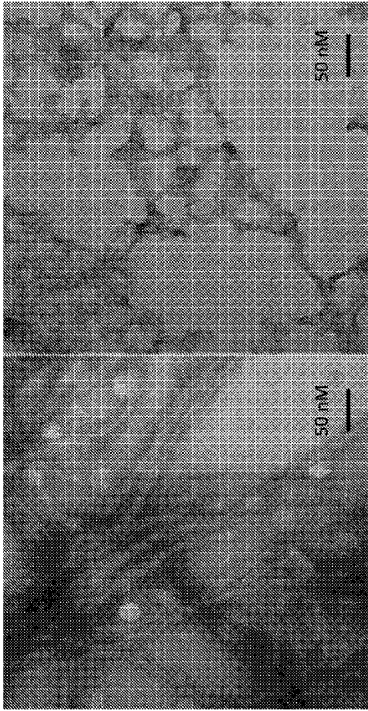
20

30

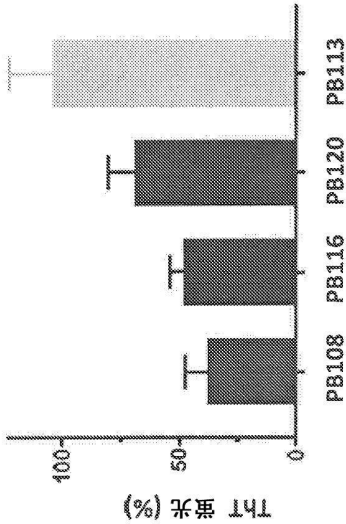
40

50

【図 1 1 C】



【図 1 2 B】



【図 1 2 A】

Fig. 11C

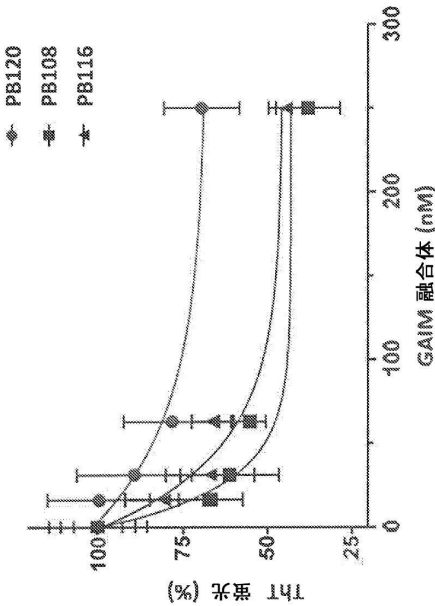


Fig. 12A

10

20

【図 1 2 C】

Fig. 12B

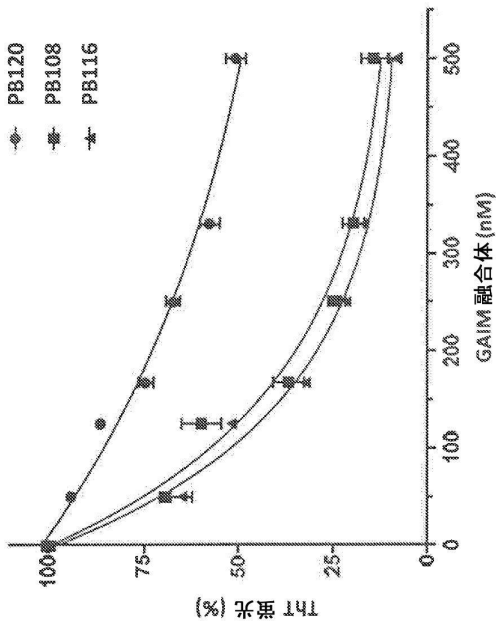


Fig. 12C

30

40

50

【図 1 2 D】

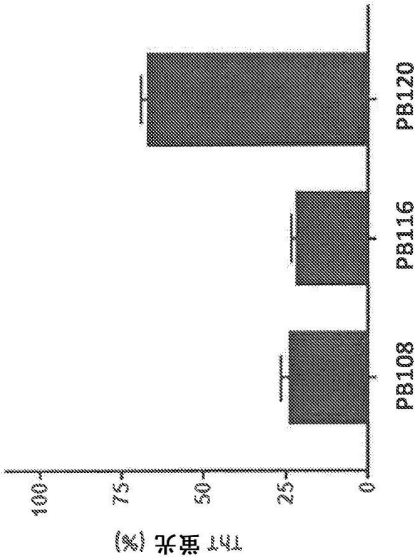


Fig. 12D

【配列表】

0007549536000001.app

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10	
C 1 2 P	21/02 (2006.01)	C 1 2 P	21/02	C
A 6 1 K	38/16 (2006.01)	A 6 1 K	38/16	
A 6 1 P	43/00 (2006.01)	A 6 1 P	43/00	
A 6 1 P	25/14 (2006.01)	A 6 1 P	25/14	
A 6 1 P	25/16 (2006.01)	A 6 1 P	25/16	
A 6 1 P	25/28 (2006.01)	A 6 1 P	25/28	
A 6 1 K	51/08 (2006.01)	A 6 1 K	51/08	2 0 0

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(72)発明者 クリシュナン, ラジャラマン

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 1 7 2 1, アッシュランド, ウィンター ストリート 2 8 1

(72)発明者 アスプ, エバ

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 4 5 9, ニュートン, ボウ ロード 3 1

(72)発明者 プロシツスキー, ミン

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 1 8 9 0, ウィンチェスター, ワイルドウッド ストリート 9 8

(72)発明者 フィッシャー, リチャード

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 1 3 8, ケンブリッジ, フェイヤーウェザー ストリート 1 3 0

審査官 福間 信子

(56)参考文献

国際公開第2013/082114 (WO, A1)

国際公開第2014/055515 (WO, A1)

国際公開第2014/193935 (WO, A1)

国際公開第2016/090022 (WO, A1)

特表2015-505823 (JP, A)

J.Mol.Biol., 2014年, Vol. 426, pp. 2500-2519

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

C 1 2 N

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)

U n i P r o t / G e n e S e q