

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2019-534858

(P2019-534858A)

(43) 公表日 令和1年12月5日 (2019. 12. 5)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C07K 7/00 (2006.01)	C O 7 K 7/00 Z N A	4 B O 6 5
C12N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	4 C O 8 4
C12N 5/07 (2010.01)	C 1 2 N 5/07	4 H O 4 5
C12N 5/09 (2010.01)	C 1 2 N 5/09	
A61P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 1 1	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 131 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2019-513444 (P2019-513444)
 (86) (22) 出願日 平成29年9月8日 (2017. 9. 8)
 (85) 翻訳文提出日 令和1年5月8日 (2019. 5. 8)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2017/050841
 (87) 国際公開番号 W02018/049275
 (87) 国際公開日 平成30年3月15日 (2018. 3. 15)
 (31) 優先権主張番号 62/385, 848
 (32) 優先日 平成28年9月9日 (2016. 9. 9)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 62/419, 331
 (32) 優先日 平成28年11月8日 (2016. 11. 8)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 米国 (US)

(71) 出願人 509012625
 ジェネンテック, インコーポレイテッド
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 サウス
 サンフランシスコ ディーエヌエー
 ウェイ 1
 (74) 代理人 110002077
 園田・小林特許業務法人
 (72) 発明者 ナイル, アーロン ヒュー
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 940
 80-4990, サウス サン フラン
 シスコ, ディーエヌエー ウェイ 1,
 シー/オー ジェネンテック, インコ
 ーポレイテッド

最終頁に続く

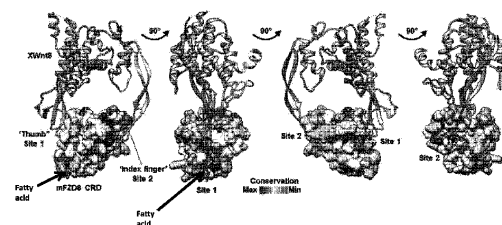
(54) 【発明の名称】 F R I Z Z L E D の選択的ペプチド阻害剤

(57) 【要約】

Frizzled 7 (FZD7) 受容体のシステイン
 リッチドメイン (CRD) と結合する天然に存在しない
 ペプチドを含むリガンドが提供される。さらに、かかる
 リガンドを使用する治療方法、ならびにかかるリガンド
 を含む組成物が提供される。

【選択図】 図 1

FIG. 1



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

F r i z z l e d 7 (F Z D 7) 受容体のシステインリッチドメイン (C R D) に結合する天然に存在しないペプチドを含む、リガンド。

【請求項 2】

前記ペプチドが、前記 F Z D 7 の C R D と特異的に結合する、請求項 1 に記載のリガンド。

【請求項 3】

前記ペプチドが、F Z D 3、F Z D 4、F Z D 5、F Z D 6、F Z D 8、F Z D 9、または F Z D 10 からなる群から選択される F Z D 受容体の C R D に結合しない、請求項 1 または 2 に記載のリガンド。

10

【請求項 4】

前記ペプチドが、F Z D 1、F Z D 2、F Z D 3、F Z D 4、F Z D 5、F Z D 6、F Z D 8、F Z D 9、または F Z D 10 からなる群から選択される F Z D 受容体の C R D に結合しない、請求項 1 または 2 に記載のリガンド。

【請求項 5】

前記ペプチドが、F Z D 1 及び F Z D 2 と更に結合する、請求項 1 ～ 3 のいずれかに記載のリガンド。

【請求項 6】

前記ペプチドが、直鎖状である、先行請求項のいずれか 1 項に記載のリガンド。

20

【請求項 7】

前記ペプチドが、環状である、先行請求項のいずれか 1 項に記載のリガンド。

【請求項 8】

前記ペプチドが、8 ～ 16 アミノ酸長である、先行請求項のいずれか 1 項に記載のリガンド。

【請求項 9】

前記ペプチドが、11 ～ 14 アミノ酸長である、請求項 8 に記載のリガンド。

【請求項 10】

前記 F Z D 7 が、h F Z D 7 である、先行請求項のいずれか 1 項に記載のリガンド。

【請求項 11】

前記ペプチドが、L e u 8 1、H i s 8 4、G l n 8 5、T y r 8 7、P r o 8 8、P h e 1 3 8、及び P h e 1 4 0 からなる群から選択される少なくとも 3 つのアミノ酸を含む h F Z D 7 C R D の結合領域と特異的に結合する、請求項 10 に記載のリガンド。

30

【請求項 12】

前記ペプチドが、以下に記載されるアミノ酸配列を含み、

X₁ X₂ X₃ D D L X₄ X₅ W C H V M Y (配列番号 100)

式中、X₁ ～ X₃ の各々が、アミノ酸がないか、任意のアミノ酸であるか、または非天然のアミノ酸であり、X₄ ～ X₅ の各々が、任意のアミノ酸または非天然のアミノ酸である、先行請求項のいずれか 1 項に記載のリガンド。

【請求項 13】

X₁ が、L であり、X₂ が、P であり、X₃ が、S であり、X₄ が、E であり、X₅ が、F である、請求項 12 に記載のリガンド。

40

【請求項 14】

前記ペプチドが、L P S D D L E F W C H V M Y (配列番号 13) に記載されるアミノ酸配列を含む、請求項 13 に記載のリガンド。

【請求項 15】

X₁ が、アミノ酸がなく、X₂ が、アミノ酸がなく、X₃ が、S であり、X₄ が、E であり、X₅ が、F である、請求項 12 に記載のリガンド。

【請求項 16】

前記ペプチドが、S D D L E F W C H V M Y (配列番号 99) に記載されるアミノ酸配

50

列を含む、請求項 15 に記載のリガンド。

【請求項 17】

前記ペプチドの N 末端アミンが、アセチル化されているか、前記ペプチドの C 末端カルボキシル基が、アミド化されているか、または前記ペプチドの N 末端アミンが、アセチル化され、かつ前記ペプチドの C 末端カルボキシル基が、アミド化されている、先行請求項のいずれか 1 項に記載のリガンド。

【請求項 18】

前記ペプチドが、前記 F Z D 7 受容体の前記 C R D への W n t の結合を強化する、先行請求項のいずれか 1 項に記載のリガンド。

【請求項 19】

前記 F Z D 7 受容体が、h F Z D 7 受容体である、請求項 18 に記載のリガンド。

【請求項 20】

前記ペプチドが、以下に記載されるアミノ酸配列を含み、

S D D L E F W C H V X Y (配列番号 114)

式中、X が、任意のアミノ酸または非天然のアミノ酸である、請求項 1～11 のいずれか 1 項に記載のリガンド。

【請求項 21】

前記非天然のアミノ酸が、2-アミノ-3-デシルオキシプロピオン酸、イプシロンアミノ基において結合したオクタン酸を含むリジンの誘導体、2-アミノデカン酸、イプシロンアミノ基において結合したデカン酸を含むリジンの誘導体、及び 6-ヒドロキシー L-ノルロイシンからなる群から選択される、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 22】

前記ペプチドが、以下に記載されるアミノ酸配列を含み、

S D D X E F W C H V M Y (配列番号 115)

式中、X が、任意のアミノ酸または非天然のアミノ酸であり、前記非天然のアミノ酸が、L-ホモロイシン、L-ホモフェニルアラニン、及びイプシロンアミノ基において結合したオクタン酸を含むリジンの誘導体からなる群から選択される、先行請求項のいずれか 1 項に記載のリガンド。

【請求項 23】

前記ペプチドが、配列番号 1～31 及び 39～99 のいずれか 1 つに記載されるアミノ酸配列を含む、請求項 1～6 及び 8～11 のいずれか 1 項に記載のリガンド。

【請求項 24】

前記ペプチドが、配列番号 32～38 のいずれか 1 つに記載されるアミノ酸配列を含む、請求項 1～5 及び 7～11 のいずれか 1 項に記載のリガンド。

【請求項 25】

前記ペプチドが、120 nM 以下の IC_{50} で W n t シグナル伝達を阻害する、先行請求項のいずれか 1 項に記載のリガンド。

【請求項 26】

前記ペプチドが、90 nM 以下の EC_{50} 値を有する、先行請求項のいずれか 1 項に記載のリガンド。

【請求項 27】

前記ペプチドが、脂質に複合されている、先行請求項のいずれか 1 項に記載のリガンド。

【請求項 28】

前記脂質が、長鎖脂肪酸 (L C F A) である、請求項 27 に記載のリガンド。

【請求項 29】

前記脂質が、短鎖脂肪酸 (S C F A) である、請求項 27 に記載のリガンド。

【請求項 30】

前記脂肪酸が、芳香族テールを含む、請求項 28 または 29 に記載のリガンド。

【請求項 31】

10

20

30

40

50

前記リガンド中の前記ペプチドが、二量体化されている、請求項 1～30 のいずれか 1 項に記載のリガンド。

【請求項 32】

前記ペプチドが、ジスルフィド結合によって二量体化されている、請求項 31 に記載のリガンド。

【請求項 33】

前記ペプチドが、化学リンカーによって二量体化されている、請求項 31 に記載のリガンド。

【請求項 34】

先行請求項のいずれか 1 項に記載のリガンドと、薬学的に許容される担体とを含む、組成物。

10

【請求項 35】

細胞中の Wnt シグナル伝達の阻害方法であって、前記細胞を、請求項 1～32 のいずれか 1 項に記載のリガンドと接触させることを含む、前記方法。

【請求項 36】

幹細胞増殖の阻害方法であって、幹細胞を、請求項 1～33 のいずれか 1 項に記載のリガンドまたは請求項 34 に記載の組成物と接触させることを含む、前記方法。

【請求項 37】

前記幹細胞が、腸幹細胞である、請求項 36 に記載の方法。

【請求項 38】

20

前記幹細胞が、がん幹細胞である、請求項 36 に記載の方法。

【請求項 39】

前記がん幹細胞が、結腸癌幹細胞、膵臓癌幹細胞、非小細胞肺癌幹細胞、RNF43 中に突然変異を含むがん幹細胞、USP6 過剰発現を特徴とするがん幹細胞、または R-スポンジン（RSPO）ファミリーメンバーを伴う遺伝子融合を特徴とするがん幹細胞である、請求項 38 に記載の方法。

【請求項 40】

がん細胞の殺滅方法であって、前記がん細胞を、請求項 1～33 のいずれか 1 項に記載のリガンドまたは請求項 34 に記載の組成物と接触させることを含む、前記方法。

【請求項 41】

30

前記がん細胞が、結腸癌細胞、膵臓癌細胞、非小細胞肺癌細胞、RNF43 中に突然変異を含むがん細胞、USP6 過剰発現を特徴とするがん細胞、または R-スポンジン（RSPO）ファミリーメンバーを伴う遺伝子融合を特徴とするがん細胞である、請求項 40 に記載の方法。

【請求項 42】

対象におけるがんの治療方法であって、有効量の、請求項 1～33 のいずれか 1 項に記載のリガンドまたは請求項 34 に記載の組成物を、前記対象に投与することを含む、前記方法。

【請求項 43】

前記がんが、結腸癌、膵臓癌、非小細胞肺癌（NSCLC）、RNF43 中の突然変異を特徴とするがん、USP6 過剰発現を特徴とするがん、または R-スポンジン（RSPO）ファミリーメンバーを伴う遺伝子融合を特徴とするがんである、請求項 42 に記載の方法。

40

【請求項 44】

がんを治療するための薬物の製造における、請求項 1～33 のいずれか 1 項に記載のリガンドまたは請求項 34 に記載の組成物の使用。

【請求項 45】

前記がんが、結腸癌、膵臓癌、非小細胞肺癌（NSCLC）、RNF43 中の突然変異を特徴とするがん、USP6 過剰発現を特徴とするがん、または R-スポンジン（RSPO）ファミリーメンバーを伴う遺伝子融合を特徴とするがんである、請求項 44 に記載の

50

使用。

【請求項 46】

対象におけるがんの治療に使用するための、請求項 1～33 のいずれか 1 項に記載のリガンドまたは請求項 34 に記載の組成物を含む、組成物。

【請求項 47】

前記がんが、結腸癌、膵臓癌、非小細胞肺癌（NSCLC）、RNF43 中の突然変異を特徴とするがん、USP6 過剰発現を特徴とするがん、または R-スポンジン（RSPO）ファミリーメンバーを伴う遺伝子融合を特徴とするがんである、請求項 46 に記載の使用するための組成物。

【請求項 48】

がんの治療用キットであって、

（a）請求項 1～3 のいずれか 1 項に記載のリガンドまたは請求項 34 に記載の組成物と、

（b）前記リガンドを、がんを有する対象に投与するための説明書と、を含む、前記キット。

【請求項 49】

前記がんが、結腸癌、膵臓癌、非小細胞肺癌（NSCLC）、RNF43 中の突然変異を特徴とするがん、USP6 過剰発現を特徴とするがん、または R-スポンジン（RSPO）ファミリーメンバーを伴う遺伝子融合を特徴とするがんである、請求項 48 に記載のキット。

【請求項 50】

LPSDDLFWSHVMY（配列番号 113）に記載される天然に存在しないペプチドを含む、リガンド。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2016 年 9 月 9 日に提出された米国仮特許出願第 62/385,848 号及び 2016 年 11 月 8 日に提出された米国仮特許出願第 62/419,331 号の優先権の利益を主張するものであり、それらの内容の全体が、参照により本明細書に組み込まれる。

【0002】

ASCII テキストファイルでの配列表の提出

ASCII テキストファイルでの次の提出物の内容は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる：コンピュータ可読形態（CRF）の配列表（ファイル名：146392036940SEQLIST.txt、記録日：2017 年 9 月 6 日、サイズ：50KB）。

【背景技術】

【0003】

Wnt シグナル伝達経路の、発がんとの関連付けは、ある特定のマウス乳腺腫瘍における初期の観察及び実験の結果として始まった。Wnt-1 プロト-がん原遺伝子（Int-1）は、ウイルス DNA 配列の挿入に起因してマウス乳腺腫瘍ウイルス（MMTV）によって誘導された乳腺腫瘍から当初に特定された。Nusse et al., Cell 1982; 31: 99-109。かかるウイルス組み込みの結果は、腫瘍の形成をもたらす Int-1 の非制御発現であった。Vanooyen, A. et al., Cell 1984; 39: 233-240、Nusse, R. et al., Nature 1984; 307: 131-136、Tsukamoto et al., Cell 1988; 55: 619-625。後の配列分析は、Int-1 が、発達に関係があるとされた無翅（Wg）ショウジョウバエ遺伝子の哺乳動物ホモログであったことを示し、次いでこれらの用語を組み合わせて「Wnt」を作成し、このタンパク質ファミリーを特定した

10

20

30

40

50

。

【0004】

分泌リガンドのヒトWnt遺伝子ファミリーは、ここで少なくとも19メンバーまで増加した（例えば、Wnt-1（参照配列NM. sub. --005430）、Wnt-2（参照配列NM. sub. --003391）、Wnt-2B（Wnt-13）（参照配列NM. sub. --004185）、Wnt-3（参照配列NM. sub. --030753）、Wnt3a（参照配列NM. sub. --033131）、Wnt-4（参照配列NM. sub. --030761）、Wnt-5A（参照配列NM. sub. --003392）、Wnt-5B（参照配列NM. sub. --032642）、Wnt-6（参照配列NM. sub. --006522）、Wnt-7A（参照配列NM. sub. --004625）、Wnt-7B（参照配列NM. sub. --058238）、Wnt-8A（参照配列NM. sub. --058244）、Wnt-8B（参照配列NM. sub. --003393）、Wnt-9A（Wnt-14）（参照配列NM. sub. --003395）、Wnt-9B（Wnt-15）（参照配列NM. sub. --003396）、Wnt-10A（参照配列NM. sub. --025216）、Wnt-10B（参照配列NM. sub. --003394）、Wnt-11（参照配列NM. sub. --004626）、Wnt-16（参照配列NM. sub. --016087））。各メンバーは、異なる程度の配列同一性を有するが、全てが、高度に保存された間隔を示す23～24個の保存システイン残基を含有する。McMahon, A. P. et al., Trends Genet. 1992; 8: 236-242、Miller, J. R. Genome Biol. 2002; 3(1): 3001. 1-3001. 15。Wntタンパク質は、小さい（すなわち、39～46 kDの）アシル化された分泌糖タンパク質であり、胚形成及び成熟組織の両方において重要な役割を果たす。胚発生中、Wntタンパク質の発現は、細胞増殖の制御及び幹細胞運命の決定によるパターンニングにおいて重要である。Wnt分子はまた、パルミトイル化され、したがってそれ以外でアミノ酸配列単独の分析によって予測されるよりも疎水性が高い。Willeert, K. et al., Nature 2003; 423: 448-52。パルミトイル化の1つまたは複数の部位はまた、機能に必須であると考えられている。

【0005】

Wntタンパク質は、Frizzled（FRZ）ファミリー7回膜貫通型受容体を活性化するリガンドとして作用する。Ingham, P. W. Trends Genet. 1996; 12: 382-384、Yang-Snyder, J. et al., Curr. Biol. 1996; 6: 1302-1306、Bhanot, P. et al., Nature 1996; 382: 225-230。FRZファミリーの既知の10メンバー（例えば、FRZ1～FRZ10）が存在し、各々がシステインリッチドメイン（CRD）の存在を特徴とする。Huang et al., Genome Biol. 2004; 5: 234. 1-234. 8。様々なWnt-Frizzled相互作用の間には相当の混乱があるが、Wnt-FRZ結合はまた、活性シグナル複合体を形成するために、LDL受容体関連タンパク質（LRP5またはLRP6）、ならびに膜及び細胞質タンパク質Dishevelled（Dsh）を組み込まなければならない。

【0006】

FrizzledへのWntの結合は、標準のWntシグナル伝達経路（それによりβ-カテニンの安定化及び増加した転写活性をもたらす）[Peifer, M. et al., Development 1994; 120: 369-380、Papkoff, J. et al., Mol. Cell Biol. 1996; 16: 2128-2134]または例えばWnt/平面内細胞極性（Wnt/PCP）もしくはWnt-カルシウム（Wnt/Ca. sup. 2+）経路による非標準シグナル伝達のいずれかを介してシグナル伝達を活性化することができる。Veeman, M. T. et al., Dev. Cell 2003; 5: 367-377。

【0007】

10

20

30

40

50

F R Z 受容体の 1 つである F Z D 7 は、多様なヒトがんにおいて上方調節され、下流シグナル伝達物質に対する突然変異を有するがん細胞においても W n t シグナル伝達活性を調節することができる。したがって、がんなどの様々な治療用途のための F Z D 7 の選択的阻害剤を開発する必要性がある。本発明は、この及び他の必要性を満たす。

【発明の概要】

【0008】

ある特定の実施形態では、F r i z z l e d 7 (F Z D 7) 受容体のシステインリッチドメイン (C R D) に結合する天然に存在しないペプチドを含むリガンドが提供される。上記の実施形態のうちのいずれかによる (または適用される) ある特定の実施形態では、天然に存在しないペプチドは、F Z D 7 の C R D と特異的に結合する。上記の実施形態のうちのいずれかによる (または適用される) ある特定の実施形態では、天然に存在しないペプチドは、F Z D 3、F Z D 4、F Z D 5、F Z D 6、F Z D 8、F Z D 9、または F Z D 10 からなる群から選択される F Z D 受容体の C R D に結合しない。上記の実施形態のうちのいずれかによる (または適用される) ある特定の実施形態では、天然に存在しないペプチドは、F Z D 1 及び F Z D 2 と更に結合する。上記の実施形態のうちのいずれかによる (または適用される) ある特定の実施形態では、天然に存在しないペプチドは、F Z D 1、F Z D 2、F Z D 3、F Z D 4、F Z D 5、F Z D 6、F Z D 8、F Z D 9、または F Z D 10 からなる群から選択される F Z D 受容体の C R D に結合しない。

【0009】

上記の実施形態のうちのいずれかによる (または適用される) ある特定の実施形態では、天然に存在しないペプチドは、直鎖状である。上記の実施形態のうちのいずれかによる (または適用される) ある特定の実施形態では、天然に存在しないペプチドは、環状である。上記の実施形態のうちのいずれかによる (または適用される) ある特定の実施形態では、天然に存在しないペプチドは、8 ~ 16 アミノ酸長である。上記の実施形態のうちのいずれかによる (または適用される) ある特定の実施形態では、天然に存在しないペプチドは、11 ~ 14 アミノ酸長である。

【0010】

上記の実施形態のうちのいずれかによる (または適用される) ある特定の実施形態では、F Z D 7 は、h F Z D 7 である。上記の実施形態のうちのいずれかによる (または適用される) ある特定の実施形態では、L e u 8 1、H i s 8 4、G l n 8 5、T y r 8 7、P r o 8 8、P h e 1 3 8、及び P h e 1 4 0 からなる群から選択される少なくとも 3 つのアミノ酸を含む h F Z D 7 C R D の結合領域と特異的に結合する。

【0011】

上記の実施形態のうちのいずれかによる (または適用される) ある特定の実施形態では、天然に存在しないペプチドは、以下に記載されるアミノ酸配列を含み、

$X_1 X_2 X_3 D D L X_4 X_5 W C H V M Y$ (配列番号 100)

式中、 $X_1 \sim X_3$ の各々が、アミノ酸がないか、任意のアミノ酸であるか、または非天然のアミノ酸であり、 $X_4 \sim X_5$ の各々が、任意のアミノ酸または非天然のアミノ酸である。上記の実施形態のうちのいずれかによる (または適用される) ある特定の実施形態では、 X_1 は、L であり、 X_2 は、P であり、 X_3 は、S であり、 X_4 は、E であり、 X_5 は、F である。上記の実施形態のうちのいずれかによる (または適用される) ある特定の実施形態では、天然に存在しないペプチドは、L P S D D L E F W C H V M Y (配列番号 13) に記載されるアミノ酸配列を含む。上記の実施形態のうちのいずれかによる (または適用される) ある特定の実施形態では、 X_1 は、アミノ酸がなく、 X_2 は、アミノ酸がなく、 X_3 は、S であり、 X_4 は、E であり、 X_5 は、F である。上記の実施形態のうちのいずれかによる (または適用される) ある特定の実施形態では、天然に存在しないペプチドは、S D D L E F W C H V M Y (配列番号 99) に記載されるアミノ酸配列を含む。上記の実施形態のうちのいずれかによる (または適用される) ある特定の実施形態では、天然に存在しないペプチドの N 末端アミンが、アセチル化されているか、天然に存在しないペプチドの C 末端カルボキシル基が、アミド化されているか、またはペプチドの N 末端ア

10

20

30

40

50

ミンが、アセチル化され、かつペプチドのC末端カルボキシル基が、アミド化されている。

【0012】

上記の実施形態のうちのいずれかによる（または適用される）ある特定の実施形態では、天然に存在しないペプチドは、FZD7受容体のCRDへのWntの結合を強化する。上記の実施形態のうちのいずれかによる（または適用される）ある特定の実施形態では、FZD7受容体は、hFZD7受容体である。

【0013】

上記の実施形態のうちのいずれかによる（または適用される）ある特定の実施形態では、天然に存在しないペプチドは、以下に記載されるアミノ酸配列を含み、

SDDLEFWCHVXY（配列番号114）

式中、Xは、任意のアミノ酸または非天然のアミノ酸である。上記の実施形態のうちのいずれかによる（または適用される）ある特定の実施形態では、非天然のアミノ酸は、2-アミノ-3-デシルオキシプロピオン酸、イブシロンアミノ基において結合したオクタン酸を含むリジンの誘導体、2-アミノデカン酸、イブシロンアミノ基において結合したデカン酸を含むリジンの誘導体、及び6-ヒドロキシ-L-ノルロイシンからなる群から選択される。

【0014】

上記の実施形態のうちのいずれかによる（または適用される）ある特定の実施形態では、天然に存在しないペプチドは、以下に記載されるアミノ酸配列を含み、

SDDXEFWCHVMY（配列番号115）

式中、Xは、任意のアミノ酸または非天然のアミノ酸であり、非天然のアミノ酸は、L-ホモロイシン、L-ホモフェニルアラニン、及びイブシロンアミノ基において結合したオクタン酸を含むリジンの誘導体からなる群から選択される。

【0015】

上記の実施形態のうちのいずれかによる（または適用される）ある特定の実施形態では、天然に存在しないペプチドは、配列番号1～31及び39～99のうちのいずれか1つに記載されるアミノ酸配列を含む。上記の実施形態のうちのいずれかによる（または適用される）ある特定の実施形態では、天然に存在しないペプチドは、配列番号32～38のうちのいずれか1つに記載されるアミノ酸配列を含む。

【0016】

上記の実施形態のうちのいずれかによる（または適用される）ある特定の実施形態では、天然に存在しないペプチドは、120nM以下のIC₅₀でWntシグナル伝達を阻害する。上記の実施形態のうちのいずれかによる（または適用される）ある特定の実施形態では、天然に存在しないペプチドは、90nM以下のEC₅₀値を有する。

【0017】

上記の実施形態のうちのいずれかによる（または適用される）ある特定の実施形態では、天然に存在しないペプチドは、脂質に複合される。上記の実施形態のうちのいずれかによる（または適用される）ある特定の実施形態では、脂質は、長鎖脂肪酸（LCFA）である。上記の実施形態のうちのいずれかによる（または適用される）ある特定の実施形態では、脂質は、短鎖脂肪酸（SCFA）である。上記の実施形態のうちのいずれかによる（または適用される）ある特定の実施形態では、脂肪酸は、芳香族テルを含む。

【0018】

上記の実施形態のうちのいずれかによる（または適用される）ある特定の実施形態では、リガンド中の天然に存在しないペプチドは、二量体化される。上記の実施形態のうちのいずれかによる（または適用される）ある特定の実施形態では、天然に存在しないペプチドは、ジスルフィド結合によって二量体化される。上記の実施形態のうちのいずれかによる（または適用される）ある特定の実施形態では、天然に存在しないペプチドは、化学リンカーによって二量体化される。

【0019】

ある特定の実施形態では、上記の実施形態のうちのいずれかによる（または適用される）リガンド及び薬学的に許容される担体を含む組成物が提供される。

【0020】

ある特定の実施形態では、細胞を、上記の実施形態のうちのいずれかによる（または適用される）リガンドまたは組成物と接触させることを含む、細胞中のWntシグナル伝達の阻害方法が提供される。

【0021】

ある特定の実施形態では、幹細胞を、上記の実施形態のうちのいずれかによる（または適用される）リガンドまたは組成物と接触させることを含む、幹細胞増殖の阻害方法が提供される。上記の実施形態のうちのいずれかによる（または適用される）ある特定の実施形態では、幹細胞は、腸幹細胞である。上記の実施形態のうちのいずれかによる（または適用される）ある特定の実施形態では、幹細胞は、がん幹細胞である。上記の実施形態のうちのいずれかによる（または適用される）ある特定の実施形態では、がん幹細胞は、結腸癌幹細胞、膵臓癌幹細胞、非小細胞肺癌幹細胞、RNF43中に突然変異を含むがん幹細胞、USP6過剰発現を特徴とするがん幹細胞、またはR-スポンジン（RSPO）ファミリーメンバーを伴う遺伝子融合を特徴とするがん幹細胞である。

【0022】

ある特定の実施形態では、がん細胞を、上記の実施形態のうちのいずれかによる（または適用される）リガンドまたは組成物と接触させることを含む、がん細胞の殺滅方法が提供される。上記の実施形態のうちのいずれかによる（または適用される）ある特定の実施形態では、がん細胞は、結腸癌細胞、膵臓癌細胞、非小細胞肺癌細胞、RNF43中に突然変異を含むがん細胞、USP6過剰発現を特徴とするがん細胞、またはR-スポンジン（RSPO）ファミリーメンバーを伴う遺伝子融合を特徴とするがん細胞である。

【0023】

ある特定の実施形態では、有効量の、上記の実施形態のうちのいずれかによる（または適用される）リガンドまたは組成物を投与することを含む、対象におけるがんの治療方法が提供される。上記の実施形態のうちのいずれかによる（または適用される）ある特定の実施形態では、がんは、結腸癌、膵臓癌、非小細胞肺癌（NSCLC）、RNF43中の突然変異を特徴とするがん、USP6過剰発現を特徴とするがん、またはR-スポンジン（RSPO）ファミリーメンバーを伴う遺伝子融合を特徴とするがんである。

【0024】

ある特定の実施形態では、がんを治療するための薬物の製造における、上記の実施形態のうちのいずれかによる（または適用される）リガンドまたは組成物の使用が提供される。上記の実施形態のうちのいずれかによる（または適用される）ある特定の実施形態では、がんは、結腸癌、膵臓癌、非小細胞肺癌（NSCLC）、RNF43中の突然変異を特徴とするがん、USP6過剰発現を特徴とするがん、またはR-スポンジン（RSPO）ファミリーメンバーを伴う遺伝子融合を特徴とするがんである。

【0025】

ある特定の実施形態では、対象におけるがんの治療に使用するための、上記の実施形態のうちのいずれかによる（または適用される）リガンドまたは組成物を含む組成物が提供される。上記の実施形態のうちのいずれかによる（または適用される）ある特定の実施形態では、がんは、結腸癌、膵臓癌、非小細胞肺癌（NSCLC）、またはRNF43中の突然変異を特徴とするがん、USP6過剰発現を特徴とするがん、またはR-スポンジン（RSPO）ファミリーメンバーを伴う遺伝子融合を特徴とするがんである。

【0026】

ある特定の実施形態では、（a）上記の実施形態のうちのいずれかによる（または適用される）リガンドまたは組成物、及び（b）がんを有する対象にリガンドを投与するための説明書を含む、がんの治療用キットが提供される。上記の実施形態のうちのいずれかによる（または適用される）ある特定の実施形態では、がんは、結腸癌、膵臓癌、非小細胞肺癌（NSCLC）、RNF43中の突然変異を特徴とするがん、USP6過剰発現を特

10

20

30

40

50

徴とするがん、またはR-スポンジン（R S P O）ファミリーメンバーを伴う遺伝子融合を特徴とするがんである。

【0027】

ある特定の実施形態では、L P S D D L E F W S H V M Y（配列番号113）に記載される天然に存在しないペプチドを含むリガンドが提供される。

【0028】

本明細書に記載される様々な実施形態の特性のうちの1つ、いくつか、または全てが組み合わされて、本発明の他の実施形態を形成することができることを理解されたい。本発明のこれら及び他の態様は、当業者にとって明らかとなるであろう。本発明のこれら及び他の実施形態は、以下の発明を実施するための形態によって更に説明される。

【図面の簡単な説明】

【0029】

【図1】ヒトF Z D C R D間の配列保存をm F Z D 8 C R Dの表面上に表示する、W n t 8とマウスF Z D 8 C R Dとの間の相互作用の構造描写を提供する。

【図2-1】Aは、50 ng/mLの組み換えW n t 3 aで刺激されたH E K 2 9 3 - T B細胞中のβ-カテニンシグナル伝達に対するペプチドF z 7 - 2 1及びF z - 2 1 Sの効果を決定するために行われた実験の結果を示す。Bは、5 ngのp C D N A 3 . 2 - W n t 3 aまたは25 ngのp C D N A 3 . 2 - W n t 3 aでトランスフェクトされたH E K 2 9 3 - T B細胞中のW n t 刺激したβ-カテニンシグナル伝達に対するペプチドF z 7 - 2 1及びF z - 2 1 Sの効果を決定するために行われた実験の結果を示す。

【図2-2】Cは、5 ngのp C D N A 3 . 2 - W n t 1または25 ngのp C D N A 3 . 2 - W n t 1でトランスフェクトされたH E K 2 9 3 - T B細胞中のW n t 刺激したβ-カテニンシグナル伝達に対するペプチドF z 7 - 2 1及びF z - 2 1 Sの効果を決定するために行われた実験の結果を示す。Dは、5 ngのp C D N A 3 . 2 - W n t 1または25 ngのp C D N A 3 . 2 - W n t 3 aでトランスフェクトされたH E K 2 9 3 - T B細胞中のW n t 刺激したβ-カテニンシグナル伝達に対する10位にD-システイン立体異性体を含むF z 7 - 2 1由来ペプチドの効果を決定するために行われた実験の結果を示す。

【図2-3】Eは、6-B I Oで処理したH E K 2 9 3 - T B細胞中の受容体非依存性β-カテニンシグナル伝達に対するペプチドF z 7 - 2 1及びF z - 2 1 Sの効果を決定するために行われた実験の結果を示す。

【図3-1】Aは、5 F A M - F z 7 - 2 1または5 F A M - F z 7 - 2 1 Sの、h F Z D 1 C R D - F cへの結合についてのE C 5 0値を決定するために行われた実験の結果を提供する。Bは、5 F A M - F z 7 - 2 1または5 F A M - F z 7 - 2 1 Sの、m F Z D 2 C R D - F cへの結合についてのE C 5 0値を決定するために行われた実験の結果を提供する。

【図3-2】Cは、5 F A M - F z 7 - 2 1または5 F A M - F z 7 - 2 1 Sの、h F Z D 4 C R D - F cへの結合についてのE C 5 0値を決定するために行われた実験の結果を提供する。Dは、5 F A M - F z 7 - 2 1または5 F A M - F z 7 - 2 1 Sの、h F Z D 5 C R D - F cへの結合についてのE C 5 0値を決定するために行われた実験の結果を提供する。

【図3-3】Eは、5 F A M - F z 7 - 2 1または5 F A M - F z 7 - 2 1 Sの、h F Z D 7 C R D - F cへの結合についてのE C 5 0値を決定するために行われた実験の結果を提供する。Fは、5 F A M - F z 7 - 2 1または5 F A M - F z 7 - 2 1 Sの、m F Z D 7 C R D - F cへの結合についてのE C 5 0値を決定するために行われた実験の結果を提供する。

【図3-4】Gは、5 F A M - F z 7 - 2 1または5 F A M - F z 7 - 2 1 Sの、h F Z D 8 C R D - F cへの結合についてのE C 5 0値を決定するために行われた実験の結果を提供する。Hは、5 F A M - F z 7 - 2 1または5 F A M - F z 7 - 2 1 Sの、m F Z D 9 C R D - F cへの結合についてのE C 5 0値を決定するために行われた実験の結果

10

20

30

40

50

を提供する。

【図 3-5】I は、5 F A M-F z 7-2 1 または 5 F A M-F z 7-2 1 S の、h F Z D 1 0 C R D-F c への結合についての E C 5 0 値を決定するために行われた実験の結果を提供する。

【図 4-1】A は、F S E C による分析の前に、様々な F Z D C R D-F c タンパク質でインキュベートされた 5 F A M-F z 7-2 1 の代表的な蛍光トレースを提供する。B は、F S E C による分析の前に、様々な F Z D C R D-F c タンパク質でインキュベートされた 5 F A M-F z 7-2 1 S の代表的な蛍光トレースを提供する。

【図 4-2】C は、図 4 A 及び 4 B についての蛍光強度の定量（曲線下面積、A U C）を提供する。

10

【図 5-1】A は、F S E C による分析の前に、様々なヒト s F R P タンパク質でインキュベートされた 5 F A M-F z 7-2 1 の代表的な蛍光トレースを提供する。B は、F S E C による分析の前に、様々な s F R P タンパク質でインキュベートされた 5 F A M-F z 7-2 1 S の代表的な蛍光トレースを提供する。

【図 5-2】C は、図 5 A 及び 5 B に対する蛍光強度の定量（曲線下面積、A U C）を提供する。

【図 6-1】A は、精製された組み換え h F Z D C R D のサイズ排除クロマトグラフィープロファイルを提供する。B は、図 6 A からのプールされた h F Z D 7 C R D の S D S-P A G E を示す。

【図 6-2】C は、F z 7-2 1 が h F Z D 7 C R D の多量体化を誘導するかどうかを評価するために行われた実験の結果を提供する。D は、図 6 C のズームイン図（1. 5 m L ~ 2. 0 m L 範囲）を提供する。

20

【図 7】5 F A M-F z 7-2 1 または 5 F A M-F z 7-2 1 S 結合活性を有するヒト F Z D システインリッチドメイン（C R D）間の進化的保存を示す分岐図を提供する。

【図 8-1】A は、アポ h F Z D 7 C R D 二量体の結晶構造のリボン表現を示す。図 B は、アポ h F Z D 7 C R D 二量体界面を架橋する脂質結合空洞の表面表現を示す。

【図 8-2】C は、F z 7-2 1 に結合した h F Z D 7 C R D の結晶構造を示す。D は、F z 7-2 1 に結合した h F Z D 7 C R D の構造の上にマップされた疎水性空洞の表面表現を示す。

【図 8-3】E は、F z 7-2 1 に結合した h F Z D 7 C R D の結晶構造の上面視表面表現を示す。F は、F z 7-2 1 に結合した h F Z D 7 C R D の結晶構造の側面視表面表現を示す。

30

【図 9-1】A は、h F Z D 4 の脂質結合溝の表面表現を示す。B は、m F Z D 8 の脂質結合溝の表面表現を示す。

【図 9-2】C は、F Z D C R D の重畳を示す。

【図 10】A は、リンカー（配列番号 1 3 6）を通して F z 7-2 1 に融合された h F Z D 7 C R D の概略図を提供する。B は、精製された h F Z D 7 C R D-F z 7-2 1 融合構築物のサイズ排除クロマトグラフィープロファイルを示す。

【図 11】A は、F z 7-2 1 二量体における分子内相互作用の図を提供する。B は、個々の相互作用が線によって描写されている、F z 7-2 1 における分子内相互作用の図を提供する。C は、F z 7-2 1 二量体構造上の諧調として表示される、溶媒露出表面の描写を提供する。

40

【図 12】A は、二量体界面での 1 6 ° 角度を強調する、アポ h F Z D 7 C R D の構造のリボン表現を提供する。B は、二量体界面での 9 0 ° 角度を強調する、F z 7-2 1 に結合した h F Z D 7 C R D の構造のリボン表現を提供する。

【図 13】F z 7-2 1 に結合した h F Z D 7 C R D の結晶構造内の選択 F z 7-2 1 / h F Z D 7 C R D 相互作用を強調する。

【図 14】h F Z D 7（配列番号 1 3 7）、h F Z D 2（配列番号 1 3 8）、h F Z D 1（配列番号 1 3 9）、h F Z D 5（配列番号 1 4 0）、m F Z D 8（配列番号 1 4 1）、h F Z D 4（配列番号 1 4 2）、h F Z D 9（配列番号 1 4 3）、h F Z D 1 0（配列番

50

号144)、hFZD6(配列番号145)及びhFZD3(配列番号146)のCRDのCRDのアミノ酸配列のアラインメントを提供する。

【図15】HEK293-TB細胞中のWnt刺激した β -カテニンシグナル伝達に対するdFz7-21、dFz7-21-L6A、dFz7-21-W9A、dFz7-21-M13A、dFz7-21-Y14A、及びdFz7-21 Δ 2の効果を評価するために行われた実験の結果を示す。

【図16-1】Aは、Fz7-21のNOSEY接続性プロットを提供する。Bは、dFz7-21の20最低エネルギーNMR構造の重畳に基づいて、dFz7-21の代表的なNMR溶液構造を示す(アミノ酸側鎖は、線として示される)。

【図16-2】Cは、dFz7-21についての2D NOESYプロットを示す。Dは、Fz7-21Sに対する2D NOESYプロットを示す。

【図16-3】Eは、Fz7-21、Fz7-21S、及びdFz7-21ペプチドの1D NMRスペクトルを示す。

【図17】Aは、代表的なマウス腸オルガノイドの形態に対するDMSOによる処置の効果を示す。Bは、代表的なマウス腸オルガノイドの形態に対するFz7-21Sによる処置の効果を示す。Cは、代表的なマウス腸オルガノイドの形態に対する抗Lrp6遮断抗体による処置の効果を示す。Dは、代表的なマウス腸オルガノイドの形態に対する200 μ Mの二量体化Fz7-21による処置の効果を示す。Eは、代表的なマウス腸オルガノイドの形態に対する100 μ Mの二量体化Fz7-21による処置の効果を示す。Fは、代表的なマウス腸オルガノイドの形態に対する10 μ Mの二量体化Fz7-21による処置の効果を示す。Gは、代表的なマウス腸オルガノイドの形態に対する1 μ Mの二量体化Fz7-21による処置の効果を示す。

【図18】ペプチド処置後のオルガノイド幹細胞(SC)ポテンシャルの定量を提供する。

【図19-1】Aは、マウス腸オルガノイド中のLrg5発現に対するdFz7-21またはFz7-21Sによる処置の効果を評価するために行われた実験の結果を提供する。Bは、マウス腸オルガノイド中のAsc12発現に対するdFz7-21またはFz7-21Sによる処置の効果を評価するために行われた実験の結果を提供する。

【図19-2】Cは、マウス腸オルガノイド中のAxin2発現に対するdFz7-21またはFz7-21Sによる処置の効果を評価するために行われた実験の結果を提供する。

【図20-1】Aは、マウスから採取された腸上皮におけるLrg5発現に対するdFz7-21またはFz7-21Sによる処置の効果を評価するために行われた実験の結果を提供する。Bは、マウスから採取された腸上皮におけるAsc12発現に対するdFz7-21またはFz7-21Sによる処置の効果を評価するために行われた実験の結果を提供する。

【図20-2】Cは、マウスから採取された腸上皮におけるAxin2発現に対するdFz7-21またはFz7-21Sによる処置の効果を評価するために行われた実験の結果を提供する。

【図21-1】Aは、50ng/mLの組み換えWnt3aで刺激されたHEK293-TB細胞中の β -カテニンシグナル伝達に対するペプチドdFz7-21 Δ 2、M13Adpの効果を決定するために行われた実験の結果を示す。Bは、50ng/mLの組み換えWnt3aで刺激されたHEK293-TB細胞中の β -カテニンシグナル伝達に対するペプチドdFz7-21 Δ 2、M13Tbhの効果を決定するために行われた実験の結果を示す。Cは、50ng/mLの組み換えWnt3aで刺激されたHEK293-TB細胞中の β -カテニンシグナル伝達に対するペプチドdFz7-21 Δ 2、M13K(C8)の効果を決定するために行われた実験の結果を示す。Dは、50ng/mLの組み換えWnt3aで刺激されたHEK293-TB細胞中の β -カテニンシグナル伝達に対するペプチドdFz7-21 Δ 2、L6Hofの効果を決定するために行われた実験の結果を示す。

10

20

30

40

50

【図 2 1 - 2】E は、50 ng/mL の組み換え Wnt 3 a で刺激された HEK 2 9 3 - T B 細胞中の β - カテニンシグナル伝達に対するペプチド d F z 7 - 2 1 Δ 2 . M 1 3 C 8 の効果を決定するために行われた実験の結果を示す。F は、50 ng/mL の組み換え Wnt 3 a で刺激された HEK 2 9 3 - T B 細胞中の β - カテニンシグナル伝達に対するペプチド d F z 7 - 2 1 Δ 2 . M 1 3 K (C 1 0) の効果を決定するために行われた実験の結果を示す。G は、50 ng/mL の組み換え Wnt 3 a で刺激された HEK 2 9 3 - T B 細胞中の β - カテニンシグナル伝達に対するペプチド d F z 7 - 2 1 Δ 2 . L 6 H o 1 の効果を決定するために行われた実験の結果を示す。H は、50 ng/mL の組み換え Wnt 3 a で刺激された HEK 2 9 3 - T B 細胞中の β - カテニンシグナル伝達に対するペプチド d F z 7 - 2 1 Δ 2 . L 6 K C (8) の効果を決定するために行われた実験の結果を示す。

10

【図 2 1 - 3】I は、50 ng/mL の組み換え Wnt 3 a で刺激された HEK 2 9 3 - T B 細胞中の β - カテニンシグナル伝達に対するペプチド d F z 7 - 2 1 Δ 2 . M 1 3 K (C 1 2) の効果を決定するために行われた実験の結果を示す。J は、50 ng/mL の組み換え Wnt 3 a で刺激された HEK 2 9 3 - T B 細胞中の β - カテニンシグナル伝達に対するペプチド d F z 7 - 2 1 Δ 2 . M 1 3 K (C 1 4) の効果を決定するために行われた実験の結果を示す。K は、50 ng/mL の組み換え Wnt 3 a で刺激された HEK 2 9 3 - T B 細胞中の β - カテニンシグナル伝達に対するペプチド d F z 7 - 2 1 Δ 2 . M 1 3 K (C 1 6) の効果を決定するために行われた実験の結果を示す。

【図 2 2 A】10 μ M より下のペプチド濃度で F z 7 - 2 1 の存在下、F Z D 1 C R D、F Z D 2 C R D、F Z D 4 C R D、及び F Z D 7 C R D への Wnt 5 a の結合を評価するために行われた実験の結果を示す。

20

【図 2 2 B】10 μ M より下のペプチド濃度で d F z 7 - 2 1 の存在下、F Z D 1 C R D、F Z D 2 C R D、F Z D 4 C R D、及び F Z D 7 C R D への Wnt 5 a の結合を評価するために行われた実験の結果を示す。

【図 2 2 C】10 μ M より下のペプチド濃度で F z 7 - 2 1 S の存在下、F Z D 1 C R D、F Z D 2 C R D、F Z D 4 C R D、及び F Z D 7 C R D への Wnt 5 a の結合を評価するために行われた実験の結果を示す。

【図 2 2 D】10 μ M より下のペプチド濃度で F z 7 - 2 1 の存在下、F Z D 1 C R D、F Z D 2 C R D、F Z D 4 C R D、及び F Z D 7 C R D への Wnt 3 a の結合を評価するために行われた実験の結果を示す。

30

【図 2 2 E】10 μ M より下のペプチド濃度で d F z 7 - 2 1 の存在下、F Z D 1 C R D、F Z D 2 C R D、F Z D 4 C R D、及び F Z D 7 C R D への Wnt 3 a の結合を評価するために行われた実験の結果を示す。

【図 2 2 F】10 μ M より下のペプチド濃度で F z 7 - 2 1 S の存在下、F Z D 1 C R D、F Z D 2 C R D、F Z D 4 C R D、及び F Z D 7 C R D への Wnt 3 a の結合を評価するために行われた実験の結果を示す。

【図 2 3 - 1】A は、10 μ M より下のペプチド濃度で d F z 7 - 2 1、F z 7 - 2 1 S、または d F z 7 - 2 1 Δ 2 の存在下、F Z D 7 C R D への Wnt 5 a の結合を評価するために行われた実験の結果を示す。B は、10 μ M より下のペプチド濃度で F z 7 - 2 1 S、d F z 7 - 2 1、または M 1 3 A d p の存在下、F Z D 7 C R D への Wnt 5 a の結合を評価するために行われた実験の結果を示す。C は、10 μ M より下のペプチド濃度で F z 7 - 2 1 S、d F z 7 - 2 1、または M 1 3 T b h の存在下、F Z D 7 C R D への Wnt 5 a の結合を評価するために行われた実験の結果を示す。D は、約 0 . 5 μ M より下のペプチド濃度で F z 7 - 2 1 S、d F z 7 - 2 1、または M 1 3 K (C 8) の存在下、F Z D 7 C R D への Wnt 5 a の結合を評価するために行われた実験の結果を示す。

40

【図 2 3 - 2】E は、10 μ M より下のペプチド濃度で F z 7 - 2 1 S、d F z 7 - 2 1、または L 6 H o f の存在下、F Z D 7 C R D への Wnt 5 a の結合を評価するために行われた実験の結果を示す。F は、10 μ M より下のペプチド濃度で F z 7 - 2 1 S、d

50

Fz7-21、またはM13C8の存在下、FZD7 CRDへのWnt5aの結合を評価するために行われた実験の結果を示す。Gは、10 μ Mより下のペプチド濃度でFz7-21S、dFz7-21、またはM13K(C10)の存在下、FZD7 CRDへのWnt5aの結合を評価するために行われた実験の結果を示す。Hは、10 μ Mより下のペプチド濃度でFz7-21S、dFz7-21、またはL6H01の存在下、FZD7 CRDへのWnt5aの結合を評価するために行われた実験の結果を示す。

【図23-3】Iは、10 μ Mより下のペプチド濃度でFz7-21S、dFz7-21、またはL6K(C8)の存在下、FZD7 CRDへのWnt5aの結合を評価するために行われた実験の結果を示す。Jは、10 μ Mより下のペプチド濃度でFz7-21S、dFz7-21、M13K(C8)、M13K(C10)、M13K(C12)、M13K(C14)、またはM13K(C16)の存在下、FZD7 CRDへのWnt5aの結合を評価するために行われた実験の結果を示す。

【図23-4】Kは、10 μ Mより下のペプチド濃度でFz7-21S、dFz7-21、dFz7-21 Δ 2、M13Adp、dFz7-21 Δ 2、M13Tbh、dFz7-21 Δ 2、M13K(C8)、dFz7-21 Δ 2、L6H0f、dFz7-21 Δ 2、M13C8、dFz7-21 Δ 2、M13K(C10)、dFz7-21 Δ 2(Q519)、dFz7-21 Δ 2、L6H01、またはdFz7-21 Δ 2、L6KC(8)の存在下、FZD4 CRDへのWnt5aの結合を評価するために行われた実験の結果を示す。Lは、10 μ Mより下のペプチド濃度でFz7-21S、dFz7-21、M13K(C8)、M13K(C10)、M13K(C12)、M13K(C14)、またはM13K(C16)の存在下、FZD4 CRDへのWnt5aの結合を評価するために行われた実験の結果を示す。

【図24】Aは、UV吸収によって分析された分子量(MW)標準が、溶出量(ve)/空隙量(vo)の関数としてプロットされたことを示す。値は、3回の独立した実験の平均土標準誤差を表す。Bは、5FAM-Fz7-21(灰色の丸)に結合したFZD CRD-Fcタンパク質の観察された分子量を、予測されたFZD CRD-Fc四量体分子量(黒色の正方形)と比較して示す。Cは、使用された異なるFZD CRD-Fcタンパク質(約2 μ g)の天然のPAGE(4~16%)を示す。

【図25-1】Aは、FZD7内のCRD配置を示す全長FZD7の概略図と共に、アポhFZD7 CRD結晶構造のリボン表現を示す。Bは、Fz7-21に結合したhFZD7 CRDの構造のリボン表現を示す。

【図25-2】Cは、アポhFZD7 CRDにおける疎水性空洞のズームイン側面図を提供する。Dは、Cの上面図を提供する。

【図25-3】Eは、Fz7-21に結合したhFZD7 CRDのズームイン側面図を提供する。Fは、Eの上面図を示す。

【図26】dFz7-21の、20の最低エネルギーNMR構造の重畳を示す。

【図27】Aは、hFZD7 CRD-GSの分子量を決定するために使用される関連分子量標準物を示す。Bは、還元条件下の図10Bにおける融合タンパク質のSDS-PAGEを示す。Cは、図10Bにおける融合タンパク質から得られた結晶の明視野像を示す。

【図28-1】Aは、それぞれのC24脂肪酸に結合したhFZD7 CRDプロモーターの重畳を提供する。Bは、C24脂肪酸に近位の残基を表示するリボン表現なしに、Aからの構造を示す。C24脂肪酸炭素は、カルボン酸頭部基(C1)から ω 炭素(C24)まで順次番号が付けられている。水、結晶化補因子、及びグリカンは、明確にするために隠されている。

【図28-2】Cは、アポhFZD7 CRD(リボン表現)の、C24脂肪酸(球棒表現)に結合したhFZD7 CRD(リボン表現)との重畳を提供する。

【図29-1】Aは、C24脂肪酸(球棒表現)と複合したhFZD7 CRD二量体(リボン表現)の結晶構造を提供する。Bは、C24脂肪酸(黒色、球棒表現)と複合したhFZD7 CRD(リボン表現)の上にマップされた疎水性空洞の表面表現を提供する

10

20

30

40

50

。

【図 29-2】Cは、疎水性空洞に近位の残基を表示する、Bのズームイン図を提供する（灰色：鎖A、白色：鎖B、C24脂肪酸：黒色、球棒表現）。C24脂肪酸炭素は、カルボン酸頭部基（C1）から ω 炭素（C24）まで順次番号が付けられている。脂質結合空洞の塩基は、C9～C13の間である。Dは、C24脂肪酸（黒色、空間充填モデル）に結合したアポ-hFZD7 CRD（PDB ID 5T44、薄灰色、棒表現）及びhFZD7 CRD（灰色、棒表現）の脂質結合空洞の重畳を示す。水素結合相互作用が表示されている（黒色、破線）。

【図 30】Aは、20（S）-ヒドロキシコレステロール（灰色、棒表現）に結合した平滑化CRD（灰色、リボン表現、PDB ID #5KZV）の、C24脂肪酸（白色、棒表現、108原子対にわたる平均平方二乗誤差=8.3 Å）に結合したhFZD7 CRD（白色、リボン表現）との重畳を示す。ズームイン挿入図は、リガンドヒドロキシル基の近位にある残基を強調し、水素結合相互作用が表示されている（黒色、破線）。Bは、20（S）-ヒドロキシコレステロール（灰色、棒表現）に結合した平滑化CRD（灰色、リボン表現、PDB ID #5KZV）の、C16:1脂肪酸（濃灰色、棒表現、109原子対にわたる平均平方二乗誤差は、4.6 Åである）に結合したhFZD5 CRD（褐色、鎖A、リボン表現）との重畳を示す。ズームイン挿入図は、リガンドヒドロキシル基の近位にある残基を強調し、水素結合相互作用が表示されている（黒色、破線）。

【図 31】C16:1 n-7脂肪酸（黒色または濃灰色、球棒表現）に結合したヒト（h）FZD5 CRD（鎖A：薄灰色、鎖B：中灰色、リボン表現）の構造を示す。鎖A内の各C16:1 n-7脂肪酸は、対称合致平均化に起因して50%の占有率を有する。

【図 32-1】Aは、C16:1 n-7脂肪酸（濃灰色または黒色、球棒表現）と複合したhFZD5 CRDホモ二量体（鎖A、リボン表現）の結晶構造を示す。Bは、各々が50%の占有率を有する2つのC16:1 n-7脂肪酸（黒色または灰色、球棒表現）と複合したhFZD5 CRD（リボン表現）の上にマップされたhFZD5 CRD鎖Aホモ二量体疎水性空洞（灰色）の表面表現を提供する。

【図 32-2】Cは、リボン表現なしに、Bのズームイン図を示す。疎水性空洞の近位にある残基が強調されている（濃灰色、棒表現）。C16:1 n-7脂肪酸炭素は、カルボン酸頭部基（C1）から ω 炭素（C16）まで順次番号が付けられている。脂質結合空洞の塩基は、C7～C10の間である。

【図 33-1】Aは、各々が50%の占有率を有するn-オクチル- β -D-グルコシド（BOG）の2つの分子（灰色または黒色、球棒表現）と複合したヒト（h）FZD5 CRD二量体の結晶構造を提供する。Bは、n-オクチル- β -D-グルコシド（球棒表現）に結合したhFZD5 CRD鎖A（白色、リボン表現）の構造の上にマップされたhFZD5 CRD鎖Aの疎水性空洞の表面表現を示し、約5 Åのn-オクチル- β -D-グルコシド（表現）内の残基を強調している。

【図 33-2】Cは、炭素骨格を表示せずに、Bのズームイン図を示す。hFZD5 CRDとn-オクチル- β -D-グルコシドのグリコシドとの間の水素結合相互作用が強調されている（破線、黒色）。Dは、n-オクチル- β -D-グルコシドの分子構造を示し、分子成分を強調している。

【図 34-1】Aは、C16:1 n-7脂肪酸（リボン及び棒表現）またはn-オクチル- β -D-グルコシド（リボン及び棒表現）が結合したhFZD5 CRD（119残基にわたる平均平方二乗誤差は、0.134 Åである）の重畳を示す。鎖A内の各C16:1 n-7脂肪酸及びn-オクチル- β -D-グルコシドは、対称合致平均化に起因して50%の占有率を有する。Bは、AからのhFZD5 CRD鎖Bのリボン表現を示し、C16:1 n-7脂肪酸の近くの選択残基を強調している。

【図 34-2】Cは、AからのhFZD5 CRD鎖Aを示し、C16:1 n-7脂肪酸またはn-オクチル- β -D-グルコシドのいずれかと接触する残基を強調している（VDWオーバーラップ>-0.4 Å）。FZD5 CRDとn-オクチル- β -D-グルコシドとの間の水素結合相互作用を描写するズームイン図が示されている（黒色破線）。

10

20

30

40

50

【図 3 5 - 1】A は、ホモ二量体疎水性空洞の表面表現と共に、m F Z D 8 C R D 二量体 (P D B I D # 1 I J Y、リボン表現) の結晶構造を示す。実施例及び D a n n, C . E. e t a l. “ I n s i g h t s i n t o W n t b i n d i n g a n d s i g n a l i n g f r o m t h e s t r u c t u r e s o f t w o F r i z z l e d c y s t e i n e - r i c h d o m a i n s . ” N a t u r e 4 1 2, 8 6 - 9 0 (2 0 0 1) からの二量体界面が示される。

【図 3 5 - 2】B は、疎水性空洞の表面表現と共に、鎖 A 及び鎖 B の重畳を示す。C は、B のズームイン図を示し、m F Z D 8 C R D の疎水性空洞に近位の側鎖を強調している。

【図 3 5 - 3】D は、B O G が結合した h F Z D 5 C R D (リボン表現)、C 1 6 : 1 n - 7 脂肪酸が結合した h F Z D 5 C R D (リボン表現)、アポー F Z D 7 C R D (リボン表現)、C 2 4 脂肪酸が結合した h F Z D 7 C R D (リボン表現)、及びアポー m F Z D 8 C R D (リボン表現) の重畳を示す。

【図 3 5 - 4】E は、シス-脂肪酸選択性について、U 形の疎水性空洞を利用する、F Z D 受容体の C R D への W n t 結合のモデルを示す。F Z D 5、7、及び 8 (恐らくは F Z D 1 及び F Z D 2) 受容体 (C R D : 褐色または青色の楕円、7 回膜貫通型ドメイン : 黄色の楕円) は、それらの不活性状態にあり、疎水性空洞が連続する U 形の空洞 (赤色) を形成する二量体構成を形成することができる。W n t 結合の際に、シス- $\Delta 9$ -不飽和脂肪酸は、二量体界面を横断する「よじれ」を利用して脂質結合空洞を占有し、補因子を動員して下流 W n t シグナル伝達を刺激する。

【図 3 6 - 1】A は、h F Z D 7 C R D、h F Z D 5 C R D、及び h F Z D 8 C R D の二量体相互作用界面電位エネルギーの表を示す。B は、F Z D C R D 二量体相補性スコア (S c) の表を示す。C は、h F Z D 7 C R D のループ・ループ相互作用界面についての二量体相補性スコアの視覚化を示す。二量体相補性スコアに従い、相互作用界面の中心は、低い相補性を有し、周辺部のらせんは、高い相補性を有すると仮定される。D は、m F Z D 8 C R D のループ・ループ相互作用界面についての二量体相補性スコアの視覚化を示す。二量体相補性スコアに従い、相互作用界面の中心は、低い相補性を有し、周辺部のらせんは、高い相補性を有する。

【図 3 6 - 2】E は、h F Z D 5 C R D のループ・ループ相互作用界面についての二量体相補性スコアの視覚化を示す。二量体相補性スコアに従い、相互作用界面の中心は、低い相補性を有し、周辺部のらせんは、高い相補性を有する。F は、h F Z D 5 C R D の F Z D 7 様 α らせん二量体相互作用界面についての二量体相補性スコアの視覚化を示す。二量体相補性スコアに従い、相互作用界面の中心は、低い相補性を有し、周辺部のらせんは、高い相補性を有する。図 3 6 G は、h F Z D 7 C R D の F Z D 7 様 α らせん二量体相互作用界面についての二量体相補性スコアの視覚化を示す。二量体相補性スコアに従い、相互作用界面の中心は、低い相補性を有し、周辺部のらせんは、高い相補性を有する。図 3 6 H は、h F Z D 7 C R D の F Z D 7 様 α らせん二量体相互作用界面についての二量体相補性スコアの視覚化を示す。二量体相補性スコアに従い、相互作用界面の中心は、低い相補性を有し、周辺部のらせんは、高い相補性を有する。

【図 3 7 A】ヒト F Z D C R D ファミリーメンバーの C l u s t a l O m e g a 配列アラインメントを示す。プロモーター間の結晶学的 F Z D 7 様二量体接触を形成する残基には、下線が引かれている (V D W オーバーラップ > -0.4 オングストローム)。F Z D ファミリーメンバー間の F Z D 7 様二量体界面の保存は、配列アラインメントの上の「+」によって表示される。保存されたシステインは、青色で強調される。F Z D 7 (配列番号 1 4 7)、F Z D 2 (配列番号 1 4 8)、F Z D 1 (配列番号 1 4 9)、F Z D 5 (配列番号 1 5 0)、F Z D 8 (配列番号 1 5 1)、F Z D 4 (配列番号 1 5 2)、F Z D 9 (配列番号 1 5 3)、F Z D 1 0 (配列番号 1 5 4)、F Z D 6 (配列番号 1 5 5)、及び F Z D 3 (配列番号 1 5 6)。

【図 3 7 B】アポー h F Z D 7 C R D (リボン表現) の構造を、 180° の回転で α らせん F Z D 7 二量体界面を強調するための代用として使用することを示す。挿入図は、二

10

20

30

40

50

量体界面のズームイン図を表示し、残基－残基水素結合（黒色破線）を強調する。

【図 3 8 A】mFZD8 CRD（白色、リボン表現、PDB ID# 4 F 0 A）と複合したXWnt8（薄灰色、リボン表現）が、mFZD8 CRD（灰色、リボン表現、PDB ID# 1 I J Y）のαらせん二量体の上に重畳されたことを示す。示される二量体の疎水性空洞表面は、前面透明性を有するFZD CRD構造の上にマップした。C14脂肪酸（球棒表現）は、XWnt8 S187において共有結合される。水、結晶化補因子、及びグリカンは、明確性のために隠されている。

【図 3 8 B】C24脂肪酸（黒色、球棒表現）と複合したhFZD7 CRD（灰色、リボン表現）と複合したXWnt8（薄灰色、リボン表現）を示す。示される二量体の疎水性空洞表面は、前面透明性を有するFZD CRD構造の上にマップした。C14脂肪酸（薄灰色、球棒表現）は、XWnt8 S187において共有結合される。水、結晶化補因子、及びグリカンは、明確性のために隠されている。

【図 3 8 C】C16:1n-7脂肪酸（灰色または黒色、球棒表現）と複合したhFZD5 CRD鎖Aホモ二量体（灰色、リボン表現）と複合したXWnt8（薄灰色、リボン表現）を示す。示される二量体の疎水性空洞表面は、前面透明性を有するFZD CRD構造の上にマップした。C14脂肪酸（薄灰色、球棒表現）は、XWnt8 S187において共有結合される。水、結晶化補因子、及びグリカンは、明確性のために隠されている。

【図 3 9 - 1】Aは、伸長した脂肪酸部分（C16:1n-7）がhFZD7 CRDのU形疎水性空洞内に結合している、hFZD7 CRD（PDB ID# 5 U R V）と複合したXWnt8a（PDB ID# 4 F 0 A）のモデルを提供する。Bは、Aの黒枠内の部分の拡大図を提供する。

【図 3 9 - 2】Cは、ペプチドFz7-21の存在下のFZD7 CRDとのWnt相互作用について、提案モデルを提供する。Dは、Cの黒枠内の部分の拡大図を提供する。

【図 4 0】hFZD7 CRD上のペプチド結合領域内の特定の残基における突然変異が、野生型hFZD7 CRDと比較して、Fz7-21の結合を低減したかどうかを評価するために行われた蛍光サイズ排除（FSEC）クロマトグラフィー実験の結果を提供する。

【図 4 1】Aは、dFz7-21による処理が、Lgr5-GFPマウス由来のオルガノイド中のLgr5-GFP幹細胞の数を低減したかどうかを決定するために行われた実験の結果を提供する。Bは、dFz7-21による処理が、Lgr5-GFPマウス由来のオルガノイド中のLgr5-GFP幹細胞の数を低減したかどうかを決定するために行われた実験の結果を提供する。Cは、A及びBに示される結果の定量を提供する。

【図 4 2 - 1】Aは、Lgr5-GFPオルガノイド中のAxin2 mRNAレベルに対するDMSO、Fz7-21、またはFz7-21Sによる処置の効果を評価するために行われた実験の結果を提供する。Bは、Lgr5-GFPオルガノイド中のAscl2 mRNAレベルに対するDMSO、Fz7-21、またはFz7-21Sによる処理の効果を評価するために行われた実験の結果を提供する。

【図 4 2 - 2】Cは、APC^{mi}nオルガノイド中のAxin2 mRNAレベルに対するDMSO、Fz7-21、またはFz7-21Sによる処理の効果を評価するために行われた実験の結果を提供する。Dは、APC^{mi}nオルガノイド中のAscl2 mRNAレベルに対するDMSO、Fz7-21、またはFz7-21Sによる処理の効果を評価するために行われた実験の結果を提供する。Eは、APC^{mi}nオルガノイド中のLgr5 mRNAレベルに対するDMSO、Fz7-21、またはFz7-21Sによる処理の効果を評価するために行われた実験の結果を提供する。

【発明を実施するための形態】

【0030】

Frizzled 7（FZD7）受容体のシステインリッチドメイン（CRD）と結合する、または特異的に結合する天然に存在しないペプチドを含むリガンドが提供される。ある特定の実施形態では、これらのリガンドは、Frizzled 1（FZD1）及

びFrizzled 2 (FZD2) からなる群から選択されるFrizzled (FZD) 受容体のシステインリッチドメイン (CRD) と更に結合する。かかるリガンドは、以下の特性のうちの1つ以上を示す。約100nM未満のIC₅₀でのWnt 媒介型B-カテニンシグナル伝達の阻害、90nM未満のEC₅₀値でのヒトFZD7 CRD及びマウスFZD7 CRDへの結合、ならびに／または以下のアミノ酸、Leu81、His84、Gln85、Tyr87、Pro88、Phe138、及びPhe140のうちの3つ以上を含むヒトFZD7 CRDの結合領域への結合。

【0031】

また、対象におけるがん（結腸癌、膵臓癌、非小細胞肺癌、RNF43中の突然変異を特徴とするがん、USP6過剰発現を特徴とするがん、もしくはR-スポンジン (RSP O) ファミリーメンバーを伴う遺伝子融合を特徴とするがんなど）を治療する際の、FZD7のCRDと結合する、または特異的に結合する天然に存在しないペプチドを含むリガンドを使用する方法も提供される。また、対象におけるがん（結腸癌、膵臓癌、非小細胞肺癌、RNF43中の突然変異を特徴とするがん、USP6過剰発現を特徴とするがん、もしくはR-スポンジン (RSP O) ファミリーメンバーを伴う遺伝子融合を特徴とするがんなど）を治療する際の、FZD1及び／またはFZD2のCRDと更に結合する天然に存在しないペプチドを含むリガンドを使用する方法も提供される。また、眼疾患または障害の治療用薬物の製造における、FZD7のCRDと結合する、または特異的に結合する天然に存在しないペプチドを含むリガンドの使用も提供される。また、眼疾患または障害の治療用薬物の製造における、FZD1及び／またはFZD2のCRDと更に結合する天然に存在しないペプチドを含む、かかるリガンドの使用も提供される。

【0032】

本開示の実践は、別途示されない限り、細胞生物学、毒物学、分子生物学、生化学、細胞培養、免疫学、腫瘍学、組み換えDNA、及び当該技術分野の範囲内の関連分野における標準方法及び従来技法を用いる。かかる技法は、文献に記載されており、したがって当業者が利用できる。例えば、Alberts, B. et al., "Molecular Biology of the Cell," 5th edition, Garland Science, New York, NY, 2008、Voet, D. et al., "Fundamentals of Biochemistry: Life at the Molecular Level," 3rd edition, John Wiley & Sons, Hoboken, NJ, 2008、Sambrook, J. et al., "Molecular Cloning: A Laboratory Manual," 3rd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001、Ausubel, F. et al., "Current Protocols in Molecular Biology," John Wiley & Sons, New York, 1987及び定期更新、Freshney, R. I., "Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique," 4th edition, John Wiley & Sons, Somerset, NJ, 2000、ならびにシリーズ"Methods in Enzymology," Academic Press, San Diego, CAを参照されたい。

【0033】

定義

本明細書で使用されるとき、「天然に存在しない」は、例えば、自然界で見出されないアミノ酸配列を含むポリペプチドまたは例えば、自然界で見出されないヌクレオチド配列を含む核酸を意味する。本明細書で提供される天然に存在しないペプチドは、遺伝子操作方法によって、または化学合成方法によって産生され得る。したがって、本明細書に記載される天然に存在しないペプチドは、組み換えであってよく、すなわち、異種核酸の導入もしくはその細胞に天然でない形態への天然核酸の改変によって修飾された、または細胞がそのように修飾された細胞に由来する、細胞または核酸またはベクターによって産生さ

れてもよい。あるいは、本明細書に記載される天然に存在しないペプチドは、化学ペプチドを介して産生され得る。

【0034】

本明細書で使用されるとき、「アミノ酸改変」は、例えば、ペプチド配列中（F Z D 7 のシステインリッチドメイン（C R D）に結合する、または特異的に結合する天然に存在しないペプチドの配列中など）の少なくとも1つのアミノ酸の付加、欠失、または置換を指す。

【0035】

本明細書で使用されるとき、「リガンド」は、F r i z z l e d 7（F Z D 7）のシステインリッチドメイン（C R D）と結合する、または特異的に結合する、本明細書に記載される少なくとも1つの天然に存在しないペプチドを含む（例えば、それから本質的になる、もしくはそれからなる）分子を指す。本明細書に記載される少なくとも1つの天然に存在しないペプチドを含む（例えば、それから本質的になる、もしくはそれからなる）リガンドの、C R Dへの結合は、非特異的相互作用とは測定可能な程度に異なり、例えば、タンパク質ーリガンド結合を測定する結合アッセイまたはイムノアッセイによって検出され得る。

【0036】

目的の受容体と「結合する」本発明のリガンドは、十分な親和性で受容体と結合するものであり、それによりリガンドは、該受容体を発現するタンパク質または細胞または組織を標的とする診断剤及び／または治療剤として有用である。標的分子または受容体へのリガンドの結合に関して、特定のポリペプチド標的上の特定のポリペプチドまたはエピトープの「特異的結合」、またはそれに「特異的に結合する」、またはそれに「特異的な」という用語は、非特異的相互作用とは測定可能な程度に異なる結合を意味する。特異的結合は、例えば、分子の結合を対照分子の結合と比較して決定することによって測定することができる。例えば、特異的結合は、標的に類似した対照分子、例えば、過剰な標識されていない標的との競合によって決定され得る。この場合、標識された標的のプロープへの結合が過剰な標識されていない標的によって競合的に阻害されると、特異的結合が示される。特定の一実施形態では、「特異的に結合する」は、他の特定のF Z D C R Dドメインではなく、その特定の標的F Z D 7 C R Dドメインへのリガンドの結合を指す。例えば、リガンドは、F Z D 7 C R Dと特異的に結合するが、F Z D 8 C R Dには特異的に結合しない。

【0037】

ある特定の実施形態では、「標的でない」F Z D受容体（F Z D 3、F Z D 4、F Z D 5、F Z D 6、F Z D 8、F Z D 9、もしくはF Z D 10など）へのリガンドの結合の程度は、例えば、蛍光活性化セルソーティング（F A C S）分析または放射性免疫沈降法（R I A）により決定して、F Z D 1、F Z D 2、及び／またはF Z D 7へのリガンドの結合の約10%未満となる。ある特定の実施形態では、本開示のリガンドは、約4℃、25℃、37℃、または45℃の温度で測定して、100 nM以下、任意に10 nM未満、任意に1 nM未満、任意に0.5 nM未満、任意に0.1 nM未満、任意に0.01 nM未満、または任意に0.005 nM未満の解離定数（K d）またはI C₅₀値でF Z D 1、F Z D 2、及び／またはF Z D 7に特異的に結合する。ある特定の実施形態では、「標的でない」F Z D受容体（F Z D 1、F Z D 2、F Z D 3、F Z D 4、F Z D 5、F Z D 6、F Z D 8、F Z D 9、もしくはF Z D 10など）へのリガンドの結合の程度は、例えば、蛍光活性化セルソーティング（F A C S）分析または放射性免疫沈降法（R I A）により決定して、F Z D 7へのリガンドの結合の約10%未満となる。ある特定の実施形態では、本開示のリガンドは、約4℃、25℃、37℃、または45℃の温度で測定して、100 nM以下、任意に10 nM未満、任意に1 nM未満、任意に0.5 nM未満、任意に0.1 nM未満、任意に0.01 nM未満、または任意に0.005 nM未満の解離定数（K d）またはI C₅₀値でF Z D 7に特異的に結合する。

【0038】

「単離された」リガンドは、そのリガンド及び混入物または不純物を含む組成物から特定及び分離され、かつ／または回収されたリガンドである。混入物または不純物は、F Z D 7 のシステインリッチドメイン (C R D) と結合する、または特異的に結合する天然に存在しないペプチドを含む (例えば、それから本質的になる、もしくはそれからなる) リガンドの診断用途または治療用途に干渉する材料である。混入物としては、例えば、宿主細胞酵素、ホルモン、及び他のタンパク質性もしくは非タンパク質性溶質 (すなわち、リガンドが組み換え的に産生される場合)、または例えば、塩、試薬、切断もしくは分解された配列、不完全に脱保護された配列等 (すなわち、リガンドが化学合成を介して産生される場合) を挙げることができる。好ましい実施形態では、本明細書で提供されるリガンドは、次の程度まで精製される。(1) ローリー法により決定した場合にリガンドの 9 5 重量%を上回り、最も好ましくは 9 9 重量%を上回る、(2) スピニングカップシーケネータ (s p i n n i n g c u p s e q u e n a t o r) を使用して N 末端もしくは内部アミノ酸配列の少なくとも 1 5 個の残基を得るのに十分な程度、または (3) クーマシーブルーもしくは好ましくは銀染色を使用して還元もしくは非還元条件下で S D S - P A G E によって均質になるまで。単離されたリガンドは、組み換え細胞内で原位置のリガンドを含む。F Z D 7 のシステインリッチドメイン (C R D) と結合する、または特異的に結合する天然に存在しないペプチドを含む (例えば、それから本質的になる、もしくはそれからなる) 単離されたリガンドは、少なくとも 1 つの精製ステップによって調製される。

10

【0039】

20

本明細書で特定されるポリペプチド配列に関する「アミノ酸配列同一性パーセント (%)」または「相同性」は、いずれの保存的置換も配列同一性の一部として見なして配列を整列した後に、候補配列内のアミノ酸残基が、比較されるポリペプチド内のアミノ酸残基と同一である割合 (%) として定義される。アミノ酸配列同一性パーセントを決定するためのアラインメントは、当該技術分野の範囲内の様々な方法で、例えば、B L A S T、B L A S T - 2、A L I G N、または M e g a l i g n (D N A S T A R) ソフトウェアなどの公的に入手可能なコンピュータソフトウェアを使用して達成され得る。当業者は、比較される配列の全長にわたって最大のアラインメントを達成するために必要な任意のアルゴリズムを含む、アラインメントを測定するための適切なパラメータを決定することができる。しかしながら、本明細書における目的のために、アミノ酸配列同一性%値は、配列比較コンピュータプログラム A L I G N - 2 を使用して生成される。A L I G N - 2 配列比較コンピュータプログラムは、G e n e n t e c h, I n c. によって作成され、ソースコードは、ユーザ文書と共に米国著作権庁 (W a s h i n g t o n D. C., 2 0 5 5 9) に提出されており、米国著作権番号 T X U 5 1 0 0 8 7 の下に登録されている。A L I G N - 2 プログラムは、G e n e n t e c h, I n c. (S o u t h S a n F r a n c i s c o, C a l i f o r n i a) から公的に利用可能である。A L I G N - 2 プログラムは、U N I X オペレーティングシステム、好ましくはデジタル U N I X V 4. 0 D で使用する場合にコンパイルすべきである。全ての配列比較パラメータは、A L I G N - 2 プログラムにより設定されており、変動しない。

30

【0040】

40

本明細書で使用されるとき、「結合領域」という用語は、ペプチド (本明細書で提供される F Z D 7 のシステインリッチドメイン (C R D) に特異的に結合する天然に存在しないペプチドなど) によって特異的に結合され得る領域を指す。結合領域は、該結合領域に固有である空間的構造で約 3 ~ 1 0 個のアミノ酸を含み得る。これらのアミノ酸は、タンパク質内で直鎖状であり得るか (すなわち、アミノ酸配列において保存的)、またはそれらは、タンパク質の異なる部分に位置付けられ得る (すなわち、アミノ酸配列において非保存的)。タンパク質内または 2 つのタンパク質の界面におけるアミノ酸の空間的構造を決定する方法は、当該技術分野において既知であり、例えば、X 線結晶解析及び 2 次元核磁気共鳴が挙げられる。

【0041】

50

治療目的のための「対象」、「患者」、または「個体」は、ヒト、飼育動物及び家畜、ならびに動物園、競技用、または愛玩動物、例えば、イヌ、ウマ、ネコ、ウシ等を含む、哺乳動物として分類される任意の動物を指す。好ましくは、哺乳動物は、ヒトである。

【0042】

本明細書に開示されるリガンド（またはかかるリガンドを含む組成物）の「有効量」は、具体的に記載される目的を実行するのに十分な量である。「有効量」は、実験的に、かつ記載される目的に関する既知の方法によって決定することができる。

【0043】

「治療有効量」という用語は、（ヒト患者などの）哺乳動物において疾患または障害を「治療する」のに有効な、本明細書に開示されるリガンドまたは組成物の量を指す。がんの場合、本明細書に開示されるリガンドの治療有効量は、がん細胞の数を低減する、腫瘍サイズまたは重量を低減する、末梢器官へのがん細胞浸潤を阻害する（すなわち、ある程度遅延及び好ましくは停止させる）、瘍転移を阻害する（すなわち、ある程度遅延及び好ましくは停止させる）、腫瘍成長をある程度阻害する、ならびに／またはがんに関連付けられた症状のうちの1つ以上をある程度緩和することができる。本明細書に開示されるリガンドが、既存のがん細胞の成長を予防する及び／またはそれらを殺滅することができる限り、それは細胞増殖抑制性及び／または細胞毒性であり得る。一実施形態では、治療有効量は、成長阻害量である。別の実施形態では、治療有効量は、患者の生存を延長する量である。別の実施形態では、治療有効量は、患者の無進行生存を改善する量である。

【0044】

本明細書で使用されるとき、「治療」または「治療する」とは、臨床結果を含む有益なまたは所望の結果を得るためのアプローチである。本発明の目的のために、有益なまたは所望の臨床結果としては、以下：疾患に起因する1つ以上の症状の緩和、疾患の程度の弱化、疾患の安定化（例えば、疾患の悪化の予防もしくは遅延）、疾患の拡散（例えば、転移）の予防もしくは遅延、疾患の再発の予防もしくは遅延、疾患の進行の遅延もしくは減速、病状の改善、疾患の寛解（部分的もしくは全体的）の提供、疾患の治療に必要な1つ以上の他の薬剤の用量の低減、疾患の進行の遅延、生活の質の向上もしくは改善、体重増加の向上、及び／または生存期間の延長のうちの1つ以上が挙げられるが、これらに限定されない。また、がんの病理学的帰結（例えば、腫瘍体積など）の軽減も「治療」に包含される。本発明の方法は、治療のそれらの態様のうちの任意の1つ以上を企図する。

【0045】

「障害」は、F Z D 7 のシステインリッチドメイン（C R D）と結合する天然に存在しないペプチドを含む（例えば、それから本質的になる、もしくはそれからなる）リガンドによる、または本明細書に記載される F Z D 7 の C R D と特異的に結合する天然に存在しないペプチドを含む（例えば、それから本質的になる、もしくはそれからなる）リガンドによる治療から利益を享受する任意の病態である。例えば、異常な W n t 発現または活性に罹患しているか、またはそれに対する予防を必要とする哺乳動物。これには、哺乳動物を問題の障害にかかりやすくする病理学的状態を含む慢性及び急性の障害または疾患が挙げられる。本明細書で治療される障害の非限定的な例としては、本明細書の他の場所に記載されるがん及び転移性疾患が挙げられる。ある特定の実施形態では、システインリッチドメイン（F Z D 7）と結合する天然に存在しないペプチドを含む（例えば、それから本質的になる、もしくはそれからなる）リガンド、または F Z D 7 の C R D と特異的に結合する天然に存在しないペプチドを含む（例えば、それから本質的になる、もしくはそれからなる）リガンドを使用して、組織修復、創傷治癒、及び骨成長を促進することができる。

【0046】

本明細書で使用されるとき、「薬学的に許容される」または「薬理学的に適合性の」とは、生物学的に望ましくないことがないか、または他の理由で望ましくないことがない材料を意味し、例えば、この材料は、いかなる重大な望ましくない生物学的効果を引き起こすことなく、またはそれが含まれる組成物の他の成分のうちのいずれとも有害な方法で相

相互作用することなく、患者に投与される薬学的組成物に組み込まれ得る。薬学的に許容される担体または賦形剤は、好ましくは、毒性学的及び製造試験に必要とされる標準を満たしており、かつ／または米国食品医薬品局によって準備された不活性成分ガイドに含まれている。

【0047】

「検出する」という用語は、存在もしくは不在を決定すること、または物質（F Z D 7 もしくはその受容体など）の量を定量することを含むことが意図される。したがって、この用語は、定性的及び定量的決定のための、本明細書で提供される材料、組成物、及び方法の使用を指す。一般に、検出に使用される特定の技法は、本発明の実施に重要ではない。

10

【0048】

例えば、本発明による「検出する」とは、F Z D 7 の存在もしくは不在、F Z D 7 のレベルの変化、及び／またはF Z D 7 の生物学的機能／活性の変化を観察することを含み得る。ある特定の実施形態では、「検出する」とは、F Z D 7 のレベル（例えば、ヒトF Z D 1、ヒトF Z D 2、及び／またはヒトF Z D 7 のポリペプチドレベル）を検出することを含み得る。検出するとは、対照と比較して、10%～90%の間の任意の値、または30%～60%の間の任意の値、または100%超の変化（増加もしくは減少）を定量することを含み得る。検出するとは、（上限、下限値を含む）2倍～10倍か、またはそれ以上（例えば、100倍）の任意の値の変化を定量することを含み得る。

【0049】

「標識」という語は、本明細書で使用されるとき、F r i z z l e d 7（F Z D 7）のシステインリッチドメイン（C R D）と特異的に結合する天然に存在しないペプチドを含む（例えば、それから本質的になる、もしくはそれからなる）リガンドに直接または間接的に複合される検出可能な化合物または組成物を指す。標識は、それ自体が検出可能（例えば、放射性同位標識または蛍光標識）であり得るか、または酵素標識の場合、検出可能である基質化合物もしくは組成物の化学改変を触媒し得る。

20

【0050】

本明細書における「約」値またはパラメータへの言及は、当業者に容易に知られているそれぞれの値の通常の誤差範囲を指す。本明細書における「約」値またはパラメータへの言及は、その値またはパラメータ自体を対象とする態様を含む（かつ説明する）。例えば、「約X」を指す説明には、「X」の説明を含む。

30

【0051】

本明細書に記載される本発明の態様及び実施形態が、態様及び実施形態「を含む」、「からなる」、及び「から本質的になる」を含むことが理解される。

【0052】

特許出願及び公報を含む本明細書で引用される全ての参考文献は、参照によりそれら全体が本明細書に組み込まれる。

【0053】

F Z D 7 のシステインリッチドメインと結合する天然に存在しないペプチドを含むリガンド

40

F r i z z l e d 7（F Z D 7）のシステインリッチドメイン（C R D）と結合する、または特異的に結合する天然に存在しないペプチドを含む（例えば、それから本質的になる、もしくはそれからなる）リガンドが提供される。ある特定の実施形態では、リガンドは、F r i z z l e d 1（F Z D 1）、F r i z z l e d 2（F Z D 2）、及びF r i z z l e d 7（F Z D 7）からなる群から選択される1つ以上のF r i z z l e d（F Z D）受容体と結合する。ある特定の実施形態では、F Z D 1は、ヒトF Z D 1である。ある特定の実施形態では、F Z D 1は、マウスF Z D 1である。ある特定の実施形態では、F Z D 2は、ヒトF Z D 2である。ある特定の実施形態では、F Z D 2は、マウスF Z D 2である。ある特定の実施形態では、F Z D 7は、ヒトF Z D 7である。ある特定の実施形態では、F Z D 7は、マウスF Z D 7である。特定の実施形態では、リガンドは

50

、Frizzled 7 (FZD7) (例えば、ヒトFZD7またはマウスFZD7) のシステインリッチドメイン (CRD) と特異的に結合する天然に存在しないペプチドを含む (例えば、それから本質的になる、またはそれからなる)。ある特定の実施形態では、リガンドは、Frizzled 3 (FZD3)、Frizzled 4 (FZD4)、Frizzled 5 (FZD5)、Frizzled 6 (FZD6)、Frizzled 8 (FZD8)、Frizzled 9 (FZD9)、またはFrizzled 10 (FZD10) のCRDと結合しない天然に存在しないペプチドを含む (例えば、それから本質的になる、もしくはそれからなる)。ある特定の実施形態では、リガンドは、Frizzled 1 (FZD1)、Frizzled 2 (FZD2)、Frizzled 3 (FZD3)、Frizzled 4 (FZD4)、Frizzled 5 (FZD5)、Frizzled 6 (FZD6)、Frizzled 8 (FZD8)、Frizzled 9 (FZD9)、またはFrizzled 10 (FZD10) のCRDと結合しない天然に存在しないペプチドを含む (例えば、それから本質的になる、もしくはそれからなる)。

【0054】

ある特定の実施形態では、リガンドは、FZD7のCRDと結合する、または特異的に結合する天然に存在しないペプチドを含む (例えば、それから本質的になる、もしくはそれからなる)。ある特定の実施形態では、リガンドは、hFZD7のCRDと特異的に結合する、または特異的に結合する天然に存在しないペプチドを含む (例えば、それから本質的になる、もしくはそれからなる)。ある特定の実施形態では、リガンドは、mFZD7のCRDと特異的に結合する、または特異的に結合する天然に存在しないペプチドを含む (例えば、それから本質的になる、もしくはそれからなる)。

【0055】

ある特定の実施形態では、リガンドは、FZD7のCRDと結合する、または特異的に結合し、かつ1) FZD1、2) FZD2、またはFZD1及びFZD2のうちのいずれか1つのCRDと付加的に結合する天然に存在しないペプチドを含む (例えば、それから本質的になる、もしくはそれからなる)。ある特定の実施形態では、リガンドは、FZD1及びFZD7のCRDと結合する天然に存在しないペプチドを含む (例えば、それから本質的になる、またはそれからなる)。ある特定の実施形態では、リガンドは、FZD2及びFZD7のCRDと結合する天然に存在しないペプチドを含む (例えば、それから本質的になる、またはそれからなる)。

【0056】

ある特定の実施形態では、リガンドは、アミノ酸配列LPSDDLFWCHVMY (配列番号13) を含むペプチドが結合するFZD7 CRDの結合領域への結合に対して競合する、天然に存在しないペプチドを含む。ある特定の実施形態では、リガンドは、アミノ酸配列LPSDDLFWCHVMY (配列番号13) を含むペプチドが結合するFZD7 CRDの結合領域への結合に対して競合する、天然に存在しないペプチドから本質的になる (例えば、それからなる)。ある特定の実施形態では、リガンドは、アミノ酸配列LPSDDLFWCHVMY (配列番号13) からなるペプチドが結合するFZD7 CRDの結合領域への結合に対して競合する、天然に存在しないペプチドから本質的になる (例えば、それからなる)。

【0057】

ある特定の実施形態では、リガンドは、アミノ酸配列LPSDDLFWCHVMY (配列番号13) を含むペプチドが結合するFZD7 CRDの同じ結合領域にと特異的に結合する、天然に存在しないペプチドを含む。ある特定の実施形態では、リガンドは、アミノ酸配列LPSDDLFWCHVMY (配列番号13) を含むペプチドが結合するFZD7 CRDの同じ結合領域と特異的に結合する、天然に存在しないペプチドから本質的になる (例えば、それからなる)。ある特定の実施形態では、リガンドは、アミノ酸配列LPSDDLFWCHVMY (配列番号13) からなるペプチドが結合するFZD7 CRDの同じ結合領域と特異的に結合する、天然に存在しないペプチドから本質的にな

る（例えば、それからなる）。

【0058】

ある特定の実施形態では、リガンドは、Leu 81、His 84、Gln 85、Tyr 87、Pro 88、Phe 138、及びPhe 140からなる群から選択される少なくとも1つ、少なくとも2つ、少なくとも3つ、少なくとも4つ、少なくとも5つ、少なくとも6つ、または少なくとも7つのアミノ酸を含むFZD7の結合領域と特異的に結合するペプチドを含む（例えば、それから本質的になる、もしくはそれからなる）。

【0059】

ある特定の実施形態では、リガンドは、Leu 81、His 84、Gln 85、Tyr 87、Pro 88、Phe 138、及びPhe 140からなる群から選択される少なくとも1つ、少なくとも2つ、少なくとも3つ、少なくとも4つ、少なくとも5つ、少なくとも6つ、または少なくとも7つのアミノ酸を含むFZD7の結合領域と特異的に結合する、天然に存在しないペプチドを含む（例えば、それから本質的になる、もしくはそれからなる）。ある特定の実施形態では、リガンドは、Leu 81、His 84、Gln 85、Tyr 87、Pro 88、Phe 138、及びPhe 140からなる群から選択される少なくとも1つ、少なくとも2つ、少なくとも3つ、少なくとも4つ、少なくとも5つ、少なくとも6つ、または少なくとも7つのアミノ酸の4 Å以内の、FZD7の結合領域と特異的に結合する、天然に存在しないペプチドを含む（例えば、それから本質的になる、またはそれからなる）。

【0060】

ある特定の実施形態では、リガンドは、1つ以上の部分に融合されたFZD1、FZD2、及び／またはFZD7のCRDと結合する、または特異的に結合する本明細書に記載される天然に存在しないペプチドを含む、キメラ分子である。ある特定の実施形態では、リガンドは、1つ以上の部分に融合されたFZD7のCRDと特異的に結合する本明細書に記載される天然に存在しないペプチドを含む、キメラ分子である。ある特定の実施形態では、部分は、ペプチドのN末端に融合される。ある特定の実施形態では、部分は、ペプチドのC末端に融合される。ある特定の実施形態では、第1の部分がペプチドのN末端に融合され、第2の部分がペプチドのN末端に融合される。ある特定の実施形態では、1つ以上の部分は、ペプチドに組み換えで融合される。ある特定の実施形態では、1つ以上の部分は、リンカー（切断可能なリンカーなど）を介してペプチドに結合される。例示的な部分としては、ペプチド、ポリペプチドまたはそれらの断片、タンパク質またはそれらの断片、融合タンパク質が挙げられるが、これらに限定されない。

【0061】

ある特定の実施形態では、リガンドは、異種ポリペプチドまたはアミノ酸配列に組み換えで融合されたFZD7のCRDと結合する、または特異的に結合する、本明細書に記載される天然に存在しないペプチドを含む。ある特定の実施形態では、リガンドは、例えば、ヒト免疫不全ウイルスTATタンパク質（Schwarze et al., 1999, Science 285:1569-72）のタンパク質伝達ドメインを使用して、例えば、様々な組織に、または例えば脳血管障壁を横切って送達するためにリガンドを標的とするタンパク質伝達ドメインに（例えば、N末端、C末端、もしくはN末端及びC末端の両方で）融合されたFZD7のCRDと結合する、または特異的に結合する本明細書に記載される天然に存在しないペプチドを含む。ある特定の実施形態では、リガンドは、一次両親媒性ペプチドMPG（GALFLGFLGAAGSTMGAWSQPKKKRKV配列番号104）、Pepp-1（KETWWETWWTEWSQPKKKRKV配列番号105）、二次両親媒性ペプチドCADY（Ac-GLWRALWRLRLRSLWRLLRAL-CyA配列番号106）、またはオクターアルギニン（R（8）配列番号107）などの細胞透過性ペプチドに融合されたFZD7のCRDと結合する、または特異的に結合する、本明細書に記載される天然に存在しないペプチドを含む。

【0062】

ある特定の実施形態では、リガンドは、天然に存在しないペプチドの立体構造（αらせ

ん構造など)を安定化するドメインまたは部分に(例えば、N末端、C末端で、もしくはN末端及びC末端の両方に)融合されたF Z D 7のC R Dと結合する、または特異的に結合する、本明細書に記載される天然に存在しないペプチドを含む。

【0063】

ある特定の実施形態では、F Z D 7のC R Dと結合する、または特異的に結合する、本明細書に記載される天然に存在しないペプチド含む(例えば、それから本質的になる、もしくはそれからなる)リガンドは、単一特異性として単量体形態で、または(異なる標的リガンドもしくは同じ標的リガンド上の異なる結合領域に対して)二重もしくは多重特異性として多量体形態で使用され得る。ある特定の実施形態では、F Z D 7のC R Dと結合する、または特異的に結合する、本明細書に記載される天然に存在しないペプチドを含む(例えば、それから本質的になる、もしくはそれからなる)リガンドは、L R P 6に複合される。結合は、共有または非共有であり得る。ある特定の実施形態では、二量体二重特異性リガンドは、第1の標的または結合領域に対する特異性を有する1つのサブユニット、及び第2の標的リガンドまたは結合領域に対する特異性を有する第2のサブユニットを有する。F Z D 7のC R Dと結合する、または特異的に結合する、本明細書に記載される天然に存在しないペプチドを含むリガンドは、原子価及びしたがって結合の活性を増加させることができる多様な立体構造で接合され得る。

【0064】

ある特定の実施形態では、本明細書で提供されるリガンドは、F Z D 7のC R Dと結合する、または特異的に結合する、本明細書で提供される2つ以上の(例えば、3、4、5、6、7、8、9、10、もしくは10より多い)天然に存在しないペプチドを含む。ある特定の実施形態では、核酸を、F Z D 7のC R Dと結合する、または特異的に結合する、本明細書で提供される単一の天然に存在しないペプチドの2つ以上のコピーをコードするように操作することができ、これらのコピーは、直列で転写及び翻訳されて、同一のサブユニットの共有結合された多量体を産生する。ある特定の実施形態では、核酸は、F Z D 7のC R Dと結合する、または特異的に結合する、本明細書で提供される2つ以上の異なる天然に存在しないペプチドをコードするように操作することができ、これらのコピーは、直列で転写及び翻訳されて、異なるサブユニットの共有結合された多量体を産生する。

【0065】

別の実施形態では、リガンドは、抗タグ抗体が選択的に結合し得るエピトープを提供するタグポリペプチドと融合されたF Z D 7のC R Dと結合する、または特異的に結合する、天然に存在しないペプチドを含む。エピトープタグは、一般に、リガンドのアミノ末端またはカルボキシル末端に位置する。かかるエピトープタグ形態のリガンドの存在は、タグポリペプチドに対する抗体を使用して検出され得る。また、エピトープタグの提供により、F Z D 7のC R Dと結合する、または特異的に結合する、本明細書で提供される天然に存在しないペプチドを含むリガンドが、抗タグ抗体またはエピトープタグに特異的に結合する別の種類の親和性マトリクスを使用して、親和性精製によって容易に精製されることも可能になる。

【0066】

様々なタグポリペプチド及びそれらそれぞれの抗体が、当該技術分野において既知である。例としては、ポリ-ヒスチジン(ポリ-H i s)またはポリ-ヒスチジン-グリシン(ポリ-H i s - G l y)タグ;フルH Aタグポリペプチド及びその抗体12C A 5(F i e l d e t a l. (1988) M o l. C e l l. B i o l. 8, 2159-2165); c - m y cタグ及びそれに対する8F9、3C7、6E10、G4、B7、及び9E10抗体(E v a n e t a l. (1985) M o l. C e l l. B i o l. 5, 3610-3616]; ならびに単純ヘルペスウイルス糖タンパク質D (g D)タグ及びその抗体(P a b o r s k y e t a l. (1990) P r o t e i n E n g. , 3, 547-553)が挙げられる。他のタグポリペプチドとしては、フラグーペプチド(H o p p e t a l. (1988) B i o T e c h n o l o g y, 6, 1204-1

210)、KT3エピトープペプチド(Martin et al. (1992) Science, 255, 192-194]、 α -チューブリンエピトープペプチド(Skinner et al. (1991) J. Biol. Chem. 266, 15163-15166)、及びT7遺伝子10タンパク質ペプチドタグ(Lutz-Freyermuth et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 6393-6397]が挙げられる。

【0067】

ある特定の実施形態では、リガンドは、免疫グロブリンまたは免疫グロブリンの特定領域に組み換えて融合されたFZD7のCRDと結合する、または特異的に結合する、本明細書で提供される天然に存在しないペプチドを含む。二価形態のリガンド(例えば、「イムノアドヘシン」の場合、かかる融合は、IgG分子のFc領域に対するものであり得る。本明細書で提供されるIg融合物は、Ig分子内の少なくとも1つの可変領域の代わりに、ヒトのおよそ残基94~243、残基33~53、もしくは残基33~52、またはそのみを含むポリペプチドを含む。特に好ましい実施形態では、免疫グロブリン融合物は、IgG1分子のヒンジ、CH2、及びCH3、またはヒンジ、CH1、CH2、及びCH3領域を含む。免疫グロブリン融合物の産生については、1995年6月27日に発行された米国特許第5,428,130号も参照されたい。ある特定の実施形態では、FZD7のCRDと結合する、または特異的に結合する、本明細書で提供される天然に存在しないペプチドを含むリガンドは、例えば、N末端またはC末端で、IgG(Fc)の定常領域に融合される。ある特定の実施形態では、リガンド/Fc融合分子は、免疫応答の補体成分を活性化する。ある特定の実施形態では、リガンド/Fc融合タンパク質は、FZD7のCRDと結合する、または特異的に結合する、本明細書で提供される天然に存在しないペプチドを含むリガンドの治療的価値を増加させる。ある特定の実施形態では、FZD7のCRDと結合する、または特異的に結合する、本明細書で提供される天然に存在しないペプチドを含むリガンドは、例えば、N末端またはC末端で、C1qなどの補体タンパク質に融合される(例えば、組み換えて融合される)。様々な公報が、FcRn結合ポリペプチドを分子に導入することによって(WO1997/43316、US5869046、US5747035、WO1996/32478、WO1991/14438)、またはタンパク質を、FcRn結合親和性が保存されるが他のFc受容体の親和性が大幅に低減された抗体と融合させること(WO1999/43713)もしくは抗体のFcRn結合ドメインと融合させること(WO2000/09560、US4703039)によって半減期が修飾される、天然に存在しないタンパク質を得るための方法を記載している。生理活性分子(例えば、FZD7のCRDと結合する、または特異的に結合する、本明細書で提供される天然に存在しないペプチドを含むリガンド)の半減期を増加させる特定の技法及び方法はまた、US7083784に見出され得る。ある特定の実施形態では、FZD7のCRDと結合する、または特異的に結合する、本明細書で提供される天然に存在しないペプチドを含むリガンドは、以下のアミノ酸残基突然変異(KabatのEUIンデックスにより番号が付けられた)を含むIgGからのFc領域に融合される:M252Y/S254T/T256EまたはH433K/N434F/Y436H。

【0068】

ある特定の実施形態では、リガンドは、インビボまたは血清半減期を増加または延長させる分子と融合されたFZD7のCRDと結合する、または特異的に結合する、本明細書で提供される天然に存在しないペプチドを含む。ある特定の実施形態では、リガンドは、ヒト血清アルブミン(HSA)などのアルブミン、ポリエチレングリコール(PEG)、多糖類、免疫グロブリン分子(IgG)、補体、ヘモグロビン、結合ペプチド、リボタンパク質、または血流中のその半減期及び/もしくはその組織貫通を増加させる他の因子と融合されたFZD7のCRDと結合する、または特異的に結合する、本明細書で提供される天然に存在しないペプチドを含む。

【0069】

FZD7のCRDと結合する、または特異的に結合する、本明細書で提供される天然に

10

20

30

40

50

存在しないペプチドを含む追加のリガンドは、の遺伝子シャフリング、モチーフシャフリング、エクソンシャフリング、及び／またはコドンシャフリング（集合的に「DNAシャフリング」と称される）技法を通して生成され得る。DNAシャフリングを用いて、FZD7のCRDと結合する、または特異的に結合する、本明細書で提供される天然に存在しないペプチド（例えば、より高い親和性及びより低い解離速度を有する天然に存在しないペプチド）を含む（例えば、それから本質的になる、もしくはそれからなる）リガンドの活性を改変することができる。一般に、US 5 6 0 5 7 9 3、US 5 8 1 1 2 3 8、US 5 8 3 0 7 2 1、US 5 8 3 4 2 5 2、US 5 8 3 7 4 5 8、Patten et al. (1997) Curr. Opin. Biotechnol. 8, 724-33、Harayama (1998) Trends Biotechnol. 16, 76-82、Hansson, et al., (1999) J. Mol. Biol. 287, 265-76、及びLorenzo and Blasco, (1998) Biotechniques 24, 308-313を参照されたい。

10

【0070】

ある特定の実施形態では、FZD7のCRDと結合する、または特異的に結合する、本明細書で提供される天然に存在しないペプチドを含む（例えば、それから本質的になる、またはそれからなる）リガンドは、組み換え前に、エラープローンPCR、ランダムヌクレオチド挿入、または他の方法による、ランダム変異導入法に供することによって改変される。ある特定の実施形態では、FZD7のCRDと結合する、または特異的に結合する、本明細書で提供される天然に存在しないペプチドを含む（例えば、それから本質的になる、またはそれからなる）リガンドをコードするポリヌクレオチドの1つ以上の部分は、1つ以上の異種分子の1つ以上の成分、モチーフ、区分、部分、ドメイン、断片等で組み換えられ得る。

20

【0071】

FZD7のCRDと結合する、または特異的に結合する、本明細書で提供される天然に存在しないペプチドを含む（例えば、それから本質的になる、またはそれからなる）リガンドは、公的に利用可能な遺伝子配列を使用して構築された組み換え融合遺伝子からの融合タンパク質の発現によって、または化学ペプチド合成によって生成することができる。

【0072】

ある特定の実施形態では、本明細書で提供されるリガンドは、5～45アミノ酸長である天然に存在しないペプチドを含む（例えば、それから本質的になる、またはそれからなる）。ある特定の実施形態では、本明細書で提供されるリガンドは、7～30アミノ酸長である天然に存在しないペプチドを含む（例えば、それから本質的になる、またはそれからなる）。ある特定の実施形態では、本明細書で提供されるリガンドは、10～20アミノ酸長である天然に存在しないペプチドを含む（例えば、それから本質的になる、またはそれからなる）。ある特定の実施形態では、本明細書で提供されるリガンドは、11～14アミノ酸長である天然に存在しないペプチドを含む（例えば、それから本質的になる、またはそれからなる）。ある特定の実施形態では、本明細書で提供されるリガンドは、45、40、35、30、25、20、15、10、9、8、7、6、または5アミノ酸長未満である天然に存在しないペプチドを含む（例えば、それから本質的になる、またはそれからなる）。

30

40

【0073】

ある特定の実施形態では、リガンドは、以下に記載されるアミノ酸配列を含む（例えば、それから本質的になる、またはそれからなる）天然に存在しないペプチドを含み、

$X_1 X_2 X_3 D D L X_4 X_5 W C H V M Y$ （配列番号100）

式中、 $X_1 \sim X_3$ の各々は、アミノ酸がないか、任意のアミノ酸であるか、または非天然のアミノ酸であり、 $X_4 \sim X_5$ の各々は、任意のアミノ酸または非天然のアミノ酸である。ある特定の実施形態では、 X_1 は、Lであり、 X_2 は、Pであり、 X_3 は、Sであり、 X_4 は、Eであり、 X_5 は、Fである。ある特定の実施形態では、天然に存在しないペプチドは、環化される。ある特定の実施形態では、天然に存在しないペプチドは、二量体化

50

される。

【0074】

ある特定の実施形態では、リガンドは、以下に記載されるアミノ酸配列を含む（例えば、それから本質的になる、またはそれからなる）天然に存在しないペプチドを含み、

$X_1 X_2 D D L X_3 X_4 W C H V M Y$ （配列番号101）

式中、 $X_1 \sim X_2$ の各々は、アミノ酸がないか、任意のアミノ酸であるか、または非天然のアミノ酸であり、 $X_3 \sim X_4$ の各々は、任意のアミノ酸または非天然のアミノ酸である。ある特定の実施形態では、天然に存在しないペプチドは、環化される。ある特定の実施形態では、天然に存在しないペプチドは、二量体化される。

【0075】

ある特定の実施形態では、リガンドは、以下に記載されるアミノ酸配列を含む（例えば、それから本質的になる、またはそれからなる）天然に存在しないペプチドを含み、

$X_1 D D L X_2 X_3 W C H V M Y$ （配列番号102）

式中、 X_1 は、アミノ酸がないか、任意のアミノ酸であるか、または非天然のアミノ酸であり、 $X_2 \sim X_3$ は、任意のアミノ酸または非天然のアミノ酸である。ある特定の実施形態では、 X_1 は、Sであり、 X_2 は、Eであり、 X_3 は、Fである。ある特定の実施形態では、天然に存在しないペプチドは、環化される。ある特定の実施形態では、天然に存在しないペプチドは、二量体化される。

【0076】

ある特定の実施形態では、リガンドは、以下に記載されるアミノ酸配列を含む（例えば、それから本質的になる、またはそれからなる）天然に存在しないペプチドを含み、

$D D L X_1 X_2 W C H V M Y$ （配列番号103）

式中、 X_1 及び X_2 の各々は、任意のアミノ酸または非天然のアミノ酸である。ある特定の実施形態では、天然に存在しないペプチドは、環化される。ある特定の実施形態では、天然に存在しないペプチドは、二量体化される。

【0077】

ある特定の実施形態では、リガンドは、以下に記載されるアミノ酸配列を含む（例えば、それから本質的になる、またはそれからなる）天然に存在しないペプチドから本質的になり（例えば、それからなり）、

$X_1 X_2 X_3 D D L X_4 X_5 W C H V M Y$ （配列番号100）

式中、 $X_1 \sim X_3$ の各々は、アミノ酸がないか、任意のアミノ酸であるか、または非天然のアミノ酸であり、 $X_4 \sim X_5$ の各々は、任意のアミノ酸または非天然のアミノ酸である。ある特定の実施形態では、 X_1 は、Lであり、 X_2 は、Pであり、 X_3 は、Sであり、 X_4 は、Eであり、 X_5 は、Fである。ある特定の実施形態では、天然に存在しないペプチドは、環化される。ある特定の実施形態では、天然に存在しないペプチドは、二量体化される。

【0078】

ある特定の実施形態では、リガンドは、以下に記載されるアミノ酸配列を含む（例えば、それから本質的になる、またはそれからなる）天然に存在しないペプチドから本質的になり（例えば、それからなり）、

$X_1 X_2 D D L X_3 X_4 W C H V M Y$ （配列番号101）

式中、 $X_1 \sim X_2$ の各々は、アミノ酸がないか、任意のアミノ酸であるか、または非天然のアミノ酸であり、 $X_3 \sim X_4$ の各々は、任意のアミノ酸または非天然のアミノ酸である。ある特定の実施形態では、天然に存在しないペプチドは、環化される。ある特定の実施形態では、天然に存在しないペプチドは、二量体化される。

【0079】

ある特定の実施形態では、リガンドは、以下に記載されるアミノ酸配列を含む（例えば、それから本質的になる、またはそれからなる）天然に存在しないペプチドから本質的になり（例えば、それからなり）、

$X_1 D D L X_2 X_3 W C H V M Y$ （配列番号102）

10

20

30

40

50

式中、 X_1 は、アミノ酸がないか、任意のアミノ酸であるか、または非天然のアミノ酸であり、 $X_2 \sim X_3$ は、任意のアミノ酸または非天然のアミノ酸である。ある特定の実施形態では、 X_1 は、Sであり、 X_2 は、Eであり、 X_3 は、Fである。ある特定の実施形態では、天然に存在しないペプチドは、環化される。ある特定の実施形態では、天然に存在しないペプチドは、二量体化される。

【0080】

ある特定の実施形態では、リガンドは、以下に記載されるアミノ酸配列を含む（例えば、それから本質的になる、またはそれからなる）天然に存在しないペプチドから本質的になり（例えば、それからなり）、

DDLX₁X₂WCHVMY（配列番号103）

式中、 X_1 及び X_2 の各々は、任意のアミノ酸または非天然のアミノ酸である。ある特定の実施形態では、天然に存在しないペプチドは、環化される。ある特定の実施形態では、天然に存在しないペプチドは、二量体化される。

【0081】

ある特定の実施形態では、リガンドは、以下に記載されるアミノ酸配列を含む（例えば、それから本質的になる、またはそれからなる）天然に存在しないペプチドから本質的になり（例えば、それからなり）、

SDDLEFWCHVXY（配列番号114）

式中、Xは、任意のアミノ酸または非天然のアミノ酸である。ある特定の実施形態では、Xは、2-アミノデカン酸である。ある特定の実施形態では、Xは、L-2-アミノヘキサデカン酸である。ある特定の実施形態では、Xは、リジンイブシロンアミノ基にカップリングされたオクタン酸を含むリジンの誘導体である。ある特定の実施形態では、Xは、リジンイブシロンアミノ基にカップリングされたデカン酸を含むリジンの誘導体である。ある特定の実施形態では、Xは、リジンイブシロンアミノ基にカップリングされたドデカン酸を含むリジンの誘導体である。ある特定の実施形態では、Xは、リジンイブシロンアミノ基にカップリングされたテトラデカン酸を含むリジンの誘導体である。ある特定の実施形態では、Xは、リジンイブシロンアミノ基にカップリングされたヘキサデカン酸を含むリジンの誘導体である。ある特定の実施形態では、Xは、2-アミノ-6-ヒドロキシヘキサン酸である。ある特定の実施形態では、Xは、オキソヘキサン酸ト-ブトキシである。ある特定の実施形態では、Xは、S-ベンジル-L-ホモシステイン（すなわち、チオエーテル結合を介してベンジル基にカップリングされたホモシステイン）である。ある特定の実施形態では、Xは、CAS# 374899-60-2によって表される非天然のアミノ酸である。ある特定の実施形態では、Xは、2-アミノ-3-デシルオキシプロピオン酸である。ある特定の実施形態では、Xは、L-ホモフェニルアラニンである。ある特定の実施形態では、Xは、2-アミノフェニルペンタン酸である。ある特定の実施形態では、Xは、L- α -アミノアジピン酸 Δ -tert-ブチルエステルである。ある特定の実施形態では、Xは、CAS# 159751-47-0によって表される非天然のアミノ酸である。ある特定の実施形態では、Xは、ブチルリジンである。ある特定の実施形態では、Xは、ペンチルリジンである。ある特定の実施形態では、Xは、アミノ-8-（ベンジルオキシ）-8-オキソオクタン酸である。ある特定の実施形態では、Xは、CAS# 182059-59-2によって表される非天然のアミノ酸である。ある特定の実施形態では、Xは、L-2-アミノヘプタン酸である。ある特定の実施形態では、Xは、L-3-スチルアラニンである。ある特定の実施形態では、Xは、6-ヒドロキシ-L-ノルロイシンである。ある特定の実施形態では、天然に存在しないペプチドは、環化される。ある特定の実施形態では、天然に存在しないペプチドは、二量体化される。

【0082】

ある特定の実施形態では、リガンドは、以下に記載されるアミノ酸配列を含む（例えば、それから本質的になる、またはそれからなる）天然に存在しないペプチドから本質的になり（例えば、それからなり）、

SDDXEFWCHVMY（配列番号115）

式中、Xは、任意のアミノ酸または非天然のアミノ酸である。ある特定の実施形態では、Xは、リジンイプシロンアミノ基にカップリングされたオクタン酸を含むリジンの誘導体である。ある特定の実施形態では、Xは、リジンイプシロンアミノ基にカップリングされたデカン酸を含むリジンの誘導体である。ある特定の実施形態では、Xは、リジンイプシロンアミノ基にカップリングされたドデカン酸を含むリジンの誘導体である。ある特定の実施形態では、Xは、ホモフェニルアラニンである。ある特定の実施形態では、Xは、L-ホモロイシンである。ある特定の実施形態では、Xは、CAS # 180414-94-2によって表される非天然のアミノ酸である。ある特定の実施形態では、Xは、t-ブチルアラニンである。ある特定の実施形態では、Xは、シクロブチルアラニンである。ある特定の実施形態では、Xは、シクロペンチルLアラニンである。ある特定の実施形態では、Xは、3-スチリルフェニルアラニンである。ある特定の実施形態では、Xは、ビフェニルである。ある特定の実施形態では、Xは、L-2-アミノヘプタン酸である。ある特定の実施形態では、Xは、L-2-アミノオクタン酸である。ある特定の実施形態では、Xは、L-2-アミノデカン酸である。ある特定の実施形態では、Xは、3-キノリル-L-アラニンである。ある特定の実施形態では、Xは、4-キノリル-L-アラニンである。ある特定の実施形態では、Xは、トリフルオロメチル-L-ロイシンである。ある特定の実施形態では、Xは、シクロヘキシル-L-アラニンである。ある特定の実施形態では、Xは、F（フェニルアラニン）である。ある特定の実施形態では、天然に存在しないペプチドは、環化される。ある特定の実施形態では、天然に存在しないペプチドは、二量体化される。

10

20

【0083】

ある特定の実施形態では、リガンドは、以下に記載されるアミノ酸配列を含む（例えば、それから本質的になる、またはそれからなる）天然に存在しないペプチドから本質的になり（例えば、それからなり）、

SDDX₁EFWCHVX₂Y（配列番号116）

式中、X₁及びX₂の各々は、任意のアミノ酸または非天然のアミノ酸である。ある特定の実施形態では、X₁は、L-ホモフェニルアラニンであり、X₂は、リジンイプシロンアミノ基にカップリングされたテトラデカン酸を含むリジンの誘導体である。ある特定の実施形態では、天然に存在しないペプチドは、環化される。ある特定の実施形態では、天然に存在しないペプチドは、二量体化される。

30

【0084】

ある特定の実施形態では、リガンドは、以下に記載されるアミノ酸配列を含む（例えば、それから本質的になる、またはそれからなる）天然に存在しないペプチドから本質的になり（例えば、それからなり）、

SDDL EFWCHXMY（配列番号117）

式中、Xは、任意のアミノ酸または非天然のアミノ酸である。ある特定の実施形態では、Xは、Lである。ある特定の実施形態では、Xは、Iである。ある特定の実施形態では、Xは、Tである。ある特定の実施形態では、Xは、3-アミノ-L-アラニンである。ある特定の実施形態では、Xは、CAS # 181954-34-7によって表される非天然のアミノ酸である。ある特定の実施形態では、Xは、βヒドロキシノルバリンである。ある特定の実施形態では、Xは、t-ブチルアラニンである。ある特定の実施形態では、Xは、t-ブチル-L-アラニンである。ある特定の実施形態では、Xは、シクロブチル-L-グリシンである。ある特定の実施形態では、Xは、シクロプロピル-L-アラニンである。ある特定の実施形態では、Xは、シクロペンチル-L-アラニンである。ある特定の実施形態では、天然に存在しないペプチドは、環化される。ある特定の実施形態では、天然に存在しないペプチドは、二量体化される。

40

【0085】

ある特定の実施形態では、リガンドは、以下に記載されるアミノ酸配列を含む（例えば、それから本質的になる、またはそれからなる）天然に存在しないペプチドから本質的になり（例えば、それからなり）、

50

L P S D D L E F W C H V M X (配列番号 1 1 8)

式中、Xは、任意のアミノ酸または非天然のアミノ酸である。ある特定の実施形態では、Xは、4-(トリフルオロメチル)-L-フェニルアラニンである。ある特定の実施形態では、Xは、4-クロロ-L-フェニルアラニンである。ある特定の実施形態では、Xは、4-メチル-L-フェニルアラニンである。ある特定の実施形態では、Xは、3-(3-キノリニル)-L-アラニンである。ある特定の実施形態では、Xは、3-(2-キノリニル)-L-アラニンである。ある特定の実施形態では、Xは、3-(2-キノキサリニル)-L-アラニンである。ある特定の実施形態では、Xは、3-[3,4-ビス(トリフルオロメチル)フェニル]-L-アラニンである。ある特定の実施形態では、Xは、3,4-ジフルオロ-L-フェニルアラニンである。ある特定の実施形態では、天然に存在しないペプチドは、環化される。ある特定の実施形態では、天然に存在しないペプチドは、二量体化される。

10

【0086】

ある特定の実施形態では、リガンドは、以下に記載されるアミノ酸配列を含む(例えば、それから本質的になる、またはそれからなる)天然に存在しないペプチドから本質的になり(例えば、それからなり)、

S D X L E F W C H V M Y (配列番号 1 1 9)

式中、Xは、任意のアミノ酸または非天然のアミノ酸である。ある特定の実施形態では、Xは、E(グルタミン酸)である。ある特定の実施形態では、Xは、L- α -アミノアジピン酸である。ある特定の実施形態では、Xは、C A S # 2 5 0 3 8 4-77-1によって表される非天然のアミノ酸である。ある特定の実施形態では、天然に存在しないペプチドは、環化される。ある特定の実施形態では、天然に存在しないペプチドは、二量体化される。

20

【0087】

ある特定の実施形態では、リガンドは、以下に記載されるアミノ酸配列を含む(例えば、それから本質的になる、またはそれからなる)天然に存在しないペプチドから本質的になり(例えば、それからなり)、

L P S D X L E F W C H V M Y (配列番号 1 2 0)

式中、Xは、任意のアミノ酸または非天然のアミノ酸である。ある特定の実施形態では、Xは、Q(グルタミン)である。ある特定の実施形態では、天然に存在しないペプチドは、環化される。ある特定の実施形態では、天然に存在しないペプチドは、二量体化される。

30

【0088】

ある特定の実施形態では、リガンドは、以下に記載されるアミノ酸配列を含む(例えば、それから本質的になる、またはそれからなる)天然に存在しないペプチドから本質的になり(例えば、それからなり)、

S D D L E X W C H V M Y (配列番号 1 2 1)

式中、Xは、任意のアミノ酸または非天然のアミノ酸である。ある特定の実施形態では、Xは、4-クロロ-L-フェニルアラニンである。ある特定の実施形態では、天然に存在しないペプチドは、環化される。ある特定の実施形態では、天然に存在しないペプチドは、二量体化される。

40

【0089】

ある特定の実施形態では、リガンドは、以下に記載されるアミノ酸配列を含む(例えば、それから本質的になる、またはそれからなる)天然に存在しないペプチドから本質的になり(例えば、それからなり)、

X D D L E F W C H V M Y (配列番号 1 2 2)

式中、Xは、任意のアミノ酸または非天然のアミノ酸である。ある特定の実施形態では、Xは、T(トレオニン)である。ある特定の実施形態では、Xは、 β ヒドロキシルノルバリンである。ある特定の実施形態では、天然に存在しないペプチドは、環化される。ある特定の実施形態では、天然に存在しないペプチドは、二量体化される。

50

【0090】

ある特定の実施形態では、リガンドは、以下に記載されるアミノ酸配列を含む（例えば、それから本質的になる、またはそれからなる）天然に存在しないペプチドから本質的になり（例えば、それからなり）、

L P S D D L E F W X H V M Y（配列番号123）

式中、Xは、任意のアミノ酸または非天然のアミノ酸である。ある特定の実施形態では、Xは、A（アラニン）である。ある特定の実施形態では、天然に存在しないペプチドは、環化される。ある特定の実施形態では、天然に存在しないペプチドは、二量体化される。

【0091】

ある特定の実施形態では、本明細書で提供されるリガンドは、アミノ酸配列 L P S D D L E F W C H V M Y（配列番号13）を含む天然に存在しないペプチドを含む。ある特定の
10
実施形態では、本明細書で提供されるリガンドは、アミノ酸配列 L P S D D L E F W C H V M Y（配列番号13）からなるペプチドを含む。ある特定の実施形態では、本明細書
20
で提供されるリガンドは、アミノ酸配列 L P S D D L E F W C H V M Y（配列番号13）を含む天然に存在しないペプチドからなる。ある特定の実施形態では、本明細書で提供さ
れるリガンドは、アミノ酸配列 L P S D D L E F W C H V M Y（配列番号13）からなる天然に存在しないペプチドからなる。ある特定の実施形態では、ペプチドは、例えば、M
a h o n e t a l.（2012）Drug Discovery Today：Tech. 9：e57-e62、Forood et al.（1993）Proc Natl Acad Sci U. S. A. 90：838-842、Klein（2014）Med
Chem Lett. 5：838-839、及びそれに引用される参考文献に記載
30
されるように、そのαらせん構造を核形成または安定化するような方法で修飾される。ある特定の実施形態では、ペプチドは、ステープルペプチドである。ある特定の実施形態で
は、ペプチドは、環化される。ある特定の実施形態では、ペプチドは、二量体化される。

【0092】

ある特定の実施形態では、本明細書で提供されるリガンドは、アミノ酸配列 S D D L E F W C H V M Y（配列番号99）を含む天然に存在しないペプチドを含む。ある特定の
40
実施形態では、本明細書で提供されるリガンドは、アミノ酸配列 S D D L E F W C H V M Y（配列番号99）からなる天然に存在しないペプチドを含む。ある特定の実施形態では、
50
本明細書で提供されるリガンドは、アミノ酸配列 S D D L E F W C H V M Y（配列番号99）を含む天然に存在しないペプチドを含む。ある特定の実施形態では、本明細書で提供
されるリガンドは、アミノ酸配列 S D D L E F W C H V M Y（配列番号99）からなる天然に存在しないペプチドを含む。ある特定の実施形態では、ペプチドは、例えば、M
a h o n e t a l.（2012）Drug Discovery Today：Tech. 9：e57-e62、Forood et al.（1993）Proc Natl Acad Sci U. S. A. 90：838-842、Klein（2014）Med
Chem Lett. 5：838-839、及びそれに引用される参考文献に記載され
るように、そのαらせん構造を核形成または安定化するような方法で修飾される。ある特
60
定の実施形態では、ペプチドは、ステープルペプチドである。ある特定の実施形態では、
70
ペプチドは、環化される。ある特定の実施形態では、ペプチドは、二量体化される。

【0093】

ある特定の実施形態では、リガンドは、L P S D D L E F W C H V M Y（配列番号13）の変異形である天然に存在しないペプチドを含む（例えば、それから本質的になる、またはそれからなる）。ある特定の
80
実施形態では、かかるペプチド変異形は、配列番号13に少なくとも1つ、少なくとも2つ、少なくとも3つ、少なくとも4つ、または少なくとも5つのアミノ酸置換を含む。ある特定の
90
実施形態では、配列番号13の位置（複数可）1、2、3、7、及び／または8におけるアミノ酸（複数可）が置換される。

【0094】

ある特定の実施形態では、リガンドは、S D D L E F W C H V M Y（配列番号99）の変異形である天然に存在しないペプチドを含む（例えば、それから本質的になる、または
50

それからなる)。ある特定の実施形態では、かかる変異形は、配列番号 99 に少なくとも 1 つ、少なくとも 2 つ、または少なくとも 3 つのアミノ酸置換を含む。ある特定の実施形態では、配列番号 99 の位置（複数可）1、5、及び／または 6 におけるアミノ酸（複数可）が置換される。

【0095】

ある特定の実施形態では、アミノ酸置換（複数可）は、保存的アミノ酸置換（複数可）である。ある特定の実施形態では、アミノ酸置換（複数可）は、非天然のアミノ酸（複数可）での置換（複数可）である。ある特定の実施形態では、アミノ酸置換は、天然に存在しないペプチドが F Z D 7 の C R D に結合する能力を実質的に低減しない。例えば、F Z D 7 C R D 結合親和性を実質的に低減しない保存的改変（例えば、本明細書に提供されるような保存的置換）が行われ得る。配列番号 13 または配列番号 99 の変異形を含む（例えば、それから本質的になる、またはそれからなる）リガンドの結合親和性は、以下の実施例に記載される方法を使用して評価することができる。

10

【0096】

保存的置換は、「保存的置換」という見出しで以下の表 1 に示される。より実質的な変化は、表 1 において、「例示的な置換」の見出しの下に提供され、またアミノ酸側鎖クラスを参照して以下に更に記載される通りである。アミノ酸置換は、配列番号 13 または配列番号 99 の変異形に導入されてもよく、産生物は、実施例に記載される方法を使用して、所望の活性、例えば F Z D 7 の C R D への保持／改善された結合についてスクリーニングされ得る。

20

表 1：保存的置換

元の残基	例示的な置換	好ましい置換
Ala (A)	Val、Leu、Ile	Val
Arg (R)	Lys、Gln、Asn	Lys
Asn (N)	Gln、His、Asp、Lys、Arg	Gln
Asp (D)	Glu、Asn	Glu
Cys (C)	Ser、Ala	Ser
Gln (Q)	Asn、Glu	Asn
Glu (E)	Asp、Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn、Gln、Lys、Arg	Arg
Ile (I)	Leu、Val、Met、Ala、Phe、ノルロイシン	Leu
Leu (L)	ノルロイシン、Ile、Val、Met、Ala、Phe	Ile
Lys (K)	Arg、Gln、Asn	Arg
Met (M)	Leu、Phe、Ile	Leu
Phe (F)	Trp、Leu、Val、Ile、Ala、Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val、Ser	Ser
Trp (W)	Tyr、Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp、Phe、Thr、Ser	Phe
Val (V)	Ile、Leu、Met、Phe、Ala、ノルロイシン	Leu

30

40

50

【0097】

非保存的置換は、これらのクラスのうちの1つのメンバーを別のクラスと交換することに伴う。配列番号13または配列番号99の例示的な置換型変異形は、例えば、実施例に記載されるものなどのファージディスプレイに基づく親和性成熟技法を使用して好都合に生成され得る親和性成熟ペプチドである。簡潔には、本明細書に記載されるペプチド中の1つ以上の残基が改変（すなわち、付加、欠失、または置換）され、変異形ペプチドがファージ上に提示され、FZD7 CRD結合親和性についてスクリーニングされる。親和性成熟のある特定の実施形態では、多様な方法（例えば、エラープローンPCRまたはオリゴヌクレオチド指向性変異導入法）のうちのいずれかによって、成熟のために選択される可変遺伝子に多様性が導入される。次いで、二次ライブラリが創出される。次いで、そのライブラリをスクリーニングして、FZD7 CRDに対して所望の親和性を有する任意のペプチド変異形を特定する。ある特定の実施形態では、多様性の導入は、本明細書に記載されるペプチド中の1つ以上の残基をランダム化することを伴う。ある特定の実施形態では、FZ7のCRDへの結合に関与する本明細書に記載されるペプチド中の残基は、例えば、アラニン系統の変異導入法、セリン系統の変異導入法、バリン系統の変異導入法、アスパラギン酸系統の変異導入法、またはモデリングを使用して特定され得る。

10

【0098】

いくつかの実施形態では、リガンドは、LPSDDAEFWCHVMY（配列番号109）、LPSDDL E FACHVMY（配列番号110）、LPSDDL E FWCHVA Y（配列番号111）、LPSDDL E FWCHVMA（配列番号112）、LPSDQL E FWCHVMY（配列番号131）、またはLPSDDL E FWAHVMY（配列番号133）に記載されるアミノ酸配列を含む（例えば、それから本質的になる、またはそれからなる）天然に存在しないペプチドを含む（例えば、それから本質的になる、またはそれからなる）。ある特定の実施形態では、ペプチドのC末端カルボキシル基は、アミド化される。ある特定の実施形態では、ペプチドのN末端アミンは、アセチル化される。ある特定の実施形態では、ペプチドのC末端カルボキシル基は、アミド化され、かつペプチドのN末端アミンは、アセチル化される。ある特定の実施形態では、天然に存在しないペプチドは、環化される。ある特定の実施形態では、天然に存在しないペプチドは、二量体化される。ある特定の実施形態では、二量体中のペプチドは、例えば、ペプチド中のC10間のジスルフィド結合によって結合される。ある特定の実施形態では、二量体中のペプチドは、本明細書の別の場所に記載される化学リンカーなどの化学リンカーによって結合される。ある特定の実施形態では、二量体中のペプチドは、スパーサーペプチド（例えば、介在ペプチド）に融合される。

20

30

【0099】

いくつかの実施形態では、リガンドは、SDDLEFWCHVEY（配列番号125）、SDDLEFWCHLMY（配列番号126）、SDDLEFWCHIMY（配列番号127）、SDDLEFWCHTMY（配列番号128）、SDDFEFWCHVMY（配列番号129）、SDELEFWCHVMY（配列番号130）、またはTDDLEFWCHVMY（配列番号132）に記載されるアミノ酸配列を含む（例えば、それから本質的になる、またはそれからなる）天然に存在しないペプチドを含む（例えば、それから本質的になる、またはそれからなる）。ある特定の実施形態では、ペプチドのC末端カルボキシル基は、アミド化される。ある特定の実施形態では、ペプチドのN末端アミンは、アセチル化される。ある特定の実施形態では、ペプチドのC末端カルボキシル基は、アミド化され、かつペプチドのN末端アミンは、アセチル化される。ある特定の実施形態では、天然に存在しないペプチドは、環化される。ある特定の実施形態では、天然に存在しないペプチドは、二量体化される。ある特定の実施形態では、二量体中のペプチドは、例えば、ペプチド中のC8間のジスルフィド結合によって結合される。ある特定の実施形態では、二量体中のペプチドは、本明細書の別の場所に記載される化学リンカーなどの化学リンカーによって結合される。ある特定の実施形態では、二量体中のペプチドは、スパーサーペプチド（例えば、介在ペプチド）に融合される。

40

50

【0100】

追加としてまたは代替として、ある特定の実施形態では、リガンドは、L P S D D L E F W C H V M Y（配列番号13）の変異形またはS D D L E F W C H V M Y（配列番号99）の変異形であるペプチドを含み（例えば、それから本質的になり、またはそれからなり）、ここで1つ以上のアミノ酸が、非天然のアミノ酸で置換される。追加としてまたは代替として、ある特定の実施形態では、リガンドは、L P S D D L E F W C H V M Y（配列番号13）の変異形またはS D D L E F W C H V M Y（配列番号99）の変異形であるペプチドを含み（例えば、それから本質的になり、またはそれからなり）、ここで1つ以上の非天然のアミノ酸残基が（例えば、N末端において、C末端において、またはN末端及びC末端の両方において）付加される。ある特定の実施形態では、非天然のアミノ酸は、本明細書の別の場所に記載される非天然のアミノ酸である。

10

【0101】

ある特定の実施形態では、リガンドは、L P S D D L E F W C H V M Y（配列番号13）の変異形またはS D D L E F W C H V M Y（配列番号99）の変異形であるペプチドを含み（例えば、それから本質的になり、またはそれからなり）、ここでペプチドのC末端カルボキシル基が、アミド化される。ある特定の実施形態では、リガンドは、L P S D D L E F W C H V M Y（配列番号13）の変異形またはS D D L E F W C H V M Y（配列番号99）の変異形であるペプチドを含み（例えば、それから本質的になり、またはそれからなり）、ここでペプチドのN末端アミンが、アセチル化される。ある特定の実施形態では、リガンドは、L P S D D L E F W C H V M Y（配列番号13）の変異形またはS D D L E F W C H V M Y（配列番号99）の変異形であるペプチドを含み（例えば、それから本質的になり、またはそれからなり）、ここでペプチドのC末端カルボキシル基が、アミド化され、かつペプチドのN末端アミンが、アセチル化される。

20

【0102】

ある特定の実施形態では、本明細書で提供されるリガンドは、F Z D 7のCRDと特異的に結合する二量体化された天然に存在しないペプチドを含む（例えば、それから本質的になる、またはそれからなる）。ある特定の実施形態では、二量体中の各ペプチドは、配列番号13に記載されるアミノ酸を含む（例えば、それから本質的になる、またはそれからなる）。ある特定の実施形態では、二量体中のペプチドは、例えば、配列番号13のC10間のジスルフィド結合によって結合される。ある特定の実施形態では、二量体中の各ペプチドは、配列番号99に記載されるアミノ酸を含む（例えば、それから本質的になる、またはそれからなる）。ある特定の実施形態では、二量体中のペプチドは、例えば、配列番号99のC8間のジスルフィド結合によって結合される。ある特定の実施形態では、二量体中のペプチドは、本明細書の別の場所に記載される化学リンカーなどの化学リンカーによって結合される。ある特定の実施形態では、二量体中のペプチドは、スパーサーペプチド（例えば、介在ペプチド）に融合される。

30

【0103】

ある特定の実施形態では、リガンドは、2つの天然に存在しないペプチドを含む（例えば、それから本質的になる、またはそれからなる）。ある特定の実施形態では、第1の天然に存在しないペプチドは、S D D L E F W C H V M Y X（配列番号134）に記載されるアミノ酸配列を含み（例えば、それから本質的になり、またはそれからなり）、式中、Xは、L-ホモプロパルギルグリシンであり、第2の天然に存在しないペプチドは、S D D L X F W C H V M Y（配列番号135）に記載されるアミノ酸配列を含み（例えば、それから本質的になり、またはそれからなり）、式中、Xは、5-アジド-L-オルニチンまたはS-アセトアミノメチル-L-システインである。ある特定の実施形態では、第1及び第2の天然に存在しないペプチドは、クリック化学を介して非天然のアミノ酸を反応させることによって共有結合される。ある特定の実施形態では、第1の天然に存在しないペプチドは、S D D L E F W C H V M Y X（配列番号134）に記載されるアミノ酸配列を含み（例えば、それから本質的になり、またはそれからなり）、式中、Xは、L-ビスホモプロパルギルグリシンであり、第2の天然に存在しないペプチドは、S D D L X F W

40

50

CHVMY（配列番号135）に記載されるアミノ酸配列を含み（例えば、それから本質的になり、またはそれからなり）、式中、Xは、アジド-ホモアラニンまたはS-アセトアミノメチル-L-システインである。ある特定の実施形態では、第1及び第2の天然に存在しないペプチドは、クリック化学を介して非天然のアミノ酸を反応させることによって共有結合される。

【0104】

ある特定の実施形態では、リガンドは、SDDLEFWXHVMY（配列番号124）に記載されるアミノ酸配列を含む（例えば、それから本質的になる、またはそれからなる）天然に存在しないペプチドを含み（例えば、それから本質的になり、またはそれからなり）、式中、Xは、L-セレノシステインである。ある特定の実施形態では、ペプチドは、L-セレノシステインを介して環化及び／または二量体化される。

10

【0105】

ある特定の実施形態では、本明細書で提供されるリガンドは、配列番号1～12、14～31、及び39～98のうちのいずれか1つに記載されるアミノ酸配列を含む天然に存在しないペプチド（直鎖状ペプチドなど）を含む。ある特定の実施形態では、本明細書で提供されるリガンドは、配列番号1～12、14～31、及び39～98のうちのいずれか1つに記載されるアミノ酸配列からなる天然に存在しないペプチド（直鎖状ペプチドなど）を含む。ある特定の実施形態では、本明細書で提供されるリガンドは、配列番号1～12、14～31、及び39～98のうちのいずれか1つに記載されるアミノ酸配列を含む天然に存在しないペプチド（直鎖状ペプチドなど）である。ある特定の実施形態では、本明細書で提供されるリガンドは、配列番号1～12、14～31、及び39～98のうちのいずれか1つに記載されるアミノ酸配列からなる天然に存在しないペプチド（直鎖状ペプチドなど）である。

20

【0106】

ある特定の実施形態では、本明細書で提供されるリガンドは、配列番号32～38のうちのいずれか1つに記載されるアミノ酸配列を含む天然に存在しないもの（環状ペプチドなど）を含む。ある特定の実施形態では、本明細書で提供されるリガンドは、配列番号32～38のうちのいずれか1つに記載されるアミノ酸配列からなる天然に存在しないペプチド（環状ペプチドなど）を含む。ある特定の実施形態では、本明細書で提供されるリガンドは、配列番号32～38のうちのいずれか1つに記載されるアミノ酸配列を含む天然に存在しないペプチド（環状ペプチドなど）である。ある特定の実施形態では、本明細書で提供されるリガンドは、配列番号32～38のうちのいずれか1つに記載されるアミノ酸配列からなる天然に存在しないペプチド（環状ペプチドなど）である。

30

【0107】

配列番号1～12及び14～98のアミノ酸配列は、以下の表2に提供される。

表2

配列番号		配列番号		配列番号	
1	YEHLHDLMDLIRPW	3 6	FDFCTVMPHFYICPGD	7 0	AASDDLEAWCHVMY
2	TYFDDICNLILPWANP	3 7	FDFCSVMPHFYICPGD	7 1	APSDDLASWCHVMY
3	PQDLLDWCHYMIVSSD	3 8	HLSDVFCSDWCDLVFW	7 2	APADDLEFWCHVMY
4	ACSYVIDLWNQCLT	3 9	VAADDLAAWCHVMY	7 3	APSDDLAAWCHVMY
5	PCSVICLPDWSSLLFI	4 0	AASDDLEFWCHVMY	7 4	APADDLAFWCHVVY
6	DTDLDHQWCLWFT	4 1	AASDDLEFWCHVMY	7 5	APSDDLEAWCDVMY
7	FWMLLQEGFAFWFP	4 2	APSDDVAFWCHVMY	7 6	VPSDDLEAWCDVMY
8	FELLLDLGDLIRLW	4 3	APADDVEFWCHVMY	7 7	AASDDLAFWCHVMY
9	ACSYVIDLWNLCRL	4 4	APSDDLEFWCHVMY	7 8	VPADDLASWCDVMY
1 0	ASELHDWCRMMFPW	4 5	APADDLEAWCHVMY	7 9	LPSADLESWCHVMY
1 1	ISLIEAMIALDRVF	4 6	APSDDLEFWCHAMY	8 0	AAADDLAFWCHVMY
1 2	PPNVHEGCWSMFPW	4 7	VASDDLEAWCHVMY	8 1	LASDDLEFWCHVMY
1 4	DTDLLQWCLWFT	4 8	AAADDLEFWCHVMY	8 2	LPAADLAAWCHVMY
1 5	FWMQLQDGFAIWF	4 9	AASDDLAAWCHVMY	8 3	VPSADLETWCHVMY
1 6	PCSVICLPDWSSLLFI	5 0	AASDDLESWCHVMY	8 4	LPADDLAAWCHVMY
1 7	GDFWPGSLLWEILV	5 1	APADDLAFWCHVMY	8 5	PPADDLAFWCDVMY
1 8	ILTFEYFWILGLIL	5 2	LPADDLAVWCDVMY	8 6	VASDDLASWCHVVY
1 9	LPLFFLSYVL	5 3	LPSDDLESWCHVMY	8 7	AAADDVASWCHVMY
2 0	FLPDQHSFLPWGEP	5 4	AAADDLEVWCHVMY	8 8	VAADDLAFWCDVMY
2 1	SCQMWSNLRVLFSLY	5 5	VAADALEFWCHVMY	8 9	APADDLEFWCHAMY
2 2	VFVPFSELTSLC	5 6	APSDDLAAWCHVVY	9 0	APADDLAFWCDVMY
2 3	IWFKGRFVEFSSLV	5 7	AAADDLAAWCDVMY	9 1	APSDDLAFWCDVMY
2 4	NAFWRDQCLEWFIICL	5 8	VASDDLEFWCHVMY	9 2	LPADDLAFWCDVMY
2 5	EHDLLLRAMNSFVLIF	5 9	AAADDLEAWCAVMY	9 3	AAADDLAFWCDVMY
2 6	FCENPYIICW	6 0	LAADDLESWCHVMY	9 4	LPADDLEFWCHVMY
2 7	NPPPECFLSK	6 1	APADDLASWCHVMY	9 5	VPSDDLEFWCAVMY
2 8	VFFYHSLFFIKLILDP	6 2	VASDDLASWCHAMY	9 6	APADDLESWCHVMY
2 9	ERRVCYPWFVFSQP	6 3	VPADDLASWCHVMY	9 7	APSDDLAFWCHVVY
3 0	LSSGKKVSSYWFWFW	6 4	APADDLEFWCHVVY	9 8	AAADDLAAWCHVVY
3 1	FWFDFWFG	6 5	VPSDDLAFWCHVMY		
3 2	SSDFSGCLSWCDLIFG	6 6	VPADALAVWCDVMY		
3 3	FDFCSVMPQFIYCPGD	6 7	VPADDLAFWCHVMY		
3 4	HLSDVCCSDWCDLVFW	6 8	VPSDDLASWCHVMY		
3 5	TSDFSWCLSWCDLIFW	6 9	VPSADLESWCHVMY		

10

20

30

40

【0108】

ある特定の実施形態では、本明細書で提供されるリガンドは、脂質に複合される F Z D 7 の C R D と結合する、または特異的に結合する、本明細書に記載される天然に存在しないペプチドを含む（例えば、それから本質的になる、またはそれからなる）。ある特定の実施形態では、脂質は、12～20個の炭素原子を含む、長鎖脂肪酸（すなわち、L C F A）である。ある特定の実施形態では、脂質は、6個以下の炭素原子を含む、短鎖脂肪酸（すなわち、S C F A）である。ある特定の実施形態では、脂質は、飽和脂肪酸である。ある特定の実施形態では、脂質は、不飽和脂肪酸である。ある特定の実施形態では、脂質

50

は、芳香族テールを含む。ある特定の実施形態では、脂質は、オクタン酸である。ある特定の実施形態では、脂質は、デカン酸である。ある特定の実施形態では、脂質は、ドデカン酸である。ある特定の実施形態では、脂質は、テトラデカン酸である。ある特定の実施形態では、脂質は、ヘキサデカン酸である。ある特定の実施形態では、脂質は、アミノ-6-ヒドロキシヘキサン酸である。ある特定の実施形態では、脂質は、アミノ-6-ヒドロキシヘキサン酸である。ある特定の実施形態では、脂質は、アミノフェニルペンタン酸である。ある特定の実施形態では、脂質は、L- α -アミノアジピン酸 Δ -tert-ブチルエステルである。ある特定の実施形態では、脂質は、アミノ-8-(ベンジルオキシ)-8-オキソオクタン酸である。ある特定の実施形態では、脂質は、2-アミノヘプタン酸である。ある特定の実施形態では、脂質は、L-2-アミノデカン酸である。ある特定の実施形態では、脂質は、2-アミノオクタン酸である。脂質をペプチドに連結する方法は、当該技術分野において周知であり、典型的には、標準アミドカップリング条件下で、脂質のカルボン酸基をペプチド中のリジン側鎖のイプシロンアミンと反応させることを含む。追加の方法は、Gerauer, M., Koch, S., Brunsveld, L. and Waldmann, H. 2008. Lipidated peptide synthesis. Wiley Encyclopedia of Chemical Biology. 1-11において概説されている。ある特定の実施形態では、脂質カップリングされたアミノ酸は、本明細書の別の場所に記載されるように、標準ペプチド合成技法を使用してペプチドに組み込まれる。

10

【0109】

20

ある特定の実施形態では、本明細書で提供されるリガンドは、本明細書に記載される天然に存在しないペプチドを含み（例えば、それから本質的になり、またはそれからなり）、ここでペプチドのC末端カルボキシル基は、アミド化される。ある特定の実施形態では、本明細書で提供されるリガンドは、本明細書に記載される天然に存在しないペプチドを含み（例えば、それから本質的になり、またはそれからなり）、ここでペプチドのN末端アミンは、アセチル化される。ある特定の実施形態では、本明細書で提供されるリガンドは、本明細書に記載される天然に存在しないペプチドを含み（例えば、それから本質的になり、またはそれからなり）、ここでペプチドのC末端カルボキシル基は、アミド化され、かつペプチドのN末端アミンは、アセチル化される。

【0110】

30

ある特定の実施形態では、本明細書で提供されるリガンドは、核酸分子、小分子、模倣剤、合成薬、無機分子、及び有機分子に（例えば、共役的または非共役的に）複合されるFZD7のCRDと結合する、または特異的に結合する、本明細書に記載される天然に存在しないペプチドを含む（例えば、それから本質的になる、またはそれからなる）。ある特定の実施形態では、本明細書で提供されるリガンドは、異種タンパク質またはポリペプチド（またはその断片、少なくとも10、少なくとも20、少なくとも30、少なくとも40、少なくとも50、少なくとも60、少なくとも70、少なくとも80、少なくとも90、もしくは少なくとも100アミノ酸のポリペプチド）に（例えば、共役的または非共役的に）複合されるFZD7のCRDと結合する、または特異的に結合する、本明細書に記載される天然に存在しないペプチドを含む（例えば、それから本質的になる、またはそれからなる）。

40

【0111】

ある特定の実施形態では、本明細書で提供されるリガンドは、化学療法剤などの細胞毒性薬、毒素（例えば、細菌、真菌、植物、もしくは動物起源の酵素的に活性な毒素、またはそれらの断片）あるいは放射活性アイソトープ（すなわち、放射性複合体）に複合されるFZD7のCRDと結合する、または特異的に結合する、本明細書に記載される天然に存在しないペプチドを含む（例えば、それから本質的になる、またはそれからなる）。

【0112】

使用され得る酵素的に活性な毒素及びそれらの断片としては、ジフテリアA鎖、ジフテリア毒素の非結合活性断片、外毒素A鎖（*Pseudomonas aeruginos*

50

a由来)、リシンA鎖、アブリンA鎖、モデシンA鎖、 α -サルシン、Aleurites fordiiタンパク質、ジアンチンタンパク質、Phytolacca americanaタンパク質(PAPI、PAPII、及びPAP-S)、Momordica charantia阻害剤、クルシン、クロチン、Saponaria officinalis阻害剤、ゲロニン、ミトゲリン、レストリクトシン、フェノマイシン、エノマイシン、ならびにトリコテセンが挙げられる。他の毒素としては、マイタンシン及びマイタンシノイド、カリケアミシン、ならびに他の細胞毒性薬が挙げられる。様々な放射性核種は、FZD1、FZD2、及び/またはFZD7のCRDと特異的に結合する本明細書で提供される天然に存在しないペプチドを含む(例えば、それから本質的になる、またはそれからなる)放射性複合リガンドの産生に使用可能である。例としては、 ^{212}Bi 、 ^{131}I 、 ^{131}In 、 ^{90}Y 、及び ^{186}Re が挙げられる。

【0113】

FZD7のCRDと結合する、または特異的に結合する、本明細書で提供される天然に存在しないペプチドを含む(例えば、それから本質的になる、またはそれからなる)リガンドと、例えば細胞毒性薬との複合体は、多様な二官能性タンパク質カップリング剤、例えば、N-スクシニミジル-3-(2-ピリジルジチオール)プロピオン酸塩(SPDP)、イミノチオラン(IT)、イミドエステルの二官能性誘導体(アジブイミド酸ジメチルHCLなど)、活性エステル(スベリン酸ジサクシニミジルなど)、アルデヒド(グルタレルデヒドなど)、ビス-アジド化合物(ビス(p-アジドベンゾイル)ヘキサンジアミンなど)、ビス-ジアゾニウム誘導体(ビス(p-ジアゾニウムベンゾイル)-エチレンジアミンなど)、ジイソシアネート(トリエン2,6-ジイソシアネートなど)、及びビス-活性フッ素化合物(1,5-ジフルオロ-2,4-ジニトロベンゼンなど)を使用して作製される。例えば、リシン免疫毒素は、Vitetta et al., Science, 238:1098(1987)に記載されるように調製され得る。炭素14標識1-イソチオシアネートベンジル-3-メチルジエチレントリアミンペンタ酢酸(MX-DTPA)は、FZD7のCRDと結合する、または特異的に結合する、本明細書で提供される天然に存在しないペプチドを含む(例えば、それから本質的になる、またはそれからなる)リガンドへの放射性核種の複合のための例示的なキレート剤である。WO94/11026を参照されたい。

【0114】

ある特定の実施形態では、FZD7のCRDと結合する、または特異的に結合する、本明細書で提供される天然に存在しないペプチドを含む(例えば、それから本質的になる、またはそれからなる)リガンドは、複合のための反応性基を提供するように操作される。ある特定の実施形態では、N末端及びC末端はまた、複合のための反応性基を提供するのに役立つ。ある特定の実施形態では、N末端は、1つの部分(例えば、限定されないが、PEG)に複合され、一方C末端は、別の部分(例えば、限定されないが、ビオチン)に複合されるか、またはその逆である。

【0115】

ある特定の実施形態では、FZD7のCRDと結合する、または特異的に結合する、本明細書で提供される天然に存在しないペプチドを含む(例えば、それから本質的になる、またはそれからなる)リガンドは、診断剤または検出可能な剤に複合され得る。かかるリガンド複合体は、臨床試験手順の一部として疾患の発達または進行をモニタリングまたは予後診断するため、例えば特定の治療法の有効性を決定するために有用であり得る。かかる診断及び検出は、FZD7のCRDと結合する、または特異的に結合する、本明細書で提供される天然に存在しないペプチドを含む(例えば、それから本質的になる、またはそれからなる)リガンドを、様々な酵素(例えば、限定されないが、ホスファタセ、ホスホリラーゼ、アルカリホスファターゼ、 β -ガラクトシダーゼ、またはアセチルコリンエステラーゼ)、補欠基(例えば、限定されないが、ストレプトアビジン/ビオチン及びアビジン/ビオチン)、蛍光材料(例えば、限定されないが、ウンベリフェロン、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、ジクロロトリアジニルア

ミンフルオレセイン、ダンシルクロリド、またはフィコエリスリン)、発光材料(例えば、限定されないが、ルミノール)、生物発光材料(例えば、限定されないが、ルシフェラーゼ、ルシフェリン、及びエクオリン)、放射活性材料(例えば、限定されないが、ヨウ素(^{131}I 、 ^{125}I 、 ^{123}I 、 ^{121}I)、炭素(^{14}C)、硫黄(^{35}S)、トリチウム(^3H)、インジウム(^{115}In 、 ^{113}In 、 ^{112}In 、 ^{111}In)、及びテクネチウム(^{99}Tc)、サリウム(^{201}Ti)、ガリウム(^{68}Ga 、 ^{67}Ga)、パラジウム(^{103}Pd)、モリブデン(^{99}Mo)、キセノン(^{133}Xe)、フッ素(^{18}F)、 ^{153}Sm 、 ^{177}Lu 、 ^{159}Gd 、 ^{149}Pm 、 ^{140}La 、 ^{175}Yb 、 ^{166}Ho 、 ^{90}Y 、 ^{47}Sc 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{142}Pr 、 ^{105}Rh 、 ^{97}Ru 、 ^{68}Ge 、 ^{57}Co 、 ^{65}Zn 、 ^{85}Sr 、 ^{32}P 、 ^{153}Gd 、 ^{169}Yb 、 ^{51}Cr 、 ^{54}Mn 、 ^{75}Se 、 ^{113}Sn 、及び ^{117}Tn)、様々なポジトロン放出トモグラフィーを使用するポジトロン放出金属、非放射活性常磁性金属イオン、ならびに放射標識されたまたは特定の放射性同位体に複合された分子を含むが、それらに限定されない検出可能な物質にカップリングすることによって達成され得る。

【0116】

また、治療部分に複合されたFZD7のCRDと結合する、または特異的に結合する、本明細書で提供される天然に存在しないペプチドを含む(例えば、それから本質的になる、またはそれからなる)リガンドも提供される。ある特定の実施形態では、FZD7のCRDと結合する、または特異的に結合する、本明細書で提供される天然に存在しないペプチドを含む(例えば、それから本質的になる、またはそれからなる)リガンドは、細胞毒、例えば細胞増殖抑制剤もしくは細胞破壊剤、治療剤、または放射活性金属イオン、例えば α 放出剤などの治療部分に複合され得る。細胞毒または細胞毒性薬として、細胞に有害な任意の薬剤が挙げられる。

【0117】

ある特定の実施形態では、FZD7のCRDと結合する、または特異的に結合する、本明細書で提供される天然に存在しないペプチドを含む(例えば、それから本質的になる、またはそれからなる)リガンドは、治療部分、例えば放射活性金属イオン、例えば α 放出剤、例えば ^{131}In 、 ^{131}Lu 、 ^{131}Y 、 ^{131}Ho 、 ^{131}Sm を含むが、これらに限定されない、放射性金属イオンをポリペプチドに複合するのに有用な ^{213}Bi または大環状キレート剤に複合される。ある特定の実施形態では、大環状キレート剤は、1, 4, 7, 10-テトラアザシクロデカン-N, N', N'', N'''-テトラ酢酸(DOTA)であり、これはリンカー分子を介して、FZD7のCRDと結合する、または特異的に結合する、本明細書で提供される天然に存在しないペプチドを含む(例えば、それから本質的になる、またはそれからなる)リガンドに付着され得る。かかるリンカー分子は、当該技術分野において一般に知られており、例えば、Denardo et al. (1998) Clin Cancer Res. 4, 2483-90、Peterson et al. (1999) Bioconj. Chem. 10, 553-557、及びZimmerman et al. (1999) Nucl. Med. Biol. 26, 943-50に記載されている。

【0118】

治療部分を抗体に複合するための技法は周知であり、FZD7のCRDと結合する、または特異的に結合する、本明細書で提供される天然に存在しないペプチドを含む(例えば、それから本質的になる、またはそれからなる)リガンドに適用され得る(例えば、Amo et al., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy, " in Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Reisfeld et al. (eds.), pp. 243-56. (Alan R. Liss, Inc. 1985)、Hellstrom et al., "Antibodies For Drug Delivery", in Controlled Drug Delivery (2nd Ed.), Robinson et al.

(eds.), pp. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987)、Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", in Monoclonal Antibodies 84: Biological And Clinical Applications, Pinchera et al. (eds.), pp. 475-506 (1985)、"Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radio labeled Antibody In Cancer Therapy", in Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy, Baldwin et al. (eds.), pp. 303-16 (Academic Press 1985)、及び Thorpe et al., 1982, Immunol. Rev. 62: 119-58 (を参照)。

10

【0119】

FZD7のCRDと結合する、または特異的に結合する、本明細書で提供される天然に存在しないペプチドを含む（例えば、それから本質的になる、またはそれからなる）リガンドに複合された治療部分または薬物は、対象における特定の障害に対する所望の予防的または治療的効果（複数可）を達成するために選択されるべきである。臨床医または他の医療従事者は、リガンドに複合するための治療部分または薬物を決定するときに、以下を考慮すべきである：疾患の性質、疾患の重症度、及び対象の状態。

20

【0120】

ある特定の実施形態では、FZD7のCRDと結合する、または特異的に結合する、本明細書で提供される天然に存在しないペプチドを含む（例えば、それから本質的になる、またはそれからなる）リガンドはまた固体支持体に付着され得、それは標的抗原のイムノアッセイまたは精製に特に有用である。かかる固体支持体としては、ガラス、セルロース、ポリアクリルアミド、ナイロン、ポリスチレン、ポリビニルクロリド、またはポリプロピレンが挙げられるが、これらに限定されない。

【0121】

FZD7のCRDと結合する、または特異的に結合する、本明細書で提供される天然に存在しないペプチドを含む（例えば、それから本質的になる、またはそれからなる）リガンドをコードする核酸分子、リガンドをコードする核酸分子を含む発現ベクター、及び核酸分子を含む細胞もまた企図される。また、本明細書では、かかる細胞を培養し、リガンドを発現させ、細胞培養物からリガンドを回収することによって、FZD7のCRDと結合する、または特異的に結合する、本明細書で提供される天然に存在しないペプチドを含む（例えば、それから本質的になる、またはそれからなる）リガンドを産生する方法も提供される。

30

【0122】

ある特定の実施形態では、FZD7のCRDと結合する、または特異的に結合する、本明細書で提供される天然に存在しないペプチドを含む（例えば、それから本質的になる、またはそれからなる）リガンドは、本明細書の別の場所に記載されるように、インビトロ翻訳を介して産生される。

40

【0123】

ある特定の実施形態では、FZD7のCRDと結合する、または特異的に結合する、本明細書で提供される天然に存在しないペプチドを含む（例えば、それから本質的になる、またはそれからなる）リガンドは、化学ペプチド合成を介して、例えば、化学的に合成された本明細書に記載される天然に存在しないペプチドを、1つ以上の部分にグラフトすることによって、またはリガンド全体を化学的に合成することによって生成される。

【0124】

ある特定の実施形態では、FZD7のCRDと結合する、または特異的に結合する、本明細書で提供される天然に存在しないペプチドを含む（例えば、それから本質的になる、

50

またはそれからなる) リガンドは、異常なWntシグナル伝達が関与する疾患または病態の治療において、治療剤として使用される。

【0125】

ある特定の実施形態では、がん細胞(例えば、結腸癌細胞、膵臓癌細胞、非小細胞肺癌細胞、RNF43中に突然変異を含むがん細胞、USP6過剰発現を特徴とするがん細胞、またはR-スポンジン(RSPO)ファミリーメンバーを伴う遺伝子融合を特徴とするがん細胞)を殺滅する方法であって、がん細胞を、FZD7のCRDと結合する、または特異的に結合する、本明細書で提供される天然に存在しないペプチドを含む(例えば、それから本質的になる、またはそれからなる)リガンドと接触させることを含む、方法が提供される。

10

【0126】

ある特定の実施形態では、がん幹細胞(例えば、結腸癌幹細胞、膵臓癌幹細胞、非小細胞肺癌幹細胞、RNF43中に突然変異を含むがん幹細胞、USP6過剰発現を特徴とするがん幹細胞、またはR-スポンジン(RSPO)ファミリーメンバーを伴う遺伝子融合を特徴とするがん幹細胞)を殺滅する方法であって、がん細胞を、FZD7のCRDと結合する、または特異的に結合する、本明細書で提供される天然に存在しないペプチドを含む(例えば、それから本質的になる、またはそれからなる)リガンドと接触させることを含む、方法が提供される。

【0127】

ある特定の実施形態では、細胞(結腸癌細胞、膵臓癌細胞、非小細胞肺癌細胞、RNF43中に突然変異を含むがん細胞、USP6過剰発現を特徴とするがん細胞、またはR-スポンジン(RSPO)ファミリーメンバーを伴う遺伝子融合を特徴とするがん細胞など)におけるWnt媒介型 β -カテニンシグナル伝達を阻害する方法であって、がん細胞を、FZD7のCRDと結合する、または特異的に結合する、本明細書で提供される天然に存在しないペプチドを含む(例えば、それから本質的になる、またはそれからなる)リガンドと接触させることを含む、方法が提供される。

20

【0128】

機能的特徴

ある特定の実施形態では、FZD7のCRDと結合する、または特異的に結合する、本明細書で提供される天然に存在しないペプチドを含む(例えば、それから本質的になる、またはそれからなる)リガンドは、約 1×10^{-7} M以下、好ましくは約 1×10^{-8} M以下、及び最も好ましくは約 1×10^{-9} M以下の結合親和性(K_d)値を有するが、FZD3、FZD4、FZD5、FZD6、FZD8、FZD9、及び/またはFZD10のCRDに対して、FZD7のCRDに対するその結合親和性よりも、少なくとも約50倍、または少なくとも約500倍、または少なくとも約1000倍弱い結合親和性を有する。ある特定の実施形態では、FZD7のCRDと結合する、または特異的に結合する、本明細書で提供される天然に存在しないペプチドを含む(例えば、それから本質的になる、またはそれからなる)リガンドは、約 1×10^{-7} M以下、好ましくは約 1×10^{-8} M以下、及び最も好ましくは約 1×10^{-9} M以下の結合親和性(K_d)値を有するが、FZD1、FZD2、FZD3、FZD4、FZD5、FZD6、FZD8、FZD9、及び/またはFZD10のCRDに対して、FZD7のCRDに対するその結合親和性よりも、少なくとも約50倍、または少なくとも約500倍、または少なくとも約1000倍弱い結合親和性を有する。

30

40

【0129】

ある特定の実施形態では、本明細書で提供される天然に存在しないペプチドを含む(例えば、それから本質的になる、またはそれからなる)リガンドの、例えば、非標的FZD受容体のCRD(例えば、FZD1、FZD2、FZD3、FZD4、FZD5、FZD6、FZD8、FZD9、及び/またはFZD10)への結合の程度は、当該技術分野において既知の方法、例えばELISA、蛍光活性化セルソーティング(FACS)分析、または放射性免疫沈降法(RIA)によって決定して、本明細書で提供される天然に存在

50

しないペプチドを含む（例えば、それから本質的になる、またはそれからなる）リガンドの、FZD7のCRDへの結合の約10%未満である。ある特定の実施形態では、本明細書で提供される天然に存在しないペプチドを含む（例えば、それから本質的になる、またはそれからなる）リガンドの、例えば、FZDタンパク質に構造的に関連するタンパク質（例えば、分泌Frizzled関連タンパク質、例えば、sFRP1、sFRP2、sFRP3、sFRP4、及び／またはsFRP5）への結合の程度は、当該技術分野において既知の方法、例えばELISA、蛍光活性化セルソーティング（FACS）分析、または放射性免疫沈降法（RIA）によって決定して、本明細書で提供される天然に存在しないペプチドを含む（例えば、それから本質的になる、またはそれからなる）リガンドの、FZD7のCRDへの結合の約10%未満である。

10

【0130】

特異的結合は、例えば、一般に結合活性を有しない同様の構造の分子である対照分子の結合と比較して、分子の結合を決定することによって測定され得る。例えば、特異的結合は、標的に類似した対照分子、例えば、過剰な標識されていない標的との競合によって決定され得る。この場合、標識された標的のプロープへの結合が過剰な標識されていない標的によって競合的に阻害されると、特異的結合が示される。FZD7のCRDに「特異的に結合する」本明細書で提供される天然に存在しないペプチドを含む（例えば、それから本質的になる、またはそれからなる）リガンドの結合を評価する他の方法は、実施例に記載されている。

【0131】

本明細書で使用される特定のポリペプチド標的上の特定のポリペプチドまたは結合領域の「特異的結合」または「に特異的に結合する」または「に特異的な」という用語は、例えば、少なくとも約 10^{-4} M、あるいは少なくとも約 10^{-5} M、あるいは少なくとも約 10^{-6} M、あるいは少なくとも約 10^{-7} M、あるいは少なくとも約 10^{-8} M、あるいは少なくとも約 10^{-9} M、あるいは少なくとも約 10^{-10} M、あるいは少なくとも約 10^{-11} M、あるいは少なくとも約 10^{-12} M、またはそれ以上の標的のKdを有する分子によって呈され得る。一実施形態では、「特異的結合」という用語は、分子が、いずれの他のポリペプチドまたは結合領域にも実質的に結合することなく、特定のポリペプチドまたは特定のポリペプチド上の結合領域に結合する、結合を指す。

20

【0132】

ある特定の実施形態では、本明細書で提供される天然に存在しないペプチドを含む（例えば、それから本質的になる、またはそれからなる）リガンドは、約1 pM～約500 nMのKdでFZD7のCRDと結合する。ある特定の実施形態では、本明細書で提供される天然に存在しないペプチドを含む（例えば、それから本質的になる、またはそれからなる）リガンドは、約1 pM～約50 pM、約50 pM～約250 pM、約250 pM～約500 pM、約500 pM～750 pM、約750 pM～約1 nM、約1 nM～約25 nM、約25 nM～約50 nM、50 nM～約100 nM、約100 nM～約250 nM、または約250 nM～約500 nMのKdでFZD7のCRDと結合する。ある特定の実施形態では、Kdは、表面プラズモン共鳴を介して決定される。

30

【0133】

ある特定の実施形態では、FZD7のCRDと特異的に結合する本明細書で提供される天然に存在しないペプチドを含む（例えば、それから本質的になる、またはそれからなる）リガンドは、約300 nM、275 nM、250 nM、200 nM、175 nM、150 nM、140 nM、130 nM、120 nM、110 nM、100 nM、90 nM、80 nM、70 nM、60 nM、50 nM、40 nM、30 nM、20 nM、10 nM、5 nM、1 nM、0.9 nM、0.8 nM、0.7 nM、0.6 nM、0.5 nM、0.4 nM、0.3 nM、0.2 nM、または0.1 nM（これらの値の間の任意の範囲を含む）のうちのいずれか1つより少ない IC_{50} 値でWnt媒介型 β -カテニンシグナル伝達を阻害する。

40

【0134】

50

ある特定の実施形態では、F Z D 7 の C R D と特異的に結合する本明細書で提供される天然に存在しないペプチドを含む（例えば、それから本質的になる、またはそれからなる）リガンドは、10 nM ~ 200 nM の IC_{50} 値で W n t 媒介型 β - カテニンシグナル伝達を阻害する。ある特定の実施形態では、F Z D 7 の C R D と特異的に結合する本明細書で提供される天然に存在しないペプチドを含む（例えば、それから本質的になる、またはそれからなる）リガンドは、20 nM ~ 200 nM の IC_{50} 値で W n t 媒介型 β - カテニンシグナル伝達を阻害する。ある特定の実施形態では、F Z D 7 の C R D と特異的に結合する本明細書で提供される天然に存在しないペプチドを含む（例えば、それから本質的になる、またはそれからなる）リガンドは、30 nM ~ 200 nM の IC_{50} 値で W n t 媒介型 β - カテニンシグナル伝達を阻害する。ある特定の実施形態では、F Z D 7 の C R D と特異的に結合する本明細書で提供される天然に存在しないペプチドを含む（例えば、それから本質的になる、またはそれからなる）リガンドは、40 nM ~ 200 nM の IC_{50} 値で W n t 媒介型 β - カテニンシグナル伝達を阻害する。ある特定の実施形態では、F Z D 7 の C R D と特異的に結合する本明細書で提供される天然に存在しないペプチドを含む（例えば、それから本質的になる、またはそれからなる）リガンドは、50 nM ~ 200 nM の IC_{50} 値で W n t 媒介型 β - カテニンシグナル伝達を阻害する。ある特定の実施形態では、F Z D 7 の C R D と特異的に結合する本明細書で提供される天然に存在しないペプチドを含む（例えば、それから本質的になる、またはそれからなる）リガンドは、50 nM ~ 180 nM の IC_{50} 値で W n t 媒介型 β - カテニンシグナル伝達を阻害する。ある特定の実施形態では、F Z D 7 の C R D と特異的に結合する本明細書で提供される天然に存在しないペプチドを含む（例えば、それから本質的になる、またはそれからなる）リガンドは、50 nM ~ 160 nM の IC_{50} 値で W n t 媒介型 β - カテニンシグナル伝達を阻害する。ある特定の実施形態では、F Z D 7 の C R D と特異的に結合する本明細書で提供される天然に存在しないペプチドを含む（例えば、それから本質的になる、またはそれからなる）リガンドは、50 nM ~ 140 nM の IC_{50} 値で W n t 媒介型 β - カテニンシグナル伝達を阻害する。ある特定の実施形態では、F Z D 7 の C R D と特異的に結合する本明細書で提供される天然に存在しないペプチドを含む（例えば、それから本質的になる、またはそれからなる）リガンドは、50 nM ~ 120 nM の IC_{50} 値で W n t 媒介型 β - カテニンシグナル伝達を阻害する。ある特定の実施形態では、F Z D 7 の C R D と特異的に結合する本明細書で提供される天然に存在しないペプチドを含む（例えば、それから本質的になる、またはそれからなる）リガンドは、50 nM ~ 100 nM の IC_{50} 値で W n t 媒介型 β - カテニンシグナル伝達を阻害する。ある特定の実施形態では、F Z D 7 の C R D と特異的に結合する本明細書で提供される天然に存在しないペプチドを含む（例えば、それから本質的になる、またはそれからなる）リガンドは、30 nM ~ 100 nM の IC_{50} 値で W n t 媒介型 β - カテニンシグナル伝達を阻害する。ある特定の実施形態では、F Z D 7 の C R D と特異的に結合する本明細書で提供される天然に存在しないペプチドを含む（例えば、それから本質的になる、またはそれからなる）リガンドは、20 nM ~ 100 nM の IC_{50} 値で W n t 媒介型 β - カテニンシグナル伝達を阻害する。ある特定の実施形態では、F Z D 7 の C R D と特異的に結合する本明細書で提供される天然に存在しないペプチドを含む（例えば、それから本質的になる、またはそれからなる）リガンドは、10 nM ~ 100 nM の IC_{50} 値で W n t 媒介型 β - カテニンシグナル伝達を阻害する。ある特定の実施形態では、 IC_{50} は、実施例で更に詳細に記載されるように、デュアルルシフェラーゼアッセイにおけるルシフェラーゼ活性の尺度として決定される。

【0135】

ある特定の実施形態では、F Z D 7 の C R D と特異的に結合する本明細書で提供される天然に存在しないペプチドを含む（例えば、それから本質的になる、またはそれからなる

10

20

30

40

50

）リガンドは、300 nM、275 nM、250 nM、200 nM、175 nM、150 nM、100 nM、90 nM、80 nM、70 nM、60 nM、50 nM、40 nM、30 nM、20 nM、10 nM、5 nM、1 nM、0.9 nM、0.8 nM、0.7 nM、0.6 nM、0.5 nM、0.4 nM、0.3 nM、0.2 nM、または0.1 nM（これらの値の間の任意の範囲を含む）のうちのいずれか1つより少ないEC₅₀値を有する。ある特定の実施形態では、EC₅₀は、実施例において更に詳細に記載されるように、5 FAM標識ペプチドを使用し、FSECを介して決定される。

【0136】

ある特定の実施形態では、FZD7のCRDと特異的に結合する本明細書で提供される天然に存在しないペプチドを含む（例えば、それから本質的になる、またはそれからなる）リガンドは、FZD7のCRDに対するWntの動員及び結合を強化する。ある特定の実施形態では、FZD7のCRDへのWntの動員及び結合は、ペプチドが、約10 μM、5 μM、1 μM、0.9 μM、0.8 μM、0.7 μM、0.6 μM、0.5 μM、0.4 μM、0.3 μM、0.2 μM、0.1 μM、0.005 μM、0.001 μM、または0.0005 μM未満の（これらの値の間の任意の範囲を含む）濃度で存在するときに強化される。ある特定の実施形態では、Wntは、Wnt5aである。ある特定の実施形態では、Wntは、Wnt3aである。ある特定の実施形態では、FZD7のCRDと特異的に結合する本明細書で提供される天然に存在しないペプチドを含む（例えば、それから本質的になる、またはそれからなる）リガンドは、FZD3、FZD4、FZD5、FZD6、FZD8、FZD9、及び／もしくはFZD10のCRDに対する、またはFZD1、FZD2、FZD3、FZD4、FZD5、FZD6、FZD8、FZD9、及び／もしくはFZD10のCRDへの、Wntの動員及び結合を強化しない。ある特定の実施形態では、Wntは、Wnt5aである。ある特定の実施形態では、Wntは、Wnt3aである。

【0137】

FZD7のシステインリッチドメインと特異的に結合する天然に存在しないペプチドを特定する方法

ある特定の実施形態では、FZD7のCRDと結合する、または特異的に結合する天然に存在しないペプチドを得る方法が本明細書で提供される。ある特定の実施形態では、該方法は、（a）天然に存在しないペプチド：CRD複合体を形成するのを可能にする条件下で、FZD7のCRDを、天然に存在しないペプチド（直鎖状または環状ペプチド）のライブラリと接触させることと、（b）複合体の形成を検出することと、（c）FZD7のCRDと特異的に結合する天然に存在しないペプチドを、複合体から得ることとを含む。ある特定の実施形態では、該方法は、（d）FZD7のCRDと特異的に結合する天然に存在しないペプチドの核酸配列を決定することを更に含む。ある特定の実施形態では、天然に存在しないペプチド及びFZD7のCRDを含む複合体が提供される。

【0138】

ある特定の実施形態では、FZD7のCRDと結合する、または特異的に結合する、天然に存在しないペプチドは、親和性成熟に供される。このプロセスにおいて、FZD7のCRDに結合することが見出されたペプチドは、FZD7 CRDに対する親和性を増加させるために選択するスキームに供される（Wu et al. (1998) Proc Natl Acad Sci USA. 95, 6037-42を参照）。ある特定の実施形態では、FZD7のCRDと特異的に結合する天然に存在しないペプチドは、ライブラリスクリーニングからの特定後に更にランダム化される。例えば、ある特定の実施形態では、FZD7のCRDと特異的に結合する天然に存在しないペプチドを得る方法は、（e）更にランダム化された天然に存在しないペプチドを生成するために以前に特定されたペプチド：CRDから得られた天然に存在しないペプチドの少なくとも1、少なくとも2、少なくとも3、少なくとも4、少なくとも5、少なくとも6、少なくとも7、少なくとも8、少なくとも9、少なくとも10、少なくとも11、少なくとも12、少なくとも13、少なくとも14、少なくとも15、少なくとも16、または16超のアミノ酸をランダ

ム化することと、(f) F Z D 7 の C R D を、更にランダム化された天然に存在しないペプチドと接触させることと、(g) 更にランダム化されたペプチド：C R D 複合体の形成を検出することと、(h) F Z D 7 の C R D と特異的に結合する更にランダム化された天然に存在しないペプチドを複合体から得ることを更に含む。ある特定の実施形態では、該方法は、(i) F Z D 7 の C R D と特異的に結合する天然に存在しないペプチドの核酸配列を決定することを更に含む。

【0139】

ある特定の実施形態では、この方法を使用して、F Z D 1、F Z D 2、または F Z D 7 の C R D と特異的に結合するペプチドを特定する。ある特定の実施形態では、この方法を使用して、F Z D 1、F Z D 2、及び F Z D 7 の C R D と特異的に結合するペプチドを特定する。ある特定の実施形態では、この方法を使用して、F Z D 1 または F Z D 7 の C R D と特異的に結合するペプチドを特定する。ある特定の実施形態では、この方法を使用して、F Z D 1 及び F Z D 7 の C R D と特異的に結合するペプチドを特定する。ある特定の実施形態では、この方法を使用して、F Z D 2 または F Z D 7 の C R D と特異的に結合するペプチドを特定する。ある特定の実施形態では、この方法を使用して、F Z D 2 及び F Z D 7 の C R D と特異的に結合するペプチドを特定する。ある特定の実施形態では、この方法を使用して、F Z D 1 または F Z D 2 の C R D と特異的に結合するペプチドを特定する。ある特定の実施形態では、この方法を使用して、F Z D 1 及び F Z D 2 の C R D と特異的に結合するペプチドを特定する。ある特定の実施形態では、この方法を使用して、F Z D 1 の C R D と特異的に結合するペプチドを特定する。ある特定の実施形態では、この方法を使用して、F Z D 2 の C R D と特異的に結合するペプチドを特定する。ある特定の実施形態では、この方法を使用して、F Z D 7 の C R D と特異的に結合するペプチドを特定する。

【0140】

特定の実施形態では、この方法を使用して、F Z D 7 の C R D と結合する、または特異的に結合するペプチドを特定する。

【0141】

標的 C R D (複数可) に対して十分な親和性を有する天然に存在しないペプチドが得られるまで、複数回のランダム化、スクリーニング、及び選択を行うことができる。したがって、ある特定の実施形態では、ステップ (e) ~ (h) またはステップ (e) ~ (i) が、F Z D 7 の C R D と特異的に結合する天然に存在しないペプチドを特定するために、1 回、2 回、3 回、4 回、5 回、6 回、7 回、8 回、9 回、10 回、または 10 回より多く繰り返される。

【0142】

ある特定の実施形態では、少なくとも 2 回、3 回、4 回、5 回、6 回、7 回、8 回、9 回、10 回、または 10 回より多くのランダム化、スクリーニング、及び選択を受けたペプチドは、1 回のランダム化、スクリーニング、及び選択を受けたペプチドと少なくとも同様に高い親和性で F Z D 7 の C R D に結合する。ある特定の実施形態では、少なくとも 2 回、3 回、4 回、5 回、6 回、7 回、8 回、9 回、10 回、または 10 回より多くのランダム化、スクリーニング、及び選択を受けた天然に存在しないペプチドは、1 回のランダム化、スクリーニング、及び選択を受けた天然に存在しないペプチドよりも高い親和性で F Z D 7 の C R D に結合する。

【0143】

本明細書に記載される天然に存在しないペプチドのライブラリは、F Z D 7 の C R D と結合する、または特異的に結合する、新しいペプチドまたは改善されたペプチドを進化させるために、当該技術分野において既知の任意の技法によってスクリーニングされ得る。ある特定の実施形態では、F Z D 7 の C R D は、固体支持体 (カラム樹脂またはマイクロタイタープレートウェルなど) 上に固定化され、F Z D 7 の C R D は、候補の天然に存在しないペプチドのライブラリと接触される。選択技法は、例えば、ファージディスプレイ (S m i t h (1985) S c i e n c e 228, 1315-1317)、mRNA

ディスプレイ (Wilson et al. (2001) Proc Natl Acad Sci USA 98:3750-3755)、細菌ディスプレイ (Georgiou, et al. (1997) Nat Biotechnol 15:29-34.)、酵母ディスプレイ (Boder and Wittrop (1997) Nat. Biotechnol. 15:553-5577)、またはリボソームディスプレイ (Hanes and Pluckthun (1997) Proc Natl Acad Sci USA 94:4937-4942 及び WO2008/068637) であり得る。

【0144】

ある特定の実施形態では、FZD7のCRDと結合する、または特異的に結合する、天然に存在しないペプチドを提示するファージ粒子が提供される。

10

【0145】

ファージディスプレイは、複数の天然に存在しないペプチド変異形が、バクテリオファージ粒子の表面上のコートタンパク質への融合タンパク質として提示される技法である (Smith, G. P. (1985) Science, 228:1315-7、Scott, J. K. and Smith, G. P. (1990) Science 249:386、Sergeeva, A., et al. (2006) Adv. Drug Deliv. Rev. 58:1622-54)。ファージディスプレイの有用性は、選択的にランダム化されたタンパク質変異形の大きいライブラリが、標的リガンドに高親和性で結合する配列のために迅速かつ効率的に選別され得るという事実にある。

【0146】

ファージ上のペプチド (Cwirla, S. E. et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:6378) またはタンパク質 (Lowman, H. B. et al. (1991) Biochemistry, 30:10832、Clackson, T. et al. (1991) Nature, 352:624、Marks, J. D. et al. (1991), J. Mol. Biol., 222:581、Kang, A. S. et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:8363) ライブラリの提示は、特異的結合特性を有するものの数百万のポリペプチドまたはオリゴペプチドをスクリーニングするために使用されている (Smith, G. P. (1991) Current Opin. Biotechnol., 2:668、Wu et al. (1998) Proc Natl Acad Sci USA May 95, 6037-42)。多価ファージディスプレイ法は、線維状ファージの遺伝子 III または遺伝子 VII のいずれかへの融合によりランダム小ペプチド及び小タンパク質をディスプレイするために使用されている。(Wells and Lowman, Curr. Opin. Struct. Biol., 3:355-362 (1992)、及びそこで引用される参考文献)。一価ファージディスプレイにおいて、タンパク質またはペプチドライブラリは、遺伝子 III またはその一部に融合され、野生型遺伝子 III タンパク質の存在下で、低レベルで発現され、これにより、ファージ粒子が融合タンパク質のコピーを1つディスプレイするか、または1つもディスプレイしないようになる。結合効果は、選別が内因性リガンド親和性に基づくように多価ファージに対して低減され、ファージミドベクターが使用され、これによりDNA操作が簡略化される。(Lowman and Wells, Methods: A companion to Methods in Enzymology, 3:205-0216 (1991).)

20

30

40

【0147】

FZD7のCRDに結合する天然に存在しないペプチドの選別ファージライブラリは、多数の変異形の構築及び拡大、標的リガンドを使用する親和性精製のための手順、及び結合富化の結果を評価する手段を包含する (例えば、US5223409、US5403484、US5571689、及びUS5663143を参照)。

【0148】

大部分のファージディスプレイ法は、繊維性ファージ (M13ファージなど) を使用する。ラムダ状ファージディスプレイシステム (WO1995/34683、US5627

50

024を参照)、T4ファージディスプレイシステム(Ren et al. (1998) Gene 215:439、Zhu et al. (1998) Cancer Research, 58:3209-3214、Jiang et al., (1997) Infection & Immunity, 65:4770-4777、Ren et al. (1997) Gene, 195:303-311、Ren (1996) Protein Sci., 5:1833、Efimov et al. (1995) Virus Genes, 10:173)、及びT7ファージディスプレイシステム(Smith and Scott (1993) Methods in Enzymology, 217:228-257、US5766905)もまた知られている。

【0149】

基本的なファージディスプレイ概念の多くの他の改善及び変形が、現在開発されている。これらの改善は、ディスプレイシステムが、選択された標的リガンドに結合するためのペプチドライブラリをスクリーニングする能力、及び機能的タンパク質を提示する能力を強化し、所望の特性についてこれらのタンパク質をスクリーニングする可能性を有する。ファージディスプレイ反応のためのコンビナトリアル反応デバイスが開発され(WO1998/14277)、二分子相互作用(WO1998/20169、WO1998/20159)及び拘束性らせんペプチド(WO1998/20036)を分析し、制御するために、ファージディスプレイライブラリが使用されている。WO1997/35196は、親和性リガンドを単離する方法を説明しており、ここでファージディスプレイライブラリは、第1の溶液(リガンドは、標的リガンドに結合する)及び第2の溶液(親和性リガンドは、標的リガンドに結合しない)と接触され、結合リガンドを選択的に単離する。WO1997/46251は、ランダムファージディスプレイライブラリを親和性精製抗体でバイオパニングし、次いで結合ファージを単離する方法、続いて高親和性結合ファージを単離するためにマイクロプレートウェルを使用するマイクロパニングプロセスを説明している。かかる方法は、FZD1、FZD2、及び/またはFZD7のCRDと結合する、本明細書で開示される天然に存在しないペプチドに適用することができる。親和性タグとしての黄色ブドウ球菌(*Staphylococcus aureus*)タンパク質Aの使用もまた報告されている(Li et al. (1998) Mol Biotech. 9:187)。WO1997/47314は、ファージディスプレイライブラリであり得るコンビナトリアルライブラリを使用して酵素特異性を区別するための、基質サブトラクションライブラリの使用を説明している。特異的結合タンパク質を選択する追加の方法は、US5498538、US5432018、及びWO1998/15833に記載されている。ペプチドライブラリを生成しこれらのライブラリをスクリーニングする方法もまた、US5723286、US5432018、US5580717、US5427908、US5498530、US5770434、US5734018、US5698426、US5763192、及びUS5723323に開示されている。

【0150】

FZD1、FZD2、及び/またはFZD7のCRDと特異的に結合する天然に存在しないペプチドを含むリガンドを産生する方法

ある特定の実施形態では、FZD7のCRDと結合する、または特異的に結合する、本明細書で提供される天然に存在しないペプチドを含む(例えば、それから本質的になる、またはそれからなる)リガンドは、遺伝子操作を介して生成される。変異導入のための様々な方法は(スクリーニングまたは選択の適切な方法と共に)以前に説明されている。このような変異導入法としては、例えば、エラープローンPCR、ループシャフリング、もしくはオリゴヌクレオチド配向型変異導入、ランダムヌクレオチド挿入、または組み換え前の他の方法が挙げられるが、これらに限定されない。これらの方法に関する更なる詳細は、例えば、Abou-Nadler et al. (2010) Bioengineered Bugs 1, 337-340、Firth et al. (2005) Bioinformatics 21, 3314-3315、Cirino et al. (2003) Methods Mol Biol 231, 3-9、Pirakitikul

r (2010) Protein Sci 19, 2336-2346、Steffens et al. (2007) J. Biomol Tech 18, 147-149、及び他に記載されている。したがって、ある特定の実施形態では、遺伝子操作技法を介して生成されたFZD7のCRDと特異的に結合する、本明細書に記載される天然に存在しないペプチドを含む（例えば、それから本質的になる、またはそれからなる）リガンドが提供される。

【0151】

ある特定の実施形態では、FZD7のCRDと結合する、または特異的に結合する、本明細書に記載される天然に存在しないペプチドを含む（例えば、それから本質的になる、またはそれからなる）リガンドは、インビトロ翻訳を介して生成される。簡潔に言えば、インビトロ翻訳は、タンパク質コード配列（複数可）をプロモーターを含有するベクターにクローン化することと、クローン化された配列（複数可）をRNAポリメラーゼで転写することによってmRNAを産生することと、インビトロでのこのmRNAの翻訳によって、例えば無細胞抽出物を使用してタンパク質を合成することを含む。所望の変異形タンパク質は、単にクローン化されたタンパク質コード配列を改変することによって生成され得る。多くのmRNAは、小麦胚芽抽出物中またはウサギ網状赤血球抽出液中で効率的に翻訳され得る。インビトロ翻訳に関する更なる詳細は、例えば、Hope et al. (1985) Cell 43, 177-188、Hope et al. (1986) Cell 46, 885-894、Hope et al. (1987) EMBO J. 6, 2781-2784、Hope et al. (1988) Nature 333, 635-640、及びMelton et al. (1984) Nucl. Acids Res. 12, 7057-7070に記載されている。

【0152】

したがって、FZD7のCRDと結合する、または特異的に結合する、本明細書で提供される天然に存在しないペプチドを含む（例えば、それから本質的になる、またはそれからなる）リガンドをコードする核酸分子が提供される。かかるリガンドをコードする核酸分子に操作可能に結合された発現ベクターもまた提供される。かかるリガンドをコードする核酸分子を含む宿主細胞（例えば、大腸菌などの原核宿主細胞、酵母細胞などの真核宿主細胞、哺乳動物細胞、CHO細胞等）もまた提供される。

【0153】

ある特定の実施形態では、FZD7のCRDと結合する、または特異的に結合する、本明細書に記載される天然に存在しないペプチドを含む（例えば、それから本質的になる、またはそれからなる）リガンドは、インビトロ翻訳を介して生成される。簡潔に言えば、インビトロ翻訳は、タンパク質コード配列（複数可）をプロモーターを含有するベクターにクローン化することと、クローン化された配列（複数可）をRNAポリメラーゼで転写することによってmRNAを産生することと、インビトロでのこのmRNAの翻訳によって、例えば無細胞抽出物を使用してタンパク質を合成することを含む。所望の突然変異体タンパク質は、単にクローン化されたタンパク質コード配列を改変することによって生成され得る。多くのmRNAは、小麦胚芽抽出物中またはウサギ網状赤血球抽出液中で効率的に翻訳され得る。インビトロ翻訳に関する更なる詳細は、例えば、Hope et al. (1985) Cell 43, 177-188、Hope et al. (1986) Cell 46, 885-894、Hope et al. (1987) EMBO J. 6, 2781-2784、Hope et al. (1988) Nature 333, 635-640、及びMelton et al. (1984) Nucl. Acids Res. 12, 7057-7070に記載されている。

【0154】

ある特定の実施形態では、FZD7のCRDと結合する、または特異的に結合する、本明細書で提供される天然に存在しないペプチドを含む（例えば、それから本質的になる、またはそれからなる）リガンドは、化学合成を介して生成される。ある特定の実施形態では、FZD7のCRDと結合する、または特異的に結合する、本明細書で提供される天然

に存在しないペプチドは、本明細書の別の場所に記載されるように、化学的に合成され、1つ以上の部分にグラフトされる（例えば、共有結合される）。

【0155】

固相及び液相ペプチド合成の方法は、当該技術分野において周知であり、例えば、Methods of Molecular Biology, 35, Peptide Synthesis Protocols, (M. W. Pennington and B. M. Dunn Eds), Springer, 1994、Welsch et al. (2010) Curr Opin Chem Biol 14, 1-15; Methods of Enzymology, 289, Solid Phase Peptide Synthesis, (G. B. Fields Ed.), Academic Press, 1997、Chemical Approaches to the Synthesis of Peptides and Proteins, (P. Lloyd-Williams, F. Albericio, and E. Giralt Eds), CRC Press, 1997、Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis, A Practical Approach, (W. C. Chan, P. D. White Eds), Oxford University Press, 2000、Solid Phase Synthesis, A Practical Guide, (S. F. Kates, F. Albericio Eds), Marcel Dekker, 2000、P. Seneci, Solid-Phase Synthesis and Combinatorial Technologies, John Wiley & Sons, 2000、Synthesis of Peptides and Peptidomimetics (M. Goodman, Editor-in-chief, A. Felix, L. Moroder, C. Tmiolo Eds), Thieme, 2002、N. L. Benoiton, Chemistry of Peptide Synthesis, CRC Press, 2005、Methods in Molecular Biology, 298, Peptide Synthesis and Applications, (J. Howl Ed) Humana Press, 2005、及びAmino Acids, Peptides and Proteins in Organic Chemistry, Volume 3, Building Blocks, Catalysts and Coupling Chemistry, (A. B. Hughs, Ed.) Wiley-VCH, 2011において詳細に説明されている。

【0156】

共有結合的修飾

FZD7のCRDと結合する、または特異的に結合する、本明細書で提供される天然に存在しないペプチドを含む（例えば、それから本質的になる、またはそれからなる）リガンドの共有結合的修飾もまた企図される。共有結合的修飾の1つの種類は、FZD7のCRDと結合する、または特異的に結合する、本明細書で提供される天然に存在しないペプチドを含む（例えば、それから本質的になる、またはそれからなる）リガンドの標的アミノ酸残基を、リガンドの選択された側鎖またはN末端もしくはC末端残基と反応させることができる有機誘導体化剤と反応させることを含む。二官能性剤による誘導体化は、例えば、FZD7を精製するための方法において使用するために、リガンドを水不溶性支持体マトリクスまたは表面に架橋するために有用であり、逆もまた同様である。一般的に使用される架橋剤としては、例えば、1, 1-ビス（ジアゾアセチル）-2-フェニルエタン、グルタルアルデヒド、N-ヒドロキシコハク酸イミドエステル、例えば、4-アジドサリチル酸とのエステル、3, 3'-ジチオビス（スクシンイミジル-プロピオン酸塩）などのジスクシンイミジルエステルを含むホモ二官能性イミドエステル、ビス-N-マレイミド-1, 8-オクタンなどの二官能性マレイミド、及びメチル-3-[(p-アジドフェニル)-ジチオ]プロピオイミダートなどの薬剤が挙げられる。

【0157】

他の修飾としては、グルタミニル及びアスパラギニル残基のそれぞれ対応するグルタミ

ル及びアスパルチル残基への脱アミド化、プロリン及びリジンのヒドロキシル化、セリルまたはスレオニル残基のヒドロキシル基のリン酸化、リジン、アルギニン、及びヒスチジン側鎖の α -アミノ基のメチル化 (T. E. Creighton, *Proteins: Structure and Molecular Properties*, W. H. Freeman & Co., San Francisco, pp. 79-86 (1983))、N末端アミンのアセチル化、ならびに任意のC末端カルボキシル基のアミド化が挙げられる。

【0158】

FZD7のCRDと結合する、または特異的に結合する、本明細書で提供される天然に存在しないペプチドを含む (例えば、それから本質的になる、またはそれからなる) リガンドの共有結合的修飾の別の種類は、リガンドを、US4640835、US4496689、US4301144、US4670417、US4791192、またはUS4179337に記載されるように、様々な非タンパク質性ポリマー、例えば、ポリエチレングリコール (PEG)、ポリプロピレングリコール、またはポリオキシアルキレンのうちの1つに結合することを含む。

10

【0159】

「ポリエチレングリコール」または「PEG」という用語は、カップリング剤の有無にかかわらず、部分を (例えば、チオール、トリフレート、トレシレート (tresylate)、アジルジン、オキシラン、N-ヒドロキシスクシンイミド、もしくはマレイミド部分と) カップリングまたは活性化する、ポリエチレングリコール化合物またはその誘導体を意味する。「PEG」という用語は、500~150,000Daの分子量のポリエチレングリコール (その類似体を含む) を示すことが意図され、例えば、末端OR基は、メトキシ基によって置き換えられている (mPEGと称される)。

20

【0160】

ある特定の実施形態では、FZD7のCRDと結合する、または特異的に結合する、本明細書に記載される天然に存在しないペプチドを含む (例えば、それから本質的になる、またはそれからなる) リガンドは、ポリエチレングリコール (PEG) で誘導体化される。PEGは、2つの末端ヒドロキシル基を有するエチレンオキシド反復単位の直鎖状水溶性ポリマーである。PEGは、典型的に約500ダルトン~約40,000ダルトンの範囲である、それらの分子量によって分類される。現在の好ましい実施形態では、用いられるPEGは、5,000ダルトン~約20,000ダルトンの範囲の分子量を有する。FZD7のCRDと結合する、本明細書で提供される天然に存在しないペプチドを含む (例えば、それから本質的になる、またはそれからなる) リガンドにカップリングされたPEGは、分岐状または非分岐状のいずれかであり得る。例えば、Monfardini, C. et al. 1995 *Bioconjugate Chem* 6:62-69) を参照されたい。PEGは、Nektar Inc., Sigma Chemical Co. 及び他の企業から商業的に入手可能である。かかるPEGとしては、モノメトキシポリエチレングリコール (MePEG-OH)、モノメトキシポリエチレングリコール-コハク酸塩 (MePEG-S)、モノメトキシポリエチレングリコール-スクシンイミジルコハク酸塩 (MePEG-S-NHS)、モノメトキシポリエチレングリコール-アミン (MePEG-NH₂)、モノメトキシポリエチレングリコール-トレシレート (MePEG-TRES)、及びモノメトキシポリエチレングリコール-イミダゾリル-カルボニル (MePEG-IM) が挙げられるが、これらに限定されない。

30

40

【0161】

ある特定の実施形態では、用いられる親水性ポリマー、例えばPEGは、メトキシ基またはエトキシ基などの非反応性基によって一端でキャップされる。その後、ポリマーは、ハロゲン化シアヌル (例えば、塩化、臭化、もしくはフッ化シアヌル)、ジイミダゾール、無水物試薬 (例えば、無水ジハロコハク酸、無水ジプロモコハク酸など)、アシルアジド、p-ジアゾイウムベンジルエーテル、3-(p-ジアゾニウムフェノキシ)-2-ヒドロキシプロピルエーテル) 等、などの好適な活性化剤との反応によって他端で活性化さ

50

れる。次いで、活性化ポリマーを、F Z D 7 の C R D と結合する、または特異的に結合する、本明細書で提供される天然に存在しないペプチドを含む（例えば、それから本質的になる、またはそれからなる）リガンドと反応させて、ポリマーで誘導体化されるリガンドを産生する。あるいは、F Z D 7 の C R D に結合する、もしくは特異的に結合する、本明細書で提供される天然に存在しないペプチドを含む（例えば、それから本質的になる、もしくはそれからなる）リガンド中の官能基は、ポリマーとの反応のために活性化され得るか、または2つの基は、既知のカップリング方法を使用して、協奏的カップリング反応において接合され得る。F Z D 7 の C R D と結合する、または特異的に結合する、本明細書で提供される天然に存在しないペプチドを含む（例えば、例えば、それから本質的になる、またはそれからなる）リガンドが、当業者に既知であり、当業者によって使用される無数の他の反応スキームを使用して、P E G で誘導体化され得ることは容易に理解されるであろう。

10

【0162】

リポソーム

F Z D 7 の C R D と結合する、または特異的に結合する、本明細書で提供される天然に存在しないペプチドを含む（例えば、それから本質的になる、またはそれからなる）リガンドはまた、リポソームとして製剤化され得る。かかるリポソームは、例えば、E p s t e i n e t a l . , P r o c N a t l A c a d S c i U S A , 8 2 : 3 6 8 8 (1 9 8 5) 、 H w a n g e t a l . , P r o c N a t l A c a d S c i U S A , 7 7 : 4 0 3 0 (1 9 8 0) 、 ならびに米国特許第 4 , 4 8 5 , 0 4 5 号及び同第 4 , 5 4 4 , 5 4 5 号に記載される、当該技術分野において既知の方法によって調製され得る。循環時間が向上したリポソームは、米国特許第 5 , 0 1 3 , 5 5 6 号に開示されている。

20

【0163】

特に有用なリポソームは、ホスファチジルコリン、コレステロール、及び P E G 誘導体化ホスファチジリエタノールアミン (P E G - P E) を含む脂質組成物を用いた逆相蒸発法によって生成され得る。リポソームは、所定の細孔サイズのフィルターを通して押し出されて、所望の直径を有するリポソームが得られる。第 2 の治療剤がまた、任意にリポソーム内に含有される。G a b i z o n e t a l . , J . N a t i o n a l C a n c e r I n s t . , 8 1 (1 9) : 1 4 8 4 (1 9 8 9) を参照されたい。

30

【0164】

薬学的組成物及び製剤

ある特定の実施形態では、F Z D 7 の C R D と結合する、または特異的に結合する、本明細書で提供される天然に存在しないペプチドを含む（例えば、それから本質的になる、またはそれからなる）リガンド、及び薬学的に許容される賦形剤を含む薬学的組成物が、本明細書で提供される。ある特定の実施形態では、組成物はまた、組成物を患者への眼性投与に好適にして、所望の効果または結果を達成するために、緩衝剤、担体、安定剤、保存剤、及び／またはバルク剤を含有してもよい。

【0165】

F Z D 7 の C R D と結合する、または特異的に結合する、本明細書で提供される天然に存在しないペプチドを含む（例えば、それから本質的になる、またはそれからなる）リガンドは、それらが投与に好適であるように、好適な担体または賦形剤と共に製剤化され得る。本明細書に開示されるリガンドの好適な製剤は、所望の程度の純度を有する本明細書に開示されるリガンドを、任意の薬学的に許容される担体、賦形剤、または安定剤と、凍結乾燥製剤または水溶液の形態で混合することによって得られる (R e m i n g t o n ' s P h a r m a c e u t i c a l S c i e n c e s 1 6 t h e d i t i o n , O s o l , A . E d . (1 9 8 0)) 。許容される担体、賦形剤、または安定剤は、レシピエントに対し、用いられる投与量及び濃度で無毒であり、緩衝剤（リン酸、クエン酸、及び他の有機酸など）、アスコルビン酸及びメチオニンを含む酸化防止剤、保存剤（オクタデシルジメチルベンジル塩化アンモニウム、塩化ヘキサメトニウム、塩化ベンザルコニウ

40

50

ム、塩化ベンゼトニウム、フェノール、ブチル、もしくはベンジルアルコール、アルキルパラベン（メチルもしくはプロピルパラベンなど）、カテコール、レゾルシノール、シクロヘキサノール、3-ペンタノール、及びm-クレゾールなど）、低分子量（約10残基未満）ポリペプチド、タンパク質（血清アルブミン、ゼラチン、もしくは免疫グロブリンなど）、親水性ポリマー（ポリビニルピロリドンなど）、アミノ酸（グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニン、もしくはリジンなど）、単糖類、二糖類、及び他の炭水化物（グルコース、マンノース、もしくはデキストリンを含む）、キレート剤（EDTAなど）、糖類（スクロース、マンニトール、トレハロース、もしくはソルビトールなど）、塩形成対イオン（ナトリウムなど）、金属錯体（例えば、Zn-タンパク質錯体）、ならびに／または非イオン性界面活性剤（TWEEN（商標）、PLURONICS（商標）、もしくはポリエチレングリコール（PEG）など）を含む。FZD1、FZD2、及び／もしくはFZD7のCRDと特異的に結合する、本明細書で提供される天然に存在しないペプチドを含む（例えば、それから本質的になる、もしくはそれからなる）リガンドに、またはFZD7のCRDに特異的に結合する、本明細書で提供される天然に存在しないペプチドを含む（例えば、それから本質的になる、もしくはそれからなる）リガンドに適用され得る例示的な抗体製剤は、参照により本明細書に明示的に組み込まれるWO98/56418に記載されている。皮下投与のために適合された凍結乾燥製剤は、WO97/04801に記載されている。かかる凍結乾燥製剤は、好適な希釈剤により高タンパク質濃度に再構成されてもよく、この再構成された製剤は、本明細書で治療される哺乳動物に皮下投与され得る。

【0166】

本明細書における製剤は、治療されている特定の適応症に対する必要に応じて、1つよりも多くの活性化化合物、好ましくは相互に悪影響を及ぼさない相補的活性を有する化合物も含有し得る。例えば、抗新生物剤、成長阻害剤、細胞傷害性剤、または化学療法剤を更に提供することが望ましい場合がある。かかる分子は、意図される目的に有効な量で、組み合わせで好適に存在する。かかる他の薬剤の有効量は、製剤中の量、疾患または障害または治療の種類、及び上で考察される他の要因に左右される。これらは、概して、本明細書に記載されるのと同じ投与量及び投与経路で、またはそれまでに用いられた投与量の約1～99%で使用される。活性成分はまた、例えば、コアセルベーション技法によって、または界面重合によって調製されたマイクロカプセル、例えば、それぞれ、ヒドロキシメチルセルロースまたはゼラチンマイクロカプセル及びポリ（メチルメタシレート）マイクロカプセル内に、コロイド薬物送達系（例えば、リポソーム、アルブミンマイクロスフェア、マイクロ乳濁液、ナノ粒子、及び名のカプセル）中、またはマクロ乳濁液中に取り込まれ得る。かかる技法は、Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)に開示されている。持続放出調製物が調製され得る。持続放出調製物の好適な例としては、アンタゴニストを含有する固体の疎水性ポリマーの半透性マトリクスが挙げられ、このマトリクスは、成型品、例えば、フィルムまたはマイクロカプセルの形態である。持続放出マトリクスの例としては、ポリエステル、ヒドロゲル（例えば、ポリ（2-ヒドロキシエチルメタクリレート）またはポリ（ビニルアルコール））、ポリラクチド（米国特許第3,773,919号）、L-グルタミン酸とL-グルタミン酸エチルのコポリマー、非分解性エチレン酢酸ビニル、分解性乳酸-グリコール酸コポリマー、例えば、LUPRON DEPOT（商標）（乳酸-グリコール酸コポリマー及び酢酸ロイプロリドからなる注射用マイクロスフェア）、ならびにポリ-D-（-）-3-ヒドロキシ酪酸が挙げられる。

【0167】

リポフェクチンまたはリポソームを使用して、本明細書で提供されるFZD7のCRDと結合する、または特異的に結合する、本明細書で提供される天然に存在しないペプチドを含む（例えば、それから本質的になる、またはそれからなる）リガンドを細胞に送達することができる。

【0168】

10

20

30

40

50

活性成分はまた、例えば、コアセルベーション技法によって、または界面重合によって調製されたマイクロカプセル、例えば、それぞれ、ヒドロキシメチルセルロースまたはゼラチンマイクロカプセル及びポリ（メチルメタシレート）マイクロカプセル内に、コロイド薬物送達系（例えば、リポソーム、アルブミンマイクロスフェア、マイクロ乳濁液、ナノ粒子、及び名のカプセル）中、またはマクロ乳濁液中に取り込まれ得る。かかる技法は、上記の Remington's PHARMACEUTICAL SCIENCES に開示される。

【0169】

持続放出調製物が調製され得る。持続放出調製物の好適な例としては、FZD7のCRDと結合する、または特異的に結合する、本明細書で提供される天然に存在しないペプチドを含む（例えば、それから本質的になる、またはそれからなる）リガンドを含有する固体疎水性ポリマーの半透性マトリクスが挙げられ、これらのマトリクスは、成形物品、例えば、フィルム、またはマイクロカプセルの形態である。持続放出マトリクスの例としては、ポリエステル、ヒドロゲル（例えば、ポリ（2-ヒドロキシエチルメタクリレート）またはポリ（ビニルアルコール））、ポリラクチド（米国特許第3,773,919号）、L-グルタミン酸とL-グルタミン酸エチルのコポリマー、非分解性エチレン-酢酸ビニル、分解性乳酸-グリコール酸コポリマー、例えば、LUPRON DEPOT（商標）（乳酸-グリコール酸コポリマー及び酢酸ロイプロリドからなる注射用マイクロスフェア）、ならびにポリ-D-（-）-3-ヒドロキシ酪酸が挙げられる。エチレン-酢酸ビニル及び乳酸-グリコール酸などのポリマーが、100日間にわたる分子の放出を可能にするが、ある特定のヒドロゲルは、より短い期間にわたってタンパク質を放出する。CRDと結合する、または特異的に結合する、本明細書で提供される天然に存在しないペプチドを含む（例えば、それから本質的になる、またはそれからなる）カプセル化されたりリガンドが、長期間にわたって体内に残存する場合、それらは、37℃の水分への曝露の結果として変性または凝集し、生物学的活性の損失、及び免疫原性の変化の可能性をもたらし得る。関与する機構に応じて、安定化のための合理的な戦略が講じられ得る。例えば、凝集機構がチオ-ジスルフィド交換による分子間S-S結合の形成であると見出されたならば、安定化は、スルフヒドリル残基を修飾し、酸性溶液から凍結乾燥し、水分含有量を制御し、適当な添加剤を使用し、特定のポリマーマトリクス組成物を開発することによって達成され得る。

【0170】

インビボ投与に使用される製剤は、滅菌されていなければならない。これは、例えば、滅菌濾過膜を通す濾過によって容易に達成される。

【0171】

FZD7のシステインリッチドメインと結合する、または特異的に結合する、天然に存在しないペプチドを含むリガンドを使用する方法

幹細胞は、多様な器官内での連続的な組織維持に必要である。Wntシグナル伝達は、いくつかの器官（例えば、消化管、乳房、皮膚、腎臓、及び卵巣を含む）において幹細胞を調節するとして特定されている。Clevvers et al. (2014) Science doi:10.1126/science.1248012を参照されたい。幹細胞は、それらが組織内のニッチ環境に位置する場合、自己再生し、自律的に増殖することができ、それ故にがん細胞のいくつかの特徴を既に有している（Phesse et al. (2009) Br. J. Cancer 100, 221-227）。結果として、幹細胞は、腸、胃、前立腺、及び肺を含むいくつかの異なるがんの細胞起源として特定されている（Visvader et al. (2011) Nature 469, 314-322）。Wntシグナル伝達は、いくつかの器官内で幹細胞を調節することが示されており、したがって、幹細胞内で調節解除されたWntシグナル伝達は、これらの器官及び組織内で腫瘍形成を誘導することができる（Barker et al. (2009) Nature. 457, 608-611）。Fzd7は、最近、Lgr5+腸幹細胞に重要なWntシグナルを伝達する主な受容体であることが示されている（Flanagan

et al. (2015) Stem Cell Reports, 4, 759-767) 。Fzd受容体ターンオーバーを負に調節するE3ファミリーリガーゼZNF3及びRNF43への機能喪失(LOF)突然変異は、ヒト結腸腫瘍検体において一般的に観察される(TCGA. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. Nature 2012, 487, 330-337) 。RNF43の不活性化突然変異はまた、膵管腺癌においてWnt依存性を付与する (Jiang et al. (2013) Proc Natl Acad Sci USA 110, 12649-12654) 。R-スポンジン(RSPO)融合産物は、結腸癌においてWntシグナル伝達を活性化することが示されている(Seshagiri et al. (2012) "Recurrent R-spondin fusions in colon cancer." Nature 488, 660-664) 。加えて、USP6がん原遺伝子は、Frizzledを脱ユビキチン化することによってWntシグナル伝達を促進する(Madan et al. (2016) Proc Natl Acad Sci USA 113, E2945-E2954 (2016)) 。かかる腫瘍は、Wntシグナル伝達に過敏であることが予測される。

【0172】

したがって、ある特定の実施形態では、幹細胞増殖を阻害する方法であって、幹細胞を、FZD7のCRDドメインに結合する、または特異的に結合する、本明細書で提供される天然に存在しないペプチドを含む(例えば、それから本質的になる、またはそれからなる)リガンドと接触させることを含む、方法が提供される。ある特定の実施形態では、幹細胞増殖を阻害する方法であって、幹細胞を、FZD7のCRDドメインに特異的に結合する、本明細書で提供される天然に存在しないペプチドを含む(例えば、それから本質的になる、またはそれからなる)リガンドと接触させることを含む、方法が提供される。ある特定の実施形態では、幹細胞は、腸幹細胞である。

【0173】

ある特定の実施形態では、対象におけるがん(例えば、結腸癌、膵臓癌、非小細胞肺癌、RNF43中の突然変異を特徴とするがん、USP6過剰発現を特徴とするがん、またはR-スポンジン(RSPO)ファミリーメンバーを伴う遺伝子融合を特徴とするがん)を治療する方法であって、有効量の、FZD7のCRDと結合する、または特異的に結合する、本明細書で提供される天然に存在しないペプチドを含む(例えば、それから本質的になる、またはそれからなる)リガンドを投与することを含む、方法が提供される。ある特定の実施形態では、対象におけるがん(例えば、結腸癌、膵臓癌、非小細胞肺癌、RNF43中の突然変異を特徴とするがん、USP6過剰発現を特徴とするがん、またはR-スポンジン(RSPO)ファミリーメンバーを伴う遺伝子融合を特徴とするがん)を治療する方法であって、有効量の、FZD7のCRDと特異的に結合する、本明細書で提供される天然に存在しないペプチドを含む(例えば、それから本質的になる、またはそれからなる)リガンドを投与することを含む、方法が提供される。

【0174】

ある特定の実施形態では、がん(例えば、結腸癌、膵臓癌、非小細胞肺癌、RNF43中の突然変異を特徴とするがん、USP6過剰発現を特徴とするがん、またはR-スポンジン(RSPO)ファミリーメンバーを伴う遺伝子融合を特徴とするがん)の治療用薬物の製造に使用するための、FZD7のCRDと結合する、または特異的に結合する、本明細書で提供される天然に存在しないペプチドを含む(例えば、それから本質的になる、またはそれからなる)リガンドが提供される。ある特定の実施形態では、がん(例えば、結腸癌、膵臓癌、非小細胞肺癌、RNF43中の突然変異を特徴とするがん、USP6過剰発現を特徴とするがん、またはR-スポンジン(RSPO)ファミリーメンバーを伴う遺伝子融合を特徴とするがん)の治療用薬物の製造に使用するための、FZD7のCRDと特異的に結合する、本明細書で提供される天然に存在しないペプチドを含む(例えば、それから本質的になる、またはそれからなる)リガンドが提供される。ある特定の実施形態

では、対象におけるがん（例えば、結腸癌、膵臓癌、非小細胞肺癌、RNF43中の突然変異を特徴とするがん、USP6過剰発現を特徴とするがん、またはR-スポンジン（RSPO）ファミリーメンバーを伴う遺伝子融合を特徴とするがん）の治療に使用するための、FZD7のCRDと結合する、または特異的に結合する、本明細書で提供される天然に存在しないペプチドを含む（例えば、それから本質的になる、またはそれからなる）リガンドが提供される。ある特定の実施形態では、対象におけるがん（例えば、結腸癌、膵臓癌、非小細胞肺癌、RNF43中の突然変異を特徴とするがん、USP6過剰発現を特徴とするがん、またはR-スポンジン（RSPO）ファミリーメンバーを伴う遺伝子融合を特徴とするがん）の治療に使用するための、FZD7のCRDと結合する、または特異的に結合する、本明細書で提供される天然に存在しないペプチドを含む（例えば、それから本質的になる、またはそれからなる）リガンドが提供される。ある特定の実施形態では、対象におけるがん、例えば、結腸癌、膵臓癌、非小細胞肺癌、RNF43中の突然変異を特徴とするがん、USP6過剰発現を特徴とするがん、またはR-スポンジン（RSPO）ファミリーメンバーを伴う遺伝子融合を特徴とするがんの治療に使用するための、FZD7のCRDと結合する、または特異的に結合する、本明細書で提供される天然に存在しないペプチドを含む（例えば、それから本質的になる、またはそれからなる）リガンドを含む、組成物（薬学的組成物など）が提供される。ある特定の実施形態では、対象におけるがん、例えば、結腸癌、膵臓癌、非小細胞肺癌、RNF43中の突然変異を特徴とするがん、USP6過剰発現を特徴とするがん、またはR-スポンジン（RSPO）ファミリーメンバーを伴う遺伝子融合を特徴とするがんの治療に使用するための、FZD7のCRDと特異的に結合する、本明細書で提供される天然に存在しないペプチドを含む（例えば、それから本質的になる、またはそれからなる）リガンドを含む、組成物（薬学的組成物など）が提供される。ある特定の実施形態では、リガンドは、配列番号13または配列番号99に記載されるアミノ酸配列を含む天然に存在しないペプチドを含む（例えば、それから本質的になる、またはそれからなる）。ある特定の実施形態では、治療される対象は、哺乳動物（例えば、ヒト、非ヒト霊長類、ラット、マウス、ウシ、ウマ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、イヌ、ネコ等）である。ある特定の実施形態では、対象は、ヒトである。患者は、臨床患者、臨床試験志願者、実験動物等である。ある特定の実施形態では、対象は、がん（例えば、結腸癌、膵臓癌、非小細胞肺癌、RNF43中の突然変異を特徴とするがん、USP6過剰発現を特徴とするがん、またはR-スポンジン（RSPO）ファミリーメンバーを伴う遺伝子融合を特徴とするがん）を有することが疑われるか、または有する危険性がある。

【0175】

投与及び用量

FZD7のCRDと結合する、または特異的に結合する、本明細書で提供される天然に存在しないペプチドを含む（例えば、それから本質的になる、またはそれからなる）リガンドの投与は、例えば、静脈内、筋肉内、または皮下を含む任意の好適な経路によってであり得る。ある特定の実施形態では、FZD7のCRDと結合する、または特異的に結合するもののCRDと特異的に結合する、本明細書で提供される天然に存在しないペプチドを含む（例えば、それから本質的になる、またはそれからなる）リガンドは、例えば、異常なWnt活性を伴う疾患または障害を治療するために、第2、第3、または第4の薬剤（例えば、抗体新生物剤、成長阻害剤、細胞傷害性剤、もしくは化学療法剤）と組み合わせて投与される。ある特定の実施形態では、FZD7のCRDと結合する、または特異的に結合する、本明細書で提供される天然に存在しないペプチドを含む（例えば、それから本質的になる、またはそれからなる）リガンドは、追加の薬剤に複合される。このような薬剤としては、例えば、化学療法剤が挙げられる。ある特定の実施形態では、FZD7のCRDと結合する、または特異的に結合する、本明細書で提供される天然に存在しないペプチドを含む（例えば、それから本質的になる、またはそれからなる）リガンドは、追加の薬剤に複合される。

【0176】

FZD7のCRDと結合する、または特異的に結合する、本明細書で提供される天然に

存在しないペプチドを含む（例えば、それから本質的になる、またはそれからなる）リガンドは、静脈内（例えば、注入ポンプ）、腹腔内、眼内、動脈内、肺内、経口、吸入、小胞内、筋肉内、気管内、皮下、眼内、髄腔内、経皮、経胸膜、動脈内、局所、吸入（例えば、スプレーの噴霧）、粘膜（例えば、鼻粘膜を介して）、皮下、経皮、胃腸、関節内、槽内、脳室内、直腸（すなわち、坐薬を介して）、膣（すなわち、ペッサリーを介して）、頭蓋内、尿道内、肝臓内、及び腫瘍内を含むが、これらに限定されない任意の経路を介して個体に投与され得る。いくつかの実施形態では、F Z D 7 の C R D と結合する、または特異的に結合する、本明細書で提供される天然に存在しないペプチドを含む（例えば、それから本質的になる、またはそれからなる）リガンドは、全身投与される（例えば、静脈内注射によって）。いくつかの実施形態では、F Z D 7 の C R D と結合する、または特異的に結合する、本明細書で提供される天然に存在しないペプチドを含む（例えば、それから本質的になる、またはそれからなる）リガンドは、局所投与される（例えば、動脈内または眼内注射によって）。

10

【0177】

治療される適応症及び当該分野における熟練医師が精通している投薬に関連する因子に応じて、F Z D 7 の C R D と結合する、または特異的に結合する、本明細書で提供される天然に存在しないペプチドを含む（例えば、それから本質的になる、またはそれからなる）リガンドは、毒性及び副作用を最小限に抑えながら、その適応症の治療に有効である投与量で投与される。典型的な用量は、例えば、 $0.001 \sim 1000 \mu\text{g}$ の範囲内であり得るが、この例示的な範囲より下または上の用量は、本発明の範囲内である。日用量は、総体重の約 $0.1 \mu\text{g}/\text{kg} \sim 100 \text{mg}/\text{kg}$ （例えば、約 $5 \mu\text{g}/\text{kg}$ 、約 $10 \mu\text{g}/\text{kg}$ 、約 $100 \mu\text{g}/\text{kg}$ 、約 $500 \mu\text{g}/\text{kg}$ 、約 $1 \text{mg}/\text{kg}$ 、約 $50 \text{mg}/\text{kg}$ 、または前述の値のうちのいずれか2つによって定義される範囲）、好ましくは総体重の約 $0.3 \mu\text{g}/\text{kg} \sim 10 \text{mg}/\text{kg}$ （例えば、約 $0.5 \mu\text{g}/\text{kg}$ 、約 $1 \mu\text{g}/\text{kg}$ 、約 $50 \mu\text{g}/\text{kg}$ 、約 $150 \mu\text{g}/\text{kg}$ 、約 $300 \mu\text{g}/\text{kg}$ 、約 $750 \mu\text{g}/\text{kg}$ 、約 $1.5 \text{mg}/\text{kg}$ 、約 $5 \text{mg}/\text{kg}$ 、または前述の値のうちのいずれか2つによって定義される範囲）、より好ましくは総体重の約 $1 \mu\text{g}/\text{kg} \sim 1 \text{mg}/\text{kg}$ （例えば、約 $3 \mu\text{g}/\text{kg}$ 、約 $15 \mu\text{g}/\text{kg}$ 、約 $75 \mu\text{g}/\text{kg}$ 、約 $300 \mu\text{g}/\text{kg}$ 、約 $900 \mu\text{g}/\text{kg}$ 、または前述の値のうちのいずれか2つによって定義される範囲）、及び更により好ましくは1日当たり体重 1kg 当たり約 $0.5 \sim 10 \text{mg}/\text{kg}$ （例えば、約 $2 \text{mg}/\text{kg}$ 、約 $4 \text{mg}/\text{kg}$ 、約 $7 \text{mg}/\text{kg}$ 、約 $9 \text{mg}/\text{kg}$ 、または前述の値のうちのいずれか2つによって定義される範囲）であり得る。上記のように、治療的または予防的有効性は、治療された患者の定期的な評価によってモニタリングされ得る。数日間以上にわたる反復投与の場合、病態に応じて、治療は、疾患症状の所望される抑制が生じるまで反復される。しかしながら、他の投薬量レジメンも有用であり得、本発明の範囲内である。所望の投薬量は、組成物の単一ボラス投与によって、組成物の複数ボラス投与によって、または組成物の持続注入投与によって送達され得る。

20

30

【0178】

F Z D 7 の C R D と結合する、または特異的に結合する、本明細書で提供される天然に存在しないペプチドを含む（例えば、それから本質的になる、またはそれからなる）リガンドを含む薬学的組成物は、1日1回、2回、3回、または4回投与され得る。組成物はまた、1日1回よりも低い頻度で、例えば週6回、週5回、週4回、週3回、週2回、週1回、2週間毎に1回、3週間毎に1回、月1回、2ヶ月毎に1回、3ヶ月毎に1回、または6ヶ月毎に1回投与され得る。組成物はまた、持続放出製剤中で、例えば一定期間にわたって使用するための組成物を徐々に放出し、組成物がより低い頻度で（例えば、月1回、2～6ヶ月毎に1回、年1回、または更に単一投与で）投与されるのを可能にする埋め込み物中で投与されてもよい。持続放出デバイス（例えば、ペレット、ナノ粒子、マイクロ粒子、ナノスフィア、マイクロスフィア等）が、注入によって投与されてもよい。

40

【0179】

F Z D 7 の C R D と結合する、または特異的に結合する、本明細書で提供される天然に

50

存在しないペプチドを含む（例えば、それから本質的になる、またはそれからなる）リガンドは、単一日用量で投与され得るか、または一日総用量が、1日2回、3回、もしくは4回の分割投薬量で投与され得る。組成物はまた、1日1回よりも低い頻度で、例えば週6回、週5回、週4回、週3回、週2回、週1回、2週間毎に1回、3週間毎に1回、月1回、2ヶ月毎に1回、3ヶ月毎に1回、または6ヶ月毎に1回投与され得る。組成物はまた、持続放出製剤中で、例えば一定期間にわたって使用するための組成物を徐々に放出し、組成物がより低い頻度で（例えば、月1回、2～6ヶ月毎に1回、年1回、または更に単一投与で）投与されるのを可能にする埋め込み物中で投与されてもよい。持続放出デバイス（例えば、ペレット、ナノ粒子、マイクロ粒子、ナノスフィア、マイクロスフィア等）が、様々な位置に注入によって投与され得るか、または外科的に移植され得る。

10

【0180】

製品及びキット

ある特定の実施形態では、本明細書におけるF Z D 7のC R Dと結合する、または特異的に結合する、本明細書で提供される天然に存在しないペプチドを含む（例えば、それから本質的になる、またはそれからなる）リガンド及び／または、かかるリガンドを含む薬学的組成物、ならびにがん（結腸癌、膵臓癌、非小細胞肺癌、R N F 4 3中の突然変異を特徴とするがん、U S P 6過剰発現を特徴とするがん、またはR-スポンジン（R S P O）ファミリーメンバーを伴う遺伝子融合を特徴とするがんなど）の治療に有用な材料を含む製品が提供される。製品は、容器、及び容器上または容器に伴ってラベルまたは添付文書を含み得る。好適な容器としては、例えば、ボトル、バイアル、シリンジ等が挙げられる。容器は、ガラスまたはプラスチックなどの様々な材料から形成され得る。ある特定の実施形態では、容器は、無菌単位用量パッケージを収容する。ラベルまたは添付文書は、がん（結腸癌、膵臓癌、非小細胞肺癌、R N F 4 3中の突然変異を特徴とするがん、U S P 6過剰発現を特徴とするがん、またはR-スポンジン（R S P O）ファミリーメンバーを伴う遺伝子融合を特徴とするがんなど）の治療するために使用されることを示す。ラベルまたは添付文書は、F Z D 7のC R Dと結合する、または特異的に結合する、本明細書で提供される天然に存在しないペプチドを含む（例えば、それから本質的になる、またはそれからなる）リガンドを、患者に投与するための説明書を更に含む。本明細書に記載の併用治療薬を含む製品及びキットもまた企図される。

20

【0181】

添付文書とは、かかる治療薬の適応症、使用、投薬量、投与、禁忌及び／またはその使用に関する警告についての情報を含む、治療薬の商業用パッケージに通例含まれる説明書を指す。ある特定の実施形態では、添付文書は、F Z D 7のC R Dと結合する、または特異的に結合する、本明細書で提供される天然に存在しないペプチドを含む（例えば、それから本質的になる、またはそれからなる）リガンド（またはかかるリガンドを含む薬学的組成物）は、がん（結腸癌、膵臓癌、非小細胞肺癌、R N F 4 3中の突然変異を特徴とするがん、U S P 6過剰発現を特徴とするがん、またはR-スポンジン（R S P O）ファミリーメンバーを伴う遺伝子融合を特徴とするがんなど）の治療するために使用されることを示す。さらに、製品は、薬学的に許容される緩衝液、例えば、注射用静菌水（B W F I）、リン酸緩衝生理食塩水、リンガー溶液及びデキストロス溶液を含む第2の容器を更に含み得る。製品は、他の緩衝剤、希釈剤、フィルター、針及びシリンジを含む、商業的観点及びユーザの観点から望ましい他の材料を更に含み得る。

30

40

【0182】

任意に製品と組み合わせて、様々な目的、例えば患者におけるF Z D 7の単離または検出に有用なキットもまた提供される。F Z D 7の単離及び精製のために、キットは、ビーズ（例えば、セファロースビーズ）にカップリングされたF Z D 7のC R Dと結合する、または特異的に結合する、本明細書で提供される天然に存在しないペプチドを含む（例えば、それから本質的になる、またはそれからなる）リガンドを含有し得る。F Z D 7の単離及び精製のために、キットは、ビーズ（例えば、セファロースビーズ）にカップリングされたF Z D 7のC R Dと特異的に結合する、本明細書で提供される天然に存在しないペ

50

プチドを含む（例えば、それから本質的になる、またはそれからなる）リガンドを含有し得る。インビトロでの（例えば、ELISAまたはプロットでの）FZD7の検出及び定量のための、FZD7のCRDと結合する、または特異的に結合する、本明細書に記載される天然に存在しないペプチドを含む（例えば、それから本質的になる、またはそれからなる）リガンドを含有するキットが提供される。製品と同様に、キットは、容器、及び容器上、または容器に伴ってラベルまたは添付文書を含む。例えば、容器は、本明細書に記載されるFZD7のCRDと結合する、または特異的に結合する、本明細書で提供される天然に存在しないペプチドを含む（例えば、それから本質的になる、またはそれからなる）少なくとも1つのリガンドを含む組成物を収容する。例えば、希釈剤及び緩衝液、対照抗体等を含む追加の容器が含まれてもよい。そのラベルまたは添付文書は、その組成物の説明ならびに意図されているインビトロまたは検出用途についての説明を提供してもよい。

10

【実施例】

【0183】

実施例1：材料及び実施例2～5の方法

試薬、プラスミド、抗体及び組み換えタンパク質

マウスWnt3a（カタログ番号1324-WN/CF）タンパク質を、R&D systemsから購入した。FZD CRD-Fc及びsFRPタンパク質（R&D systems）を、PBS中に10 μMまで溶解し、hFZD1 CRD-Fc（カタログ番号5988-FZ）、mFZD2 CRD-Fc（カタログ番号1307-FZ）、hFZD4 CRD-Fc（カタログ番号5847-FZ）、hFZD5 CRD-Fc（カタログ番号1617-FZ）、hFZD7 CRD-Fc（カタログ番号6178-FZ）、mFZD7 CRD-Fc（カタログ番号198-FZ）、hFZD8 CRD-Fc（カタログ番号6129-FZ）、mFZD9 CRD-Fc（カタログ番号2440-FZ）、hFZD10 CRD-Fc（カタログ番号3459-FZ）、hsFRP1（カタログ番号5396-SF）、hsFRP2（カタログ番号6838-FR）、hsFRP-3（カタログ番号192-SF）、hsFRP-4（カタログ番号1827-SF）及びhsFRP-5（カタログ番号6266-SF）を含む。バイオニル化Wnt3a（Bio-Wnt3a）及びWnt5a（Bio-Wnt5a）は、R&D systemsによって生成された（現在はカタログアイテムではない）。要するに、Wnt3aまたはWnt5aを、0.5% CHAPSを含有するPBS（pH7.4）に透析し、製造者の推奨に従いバイオニル化した（Pierce、カタログ番号21338）。pcDNA3.2 Wnt1及びWnt3a構築体は、Open Source Wntプロジェクトから得た（Najdi et al.（2012）Differentiation 84, 203-213）。抗Lrp6及び抗ブタクサ抗体は、以前に記載されているように生成した（Tian et al.（2015）Cell Rep 11, 33-42）。ペプチドは、標準Fmoc化学によって合成した。他の試薬は、バイオニル化ペルオキシダーゼ（カタログ番号432040、Invitrogen）、ヤギ抗ヒトIgG Fc-HRP（カタログ番号A18817、ThermoFisher Scientific）、DMSO（カタログ番号D2650、Sigma）及びFuGENE-HD（カタログ番号E2311、Promega）を含んでいた。

20

30

40

【0184】

hFZD7 CRD-Hisは、Kifunensineで処置したEndoHを発現するTrichoplusia ni細胞中の分泌タンパク質として発現され、次いで別の場所に記載されているように、標準Ni-NTA親和性クロマトグラフィーに続いてサイズ排除クロマトグラフィーによって精製された（Bourhis et al.（2010）J. Biol. Chem. 285, 9172-9179）。親和性ビーズを、150 mM NaCl、50 mM Tris-HCl（pH7.5）で洗浄した。単量体のサイズに対応する主要ピークを、同じ緩衝液中0.5 mL/分でSuperdex 75カラムを使用して、複数回のサイズ排除クロマトグラフィーにより精製した。Fz7-21に

50

融合された hFZD7 CRD は、Trichoplusia ni 細胞中の分泌タンパク質として発現され、Ni-NTA 親和性クロマトグラフィーによって精製された。ピーズを、150 mM NaCl、50 mM Tris-HCl (pH 7.5) で洗浄した。主要二量体ピークを、同じ緩衝液中 7 mL/分 で SRT-10 21.2 × 300 mm SEC300 カラムを使用して、複数回のサイズ排除クロマトグラフィーにより精製した。FZD3 及び FZD6 に対する複数の構築体設計を、分泌タンパク質としての Trichoplusia ni または SF9 昆虫細胞において試験し、それらの発現を、還元条件または非還元条件のいずれかで SDS-PAGE によってモニタリングした。いずれの試験した条件も、下流分析に十分な品質のタンパク質を提供しなかった。

【0185】

以下の Uniprot ID を使用して、配列アラインメントを行った：FZD1 : Q9UP38、FZD2 : Q14332、FZD3 : Q9NPG1、FZD4 : Q9ULV1、FZD5 : Q13467、FZD6 : O60353、FZD7 : O75084、FZD8 : Q9H461、FZD9 : O00144、FZD10 : Q9ULW2、hsFRP1 : Q8N474、hsFRP2 : Q96HF1、hsFRP3 : Q92765、hsFRP4 : Q6FHJ7、及び hsFRP5 : Q5T4F7。

【0186】

hFZD7 CRD-Fc に対するファージ選別

直鎖状ペプチドライブラリのファージプール (Stanger, K. et al. Allosteric peptides bind a caspase zymogen and mediate caspase tetramerization. Nat Chem Biol 8, 655-660 (2012)) を、標準プロトコルに従い、hFZD7 CRD-Fc により複数回の結合選別を通して環化した (Tonikian et al. (2007) Nat Protoc 2, 1368-1386)。ハーセプチン (10 µM) を選別溶液に含めて、全ての選別中に潜在的 Fc 結合剤を遮断した。4 回の結合選別後、個々のファージクローンを、特異性試験の標的または非標的としてプレート固定化 FZD7 CRD-Fc を使用し、高スループットスポットファージ ELISA において分析した (hFZD8 CRD-Fc 及びハーセプチン)。非標的親和性を測定するために、二重ファージ粒子を BSA に対してアッセイし、非特異性結合を測定した。0.5 超のファージ結合シグナル及び 10 超のシグナル対ノイズ比を有するクローンは、陽性クローンであるとみなされ、DNA 配列分析に供された。一般データ処理は、別途記載がない限り、Microsoft Excel 2010 を使用して行った。

【0187】

ペプチド合成

全てのペプチドは、別の場所に記載されているように、標準 9-フルオレニルメトキシカルボニルプロトコルを使用して合成し (Zhang et al. (2009) Nat Chem Biol 5, 217-219)、N 末端はアセトアミドとして保護し、C 末端は、カルボキシアミドとして保護して、RP-HPLC によって精製した。ペプチド品質 (90% 超純度) を LC-MS によってチェックし、ペプチド識別を MS によって確認した。

【0188】

細胞培養及びトランスフェクション

ホタルルシフェラーゼ Wnt レポーター (TOPbrite, TB) (Zhang et al. (2009) Nat Chem Biol 5, 217-219) 及び pRL-SV40 Renilla ルシフェラーゼ (カタログ番号 E2231、Promega) と安定して統合された HEK293 を、10% FBS、2 mM Glutamax (商標) (カタログ番号 35050-061、Gibco) 及び 40 µg/mL ヒグロマイシン (カタログ番号 30-240-CR、Cellgro) で補充された DMEM : F12 (50 : 50) 中で成長させた。細胞を、いかなる実験の前にも、5% CO₂ 加湿インキュベータ中、37 °C で 24 時間インキュベートした。ルシフェラーゼレポーターアッ

10

20

30

40

50

セイのために、50 μ LのHEK293-TB細胞(20,000細胞/ウェル)を、透明底の白色ポリスチレン96ウェルプレートの各ウェルに播種した(カタログ番号353377、Falcon)。24時間後、細胞を、示されたWnt構築体及びFugene HD(カタログ番号E2312; Promega; cDNA及びFugeneは、10 μ LのOptiMEM[カタログ番号31985-070; Gibco]中で混合した)で24時間トランスフェクトし、次いで示されたペプチドで6時間処理し、50 μ LのDual-Gloシフェラーゼアッセイシステム(カタログ番号E2940; Promega)で処理した。ペプチドでの処理のために、全てのペプチドをDMSO中に希釈し、1%の最終DMSO濃度で細胞に添加した。組み換えWntタンパク質での処理のために、全てのWntをPBS中に希釈し、同時にペプチドと共に細胞に添加した後、上記のように処理した。ホタル及びウミシイタケ発光を、Perkin Elmer EnVision(登録商標)マルチラベルリーダー上で測定した。ホタル発光とウミシイタケ発光との比を計算し、バックグラウンド除去し、Wnt3aのみ(50 ng/mL)で処理した対照細胞中の比に正規化した。細胞株をGenentech gCellラボラトリーから入手し、マイコプラズマ汚染について試験し、SNP分析によって認証された。

10

【0189】

FACS分析

gD-FZDを安定して発現する細胞株を、10% FBS(カタログ番号1500-100; Seradigm)、1X GlutMAX(カタログ番号35050-061; Gibco)、及びG418(200 μ g/mL; カタログ番号A1720; Sigma)で補充されたDMEM:F12(50:50)培地中で約80%コンフルエンスまで成長させ、PBS(カタログ番号15400-054; Gibco)中0.05%トリプシン/EDTAで遊離させ、氷上で収集し、緩衝液を氷冷FACS緩衝液(PBS中0.5% BSA及び0.05% NaAz)に交換した。100,000細胞/ウェルを、氷冷U底プレート(カタログ番号3799; Costar)にプレートに播き、細胞を1200 rpmで3分間、遠心分離によってペレット化した。細胞を、FACS緩衝液中のマウス抗gD抗体(Genentech; gD:952; 500 ng/mL)で補充された5FAM-Fz7-21(12.5 μ M)またはDMSO(カタログ番号D2650; Sigma)で1時間、暗所、氷上で処理した。5FAM-Fz7-21Sで処理した細胞は、著しい非特異的結合を呈し、分析から除外された。細胞を、氷上の氷冷FACS洗浄緩衝液(PBS中の0.5% BSA及び0.1% NaAz)で3回洗浄した。次いで細胞を、Alexa 647複合ロバ抗マウスIgG(H+L)二次抗体(500 ng/mL; カタログ番号A-31571; Invitrogen)で、暗所で1時間、氷上で処理した。細胞を、氷上の氷冷FACS洗浄緩衝液で3回洗浄し、次いで15分間、SYTOX(カタログ番号S34857; Invitrogen)でインキュベートした後、BD Fortessa器具上で分析した。データをFACS Diva(BD; バージョン8.0.1)で収集し、FlowJo(FlowJo, LLC; v10.1)を使用して分析した。

20

30

【0190】

ELISA

384-ウェルMaxisorpプレート(カタログ番号464718; Thermo Scientific)を、30 μ LのNeutravidin(カタログ番号31000, Thermo Scientific; PBS中2 μ g/mL)で一晩、4°Cでインキュベートした。次いでプレートを、PBSTで洗浄し、PBS/1% BSAで1時間、室温で遮断した後、更なる処理前にPBSTで洗浄した。結合アッセイを、PBS/1% BSAで、一晩4°Cで遮断された96ウェルプレート(カタログ番号83007-374; VWR)で行った。hFZD4 CRD-FcまたはhFZD7 CRD-Fc(63 ng/mL)を、PBS中の示されたペプチドの4倍段階希釈の存在下、Bio-Wnt3a(25 ng/mL)またはBio-Wnt5a(50 ng/mL)のいずれかで一晩4°Cでインキュベートした。全てのアッセイは、陰性対照としてhFZD9 CR

40

50

D-m l g G 2 Aタンパク質を含んでいた。h F Z D 7 C R D-H i sを、1 5 0 m M Na C l、5 0 m M T r i s-H C l中にp H 7. 5で懸濁し、アッセイで使用するとき、等量の同じ緩衝液対照を使用した。結合アッセイ混合物を、N e u t r a v i d i nコーティングしたプレートに移し、室温で約1時間インキュベートした。次いでウェルを、P B S Tで洗浄し、抗h I g G 1-H R Pでインキュベートし（1% B S Aで補充したP B S中に懸濁された1：1 0, 0 0 0、カタログ番号A 1 8 8 1 7、I n v i t r o g e n）、P B S Tで再度洗浄した。等量の1 Mリン酸を1 0分間添加する前に、1 5分間T M B試薬を添加して（製造業者の推奨に従い、K P L、5 0-7 6-0 0）シグナルを発生させた。T e k a n M 1 0 0 0プレートリーダーを使用し、吸光度を4 5 0 n mで測定した。値を収集し、P r i s m G r a p h p a dソフトウェアを使用してプロットした。ペプチドを使用する全てのアッセイ条件は、1% D M S Oの最終濃度であった。

【0191】

蛍光サイズ排除クロマトグラフィー

蛍光サイズ排除クロマトグラフィー（F S E C）実験を、U N I C O R Nソフトウェアパッケージ（バージョン5. 3 1）と共にA K T A F P L Cシステム（G e n e r a l E l e c t r i c C o m p a n y）を使用して実行した。リン酸緩衝液中0. 5 m L /分でS E C 3 0 0 0またはS E C 2 0 0 0（P h e n o m e n e x ; T o r r e n c e , C A）カラムを使用して、試料を分離した。F P-2 0 2 0 P l u s 蛍光検出器（J a s c o A n a l y t i c a l I n s t r u m e n t s , E a s t o n , M D）を通常モード（励起／放出、5 5 0 / 4 9 4 n m ; 利得=1 0 0 ; S T D=3 2）で使用して、蛍光をモニタリングした。1%の最終D M S O濃度で全ての試料を調製し、試料分離前に4℃で一晩インキュベートした。F Z D C R D-F c試料を、過剰5 F A M標識ペプチド（1 μ M）の存在下、約2 5 0 n Mで保持した。ヒト分泌F r i z z l e d関連タンパク質を、過剰5 F A M標識ペプチド（1 0 μ M）の存在下、約2 5 0 n Mで維持した。

【0192】

多角度光散乱と組み合わせたサイズ排除クロマトグラフィー

h F Z D 7 C R D（1 5. 8 μ M）を、サイズ排除クロマトグラフィー（S E C）による分析及び多角度静的光散乱（M A L S）による検出前に、タンパク質対ペプチドの示された比で2時間、F z 7-2 1、F z 7-2 1 S、またはD M S Oとともにインキュベートした。試料を、S u p e r d e x S 2 0 0 3. 2 / 3 0 0カラム（G e n e r a l E l e c t r i c H e a l t h c a r e L i f e S c i e n c e , P i t t s b u r g h , P A ; カタログ番号2 8 9 9 0 9 4 6）により、0. 1 5 m L /分で1% D M S O最終濃度の1 5 0 m M Na C l、5 0 m M T r i s-H C l（p H 7. 5）緩衝液中に溶解した。D a w n H e l e o s-I I 多角度静的光散乱（M A L S）検出器及びO p t i l a b T-r E X示差屈折率（d R I）検出器（W y a t t T e c h n o l o g i e s , S a n t a B a r b a r a , C a l i f o r n i a）に接続された1 2 6 0 i n f i n i t y H P L C（A g i l e n t T e c h n o l o g y , S a n t a C l a r a , C A）上で実行を行った。

【0193】

X線結晶学

h F Z D 7 C R D-H i sを精製し、緩衝液を1 5 0 m M Na C l、5 0 m M T r i s-H C l p H 7. 5に交換した後、遠心分離によって約2 5 m g / m Lまで濃縮した（カタログ番号U F C 9 0 0 3 2 5 ; M i l l i p o r e A m i c o n U l t r a 1 5）。タンパク質を、M E S p H 6. 5（カタログ番号1 3 4 3 1 2 ; Q i a g e n）と共に2 5% P E G 2 0 0 0 M M E（w / v）で希釈し、蒸気拡散によって1 9℃で成長させた。十分な品質の結晶が1 0日以内に成長し、3 0% P E G 2 0 0 0 M M Eで補充された母液中で低温保護し、液体窒素中で急速冷凍した。データセットを、S t a n f o r d S y n c h r o t r o n R a d i a t i o n L i g h t s o u r c e（S S R L）1 2-2において収集し、2. 0 0 Å分離度での分子置換によって解析

した。(Nile, et al. (2017) "Unsaturated fatty acyl recognition by Frizzled receptors mediates dimerization." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 114, 4147–4152 LID –4110.1073/pnas.1618293114 [doi])。Fz7-21に融合されたhFZD7 CRD [Gln33–Gly168]は、EndoHを発現する*Trichoplusia ni*細胞中の分泌タンパク質として発現され、Kifunensineで処理した。hFZD7 CRDを、分泌タンパク質としてpACGP67-Aベクター (BD Biosciences–Pharmingen) に挿入した。Fz7-21に融合されたhFZD7 CRDを、Ni–NTAビーズ上を通過させ (Qiagen; 1018401)、300mM NaCl、50mM Tris、HCl pH7.5で洗浄した後、300mMイミダゾールを含有する同じ緩衝液で溶出した。溶出液を収集し、濃縮して、緩衝液を150mM NaCl、50mM Tris HCl pH7.5に交換し、二量体プールを、150mM NaCl、50mM Tris–HCl pH8.0中のゲル濾過 (Superdex 200; GE Healthcare Life Sciences) によって収集した。二量体断片を遠心分離によって約20mg/mLまで濃縮し、タンパク質を1–プロパノール14% (v/v; カタログ番号09158; Fluka)、9% PEG5000 MME (カタログ番号HR–2–615; Hampton Research)、及びpH6.9の0.1M MES (カタログ番号HR2–243; Hampton Research) で1:1混合まで希釈し、蒸気拡散によって4℃で成長させた。X線回折データを、画素アレイ検出器 (Pilatus, Dectris AG, Switzerland) を用いてAdvanced Photon Source (Argonne National Laboratory) ビームライン17IDで収集した。X線波長は、1.00000 Åに設定した。

【0194】

極低温度 (–180℃) 下で単結晶を用いて、完全なデータセットを収集した。回折データは、プログラムXDS (Kabsch, W. Integration, scaling, space-group assignment and post-refinement. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography* 66, 133–144 (2010)) を使用して統合し、CCP4パッケージの無目的プログラム (Blessing, R. H. An empirical correction for absorption anisotropy. *Acta Crystallogr A* 51 (Pt 1), 33–38 (1995)) (Murshudov, G. N., Vagin, A. A. & Dodson, E. J. Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 53, 240–255 (1997)) を使用してスケーリングした。(構造は、プログラムPhaserを使用し (McCoy, A. J. et al. Phaser crystallographic software. *Journal of Applied Crystallography* 40, 658–674 (2007))、分子置換 (MR) によって相分析した。hFZD7 CRD構造を、MRサーチモデル (PDB ID #5URV) として使用した (Nile, A. H., Mukund, S., Stanger, K., Wang, W. & Hannoush, R. N. Unsaturated fatty acyl recognition by Frizzled receptors mediates dimerization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 114, 4147–4152 LID –4110.1073/pnas.1618293114 [doi] (2017))。この構造は、後にグラフィックプログラムCOOT (Emsley, P., Lohkamp, B., Scott, W. G. & Cowtan, K. Features and development of Co

ot. Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography 66, 486–501 (2010)) 及びプログラム PHENIX (Adams, P. D. et al. PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. Acta Crystallographica Section D 66, 213–221 (2010)) においてコードされた最大尤度最小二乗精製プロトコルを用いた反復モデル構成に供された。最終構造を 2.88 Å 分離度まで精密化し、残基の 88.3% がラマチャンドランプロットの好ましい領域内、11.1% が許容される領域内、0.3% が一般に許容される領域内、0.2% が許容されない領域内に含まれた。ランダム電子密度は、FZD7 CRD 疎水性空洞内で観察されたが、確信的な割り当てを行うことはできなかった。より詳細な回折データ処理及び構造精密化統計は、表 10 にみることができる。X 線回折データは、Advanced Photon Source (Argonne National Laboratory) ビームラインで収集した。Fz7-21 と複合した FZD7 CRD の構造は、コード 5WBS で PDB データベースに寄託した。

10

【0195】

構造分析

FZD 分子の保存を計算し、表示するために、ヒト (h) FZD8 の表面を代理として使用して、10 hFZD CRD 間の保存を提示した (hFZD1~hFZD10、青緑色：低保存、栗色、高保存)。hFZD CRD 配列を Uniprot から取得し、UGENE46 (v1.14.1) で集約し (Okonechnikov, K., Golosova, O., Fursov, M. & team, t. U. Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit. Bioinformatics 28, 1166–1167 (2012)、及び Clustal Omega33 を用いて整列させた。CRD 境界の基準として絶対的に保存されたシステイン残基に多く依存するガイドとして hFZD7 CRD (Y35~D167) を使用する反復アラインメントに従い、配列をトリミングした。アラインメントファイルを UCSF キメラ (v1.10.2) にエクスポートし (Pettersen, E. F. et al. UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis. J Comput Chem 25, 1605–1612 (2004))、AL2CO アルゴリズムを使用し (Pei, J. & Grishin, N. V. AL2CO: calculation of positional conservation in a protein sequence alignment. Bioinformatics 17, 700–712 (2001))、独立したカウントによる頻度推定を使用して計算し、エントロピーに基づくアプローチ及び 0.5 のギャップ比率を有する平均ウィンドウ 1 によって保存を測定した。AL2CO から計算された保存値は、平均からの標準偏差を表し、色勾配にわたって +1.678 (最大保存：栗色) ~ -1.539 (最小保存：青緑色) の範囲であり、この諧調は、mFZD8 CRD (PDB ID# 4FOA) 中の分子表面として表示された。

20

30

40

【0196】

dFz7-21 間の分子間相互作用を計算するために、UCSF キメラ 47 内の検索クラッシュ/接触ユーティリティを使用して、VDW 半径の総和 - 2 つの原子間の距離 - 潜在的に水素結合された対の許容範囲 $[\text{overlap}_{ij} = r_{VDW_i} + r_{VDW_j} - d_{ij} - \text{allowance}_{ij}]$ として定義された 2 つの原子間のオーバーラップを特定した。この計算は、極性及び非極性の好ましい及び好ましくない (クラッシュを含む) 全ての直接相互作用を特定し、VDW オーバーラップは -0.4 Å 超であり、潜在的水素結合対について控除されたオーバーラップはない。単離された dFz7-21 分子 (鎖 A 及び鎖 B) の溶媒露出表面 (SAS) 分子表面は、UCSF キメラパッケージ内の MSMS パッケージ (Sanner, M. F., Olson, A. J. & Spehner, J. C

50

. Reduced surface: an efficient way to compute molecular surfaces. Biopolymers 38, 305-320 (1996)) (プローブ半径 1.4 Å) を使用して計算した。

【0197】

hFZD7 CRD疎水性空洞表現

Fz7-21と複合したhFZD7 CRD内の疎水性空洞を視覚化するために、mFZD8 CRD (PDB ID# F40A) と複合した2つのXWnt8分子を、Needleman-Wunschアラインメントアルゴリズム及びBLAST-62マトリクスを用い、UCSFキメラにおけるMatchMakerユーティリティを使用してhFZD7 CRD構造の上に重畳した。連続疎水性表面を、約5 Åの脂肪アシル部分内で特定した。F40AとのアポhFZD7 CRDの重畳において、脂肪酸をそれらのω炭素から切断して、疎水性空洞内の脂肪酸間のクラッシュを排除し、次いで上記のように疎水性空洞検索を行い、約5 Åの脂肪アシル基内の疎水性表面を特定した。

【0198】

インシリコ分析

hFZD7 CRDのU形疎水性空洞内で結合する伸長した脂肪アシル部分 (C16:n-7) を有するhFZD7 CRD (PDB ID# 5URV) と複合したXWnt8a (PDB ID# 4F0A) の図39A及び39Bに提示されたモデルは、MOE (Chemical Computing Group, バージョン2017.05) において構築した。mFZD8 CRD (PDB ID# 4F0A) をガイドとして使用して、C24に結合したhFZD7 CRD構造 (PDB ID# 5URV) の上にXWnt8を重畳した。プロトン化3D及び構造調製ユーティリティを、デフォルト設定を使用して適用して、水素置換を最適化した。XWnt8 Ser187において共有結合されたC14脂肪酸を切り取り、hFZD7 CRD疎水性空洞内のC24脂肪酸の輪郭に沿って伸長させた。次いで、近位の脂肪酸及び残基を、剛性水及び0.1 RMS kcal/mol/A² 勾配を有するMMFF94x力場 (eps=r、カットオフ [8, 10]) を使用して、エネルギー最小化した。hFZD7 CRDの疎水性空洞内で結合する伸長した脂肪アシル部分 (C16:n-7) を有するFz7-21に結合したhFZD7 CRDと複合したXWnt8a (PDB ID# 4F0A) の図39C及び39Dに見出されるモデルは、上記のように、MOE (Chemical Computing Group, バージョン2017.05) において構築した。各構造表示について、それぞれのリガンドを使用して疎水性空洞を定義した。連続疎水性表面を、約5 Åの結合したリガンド内で特定し、空洞の疎水性に従って視覚化した。アミノ酸疎水性による分子表面を、Kyte-Doolittleスコアリングメトリックに基づいてスケールリングする (Kyte, J. & Doolittle, R. F. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. Journal of Molecular Biology 157, 105-132 (1982))。図生成のために、座標をUCSFキメラ (バージョン1.11) にエクスポートした。

【0199】

NMR分光法

全てのNMR実験は、クライオプローブを備えたBruker Ultrashieldプラス600MHz分光計上で行った。溶液中のNMR構造の決定のために、ペプチドを1mMで、10mMリン酸緩衝液 (pH7.3) 及び10% (v/v) アセトニトリル-d₃ (ISOTEC, Inc.、カタログ番号T82-05013-ML) (H₂O中) に再懸濁した。ペプチドの全相関分光法 (TOCSY) 及び核オーバーハウザー効果分光法 (NOESY) を、27°Cでそれぞれ70ms及び350msの混合時間で記録した。Topspin (Bruker Biospin) 及びCCPN分析を、スペクトル処理、視覚化、及びピークピーキングに使用した (Vranken et al. (2005) Proteins 59, 687-696)。等核TOCSY及びNOESYスペク

トルに基づいて、ペプチドの残基を割り当てた。スピンシステム特定及び逐次帰属に基づいて、プロトンのほぼ完全な共鳴帰属を得た (Wuthrich, K. *NMR of Proteins and Nucleic Acids*. (Wiley Interscience, New York, 1986)。プロトン間の距離拘束は、NOESYスペクトルから得た。dFz7-21の3次元構造を、CYANA 3.97パッケージを使用して最初に計算した (Gunttert & Buchner (2015) *Journal of biomolecular NMR* 62, 453-471; Gunttert et al. (1997) *J Mol Biol* 273, 283-298)。単一の共鳴の組のみが観察されたため、dFz7-21は、重複配列及び対称距離拘束を用いて、CYANA計算において対称二量体として扱った。表16を参照されたい。

10

【0200】

次いで、構造をCNSで精密化した (Brunger, A. T. et al. *Crystallography & NMR system: A new software suite for macromolecular structure determination*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 54, 905-921 (1998)、Brunger, A. T. *Version 1.2 of the Crystallography and NMR system*. *Nat Protoc* 2, 2728-2733 (2007))。合計50構造を生成し、最低エネルギーを有する20構造を選別した。Procheckによる順序残基 (残基6~14) のラマチャンドラン分析は、63.1%の残基が最も好ましい領域内にあり、27.2%の残基が、追加として許容される領域内にあり、9.7%の残基が、寛大に許容される領域内にあり、0%の残基が許容されない領域内にある。目的のペプチドは、同位体標識されていないため、骨格核の帰属は得られなかった (Ca、Cb、Ha、CO)。骨格帰属がなく、二面角拘束は、構造計算に含まれなかった。構造計算に使用された化学シフト帰属及びNOE拘束は、コード30311でBMRBに寄託された。構造は、コード5W96でPDBデータベースに寄託された。

20

【0201】

オルガノイド培養

マウスオルガノイドを、小腸の全長から収集された単離陰窩から確立し、以前に記載されたように維持した (Sato et al. (2009) *Nature* 459, 262-265 (2009))。全てのマウス由来組織は、カリフォルニア州法及び倫理綱領に準拠する、Genentech、Rocheグループのメンバー、及びInstitutional Animal Care and Use Committee (動物実験委員会) の動物使用ガイドラインに従って収集を行った。マウスの性別は選別しなかった。オルガノイドを、少なくとも週2回継代し、IntestiCult Organoid成長培地 (カタログ番号06005; StemCell Technologies) を使用して成長させた。ペプチドをDMSO中に懸濁し、培地中に1% DMSO最終濃度まで溶解した後、オルガノイドに添加して、薬物処理を開始した。抗体を10 µg/mL濃度まで添加した。オルガノイドは、Andor Neoカメラ (1×1ビニング、200ms露光) を使用し、Nikon Plan Fluor 10X Ph1 DDL対物レンズを有するNikon Eclipse Tiスコープを用いて撮像し、NIS Elements (v4.50 64ビット、Nikon) を使用して取得した。APC^{min}オルガノイドは、以前に記載されたように生成した (Mello, F. d. S. et al. *A distinct role for Lgr5+ stem cells in primary and metastatic colon cancer*. *Nature* 543, 676-680 (2017))。CHIR99021 (5 µM、Stemcell Technologies) で処理されたオルガノイドについて、オルガノイドを分裂させ、DMSOまたはCHIR99021 (5 µM) で24時間、ペプチドまたはDMSOの添加前に24時間処理した。

30

40

【0202】

50

補足図 22に見出される共焦点像について、LEICA SP5レーザー走査共焦点顕微鏡を使用し、青色(DAPI)及び緑色(GFP)チャンネル内で40倍油浸レンズ(HCX PL APO CS UV, 1.25NA)を用いて画像を収集した。全ての画像は、同一条件下、逐次モードで以下のように取得した：シーケンス1(青色チャンネル)：UVレーザー(405nm)：85%励起力、PMT設定：425~470nm放射、活性利得：900、オフセット：-15；シーケンス2(緑色チャンネル)：アルゴンレーザー(488nm)、20%出力、55%励起力、PMT設定：500~550nm放射、活性利得700、オフセット：-5。2048×2048画素解像度(1.5倍ズーム)の画像を、1 Airyユニットピンホールにより400Hzの一方方向走査速度で収集した。10~20光切片のスタック(0.968マイクロメートル厚)を収集し、最大強度投影の画像を図面に使用した。

【0203】

RNA抽出及びRT-PCR

オルガノイド試料からのRNAを、RNeasyマイクロキット(カタログ番号74004; Qiagen)を使用し、製造者の指示に従って単離した。マウス小腸RNAを、RNeasyミニキット(カタログ番号74104; Qiagen)を使用して収集した。qRT-PCRは、50ngの総RNAを含む10μL反応液中で、ワンステップリアルタイムRT-PCRマスターミックス(カタログ番号4392938; Life Technologies)を使用し、製造者の指示に従って行った。Life TechnologiesからのTaqmanプローブを使用した：Actb(Mm01205647_g1)、Lgr5(Mm01251801_m1)、Axin2(Mm00443610_m1)、Ascl2(Mm01268891_g1)、Olfm4(Mm01320260_m1)、Muc2(Mm01276696_m1)、ACTB(Hs99999903_m1)、ACTB(Mm00607939_s1)、GAPDH(Mm99999915_g1)、及びGAPDH(Hs03929097_g1)。RT-PCR反応を、7900HT FastリアルタイムPCRシステム(ABI)を使用して、以下の熱循環条件で実行した：48℃で30分の保持ステップ、続いて95℃で10分の保持ステップ、ならびに95℃で10秒及び60℃で1分の40サイクル。値をアクチン転写レベルに対して正規化し、次いで図面の凡例に記載されているように、対照に対して正規化した。

【0204】

RNAシーケンシング

RNA-Seqライブラリは、TruSeq RNA試料調製キット(Illumina, CA)を使用して調製した。ライブラリを、Illumina HiSeq 2500シーケンサー上でシーケンシングして、1試料当たり平均3400万のシングルエンドリード(50bp)を得た。RNAseqリードを最初に、リボソームRNA配列に対して整列させて、リボソームリードを除去した。残りのリードは、GSNAP(バージョン2013-10-10)を使用してマウス参照ゲノム(NCBI Build 38)に対して整列させ(Wu, T. D. & Nacu, S. Fast and SNP-tolerant detection of complex variants and splicing in short reads. Bioinformatics 26, 873-881(2010))、50塩基配列当たり最大2つのミスマッチを許容する(パラメータ：'-M2-n10-B2-i1-N1-w200000-E1-pairmax-rna=200000-クリップオーバーラップ')。転写注釈は、RefSeqデータベースに基づいた(NCBI Annotation Release 104)。遺伝子発現レベルを定量するために、各RefSeq遺伝子のエクソンにマップされたリードの数を計算した。リードカウントは、ライブラリサイズ、正規化された分位数、及び"voom" Rパッケージを使用して計算された精密重量によってスケールした(Law, C. W., Chen, Y., Shi, W. & Smyth, G. K. voom: precision weights unlock linear model

analysis tools for RNA-seq read counts. *Genome Biology* 15, R29 (2014)). 後に、正規化されたカウントデータでの示差発現分析を、dFz7-21で処理した試料をDMSOまたはFz7-21のいずれかで処理した試料と、それぞれ6時間及び24時間に対比させることにより、“limma” Rパッケージを使用して行った(Ritchie, M. E. et al. limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Research* 43, e47-e47 (2015)). 更に、遺伝子発現は、以前に記載されているように、100万総リード当たりの正規化されたReads Per Kilobase遺伝子モデル(nRPKM)の形態で得られた(Srinivasan, K. et al. Untangling the brain's neuroinflammatory and neurodegenerative transcriptional responses. *Nat Commun* 7, 11295 (2016)). 収集されたRNAseqデータは、NCBIの遺伝子発現オムニバスを通して受託番号GSE94159で入手可能である。

10

【0205】

遺伝子セット分析

遺伝子発現についての定量的セット分析(QuSAGE)を行い(Yaari, G., Bolen, C. R., Thakar, J. & Kleinstein, S. H. Quantitative set analysis for gene expression: a method to quantify gene set differential expression including gene-gene correlations. *Nucleic Acids Research* 41, e170-e170 (2013))、Wnt阻害と関連した関連生物学的プロセスを特定した。その目的で、dFz7-21で処理した試料を、6時間または24時間のいずれかにおいて、DMSO試料と対比させた。各対比について、選別されたセットの遺伝子セット活性(すなわち、そのセットを構成する個々の遺伝子のlog2発現の平均差)を、腸内生物学に関連するKim et al. Single-Cell Transcript Profiles Reveal Multilineage Priming in Early Progenitors Derived from Lgr5+ Intestinal Stem Cells. *Cell Reports* 16, 2053-2060 (2016)において定義されるように計算した。

20

30

【0206】

動物試験

C57BL/6雌マウス(8週齢)は、示されたペプチド用量に到達するまで、1時間当たり1回(5回の注入で約150~200µLの注入量)腹腔内注入を受けた。対照抗Lrp6または抗Ragweed抗体(15mg/kg)の両方を実験開始時に腹腔内投与し、6時間後に小腸を採取した。dFz7-21ペプチドを、90.9mMの重炭酸アンモニウム、18.2mMの酢酸ヒスチジン、218.2mMのスクロース、及び0.018%のポリソルベート-20、ならびにpH7.5~8中に20mg/mL(160mg/kg注入の場合)または10mg/mL(80mg/kg注入の場合)まで懸濁した。抗体を、20mMの酢酸ヒスチジン、240mMのスクロース、0.02%のポリソルベート-20、pH5.5中に再懸濁した。6時間後、マウスを犠牲死させ、mRNA抽出のために小腸を採取した。動物を伴う全ての研究は、Genentechの動物実験委員会により承認され、実験動物のケア及び使用についてのNRCガイドラインに従った。

40

【0207】

実施例2: FZD7 CRDと選択的に結合するペプチドの特定

FZD7は、複数の組織特異的幹細胞において上方調節されるため、広範な幹細胞プロセスにおいて重要な役割を果たしている(Vincan & Barker (2008) Cl

50

inical & experimental metastasis 25, 657-663; Phesse, et al. (2016) Cancers 8)。10哺乳動物Frizzledの中で、FZD1、2、及び7（FZD7サブクラスに属する）は、哺乳動物成体腸陰窩の基部で富化され、そこでは多能性幹細胞が存在することが知られている（Mariadason et al. (20051) Gastroenterology 128, 1081-1088、Gregorieff et al. (2005) Gastroenterology 129, 626-638）。最近では、FZD7が、Lgr5+腸幹細胞（ISC）内で富化され、ガンマ線照射後の腸上皮の幹細胞媒介型再生に必要であることが示され、腸幹細胞内のWnt活性を媒介することを担う重要なFZD受容体として意味付けられる（Flanagan et al. (2015) Stem cell reports 4, 759-767）。FZD7遺伝子ノックダウン実験は、FZD7がまた、ヒト胚幹細胞をそれらの未分化状態で維持するために必須であることを確定した（Fernandez, et al. (2014) Proceedings of the National Academy of Sciences 111, 1409-1414, doi:10.1073/pnas.1323697111）。更に、最近のデータは、FZD7が、結腸、膵臓、及び胃腫瘍のサブセットにおいて上方調節されることを示した（Vincan et al. (2008) Clinical & experimental metastasis 25, 657-663; Phesse (2016) Cancers 8）。追加として、FZD7は、黒色腫の腫瘍開始及び転移性成長ならびにBRAF阻害剤に対するそれらの薬物耐性と関係があるとされている（Tiwarly & Xu (2016) PLoS One 11, e0147638）、Anastas et al. (2014) The Journal of clinical investigation 124, 2877-2890）。これらの発見は、FZD7受容体を、幹細胞の重要な調節因子、及び幹細胞不全と関連した疾患の魅力的薬理学的標的として強調している。

【0208】

Wntシグナル伝達は、分泌Wnt糖タンパク質とFZD受容体との相互作用時に細胞表面において開始される。Wntタンパク質上に存在する共有結合されたスー不飽和脂アシル基（パルミトレイン酸）は、FZD受容体の細胞外N末端CRD内の脂質結合溝に結合し（Janda et al. (2012) "Structural basis of Wnt recognition by Frizzled." Science 337, 59-64、Nile and Hannoush (2016) "Fatty acylation of Wnt proteins." Nature Chemical Biology 12, 60-69）、核β-カテニンの安定化及び下流Wntシグナル伝達の開始につながる。結腸直腸癌において、Wnt経路突然変異の大半は、β-カテニンのレベルで起こる（Polakis, P. (2012) Cold Spring Harb Perspect Biol 4）。しかしながら、Wnt経路の異常活性はまた、胆管細胞癌中で観察されているように、受容体のレベルで起こり得（Boulter et al. (2015) J. Clin. Invest. 125, 1269-1285 LID-1210.1172/JCI76452 [doi] LID-76452 [pii]）、経路内の上流突然変異によって駆動される。例えば、結腸直腸癌及び子宮内膜癌における頻繁に突然変異した遺伝子である（Giannakis et al. (2014) Nat Genet 46, 1264-1266）、腫瘍抑制因子E3ユビキチンリガーゼZNF3及びRNF43における突然変異を不活性化することは、細胞表面における安定化及びより高いレベルのfrizzled受容体につながる（Jiang et al. (2015) Molecular Cell 58, 522-533）。グローバルWntパルミトイル化及び分泌の小分子阻害剤であるC59での処置は、マウスにおけるRnf43^{-/-}（RINGフィンガータンパク質43の不足）及びZnf3^{-/-}（亜鉛/RINGフィンガータンパク質3の不足）腸新生物の成長を防止し、これらの腫瘍における上流Wntシグナル伝達に対する役割を強調する（Koo et al

. (2015) *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112, 7548–7550)。C59での処置時に、隣接した腸陰窩に対する重大な有害作用が観察されなかったことは特筆に値する。これらの発見は、Wnt/FZD相互作用の上流阻害剤が、胃などの高度に増殖する幹細胞コンパートメント内で耐えられ得ることを示唆しているが、今後の研究においてWnt経路阻害の一般的な毒性副作用を詳細に評価することが依然として重要である。要するに、上記の発見は、がんにおけるFZDの生物学的役割を強調し、FZD受容体の薬理的標的が、細胞表面の上流でWnt経路を阻害するために魅力的なアプローチであり得ることを示す。

【0209】

FZD受容体タンパク質ファミリーの分子理解は、ヒト(h)FZD4、5、及び7 CRDならびにマウス(m)FZD8 CRDのX線結晶構造に限定されている。mFZD8 CRDと複合したXenopus Wnt8の第1のX線共結晶構造が報告されたが、Wnt-FZD相互作用の特異性の構造基盤(Dijksterhuis et al. (2015) *J Biol Chem* 290, 6789–6798)は、依然として十分に理解されていない。Wnt-FZD相互作用の良好な構造理解にもかかわらず、脂質結合溝において結合し、FZD依存性シグナル伝達を中断させる高親和性小リガンドを開発することは困難である。特異的FZD受容体の選択的標的もまた、高度の配列類似性に起因して困難である。図1、Lee et al. (2015) *J Biol Chem* 290, 30596–30606、Gurney et al. (2012) *Proc Natl Acad Sci USA* 109, 11717–11722を参照されたい。図1は、マウス(m)FZD8 CRD(表面表現)と複合したXenopus (X)Wnt8(リボン表現、矢印で示された脂肪酸)の結晶構造を示す。XWnt8は、2つの別個の部位でmFZD8 CRDと相互作用する。部位1(「親指」)は、主にmFZD8 CRD上のWnt脂肪アシル基と疎水性溝との間の脂質-タンパク質界面であるが、部位2(「人差し指」)は、タンパク質-タンパク質相互作用界面で構成される。mFZD8 CRDは、XWnt8と複合した単量体として結晶化した。全てのヒトFZD CRDのClustal Omega(Sievers, F. et al. *Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega*. *Mol. Sys. Biol.* 7, 539 (2011))配列アラインメントを、それらの保存率についてスコアリングし、模擬構造としてmFZD8 CRDの表面上の色勾配として適用した(濃灰色:高保存、薄灰色:低保存)。グリコシル化基は、明確性のために隠されている。

【0210】

腸幹細胞機能におけるFZD7の役割を調査するために、実験を行い、FZD7 CRDと選択的に結合するリガンドを特定した。ナイーブ直鎖状ペプチドライブラリ(4~16アミノ酸長)及び環状ペプチドライブラリを、FZD7 CRD-Fcに対するファージディスプレイを介してスクリーニングした。次いで、FZD7 CRD-Fcと結合することが見出されたペプチドをFZD7 CRD-Fc、FZD8 CRD-Fc、及びハーセプチンに対するスポットファージELISAを介してスクリーニングして、FZD7 CRDと結合するが、FZD8 CRDまたはハーセプチンとは結合しない候補を特定した。候補FZD7 CRDと結合する直鎖状ペプチドのアミノ酸配列を以下の表3に示し、候補FZD7 CRDと結合する環状ペプチドのアミノ酸配列を表4に示す。

表 3

配列番号	ペプチド配列	ペプチドID	N ^A	シグナル：ノイズ比 ^B		
				FZD7 CRD	ハーセプチン	FZD8 CRD
1	YEHLHDLMDLIRPW	Fz7-07	20	23. 2	1. 2	1. 6
2	TYFDDICNLILPWANP		1	27. 5	1. 2	1. 4
3	PQDLLDWCHYMIVSSD		1	29. 1	1. 2	1. 3
4	ACSYVIDLWNQCLT		4	26. 8	1. 1	3. 1
5	PCSVICLPDWSSLLFI		1	22. 7	1. 0	1. 5
6	DTDLDHQWCLWFT		21	30. 2	1. 1	9. 3
7	FWMLLQEGFAFWFP		1	30. 5	1. 3	6. 4
8	FELLLDLGDLIRLW		1	26. 9	1. 8	2. 0
9	ACSYVIDLWNLCLR		1	27. 6	1. 3	1. 5
10	ASELHDWCRMMFPW		3	28. 9	1. 2	1. 3
11	ISLIEAMIALDRVF	Fz7-06	7	27. 0	1. 1	25. 8
12	PPNVHEGCWSMFPW		1	28. 1	1. 1	1. 3
13	LPSDDLEFWCHVMY	Fz7-21	3	24. 5	1. 0	1. 1
14	DTDLLQWCLWFT		1	31. 1	1. 2	6. 0
15	FWMQLQDGFAIWFP		27	27. 8	1. 7	2. 9
16	PCSVICLPDWSSLLFI		2	5. 0	1. 1	1. 1
17	GDFWPGSLLWEILV		3	4. 4	1. 2	1. 0
18	ILTFEYFWILGLIL		5	4. 5	1. 1	1. 1
19	LPLFFLSYVL		5	6. 3	1. 1	1. 1
20	FLPDQHSHLFLPWGEP		1	5. 3	1. 1	1. 0
21	SCQMWSNLRVLFLSYW		1	1. 0	0. 7	0. 7
22	VFVPFSELTSLC		1	7. 8	1. 1	1. 0
23	IWFKGRFVEFSSLV	Fz7-17	4	7. 7	1. 1	1. 0
24	NAFWRDQCLEWFIICL		4	5. 5	1. 2	1. 1
25	EHDLLLRAMNSFVLIF		1	7. 6	1. 4	1. 0
26	FCENPYIICW		1	8. 6	1. 1	0. 8
27	NPPPECFLSK		1	5. 2	1. 2	1. 1
28	VFFYHSLFFIKLILDP		1	4. 7	1. 3	1. 3
29	ERRVCYPWFVVSQP		1	2. 6	1. 3	1. 2
30	LSSGKKVSSYWFNFWF		1	3. 5	3. 8	1. 0
31	FWFDFWFG		1	4. 2	4. 1	0. 8

10

20

30

40

^A 「N」は、各ペプチドの発生を指す。

^B 「シグナル：ノイズ比」について、「シグナル」は、FZD7 CRD、ハーセプチン、またはFZD8 CRDに対して検出されたスポットファージELISAシグナルである。「ノイズ」は、BSAに対するELISAシグナルである。

表 4

配列 番号	ペプチド配列 ^A	ペプチド ID	N ^B	シグナル：ノイズ比 ^C		
				FZD7 CRD	ハーセプチン	FZD8 CRD
32	SSDFSG <u>CL</u> SWCDLIFG		1	28. 4	1. 22	1. 39
33	FDFC <u>SV</u> MPQFIYCPGD	Fz7-20	11	26. 0	1. 14	2. 10
34	HLSDVCCSDWCDLVFW		1	16. 1	0. 99	1. 09
35	TSDFSW <u>CL</u> SWCDLIFW		79	28. 4	1. 19	1. 27
36	FDFCTVMPHF <u>FI</u> YCPGD		1	27. 4	1. 13	2. 01
37	FDFC <u>SV</u> MPHF <u>FI</u> YCPGD		1	27. 5	1. 10	1. 12
38	HLSDVFCSDWCDLVFW		1	17. 5	1. 14	1. 28

10

^A 下線が引かれたシステイン残基は、ジスルフィド結合を形成し得る。

^B 「N」は、各ペプチドの発生を指す。

^C 「シグナル：ノイズ比」について、「シグナル」は、FZD7 CRD、ハーセプチン、またはFZD8 CRDに対して検出されたスポットファージELISAであり、「ノイズ」は、BSAに対するELISAシグナルである。

【0211】

5つのペプチド、FZ7-06、FZ7-07、FZ7-17、FZ7-20、及びFZ7-21が、化学合成及び更なる特徴付けのために選別された。

20

【0212】

ショットガンアラニン走査を、FZ7-21上で行い、FZD7 CRDに結合するために重要なペプチド中のアミノ酸残基を特定した。要するに、各々が少なくとも1つのランダムアラニン及び／またはバリン及び／またはアスパラギン酸及び／またはセリン置換を含有する60のFZ7-21由来のペプチド（表5を参照）を生成し、FZD7 CRD-Fc及びハーセプチンに対するスポットファージELISAを介して（すなわち、上記のように）スクリーニングした。表5に示すように、アラニン、アスパラギン酸、セリン、またはバリン置換FZ7-21由来のペプチドのほとんどは、FZD7 CRD結合活性を示した。

30

表5

配列 番号	ペプチド ID	ペプチド配列	FZD7 CRD-Fc		ハーセプチン		
13	Fz7-21	LPSDDLEFWCHVMY	S/W ^A	S/N ^B	S/W ^A	S/N ^B	N _c
39		VAADDLAAWCHVMY	3. 4	60. 7	0. 0	1. 4	1
40		AASDDLEFWCHVMY	3. 2	60. 5	0. 0	1. 4	5
41		AASDDLEFWCHVMY	3. 0	59. 6	0. 0	1. 3	1
42		APSDDVAFWCHVMY	3. 1	58. 6	0. 0	1. 6	1
43		APADDVEFWCHVMY	3. 1	58. 6	0. 0	1. 8	1
44		APSDDLEFWCHVMY	3. 1	58. 3	0. 0	1. 3	2
45		APADDLEAWCHVMY	3. 1	58. 1	0. 0	1. 2	1
46		APSDDLEFWCHAMY	3. 1	57. 2	0. 0	1. 3	1
47		VASDDLEAWCHVMY	3. 1	57. 0	0. 0	1. 4	1
48		AAADDLEFWCHVMY	3. 1	56. 1	0. 0	1. 2	2
49		AASDDLAAWCHVMY	3. 0	55. 7	0. 0	1. 8	1
50		AASDDLESWCHVMY	2. 9	55. 6	0. 0	1. 2	1
51		APADDLAFWCHVMY	3. 0	55. 1	0. 0	1. 3	2
52		LPADDLAVWCDVMY	3. 1	54. 9	0. 0	1. 5	1
53		LPSDDLESWCHVMY	3. 0	54. 5	0. 0	1. 2	1
54		AAADDLEVWCHVMY	3. 1	54. 4	0. 0	1. 4	1
55		VAADALEFWCHVMY	3. 0	54. 2	0. 0	1. 3	1
56		APSDDLAAWCHVY	2. 9	54. 0	0. 0	1. 2	1
57		AAADDLAAWCDVMY	3. 1	54. 0	0. 0	1. 4	1
58		VASDDLEFWCHVMY	3. 2	54. 0	0. 0	1. 3	2
59		AAADDLEAWCAVMY	3. 1	53. 6	0. 0	1. 2	1
60		LAADDLESWCHVMY	3. 0	53. 5	0. 0	1. 2	1
61		APADDLASWCHVMY	3. 2	53. 5	0. 0	1. 3	1
62		VASDDLASWCHAMY	3. 0	53. 5	0. 0	1. 3	1
63		VPADDLASWCHVMY	3. 1	53. 4	0. 0	1. 2	1
64		APADDLEFWCHVY	3. 1	53. 2	0. 0	1. 4	1
65		VPSDDLAFWCHVMY	3. 0	53. 2	0. 0	1. 3	2
66		VPADALAVWCDVMY	2. 9	53. 0	0. 0	1. 3	1
67		VPADDLAFWCHVMY	3. 1	52. 7	0. 0	1. 3	3
68		VPSDDLASWCHVMY	3. 1	52. 2	0. 0	1. 4	1
69		VPSADLESWCHVMY	2. 9	52. 2	0. 0	1. 6	1
70		AASDDLEAWCHVMY	3. 1	52. 1	0. 0	1. 4	1
71		APSDDLASWCHVMY	3. 3	52. 0	0. 0	1. 1	1

10

20

30

40

72		APADDLEFWCHVMY	3. 0	51. 6	0. 0	1. 2	2
73		APSDDLAAWCHVMY	3. 0	51. 3	0. 0	1. 3	1
74		APADDLAFWCHVVY	3. 2	50. 6	0. 0	1. 3	1
75		APSDDLEAWCDVMY	2. 7	50. 2	0. 0	1. 3	1
76		VPSDDLEAWCDVMY	2. 7	49. 8	0. 0	1. 3	1
77		AASDDLAFWCHVMY	3. 1	49. 7	0. 0	1. 1	5
78		VPADDLASWCDVMY	2. 9	49. 2	0. 1	1. 9	1
79		LPSADLESWCHVMY	2. 9	48. 6	0. 0	1. 4	1
80		AAADDLAFWCHVMY	3. 1	48. 2	0. 0	1. 4	3
81		LASDDLEFWCHVMY	3. 0	48. 1	0. 0	1. 2	2
82		LPAADLAAWCHVMY	3. 0	48. 0	0. 0	1. 2	1
83		VPSADLETWCHVMY	2. 8	47. 3	0. 0	1. 4	1
84		LPADDLAAWCHVMY	3. 1	46. 7	0. 0	1. 4	1
85		PPADDLAFWCDVMY	2. 9	44. 9	0. 0	1. 1	1
86		VASDDLASWCHVVY	2. 5	44. 8	0. 0	1. 2	1
87		AAADDVASWCHVMY	2. 3	44. 5	0. 0	1. 3	1
88		VAADDLAFWCDVMY	3. 0	40. 7	0. 0	1. 2	1
89		APADDLEFWCHAMY	1. 9	36. 3	0. 0	1. 4	1
90		APADDLAFWCDVMY	3. 0	33. 8	0. 0	0. 9	1
91		APSDDLAFWCDVMY	3. 1	27. 4	0. 0	0. 7	1
92		LPADDLAFWCDVMY	2. 8	23. 8	0. 0	0. 7	1
93		AAADDLAFWCDVMY	2. 7	8. 5	-0. 2	0. 4	1
94		LPADDLEFWCHVMY	0. 1	2. 8	0. 0	1. 2	1
95		VPSDDLEFWCAVMY	0. 1	2. 1	0. 0	1. 2	1
96		APADDLESWCHVMY	2. 9	53. 9	0. 1	2. 1	1
97		APSDDLAFWCHVVY	2. 5	45. 0	0. 1	2. 1	1
98		AAADDLAAWCHVVY	2. 7	50. 8	0. 1	2. 2	1

10

20

30

A 「S/W」値は、シグナルーノイズであり、「シグナル」は、384ウェルMaxisorpプレート上に固定化されたFZD8 CRD-Fcまたはハーセプチンに対して検出されたスポットファージELISAシグナルを指し、「ノイズ」は、同じプレート上のBSAに対するELISAシグナルを指す。

B 「S/N」値は、シグナル対ノイズ比である。

C 「N」は、各ペプチドの発生を指す。

【0213】

次に、「W/A」値を、ペプチドFz7-21中の各アミノ酸位置について決定した。「W/A」は、特定の酸位置に野生型(WT)残基を有するFz7-21由来ペプチドの数を、その位置に置換を有するFz7-21由来ペプチドの数で除算することによって計算した。(置換がある特定のアミノ酸位置に見出されない場合、A=1である。)データは、60ペプチド変異形から収集した。「W/A」値は、FZD7 CRDとの相互作用について、各野生型Fz7-21残基のペプチド結合依存性を表す。FZ7 CRDへのFz7-21の結合において重要な役割を果たす残基は、25以上のW/Aを有すると定義され、「クラス2」残基として分類された。FZ7 CRDへのFz7-21の結合に

40

50

において重要な役割を果たす残基は、6～19のW/A値（すなわち、 $5 \leq W/A < 25$ ）を有すると定義され、「クラス1」残基として分類された。不要な残基は、 $W/A < 5$ を有すると定義され、「クラス0」残基として分類された。以下の表6に示されるように、Fz7-21中のD5、L6、W9、C10、M13、及びY14は、FZ7 CRDへの結合に重要であると決定され、Fz7-21中のD4、H11、及びV12は、Fz7 CRDへの結合に重要であると決定され、Fz7-21中のL1、P2、S3、E7、及びF8は、不要であることが見出された。

表6

位置	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Fz7-21 配列	L	P	S	D	D	L	E	F	W	C	H	V	M	Y
W/A	0.3	1.7	0.9	14	29	57	0.8	2.0	60	60	23	14	54	60
残基 クラス	0	0	0	1	2	2	0	0	2	2	1	1	2	2

10

【0214】

D5N置換を含有するFz7-21ペプチドの誘導体、すなわちFz7-21Nを合成して、Fz7-21中のアミノ酸位置5における電荷アスパラギン酸残基の、FZD7 CRD結合に対する寄与を調査した。

20

【0215】

ペプチドの機能的活性は、イチレノ細胞ベースアッセイにおいて特徴付けられた。一組のアッセイでは、Wntシグナル伝達に対するFz7-06、Fz7-07、Fz7-17、Fz7-20、Fz7-21、及びFz7-21Nの効果を、HEK293-TB細胞中で試験した。要するに、HEK293-TB細胞（すなわち、TCF/LEF応答性ホタルルシフェラーゼ構築体及び構成的に発現されたウミシイタケルシフェラーゼ構築体で安定してトランスフェクトされた細胞）を、Fz7-06、Fz7-07、Fz7-17、Fz7-20、Fz7-21、及びFz7-21Nの3倍段階希釈で6時間、組み換えmWnt3a（50 ng/mL）により刺激した。DMSO対照を並行して行った。 β -カテニンシグナル伝達は、DMSO対照に対して正規化されたホタルルシフェラーゼのウミシイタケルシフェラーゼに対する比として測定した。結果を表7に示す。表7の値は、少なくとも3つの独立した繰り返しの平均、±標準偏差である。最も効力のあるペプチド、Fz7-21（配列番号13）は、約90～100 nMのIC₅₀でHEK293細胞中のWnt3a媒介型 β -カテニンシグナル伝達を障害した（表7を参照）。Fz7-21Nは、外因性Wnt3aで刺激されたHEK293細胞中のWnt3a媒介型 β -カテニンシグナル伝達を障害した（IC₅₀ = 100 nM）。

30

【0216】

補足的な実験の組では、マウスL細胞中の β -カテニタンパク質のWnt媒介型安定化に対するFz7-06、Fz7-07、Fz7-17、Fz7-20、Fz7-21、及びFz7-21Nの効果（Hannoush（2008）PLoS One 3, e3498に記載される）である。L細胞を、Wnt3a（2.5 nM）により、Fz7-06、Fz7-07、Fz7-17、Fz7-20、Fz7-21、またはFz7-21Nの3倍段階希釈で5時間処理した。DMSO対照を並行して行った。処理に続いて、L細胞を固定し、透過処理し、蛍光標識された抗 β -カテニン抗体で探索して、細胞内ウェスタンアッセイを介して（すなわち、Hannoush（2008）PLoS One 3, e3498に記載されるように）観察して、 β -カテニタンパク質レベルを評価した。結果を表7に示す。表7の値は、少なくとも3つの独立した繰り返しの平均、±標準偏差である。Fz7-21は、マウスL細胞における β -カテニンのWnt3a媒介型安定化を遮断し、このペプチドが、Wntシグナル伝達を阻害することを示す。Fz7-21

40

50

Nは、マウスL細胞におけるβ-カテニンのWnt3a媒介型安定化を遮断し、このペプチドが、Wntシグナル伝達を阻害することを示す。

表7†

ペプチド	HEK293S-TB ^{A, D}		L細胞 ^{B, E}		ペプチド 配列 (配列番号)
	IC50 (μM)	残存活性% ^C	IC50 (μM)	残存活性% ^C	
Fz7-06	10.45±0.56	4.70±2.07	n. i.	174.95±16.83	ISLIEAMIALDRVF (配列番号11)
Fz7-07	>100	46.04±6.94	>100	67.20±10.22	YEHLDLMDLIRPW (配列番号1)
Fz7-17	34.77±0.34	4.59±1.30	~35	38.20±0.06	IWFKGRFVEFSSLV (配列番号23)
Fz7-20	20.81±1.61	9.78±0.53	15.22±10.83	23.68±4.40	FDFCSVMPQFIYCPGD (配列番号33)
Fz7-21	0.10±0.05	5.15±2.88	0.05±0.03 ^F	50.98 ^G ±3.76	LPSDDLEFWCHVMY (配列番号13)
Fz7-21N	0.41±0.16	5.51±0.13	0.18±0.12 ^F	59.77 ^G ±6.12	LPSDNLEFWCHVMY (配列番号108)

† 値は、平均±標準偏差を表す。

>100 μMは、ペプチドが、試験したペプチドの最高濃度(100 μM)における部分阻害を示したことを示す。

^A TCFのβ-カテニン領域を含有するTOPbriteレポーターからの読み出しによって測定した

^B 免疫蛍光を介して検出されたβ-カテニンの量によって測定した

^C 100 μMのペプチドで測定した

^D 値は、少なくとも2つの繰り返しの平均、±標準偏差である

^E 値は、少なくとも3つの繰り返しの平均、±標準偏差である

^F β-カテニン活性は、11.11 μMのペプチドで約50%阻害のプラトーに到達する

^G 11.11 μMのペプチドで測定した

【0217】

理論に束縛されるものではないが、それぞれTOPbriteルシフェラーゼレポーター及びβ-カテニン撮像アッセイにより測定した、HEK293とマウスL細胞との間の最大Wnt経路阻害における観察された差は、2つの細胞株間の様々なFZDレポーターの細胞表面発現レベルの差に起因する可能性があり得る(Zhou et al. (2014) Dev. Cell 31, 248-256 LID-210.1016/j.devcel.2014.1008.1018 [doi] LID-S1534-5807 (1014) 00548-00546 [pii])。

【0218】

Fz7-21、すなわちC10S置換を含有するFz7-21の誘導体を合成して、Fz7-21中のアミノ酸位置10におけるシステイン残基の、FZD7-CRD結合に対する寄与を調査した。Fz7-21のアミノ酸配列は、LPSDDLEFWCHVMY(配列番号113)である。第1のアッセイでは、HEK293-TB細胞を、組み換えmWnt3a(50 ng/mL)により、Fz7-21、Fz7-21S、またはDMSO対照の3倍段階希釈で6時間刺激した。図2Aに示すように、Fz7-21は、93.7 nM±27.9 nMのIC₅₀でWnt3a刺激型β-カテニンシグナル伝達を阻害した。Fz7-21Sが、Wnt3aシグナル伝達を阻害することは見出されなかった。

【0219】

後のアッセイでは、HEK293-TB細胞を、5 ngのpCDNA3.2-Wnt3aまたは25 ngのpCDNA3.2-Wnt3aでトランスフェクトした。24時間後、トランスフェクトした細胞を、Fz7-21、Fz7-21S、またはDMSOの3倍段階希釈で6時間処理した。図2Bに示すように、Fz7-21は、5 ngのpCDNA3.2-Wnt3aでトランスフェクトした細胞中329.8 nM $\pm$ 157 nMのIC₅₀、及び25 ngのpCDNA3.2-Wnt3aでトランスフェクトした細胞中419.3 nM $\pm$ 168.6 nMのIC₅₀でWnt3a刺激型 β -カテニンシグナル伝達を阻害した。Fz7-21Sが、Wnt3aシグナル伝達を阻害することは見出されなかった。

10

【0220】

更なるアッセイでは、HEK293-TB細胞を、5 ngのpCDNA3.2-Wnt1または25 ngのpCDNA3.2-Wnt1でトランスフェクトした。24時間後、トランスフェクトした細胞を、Fz7-21、Fz7-21S、またはDMSOの3倍段階希釈で6時間処理した。図2Cに示すように、Fz7-21は、5 ngのpCDNA3.2-Wnt3aでトランスフェクトした細胞中1.0864 μ M $\pm$ 0.5077 μ MのIC₅₀、及び25 ngのpCDNA3.2-Wnt3aでトランスフェクトした細胞中2.661 μ M $\pm$ 1.124 μ MのIC₅₀でWnt1刺激型 β -カテニンシグナル伝達を阻害した。Fz7-21Sが、Wnt1シグナル伝達を阻害することは見出されなかった。

20

【0221】

次に、HEK293-TB細胞を、5 ngのpCDNA3.2-Wnt1または25 ngのpCDNA3.2-Wnt3aでトランスフェクトした。24時間後、トランスフェクトした細胞を、Fz7-21C、すなわち10位にD-システイン立体異性体を含むFz7-21由来ペプチドの3倍段階希釈で6時間処理した。図2Dに示されるように、Fz7-21の10位におけるD-システインによるL-システインの置換は、Wnt1阻害の効力を16倍低減し、Wnt3a阻害の効力を31倍低減した。

【0222】

まとめると、図2A～2Dに示す結果は、FZD7-CRD結合に対するCys10残基の機能的寄与を強調する。

30

【0223】

エピスタシス試験を、 β -カテニンを安定化し、受容体活性化とは独立して下流Wntシグナル伝達を活性化するGSK-3 α/β の阻害剤である、6-BIO（6-ブロモインジルビン-3'-オキシム）で処理したHEK293-TB細胞において実行した（Meijer et al. (2003) Chemistry & Biology 10, 1255-1266）。HEK293-TB細胞を、10 μ Mの6-BIOにより、Fz7-21、Fz7-21S、またはDMSOの3倍段階希釈の存在下で6時間刺激した。Fz7-21もFz7-21Sも、6-BIOで処理した細胞においてWntシグナル伝達を阻害した（図2Eを参照）。かかる結果は、Fz7-21が、GSK3 α 及び β -カテニンの上流で、恐らくはFZD受容体のレベルで作用する。

40

【0224】

図2A～2Eにおいて、 β -カテニンシグナル伝達を、DMSO対照に対して正規化されたホタルとウミシイタケとの比として測定した。計算値を、バックグラウンド除去し（Wnt3aにより刺激されていない細胞）、DMSOで処理した試料に対して正規化し、技術的三重複による少なくとも3つの独立した実験の平均 $\pm$ 標準誤差を表す。Graphpad Prism (v6.05)を使用し、log（阻害剤）対正規化した応答を使用して阻害曲線を生成した〔可変傾斜等式（ $Y = 100 / (1 + 10^{((\log IC_{50} - X) * Hill Slope)})$ ）〕。IC₅₀は、平均 $\pm$ 95%信頼区間を表す。全ての試料は、1%の最終DMSO濃度を維持した。統計的有意性は、Holm-Sidak法を使用して $\alpha = 5\%$ で決定し、 $P^* < 1.17 \times 10^{-6}$ である。有意性は、全ての試料

50

が同じ分散を有する集団からのものであると想定する。

【0225】

次に、Fz7-21ペプチドの5-カルボキシフルオレセイン標識バージョンである5FAM-Fz7-21を生成し、hFZD1 CRD-Fc、mFZD2 CRD-Fc、hFZD4 CRD-Fc、hFZD5 CRD-Fc、hFZD7 CRD-Fc、mFZD7 CRD-Fc、hFZD8 CRD-Fc、mFZD9 CRD-Fc、及びhFZD10 CRD-Fcへの結合について試験した。5FAM-Fz7-21Sを使用する対照実験を、並行して行った。5FAM-Fz7-21または5FAM-Fz7-21Sを、前述のFZD CRD-Fcの各々で、PBS中4℃で一晩インキュベートし、SECを介して分離した。5FAM-Fz7-21は、低nM範囲（39～116 nM）の親和性を有する、hFZD1 CRD-Fc、hFZD2 CRD-Fc、hFZD7 CRD-Fc、及びmFZD7 CRD-Fcへの選択的かつ選好的結合を示した。

10

【0226】

表8及び図3A～3Iを参照されたい。図3A～3Iにおいて、5FAM-Fz7-21または5FAM-Fz7-21S（PBS中50 nM）を、漸増濃度のFZD CRD-Fc（2倍段階希釈）でインキュベートし、Monolith NT. 115またはNT. 115 Pico器具（NanoTemper Technologies）のいずれかを使用して測定した。EC₅₀値は、2回行われたhFZD1 CRD-Fc+5FAM-Fz7-21Sを除いて、少なくとも3つの独立した実験の95%信頼区間を表す。EC₅₀値は、Prism Graphpadを用い、Log（アゴニスト）対応答を使用して計算した〔可変傾斜（4パラメータ）関数：Y=底部+（上部-底部）／（1+10^{-(Log EC-X)*Hill Slope}）〕。プロットした値は、平均±標準誤差を表す。

20

表8

FZD CRD-Fc	5FAM-Fz7-21 EC ₅₀ (nM)	5FAM-Fz7-21S E C ₅₀
hFzd1	39±26	>10 μM
mFzd2	60±18	NC ^A
hFzd4	NC ^A	NC ^A
hFzd5	NC ^A	NC ^A
hFzd7	116±20	NC ^A
mFzd7	67±39	NC ^A
hFzd8	NC ^A	NC ^A
mFzd9	NC ^A	NC ^A
hFzd10	NC ^A	NC ^A

30

40

^A NC = 変化なし

【0227】

Fz7-21がFZD7サブクラスのCRDに特異的に結合する仮説と一致して、FZD5、FZD8、FZD9、及びFZD10 CRDへの5FAM-Fz7-21の結合

50

は、ほとんどまたは全く観察されなかった。対照ペプチド 5 F A M - F z 7 - 2 1 S は、F Z D C R D ファミリーのいかなるメンバーにも検出可能な結合を示さなかった。図 3 A ~ 3 I 及び表 8 を参照されたい。

【0228】

F Z D 7 受容体サブクラスの選択的標的はまた、クロマトグラフ的に観察された。5 F A M - F z 7 - 2 1 と、F Z D 1 C R D - F c、F Z D 2 C R D - F c、及び F Z D 7 C R D - F c との複合体は、蛍光サイズ排除クロマトグラフィー (F S E C) によって分離され得る。対照的に、複合体は、5 F A M - F z 7 - 2 1 S では観察されなかった。図 4 A 及び 4 B を参照されたい。これらは、F S E C による分析前に、様々な F Z D C R D - F c タンパク質 (250 nM) で一晩 4 °C でインキュベートされた、それぞれ 1 μ M の 5 F A M - F z 7 - 2 1 及び 1 μ M の 5 F A M - F z 7 - 2 1 S の代表的な蛍光ト

レースを提供する。垂直点線は、分子量標準の溶出量を表す。ペプチドに対する F Z D 7 C R D のモル化学量論が示されている。図 4 A 及び 4 B の蛍光強度の定量 (曲線下面積、A U C) を図 4 C に提供する。図 4 A ~ 4 C の結果は、5 F A M - F z 7 - 2 1 が、F Z D 7 クラス C R D に選好的に結合するが、5 F A M - F z 7 - 2 1 S は、いかなる F Z D C R D - F c も結合しないことを示す。これらの実験では、F Z D C R D - F c 融合構築体は、2 つの F c 断片によって一緒に保持される 2 つの F Z D C R D 二量体を含む四量体の形成と一致した保持プロファイルを示した。図 2 4 A では、U V 吸収により分析された分子量 (M W) 標準を、空隙量 (V o) に対する溶出量 (V e) の関数としてプロットした。値は、3 回の独立した実験の平均 $\pm$ 標準誤差を表す。図 2 4 B は、5 F A M - F z 7 - 2 1 (灰色の丸) と予測された F Z D C R D - F c 四量体 M W (黒色の正方形) とに結合した F Z D C R D - F c タンパク質の観察された分子量を示す。測定値は、3 つの独立した実験の平均 $\pm$ 標準偏差 (S D) を表す。図 2 4 C は、使用された異なる F Z D C R D - F c タンパク質 (約 2 μ g) の天然 P A G E (4 ~ 16 %) を示す。N a t i v M a r k を、分子量標準物として使用した。タンパク質試料を、天然の P A G E 試料緩衝液で希釈し、濃青色カソード走行緩衝液を使用して分離し、溶解して、製造者の推奨に従い固定した。組み換え F Z D 3 及び 6 C R D への結合は、これらのタンパク質の発現による困難に起因して評価することができなかった。しかしながら、フローサイトメトリー分析によって、5 F A M - F z 7 - 2 1 は、F Z D 7 への主な結合を示し、H E K 2 9 3 細胞中で安定して発現された F Z D 4、5、または 6 受容体への結合は最小であり、上述のクロマトグラフィー実験と一致していた。

【0229】

更なる F S E C 実験を行い、5 F A M - F z 7 - 2 1 または 5 F A M - F z 7 - 2 1 S が、ヒト s F R P 1、s F R P 2、s F R P 3、s F R P 4、または s F R P 5 (すなわち、F Z D タンパク質に構造的に関連した可溶性タンパク質のファミリーである、分泌 F r i z z l e d 関連タンパク質) と結合するかどうかを決定した。5 F A M - F z 7 - 2 1 または 5 F A M - F z 7 - 2 1 S は、試験した s F R P のうちのいずれとも結合することが見出されなかった。例えば、図 5 A ~ 5 C を参照されたい。垂直点線は、分子量標準の溶出量を表す。

【0230】

図 4 C 及び 5 C について、値は、3 回の独立した実験の平均 $\pm$ 標準誤差を表す。図 4 C 及び 5 C の曲線下面積 (A U C) は、U N I C O R N (v 5. 31、G e n e r a l E l e c t r i c B i o - S c i e n c e s) を使用して統合され、3 つの独立した実験からの平均 $\pm$ 標準誤差を表す。試料は、S E C 3 0 0 0 カラム (P h e n o m e n e x、T o r r e n c e, C A) を使用し、リン酸緩衝生理食塩水 (P B S) 中 0. 5 mL / 分で分離し、F P - 2 0 2 0 P l u s 蛍光検出器 (J a s c o A n a l y t i c a l I n s t r u m e n t s, E a s t o n, M D) を用い、正常モード (励起 / 放出 550 / 494 nm) を使用して、利得 = 100、S T D = 32 で蛍光をモニタリングした。全ての溶液は、1 % の最終 D M S O を維持した。ライントレースを、n + 20 単位だけ上方調整し、トレース間の区別を可能にした。分子量は、試料走行前に標準 (B i o R a d カ

タログ番号151-1901) 走行によって決定した。

【0231】

更なる実験を行い、hFZD7 CRDの可溶性単量体形態へのペプチド結合を調べた。Ni-NTAアガロース樹脂で補足されたバキュロウイルスから生成され、濃縮され、かつGE Healthcare HiLoad 16/60 Superdex 75 PGを、150mMのNaCl、50mMのTris-HCl、pH7.5と共に0.5mL/分で使用して分離されたEndoH及びKifunensineで処理した組み換えhFZD7 CRD-Hisを使用して、サイズ排除クロマトグラフィー(SEC)を行った。図6Aに示されるように、hFZD7 CRDは、約16kDaにおける単量体の2つの主要ピークとして、及びより高い分子量の多量体として溶出する。「Vo」=空隙量 図6Bは、図6Aからのプールされた単量体のSDS-PAGEを示す。試料を、1mM DTTで補充された試料緩衝液で処理し、SDS-PAGEによる分析前に10分間、98℃まで加熱した。M: マーカー(10μL、青色Plus2染色済みタンパク質スタンダード)。

【0232】

Fz7-21の作用機序を更に理解するために、hFZD7 CRD-His(15.8μM)を、サイズ排除クロマトグラフィー(SEC)を介した分離及び多角度光散乱(MALS)及びλ₂₈₀での吸収を介した検出前に、(a)1:1、1:5、もしくは1:10の比でFz7-21とともに、(b)1:10の比でFz7-21Sとともに、または(c)DMSOとともに、2時間にわたってインキュベートした。Superdex S200 3.2/300カラム(General Electric Healthcare Life Science, Pittsburgh, PA、28990946)によって、1% DMSO最終濃度の150mMのNaCl、50mMのTris-HCl pH7.5緩衝液中0.15mL/分で試料を分離した。カラムを、Dawn Helios-II多角度静的光散乱(MALS)検出器及びOptilab T-rEX示唆屈折指数(dRI)検出器(Wyatt Technologies, Santa Barbara, California)に接続された1260 infinity HPLC(Agilent Technology, Santa Clara, CA)に接続した。SEC-MALS分析の結果を図6Cに示す。図6Dは、試験した追加のペプチド濃度を有する図6Cのズームイン図(1.5mL~2.0mL範囲)を示す。DMSO対照に対するMALSシグナルの定量及び分子量の変化(ΔMW)を表9に示す。Fz7-21によるインキュベーションは、Ve=1.6mL付近で多量体(複数可)の形成を促進する。図6Dを参照されたい。

表 9

タンパク質	処理	MW(kDa)	不確実性(%)	ΔMW(kDa)
BSA	DMSO	70.1	0.3	該当せず
hFZD7 CRD	DMSO	20.9	1.4	0
hFZD7 CRD	Fz7-21 (1:1)	21.9	1.6	1
hFZD7 CRD	Fz7-21 (1:5)	27.3	1	6.4
hFZD7 CRD	Fz7-21 (1:10)	32	1.4	11.1
hFZD7 CRD	Fz7-21S (1:10)	23.5	1.3	2.6

【0233】

かかる結果は、ペプチド Fz7-21 が、単量体 hFZD7 CRD-His に結合することを示す。表 9 を参照されたい。予想外に、Fz7-21 は、濃度依存的に、hFZD7 CRD-His のホモ二量体化またはオリゴマー化を誘導した。表 9 を参照されたい。集合的に、かかる発見は、ペプチド Fz7-21 は、FZD7 受容体サブクラスに対する結合選択性を示すことを示す。かかる結果はまた、Fz7-21 が、単量体 FZD7 CRD の二量体化を誘導すること、及び Fz7-21 が、予備形成した四量体 FZD7 CRD-Fc に結合することを示す。(図 6A~6D を参照されたい。)

【0234】

上述の結果は、Fz7-21 が、進化的に保存されたタンパク質の FZD7 サブクラス、つまり FZD1、FZD2、及び FZD7 に結合することを示す。図 7 を参照されたい。かかる結合選択性は、FZD タンパク質間の高度の配列類似性の点から予想されない。

【0235】

図 7 において、タンパク質 CRD を手動でトリミングし、Clustal Omega で整列させた。図 7 におけるクラドグラムは、PHYLP Neighbor Joining を使用し、Jones-Taylor-Thorton 距離マトリクス及び 100 ブートストラップ反復及び 2.0 の移行/転換比を用いて生成した。図 7 におけるクラドグラムの右側は、各タンパク質に対する 5FAM-Fz7-21 または 5FAM-Fz7-21S の結合選好の要約である。「*」は、マウスタンパク質を試験したことを示す。「**」は、マウスタンパク質及びヒトタンパク質の両方を試験したことを示す。「sFRP」は、「分泌 frizzled 関連タンパク質」を指す。以下の受託番号を、ソース配列として使用した：hFZD1 (Q9UP38)、hFZD2 (Q14332)、hFZD3 (Q9NPG1)、hFZD4 (Q9ULV1)、hFZD5 (Q13467)、hFZD6 (O60353)、hFZD7 (O75084)、hFZD8 (Q9H461)、hFZD9 (O00144)、hFZD10 (Q9ULW2)。

【0236】

実施例 3：FZD7 CRD と Fz7-21 との間の相互作用の構造的特徴付け

そのアポ形態のまたは C24 脂肪酸と複合した hFZD7 CRD の X 線結晶構造は、最近報告された (Nile et al. (2017) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 114, 4147-4152 LID -4110. 1073/pnas. 1618293114 [doi])。両方の構造において、hFZD7 CRD は、 α らせん二量体界面及びその二量体界面を架橋する U 形脂質結合空洞を有する二量体を含んでいた (Nile et al. (2017) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 114, 4147-4152 LID -4110. 1073/pnas. 1618293114 [doi])。ペプチド-FZD CRD 選択性の機序に対する洞察を得るために、更なる実験を行い、分子レベルでペプチド-タンパク質相互作用を特徴付けた。共結晶及び浸漬技法を含む Fz7-21 と複合した hFZD7 CRD の共結晶構造を得ることを目的とした広範な努力は、不成功であった。Fz7-21 の N 末端が、hFZD7 CRD の C 末端に融合され、両側にリンカーがある構築体を使用した。FZD7 CRD (アポ形態) 及びペプチド Fz7-21 に結合した hFZD7 CRD の X 線結晶構造を、それぞれ 2.00 Å 及び 2.88 Å の分離度で決定した (図 8A~8F 及び以下の表 10)。アポ FZD7 CRD の構造は、固有のアーキテクチャを有する二量体を明らかにした。図 8A~8F に示すように、FZD7 CRD の脂質結合空洞の構造は、驚くことに、他の FZD CRD ファミリーメンバーの脂質結合空洞の報告された構造とは異なる。2つの脂質結合溝が、FZD7 CRD 二量体中に存在する。FZD7 CRD 単量体のテールは、二量体界面において互いに面している。図 8A~8B を参照されたい。これは、二量体界面を架橋する連続した屈曲 (U 形) 脂質結合空洞を創出する。図 8B を参照されたい。疎水性空洞に近位の残基は、図 8B において球棒形態で表示される。図 8C は、Fz7-21 に結合した hFZD7 CRD の結晶構造を示す。図 8D は、Fz7-21 (リボン表現) に結合した hFZD7 CRD (リボン表現) の構造の上にマップされた疎水性空洞の表面表現を示す。疎水性空洞を形成する残基は、球棒表現で

10

20

30

40

50

示される。図 8 E は、F z 7-2 1（リボン表現、ジスルフィドが示される）に結合した h F Z D 7 C R D の結晶構造の上面図表面表現を示す。図 8 F は、F z 7-2 1（リボン表現、ジスルフィドが示される）に結合した h F Z D 7 C R D の結晶構造の側面表面表現を示す。F z 7-2 1（4 Å 距離内で定義される）の結合エピソードは丸の中である。脂質結合空洞は、矢印によって示される。全ての構造について、グリカン部分は、明確性のために隠されている。

表 1 0 . アポ h F Z D 7 C R D 及び F z 7-2 1 が結合した h F Z D 7 C R D についての X 線結晶学データ処理及び構造精密化統計

	hFZD7 CRD	hFZD7 CDR-Fz721
PDBコード	TBD	TBD
X線源	2015_01_21_SSRL_122 (CRY1 8650)	2015_11_14_APS_17ID (CRY2 0775)
空間群	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁
単位細胞	a=39.1 Å, b=62.8 Å, c=103.2 Å, $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$	a=62.6 Å, b=164.7 Å, c=97.8 Å, $\alpha = 90^\circ$, $\beta = 108.3^\circ$, $\gamma = 90^\circ$
分離度	2.00 Å	2.88 Å
反射の総数	17922 (103) ¹	42391 (426) ¹
完全性 (%)	99.5 (97.1)	99.7 (99.6)
冗長性	6.4 (6.2)	3.0 (2.9)
I / σ	10.3 (2.6)	7.4 (1.2)
R _{sym} ²	0.084 (0.430)	0.080 (0.600)
分離度範囲	50-2.00 Å	50-2.88 Å
R _{cryst} ³ / R _{free} ⁴	0.199 / 0.252	0.196 / 0.243
非水素原子	1926	8368
水分子	98	1
平均B、全体	40.09	89.12
平均二乗偏差結合長	0.006 Å	0.007 Å
平均二乗偏差結合角	0.994°	1.159°
ラマチャンドラン (C/A/G/D) ⁵	0.944 / 0.056 / 0 / 0	0.883 / 0.111 / 0.003 / 0.002

10

20

30

¹ 括弧内の値は、最高分離度シェルのものである。

² $R_{sym} = \sum |I_{hi} - I_h| / \sum I_{hi}$ 、式中、 I_{hi} は、反射 h の i t h 対称関連観察のスケーリングした強度であり、 I_h は、平均値である。

³ $R_{cryst} = \sum h |F_o h - F_c h| / \sum h F_o h$ 、式中、 $F_o h$ 及び $F_c h$ は、反射 h についての観察及び計算された構造因子振幅である。

40

⁴ R_{free} の値は、精密化に含まれない 5 % のランダムに選択された反射について計算される。

⁵ C - コア、A - 追加として許容される、G - 一般に許容される、D - 許容されない。
【0 2 3 7】

この配置は、h F Z D 4（図 9 A を参照）及び m F Z D 8（図 9 B を参照）のものなどの他の F Z D C R D 上の脂質結合溝の位置付けに対して著しい対照をなし、これは二量体界面から離れて反対側に位置し、それにより互いから分離される（例えば、J a n d a e t a l .（2012）S c i e n c e 337, 59-64、D a n n e t a l .（2001）N a t u r e 412, 86-90、及び S h e n e t a l .（2

50

015) Cell Res. 25, 1078-1081を参照)。hFZD4 (図9Aを参照) 及びmFZD8 (図9Bを参照) の脂質結合空洞は、諧調にわたってアミノ酸疎水性に従い影が付けられている (濃灰色＝疎水性、薄灰色＝疎水性)。さらに、hFZD4

CRD及びmFZD8 CRDの脂質結合空洞はまた、それらが溶媒曝露され、「伸長された」立体構造を表示することにおいて、hFZD7 CRDのものとは異なる。図9Cは、アポhFZD7 CRDの、mFZD8 CRD及びhFZD4 CRDとの重畳を提供し、異なる二量体界面を強調する。共結晶及び浸漬技法を含むFz7-21と複合したhFZD7 CRDの共結晶構造を得ることを目的とした広範な努力は、不成功であった。Fz7-21のN末端がhFZD7 CRDのC末端に融合され、リンカーが隣接する構築体が設計され、hFZD7 CRD-GSと称される (図10A及び10B、ならびに表10)。融合構築体は、昆虫細胞中で発現され、サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) によってほぼ均質に精製された。図10Bは、42.7 kDaの決定分子量 (MW) を有する精製されたhFZD7 CRD-GSのSECプロファイルを示し、二量体に対応する。図27Aは、hFZD7 CRD-GSのMWを決定するために使用される関連MW標準物を示す。図27Bは、還元条件下の図10Aにおける融合タンパク質のSDS-PAGEを示し、単量体に対応する。図27Cは、図10Aにおける融合タンパク質から得られた結晶の明視野像を示す。

【0238】

融合構築体の結晶構造は、脂質結合溝に近位の二量体として結合されたペプチドFz7-21が、hFZD7 CRDの二量体界面における脂質結合空洞を覆う残基と接触させることを明らかにした (図8C～8Fならびに表11及び12)。ペプチド二量体は、互いに対して約45°角度で配向された2つの逆平行αらせんを含んでおり、Cys10及び多くの骨格における1つのジスルフィド結合、ならびに側鎖相互作用によって一緒に保持され、ジスルフィド結合を取り囲む溶媒保護されたコアを形成する (図8C～8F及び図11A～11C)。非対称単位は、各々がFz7-21二量体ペプチドによって架橋された4つの構造的に同様のCRD二量体対を含んでいた。リンカー領域は、電子密度の欠如に起因して、分離することができなかった。

【0239】

ペプチド結合したhFZD7 CRDのアーキテクチャは、固有の立体構造を示した。脂質結合空洞の幾何形状は、屈曲形態 (すなわち、アポ構造) から改変され、伸長形態 (すなわち、ペプチド結合した形態) に対して二量体界面において約16°角度を示し、二量体界面において90°を示す。したがって、hFZD7 CRDの脂質結合空洞に対するFz7-21の結合は、二量体界面を約75°移動させる (図8A～8D、図12A及び12B、ならびに図25A～25F)。図25Aは、アポhFZD7 CRD結晶構造のリボン表現を示し (レインボーカラー、N末端、：青色；C末端：赤色)、全長FZD7の概略は、FZD7内のCRD配置を示し、図25Bは、Fz7-21に結合したhFZD7 CRD (レインボーカラー) の構造のリボン表現を示す。アポ構造及び結合構造の両方において、二量体界面における選別対合された残基を図25A及び25Bに示す。図25Cは、アポhFZD7 CRDにおける疎水性空洞のズームイン側面図を提供し、図25Dは、図25Cからの上面図を提供する。図25Eは、Fz7-21に結合したhFZD7 CRDのズームイン側面図を提供し、疎水性空洞が強調されており、タンパク質骨格は180°の回転で、明確性のために隠されており、図25Fは、図25Eの上面図を示す。図25C～25Eにおける疎水性空洞は濃灰色：疎水性、白色：中性、青色：薄灰色で描かれる。総じて、FZD7 CRDのαらせん二量体界面を構成する残基の数は、アポ構造の単量体当たり13 (P55、E77、G80、L81、H84、Q85、Y87、P88、K91、V92、L134、F138 (あるいは明細書全体でF130として特定される)、及びF140からペプチド結合構造の単量体当たり5 (P88、K91、V92、K137、及びF138 (あるいは明細書全体でF130として特定される)) まで減少した。 (図14を参照)。

【0240】

この結合構成では、ペプチド α らせん二量体は、伸長した脂質結合溝の上部に「蓋」を形成し、各らせんからの結合残基は、両方のhFZD7 CRD単量体上の残基と接触する（図8C～8Fならびに以下の表11及び12）。図13に示されるように、Fz7-21（鎖B）上のLeu6は、Phe138（あるいは明細書全体でPhe130として特定される）及びhFZD7 CRDのPhe140（鎖A）との重要な疎水性接触を形成するが、Fz7-21（鎖B）上のAsp5の骨格カルボニルは、hFZD7 CRDのHis84（鎖B）の側鎖との水素結合を形成する。図13において、選別Fz7-21-hFZD7 CRD相互作用は、Fz7-21に結合したhFZD7 CRDの結晶構造（リボン及び棒表現）内で強調されている。点線は、水素結合相互作用を表す。更に、Fz7-21上のTrp9のインドール窒素は、hFZD7 CRD上のGln85の骨格カルボニルとの水素結合を形成する。図13を参照されたい。要するに、脂質結合溝の表面を覆う主に α らせん二量体界面におけるhFZD7 CRDとの相互作用に關与する、Fz7-21上に16個の残基（単量体当たり8個の残基）が存在する（表12を参照）。

表11：Fz7-21の4 Å以内のFZD7 CRD二量体残基

Fz7-21の4 Å以内のhFZD7 CRD残基	
(二量体鎖A)	(二量体鎖B)
Leu81	Leu81
His84	His84
Gln85	Gln85
Tyr87	Tyr87
Pro88	Pro88
Phe138*	Phe138*
Phe140	Phe140

* Phe138は、代替として、本明細書全体でPhe130として特定される。

表12：hFZD7 CRD二量体の4 Å以内のFz7-21残基

hFZD7 CRD4 Å以内のFz7-21残基	
Fz7-21（鎖A）	Fz7-21（鎖B）
Ser3	Ser3
Asp5	Asp5
Leu6	Leu6
Phe8	Phe8
Trp9	Trp9
Val12	Val12
Met13	Met13
Tyr14	Tyr14

【0241】

これらの相互作用は、FZD CRDファミリー内のペプチド結合エピトープの配列保存に部分的に基づいて、FZD7受容体サブクラスに対するペプチド選択性についての根拠を提供する。hFZD7、hFZD1、hFZD2、mFZD8、hFZD5、hFZD4、hFZD9、hFZD10、hFZD3、及びhFZD6のCDRのアミノ酸配列のアラインメントを提供する、図14を参照されたい。図14において、Fz7-21結

合エピトープ、及びそのアポ形態のまたは F z 7-2 1（ホロー F Z D 7 界面、鎖 A 対鎖 B）と複合した h F Z D 7 C R D（鎖 A 対鎖 B）の α ラせん二量体界面中の残基は、配列アラインメントの上の「+」によって示される。保存システインは、灰色で強調され、保存エピトープ残基は、下線が引かれている。追加として、h F Z D 7 C R D 内の二量体界面及び脂質結合溝幾何形状は、ペプチド結合フットプリントに寄与し、したがってペプチド選択性に影響を及ぼし得る。ペプチドラせん二量体を安定化するのを助ける骨格及び側鎖相互作用を、表 1 3 に示す。

表 1 3：F z 7-2 1 分子間相互作用の要約

残基1	残基2	備考
Cys10	Cys10	ジスルフィド
Tyr14	Glu7	二量体幾何形状を安定化するファンデルワールス相互作用
Tyr14	Glu7	ペプチド骨格とのファンデルワールス相互作用
Tyr14	Leu6	疎水性相互作用
Tyr14	Cys10	疎水性、Cys10-Cys10ジスルフィドを取り囲む溶媒排除領域を促進する
Trp9	Trp9	疎水性相互作用
Trp9	Cys10	疎水性、Cys10-Cys10ジスルフィドを取り囲む溶媒排除領域を促進する
Trp9	Leu6	疎水性相互作用は、ペプチド幾何形状を安定化する
Tyr14	Cys10	疎水性、Cys10-Cys10ジスルフィドを取り囲む溶媒排除領域を促進する
Phe8 (側鎖)	Leu12 (側鎖)	疎水性相互作用
Trp9	M13	スタッキング／疎水性相互作用
Pro2. A (カルボ ニル)	Asp4. A (アミ ノ)	主鎖H結合は α らせんを形成する
Asp4. A (カルボ ニル)	Phe8. A (アミ ノ)	主鎖H結合は α らせんを形成する
Asp5. A (カルボ ニル)	Trp9. A (アミ ノ)	主鎖H結合は α らせんを形成する
Leu6. A (カルボ ニル)	Cys10. A (ア ミノ)	主鎖H結合は α らせんを形成する
Glu7. A (カルボ ニル)	Cys10. A (ア ミノ)	主鎖H結合は α らせんを形成する
Glu7. A (カルボ ニル)	His11. A (ア ミノ)	主鎖H結合は α らせんを形成する
Phe8. A (カルボ ニル)	His11. A (ア ミノ)	主鎖H結合は α らせんを形成する
Phe8. A (カルボ ニル)	Val12. A (ア ミノ)	主鎖H結合は α らせんを形成する
Cys10. A (カル ボニル)	Tyr14. A (ア ミノ)	主鎖H結合は α らせんを形成する
His11. A (カル ボニル)	Gly15. A (ア ミノ)	主鎖H結合は α らせんを形成する
Asp4. B (カルボ ニル)	Phe8. B (アミ ノ)	主鎖H結合は α らせんを形成する

10

20

30

40

Asp5. B (カルボ ニル)	Trp9. B (アミ ノ)	主鎖H結合は α らせんを形成する
Leu6. B (カルボ ニル)	Cys10 (amin o)	主鎖H結合は α らせんを形成する
Phe8. B (カルボ ニル)	Val12. B (ア ミノ)	主鎖H結合は α らせんを形成する
Trp9. B (カルボ ニル)	Met13. B (ア ミノ)	主鎖H結合は α らせんを形成する
Cys10. B (カル ボニル)	Tyr14. B (ア ミノ)	主鎖H結合は α らせんを形成する

10

【0242】

アポFZD7 CRDの結晶構造は、このFZDサブクラス内の脂質結合空洞の固有の幾何形状について、予想外の分子像を明らかにし、これはなぜWntタンパク質上のcis-不飽和脂肪酸が、選好的に進化してhFZD CRDの脂質結合空洞に結合し得るかについての説明を提供し得る。とりわけ、ペプチド結合したFZD7 CRDのアーキテクチャは、固有の立体構造を示し、約90°角度を形成する二量体界面の75°の実質的な変位が伴う、屈曲U形（アポ構造、図12Aに示す）から伸張した形態への脂質結合空洞の幾何形状の改変を伴う。FZD7 CRDのアポ形態及びFz7-21結合形態の二量体界面におけるアミノ酸残基間の距離（Å）を、以下の表14に提供する。

20

表14：残基間距離（Å）

残基	アポ FZD7 CRD	Fz7-21結合 FZD7-CRD	Δ
T74	23.5	53.9	30.4
L81	6.4	29.2	22.8
H84	4.6	23.0	18.4
Q85	7.2	21.0	13.8
Y87	8.3	17.3	9.0
P88	5.1	8.3	3.2
F138	9.7	14.8	5.1
F140	16.9	21.5	4.6

30

【0243】

結晶学的モデルから観察された相互作用は、上記のいくつかの機能的分析によって支持されている。第1に、ショットガンアラニン走査は、結晶構造に則して（図13を参照）、hFZD7 CRD-Fcとの相互作用に重要なFz7-21上のいくつかの残基、すなわち、Asp5、Leu6、Trp9、Cys10、Met13、及びTyr14を特定した（上記の表6を参照）。第2に、結晶構造からの観察は、Fz7-21の二量体形態が、改善された活性を呈することを示唆した。dFz7-21（すなわち、Fz7の二量体形態が、Cys10におけるジスルフィド結合を介して、合成的に二量体化するFz7-21を得た）は、組み換えmWnt3a（50 ng/mL）で刺激されたHEK293-TB細胞中のTOPbriteレポーターアッセイにより測定して、HEK293細胞中のWnt3aシグナル伝達を阻害することにおいて単量体Fz7-21と比較して、約40倍の改善を示した（図15）。（図15における値は、dFz7-21に対して指示されたペプチドのIC₅₀の倍率変化を表す。発現レベルを説明するために、ホタル発

40

50

光シグナルを、ウミシイタケルシフェラーゼ発光に対して正規化した。計算値を、バックグラウンド除去し、模擬処置した試料に対して正規化し、各々が技術的三重複を有する少なくとも3つの独立した実験の平均を表す。) 追加として、h F Z D 7 C R D (例えば、L 6 A) とのその相互作用を中断することが予測された d F z 7 - 2 1 内の様々な位置におけるアラニン点突然変異は、分化能の約 8 0 0 倍の低減につながった (図 1 5 及び表 1 5 を参照)。対照的に、N 末端における切断は、d F z 7 - 2 1 活性に干渉せず (例えば、2 N 末端残基を欠くペプチド d F z 7 - 2 1)、結晶構造及びショットガンアラニン走査データと一致した (表 6、表 1 5、及び図 1 5 を参照)。F z 7 - 2 1 S は、陰性対照として並行して試験した。

表 1 5

ペプチド	IC50 (nM)	IC50 (nM) (95% 信頼区間)	倍率効力対 二量体の低 減	ペプチド 配列 (配列番号)
Fz7-21	464.8	296.6~633.3	42	LPSDDLEFWCHVMY (配列番号13)
dFz7-21	11.1	8.3~13.9	1	†
dFz7-21-L6A	7,120.7	4,905.7~9,335.7	642	LPSDDAEFWCHVMY (配列番号109)
dFz7-21-W9A	639.7	440.5~838.9	58	LPSDDLEFACHVMY (配列番号110)
dFz7-21-M13A	913.1	692.9~1,133.3	82	LPSDDLEFWCHVAY (配列番号111)
dFz7-21-Y14A	2,964.2	1,985.9~3,942.4	267	LPSDDLEFWCHVMA (配列番号112)
dFz7-21-Δ2	8.8	6.6~10.9	1	SDDLEFWCHVMY (配列番号99)
Fz7-21-C10S	超 溶解度	超 溶解度	>9,000	LPSDDLEFWSHVMY (配列番号113)

† d F z 7 - 2 1 は、C y s 1 0 におけるジスルフィド結合を介して F z 7 - 2 1 を合成的に二量体化することで得られた F z 7 の二量体形態である。

【0244】

図 1 5 及び表 1 5 のデータを得るために、W n t シグナル伝達を、組み換え m W n t 3 a (50 ng/mL) で刺激された H E K 2 9 3 - T B 細胞中、T O P b r i t e レポーターアッセイによって測定した。図 1 5 及び表 1 5 における値は、d F z 7 - 2 1 に対する、示されたペプチドの I C 5 0 の倍率変化を表す。発現レベルを説明するために、ホタル発光シグナルを、ウミシイタケルシフェラーゼ発光に対して正規化した。計算値を、バックグラウンド除去し、模擬処置した試料に対して正規化し、各々が技術的三重複を有する少なくとも3つの独立した実験の平均を表す。

【0245】

更に、h F Z D 7 C R D 上のペプチド結合領域内の特定の残基において導入された突然変異 (H 8 4 A、Y 8 7 A、F 1 3 8 A (あるいは、本明細書全体で F 1 3 0 A として特定される)、F 1 4 0 A) は、野生型 h F Z D 7 C R D と比較して (図 4 0 を参照) F z 7 - 2 1 の結合を低減し、構造的予測と一致した。更に、F z 7 - 2 1 は、ペプチド

－C R D結合の2：2立体化学を描く構造モデルに即して、溶液中のh F Z D 7 C R Dの単量体から二量体への移行（データ図示せず）を促進した。第5に、F Z D 7 C R D－F z 7－2 1融合構築体は、ペプチド配列内でC y s 1 0からS e rへの突然変異を含有する融合構築体と比較して、溶液中で主に二量体であり（データ図示せず）、単量体及びあまり顕著でない二量体種を有するオリゴマーの混合集団を示した（データ図示せず）。ペプチド－ペプチドまたはペプチド－F Z D 7相互作用に重要であることが予測されたF z 7－2 1残基の追加のA l a突然変異（すなわち、L 6 A、W 9 A、Y 1 4 A、L 6 A及びW 9 A、L 6 A及びY 1 4 A、ならびにL 6 A、W 9 A、及びY 1 4 A）は、F Z D 7 C R D－F z 7－2 1融合構築体の二量体化の低減につながった（データ図示せず）。これらの発見は、上記のS E C－M A L Sデータ及び結晶学的観察と一致し、F z 7－2 1の活性形態が、F Z D 7 C R Dの二量体形成を強化する二量体であるという考えを更に支持する。

10

【0 2 4 6】

d F z 7－2 1のN M R溶液構造は、ペプチド二量体が構築されたことを明らかにし、結晶構造からの観察と同様に、分子内相互作用及び α らせん特徴を呈した（図1 6 A～1 6 E及び表1 6を参照）。図1 6 Aは、d F z 7－2 1のN O E S Y接続性プロットを提供する。図2 6は、d F z 7－2 1の2 0最低エネルギーN M R構造の重畳を示す（鎖A及び鎖B、リボン表現；側鎖、線表現）。図1 6 Bは、d F z 7－2 1の2 0の最低エネルギーN M R構造の重畳に基づいて、d F z 7－2 1の代表的なN M R溶液構造を示す（アミノ酸側鎖は、線として示される）。N M R溶液構造において、2つのペプチド鎖は、互いに関して9 0°角度で配向され、N末端領域は無秩序であるように思われ、F Z D 7 C R Dとの相互作用が、立体構造変化を誘導し、ペプチド内の二次構造形成を促進し得ることを示す。図1 6 Cは、 α らせん特徴を表示するd F z 7－2 1の2 D N O E S Yプロットを示す。対照的に、図1 6 Dに示されるF z 7－2 1 Sの2 D N O E S Yプロットは、F z 7－2 1 Sが、限定された二次構造を有することを示す。図1 6 Eは、F z 7－2 1、F z 7－2 1 S、及びd F z 7－2 1ペプチドの1 D N M Rスペクトルを示す。図1 6 Eにおいて、F z 7－2 1は、試験した緩衝条件において、F z 7－2 1 S及びd F z 7－2 1に対するピーク広がりを示し、その二次構造の帰属を困難にする。図1 6 Eにおける矢印は、ジスルフィドシステインからのアミド基のプロトンピークを示す。一緒に、提示される構造－活性関係及びN M Rデータは、構造モデルに対する更なる生化学的支持を提供する。

20

30

表1 6．F z 7－2 1二量体のN M R統計

距離拘束	
合計	414
残基内 ($i - j = 0$)	94
残基間	
連続的 ($ i - j = 1$)	124
中間範囲 ($2 \leq i - j \leq 4$)	108
長範囲 ($ i - j \geq 5$)	88
分子間	0
総二面角拘束	
ϕ	0
ψ	0
侵害の平均数	
距離拘束	0.00 ± 0.00
最大距離拘束の侵害 ($\text{\AA}$)	0.01
理想化された幾何形状からの偏差	
結合長 ($\text{\AA}$)	0.0006
結合角度 ($^\circ$)	0.41
不適切 ($^\circ$)	0.079
ラマチャンドラプロット (%)	
最も好ましい領域内の残基	64.3
追加として許容される領域内の残基	26.6
一般に許容される領域内の残基	9.1
許容されない領域内の残基	0
平均対 r. m. s. 偏差 ($\text{\AA}$)	
残基5~13 (105~113)、骨格	0.4
残基5~13 (105~113)、重原子	0.8

10

20

30

【0247】

上述のように、hFZD7、hFZD1、hFZD2、mFZD8、hFZD5、hFZD4、hFZD9、hFZD10、hFZD3、及びhFZD6 CRDの配列を、FZD7クラスのCRDに対するFz7-21の選択性についての更なる洞察を得るために整列させた。図14を参照されたい。Clustal Omegaを使用してアラインメントを生成し、続いてガイドとしてジスルフィド結合システムを使用して手動で整列させた（システムが灰色で強調される）。Fz7-21二量体と直接接触されるhFZD7上の残基及び他のFZD CRD上の同一残基は、太字の下線文字で描かれている。Fz7-21はFZD7クラスのCRD（すなわち、FZD7 CRD、FZD1 CRD、及びFZD2 CRD）のみに結合するため、図14に示される結合部位1（すなわち、LXXHQXP）及び結合部位2（すなわち、FGF）の両方の組み合わせは、特定の選択的FZD7クラスの結合に必要な可能性がある。

40

【0248】

hFZD7 CRD二量体の配置は、hFZD5及びmFZD8 CRDなどの他の関

50

連 *f r i z z l e d* ファミリーメンバーと同様であるが、*h F Z D 4* C R D などのより遠い関係のある *F Z D* C R D ファミリーメンバーに対して著しい対照をなし (J a n d a e t a l. (2012) *S c i e n c e* 337, 59-64、N i l e e t a l. (2017) *P r o c. N a t l. A c a d. S c i. U S A* 114, 4147-4152 L I D -4110. 1073/pnas. 1618293114 [doi]、D a n n e t a l. (2001) *N a t u r e* 412, 86-90、S h e n e t a l. (2015) *C e l l R e s.* 25, 1078-1081)、そこでは脂質結合溝は、むしろ互いに分離しているように思われ、二量体界面から離れて反対側に位置する (図 9 B)。しかしながら、*C 16:1 n-7* 脂肪酸と複合した *h F Z D 4* C R D の最近報告された構造は、*h F Z D 7* C R D / *C 16:1 n-7* 複合体において見出された C R D と *h F Z D 7* C R D / *F z 7-21* 複合体の C R D との間の中間である構成を有する二量体 C R D を明らかにした。*h F Z D 7* C R D と比較して、*h F Z D 4* C R D における二量体界面の異なるアーキテクチャは、ペプチド結合領域内のアミノ酸配列の差に加えて (図 14)、*h F Z D 4* C R D に結合するペプチドの欠如を部分的に説明することができる。

【0249】

F Z D 5、*7*、及び *8* C R D は、 α らせん二量体アーキテクチャを共有するが (N i l e e t a l. (2017) *P r o c. N a t l. A c a d. S c i. U S A* 114, 4147-4152 L I D -4110. 1073/pnas. 1618293114 [doi])、二量体界面を含むアミノ酸残基のわずかな変化が存在する。特に、*F Z D 7* C R D の *T y r 87* 及び *P h e 138* (あるいは本明細書全体で *F 130* として特定される) は、*F Z D 5/8* C R D では *T r p* 及び *T y r* にそれぞれ変化する。これらの2つの残基は、*h F Z D 7* C R D 上の *F z 7-21* ペプチド結合領域の一部を成し、*F Z D 7* クラス C R D と *F Z D 8* クラス C R D との間に保存されていないペプチドエピトープ内の (合計7個の C R D 残基のうち) 唯一の残基である。残基の差は、インシリコ予測に基づいて主要なアミノ酸変化を提示しないが、*F 138 Y* は、*L e u 6* における *F z 7-21*、ならびに *V a l 92* 及び *L y s 91* における *F Z D 7* C R D 二量体パートナーとの立体的不適合を呈する場合があり、潜在的に *h F Z D 7* C R D の「伸長された」脂質結合溝形態を崩壊させる。(*F 138 Y* は、代替として、本明細書全体で *F 130 Y* として特定される。) これらの相互作用は、*F Z D* C R D ファミリー内のペプチド結合エピトープの配列保存に部分的に基づいて、*F Z D 7* 受容体サブクラスに対するペプチド選択性についての根拠を提供し得る。追加として、*h F Z D 7* C R D 内の二量体界面及び脂質結合溝幾何形状は、ペプチド結合のフットプリントに寄与し、したがって C R D タンパク質の動力学は言うまでもなく、ペプチド選択性に影響を及ぼし得る。

【0250】

実施例 4: *F z d 7* 機能のインビボ特徴付け

F z 7-21 が、*W n t* と *F Z D 7* との相互作用を中断させることによって *F Z D 7* 媒介型シグナル伝達に干渉するかどうかの問いに対処するために、酵素結合免疫吸着測定法 (E L I S A) を開発して、*F z 7-21*、*d F z 7-21*、または *F z 7-21 S* の存在または不在下での、異なる *F Z D* C R D へのビオチニル化 *W n t* (*b i o-W n t*) の結合を測定した。*F z 7-21* または *d F z 7-21* での処理は、*F Z D 7* クラスタンパク質への *b i o-W n t 3 a* または *b i o-W n t 5 a* の結合を約 1.5~2 倍強化したが、*F z 7-21* と相互作用しない *F Z D 4* への同じ *W n t* タンパク質の結合に対するいかなる効果も示さなかった。更に、対照ペプチド *F z 7-21 S* は、予想されるように、*F Z D* C R D への異なる *W n t* の結合に対する効果を示さなかった。理論に束縛されるものではないが、脂質結合空洞の改変された幾何形状により例証されるように、*h F Z D 7* C R D 上の *d F z 7-21* により誘導された実質的な立体構造変化は、2つの *W n t* 分子を *h F Z D 7* C R D 二量体の上に同時に収容するのを容易にすることができる (図 4 e~h)。分子モデリングは、ペプチドが結合した *h F Z D 7* C R D 構造内の伸長した疎水性空洞が、そうでなければアポ *h F Z D 7* C R D 構造において立体的に不適合

である、潜在的に2つのWnt 脂肪アシル部分を収容し得ることを示唆し、ELISAシグナルにおける観察された2倍増加についての妥当な説明を提供する。実験的データ及びモデリングデータは共に、dFz7-21が、FZD4 CRDではなくFZD7クラス
のCRDに対するWnt 3a及びWnt 5aの動員を強化し得ることを示唆する。Fz7-21-FZD7 CRD複合体において観察された劇的な立体構造変化は、Wntシグナル伝達に対するペプチドの阻害効果により示されるように、強化されたWnt結合にもかかわらず、適切なシグナル伝達について受容体を無能にし得る。

【0251】

幹細胞機能におけるFZD7の役割についての問いに薬理学的に対処するために、成体マウス腸上皮から確立されたオルガノイド培養物に対するFz7-21処理の効果を評価した(Fatehullah et al (2016) "Organoids as an in vitro model of human development and disease." Nat Cell Biol 18, 246-254、Barker, N. et al. (2007) "Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene Lgr5." Nature 449, 1003-1007)。オルガノイド培養系は、陰窩ウイルス形態学の存在を含む腸上皮を忠実に再現する。とりわけ、陰窩領域は、機能的腸幹細胞(ISC)の存在の直接尺度である、連続出芽を経る。したがって、オルガノイド集団の幹細胞機能(Wnt依存性プロセス)を、オルガノイド当たりの形成された芽の数をスコアリングすることによって定量的に評価した(Grabinger et al. (2014) "Ex vivo culture of intestinal crypt organoids as a model system for assessing cell death induction in intestinal epithelial cells and enteropathy." Cell Death & Disease 5, e1228)。腸マウスオルガノイドを、成長因子(noggin、EGF、及びR-スポンジン)及び(a) DMSO、(b) 200 μ M Fz7-21S(すなわち、陰性対照)、(c) 抗Lrp6遮断抗体(すなわち、陽性対照)、(d) 200 μ M二量体化dFz7-21、(e) 100 μ Mの二量体化dFz7-21、(f) 10 μ Mの二量体化dFz7-21、または(g) 1 μ Mの二量体化dFz7-21の存在下で48時間、マトリゲル中で成長させた。48時間の処理後の代表的なマウス腸オルガノイドの形態を図17A~Gに示す。次に、ペプチド処理後のオルガノイド幹細胞(SC)ポテンシャルを定量した。オルガノイドSCポテンシャルは、オルガノイド当たり1つ以上の芽を有するオルガノイドの%を示す。オルガノイドを上記のように処理し、処理の48時間後に収集した。図18に示すように、dFz7-21での処理は、濃度依存的に出芽事象を劇的に低減したが、陰性対照ペプチドFz7-21Sは、いかなる主要な効果も示さなかった。(図18における値は、少なくとも3つの生物学的繰り返しからの平均 $\pm$ 標準誤差を表す。オルガノイドの総数を各条件でスコアリングした。n=554(DMSO)、n=547(dFz7-21、200 μ M)、n=627(dFz7-21、100 μ M)、n=648(dFz7-21、10 μ M)、n=287(dFz7-21、1 μ M)、n=528(Fz7-21S、200 μ M)、n=715(抗LRP6 Ab、10 μ g/mL)。)

【0252】

ISCポテンシャルの崩壊と一致して、Lgr5(図19A)及びAscl2(図19B)などの良好に特徴付けられたISCマーカー(Clevers, H. (2012) "The intestinal crypt, a prototype stem cell compartment." Cell 154, 274-284)は、dFz7-21での処理の24時間及び48時間後に著しく下方調節された。Fz7-21Sでの処理は、効果を有しなかった。図19A及び19Bを参照されたい。同様に、良好に確立されたWnt標的遺伝子であるAxin2は、Fz7-21S処理時ではなく、dFz7-21処理時に著しく低減された。図19Cを参照されたい。(図19A~19Cにおける

値は、各々2つの技術的繰り返しを有する6つの生物学的繰り返しの平均±標準誤差を表す。ペプチド処理した試料は、DMSO対照に対して正規化した。両方の集団が同じSDを有すると仮定して、パラメトリック独立t検定で統計を行った。)対照的に、Fz7-21Sではなく、dFz7-21での処理の24時間及び48時間後にMuc2が上方調節された。ISCポテンシャル及び幹細胞転写の両方に対するdFz7-21の効果は、対照抗Lrp6抗体(すなわち、Wntシグナル伝達の一般的阻害剤)と同様であった。

【0253】

dFz7-21の薬理学的効果を、インビボで更に調査した。要するに、dFz7-21、Fz7-21S、抗ブタクサ抗体(陰性対照)、または抗Lrp6抗体(Wntシグナル伝達の阻害のための陽性対照)で6時間処置した(すなわち、腹腔内投与を介して)C57BL/6マウスから腸上皮を採取した。処置に続いて、RT-PCRを行い、転写レベルを定量した。様々な腸幹細胞(ISC)、ならびにLgr5(図20A)、Ascl2(図20B)、及びAxin2(図20C)などのWnt転写物が、dFz7-21処置後に著しく下方調節された(図20A~20Cにおける値は、技術的繰り返しでの5匹のマウスの平均±標準誤差を表す。両方の集団が同じSDを有すると仮定して、パラメトリック独立t検定で統計を行った。ROUT外れ値排除法を使用した後、1つの値を除去した(Q=1%)。全ての値は、抗ブタクサ陰性対照に対して正規化した。)この効果はまた、抗Lrp6抗体で処置した試料中で観察された。対照的に、Fz7-21Sでの処置は、Lgr5、Ascl2、及びAxin2転写レベルに影響を及ぼさなかった。図20A~20Cを参照されたい。これらの結果は、図17A~17G、図18、及び図19A~19Cにおけるデータと一致する。

【0254】

dFz7-21の薬理学的効果を、dFz7-21で6時間及び24時間処理した腸オルガノイド試料上でRNAシーケンシングを行うことによって更に調査した。公平な分析は、Lgr5+ISC中で発現し、時間依存的にdFz7-21で処理する際に、ISCを保存することが知られているマーカーの実質的な下方調節を明らかにした。同時に、dFz7-21で処理したオルガノイドにおいて、腸細胞マーカーの上方調節(分化促進)も存在した。中でも、dFz7-21での処置に際して最も下方調節された遺伝子は、Lgr5、Olfm4、及びAscl2であった。模擬ペプチドFz7-21SまたはDMSOで処理された試料中で、遺伝子発現の変化はほとんどまたは全く観察されなかった。最後に、幹細胞に対するdFz7-21の直接効果を評価するために、Lgr5-GFPマウスに由来するオルガノイド中のGFP+幹細胞の存在を、Tian, H. et al. "A reserve stem cell population in small intestine renders Lgr5-positive cells dispensable." Nature 478, 255-259 (2011)に記載されているようにモニタリングした。dFz7-21での処理は、フローサイトメトリー(図41A~41Cを参照)及び共焦点顕微鏡(データ図示せず)によってアッセイして、腹腔内投与対照DMSOと比較してLgr5-GFP幹細胞の数を低減した。図41A及び41Bにおいて、Lgr5-GFPオルガノイドを解離し、SYTOXで処理して、フローサイトメトリーにより分析した。図41Aは、DMSOで処理したGFP+発現する生細胞の代表的なプロットを示し、図41Bは、dFz7-21で処理したGFP+を発現する生細胞の代表的なプロットを示す。図41A及び41Bの定量を、図41Cに示す。

【0255】

dFz7-21の阻害機序及びその特異性を検証するために、活発な下流Wntシグナル伝達を呈したオルガノイドに対するペプチド処理の効果を試験した。要するに、Lgr5-GFPオルガノイドを、DMSOまたはGsk3β阻害剤CHIR99021(5μM)で24時間前処理し、次いでDMSO、dFz7-21(100μM)、またはFz7-21S(100μM)±CHIR99021で処理した。転写は、Axin2(図42A)及びAscl2(図42B)について、RT-PCRにより定量した。第2の実験

の組において、APC^{min}オルガノイドを培養し、DMSO、dFz7-21 (100 μM)、Fz7-21S (100 μM) で24時間処理し、Axin2 (図42C)、Asc12 (図42D)、及びLgr5 (図42C) について、転写をRT-PCRにより定量した。(Ap^c^{Min} (複数腸腫瘍) マウスは、単一突然変異体Ap^c対立遺伝子を担持し、4~6ヶ月齢までに小腸内に50~100良性腺腫を発達させ、残留する野生型遺伝子の喪失と常に関連付けられる。) CHIR99021 (Gsk3β阻害剤) で前処理されたか、またはAp^c突然変異体バックグラウンドを有していた腸オルガノイド中の幹細胞 (Lgr5、Asc12) 及びWntシグナル伝達 (Axin2) マーカーに対する効果はほとんどまたは全く観察されなかった。これらの発見は、dFz7-21が、受容体のレベルにおいてβ-カテニン及びAPCの上流で作用することを示し、2D細胞培養データと一致する (図2E)。

10

【0256】

全体として、実施例において考察される代表的な結果は、脂質結合溝におけるdFz7-21によるFZD7 CRDサブクラスを選択的標的が、Wntシグナル伝達及び幹細胞機能を障害するのに十分であることを示す。Fz7-21-FZD7 CRD複合体において観察された劇的な立体構造変化は、インビトロ及びインビボでのペプチドの阻害効果によって示されるように、受容体を適切なシグナル伝達に対して無能にする可能性が高く、それによりペプチドの作用形態の機序を提供する。

【0257】

有力かつ選択的な小ペプチドアンタゴニスト (すなわち、Fz7-21及びその誘導体) が記載されている。このペプチドは、FZD受容体ファミリーの複数のサブクラスを標的とする、以前に報告された抗体または小分子系アンタゴニストから、その高い能力、選択性、及び薬理学的作用形態によって区別される。例えば、Lee et al. (2015) "Structure-based Discovery of Novel Small Molecule Wnt Signaling Inhibitors by Targeting the Cysteine-rich Domain of Frizzled." J Biol Chem 290, 30596-30606及びGurney et al. (2012) "Wnt pathway inhibition via the targeting of Frizzled receptors results in decreased growth and tumorigenicity of human tumors." Proc Natl Acad Sci U. S. A 109, 11717-11722を参照されたい。

20

30

【0258】

Fz7-21と複合したhFZD7 CRDの結晶構造は、新規のCRD立体構造を明らかにする。更に、本明細書で提供されるデータは、アイソフォーム選択的FZD阻害の基礎として、脂質溝結合機序を定義する。ペプチドFz7-21は、FZD7 CRDの二量体構成及びその脂質結合空洞を改変し、開いた二量体界面及びアポFZD7 CRDに対して「伸長した」脂質結合溝を有する、開状態のFZD CRDの第1の例を提供する (図12A及び12B)。ペプチドは、FZD7 CRD結合について高親和性Wntリガンドと競合せず、これは特にインビボ設定において有益であり得る。インビトロでのFz7-21の存在下、FZD CRDに対するWntリガンドの追加の動員があるが、Fz7-21-FZD7 CRD複合体において観察された劇的な立体構造変化は、細胞及び腸オルガノイド中のペプチドの阻害効果によって示されるように、受容体を適切なシグナル伝達に対して無能にする可能性が高く、それによりペプチドの作用形態についての妥当な説明を提供する。更に、理論に束縛されるものではないが、これらのタンパク質間の高度の配列保存及びELISAからの同様の発見を考慮すると、ペプチドは、FZD7 CRDと同様にFZD1及びFZD2 CRDに結合することが可能である。

40

【0259】

考察されたデータは、脂質結合溝におけるFZD7 CRDサブクラスを選択的標的が、Wnt及び幹細胞機能を障害するのに十分であることを示す。Fz7-21は、幹細胞

50

及びがん生物学におけるFZD7の役割を更に調査するための選択的薬理的ツールとして役立つ。かかる発見は、Wntシグナルを媒介してLgr5+腸幹細胞を調節することにおいて、FZD7 CRD脂質結合溝幾何形状に対する重要な役割があることを示唆する。FZD7受容体サブクラスの選択的標的を示すデータと併せて、腸陰窩の底部におけるFZD7クラス受容体の機能的冗長性の明らかな欠如は、活発な上流Wntシグナル伝達に依存する腫瘍中の小リガンドによる薬理的にFZD7を標的とするための可能性のある経路を示唆する (Seshagiri (2012) "Recurrent R-spondin fusions in colon cancer." Nature 488, 660-664、Jiang et al. (2013) "Inactivating mutations of RNF43 confer Wnt dependency in pancreatic ductal adenocarcinoma." Proc Natl Acad Sci U. S. A. 110, 12649-12654、Madan et al. (2016) "USP6 oncogene promotes Wnt signaling by deubiquitylating Frizzleds." Proc Natl Acad Sci U. S. A. 113, E2945-2954)。

10

【0260】

実施例5：Fz7-21ペプチド誘導体

Fz7-21のM13及びL6は、FZD7 CRD上の開いた脂質結合溝に面する。図13、25A、及び25Bを参照されたい。更なる実験を行い、これらの位置において脂質をFz7-21に複合することが、FZD7 CRDへのペプチドの親和性を強化するかどうか、FZD7 CRDへのWnt結合に干渉するかどうか、または両方を評価した。Fz7-21の脂質含有誘導体 (表17に列挙される) を生成し、それらがWnt3a媒介型β-カテニンシグナル伝達を阻害する能力について、すなわち上記のように評価した。要するに、TCF/LEF応答性ホタルルシフェラーゼ構築体及び構成的に発現されたウミシイタケルシフェラーゼ構築体で安定してトランスフェクトされたHEK293-TB細胞を、以下の表17に列挙される二量体化ペプチドの3倍段階希釈で6時間、組み換えmWnt3a (50 ng/mL) により刺激した。DMSO対照を並行して行った。β-カテニンシグナル伝達は、DMSO対照に対して正規化されたホタルルシフェラーゼのウミシイタケルシフェラーゼに対する比として測定した。表17及び図21A~21Kに示すように、dFz7-d21Δ2、L6H及びFz7-21Δ2は、dFz7-21に相当するIC50値で、外因性Wnt3aで刺激されたHEK293細胞中のWnt3a媒介型β-カテニンシグナル伝達を障害した。(表17及び図21A~21Kにおける値は、少なくとも3つの独立した繰り返しの平均 (特に指示される場合を除いて) 土標準偏差である。

20

30

表17

ペプチド	最良適合IC 50 (nM) (n=3)	95%信頼区 間	単量体ペプチド の配列 (配列番号)	非天然のアミノ 酸
dFz7-21**	14.1	8.8~22.5	LPSDDLEFWCHVMY (配列番号13)	該当せず
Fz7-21S	阻害されず	阻害されず	LPSDDLEFWSHVMY (配列番号113)	該当せず
dFz7-21 Δ 2. M13Adp*	1,409.7	940.0~2,114.3	SDDLEFWCHVXY (配列番号114)	X=2-アミノ-3-デシルオキシ-プロピオン酸
dFz7-21 Δ 2. M13Tbh*	476.6	308.4~736.7	SDDLEFWCHVXY (配列番号114)	X=6-ヒドロキシ-L-ノルロイシン
dFz7-21 Δ 2. M13K(C8)*	2,127.6	981.9~4,610.2	SDDLEFWCHVXY (配列番号114)	X=イプシロンアミノ基にカップリングされたオクタン酸を含むリジン
dFz7-21 Δ 2. L6Hof*	14.9	11.0~20.1	SDDXEFWCHVMY (配列番号115)	X=L-ホモフェニルアラニン
dFz7-21 Δ 2. M13C8*	14,0000.0	8,498.6~23,060.0	SDDLEFWCHVXY (配列番号114)	X=2-アミノデカン酸
dFz7-21 Δ 2. M13K(C10)*	1505.00	1,032.6~2,193.6	SDDLEFWCHVXY (配列番号114)	X=リジン、イプシロンアミノ基にカップリングされたデカン酸
dFz7-21 Δ 2 (Q519)*	4.3	0.13~146.3	SDDLEFWCHVMY (配列番号99)	ペプチドのN末端アミンは、アセチル化され、ペプチドのC末端カルボキシル基は、アミド化される。
dFz7-21 Δ 2. L6Ho1 (n=2)* [§]	16,570.0	0.0003~9.0 x10 ¹¹	SDDXEFWCHVMY (配列番号115)	X=L-ホモロイシン
dFz7-21 Δ 2. L6KC(8)*	1,165.7	886.0~1,533.8	SDDXEFWCHVMY (配列番号115)	X=イプシロンアミノ基にカップリングされたオクタン酸を含む、リジン

10

20

30

40

dFz7-21 Δ 2. M13K (C1 2)*	553		SDDLEFWCHVXY (配列番号114)	X=リジン、イブシロンアミノ基にカップリングされたドデカン酸
dFz7-21 Δ 2. M13K (C1 4)*	607		SDDLEFWCHVXY (配列番号114)	X=リジン、イブシロンアミノ基にカップリングされたテトラデカン酸
dFz7-21 Δ 2. M13K (C1 6)*	607		SDDLEFWCHVXY (配列番号114)	X=リジン、イブシロンアミノ基にカップリングされたヘキサデカン酸

10

* * C y s 1 0 において結合されたジスルフィドを介して二量体化されたペプチド。

* C y s 8 において結合されたジスルフィドを介して二量体化されたペプチド。

20

§ ペプチドは、二重実験において試験した。

【 0 2 6 1 】

後の実験の組において、E L I S A アッセイを行い、F Z D C R D への W n t の結合に対する低濃度の F z 7 - 2 1、d F z 7 - 2 1、及び F z 7 - 2 1 S（例えば、約 1 0 0 n M の細胞性 I C 5 0 と同じ範囲内の濃度）の効果を評価した。要するに、（a）F Z D 1 C R D - F c、（b）F Z D 2 C R D - F c、（c）F Z D 4 C R D - F c、または（d）F Z D 7 C R D - F c を捕捉試薬として、及びビオチニル化 W n t 5 a を検出試薬として使用して、アッセイを行った。ペプチド（1）d F z 7 - 2 1、（2）F z 7 - 2 1、（3）F z 7 - 2 1 S、または（4）D M S O 対照を、0 μ M ~ 1 0 μ M の漸増濃度で添加した。ストレプトアビジン-H R P を使用して、ビオチニル化 W n t 5 a を検出し、H R P 活性を 4 2 8 n m の化学発光検出の関数として測定した。とりわけ、F Z D 1 C R D、F Z D 2 C R D、及び F Z D 7 C R D への W n t 5 a の結合は、約 0. 5 μ M を下回る濃度で F z 7 - 2 1 の存在下で増加し（図 2 2 A）、F z 7 - 2 1 は、F Z D 1 - C R D、F Z D 2 C R D、及び F Z D 7 C R D への W n t 5 a の動員を濃度依存的に強化することを示す。ほとんどの結合は、0. 1 μ M の F z 7 - 2 1 の存在下で見られた。対照的に、F z 7 - 2 1 は、F Z D 4、すなわち、F Z D 1、F Z D 2、及び F Z D 7 が互いに共有するよりも、F Z D 1、F Z D 2、及び F Z D 7 との低い配列類似性を共有する F Z D 上の C R D への W n t 5 a の結合に対して、かかる効果を有していなかった。F Z D 1 - C R D、F Z D 2 C R D、及び F Z D 7 C R D への W n t 5 a の結合はまた、約 0. 5 μ M を下回る濃度で d F z 7 - 2 1 の存在下で増加し（図 2 2 B）、ほとんどの結合は、0. 0 5 μ M の d F z 7 - 2 1 の存在下で見られた。d F z 7 - 2 1 は、F Z D 4 上の C R D への W n t 5 a の結合に対して、かかる効果を有していなかった。F z 7 - 2 1 S は、試験した F Z D C R D のうちのいずれへの W n t 5 a の結合に対しても効果を有していなかった（図 2 2 C）。

30

40

【 0 2 6 2 】

同様の結果は、W n t 3 a を使用して観察された。図 2 2 D ~ 2 2 F を参照されたい。F Z D 1 C R D、F Z D 2 C R D、及び F Z D 7 C R D への W n t 3 a の結合は、約 0. 5 μ M を下回る濃度で F z 7 - 2 1 の存在下で増加し（図 2 2 D）、ほとんどの結合は、0. 0 5 μ M ~ 0. 1 μ M の d F z 7 - 2 1 の存在下で見られた。F Z D 1 C R D、F Z D 2 C R D、及び F Z D 7 C R D への W n t 3 a の結合は、約 0. 5 μ M を

50

下回る濃度でdFz7-21の存在下で増加し(図22E)、ほとんどの結合は、0.01 μ M~0.05 μ MのdFz7-21の存在下で見られた。Fz7-21もdFz7-21も、FZD4 CRDへのWnt3a結合に対していかなる効果も有していなかった。Fz7-21Sは、試験したFZD CRDのうちのいずれかに対するWnt3aの結合に対する効果を有していなかった(図22F)。

【0263】

図22A~22Fの値は、DMSO対照に対して正規化した。全てのアッセイは、1% DMSO最終濃度で行った。

【0264】

FZD1 CRD、FZD2 CRD、及びFZD7 CRDへのWntの結合に対するFz7-21及びdFz7-21の驚くべき効果を考慮して、上記のアッセイを繰り返して、FZD4 CRD及びFZD7 CRDへのWnt5aの結合に対する表17に列挙されたFz7-21由来ペプチド二量体の効果を試験した。試験した全てのFz7-21由来ペプチド二量体は、FZD7 CRDへのWnt5aの動員を阻害した。図23A~23J。Fz7-21由来ペプチド二量体は、FZD4 CRDへのWnt5a結合に対する効果を有していなかった。図23K及び23L。Fz7-21Sは、試験したFZD CRDへのWnt5a結合に対する効果を有していなかった。図23A~23L。要約すると、出願人は、驚くべきことに、各々が疎水性の非天然アミノ酸の存在によってdFz7-21とは異なる、Fz7-21由来ペプチド二量体が、FZD7 CRDへのWnt5a動員を阻害することを示した。かかる結果は、FZD7 CRDへの表17に列挙したFz7-21由来ペプチド二量体の結合が、アポ構造中の屈曲形態から伸長形態へとFZD7 CRDの脂質結合空洞を改変することを示唆し(図12A及び12Bを参照)、これは各Fz7-21由来ペプチド二量体中に存在する非天然のアミノ酸の疎水性部分が、伸長した脂質結合溝に浸透し、したがってFZD7 CRDへのWnt5a結合を遮断するのを可能にする。

【0265】

実施例6：実施例7の材料及び方法

試薬及び組み換えタンパク質

hFZD7 CRD-His [Gln33-Gly168]を、EndoHを発現するTrichoplusia ni細胞中で分泌タンパク質として発現させ、Kifunensinで処理した。次いで、以前に記載されたように、標準Ni-NTA親和性クロマトグラフィー、続いてサイズ排除クロマトグラフィーによって精製した²⁰。hFZD5 CRD-His [Ala27-Ala155]は、Trichoplusia ni細胞中で分泌タンパク質として発現し、次いでBourhis, E. et al. Recognition of a frizzled8. Wnt3a. LRP6 signaling complex reveals multiple Wnt and Dkk1 binding sites on LRP6. J. Biol. Chem. 285, 9172-9 (2010)に記載されるように、標準Ni-NTA親和性クロマトグラフィー、続いてサイズ排除クロマトグラフィーによって精製した。

【0266】

X線結晶学

C24結合したhFZD7 CRD-Hisを精製し、緩衝液を150mMのNaCl、50mMのTris-HCl、pH7.5に交換した後、遠心分離によって25mg/mLまで濃縮した(カタログ番号UFC900325; Millipore Amicon Ultra 15)。タンパク質を、2.2M硫酸アンモニウム、100mMのBis-Tris (pH6.5)を含有するリザーバー溶液と混合し(1:1)、蒸気拡散によって19°Cでインキュベートした。回折データを、Stanford Synchrotron Radiation Light source (SSRL) 12-2において収集し、2.20 Å分離度での分子置換により解析した。hFZD5 CRD-Hisを精製し、緩衝液を150mM NaCl、50mM Tris-HCl pH8.0に交

換した後、遠心分離によって約 8 mg/mL まで濃縮した。タンパク質を、 0.1 M のクエン酸ナトリウム三塩基性脱水物 ($\text{pH } 5.5$)、 22% のポリエチレングリコール 3350 を含有するリザーバー溶液で、 $1:1$ で混合し、蒸気拡散によって 19°C でインキュベートした。 0.1% の n -オクチル- β -D-グルコシド (BOG) を、FZD5 BOG 共結晶のための結晶化媒質に含めた。パルミトール酸との FZD5 CRD 共結晶のために、後者を、 150 mM の NaCl 、 50 mM の Tris-HCl 、 50% DMSO を含有する $\text{pH } 8.0$ 緩衝液中のストック溶液 (10 mg/mL) として調製し、次いで FZD5 CRD と混合した ($1:1$)。共結晶化は、上記のようにタンパク質-脂肪酸複合体をリザーバー溶液と混合することによって ($1:1$) セットアップした。リザーバー溶液はまた、 0.1% のパルミトール酸を含有していた。hFZD5 CRD : C16 : 1 $n-7$ 及び hFZD5 CRD : BOG 結晶についての回折データを、Advanced Light Source (ALS) ビームライン $5.0.1$ において収集し、それぞれ $2.10 \text{ \AA}$ 及び $2.20 \text{ \AA}$ 分離度での分子置換により解析した。統計は、補足表 1 において入手可能である。

【0267】

hFZD7 CRD 疎水性空洞表現

hFZD8 CRD 内の疎水性空洞を視覚化するために、mFZD8 CRD (PDB ID# F40A) と複合した 2 つの XWnt8 分子を、Needleman-Wunsch アラインメントアルゴリズム及び BLOSUM-62 マトリクスを用い、UCSF キメラにおける MatchMaker ユーティリティを使用して各 hFZD8 CRD 二量体対の上に重畳した。BOG に結合した hFZD5 CRD または C24 脂肪酸に結合した C16 1 $n-7$ 及び hFZD7 CRD について、それらそれぞれのリガンドを使用して、疎水性空洞を定義した。連続疎水性表面を、約 $5 \text{ \AA}$ の結合したリガンド内で特定し、空洞の疎水性に従って視覚化した。

【0268】

インシリコ FZD CRD 二量体界面分析

図を、UCSF キメラ視覚化スイート (バージョン 1.11) を使用して生成した。二量体界面エネルギー論を、Amber 10 : EHT 力場及び Born 溶媒和と共に位置エネルギーユーティリティを使用して、MOE (Chemical Computing Group ; バージョン 2017.05) において演算した。力場からのエネルギー値は、 kcal/mol で報告され、実際に結合する自由エネルギーを反映するようにスケールリングしていない。Connolly 表面間の相補性を、Sc アルゴリズムの実装を使用してランク付けし、これは $1.5 \text{ \AA}$ の表面の縁部内の表面を無視する (ワールドワイドウェブ-ccp4.ac.uk/newsletters/newsletter39/02_sc.html)。計算前に、結晶学的モデルを、Protonate 3D を使用してプロトン化し、水素置換を最適化した (MOE バージョン 2017.05)。UCSF キメラスイート (バージョン 1.11) 内の MatchMaker ユーティリティを使用し、示された構造の整列及び重畳された各残基の α 炭素を使用して、平均二乗偏差 (RMSD) を計算した。

【0269】

実施例 7 : Fz7-21 ペプチド誘導体

FZD 受容体は、骨成長から幹細胞活性に至る多様なプロセスにおいて、Wnt シグナル伝達を媒介する。しかし、本明細書で報告された結晶構造が発明されるまで、FZD 受容体の CRD による Wnt cis 不飽和脂肪アシル基の認識についての分子的基盤は、捉えられないままであった。この実施例は、C16 : 1 cis- $\Delta 9$ 不飽和脂肪酸に結合したヒト FZD5 CRD の最初の結晶構造を示す。予想外に、C24 脂肪酸に結合したヒト FZD7 CRD の結晶構造もまた得られた。両方の構造は、CRD の保存された新規二量体配置を共有する。脂質結合溝は、両方の単量体に及び、脂肪酸を収容する U 形幾何形状を採用する。マウス FZD8 CRD 構造は、FZD5 及び FZD7 CRD と同じアーキテクチャも共有することを明らかにする。この実施例は、複数の FZD 受容体

によってWnt cis-不飽和脂肪アシル基を認識するための一般機序を示し、特異的FZD受容体阻害剤の開発を助ける。

【0270】

この実施例の実験の初期目標は、アポhFZD7 CRDの結晶構造を決定することであった。hFZD7 CRD（残基Gln33～Gly168）が発現され、昆虫細胞中の可溶性分泌タンパク質として精製された。hFZD7 CRDのX線結晶構造は、分子置換によって解析され、2.20 Åの分離度に精密化された（表18を参照）。hFZD7 CRDは、結晶学的非対称単位を含む2つのプロトマー（鎖A及びB）の間のαらせん二量体界面を有する、ホモ二量体配置を採用した。予想外に、脂質結合空洞内の追加の電子密度が観察され、遊離脂肪酸分子（C24）の特徴に類似した伸長形状を示す。かかる脂肪酸は、恐らくは昆虫細胞発現宿主に源を発していた。観察された電子密度は、脂肪酸のカルボキシレート基が、1つの単量体中に存在するが（鎖A）、炭化水素鎖のメチル末端は、他の単量体中に存在することを示した（図29A、29B、29C、及び29D）。hFZD7 CRD二量体中の各単量体は、親油性溝を含有していた。2つの脂質結合溝は、二量体界面で遭遇し、連続する屈曲した（U形）空洞を形成する（図29B及び29C）。C24に結合したhFZD7 CRD二量体のほぼ厳密な非結晶学的対称（NCs）二重配置にもかかわらず、CRD二量体中の親油性溝の内部構造において重要な差異があり、これはC24脂肪酸の内因性非対称によって誘導される可能性がある（全118原子対にわたって0.847 Åの鎖A対鎖B r. m. s 偏差、図28A及び28Bを参照）。とりわけ、脂質結合溝の内面を覆う2つの重要な残基であるPhe138及びPhe140は、鎖AとBとの間に異なる側鎖回転体を採用し、それにより非対称脂肪酸を結合するための非対称トンネルを提示する（図28Bを参照）。追加として、脂肪酸は、U形脂質結合空洞内に主に埋め込まれるように思われ、C9～C13は、疎水性空洞の基部に位置付けられる（図29C及び28B）。

表18

10

20

	hFZD5 CRD+ BOG	hFZD5 CRD+ C16:1n-7	hFZD7 CRD+ C24脂肪酸	アポhFZD7 CRD
PDBコード	未決定	未決定	未決定	未決定
X線源	2012_09_19_ALS_502 (CRY11859)	2012_09_19_ALS_502 (CRY11964)	2015_01_21_SSRL_12 2 (CRY18651)	2015_01_21_SSRL_12 2 (CRY18650)
空間群	P3 ₁ 21	P3 ₁ 21	P2 ₁ 2 ₁ 2	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
単位細胞	a=b=123.1 Å, c=46.9 Å $\alpha = \beta = 90^\circ$, $\gamma = 120^\circ$	a=b=123.4 Å, c=46.9 Å $\alpha = \beta = 90^\circ$, $\gamma = 120^\circ$	a=97.6 Å, b=104.9 Å, c=41.4 Å $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$	a=39.1 Å, b=62.8 Å, c=103.2 Å $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$
分離度	2.20 Å	2.10 Å	2.20 Å	2.00 Å
反射の 総数	20901 (2055) ¹	24306 (2480) ¹	22293 (233) ¹	17922 (103) ¹
完全性 (%)	99.9 (99.8)	100 (100)	99.9 (99.9)	99.5 (97.1)
冗長性	10.8 (10.0)	10.9 (10.9)	6.6 (6.8)	6.4 (6.2)
I/σ	25.4 (3.2)	28.1 (3.9)	14.4 (3.7)	10.3 (2.6)
Rsym ²	0.104 (0.771)	0.085 (0.716)	0.134 (0.645)	0.084 (0.430)
分離度 範囲	50-2.20 Å	50-2.10 Å	50-2.20 Å	50-2.00 Å
Rcryst ³ /Rfre ⁴	0.180/0.224	0.171/0.205	0.163/0.210	0.199/0.252
非水素原子	2071	2152	2308	1926
水 分子	97	139	239	98
平均B、全体	58.1	47.9	31.64	40.09

10

20

30

40

平均二乗偏 差結合長	0.011 Å	0.009 Å	0.011 Å	0.006 Å
平均二乗偏 差角度	1.215°	1.194°	1.325°	0.994°
ラマチャン ドラン (C/A/G/D)	0.924/0.071/0.005/ 0	0.915/0.085/0/0	0.937/0.063/0/0	0.944/0.056/0/0

10

【0271】

異なる結晶化条件下、アポhFZD7 C RDの結晶構造も得られ、これはC24結合したhFZD7 C RDの構造において観察されたものと同様の二量体構成及び脂質結合溝幾何形状を示した。興味深いことに、hFZD7 C RDは今回、発現宿主から発生する任意の内因性脂肪酸の不在下で結晶化した。アポ及び脂質結合構造の両方が良好に重畳したが（全ての117原子対にわたって0.979 Åのr. m. s 偏差、図28Cを参照）、いくつかの重要な立体構造変化があり、これらは脂質結合構造中で明らかであった。例えば、Tyr87及びPhe138（図29D）などの疎水性空洞を覆う残基の側鎖配向が改変され、脂質結合空洞が、可撓性であり、可変鎖長の脂肪酸を収容し得ることを示唆する。これらの発見は、Wntタンパク質が13～16個の炭素鎖脂肪アシル基を組み込むことを示す、以前の生化学データと一致し、説明する。（Gao, X. & Hannoush, R. N. Single-cell imaging of Wnt palmitoylation by the acyltransferase porcupine. *Nat Chem Biol* 10, 61–68 (2014)。最後に、C24のカルボキシレート基が、Tyr76への、水分子によって媒介された水素結合によって係留されたことは特筆に値する（図29D）。FZDファミリーメンバーにわたるTyr76の高度の配列保存を考慮して、この相互作用は、FZD受容体による遊離脂肪酸の認識のための、潜在的分子機序を強調する。Tyr76がまた、細胞外FZD様CRDを含有し（Sharpe, H. J., Wang, W., Hannoush, R. N. & de Sauvage, F. J. Regulation of the oncoprotein Smoothed by small molecules. *Nat Chem Biol* 11, 246–55 (2015)、20 (S)–ヒドロキシコレステロールのヒドロキシル基との有極接点を形成する（Huang, P. et al. Cellular Cholesterol Directly Activates Smoothed in Hedgehog Signaling. *Cell* 166, 1176–1187. e14 (2016)、平滑化（SMO）ヘッジホッグ経路受容体内に保存されることも記録に値する。注目すべきことには、後者の分子は、遊離脂肪酸がFZD7 C RD構造内で結合し得る同じ位置でSMOの疎水性溝内で結合した（図30A）。

20

30

40

【0272】

hFZD7 C RD：C24複合体構造、特に二量体界面の周りの脂質結合溝のU形幾何形状及び脂肪酸のその非対称認識における上記の予想外の観察は、他のFZD C RDが、Wntタンパク質上に存在する生理学的に関連した脂質であるC16:1 cis-Δ9不飽和脂肪酸（C16:1 n-7）にどのように結合するかのもっとの検討を促進した。FZD5 C RD、または不飽和脂肪酸と複合した任意の他のFZD C RDに関する構造は報告されていない。FZD5 C RDは、FZD7及びFZD8 C RDに対する進化的近位性を呈する（図7）。したがって、hFZD5 C RD（残基Ala27～Ala155）は、昆虫細胞中の可溶性分泌タンパク質として発現され、ほぼ均質まで精製

50

された。h F Z D 5 C R Dを、C 1 6 : 1 n - 7 脂肪酸と複合して供結晶化した。複合体の得られたX線結晶構造は、分子置換によって解析され、2. 1 0 Åの分離度に精密化された(表18を参照)。結晶学的非対称単位は、h F Z D 5 C R Dの2つの単量体からなっていた(図31)。

【0273】

h F Z D 5 C R D構造及び結晶学対称合致の検査は、アポh F Z D 7 C R D及びC 2 4に結合したh F Z D 7 C R Dの構造において観察されたものと同様である、追加のタンパク質-タンパク質界面(鎖Aホモ二量体)を明らかにした(図32A及び32B)ならびに図31)。2つの脂質結合溝があり、各々が1つの単量体から発生し、h F Z D 7 C R D二量体構造において観察されたものと同様の、連続したU形空洞を形成した。結合したC 1 6 : 1 n - 7 脂肪酸を、2倍軸上のその特別な位置に起因して、その構造において50%占有率で精密化され、これは疎水性空洞内での100%占有率に相当する。脂肪酸は、脂質結合溝内でいずれかの方向に結合し得、カルボキシレート頭部基は、T r p 4 6及びG l n 4 4残基の近位に位置付けられる(図32C)。注目すべきことに、炭化水素鎖内の「よじれた」c i s - Δ 9不飽和部位(C 9 ~ C 1 0)は、残基I l e 5 1及びT r y 9 8付近のU形脂質結合空洞の基部に位置していた(それぞれh F Z D 7 C R D内のV a l 9 2及びP h e 1 3 8)(図32C)。したがって、本明細書に開示されたC 1 6 : 1 n - 7と複合したh F Z D 5 C R Dの結晶構造は、脂質結合空洞の幾何形状の先例のない原子分離度図、及び遊離不飽和脂肪酸をどのように収容するかを明らかにし、潜在的に、W n tタンパク質上のc i s - 不飽和脂肪アシルに対するF Z D受容体C R Dの選好的結合を説明する。

【0274】

最後に、アポh F Z D 5 C R Dの結晶構造を決定する実験を行った。しかしながら、この場合、h F Z D 5 C R Dは、最適な結晶化緩衝液中に存在するn - オクタールβ - D - グルコシド(B O G)の存在下で結晶化した(2. 2 Å分離度)。興味深いことに、B O Gリガンドは、50%占有率でh F Z D 5 C R Dの疎水性空洞内で結合した(図34A、34B、34C、及び34D、ならびに表18)。全体として、B O Gが結合したh F Z D 5 C R D構造は、らせん-らせん二量体界面、U形脂質結合空洞、及び疎水性空洞内のリガンドの位置付けに関して、C 1 6 : 1 n - 7と複合したF Z D 5 C R D(119残基にわたって0. 134のr. m. s偏差、図34A、34B、34C、及び34D)ならびにC 2 4と複合したF Z D 7 C R Dと非常に類似していた。

【0275】

アポh F Z D 7、h F Z D 7 C R D : C 2 4、h F Z D 5 C R D : C 1 6 : 1 n - 7、及びh F Z D 5 C R D : B O Gの間の構造的類似性、特に二量体構成及び脂質結合溝アーキテクチャ、m F Z D 8 C R Dの公開された結晶学的データに基づいて、最も進化的に保存されたF Z D C R Dを再検討した(P D B I D # 1 I J Y)(D a n n, C. E. et al. Insights into Wnt binding and signalling from the structures of two Frizzled cysteine-rich domains. Nature 412, 86-90(2001)(図7)。対称合致分析は、F Z D 7及びF Z D 5 C R Dの両方と同一の二量体構成を示した(図35A、35B、35C、及び35D)。D a n nらは、分泌f r i z z l e d関連タンパク質3(s F R P 3)に対するその類似性、及び二量体界面を媒介したループ-ループ領域間のその好ましい相補性スコアに基づいて、非対称単位を割り当てた(D a n n, C. E. et al. Insights into Wnt binding and signalling from the structures of two Frizzled cysteine-rich domains. Nature 412, 86-90(2001)。発表時には、W n tのc i s - 不飽和脂肪アシル化状態も、F Z D C R Dへのその脂肪酸媒介型結合も知られておらず(J a n d a, C. Y., W a g h r a y, D., L e v i n, A. M., T h o m a s, C. & G a r c i a, K. C. Structural Basis of Wnt

Recognition by Frizzled. Science 337, 59–64 (2012)、Takada, R. et al. Monounsaturated Fatty Acid Modification of Wnt Protein: Its Role in Wnt Secretion. Developmental Cell 11, 791–801 (2006)、U形脂質結合空洞についての手がかりを提供しない。エネルギー及び相補性スコアに基づいて、本明細書で開示されたインシリコ分析は (Lawrence, M. C. & Colman, P. M. Shape complementarity at protein/protein interfaces. J. Mol. Biol. 234, 946–950 (1993))、らせん-らせん (FZD 7 様) 二量体界面を、mFZD8 CRD 二量体内の潜在的生物学的界面として支持する (図 36A、36B、36C、36D、36E、36F、36G、及び 36H)。計算的に、ループ-ループ及びらせん-らせん二量体界面の両方は、それらの相補性スコアにおいて同様であるが、らせん-らせん二量体界面は、hFZD7 及び mFZD8 CRD の両方のループ-ループ界面と比較して、エネルギー的により好ましい (図 36A、36B、36C、36D、36E、36F、36G、及び 36H)。

【0276】

いくつかの証拠は、U形脂質結合溝を有するらせん-らせん二量体界面構成が、以下の観察に基づいて、生物学的単位である可能性があるという考えを支持する：(a) 脂肪酸の結合モードが、2つの異なる FZD CRD 構造 (FZD5 及び 7) 間で一致し、異なる条件下で独立して結晶化し、炭化水素脂肪アシル鎖が、両方の FZD CRD 単量体上の2つの脂質結合溝に同時に及ぶことを明らかにし、1つの単量体上にカルボン酸端部、及び他方の単量体上に炭化水素鎖のメチル端部がある。(b) FZD7 及び 8 ファミリーメンバーにわたるらせん二量体界面の保存 (図 37A 及び 37B)、ならびに (c) 本研究において示される複数の FZD ファミリーメンバーにわたる「よじれた」疎水性空洞の構造的類似性及び保存 (図 35D)。追加の研究が、観察された二量体幾何形状の機能的関連、ならびにインビトロ及びインビボ両方の脂質結合空洞の調節を探究するために必要である。それにもかかわらず、本明細書で開示された構造研究は、単一脂肪酸によって占有される連続した疎水性脂質結合空洞に対する強制的支持を提供する。

【0277】

本研究において提示された構造データに基づいて、FZD CRD との Wnt 相互作用についての分子モデルが提案される。Wnt 脂肪アシル基は、FZD CRD の U 形脂質結合空洞を占有し、「よじれた」cis- $\Delta 9$ 不飽和部位は、空洞の基部に位置付けられる (図 35E 及び 図 38A、38B、及び 38C)。本研究において報告された hFZD5 CRD の、XWnt8 に結合した公開済みの mFZD8 CRD 構造との重畳は (Janda, C. Y., Waghray, D., Levin, A. M., Thomas, C. & Garcia, K. C. Structural Basis of Wnt Recognition by Frizzled. Science 337, 59–64 (2012))、単一の XWnt8 から発生する cis-不飽和脂肪アシル鎖が、両方の脂質結合空洞を同時に占有し得、それにより hFZD5 CRD 二量体界面を架橋することを示す (図 38A、38B、及び 38C)。同じことは、FZD7 及び FZD8 CRD 二量体についても真であり、それにより Wnt-FZD CRD 相互作用について 1:2 の化学量論を示す。これは、XWnt8 に結合した公開済みの mFZD8 CRD 構造で描かれる 1:1 の化学量論とはかなり異なる (Janda, C. Y., Waghray, D., Levin, A. M., Thomas, C. & Garcia, K. C. Structural Basis of Wnt Recognition by Frizzled. Science 337, 59–64 (2012))。この後者の場合において、脂質結合溝は、溶媒曝露配向であり (これは好ましくない)、16 炭素脂肪アシル鎖を完全に埋め込まない (Janda, C. Y., Waghray, D., Levin, A. M., Thomas, C. & Garcia, K. C. Structural Basis of Wnt Recognition by Frizzled. Science 337

、59-64(2012)) (図38A、38B、及び38C)。Fc断片を含有していた本研究で使用されるXWnt8-mFZD8 CRD融合構築体は、好ましいFZD CRD二量体形成を有しない場合があると考えられ、それにより観察された矛盾についての説明を提供する。また、著者が、存在した脂質がパルミトレイン酸であったか、または飽和パルミチン酸であったかを明白に決定できなかったことに注目することは興味深い。実際に、XWnt8-mFZD8 CRD構造においてモデル化された脂肪アシル鎖は、驚くべきことに、分離度は低い、一不飽和脂肪酸から予想するように、よじれているのではなく直鎖状であり(図38A)、そうであるなら、かかる脂質の存在は、FZD CRD二量体化を排除するであろう。それにもかかわらず、本明細書で提案されたWnt-FZD CRD 1:2化学量論は、Wntタンパク質が、その不飽和脂肪アシル基を通して、FZD CRD二量体化の促進を助け得ることを示唆し、それにより細胞表面でのFZD受容体クラスタリングを強化し、後の下流シグナロソームアセンブリを促進する(Bienzen, M. Signalosome assembly by domains undergoing dynamic head-to-tail polymerization. Trends Biochem Sci 39, 487-95 (2014))。

【0278】

結論として、遊離脂肪酸と複合した2つのFZD CRD (FZD5及びFZD7)の最初の結晶構造が本明細書で報告され、不飽和脂肪酸がどのようにFZD CRDと相互作用し得るかについての長く探求されてきた構造的根拠を提供する。これらの研究は、脂質結合溝が可撓性であり、両方のCRD単量体に同時に結合する単一の脂肪酸を収容することを明らかにする。以前に公開された構造を再検討した際に(Dann, C. E. et al. Insights into Wnt binding and signaling from the structures of two Frizzled cysteine-rich domains. Nature 412, 86-90 (2001))、mFZD8 CRDはまた、本明細書で報告されたhFZD7及びhFZD5 CRDと同様の、 α らせん二量体界面及び連続したU形脂質結合空洞を含めた構造特徴を共有することが見いだされ、結果としてその構造内の二量体の解釈に立ち戻った。合わせて、本実施例で提供された実験的データは、cis-不飽和脂肪酸の認識のための複数のFZD CRDの一般機序を示唆し、Wntがfrizzled受容体とどのように相互作用し、cis-不飽和脂肪アシル基を介したその二量体化を促進し得るかについての分子像を提供する。最後に、本明細書における発見は、新たに発見された二量体界面、ならびに脂質結合溝構成及びその可撓性を利用することによって、特異的FZD CRD受容体サブクラスを標的とするための薬理学的戦略の開発を促進し得る。

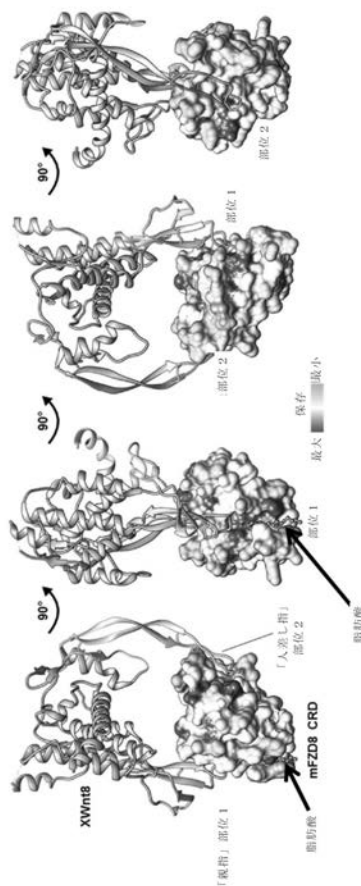
【0279】

成体腸上皮の再生は、陰窩の基部に位置する、ロイシンリッチ反復を含有するGタンパク質共役受容体5 (Lgr5)を発現する、環化幹細胞のプールによって媒介される。10の哺乳動物frizzled (FZD)受容体の中で、FZD7は、Lgr5+腸幹細胞内で富化され、それらの自己再生において重要な役割を果たす。最近の研究は、FZD7が、幹細胞不全に関連した疾患に対する潜在的な薬理学的標的であり得ることを示唆するが、選択的FZD阻害についてのアプローチ及び構造基盤は、依然として十分に定義されないままである。FZDは、FZDシステインリッチドメイン(CRD)内に位置する脂質結合溝を介して、それらの脂肪アシル基に部分的に結合することによって、Wntタンパク質と相互作用する。ここで、FZD7 CRDに結合し、その脂質結合溝のアーキテクチャを改変する高度に有力な選択的ペプチドを特定する。FZD7結合ペプチドでの処理は、Wntシグナル伝達を障害し、主に腸オルガノイドの幹細胞区画において発現される遺伝子を下方調節した。本明細書におけるデータに従い、脂質溝結合機序は、アイソフォーム選択的FZD阻害の基礎として役立ち、腸幹細胞内のFZD7 CRD脂質結合溝幾何形状に対する役割を果たす。

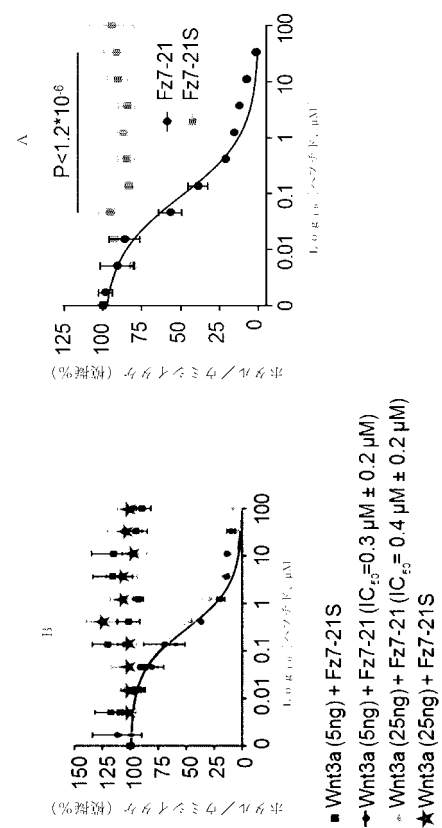
【0280】

前述の実施例は、例示目的のためのみに提供されており、決して、本発明の範囲を限定するようには意図されていない。本明細書に示され、かつ記載される修正に加えて、本発明の様々な修正が前述の記述から当業者に明らかになり、添付の特許請求の範囲内に含まれる。

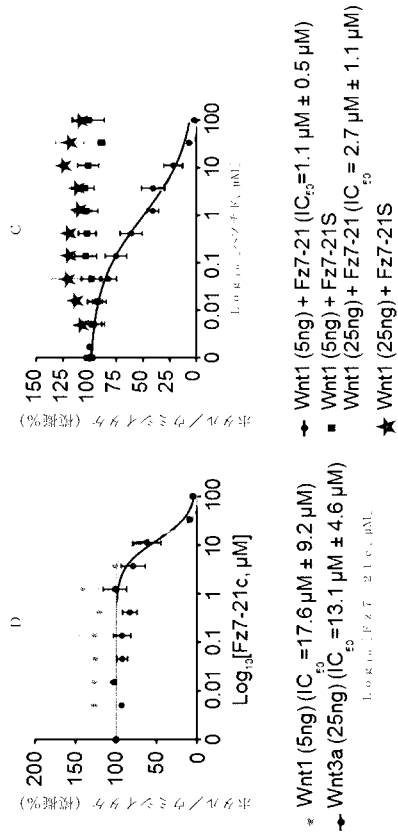
【図 1】



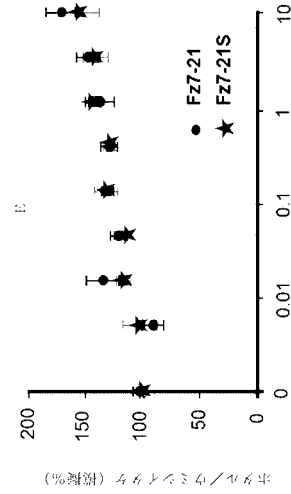
【図 2 - 1】



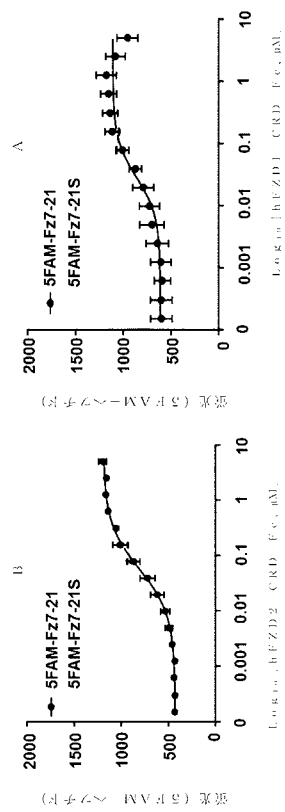
【図 2 - 2】



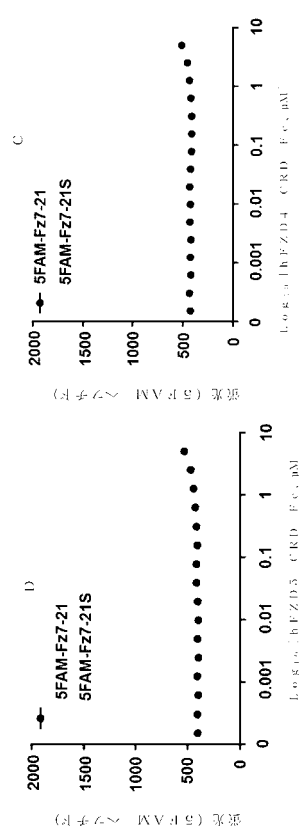
【図 2 - 3】



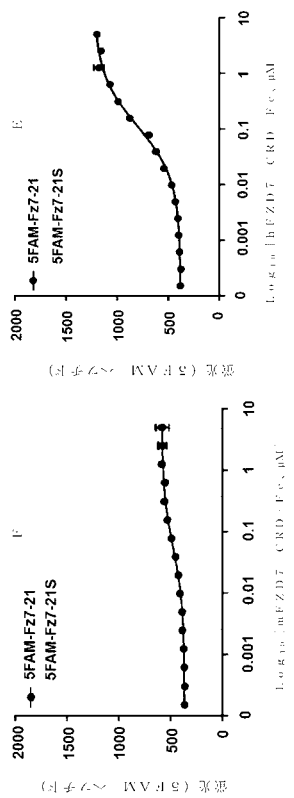
【図 3 - 1】



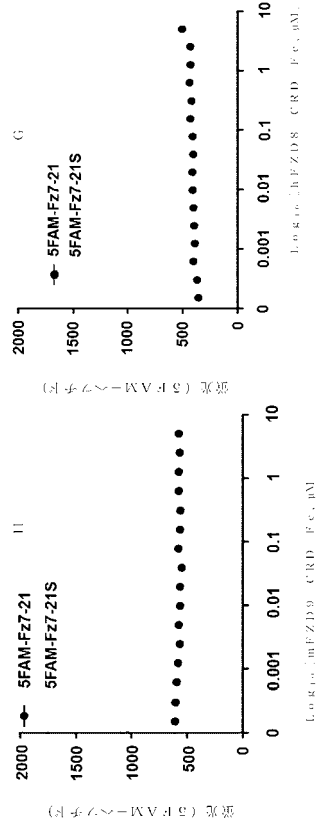
【図 3 - 2】



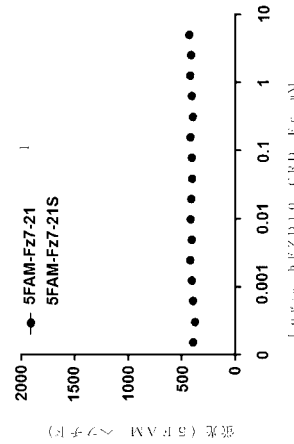
【図 3 - 3】



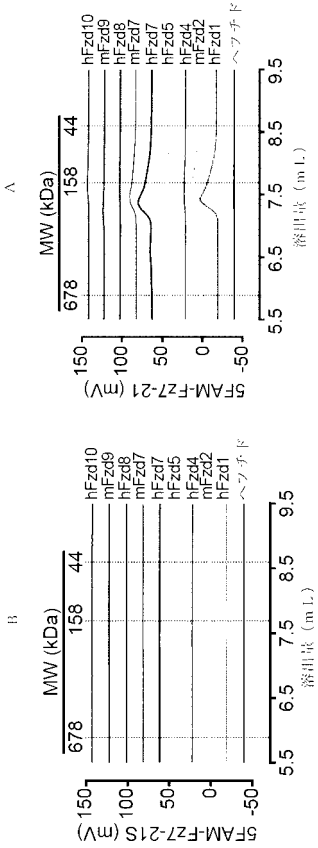
【図 3 - 4】



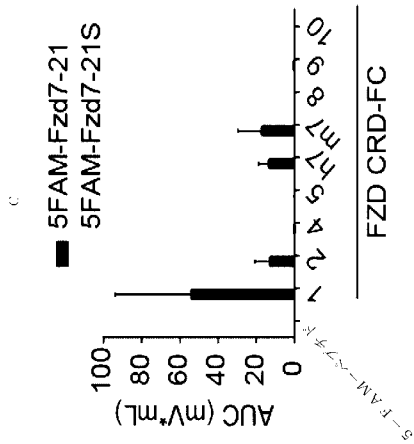
【図 3 - 5】



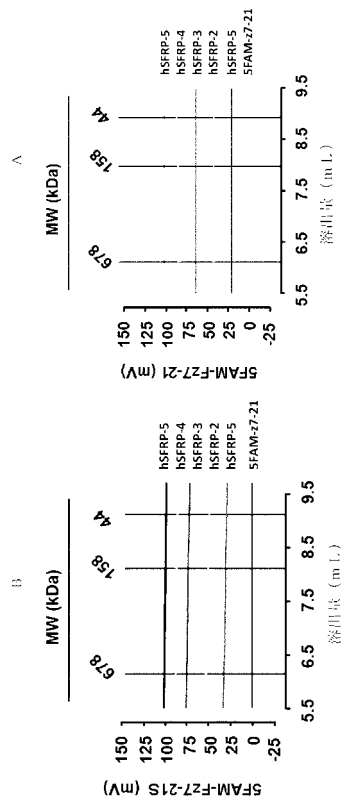
【図 4 - 1】



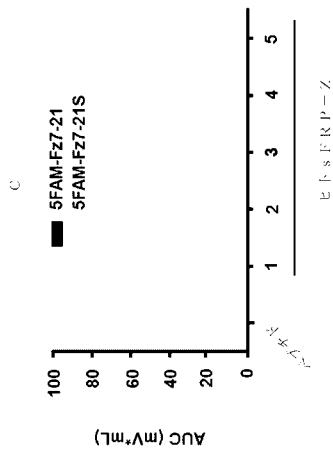
【図 4 - 2】



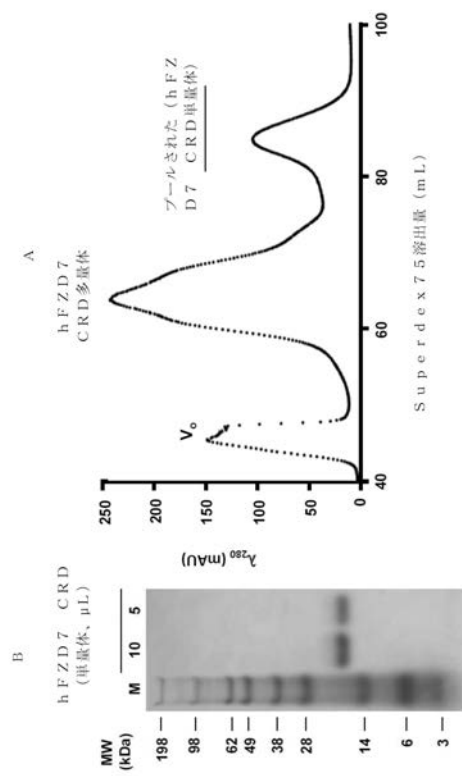
【図 5 - 1】



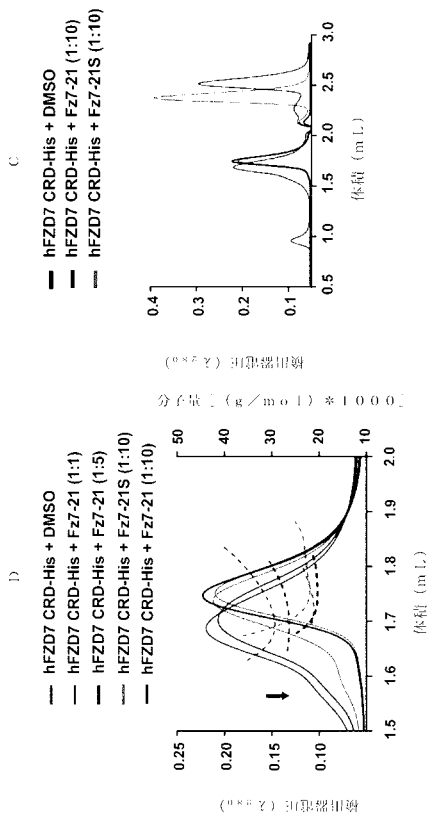
【図 5 - 2】



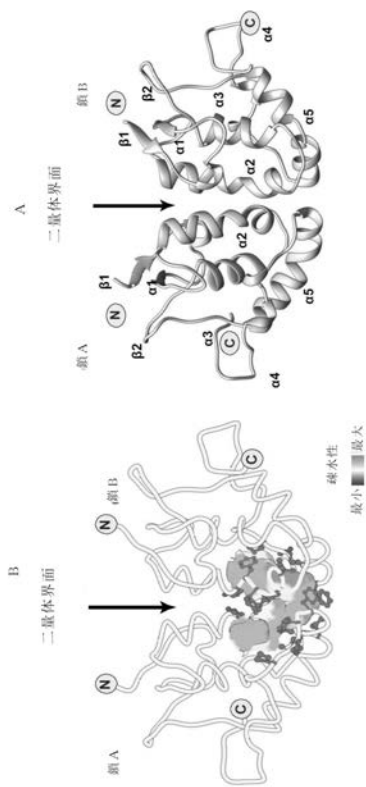
【図 6 - 1】



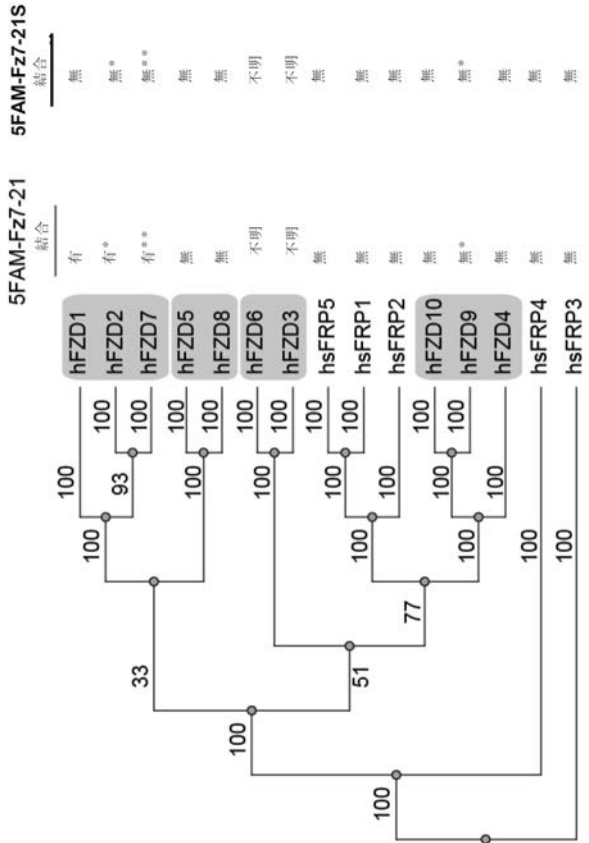
【図 6 - 2】



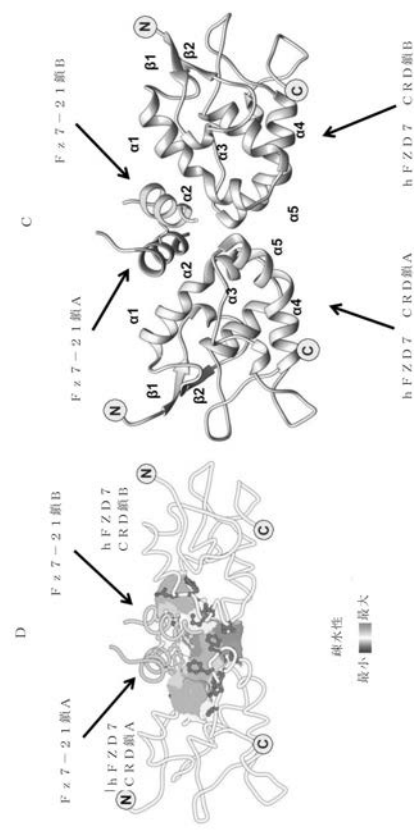
【図 8 - 1】



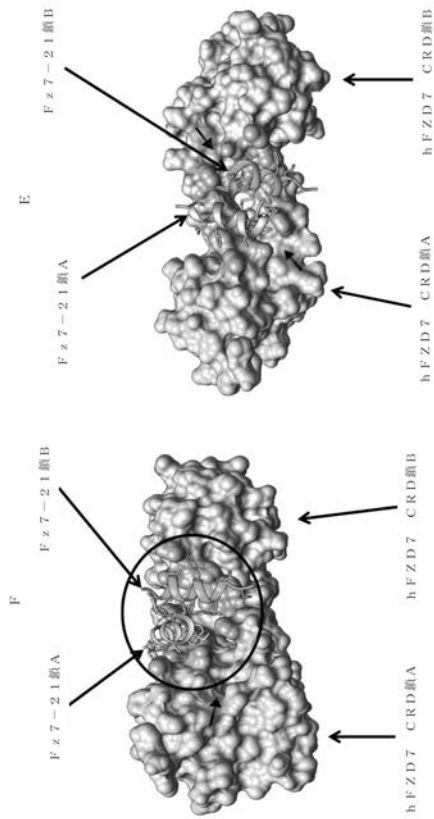
【図 7】



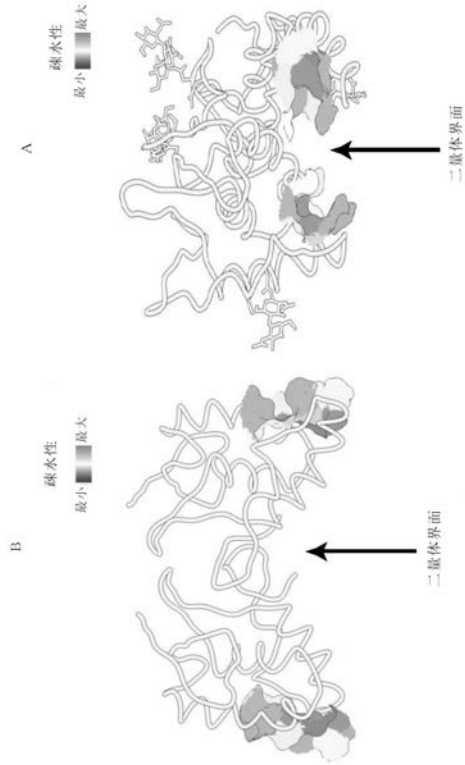
【図 8 - 2】



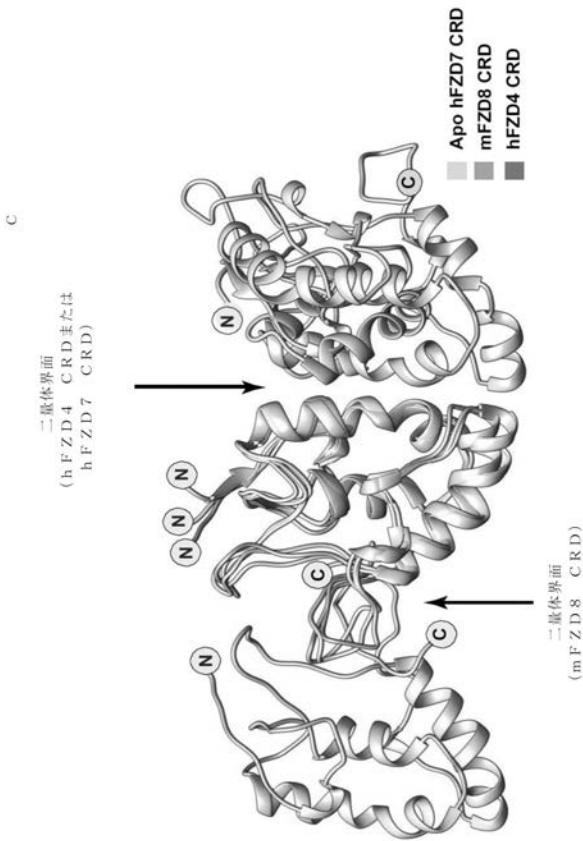
【図 8 - 3】



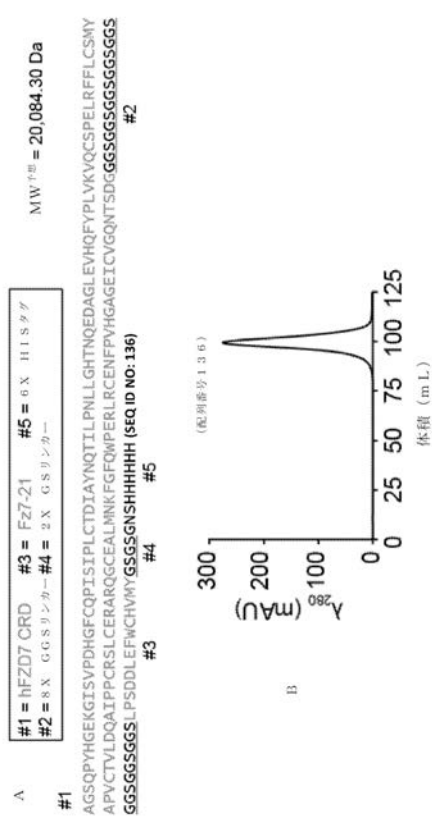
【図 9 - 1】



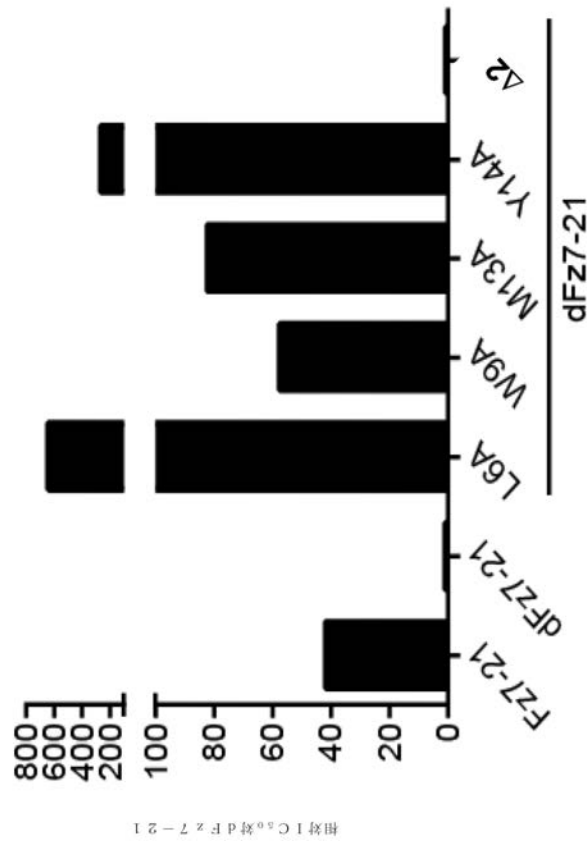
【図 9 - 2】



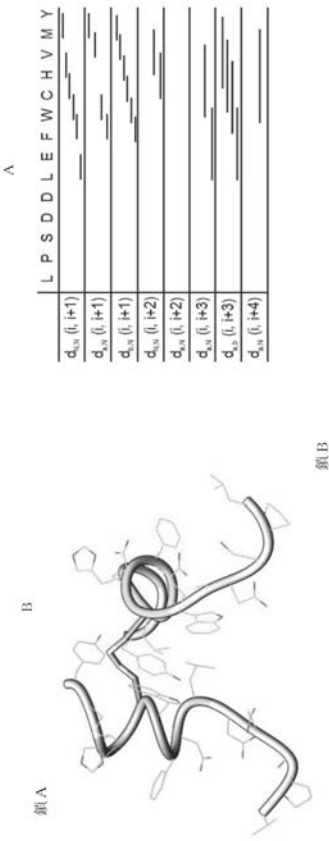
【図 10】



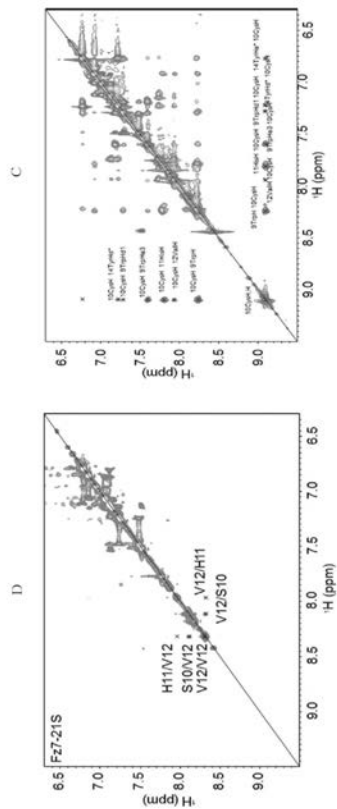
【図 1 5】



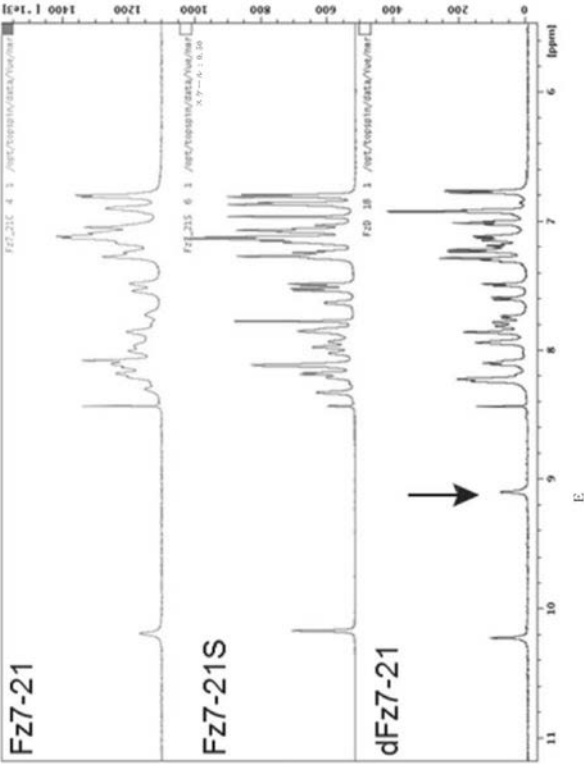
【図 1 6 - 1】



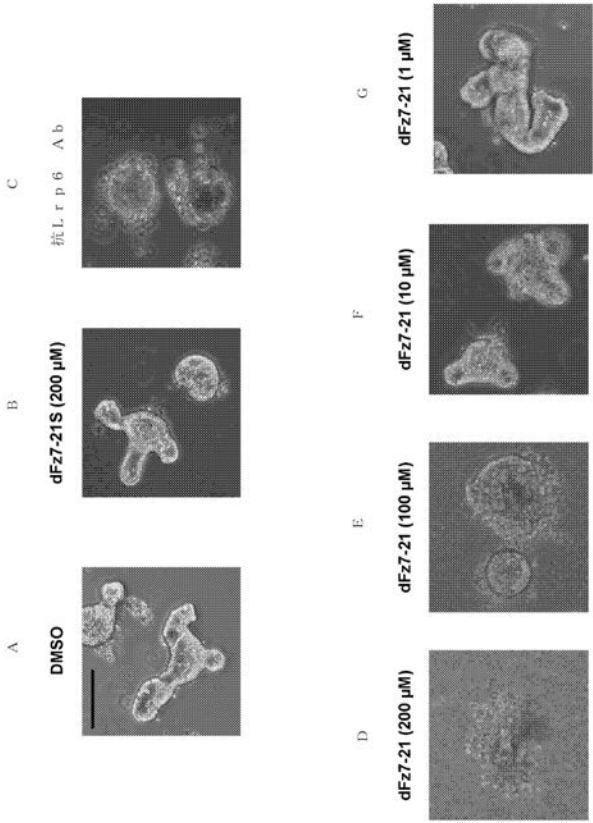
【図 1 6 - 2】



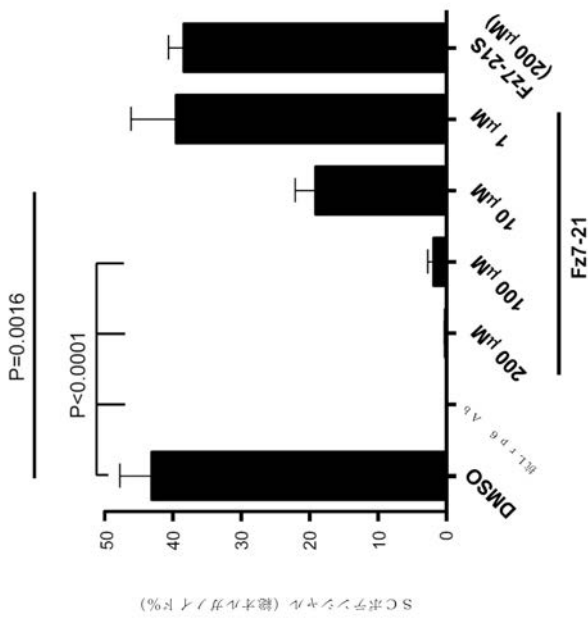
【図 1 6 - 3】



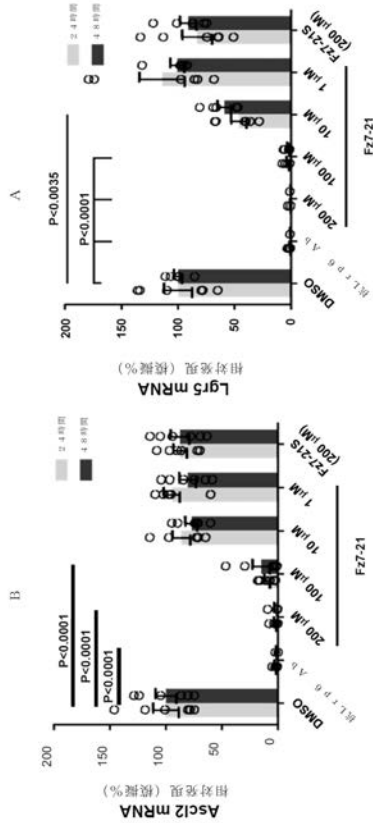
【図 17】



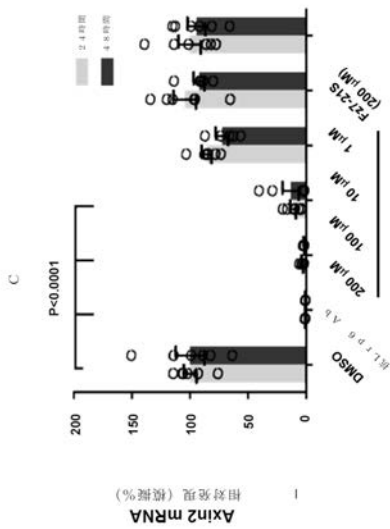
【図 18】



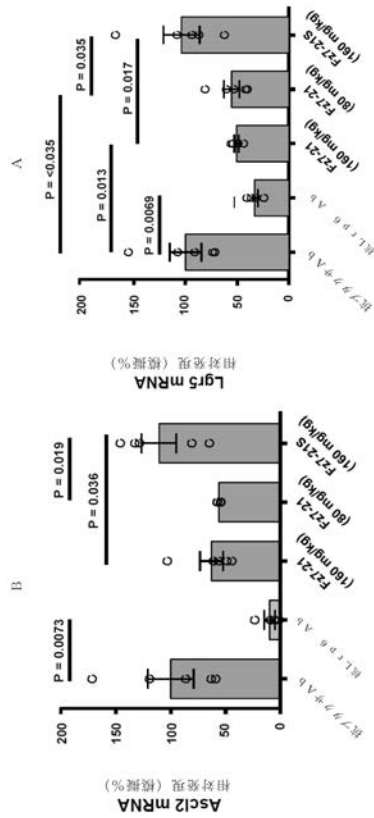
【図 19 - 1】



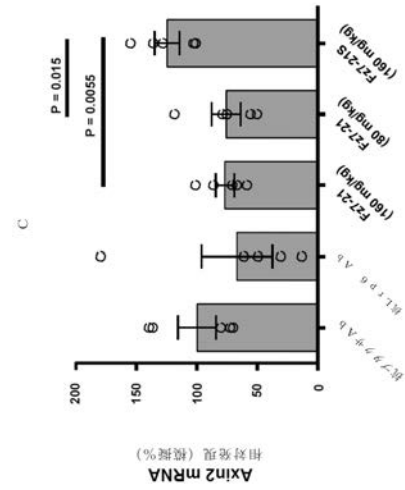
【図 19 - 2】



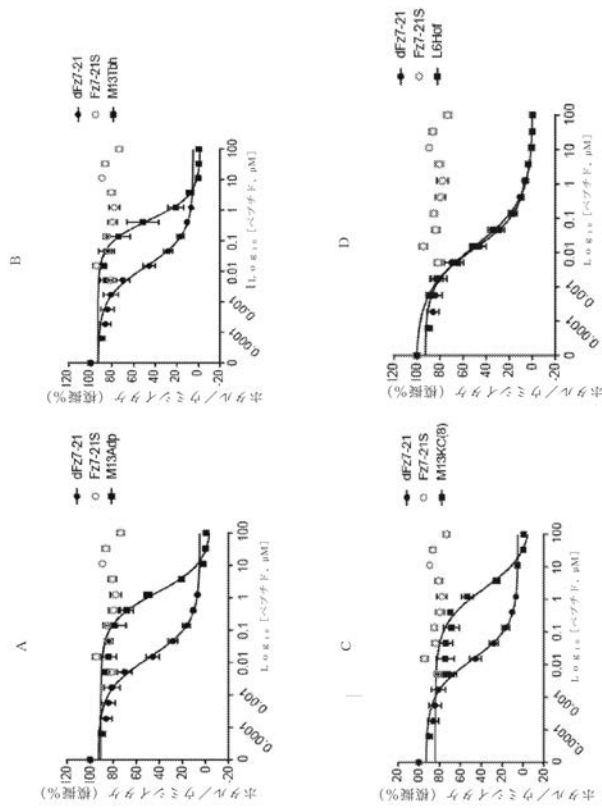
【図 20-1】



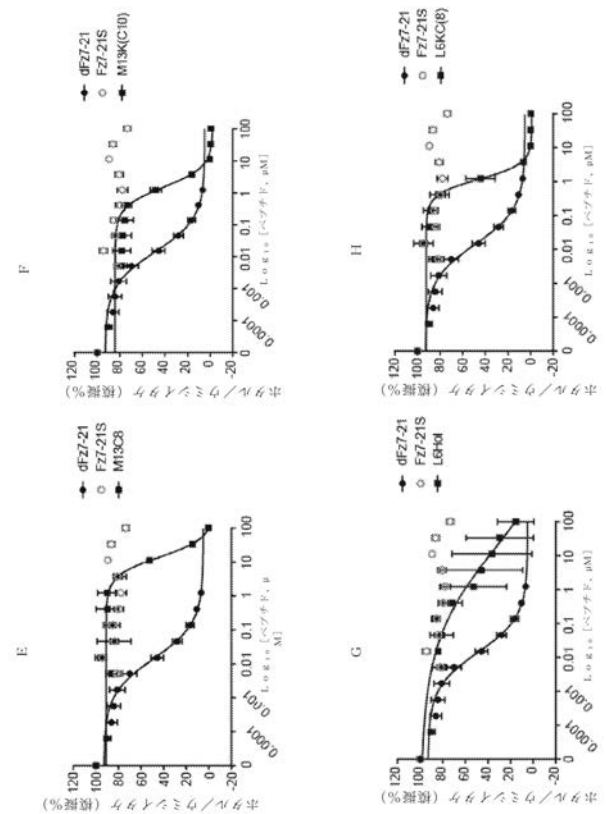
【図 20-2】



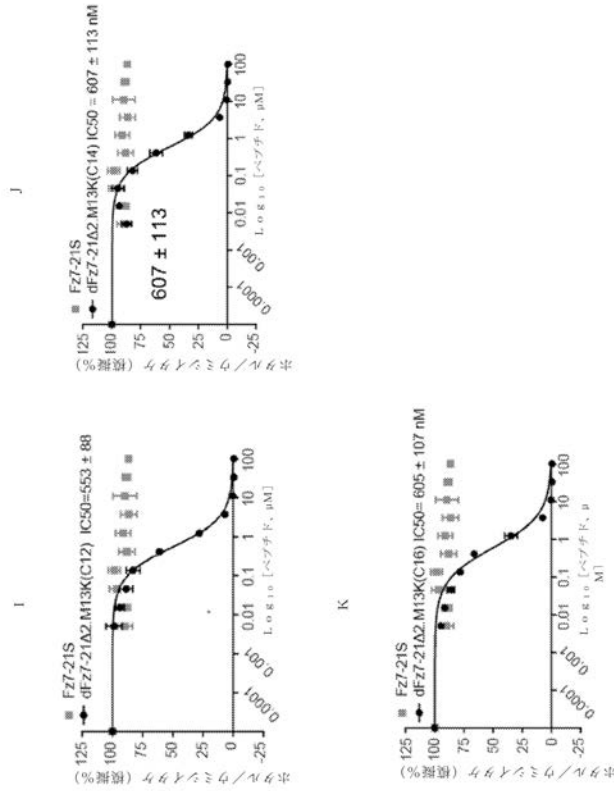
【図 21-1】



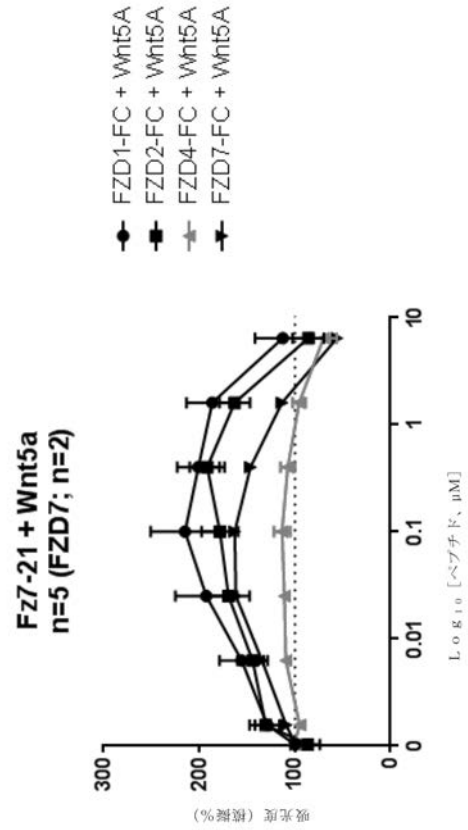
【図 21-2】



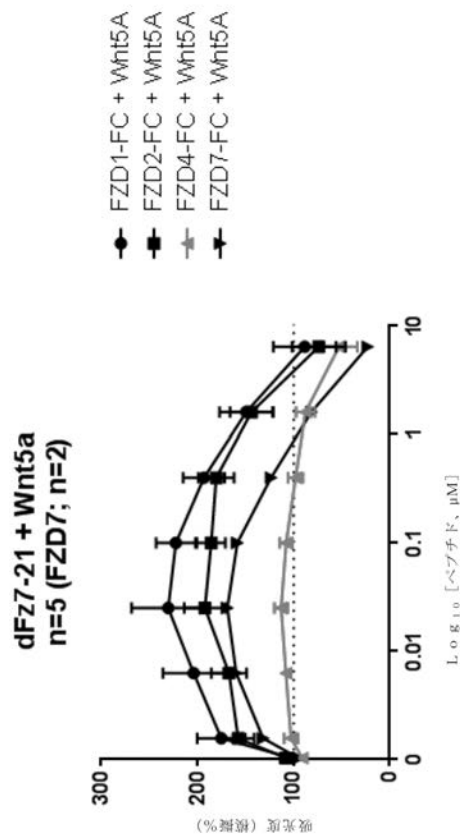
【図 2 1 - 3】



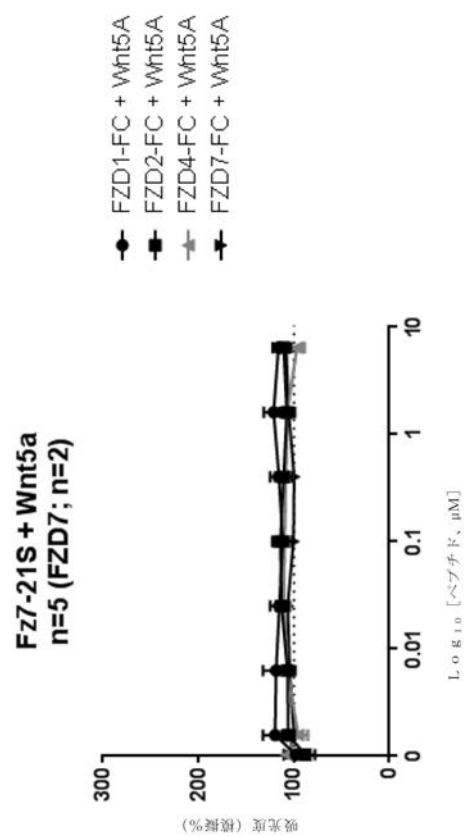
【図 2 2 A】



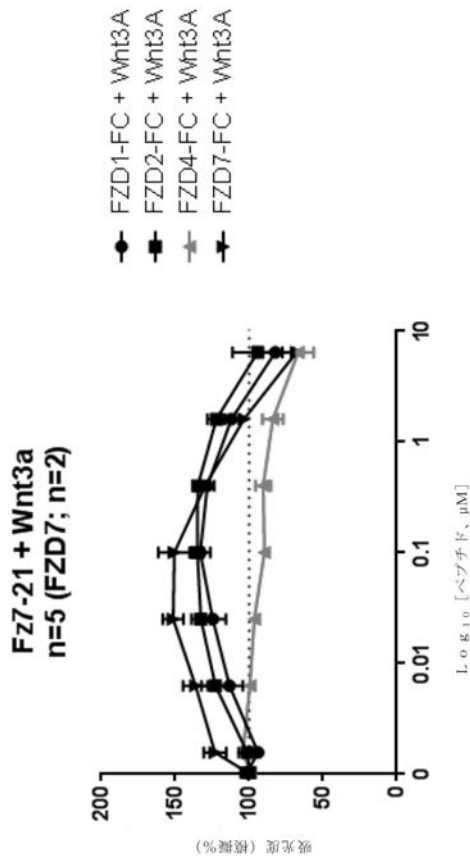
【図 2 2 B】



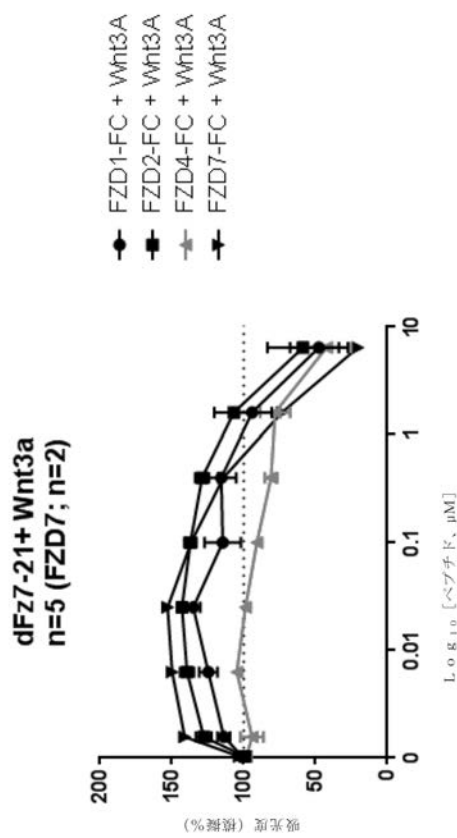
【図 2 2 C】



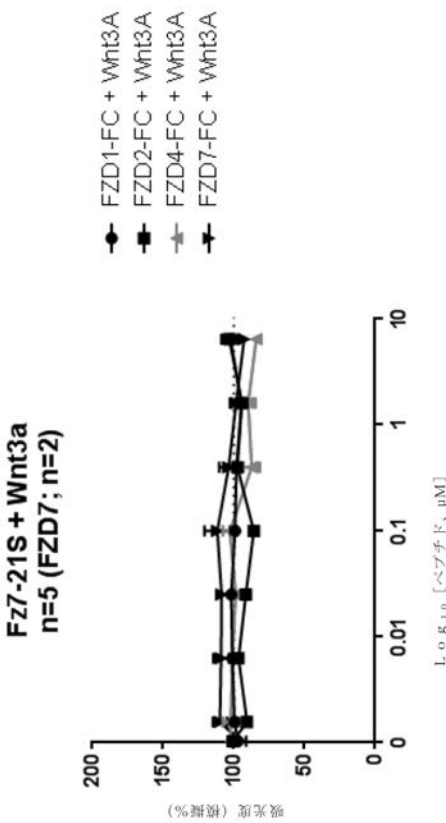
【図 2 2 D】



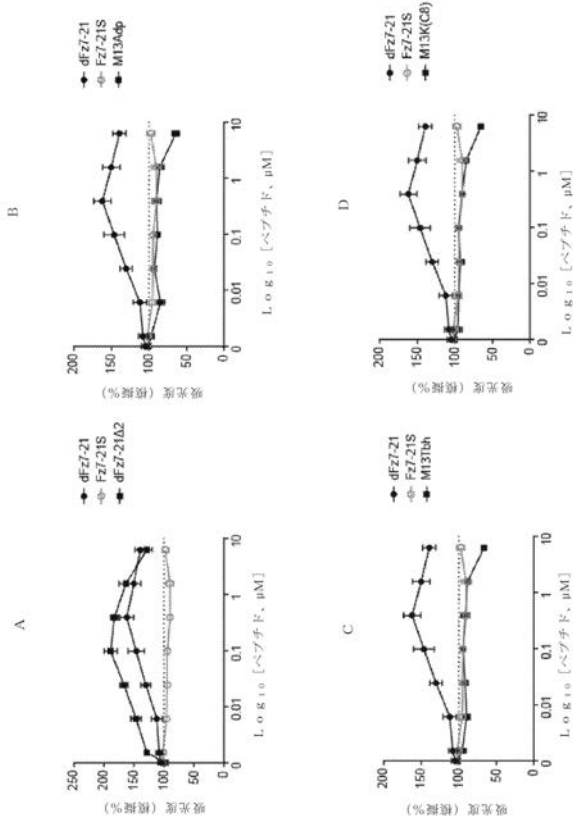
【図 2 2 E】



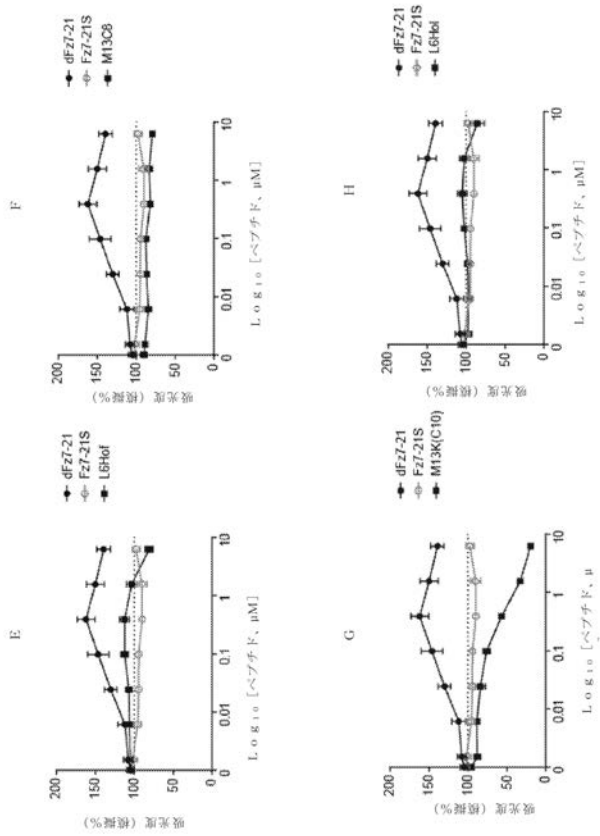
【図 2 2 F】



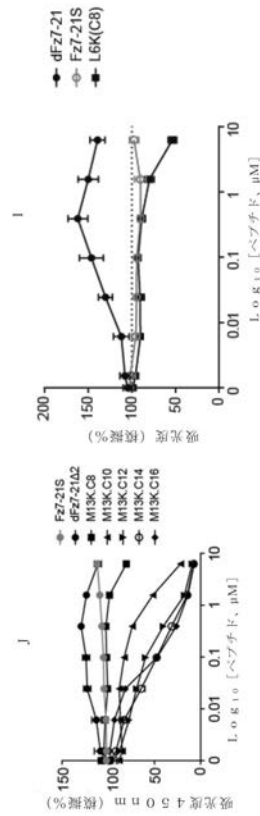
【図 2 3 - 1】



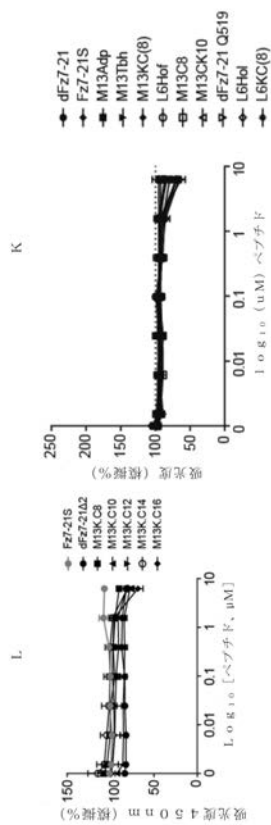
【図 23-2】



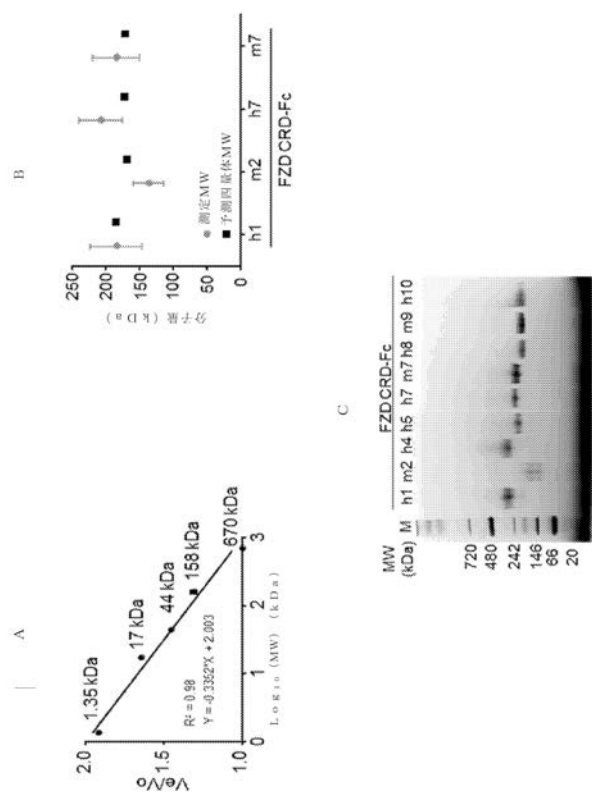
【図 23-3】



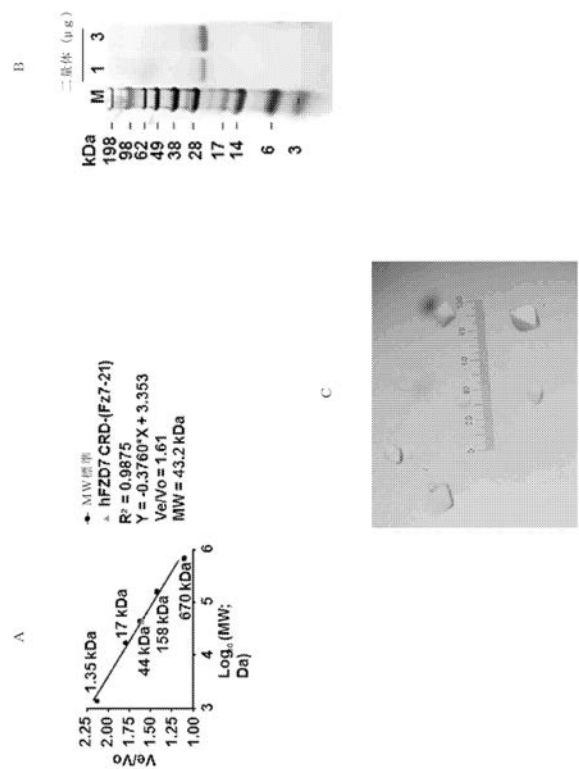
【図 23-4】



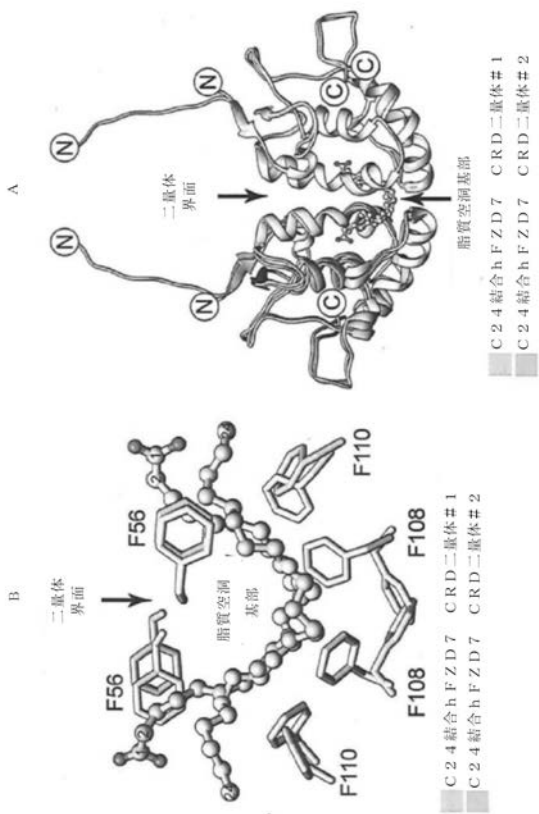
【図 24】



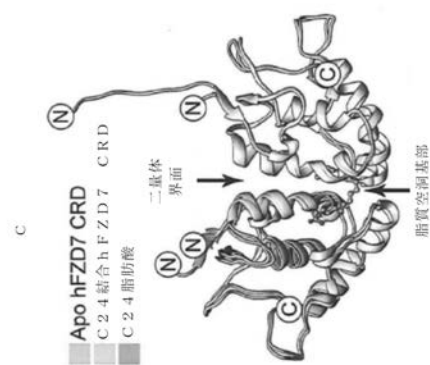
【図 27】



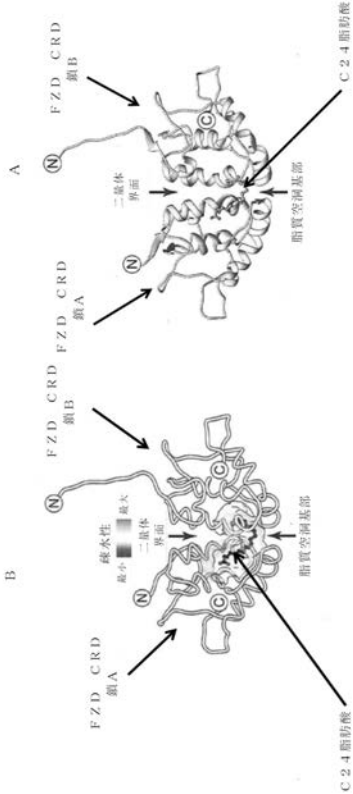
【図 28 - 1】



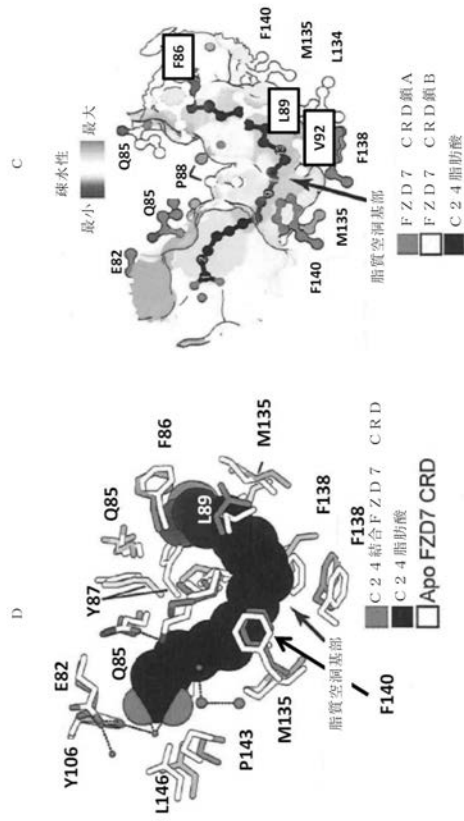
【図 28 - 2】



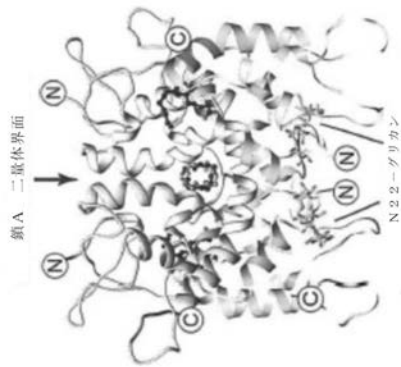
【図 29 - 1】



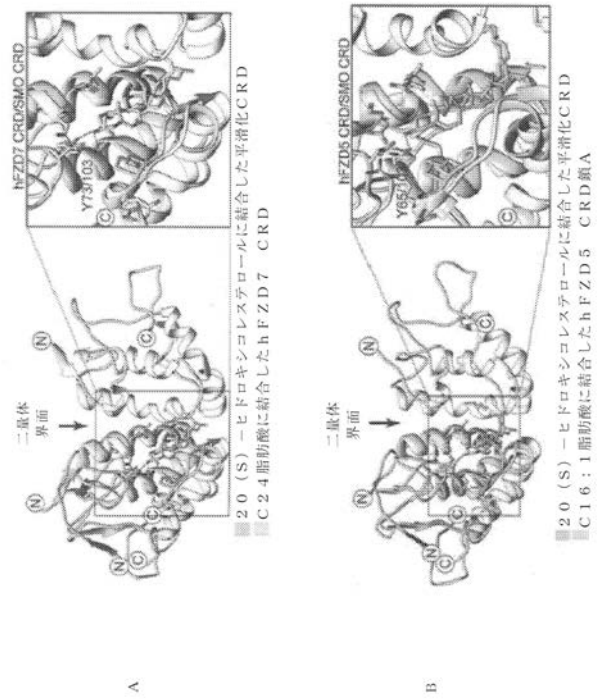
【图 2 9 - 2】



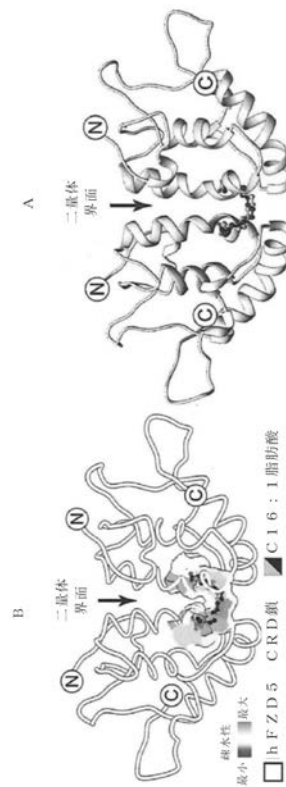
【図 3 1】



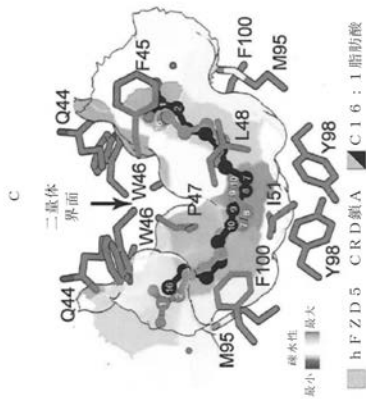
【 図 3 0 】



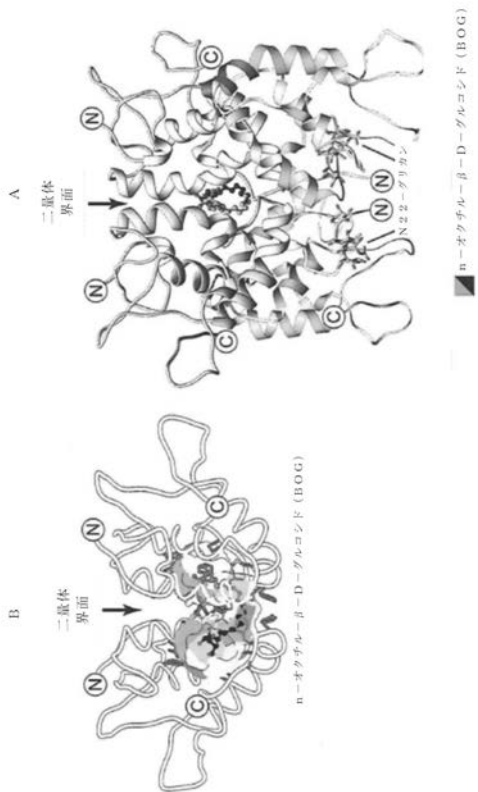
【图 3 2-1】



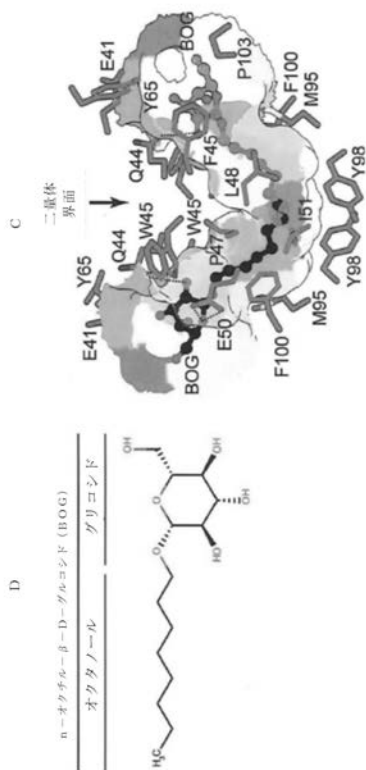
【図 3 2 - 2】



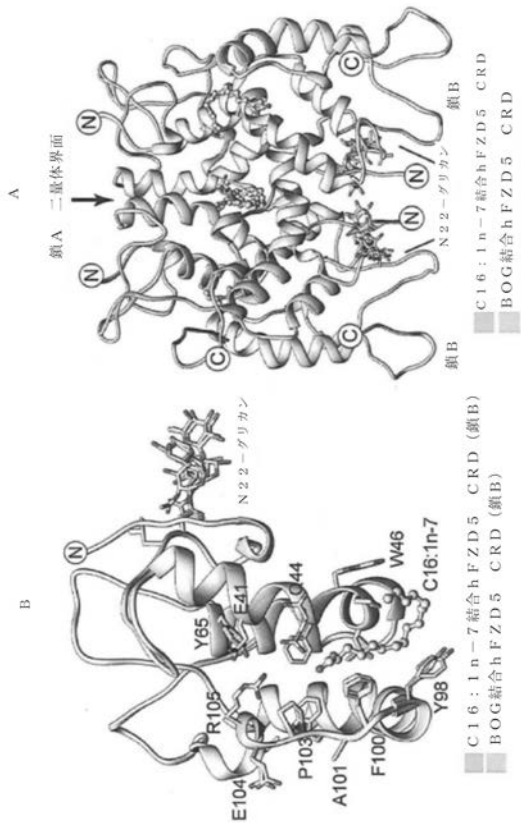
【図 3 3 - 1】



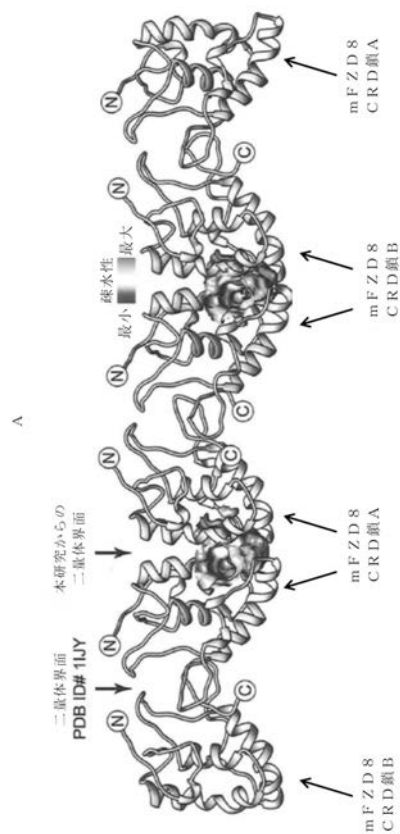
【図 3 3 - 2】



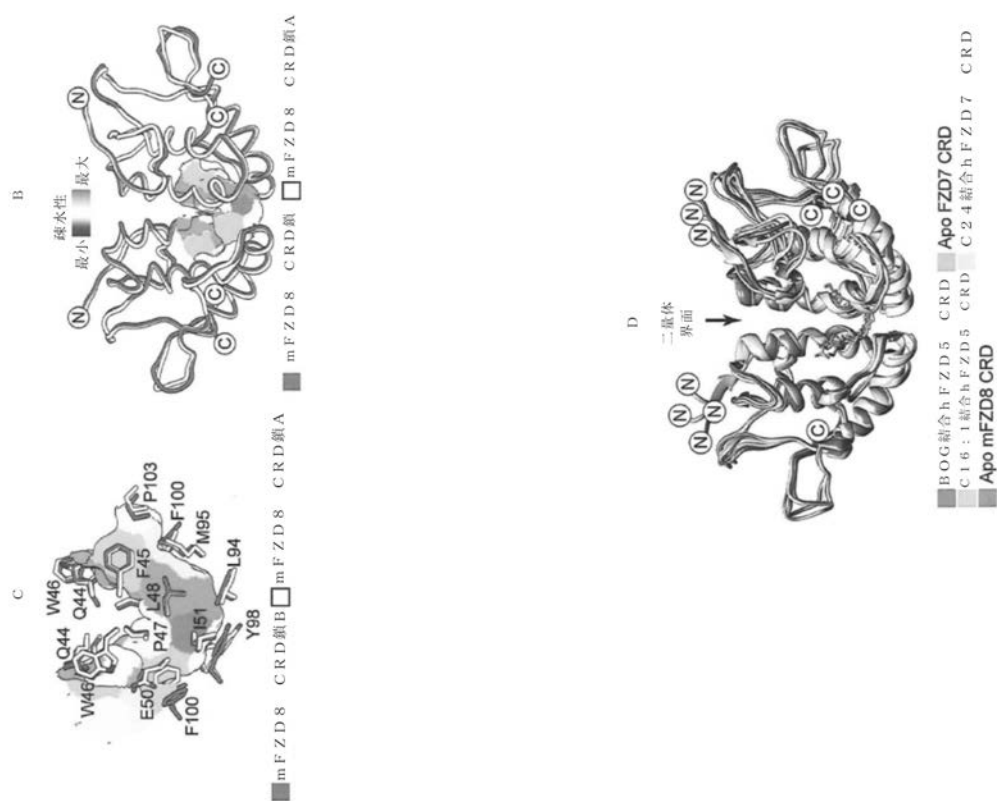
【図 3 4 - 1】



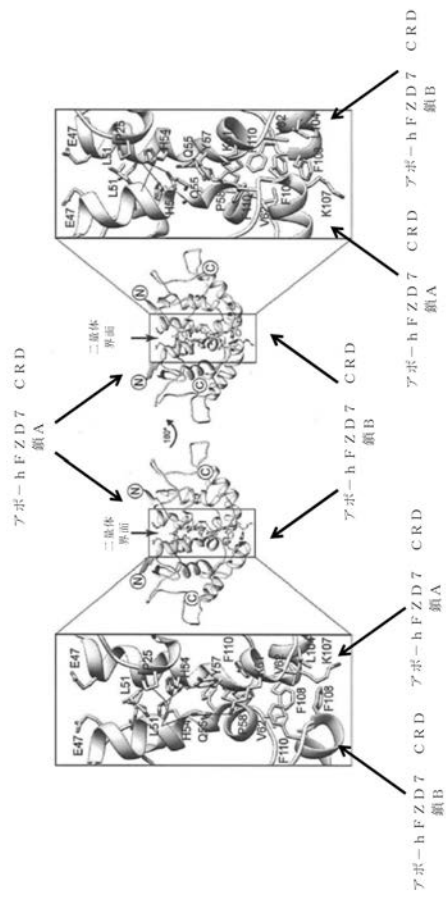
【図 3 5 - 1】



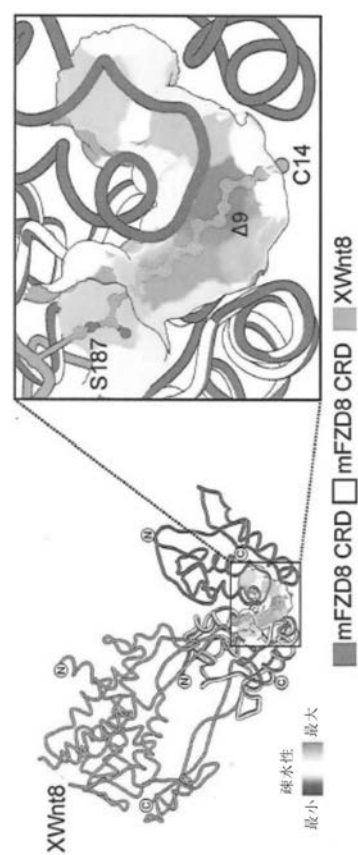
【図 3 5 - 3】



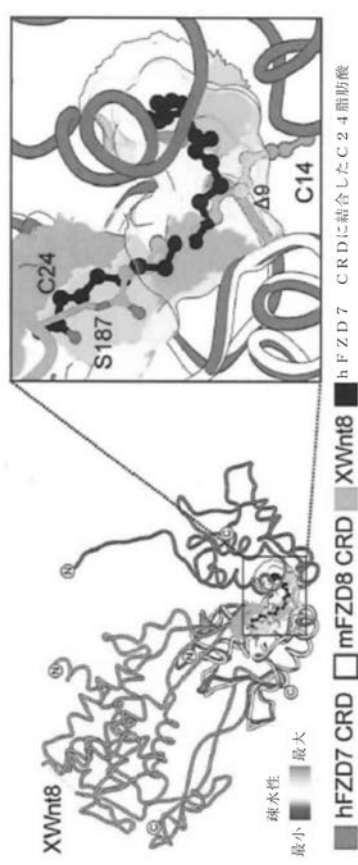
【図 3 7 B】



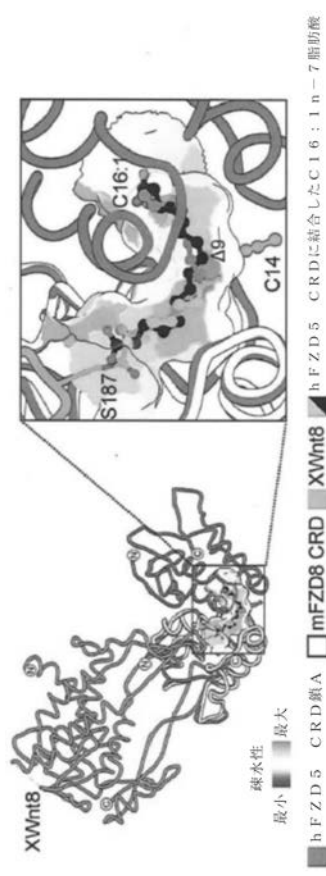
【図 3 8 A】



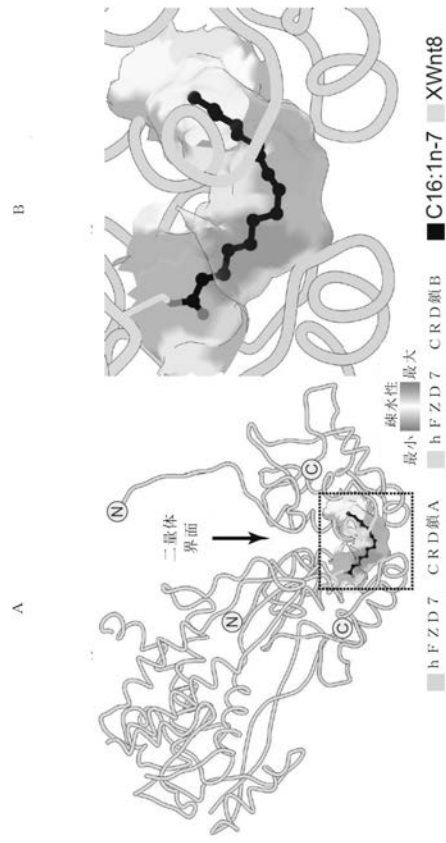
【図 3 8 B】



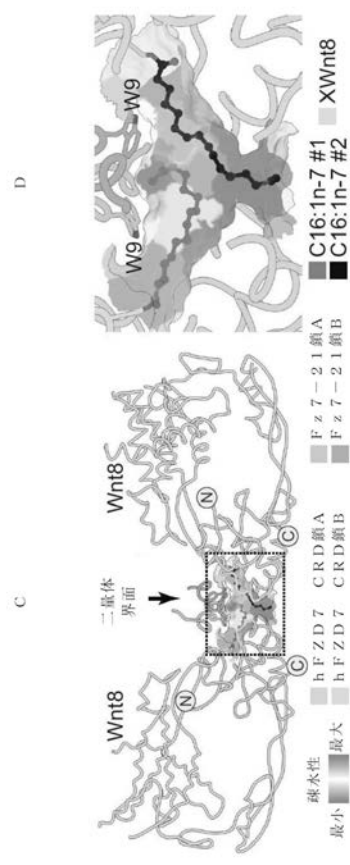
【図 3 8 C】



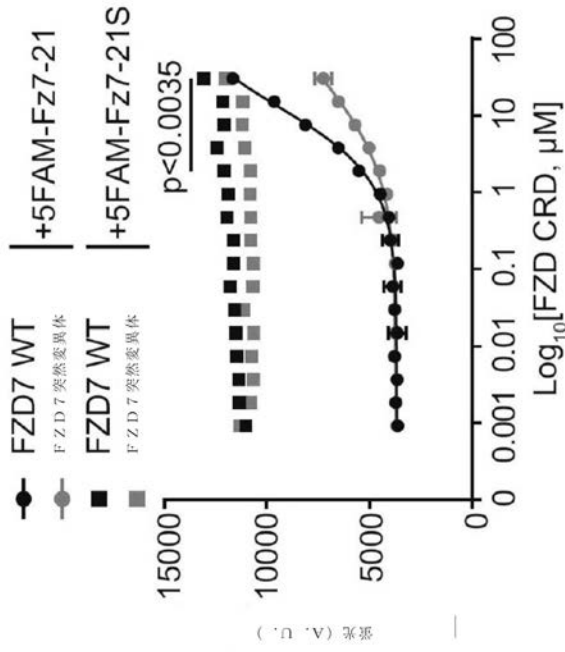
【図 3 9 - 1】



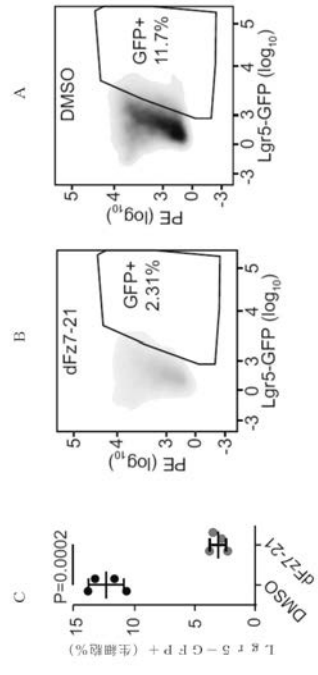
【図 3 9 - 2】



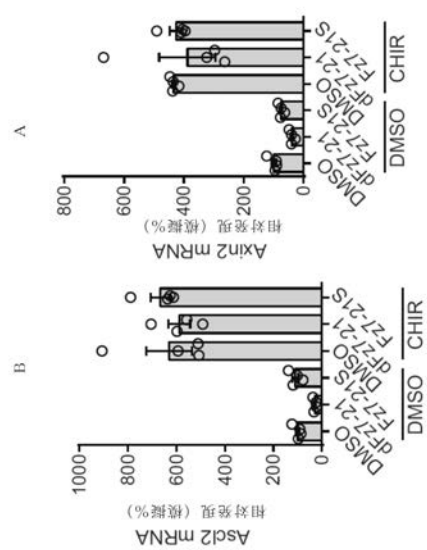
【図 4 0】



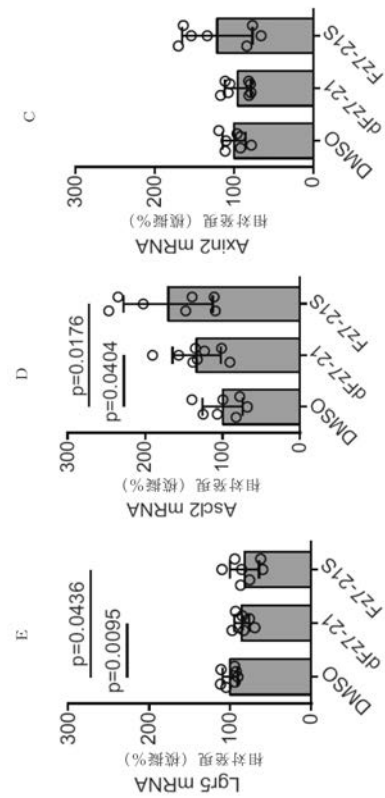
【図 4 1】



【 図 4 2 - 1 】



【 図 4 2 - 2 】



【 配 列 表 】

2019534858000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2017/050841

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. A61K38/03 C07K7/00 A61K38/10
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
A61K C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, Sequence Search, EMBASE, FSTA

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 2 975 047 A1 (UNIVERSITÉ DE LAUSANNE [CH]) 20 January 2016 (2016-01-20) pages 8-9; claims 1-9 -----	1,6,10, 34-36, 40,42, 44,46,48
X	WO 2010/037041 A2 (ONCOMED PHARM INC [US]; GURNEY AUSTIN L [US]; SATO AARON KEN [US]; AXE) 1 April 2010 (2010-04-01) pages 31-60; claims 1-107; examples 1-25 -----	1,5, 8-11, 34-49
X	WO 2015/023851 A1 (UNIV TORONTO [CA]; GAKHAL AMANDEEP [US]) 19 February 2015 (2015-02-19) pages 15-18; claims 1-21; examples 1-4 ----- -/-	1,2,10, 34-36, 38-49

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

9 November 2017

Date of mailing of the international search report

01/12/2017

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Behrens, Joyce

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2017/050841

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CHUMAN Y ET AL: "Identification of a peptide binding motif for secreted frizzled-related protein-1", PEPT, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 25, no. 11, 1 November 2004 (2004-11-01), pages 1831-1838, XP004610721, ISSN: 0196-9781, DOI: 10.1016/J.PEPTIDES.2004.07.010 abstract pg 1831-1833; Table 1 -----	3,4,7, 12, 15-33,50
A	B. T. MACDONALD ET AL: "Frizzled and LRP5/6 Receptors for Wnt/ -Catenin Signaling", COLD SPRING HARBOR PERSPECTIVES IN BIOLOGY, vol. 4, no. 12, 1 December 2012 (2012-12-01), pages a007880-a007880, XP055422746, DOI: 10.1101/cshperspect.a007880 pages 2-3 -----	1-50
A	PEZ FLORIANE ET AL: "Wnt signaling and hepatocarcinogenesis: Molecular targets for the development of innovative anticancer drugs", JOURNAL OF HEPATOLOGY, vol. 59, no. 5, 5 July 2013 (2013-07-05), pages 1107-1117, XP028755494, ISSN: 0168-8278, DOI: 10.1016/J.JHEP.2013.07.001 abstract; pg 1112-1113 -----	1-50
A	A. GURNEY ET AL: "Wnt pathway inhibition via the targeting of Frizzled receptors results in decreased growth and tumorigenicity of human tumors", PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, vol. 109, no. 29, 2 July 2012 (2012-07-02), pages 11717-11722, XP55204893, ISSN: 0027-8424, DOI: 10.1073/pnas.1120068109 abstract; pg 11717-11718; Fig. 2 -----	1-50
A	TAJ D. KING ET AL: "Frizzled7 as an emerging target for cancer therapy", CELLULAR SIGNALLING, vol. 24, no. 4, 1 April 2012 (2012-04-01), pages 846-851, XP055204447, ISSN: 0898-6568, DOI: 10.1016/j.cellsig.2011.12.009 abstract; pg 849-850 -----	1-50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2017/050841

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 2975047	A1	20-01-2016	NONE
WO 2010037041	A2	01-04-2010	
		AU 2009296246	A1 01-04-2010
		CA 2738485	A1 01-04-2010
		CN 103002911	A 27-03-2013
		CN 105079805	A 25-11-2015
		EP 2331136	A2 15-06-2011
		HK 1183435	A1 26-02-2016
		IL 211742	A 29-10-2015
		JP 5792621	B2 14-10-2015
		JP 6212070	B2 11-10-2017
		JP 2012503990	A 16-02-2012
		JP 2015177802	A 08-10-2015
		KR 20110066189	A 16-06-2011
		NZ 592338	A 30-11-2012
		RU 2011110405	A 10-11-2012
		SG 190568	A1 28-06-2013
		TW 201023881	A 01-07-2010
		US 2010104574	A1 29-04-2010
		US 2011318341	A1 29-12-2011
		US 2013252326	A1 26-09-2013
		US 2013295105	A1 07-11-2013
		US 2015232554	A1 20-08-2015
		US 2016326259	A1 10-11-2016
		WO 2010037041	A2 01-04-2010
		ZA 201101896	B 30-05-2012
WO 2015023851	A1	19-02-2015	
		AU 2014306564	A1 03-03-2016
		CA 2921398	A1 19-02-2015
		EP 3033356	A1 22-06-2016
		JP 2016528256	A 15-09-2016
		US 2016194394	A1 07-07-2016
		WO 2015023851	A1 19-02-2015

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 38/08 (2019.01)		A 6 1 K 38/08	
A 6 1 K 38/10 (2006.01)		A 6 1 K 38/10	
A 6 1 K 38/12 (2006.01)		A 6 1 K 38/12	
A 6 1 K 38/16 (2006.01)		A 6 1 K 38/16	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)		A 6 1 P 35/00	
		A 6 1 P 43/00	1 0 5

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

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. UNIX

- (72)発明者 チャン, インナン
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94080-4990, サウス サン フランシスコ, デ
ィーエヌエー ウェイ 1, シー/オー ジェネンテック, インコーポレイテッド
- (72)発明者 チョウ, リーチュアン
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94080-4990, サウス サン フランシスコ, デ
ィーエヌエー ウェイ 1, シー/オー ジェネンテック, インコーポレイテッド
- (72)発明者 ハヌーシュ, ラミ
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94080-4990, サウス サン フランシスコ, デ
ィーエヌエー ウェイ 1, シー/オー ジェネンテック, インコーポレイテッド

Fターム(参考) 4B065 AA91X AA93X AB01 AC20 BA05 BB19 CA44
4C084 AA02 AA07 BA01 BA08 BA17 BA18 BA23 BA24 BA25 CA59
DA27 MA66 NA14 ZB21 ZB26 ZC02 ZC41
4H045 AA10 AA30 BA15 BA16 BA17 EA28 FA33