

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6953020号
(P6953020)

(45) 発行日 令和3年10月27日 (2021. 10. 27)

(24) 登録日 令和3年10月1日 (2021. 10. 1)

(51) Int. Cl.	F I
C 1 2 N 15/62 (2006. 01)	C 1 2 N 15/62 Z
A 6 1 K 38/16 (2006. 01)	A 6 1 K 38/16
A 6 1 K 38/46 (2006. 01)	A 6 1 K 38/46
A 6 1 K 45/00 (2006. 01)	A 6 1 K 45/00
A 6 1 K 47/65 (2017. 01)	A 6 1 K 47/65

請求項の数 26 (全 89 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2018-531307 (P2018-531307)	(73) 特許権者	518076377
(86) (22) 出願日	平成28年9月6日 (2016. 9. 6)		セリピオン, インコーポレイテッド
(65) 公表番号	特表2018-531622 (P2018-531622A)		アメリカ合衆国 ワシントン 9 8 1 7 7
(43) 公表日	平成30年11月1日 (2018. 11. 1)		, ショアライン, リッジフィールド
(86) 国際出願番号	PCT/US2016/050405		ロード エヌダブリュー 1 8 7 9 8
(87) 国際公開番号	W02017/044424	(74) 代理人	100078282
(87) 国際公開日	平成29年3月16日 (2017. 3. 16)		弁理士 山本 秀策
審査請求日	令和1年8月26日 (2019. 8. 26)	(74) 代理人	100113413
(31) 優先権主張番号	62/215, 256		弁理士 森下 夏樹
(32) 優先日	平成27年9月8日 (2015. 9. 8)	(74) 代理人	100181674
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)		弁理士 飯田 貴敏
前置審査		(74) 代理人	100181641
			弁理士 石川 大輔
		(74) 代理人	230113332
			弁護士 山本 健策

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 A p o A - 1 融合ポリペプチドならびに関連する組成物および方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

アミノ末端位置からカルボキシル末端位置へと、A p o A 1 - L 1 - Dを含む融合ポリペプチドであって、

A p o A 1 が、配列番号 2 のアミノ酸残基 2 5 ~ 2 6 7 と少なくとも 9 5 % 同一性を有するアミノ酸配列を含む第 1 のポリペプチドセグメントであり、前記第 1 のポリペプチドセグメントが、コレステロール流出活性を有し、

L 1 が、少なくとも 1 0 個のアミノ酸残基を含む第 1 のポリペプチドリンカーであり、

D が、免疫グロブリン F c 領域であり、前記 F c 領域が、ヒト I g G 重鎖定常領域のための E U ナンバリングにしたがって C 2 2 0、C 2 2 6、及び C 2 2 9 がそれぞれセリンによって置き換えられたヒト γ 1 F c 領域であり、

前記融合ポリペプチドが、L 1 が 2 つのアミノ酸残基からなるリンカーである A p o A 1 - L 1 - D 融合ポリペプチド、または L 1 が存在しない A p o A 1 - L 1 - D 融合ポリペプチドと比較して増加したコレステロール流出活性を有し、

前記融合ポリペプチドが、二量体形成ドメインに対しカルボキシル末端側に位置する第 2 のポリペプチドセグメントをさらに含み、前記融合ポリペプチドが、アミノ末端位置からカルボキシル末端位置へと、A p o A 1 - L 1 - D - L 2 - Pを含み、A p o A 1、L 1、および D は、先に規定したとおりであり、L 2 は第 2 のポリペプチドリンカーであり、P は R N a s e およびパラオキシナーゼからなる群から選択される第 2 のポリペプチドセグメントであり、

10

20

前記融合ポリペプチドが、
(i) 配列番号 4 の残基 2 5 ～ 6 7 5、
(i i) 配列番号 1 4 の残基 2 5 ～ 6 7 5、
(i i i) 配列番号 2 8 の残基 2 5 ～ 8 8 3、
(i v) 配列番号 3 8 の残基 2 5 ～ 8 7 3、
(v) 配列番号 4 6 の残基 2 5 ～ 8 8 3、または
(v i) 配列番号 4 8 の残基 2 5 ～ 8 8 3
 と少なくとも 9 5 % 同一性を有するアミノ酸配列を含む、
 融合ポリペプチド。

【請求項 2】

10

L 1 が、1 0 ～ 4 0 個のアミノ酸残基からなる、請求項 1 に記載の融合ポリペプチド。

【請求項 3】

L 1 が、1 6 個のアミノ酸残基、2 1 個のアミノ酸残基、2 6 個のアミノ酸残基、3 1 個のアミノ酸残基または 3 6 個のアミノ酸残基からなる、請求項 1 に記載の融合ポリペプチド。

【請求項 4】

L 1 が、配列番号 2 2 の残基 2 6 8 ～ 2 8 3、配列番号 2 6 の残基 2 6 8 ～ 2 8 8、配列番号 2 の残基 2 6 8 ～ 2 9 3、配列番号 5 4、または配列番号 2 4 の残基 2 6 8 ～ 3 0 3 に示すアミノ酸配列を有する、請求項 3 に記載の融合ポリペプチド。

【請求項 5】

20

前記第 1 のポリペプチドセグメントが、配列番号 2 の残基 2 5 ～ 2 6 7 に示すアミノ酸配列を有する、請求項 1 ～ 4 のいずれか一項に記載の融合ポリペプチド。

【請求項 6】

ヒト I g G 重鎖定常領域のための E U ナンバリングにしたがって残基 P 2 3 8 が、セリンによって置き換えられた、請求項 1 に記載の融合ポリペプチド。

【請求項 7】

ヒト I g G 重鎖定常領域のための E U ナンバリングにしたがって残基 P 3 3 1 がセリンによって置き換えられた、請求項 1 に記載の融合ポリペプチド。

【請求項 8】

ヒト I g G 重鎖定常領域のための E U ナンバリングにしたがって残基 P 3 3 1 が、セリンによって置き換えられた、請求項 6 に記載の融合ポリペプチド。

30

【請求項 9】

前記 F c 領域が、(i) 配列番号 2 の残基 2 9 4 ～ 5 2 5 もしくは 2 9 4 ～ 5 2 4 または (i i) 配列番号 1 3 の残基 2 9 4 ～ 5 2 5 もしくは 2 9 4 ～ 5 2 4 に示すアミノ酸配列を有する、請求項 1 に記載の融合ポリペプチド。

【請求項 1 0】

前記第 2 のポリペプチドセグメントが、R N a s e であり、前記融合ポリペプチドが、
(i) 配列番号 4 の残基 2 5 ～ 6 7 5、または
(i i) 配列番号 1 4 の残基 2 5 ～ 6 7 5
 と少なくとも 9 5 % 同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項 1 ～ 9 のいずれか一項に記載の融合ポリペプチド。

40

【請求項 1 1】

前記 R N a s e が、配列番号 4 のアミノ酸残基 5 4 2 ～ 6 7 5 と少なくとも 9 5 % 同一性を有する、請求項 1 0 に記載の融合ポリペプチド。

【請求項 1 2】

前記 R N a s e が、配列番号 4 の残基 5 4 2 ～ 6 7 5 に示すアミノ酸配列を有する、請求項 1 1 に記載の融合ポリペプチド。

【請求項 1 3】

(i) 配列番号 4 の残基 2 5 ～ 6 7 5、または
 (i i) 配列番号 1 4 の残基 2 5 ～ 6 7 5

50

に示すアミノ酸配列を含む、請求項 10 に記載の融合ポリペプチド。

【請求項 14】

前記第2のポリペプチドセグメントが、パラオキシナーゼであり、前記融合ポリペプチドが、

(i) 配列番号 28 の残基 25～883、

(ii) 配列番号 38 の残基 25～873、

(iii) 配列番号 46 の残基 25～883、または

(iv) 配列番号 48 の残基 25～883

と少なくとも 95% 同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項 1～9 のいずれか一項に記載の融合ポリペプチド。

10

【請求項 15】

前記パラオキシナーゼが、配列番号 12 のアミノ酸残基 16～355、配列番号 42 のアミノ酸残基 16～355 または配列番号 44 のアミノ酸残基 16～355 と少なくとも 95% 同一性を有する、請求項 14 に記載の融合ポリペプチド。

【請求項 16】

前記パラオキシナーゼが、配列番号 12 の残基 16～355、配列番号 42 の残基 16～355 または配列番号 44 の残基 16～355 に示すアミノ酸配列を有する、請求項 15 に記載の融合ポリペプチド。

【請求項 17】

(i) 配列番号 28 の残基 25～883、

(ii) 配列番号 38 の残基 25～873、

(iii) 配列番号 46 の残基 25～883、または

(iv) 配列番号 48 の残基 25～883

に示すアミノ酸配列を含む、請求項 14 に記載の融合ポリペプチド。

20

【請求項 18】

ミエロペルオキシダーゼ (MPO) 阻害剤に連結された、請求項 1～17 のいずれか一項に記載の融合ポリペプチド。

【請求項 19】

第1の融合ポリペプチドおよび第2の融合ポリペプチドを含む二量体タンパク質であって、前記第1および第2の融合ポリペプチドのそれぞれが、請求項 1～18 のいずれか一項に規定されている融合ポリペプチドである、二量体タンパク質。

30

【請求項 20】

請求項 1～17 のいずれか一項に記載の融合ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド。

【請求項 21】

次に挙げる作動可能に連結されたエレメント、

転写プロモーター、

請求項 1～17 のいずれか一項に記載の融合ポリペプチドをコードする DNA セグメント、および

転写ターミネーター

を含む発現ベクター。

40

【請求項 22】

請求項 21 に記載の発現ベクターが導入された培養細胞であって、前記 DNA セグメントを発現する細胞。

【請求項 23】

融合ポリペプチドを作製する方法であって、

請求項 21 に記載の発現ベクターが導入された細胞を培養するステップであって、前記細胞が、前記 DNA セグメントを発現し、前記コードされた融合ポリペプチドが、産生されるステップと、

前記融合ポリペプチドを回収するステップと

50

を含む方法。

【請求項 2 4】

二量体タンパク質を作製する方法であって、

請求項 2 1 に記載の発現ベクターが導入された細胞を培養するステップであって、前記細胞が、前記 DNA セグメントを発現し、前記コードされた融合ポリペプチドが、二量体タンパク質として産生されるステップと、

前記二量体タンパク質を回収するステップと

を含む方法。

【請求項 2 5】

請求項 1 ～ 1 8 のいずれか一項に記載の融合ポリペプチドと、

薬学的に許容される担体と

を含む組成物。

10

【請求項 2 6】

請求項 1 9 に記載の二量体タンパク質と、

薬学的に許容される担体と

を含む組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

20

関連出願への相互参照

本出願は、2 0 1 5 年 9 月 8 日に提出された米国仮出願第 6 2 / 2 1 5 , 2 5 6 の利益を主張し、当該出願はその全体が本明細書において参考として援用される。

【0 0 0 2】

配列表の参照

本願は、E F S - W e b を介して A S C I I フォーマットで提出された配列表を含み、その全体を参照により本明細書に組み込む。2 0 1 6 年 8 月 3 1 日に作成された前記 A S C I I コピーは、「T R P _ 0 1 1 0 P C _ 2 0 1 6 0 8 3 1 _ S e q _ L i s t i n g _ S T 2 5」と命名され、サイズは 1 6 1 , 1 3 2 バイトである。

【背景技術】

30

【0 0 0 3】

アポリポタンパク質 A - I (A p o A - 1) および高密度リポタンパク質 (H D L)

心血管疾患は、多くの国における死亡率の主因であり、世界中で毎年およそ 1 6 7 0 万名の死亡を構成する。心血管疾患の最も一般的な帰結は、心筋梗塞および脳卒中であり、これらは、粥状動脈硬化に共通の根底にある病因を有する。

【0 0 0 4】

1 9 7 0 年代以来、疫学的研究は、低レベルの高密度リポタンパク質 (H D L) が、心筋梗塞のリスク増加に関連することを示してきた。この研究により、H D L を標的とする新たな治療法のための複数のアプローチ (Kingwell ら、Nature Reviews Drug Discovery 1 3 巻：4 4 5 ～ 6 4 頁、2 0 1 4 年を参照) が導かれると共に、コレステロール逆転送 (R C T) のプロセスが、R C T なしの単純な H D L の増加よりもむしろ、有益な H D L 活性にとって中心的であるという一致した見解が導かれた。例えば、今までのところ臨床治験において、コレステロールエステル転送タンパク質 (C E T P) の阻害剤による R C T の阻害によって H D L を増加させる薬物は、効果的ではない。さらに、より最近では、H D L は、化学療法の際および神経変性障害の患者におけるものを含む、酸化およびグリケーションによって損傷されるため、H D L のレベルの測定が、患者におけるその機能の決定に十分ではないことが了解されている。Keeney ら、Proteomics Clin Appl. 7 巻：1 0 9 ～ 1 2 2 頁、2 0 1 3 年を参照されたい。

40

【0 0 0 5】

アポリポタンパク質 A - 1 (A p o A - 1) は、H D L の主要タンパク質成分である。

50

Phillips, Journal of Lipid Research 54巻: 2034~2048頁、2013年。ヒトApoA-1は、243アミノ酸のタンパク質であり、残基44~243にまたがる、一連の8個の22-merおよび2個の11-merの両親媒性 α -ヘリックスを有する。Lund-KatzおよびPhillips, Subcell Biochem. 51巻: 183~227頁、2010年。この分子のアミノ末端3分の2におけるヘリックスは、ヘリックスバンドル構造を形成する一方、カルボキシル末端領域は、脂質結合に重要な別々の相対的に無秩序なドメインを形成する。C末端セグメントと脂質との相互作用は、ApoA-1構造に立体構造変化を誘導し、分子の α -ヘリックス含量を増加させ、N末端ヘリックスバンドルのその後の開口を可能にする。同文献参照。ApoA-1の脂質親和性は、洗剤に似た特性を付与し、リン脂質を可溶化して、リン脂質二重層のセグメントを含有する円盤状HDL粒子、およびこの円盤の縁に巻き付いて逆平行ダブルベルト(double-belt)立体構造に配置された2個のApoA-1分子を形成することができる。Phillips、上記参照。ApoA-1の立体構造適応性は、異なるサイズの円盤状粒子と共に球状HDL粒子を含むHDL粒子に安定性も付与する。同文献参照。これらの特徴は、ApoA-1が、細胞のリン脂質およびコレステロールの流出の媒介ならびに安定したHDL粒子の産生においてABCA1とパートナーを組むことを可能にする。Phillips、上記参照；Lund-KatzおよびPhillips、上記参照。

10

【0006】

HDL粒子形成および機能におけるその重要な役割のため、ApoA-1は、いくつかのHDL標的化治療戦略の焦点になった。しかし、ApoA-1の合成を増加させるナイアシンおよびフィブレートを含む薬物は、また、VLDLの濃度を減少させるため、HDLに特異的ではない。ナイアシンの臨床試験は、有効性の欠如のために停止された一方、ペルオキシソーム増殖剤活性化受容体(PPAR)を活性化するフィブレートは、メタ解析において主要心血管事象の10%低下($p < 0.05$)および冠血管事象の13%低下($p < 0.0001$)を引き起こすことが見出された。Junら、Lancet 375巻: 1875頁、2010年を参照されたい。より有効な治療法が必要とされるため、前臨床開発においてApoA-1を増加させるいくつかの他の経口活性薬物が存在する。Kingwellら、上記参照。

20

【0007】

ApoA-1を増加させるための代替アプローチは、精製されたタンパク質の直接的注射によって為される。例えば、Kingwellら、Circulation 128巻: 1112頁、2013年を参照されたい。ApoA-1は、ヒト血漿から精製され(再構成されたHDL)、臨床試験において検査された。組換えApoA-1も、細菌および哺乳動物発現系の両方において発現され、臨床試験において検査された。これらの研究は、リン脂質と共にプレ β HDLへと再構成されたApoA-1の注入が、小規模の(47~60名の患者)臨床試験後に血管内超音波(IVUS)によって測定される通り、プラーク体積の低下およびプラーク形態の改善を引き起こすことを示した。有望ではあるが、天然または組換えApoA-1の使用には、短いApoA-1半減期による毎週投与の必要性および高い製造コストを含む、いくつかの制約がある。

30

【0008】

高度活性型ApoA-1突然変異体である組換えApoA-1ミラノ(Milano)を、細菌細胞において発現させ、急性冠症候群患者の臨床試験において検査したところ(Nissenら、JAMA 290巻: 2292頁、2003年を参照)、プラーク体積の低下が観察された。この研究は、最初にHDL仮説を直接検査および確認したと考慮されるが、細菌系において産生されたApoA-1は、低い発現レベルおよび高い製造コストのせいで進展しなかった。哺乳動物細胞において産生された組換えApoA-1は、近年完了した第II相研究を含む臨床試験においてさらに進展した。Cerenis Therapeuticsによる開発中のCER-001は、哺乳動物細胞によって産生され、特異的脂質と共に製剤化されて、プレ β 様HDL粒子を形成した組換えApoA-1である。Cerenisによれば、CER-001は、MODE試験(NCT01412034)において、

40

50

家族性高コレステロール血症患者におけるMRIによって測定される頸動脈プラーク体積低下のその主要エンドポイントを満たした。CHIEF-SQUARE治験（NCT01201837）において、Cerenisは、CER-001が、急性冠症候群患者において、対ベースラインでプラーク体積を低下させたが、低下は対プラセボで有意ではなかったと公表した。

【0009】

マカクにおける別の研究では、脂質（POPC）と共に再構成されたApoA-1ミラノは、1日おきに21回の注入で、相対的に高用量（30、100および300mg/kg）で注入された。Kempenら、J. Lipid. Res. 54巻：2341～2353頁、2013年。薬物注入は、内在性コレステロールエステル化率を急速に減少させ、LCAT活性化の欠如による大型のApoEリッチ粒子の形成を増加させ、ABCA1媒介性流出の刺激持続による遊離コレステロールの大幅な増加を引き起こした。同文献参照。これらの結果は、大量の再構成されたApoA-1ミラノの注入が、正常な代謝経路を経て処理する能力を伴わずにコレステロール流出を増強することにより、HDL代謝を破壊することを示す。

10

【0010】

HDL注入治療法の見通しは、非常に有望ではあるが、現在のアプローチの制約のいくつかを克服する、改善された組換えApoA-1分子の必要性が存在する。精製を単純化するためのHisタグと共に細菌において産生されたApoA-1を含む、いくつかの組換えApoA-1融合タンパク質が産生された。例えば、Prietoら、Protein J. 31巻：681～688頁、2012年；Ryanら、Protein Expr. Purif. 27巻：98～103頁、2003年を参照されたい。別の例では、IFN α が、3aa（Gly Ala Pro）リンカーを介してApoA-1のアミノ末端に取り付けられた。Fioravantiら、J. Immunol. 188巻：3988～3992頁、2012年を参照されたい。この構築物におけるリンカーは、制限酵素の選択によって作製され、融合タンパク質は、アデノウイルス送達によって検査されて、肝臓へと標的化し、IFN α 治療法の毒性を低下した。ApoA-1は、また、Fcドメインと融合され（ApoA-1-Ig）、Creative Biomart（cat. No. APOA-1-33H）およびLife Technologies（Cat#10686-HO2H-5）から市販された。しかし、このApoA-1-Ig分子は、非常に低い機能活性を有する（実施例1を参照）。

20

30

【0011】

追加的な組換えApoA-1融合タンパク質は、抗CD20 scFv-ApoA-1（Crosbyら、Biochem. Cell Biol. 10巻：1139/bcb、2015年）、IL-15-ApoA-1（Ochoaら、Cancer Res. 73巻：139～149頁、2013年）、およびヒトテトラネクチン（tetranectin）の三量体形成ドメインの付加により作製された三量体ApoA-1融合タンパク質（Graversenら、J. Cardiovascular Pharmacol. 51巻：170～77頁、2008年）を含む。これらの例では、融合は、ApoA-1のN末端で為された。

【0012】

三量体テトラネクチン-ApoA-1（TN-ApoA-1）は、コレステロール逆流において有効であり、マウスにおけるその半減期は、単量体ApoA-1の3時間と比べて、12時間まで増加した。Gaversenら、上記参照。粥状動脈硬化の高悪性度モデルにおいて（高脂肪食を与えたLDLR-/-マウス）、三量体TN-ApoA-1は、大動脈起始部における病変の進行を遅らせた。同文献参照。しかし、非ヒト霊長類における近年の研究は、脂質付加されたTN-ApoA-1の複数の注入が、耐容性が良くなく、高い免疫原性および脂質蓄積をもたらしたことを示した。Regenness-Lechnerら、Toxicological Sciences 150巻：378～89頁、2016年を参照されたい。三量体融合タンパク質は、リン脂質と複合体形成させられ、4日毎に3週間、100mg/kgおよび400mg/kgの濃度で注射され、続いて、6週間の回復期間を置いた。脂質付加されたTN-ApoA-1の複数の注入後に、臨床状態が悪化し、進行性炎症応答、サイトカイ

40

50

ン、C反応性タンパク質のレベル増加、および複数の組織における血管／血管周囲浸潤を示す変化を伴った。抗薬物抗体の急速形成が、脂質付加されたTN-ApoA-1を与えた全動物において起こった。同文献参照。処置された動物の組織における三量体TN-ApoA-1の蓄積は、N末端付近に突然変異を有する患者におけるApoA-1の原線維形成および沈着に似ている。Mizuguchiら、J. Biol. Chem. 290巻：20947～20959頁、2015年；Dasら、J. Mol. Biol. 2015. 10. 029；Obiciら、Amyloid 13巻：191～205頁、2006年を参照されたい。

【0013】

脂質の非存在下におけるApoA-1の半減期は非常に短いため、臨床開発におけるApoA-1の現在の形態は、注入に先立ち、特異的な脂質とのプレβ様HDL粒子への製剤化を必要とする。Nanjeeら、Arterioscler Thromb Vasc Biol 16巻：1203～1214頁、1996年（脂質不含ApoA-1が、ヒトにおけるボラスまたは緩徐注入のいずれかの後に僅か2～2.3時間の半減期を有することを示す）を参照されたい。脂質製剤化後に、半減期は、約48時間まで増加するが、頻繁な（毎週）投与が依然として必要とされる。

【0014】

ApoA-1治療法は、インスリン感受性およびグルコース取り込みの改善における有意な利益も示し（Drewら、Nature Reviews Endocrinology 8巻：237頁、2012年を参照）、糖尿病およびNASH（非アルコール性脂肪性肝炎）の患者において有用となり得る。加えて、ApoA-1は、アミロイドーベータに結合し、培養された海馬神経細胞における神経毒性を予防する。Koldamovaら、Biochemistry 40巻：3553頁、2001年；Paula-Limaら、Int. J. Biochem. Cell Biol. 41巻：1361頁、2009年を参照されたい。さらに、ApoA-1多型は、アルツハイマー病のリスクに関係づけられており、ApoA-1は、神経変性障害患者において減少したレベルで見出される。Keeneyら、Proteomics Clin. Appl. 7巻：109～122頁、2013年を参照されたい。

【0015】

ApoA-1治療法の有効性は、がんの動物モデルにおいても実証された。ある一研究は、マウスにおける腫瘍の成長におけるApoA-1注入の効果を試験した。Zamanian-Daryoushら、J. Biol. Chem. 288巻：21237～21252頁、2013年を参照されたい。Zamanian-Daryoushらは、ApoA-1が、B16F10L悪性メラノーマおよびルイス肺癌を含む、複数の同一遺伝子腫瘍モデルにおいて腫瘍成長および転移を強力に抑制することを見出した。ApoA-1の効果は、免疫応答のモジュレーションによるものであった。腫瘍における骨髄系由来サプレッサー細胞（MDSC）の動員および増大が阻害された。腫瘍血管新生およびマトリックス分解プロテアーゼMMP-9の阻害も見られた。対照的に、ApoA-1治療法は、CD11bマクロファージを増加させ、T細胞活性化を支持するTh1応答のマーカーであるIFNγ、IL-12bおよびCXCL10の量を増加させた。著者らは、T細胞が、腫瘍成長におけるApoA-1の強力な抑制効果に必要とされ、ApoA-1治療法が、腫瘍におけるCD8⁺T細胞の特異的増加を引き起こしたことを示した。同文献参照。Zamanian-Daryoushらの結果は有望であるが、この研究は、観察された効果を達成するために高用量の脂質不含ApoA-1を使用し（マウス当たり1日おきに15mg）、これは、ApoA-1の短い半減期のせいで必要とされる可能性があった、同文献参照。

【0016】

別のがん研究は、ApoA-1およびミメティックペプチド（L-4F、D-4F、L-5F）が、卵巣癌のマウスモデルにおける腫瘍発達を阻害することを示した。Suら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 107巻：19997～20002頁、2010年を参照されたい。Suらは、トランスジェニックマウスにおけるApoA-1過剰発現、またはペプチドミメティック投与が、刺激性リン脂質を低下させたことを見出し、これは、腫瘍成長の阻害のための追加的な機構を関係づける。同文献参照。

【0017】

研究は、多発性硬化症（MS）の病理発生におけるApoA-1の役割も示唆した。特に、ApoA-1発現は、健康対照と比較して、MS患者においてより低いことが示され、原発性進行性MS患者は、他の形態のMSを有する患者よりも少ない血漿ApoA-1を有した。Meyersら、J. Neuroimmunol. 277巻：176～185頁、2014年を参照されたい。MSのモデルとして実験的アレルギー性脳脊髄炎（EAE）を使用すると、ApoA-1を欠損したマウスは、野生型動物と比較して、より悪化した臨床疾患およびより多くの神経変性を示した。著者らは、ApoA-1レベルを増加させる薬剤が、MSに可能な治療法であることを示唆する。同文献参照。別のMS研究は、ApoA-1レベル上昇に関連するApoA-1プロモーター多型A-対立遺伝子が、MS患者における認知能力改善と相関することを見出した；A-対立遺伝子キャリアは、全体的に優れた認知能力を呈し、認知機能障害の全体的リスクが3分の1に減少した。Koutsisら、Mult. Scler. 15巻：174～179頁、2009年を参照されたい。

ペプチドミメティック

【0018】

ApoA-1ミメティックペプチドは、疾患の多数の動物モデルにおける有効性を示し、潜在的治療剤として魅力的な特性を有する。例えば、Reddyら、Curr. Opin. Lipidol. 25巻：304～308頁、2014年およびWhiteら、J. Lipid. Res. 55巻：2007～2021頁、2014年を参照されたい。ペプチド4Fは、冠動脈疾患の高リスク患者において検査された。酸化に対し抵抗性であるいくつかのApoA-1ミメティックペプチドについて過去数年間に記載された。これらの α -ヘリックスペプチドは、動物モデルにおいて活性を示すが、その短い半減期のために毎日の投薬を必要とする。加えて、筋肉毒性を含む毒性および高トリグリセリド血症が、ペプチド処置された動物において見られた（これらの毒性は、ApoA-1で処置されたマウスに見られた）。配列設計によって毒性を低下させ、ペプチド産生のコストを低下させるための進歩について記載された。例えば、Bielicki、Curr. Opin. Lipidol. 27巻：40～46頁、2016年を参照されたい。別のアプローチは、大いに研究されたD-4Fペプチドを含むD-ペプチドを合成することであった。これは、より長い半減期を有し、経口で与えることができるが、高い製造コストおよび組織におけるD-ペプチドの蓄積は、このペプチドが、初期臨床検査を通過することを妨げている可能性がある。

RNase

【0019】

RNaseは、がんおよび自己免疫性疾患の治療法として研究されてきた。がん治療のため、天然（オンコナーゼ（onconase）、カエルRNase）、および細胞質阻害剤による阻害に対し抵抗性の組換えヒトRNase 1（米国特許第8,569,457号を参照）の両方が報告されている。加えて、抗腫瘍抗体への細胞傷害性RNase（オンコナーゼ）のコンジュゲーションによる、腫瘍細胞へのRNaseの標的化が報告されている。Luiら、Mol. Cancer 13巻：1186頁、2014年；Newtonら、Blood 97巻：528～535頁、2001年を参照されたい。

【0020】

RNase治療法は、心血管疾患のマウスモデルにおいても研究された。Simseyilmazら、Circulation 129巻：598～606頁、2014年を参照されたい。この著者らおよび他の研究者らは、細胞外RNAが、血管性傷害の部位に蓄積すること、および細胞外RNAが、炎症性サイトカインの産生を引き起こすことを示す。Fischerら、Thromb. Haemost. 108巻：730～741頁、2012年を参照されたい。RNase治療法は、加速させた心血管疾患のマウスモデルにおける新生内膜形成を低下させ、プラークマクロファージ含量を低下させ、in vivoで傷害された頸動脈への白血球動員を阻害した。Simseyilmazら、上記参照。

【0021】

RNase治療法は、急性脳卒中のモデルにおいても研究されており、それによると、

これが梗塞サイズを低下させることが見出された。Walbererら、Curr. Neurovasc. Res. 6巻：12～19頁、2009年を参照されたい。よって、RNase 1による全身性処置は、動脈性血栓性閉塞からマウスをレスキューして、脳浮腫を限定し、*in vivo*で強力な抗炎症性レジメンとして機能した。これらのRNase 1治療法研究では、RNase 1の半減期は非常に短いため、RNase 1は、皮下に植え込まれた浸透圧ミニポンプを使用した持続注入によって与えられた。

【0022】

RNase 1治療法は、全身性エリテマトーデス（SLE）のマウスモデルにおいても研究された。Sunら、J. Immunol. 190巻：2536～2543頁、2013年を参照されたい。RNAセンサーであるTLR7の過剰発現は、自己抗体によるループス様疾患、腎臓疾患および早期死亡率を引き起こす。このようなマウスを、導入遺伝子としてRNase 1を過剰発現するマウスと交雑すると、生存性が増加し、リンパ球活性化が低下し、IgGおよびC3の腎臓沈着物が低下し、肝臓の炎症および壊死が低下した後代が生じた。

10

【0023】

細胞外一本鎖ウイルスRNAは、マウスへのくも膜下腔内投与後に広汎な神経変性を引き起こし、神経細胞損傷は、TLR7によって媒介された。Lehmannら、J. Immunol. 189巻：1448～58頁、2012年を参照されたい。

【0024】

ヒトRNase 1が、p238sおよびp331s突然変異を含む突然変異したヒトIgG1 Fcドメインに融合された、RNase-Ig（米国特許第8,937,157号を参照）は、全身性エリテマトーデス（SLE）の患者において、Resolve Therapeuticsによって臨床開発中である。

20

パラオキシナーゼ

【0025】

ヒトパラオキシナーゼ1（PON1）は、効率的なエステラーゼ活性を有し、有機リン酸エステルを加水分解することができる、リポラクトナーゼである。PON1は、LDLおよび細胞膜酸化を予防し、粥状保護性（atheroprotective）であると考えられる。PON1は、HDLに排他的に会合し、HDLの抗酸化機能に寄与する。例えば、Macknessら、Gene 567巻：12～21頁、2015年を参照されたい。HDL-PON1活性の低下は、多種多様な炎症性疾患において存在し、そこでは、PON1活性の喪失が、炎症および粥状動脈硬化を促進し得る機能障害性HDLをもたらし。例えば、Erenら、Cholesterol. 792090 doi: 10.1155/2013/792090、2013年を参照されたい。PON1活性は、アルツハイマー病および他の認知症の患者においても減少され、PON1の可能な神経保護的役割を示唆する。Meniniら、Redox Rep. 19巻：49～58頁、2014年を参照されたい。

30

【0026】

PON1は、複数の動物モデルにおいて保護的活性を示した。ヒトPON1の過剰発現は、メタボリックシンドロームのモデルである組み合わせたレプチンおよびLDL受容体欠乏によるマウスにおける粥状動脈硬化の発症を阻害した。Macknessら、Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 26巻：1545～50頁、2006年を参照されたい。

40

【0027】

別の研究では、STZ誘導性糖尿病に先立つマウスへの組換えPON1の注射は、低下した糖尿病発症率およびより高い血清インスリンレベルをもたらした。PON1と同時のHDLの添加は、インスリン分泌に相加効果を有した。Koren-Gluserら、Atherosclerosis 219巻：510～518頁、2011年を参照されたい。

【0028】

別の研究では、タンパク質形質導入ドメイン（PTD）を含有するPON1融合タンパク質を使用して、細胞および組織にPON1を形質導入した。PON1形質導入は、酸化ストレス誘導性炎症応答から*in vitro*でマイクログリア細胞を保護し、パーキン

50

ソン病モデルにおいてドーパミン作動性神経細胞死に対して保護した。Kimら、*Biomaterials* 64巻：45～56頁、2015年を参照されたい。

【0029】

別の研究では、組換えPON1をマウスに投与したところ、コレステロール質量の有意な低下およびコレステロール生合成速度の阻害が見られ、これは、おそらく粥状動脈硬化の減弱をもたらし得る効果であった。Rosenblatら、*Biofactors* 37巻：462～467頁、2011年を参照されたい。

【0030】

別の研究では、マウスに、組換えアデノウイルスPON1またはPON3を与えたところ、どちらも、CC1(4)誘導性肝臓傷害から保護することが示された。ヒトPON1またはヒトPON3のいずれかの過剰発現は、肝臓酸化ストレスを低下させ、肝臓における抗酸化能力を強化した。Pengら、*Toxicol. Lett.* 193巻：159～166頁、2010年を参照されたい。

【0031】

別の研究では、PON1は、FcドメインのC末端に融合され、ヒトインスリン受容体(HIR)に対する抗体を使用した二重特異性分子として発現された。HIRMAb-PON1と命名されたこの分子は、CHO細胞における発現後に安定しており、アカゲザルにおいて、高い血液脳関門透過性を有することが示されたが、肝臓によって急速に排除された。Boadoら、*Biotechnol. Bioeng.* 108巻：186～196頁、2011年を参照されたい。

血小板活性化因子アセチルヒドロラーゼ

【0032】

血小板活性化因子アセチルヒドロラーゼ(PAF-AH)は、血小板活性化因子等、リン脂質の短鎖アシル基を加水分解する、LDLおよびHDL関連酵素であり、リン脂質を酸化して、その炎症性特性を低下させた。Watsonら、*J. Clin. Invest.* 95巻：774～782頁、1995年；Stafforini、*Cardiovasc. Drugs Ther.* 23巻：73～83頁、2009年を参照されたい。アデノウイルス媒介性遺伝子送達を介したPAF-AHによる治療法は、ラットモデルにおいて蛋白尿および糸球体硬化症を寛解することが報告された。Iso-0ら、*Molecular Therapy* 13巻：118～126頁、2006年を参照されたい。PAF-AHは、また、ラットにおいてパラセタモール中毒後の肝臓回復を増強し、PAFは、高用量のアセトアミノフェン由来の肝臓毒性に関連する。Grypiotiら、*Dig. Dis. Sci.* 52巻：2580～2590頁、2007年；Grypiotiら、*Dig. Dis. Sci.* 53巻：1054～1062頁、2008年を参照されたい。機能喪失を引き起こすPAF-AHにおける突然変異は、日本人の4%に存在し、PAF-AHは、そのような個体における心血管疾患および脳卒中の独立リスク因子であることが見出された。Blankenbergら、*J. Lipid Res.* 44巻：1381～1386頁、2003年を参照されたい。組換えPAF-AHは、第III相臨床試験において、急性呼吸促迫症候群(ARDS)患者および敗血症患者において検査された。Karabinaら、*Biochim. Biophys. Acta* 1761巻：1351～1358頁、2006年を参照されたい。

コレステリルエステル転送タンパク質

【0033】

コレステリルエステル転送タンパク質(CE TP)は、高密度リポタンパク質(HDL)から低密度および超低密度リポタンパク質(LDLおよびVLDL)へとコレステリルエステルを輸送する。多くのCE TP阻害剤が開発され、臨床試験において検査された。トルセトラピブ(Torecetrapib)は、後期臨床試験へと進出した最初のCE TP阻害剤であり、血漿リポタンパク質レベルにおける有意な効果を示し、アテローム産生抑制性HDLコレステロールレベルを高めつつ、アテローム生成促進的LDLコレステロールレベルを低めた。トルセトラピブは、CE TP内深くに結合し、疎水性トンネルのN末端ポケットにおける結合しているコレステリルエステルをシフトし、ポケットからリン脂質を移す。Liuら、*J. Biol. Chem.* 287巻：37321～37329頁、2012年を参照さ

りたい。CETP阻害剤が、心血管疾患の治療法に有用となるであろうという初期の期待は、実現されていない；4種の阻害剤が、後期臨床試験に達したが、心血管事象の低下を示すことができなかった。Kosmasら、Clinical Medical Insights: Cardiology 2016年：10巻 37～42頁 doi：10.4137/CMC.S32667)を参照されたい。

CETP阻害剤および心血管疾患の代替的な見解が出現した。例えば、Miller、F100Research 3巻：124頁、2014年を参照されたい。CETPの保護的役割に関しては証拠がますます増えている。例えば、ヒトにおける複数の研究は現在、心血管疾患が、CETPレベルと逆相関することを示す。加えて、肝臓分泌が低下したCETP対立遺伝子は、心筋梗塞のリスク増加に関連する。Miller、上記参照。CETP阻害剤が、HDLコレステロールレベルを増加させ、したがって、心血管疾患の低下において有益となるであろうという本来の考えは、正しくない可能性がある。HDLコレステロールは、その脂質輸送機能のため有益であり、HDLからLDLおよびVLDLへのコレステリルエステルのCETP媒介性転移が、この機能の重要な成分である可能性がある。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0034】

【非特許文献1】Kingwellら、Nature Reviews Drug Discovery 13巻：445～64頁、2014年

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0035】

一態様では、本発明は、アミノ末端位置からカルボキシル末端位置へと、ApoA1-L1-Dを含む融合ポリペプチドであって、式中、ApoA1は、コレステロール流出活性を有する第1のポリペプチドセグメントであり、これは、(i)配列番号2のアミノ酸残基19～267、25～267または1～267と少なくとも90%または少なくとも95%同一性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチドおよび(ii)ApoA1ミメティックから選択され；L1は、第1のポリペプチドリンカーであり；Dは、二量体形成ドメインである、融合ポリペプチドを提供する。ある特定の実施形態では、L1は、少なくとも2個のアミノ酸残基、少なくとも3個のアミノ酸残基または少なくとも16個のアミノ酸残基を含む。例えば、特定の変種では、L1は、2～60個のアミノ酸残基、3～60個のアミノ酸残基、5～40個のアミノ酸残基、15～40個のアミノ酸残基または16～36個のアミノ酸残基からなる。より特異的な変種では、L1は、16個のアミノ酸残基、21個のアミノ酸残基、26個のアミノ酸残基、31個のアミノ酸残基または36個のアミノ酸残基からなり；一部のこのような実施形態では、L1は、配列番号22の残基268～283、配列番号26の残基268～288、配列番号2の残基268～293、配列番号54、または配列番号24の残基268～303に示すアミノ酸配列を有する。ある特定の実施形態では、第1のポリペプチドセグメントは、配列番号2の残基19～267または25～267に示すアミノ酸配列を含む。

【0036】

上述の融合ポリペプチドの一部の実施形態では、Dは、例えば、免疫グロブリンFc領域等、免疫グロブリン重鎖定常領域である。二量体形成ドメインが免疫グロブリンFc領域である、ある特定の実施形態では、Fc領域は、例えば、野生型ヒト配列と比べて1個または複数のアミノ酸置換を含むヒトFcバリエーション等、ヒトFc領域である。特に適したFc領域は、ヒトγ1およびγ3 Fc領域を含む。一部の変種では、Fc領域は、Eu残基C220がセリンによって置き換えられたヒトγ1 Fcバリエーションである；一部のこのような実施形態では、Eu残基C226およびC229はそれぞれ、セリンによって置き換えられている、および／またはEu残基P238は、セリンによって置き換えられている。上述のFc領域を含むさらなる変種では、Fc領域は、Eu残基P331がセリンによって置き換えられたヒトγ1 Fcバリエーションである。Fcバリエーションは、野生

型ヒト配列と比べてグリコシル化を低下させるアミノ酸置換を含むことができ；一部のこのような実施形態では、Eu残基N297は、別のアミノ酸により置き換えられている。上述のFc領域を含むさらなる変種では、Fc領域は、Fc受容体に対する結合親和性を増加または低下させるアミノ酸置換（例えば、FcγRI、FcγRIIおよびFcγRIIIのうち少なくとも1種に対する結合親和性を増加または低下させるアミノ酸置換）を含むFcバリエーションである。ある特定の実施形態では、Fcバリエーションは、新生児Fc受容体（FcRn）に対する結合親和性を増加または低下させるアミノ酸置換を含む。適したFc領域は、（i）配列番号2の残基294～525または294～524に示すアミノ酸配列を含むFc領域、および（ii）配列番号13の残基294～525または294～524に示すアミノ酸配列を含むFc領域を含む。

10

【0037】

上述の融合ポリペプチドのある特定の実施形態では、融合ポリペプチドは、（i）配列番号2の残基19～525、19～524、25～525もしくは25～524、（ii）配列番号13の残基19～525、19～524、25～525もしくは25～524、（iii）配列番号20の残基19～501、19～500、25～501もしくは25～501、（iv）配列番号22の残基19～515、19～514、25～515もしくは25～514、（v）配列番号26の残基19～520、19～519、25～520もしくは25～519、または（vi）配列番号24の残基19～535、19～534、25～535もしくは25～534と少なくとも90%または少なくとも95%同一性を有するアミノ酸配列を含む。より特異的な変種では、融合ポリペプチドは、（i）配列番号2の残基19～525、19～524、25～525もしくは25～524、（ii）配列番号13の残基19～525、19～524、25～525もしくは25～524、（iii）配列番号20の残基19～501、19～500、25～501もしくは25～501、（iv）配列番号22の残基19～515、19～514、25～515もしくは25～514、（v）配列番号26の残基19～520、19～519、25～520もしくは25～519、または（vi）配列番号24の残基19～535、19～534、25～535もしくは25～534に示すアミノ酸配列を含む。

20

【0038】

上述の融合ポリペプチドの一部の実施形態では、融合ポリペプチドは、二量体形成ドメインに対しカルボキシル末端側に位置する第2のポリペプチドセグメントをさらに含む。特定の変種では、第2のポリペプチドセグメントは、RNase、パラオキシナーゼ、血小板活性化因子アセチルヒドロラーゼ（PAF-AH）、コレステロールエステル転送タンパク質（CEPT）、レシチン・コレステロールアシルトランスフェラーゼ（LCAT）、または例えば、Aβ特異的scFv等、アミロイドベータ（Aβ）に特異的に結合するポリペプチドである。上述の第2のポリペプチドセグメントを含む融合ポリペプチドは、式ApoA1-L1-D-L2-P（アミノ末端位置からカルボキシル末端位置へと）によって表すことができ、式中、ApoA1、L1およびDはそれぞれ、上述通りに定義されており、L2は、第2のポリペプチドリンカーであり、任意選択で存在し、Pは、第2のポリペプチドセグメントである。L2が存在する融合ポリペプチドの一部の実施形態では、L2は、配列番号4の残基526～541に示すアミノ酸配列を有する。

30

40

【0039】

別の態様では、本発明は、コレステロール流出活性を有し、（i）配列番号2のアミノ酸残基19～267または25～267と少なくとも90%または少なくとも95%同一性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチドおよび（ii）ApoA-1ミメティックから選択される第1のポリペプチドセグメントと、第1のポリペプチドセグメントに対しカルボキシル末端側に位置する第2のポリペプチドセグメントであって、RNase、パラオキシナーゼ、血小板活性化因子アセチルヒドロラーゼ（PAF-AH）、コレステロールエステル転送タンパク質（CEPT）、レシチン・コレステロールアシルトランスフェラーゼ（LCAT）、および例えば、Aβ特異的scFv等、アミロイドベータに特異的に結合するポリペプチドから選択される第2のポリペプチドセグメントとを含む融合ポリ

50

ペプチドを提供する。一部の実施形態では、第1のポリペプチドセグメントは、配列番号2の残基19～267または25～267に示すアミノ酸配列を有する。一部の変種では、融合ポリペプチドは、第1のポリペプチドセグメントに対しカルボキシル末端側に位置し、第2のポリペプチドセグメントに対しアミノ末端側に位置するリンカーポリペプチドをさらに含む。一部の実施形態では、融合ポリペプチドは、二量体形成ドメインをさらに含む。

【0040】

第2のポリペプチドセグメントとしてRNaseを含む上述の融合ポリペプチドの一部の実施形態では、RNaseは、ヒトRNase 1またはその機能的バリエーションもしくは断片である。ある特定の実施形態では、RNaseは、配列番号4のアミノ酸残基542～675と少なくとも90%または少なくとも95%同一性を有する。特異的な変種では、RNaseは、配列番号4の残基542～675に示すアミノ酸配列を有する。RNaseを含み、上述の式ApoA1-L1-D-L2-Pを有する融合ポリペプチドの特定の実施形態では、融合ポリペプチドは、(i) 配列番号4の残基19～675もしくは25～675または(ii) 配列番号14の残基19～675もしくは25～675と少なくとも90%または少なくとも95%同一性を有するアミノ酸配列を含み；一部のこのような実施形態では、融合ポリペプチドは、(i) 配列番号4の残基19～675もしくは25～675または(ii) 配列番号14の残基19～675もしくは25～675に示すアミノ酸配列を含む。

【0041】

第2のポリペプチドセグメントとしてパラオキシナーゼを含む上述の融合ポリペプチドの一部の実施形態では、パラオキシナーゼは、ヒトパラオキシナーゼ1 (PON1) またはその機能的バリエーションである。ある特定の実施形態では、パラオキシナーゼは、配列番号12のアミノ酸残基16～355、配列番号42のアミノ酸残基16～355、または配列番号44のアミノ酸残基16～355と少なくとも90%または少なくとも95%同一性を有する。特異的な変種では、パラオキシナーゼは、配列番号12の残基16～355、配列番号42の残基16～355、または配列番号44の残基16～355に示すアミノ酸配列を含む。パラオキシナーゼを含み、上述の式ApoA1-L1-D-L2-Pを有する融合ポリペプチドの特定の実施形態では、融合ポリペプチドは、(i) 配列番号28の残基19～883もしくは25～883、(ii) 配列番号38の残基19～873もしくは25～873、(iii) 配列番号46の残基19～883もしくは25～883、または(iv) 配列番号48の残基19～883もしくは25～883と少なくとも90%または少なくとも95%同一性を有するアミノ酸配列を含み；一部のこのような実施形態では、融合ポリペプチドは、(i) 配列番号28の残基19～883もしくは25～883、(ii) 配列番号38の残基19～873もしくは25～873、(iii) 配列番号46の残基19～883もしくは25～883、または(iv) 配列番号48の残基19～883もしくは25～883に示すアミノ酸配列を含む。

【0042】

第2のポリペプチドセグメントとして血小板活性化因子アセチルヒドロラーゼ (PAF-AH) を含む上述の融合ポリペプチドの一部の実施形態では、血小板活性化因子アセチルヒドロラーゼは、ヒトPAF-AHまたはその機能的バリエーションである。ある特定の実施形態では、血小板活性化因子アセチルヒドロラーゼは、配列番号32のアミノ酸残基22～441と少なくとも90%または少なくとも95%同一性を有する。特異的な変種では、パラオキシナーゼは、配列番号32の残基22～441に示すアミノ酸配列を含む。血小板活性化因子アセチルヒドロラーゼを含み、上述の式ApoA1-L1-D-L2-Pを有する融合ポリペプチドの特定の実施形態では、融合ポリペプチドは、配列番号34の残基19～963または25～963と少なくとも90%または少なくとも95%同一性を有するアミノ酸配列を含み；一部のこのような実施形態では、融合ポリペプチドは、配列番号34の残基19～963または25～963に示すアミノ酸配列を含む。

【0043】

第2のポリペプチドセグメントとしてコレステロールエステル転送タンパク質（CETP）を含む上述の融合ポリペプチドの一部の実施形態では、コレステロールエステル転送タンパク質は、ヒトCETPまたはその機能的バリエーションである。ある特定の実施形態では、コレステロールエステル転送タンパク質は、配列番号30のアミノ酸残基18～493と少なくとも90%または少なくとも95%同一性を有する。特異的な変種では、コレステロールエステル転送タンパク質は、配列番号30の残基18～493に示すアミノ酸配列を含む。血小板活性化因子アセチルヒドロラーゼを含み、上述の式ApoA1-L1-D-L2-Pを有する融合ポリペプチドの特定の実施形態では、融合ポリペプチドは、配列番号40の残基19～1019または25～1019と少なくとも90%または少なくとも95%同一性を有するアミノ酸配列を含み；一部のこのような実施形態では、融合ポリペプチドは、配列番号40の残基19～1019または25～1019に示すアミノ酸配列を含む。

10

【0044】

上述の融合ポリペプチドのある特定の実施形態では、融合ポリペプチドは、ミエロペルオキシダーゼ（MPO）阻害剤に連結される。

【0045】

別の態様では、本発明は、第1の融合ポリペプチドおよび第2の融合ポリペプチドを含む二量体タンパク質であって、前記第1および第2の融合ポリペプチドのそれぞれが、上述の通りの二量体形成ドメインを含む融合ポリペプチドである、二量体タンパク質を提供する。

20

【0046】

別の態様では、本発明は、上述の通りの融合ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを提供する。

【0047】

また別の態様では、本発明は、次に挙げる作動可能に連結されたエレメントを含む発現ベクターを提供する：転写プロモーター、上述の通りの融合ポリペプチドをコードするDNAセグメント、および転写ターミネーター。上述の発現ベクターが導入された培養細胞であって、DNAセグメントを発現する細胞も提供される。

【0048】

別の態様では、本発明は、融合ポリペプチドを作製する方法を提供する。本方法は一般に、上述の通りの発現ベクターが導入された細胞を培養するステップであって、細胞がDNAセグメントを発現し、コードされた融合ポリペプチドが産生されるステップと、融合ポリペプチドを回収するステップとを含む。

30

【0049】

さらに別の態様では、本発明は、二量体タンパク質を作製する方法を提供する。本方法は一般に、上述の通りの発現ベクターが導入された細胞を培養するステップであって、細胞がDNAセグメントを発現し、コードされた融合ポリペプチドが二量体タンパク質として産生されるステップと、二量体タンパク質を回収するステップとを含む。

【0050】

別の態様では、本発明は、上述の通りの融合ポリペプチドと、薬学的に許容される担体とを含む組成物を提供する。

40

【0051】

別の態様では、本発明は、上述の通りの二量体タンパク質と、薬学的に許容される担体とを含む組成物を提供する。

【0052】

また別の態様では、本発明は、粥状動脈硬化によって特徴付けられる心血管疾患を処置するための方法を提供する。本方法は一般に、心血管疾患を有する対象に、上述の通りの融合ポリペプチドまたは二量体融合タンパク質の有効量を投与するステップを含む。一部の実施形態では、心血管疾患は、冠動脈心疾患および脳卒中からなる群から選択される。ある特定の変種では、冠動脈心疾患は、急性冠症候群によって特徴付けられる。

50

【0053】

別の態様では、本発明は、神経変性疾患を処置するための方法を提供する。本方法は一般に、神経変性疾患を有する対象に、上述の通りの融合ポリペプチドまたは二量体融合タンパク質の有効量を投与するステップを含む。一部の実施形態では、神経変性疾患は、アルツハイマー病および多発性硬化症からなる群から選択される。ある特定の実施形態では、神経変性疾患は、認知症によって特徴付けられ；一部のこのような変種では、神経変性疾患は、アルツハイマー病である。

【0054】

別の態様では、本発明は、アミロイド沈着物によって特徴付けられる疾患を処置するための方法を提供する。本方法は一般に、アミロイド沈着物によって特徴付けられる疾患を有する対象に、上述の通りの融合ポリペプチドまたは二量体融合タンパク質の有効量を投与するステップを含む。一部の実施形態では、疾患は、アルツハイマー病である。

10

【0055】

別の態様では、本発明は、自己免疫性疾患を処置するための方法を提供する。本方法は一般に、自己免疫性疾患を有する対象に、上述の通りの融合ポリペプチドまたは二量体融合タンパク質の有効量を投与するステップを含む。一部の実施形態では、自己免疫性疾患は、関節リウマチ、全身性エリテマトーデス、多発性硬化症および1型糖尿病からなる群から選択される。

【0056】

さらに別の態様では、本発明は、炎症性疾患を処置するための方法を提供する。本方法は一般に、炎症性疾患を有する対象に、上述の通りの融合ポリペプチドまたは二量体融合タンパク質の有効量を投与するステップを含む。一部の実施形態では、炎症性疾患は、関節リウマチ、全身性エリテマトーデス、多発性硬化症、1型糖尿病、2型糖尿病、肥満、非アルコール性脂肪性肝炎、冠動脈心疾患および脳卒中からなる群から選択される。他の実施形態では、炎症性疾患は、例えば、喘息、慢性閉塞性肺疾患（COPD）、気管支拡張症、特発性肺線維症、過酸素症、低酸素症または急性呼吸促迫症候群等、炎症性肺疾患である。

20

【0057】

また別の態様では、本発明は、感染性疾患を処置するための方法を提供する。本方法は一般に、感染性疾患を有する対象に、上述の通りの融合ポリペプチドまたは二量体融合タンパク質の有効量を投与するステップを含む。ある特定の実施形態では、感染性疾患は、細菌感染によって特徴付けられ；一部のこのような実施形態では、細菌感染は、*Pseudomonas aeruginosa*感染である。

30

【0058】

別の態様では、本発明は、ネフローゼ症候群（NS）を処置するための方法を提供する。本方法は一般に、ネフローゼ症候群を有する対象に、上述の通りの融合ポリペプチドまたは二量体融合タンパク質の有効量を投与するステップを含む。特異的な変種では、対象のネフローゼ症候群は、原発性腎臓疾患（例えば、微小変化型ネフローゼ、巣状糸球体硬化症、膜性腎症またはIgA腎症）、アミロイドーシス、全身性エリテマトーデス、1型糖尿病および2型糖尿病からなる群から選択される疾患に関連する。

40

【0059】

さらに別の態様では、本発明は、硫黄マスタードガスまたは有機リン酸エステルへの曝露を処置するための方法を提供する。本方法は一般に、硫黄マスタードガスまたは有機リン酸エステルに曝露された対象に、上述の通りの融合ポリペプチドまたは二量体融合タンパク質の有効量を投与するステップを含む。

【0060】

また別の態様では、本発明は、がんを処置するための方法を提供する。本方法は一般に、がんを有する対象に、上述の通りの融合ポリペプチドまたは二量体融合タンパク質の有効量を投与するステップを含む。一部の実施形態では、がんは、悪性メラノーマ、腎細胞癌、非小細胞肺癌、膀胱がんおよび頭頸部がんからなる群から選択される。ある特定の

50

変種では、がん処置は、併用療法である。一部の併用療法実施形態では、併用療法は、例えば、抗PD-1/PD-L1治療法、抗CTLA-4治療法またはその両方を含む免疫調節療法等、非Ap0A1媒介性免疫調節療法を含む。他の併用療法実施形態では、併用療法は、放射線療法または化学療法を含む。一部の併用療法実施形態では、併用療法は、標的化療法を含み；一部のこのような実施形態では、標的化療法は、(i) 特異的な細胞表面もしくは細胞外抗原（例えば、VEGF、EGFR、CTLA-4、PD-1またはPD-L1）を標的とする治療用モノクローナル抗体または(ii) 例えば、細胞内酵素（例えば、プロテアソーム、チロシンキナーゼ、サイクリン依存性キナーゼ、セリン/スレオニンタンパク質キナーゼB-Raf (BRAf) またはMEKキナーゼ）等、細胞内タンパク質を標的とする小分子を含む。

10

【0061】

本発明の上述および他の態様は、本発明の次の詳細な説明の参照により明らかとなるであろう。

定義

【0062】

他に定義されていないければ、本明細書に使用されているあらゆる技術および科学用語は、記載されている方法および組成物に係る技術分野の当業者によって一般的に理解されているものと同じ意味を有する。本明細書で使用される場合、他に規定がなければ、次の用語および語句は、それらに帰する意味を有する。

【0063】

用語「a」、「an」および「the」は、文脈がそれ以外のことを明らかに示さない限り、複数の指示対象を含む。

20

【0064】

「ポリペプチド」は、天然に産生されたか合成により産生されたかにかかわらず、ペプチド結合によって連接されたアミノ酸残基のポリマーである。約10個未満のアミノ酸残基のポリペプチドは一般的に、「ペプチド」と称される。

【0065】

「タンパク質」は、1本または複数のポリペプチド鎖を含む高分子である。タンパク質は、炭水化物基等、非ペプチド性成分を含むこともできる。炭水化物および他の非ペプチド性置換基は、タンパク質を産生した細胞によってタンパク質に付加されてよく、細胞の種類により変動するであろう。タンパク質は、そのアミノ酸骨格構造の観点から本明細書において定義されている；炭水化物基等の置換基は一般に、特定されていないが、そうであっても存在し得る。

30

【0066】

用語「アミノ末端」（または「N末端」）および「カルボキシル末端」（または「C末端」）は、ポリペプチド内の位置を表示するように本明細書で使用されている。文脈が許すのであれば、これらの用語は、ポリペプチドの特定の配列または部分を参照しつつ、近接または相対的位置を表示するように使用されている。例えば、ポリペプチド内で参照配列に対しカルボキシル末端側に位置するある特定の配列は、参照配列のカルボキシル末端の近位に位置するが、必ずしも完全ポリペプチドのカルボキシル末端に存在しているとは限らない。

40

【0067】

用語「ポリヌクレオチド」および「核酸」は、本明細書において同義的に使用されており、5'から3'末端へと読まれる、デオキシリボヌクレオチドまたはリボヌクレオチド塩基の一本鎖または二本鎖ポリマーを指す。ポリヌクレオチドは、RNAおよびDNAを含み、天然の供給源から単離しても、in vitroで合成しても、または天然および合成分子の組合せから調製してもよい。ポリヌクレオチドのサイズは、塩基対（「bp」と省略）、ヌクレオチド（「nt」）またはキロベース（「kb」）として表現される。文脈が許すのであれば、後者の2つの用語は、一本鎖または二本鎖のポリヌクレオチドを記載することができる。当業者であれば、二本鎖ポリヌクレオチドの2本の鎖の長さが僅

50

かに異なる場合があり、それらの末端が、酵素による切断の結果としてずらして配置されている場合があり；よって、二本鎖ポリヌクレオチド分子内の全ヌクレオチドが、対形成している必要はないことを認識するであろう。このような対形成していない末端は、一般に、20ntの長さを超えないであろう。

【0068】

「セグメント」は、特定された特質を有するより大型の分子（例えば、ポリヌクレオチドまたはポリペプチド）の部分である。例えば、特定されたポリペプチドをコードするDNAセグメントは、5'から3'方向に読まれると、特定されたポリペプチドのアミノ酸の配列をコードするプラスミドまたはプラスミド断片等、より長いDNA分子の部分である。また、本発明に従った融合ポリペプチドの文脈において、「コレステロール流出活性を有し」および「配列番号2のアミノ酸残基19～267または25～267と少なくとも90%または少なくとも95%同一性を有するアミノ酸配列を含む」ポリペプチドセグメントは、コレステロール流出活性を有する特定されたポリペプチドセグメントに加えて、本明細書に記載されている他のポリペプチドセグメント（例えば、リンカー（複数可）、二量体形成ドメイン）を含む、より長いポリペプチド融合分子の部分である。

10

【0069】

用語「発現ベクター」は、その転写をもたらす追加的なセグメントに作動可能に連結した目的のポリペプチドをコードするセグメントを含む、直鎖状または環状のDNA分子を表示するように使用されている。そのような追加的なセグメントは、プロモーターおよびターミネーター配列を含み、1種または複数の複製起点、1種または複数の選択可能マーカー、エンハンサー、ポリアデニル化シグナル等を含むこともできる。発現ベクターは一般に、プラスミドもしくはウイルスDNAに由来する、またはその両方のエレメントを含有することができる。

20

【0070】

用語「プロモーター」は、その本技術分野で認識されている意味のため、RNAポリメラーゼの結合および転写の開始をもたらすDNA配列を含有する遺伝子の部分を表示するように、本明細書で使用されている。プロモーター配列は、一般的に、遺伝子の5'非コード領域に存在するが、必ずしもそうであるとは限らない。

【0071】

「分泌性シグナル配列」は、より大型のポリペプチドの成分として、これを合成する細胞の分泌性経路を介してこのより大型のポリペプチドを方向づけるポリペプチド（「分泌性ペプチド」）をコードするDNA配列である。より大型のポリペプチドは一般的に、切断されて、分泌性経路の通過の際に分泌性ペプチドを除去する。

30

【0072】

「作動可能に連結された」は、2個またはそれを超える実体が、それらの意図される目的のために協調して機能するように、一体に接続されていることを意味する。DNAセグメントを参照する場合、この語句は、例えば、コード配列が、正しい読み枠で接続されており、転写が、プロモーターにおいて開始し、コードセグメント（複数可）を経てターミネーターまで前進することを示す。ポリペプチドを参照する場合、「作動可能に連結された」は、共有結合により（例えば、ジスルフィド結合による）および非共有結合により（例えば、水素結合、疎水性相互作用または塩橋相互作用による）連結された配列の両方を含み、その場合、配列の所望の機能（複数可）は保持されている。

40

【0073】

用語「組換え」は、例えば、細胞、核酸、タンパク質またはベクターを参照しつつ使用される場合、細胞、核酸、タンパク質またはベクターが、異種核酸もしくはタンパク質の導入またはネイティブ核酸もしくはタンパク質の変更によって修飾されていること、あるいは細胞が、そのように修飾された細胞に由来することを示す。よって、例えば、組換え細胞は、ネイティブ（非組換え）型の細胞内には存在しない遺伝子を発現する、またはそうでなければ異常に発現される、過小発現されるもしくは全く発現されないネイティブ遺伝子を発現する。本明細書における用語「組換え核酸」とは、一般に、自然には正常には

50

存在しない形態における、例えば、ポリメラーゼおよびエンドヌクレアーゼを使用した核酸の操作によって、本来 *in vitro* で形成された核酸を意味する。このようにして、異なる配列の作動可能な連結が達成される。よって、直鎖形態の単離された核酸、または正常では接続されていない DNA 分子のライゲーションによって *in vitro* で形成された発現ベクターは両者共に、本明細書に開示されている目的のため、組換えと考慮される。組換え核酸が作製され、宿主細胞または生物に再導入されると、これは、非組換え的に、すなわち、*in vitro* 操作ではなく宿主細胞の *in vivo* 細胞機構を使用して複製するであろうことが理解される；しかし、このような核酸は、ひとたび組換えにより産生されると、その後非組換え的に複製されても、本明細書に開示されている目的のため、組換えであると依然として考慮される。同様に、「組換えタンパク質」は、組換え技法を使用して、すなわち、上に描写されている組換え核酸の発現により作製されたタンパク質である。

10

【0074】

用語「異種」は、核酸の部分を参照しつつ使用される場合、核酸が、自然において互いに同じ関係性で正常には存在しない2個またはそれを超えるサブ配列 (subsequence) を含むことを示す。例えば、核酸は、典型的には、組換えにより産生され、例えば、新たな機能的核酸を作製するために配置された無関係の遺伝子に由来する2個またはそれを超える配列、例えば、ある供給源由来のプロモーターと、別の供給源由来のコード領域を有する。同様に、「異種」は、タンパク質の部分を参照して使用される場合、タンパク質が、自然において互いに同じ関係性では存在しない2個またはそれを超えるサブ配列 (例えば、融合ポリペプチドの2個のセグメント) を含むことを示す。

20

【0075】

「免疫グロブリン」は、脊椎動物生物において抗体として機能する血清タンパク質である。5クラスの「免疫グロブリン」または抗体、タンパク質 (IgG、IgA、IgM、IgD および IgE) が、高等脊椎動物において同定されている。IgG は、主要クラスを構成する；これは通常、血漿中に存在する2番目に豊富なタンパク質として存在する。ヒトでは、IgG は、IgG1、IgG2、IgG3 および IgG4 と命名される4つのサブクラスからなる。IgG クラスの重鎖定常領域は、ギリシャ記号 γ により識別される。例えば、IgG1 サブクラスの免疫グロブリンは、 $\gamma 1$ 重鎖定常領域を含有する。各免疫グロブリン重鎖は、ある種における所定のサブクラスに対して基本的にインバリエントな、定常領域タンパク質ドメイン (CH1、ヒンジ、CH2 および CH3) からなる定常領域を保有する。ヒトおよび非ヒト免疫グロブリン鎖をコードする DNA 配列は、本技術分野で公知である。例えば、Ellison ら、DNA 1 巻：11～18 頁、1981 年；Ellison ら、Nuc. Acids Res. 10 巻：4071～4079 頁、1982 年；Kenten ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79 巻：6661～6665 頁、1982 年；Seno ら、Nuc. Acids Res. 11 巻：719～726 頁、1983 年；Riechmann ら、Nature 332 巻：323～327 頁、1988 年；Amster ら、Nuc. Acids Res. 8 巻：2055～2065 頁、1980 年；Rusconi および Kohler、Nature 314 巻：330～334 頁、1985 年；Boss ら、Nuc. Acids Res. 12 巻：3791～3806 頁、1984 年；Boothwell ら、Nature 298 巻：380～382 頁、1982 年；van der Loo ら、Immunogenetics 42 巻：333～341 頁、1995 年；Karlin ら、J. Mol. Evol. 22 巻：195～208 頁、1985 年；Kindsvogel ら、DNA 1 巻：335～343 頁、1982 年；Breiner ら、Gene 18 巻：165～174 頁、1982 年；Kondo ら、Eur. J. Immunol. 23 巻：245～249 頁、1993 年；ならびに GenBank 受託番号 J00228 を参照されたい。免疫グロブリン構造および機能の総説については、Putnam、The Plasma Proteins、V 巻、Academic Press, Inc.、49～140 頁、1987 年；および Padlan、Mol. Immunol. 31 巻：169～217 頁、1994 年を参照されたい。

30

40

【0076】

「免疫グロブリンヒンジ」は、CH1 および CH2 ドメインを接続する免疫グロブリン

50

重鎖の部分である。ヒト $\gamma 1$ のヒンジ領域は、およそ E u 残基 216 ~ 230 に対応する。

【0077】

用語「Fc断片」、「Fc領域」または「Fcドメイン」は、本明細書において使用される場合、同義であり、細胞における抗体受容体および補体の C1q 成分への結合の原因となる免疫グロブリンの部分を目指す（このような結合活性を除去するための、天然起源の配列と比べたいかなるアミノ酸変化もなく）。Fc は、「断片結晶性 (fragment crystalline)」の略語であり、タンパク質結晶を容易に形成するであろう抗体の断片である。本来はタンパク質分解性消化によって描写された別個のタンパク質断片により、免疫グロブリンタンパク質の全体的な一般構造を定義することができる。文献において本来定義される通り、Fc断片は、ジスルフィド連結された重鎖ヒンジ領域、CH2 および CH3 ドメインからなる。本明細書において使用される場合、この用語は、CH3、CH2、および第2のこのような鎖とのジスルフィド連結された二量体の形成に十分なヒンジの少なくとも部分からなる単鎖も指す。本明細書において使用される場合、用語 Fc 領域は、天然起源の配列のバリエーションをさらに含み、このバリエーションは、二量体を形成することができ、増加または減少した Fc 受容体結合または補体結合活性を有するようなバリエーションを含むことができる。

10

【0078】

「二量体形成ドメイン」は、本明細書において使用される場合、2個のポリペプチドが生理的条件下で会合して二量体を形成するような、第2のポリペプチドに対し親和性を有するポリペプチドを指す。典型的には、第2のポリペプチドは、同じポリペプチドであるが、一部の変種では、第2のポリペプチドは異なる。ポリペプチドは、共有結合および／または非共有結合的会合（複数可）により互いと相互作用することができる。二量体形成ドメインの例として、Fc 領域；ヒンジ領域；CH3 ドメイン；CH4 ドメイン；CH1 もしくは CL ドメイン；ロイシンジッパードメイン（例えば、jun / fos ロイシンジッパードメイン、例えば、Kostelney ら、J. Immunol., 148 巻：1547 ~ 1553 頁、1992 年を参照；または酵母 GCN4 ロイシンジッパードメイン）；イソロイシンジッパードメイン；二量体形成細胞表面受容体（例えば、インターロイキン-8 受容体 (IL-8R)）；または LFA-1 もしくは GPIIb / IIIa 等のインテグリンヘテロ二量体の二量体形成領域；分泌される二量体形成リガンド（例えば、神経増殖因子 (NGF)、ニューロトロフィン-3 (NT-3)、インターロイキン-8 (IL-8)、血管内皮増殖因子 (VEGF) または脳由来神経栄養因子 (BDNF)）；例えば、Arakawa ら、J. Biol. Chem. 269 巻：27833 ~ 27839 頁、1994 年および Radziejewski ら、Biochem. 32 巻：1350 頁、1993 年を参照）の二量体形成領域；ならびにポリペプチドと少なくとも1個のシステイン残基を含む第2のポリペプチド（以降「合成ヒンジ」）の間にジスルフィド結合（複数可）を形成することができるような、少なくとも1個のシステイン残基（例えば、約1、2または3 ~ 約10個のシステイン残基）を含むポリペプチドが挙げられる。本発明に従って好まれる二量体形成ドメインは、Fc 領域である。

20

30

【0079】

用語「二量体」または「二量体タンパク質」は、本明細書において使用される場合、二量体形成ドメインを介して一体に連結された、本明細書に開示されている2個（「第1の」および「第2の」）融合ポリペプチドの多量体を指す。文脈がそれ以外のことを明らかに示さない限り、「二量体」または「二量体タンパク質」は、二量体形成された第1および第2の融合ポリペプチドと存在し得る別の ApoA-1 ポリペプチドとの相互作用による（例えば、天然起源の内在性 ApoA-1 タンパク質との相互作用による）等、球状 HDL 粒子において形成し得るより高次の多量体（例えば、三量体）の文脈における、このような二量体形成された第1および第2の融合ポリペプチドの参照を含む。この用語は、第1または第2の融合ポリペプチドにおける追加的な二量体形成ドメインの包含によって作製され得るより高次の多量体の文脈における（例えば、免疫グロブリン軽鎖を含む第1

40

50

の融合ポリペプチドと、免疫グロブリン重鎖を含む第2の融合ポリペプチドは、CH1とCLドメインの間の相互作用によりヘテロ二量体形成することができ、2個のこのようなヘテロ二量体は、免疫グロブリン重鎖のFc領域によりさらに二量体形成することができ、これにより、四量体を形成する）、二量体形成された第1および第2の融合ポリペプチドの参照も含む。

【0080】

用語「リンカー」または「ポリペプチドリンカー」は、ペプチド結合（複数可）によって接続され、2個の個別の別々のポリペプチド領域を連結する、2個またはそれを超えるアミノ酸を示すように本明細書で使用されている。リンカーは、典型的には、別々のポリペプチド領域が、それらの別々の機能を行うことを可能にするように設計される（例えば、他のポリペプチド領域に連結された二量体形成ドメインが、別の対応する二量体形成ドメインと会合して、二量体を形成する場合等）。リンカーは、ネイティブ配列、そのバリエーションまたは合成配列の部分となることができる。リンカーはまた、本明細書において、略語「L」を使用して参照される。添字（例えば、「1」または「2」）と「L」の使用は、ポリペプチド鎖内の複数のリンカーを区別するために本明細書で使用されており、このリンカーは、アミノ酸配列に関して同じであっても異なってもよい。

10

【0081】

文脈がそれ以外のことを明らかに示さない限り、本明細書において、「ApoA-1」の参照は、天然起源のApoA-1ポリペプチド、ならびにその機能的バリエーション、機能的断片およびミメティックを含むものと理解される。「ApoA1」、「Apo A-1」、「apoA-1」および「apo A-1」は、本明細書において「ApoA1」と同義に使用される。

20

【0082】

文脈がそれ以外のことを明らかに示さない限り、本明細書において、「RNase」（例えば、「RNase 1」）、「パラオキシナーゼ」（例えば、「PON1」）、「血小板活性化因子アセチルヒドロラーゼ」（「PAF-AH」）、「コレステロールエステル転送タンパク質」（「CETP」）または「レシチン・コレステロールアシルトランスフェラーゼ」（「LCAT」）の参照は、前述のうちいずれかの天然起源のポリペプチド、ならびにその機能的バリエーションおよび機能的断片を含むものと理解される。

【0083】

用語「対立遺伝子バリエーション」は、同じ染色体座を占める遺伝子の2種またはそれを超える代替型のいずれかを表示するように本明細書で使用される。対立遺伝子変種は、突然変異により天然に生じ、集団内に表現型多型をもたらし得る。遺伝子突然変異は、サイレントとなり得る（コードされるポリペプチドに変化なし）、または変更されたアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードし得る。用語、対立遺伝子バリエーションはまた、遺伝子の対立遺伝子バリエーションによってコードされるタンパク質を表示するように本明細書で使用される。

30

【0084】

本開示のApoA-1融合ポリペプチドは、本明細書において、例えば、「ApoA1-L1-D」、「ApoA1-L1-D-L2-P」、「ApoA1-L1-[Fc領域]」、「ApoA1-L1-D-L2-RNase」、「ApoA1-L1-[Fc領域]-L2-RNase1」、「ApoA1-L1-D-L2-パラオキシナーゼ」または「ApoA1-L1-[Fc領域]-L2-PON1」等の式によって参照することができる。このような事例のそれぞれにおいて、文脈がそれ以外を明らかに指示しない限り、融合ポリペプチドの特定のセグメント（例えば、「ApoA1」、「D」（二量体形成ドメインのため）、「L1」（第1のポリペプチドリンカーのため）、「Fc領域」、「RNase」、「パラオキシナーゼ」等）を指す用語は、本明細書におけるそのような用語に帰する意味を有するものと理解され、本明細書に記載されている様々な実施形態を包括する。

40

【0085】

50

本明細書に記載されている通りの対象への可溶性融合ポリペプチドまたは二量体タンパク質の投与による疾患の処置の文脈における用語「有効量」は、疾患の1種または複数の症状の出現の阻害または寛解に十分な、そのような分子の量を指す。例えば、本明細書に記載されている通りの対象への二量体A p o A 1融合タンパク質の投与による自己免疫性疾患の処置の特異的な文脈において、用語「有効量」は、自己免疫性疾患の1種または複数の症状の出現を阻害または寛解することができるような、対象における自己免疫応答のモジュレートに十分な、そのような分子の量を指す。有効量の薬剤は、「有効レジーム (regime)」において本発明の方法に従って投与される。用語「有効レジーム」は、疾患の処置または予防の達成に適切な、投与される薬剤の量および投薬頻度の組合せを指す。

【0086】

10

本明細書に記載されている通りの疾患または障害の処置の文脈における用語「患者」または「対象」は、例えば、ヒトおよび他の霊長類等、哺乳動物を含む。この用語は、例えば、ウシ、ブタ、ヒツジ、ウマ、イヌおよびネコ等、飼い慣らされた動物も含む。

【0087】

用語「併用療法」は、示される治療効果を達成するための、少なくとも2種の別個の治療法の提供が関与する治療レジメンを指す。例えば、併用療法は、2種またはそれを超える化学的に別個の活性成分または薬剤、例えば、本発明に係る可溶性A p o A 1融合ポリペプチドまたは二量体タンパク質、および例えば、別の抗炎症または免疫調節剤等の別の薬剤の投与が関与し得る。あるいは、併用療法は、本発明に係る可溶性A p o A 1融合ポリペプチドまたは二量体タンパク質の、単独での、または別の薬剤と併せた投与と共に、別の治療法（例えば、放射線療法）の送達に関与し得る。併用療法を構成する別個の治療法は、例えば、同時の、重複するまたは逐次の投薬レジメンとして送達することができる。2種またはそれを超える化学的に別個の薬剤の投与の文脈において、活性成分を、同じ組成物の一部としてまたは異なる組成物として投与することができることが理解される。別々の組成物として投与される場合、異なる活性成分を含む組成物は、同じまたは異なる時点で、同じまたは異なる経路により、同じまたは異なる投薬レジメンを使用して投与することができ、これらは全て、要求される特定の文脈の通り、また、担当医によって決定される通りに為される。

20

【0088】

がん処置の文脈における用語「非A p o A 1媒介性免疫調節療法」は、A p o A - 1またはA p o A - 1媒介性シグナル伝達経路を特異的に標的としない免疫調節療法を意味する。

30

【0089】

がん処置の文脈における用語「標的化療法」は、治療剤を使用して、特異的な種類のがん細胞を同定および攻撃し、典型的には、正常細胞には害が少ない、ある種の処置を指す。一部の実施形態では、標的化療法は、がん細胞の成長および伝播に関与する酵素または他の分子の作用を遮断する。他の実施形態では、標的化療法は、免疫系ががん細胞を攻撃するのを助ける、または有毒物質を直接的にがん細胞に送達するのいずれかである。ある特定の変種では、標的化療法は、小分子薬物またはモノクローナル抗体を治療剤として使用する。

40

【0090】

最大一致のために整列されたときに2種のアミノ酸配列のアミノ酸残基が同じである場合、この2種のアミノ酸配列は、「100%アミノ酸配列同一性」を有する。DNA STAR (Madison, Wisconsin) によって生産されているLASERGEN バイオインフォマティクスコンピュータ処理一式に含まれるもの等、標準ソフトウェアプログラムを使用して、配列比較を行うことができる。最適整列を決定することによってアミノ酸配列を比較するための他の方法は、当業者に周知である（例えば、PeruskiおよびPeruski, The Internet and the New Biology: Tools for Genomic and Molecular Research (ASM Press, Inc. 1997年); Wuら（編）、「Information Superhighway and Computer Databases of Nucleic Acids and Proteins」、Methods

50

in Gene Biotechnologyの123～151頁(CRC Press, Inc.1997年); Bishop (編)、Guide to Human Genome Computing (第2版、Academic Press, Inc.1998年)を参照)。2種のアミノ酸配列が、互いに比べて少なくとも80%、少なくとも90%または少なくとも95%配列同一性を有する場合、この2配列は、「実質的配列同一性」を有すると考慮される。

【0091】

パーセント配列同一性は、従来の方法によって決定される。例えば、Altschulら、Bull. Math. Bio. 48巻: 603頁、1986年ならびにHenikoffおよびHenikoff、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89巻: 10915頁、1992年を参照されたい。例えば、ギャップオープニングペナルティ10、ギャップエクステンションペナルティ1、および表1に示す(アミノ酸は、標準1文字コードによって示されている) HenikoffおよびHenikoff、上記参照の「BLOSUM62」スコアリングマトリックスを使用して、2種のアミノ酸配列を整列して、整列スコアを最適化することができる。続いて、次の通りにパーセント同一性が計算される: ([同一マッチの総数] / [長い方の配列の長さプラス2配列を整列するために長い方の配列に導入されたギャップの数]) (100)。

【表1】

表1:BLOSUM62スコアリングマトリックス

	A	R	N	D	C	Q	E	G	H	I	L	K	M	F	P	S	T	W	Y	V
A	4																			
R	-1	5																		
N	-2	0	6																	
D	-2	-2	1	6																
C	0	-3	-3	-3	9															
Q	-1	1	0	0	-3	5														
E	-1	0	0	2	-4	2	5													
G	0	-2	0	-1	-3	-2	-2	6												
H	-2	0	1	-1	-3	0	0	-2	8											
I	-1	-3	-3	-3	-1	-3	-3	-4	-3	4										
L	-1	-2	-3	-4	-1	-2	-3	-4	-3	2	4									
K	-1	2	0	-1	-3	1	1	-2	-1	-3	-2	5								
M	-1	-1	-2	-3	-1	0	-2	-3	-2	1	2	-1	5							
F	-2	-3	-3	-3	-2	-3	-3	-3	-1	0	0	-3	0	6						
P	-1	-2	-2	-1	-3	-1	-1	-2	-2	-3	-3	-1	-2	-4	7					
S	1	-1	1	0	-1	0	0	0	-1	-2	-2	0	-1	-2	-1	4				
T	0	-1	0	-1	-1	-1	-1	-2	-2	-1	-1	-1	-1	-2	-1	1	5			
W	-3	-3	-4	-4	-2	-2	-3	-2	-2	-3	-2	-3	-1	1	-4	-3	-2	11		
Y	-2	-2	-2	-3	-2	-1	-2	-3	2	-1	-1	-2	-1	3	-3	-2	-2	2	7	
V	0	-3	-3	-3	-1	-2	-2	-3	-3	3	1	-2	1	-1	-2	-2	0	-3	-1	4

【0092】

当業者であれば、2種のアミノ酸配列の整列に利用できる多くの確立されたアルゴリズムが存在することを認める。PearsonおよびLipmanの「FASTA」類似性検索アルゴリズムは、本明細書に開示されているアミノ酸配列および第2のアミノ酸配列によって共有される同一性のレベルの試験に適したタンパク質整列方法である。FASTAアルゴリズムは、PearsonおよびLipman、Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 85巻: 2444頁、1988年ならびにPearson、Meth. Enzymol. 183巻: 63頁、1990年によって記載されている。簡潔に説明すると、FASTAはまず、保存的アミノ酸置換、挿入または欠失を考慮することなく、同一性の最高密度(k t u p変数が1の場合)ま

たは同一性の対 ($k t u p = 2$ の場合) のいずれかを有する、問い合わせ配列 (例えば、配列番号 2 の残基 19 ~ 267 または 25 ~ 267) および被験配列によって共有される領域を同定することによって、配列類似性を特徴付ける。次に、同一性の最高密度を有する 10 個の領域が、アミノ酸置換マトリックスを使用して、対形成されたアミノ酸の全ての類似性を比較することにより再度スコアリングされ、領域の末端が、最高スコアに寄与する残基のみを含むように「トリミング」される。「カットオフ」値 (配列の長さおよび $k t u p$ 値に基づく既定の式によって計算される) よりも大きいスコアを有するいくつかの領域が存在する場合、トリミングされた初期領域が試験されて、領域を接続して、ギャップを有するおよその整列を形成することができるか決定する。最後に、2 種のアミノ酸配列の最高スコアリング領域が、アミノ酸挿入および欠失を可能にする Needleman-Wunsch-Sellers アルゴリズム (Needleman および Wunsch, J. Mol. Biol. 48 巻: 444 頁、1970 年; Sellers, SIAM J. Appl. Math. 26 巻: 787 頁、1974 年) の修正版を使用して整列される。FASTA 解析のための説明目的のパラメータは: $k t u p = 1$ 、ギャップオープニングペナルティ = 10、ギャップエクステンションペナルティ = 1 および置換マトリックス = BLOSUM62 である。これらのパラメータは、Pearson, Meth. Enzymol. 183 巻: 63 頁、1990 年の付録 2 に説明される通り、スコアリングマトリックスファイル (「SMATRIX」) を修飾することによって FASTA プログラムに導入することができる。

【0093】

このような値が、「約」X または「およそ」X と表現される場合、記述されている値の X は、 $\pm 10\%$ まで正確であると理解されるであろう。

【図面の簡単な説明】

【0094】

【図 1】図 1 は、ApoA-1 分子およびその組換え融合体による、BHK 細胞培養物におけるコレステロール流出を図解する。ApoA-1 と Fc 領域の間に 26 アミノ酸リンカーを含有する ApoA-1-Fc 融合タンパク質 (ApoA-1 (26) Fc) は、2 アミノ酸リンカーを有する ApoA-1-Fc 融合タンパク質 (ApoA-1 (2) Fc (Theripion)) またはリンカーなしの ApoA-1-Fc 融合タンパク質 (ApoA-1 (0) Fc (Sino Biol)) のいずれかと比較して増加したコレステロール流出を実証し、野生型ヒト ApoA-1 (対照 ApoA-1) と同様の活性を有した。ApoA-1 分子は、ABCA1 発現のために誘導された H3-コレステロール標識 BHK 細胞と共に 2 時間インキュベートした。Fc タンパク質は、二量体であると予測された; しかし、示されている濃度は、分子当たりの ApoA-1 の質量に基づき計算および正規化された。

【0095】

【図 2】図 2 A および図 2 B は、成分機能ドメインを含む、本開示に従った融合タンパク質のある特定の実施形態の模式図を示す。図 2 A は、ヒト IgG Fc 領域へと、リンカーを介してそのカルボキシル末端において接続されたヒト ApoA-1 の略図を描写する (本明細書において、「THER 融合タンパク質」または「THER 分子」とも称される)。図 2 B は、酵素領域へと、リンカーを介してそのカルボキシル末端においてさらに接続された、THER 融合タンパク質の略図を描写する (このような融合体は、本明細書において、「二機能性酵素脂質輸送」または「BELT」分子とも称される; BELT 分子は、本明細書において全般的に、THER 融合タンパク質または分子と称することもできる)。融合タンパク質のカルボキシル末端に存在するリンカー配列およびドメインは、構築物に応じて変動する。

【0096】

【図 3】図 3 は、5 種の異なる THER 分子を発現する一過的にトランスフェクトされた 293T 細胞由来の培養上清 (無血清) のウエスタンブロットを示す。トランスフェクションおよびウエスタンブロット解析は、実施例 3、下記に記載されている通りに行われた。左から右に: 偽 — 偽トランスフェクション陰性対照; CD40 IgG — CD4

10

20

30

40

50

0 I g G DNAトランスフェクション陽性対照；THER0 — 2個のアミノ酸のリンカーを有するApoA1-IgG融合タンパク質；THER2 — 16個のアミノ酸のリンカーを有するApoA1-IgG融合タンパク質；THER4 — 26個のアミノ酸のリンカーを有するApoA1-IgG融合タンパク質；THER6 — 36個のアミノ酸のリンカーを有するApoA1-IgG融合タンパク質；THER4RNA — 36個のアミノ酸のリンカーを有するApoA1-IgG融合タンパク質、これは、ヒトRNase1へと第2の18アミノ酸リンカーを介してさらに連結されている。

【0097】

【図4-1】図4A～図4Eは、THER0（図4A）、THER2（図4B）、THER4（図4C）、THER6（図4D）およびTHER4RNA2（図4E）ApoA1融合タンパク質を発現する安定したCHOクロンの初期スクリーニング、ならびに96ウェル培養上清からの融合タンパク質の相対的発現レベルを要約する円柱グラフを示す（実施例4、下記を参照）。

10

【図4-2】図4A～図4Eは、THER0（図4A）、THER2（図4B）、THER4（図4C）、THER6（図4D）およびTHER4RNA2（図4E）ApoA1融合タンパク質を発現する安定したCHOクロンの初期スクリーニング、ならびに96ウェル培養上清からの融合タンパク質の相対的発現レベルを要約する円柱グラフを示す（実施例4、下記を参照）。

【図4-3】図4A～図4Eは、THER0（図4A）、THER2（図4B）、THER4（図4C）、THER6（図4D）およびTHER4RNA2（図4E）ApoA1融合タンパク質を発現する安定したCHOクロンの初期スクリーニング、ならびに96ウェル培養上清からの融合タンパク質の相対的発現レベルを要約する円柱グラフを示す（実施例4、下記を参照）。

20

【0098】

【図5-1】図5A～図5Cは、培養6および10日後の、その細胞成長パターン（図5A）、相対的細胞生存率（図5B）および融合タンパク質の発現（図5C）を評価する、より高いレベルの融合タンパク質を発現したTHERクロンのサブセットの解析の結果を示す（実施例4、下記を参照）。

【図5-2】図5A～図5Cは、培養6および10日後の、その細胞成長パターン（図5A）、相対的細胞生存率（図5B）および融合タンパク質の発現（図5C）を評価する、より高いレベルの融合タンパク質を発現したTHERクロンのサブセットの解析の結果を示す（実施例4、下記を参照）。

30

【0099】

【図6】図6Aおよび図6Bは、CHOクロン使用済みの（spent）培養上清から精製されたTHER融合タンパク質の非還元（図6A）および還元（図6B）SDS-PAGE解析を示す（実施例4、下記を参照）。

【0100】

【図7】図7は、精製されたTHER融合タンパク質のネイティブPAGEゲル解析を示す。実施例4、下記に記載されている通りに試料を調製し、BLUEネイティブPAGEゲルを泳動し、染色した。

40

【0101】

【図8】図8は、融合タンパク質の抗IgG捕捉およびHRPコンジュゲート抗ApoA1抗体による検出ステップを使用した、サンドイッチELISAにおける異なる融合タンパク質の相対的結合を要約するグラフを示す（実施例5、下記を参照）。

【0102】

【図9】図9は、精製されたApoA1-IgG-RNase二重特異性融合タンパク質（THER4RNA2）の系列希釈の試料に存在するRNase活性を測定する動態酵素アッセイの結果を示す。陽性対照としてRNase A（「RNase」）および陰性対照としてApoA1-lnk26-hIgG（「THER4」）を使用して、実施例6、下記に記載されている通りに、RNASEALERT（商標）アッセイ（IDT、Co

50

ralville, I A) を行った。各ボックスは、RNA の消化により蛍光シグナルを生成する非蛍光 RNA 基質の固定された濃度による、45 分間アッセイの経過における時間の関数として、観察された相対蛍光単位を表す。

【0103】

【図10】図10は、4 pmol / μ l タンパク質希釈における RNase 酵素活性を比較する、図9に示すデータのサブセットを示す。

【0104】

【図11】図11は、精製された融合タンパク質および分化したヒト単球細胞株、THP-1 を使用した、BODIPY-コレステロール流出アッセイの結果を示す。実施例7、下記に記載されている通りに96ウェルプレートフォーマットでアッセイを行い、データを、5回の複製から観察された平均流出として表し、全試料からベースライン流出（培地単独）を減算した。

【0105】

【図12】図12は、マウス単球・マクロファージ細胞株 J774 A. 1 (ATCC、Manassas, VA) を使用したコレステロール流出アッセイの結果を示す。実施例7、下記に記載されている通りに、ベースラインおよび cAMP 刺激流出の両方を評価した。

【発明を実施するための形態】

【0106】

I. 概観

本発明は、コレステロール流出活性を有し、ApoA1 ポリペプチドまたはその機能的バリエーションもしくは断片、あるいは ApoA-1 ミメティックのいずれかである、第1のポリペプチドセグメントを含む融合ポリペプチドに関する組成物および方法を提供する。一部の態様では、融合ポリペプチドは、二量体形成ドメインのアミノ末端側の末端と ApoA-1 ポリペプチド、バリエーション、断片またはミメティックのカルボキシル末端側の末端との間のペプチドリンカーを有する二量体形成ドメインをさらに含み、これにより、融合ポリペプチドが、安定した二量体を形成することを可能にする。他の相互排他的でない態様では、融合ポリペプチドは、ApoA-1 ポリペプチド、バリエーション、断片またはミメティックに対しカルボキシル末端側にあり、第2の生物学的活性を付与する、第2のポリペプチドセグメントをさらに含む二重特異性構築物である。例示的な第2のポリペプチドは、RNase、パラオキシナーゼ、血小板活性化因子アセチルヒドロラーゼ (PAF-AH)、コレステロールエステル転送タンパク質 (CEPT)、レシチン・コレステロールアシルトランスフェラーゼ (LCAT)、およびアミロイドベータに特異的に結合するポリペプチドを含み、これらのいずれも、天然起源のタンパク質またはその機能的バリエーションもしくは断片となることができる。

【0107】

本発明の融合分子を使用して、例えば、対象におけるコレステロール逆転送を増加させて、様々な疾患の処置に治療利益をもたらすことができる。HDL の主要タンパク質である ApoA-1 は、急性冠症候群患者の臨床試験において有益な活性を既に示した。本発明の ApoA-1 融合分子を使用して、冠動脈心疾患、急性冠症候群、および例えば、脳卒中等の粥状動脈硬化によって特徴付けられる他の心血管疾患を処置することができる。本発明の融合分子は、例えば、自己免疫性疾患（例えば、関節リウマチ、全身性エリテマトーデス）、炎症性疾患、2型糖尿病、肥満および神経変性疾患（例えば、アルツハイマー病）の処置にも有用である。一部の実施形態では、本発明の融合タンパク質が使用されて、例えば、1型糖尿病および認知症の処置における等、欠損した ApoA-1 を置き換える。ある特定の変種では、本明細書に開示されている融合タンパク質が使用されて、多発性硬化症 (MS) を処置する。ApoA-1 レベルは、MS 患者において低いことが示されており、ApoA-1 欠損マウスは、MS のモデルである実験的アレルギー性脳脊髄炎 (EAE) において、野生型動物よりも多くの神経変性およびより悪化した疾患を示すことが示された。Meyersら、J. Neuroimmunol. 277 巻：176～185 頁、2014

10

20

30

40

50

年を参照されたい。データは、中枢神経系におけるApoA-1のプラスの神経保護効果をさらに示唆する。Gardnerら、Frontiers in Pharmacology: 2015年11月20日、doi: 10.3389/fphar.2015.00278を参照されたい。

【0108】

いくつかの研究は、自己免疫性疾患に対するApoA-1治療法の使用を支持する。例えば、全身性エリテマトーデス(SLE)患者は、低いHDL-コレステロールレベルを有し、存在するHDLは多くの場合、ApoA-1のミエロペルオキシダーゼ媒介性メチオニン酸化およびチロシン塩素付加によって損傷され、これは、ABCA1依存性コレステロール流出活性の喪失をもたらす。Shaoら、J. Biol. Chem. 281巻: 9001~4頁、2006年; Hewingら、Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 34巻: 779~89頁、2014年を参照されたい。これは、SLE患者に見られる抗炎症特性の喪失および炎症促進性HDLの生成を促進する。Skaggsら、Clin. Immunol. 137巻: 147~156頁、2010年; McMahonら、Arthritis Rheum. 60巻: 2428~2437頁、2009年を参照されたい。ApoA-1に対する自己抗体は、多くのSLE患者に存在し、SLEDAIによって評価されるSLE疾患活動性およびSLICC/ACR損傷指標によって評価されるSLE疾患関連の臓器損傷は、抗ApoA-1抗体と正に相関する。Batuklaら、Ann. NY Acad. Sci. 1108巻: 137~146頁、2007年; Ahmedら、EXCLI Journal 12巻: 719~732頁、2013年を参照されたい。さらに、増加したApoA-1濃度は、ループス易発性SLE1、2、3マウスにおける自己免疫および糸球体腎炎を減弱した。Blackら、J. Immunol. 195巻: 4685~4698頁、2015年を参照されたい。

【0109】

HDLのコレステロール流出能力は、高い疾患活動性を有する関節リウマチ患者においても損なわれ、全身性炎症およびHDL抗酸化活性の喪失と相関する。Charles-Schoemanら、Arthritis Rheum. 60巻: 2870~2879頁、2009年; Charles-Schoemanら、Ann. Rheum. Dis. 71巻: 1157~1162頁、2012年を参照されたい。ApoA-1および再構成されたHDLによるLewisラットにおける関節炎の処置は、急性および慢性の関節炎症を低下させ、マクロファージTLR2発現および活性化を減少させた。Wuら、Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 34巻: 543~551頁、2014年を参照されたい。プラバスタチンと組み合わせたApoA-1ミメティックペプチドD-4Fによるラットにおけるコラーゲン誘導性関節炎の治療法は、疾患活動性を有意に低下させた。Charles-Schoemanら、Clin. Immunol. 127巻: 234~244頁、2008年を参照されたい。

【0110】

本発明の融合分子は、感染性疾患の処置において使用することもできる。感染および内毒血症において、ApoA-1の低下ならびにHDL組成およびサイズの変化を含む、脂質代謝およびリポタンパク質組成の有意な変更が起こる。HDLは、グラム陰性LPSおよびグラム陽性リポテイコ酸に結合しこれを中和し、これらの炎症性産物のクリアランスを促進することができる。薬理学的研究は、細菌感染における組換えApoA-1の利益を支持する。例えば、Pirilloら、Handb Exp Pharmacol. 224巻: 483~508頁、2015年を参照されたい。

【0111】

パラオキシナーゼ(例えば、PON1)を含有する本発明の二機能性ApoA-1融合分子は、グラム陰性細菌であるPseudomonas aeruginosaに感染した患者の治療法に特に有用である。これは、P. aeruginosaによる感染が一般的な、免疫低下した患者に特に重要である。P. aeruginosaは、病原性因子を分泌し、クオラムセンシング(QS)と呼ばれる濃度依存性プロセスにおいて、アシルホモセリンラクトンと呼ばれる小型のシグナル伝達分子に応答してバイオフィームを形成する。パラオキシナーゼ(Paroxonase) 1は、アシルホモセリンラクトンを分解し、内在性PONホモログが存在しないDrosophila melanogasterのト

ランスジェニック *in vivo* モデルにおいて、*P. aeruginosa* による致死性から保護することが示された。Estinら、*Adv. Exp. Med. Biol.* 660巻：183～193頁、2010年を参照されたい。

【0112】

本発明の融合分子は、炎症性疾患の処置において使用することもできる。例えば、本明細書に記載されている *ApoA-1* 融合ポリペプチドおよび二量体タンパク質は、好中球、マクロファージおよび／または抗原提示細胞の表現型を変更して、炎症促進性応答を低下させることができる。本発明の分子は、例えば、*ABCA1* 等のトランスポーター分子によって媒介される、細胞膜からのコレステロールの流出を引き起こす。マクロファージおよび樹状細胞を含む抗原提示細胞からのコレステロールの流出は、これらの細胞によって媒介される炎症促進性応答を阻害し、炎症性サイトカインの産生低下をもたらすことができる。研究は、抗炎症性効果の媒介における *ApoA-1* の利益を支持する。例えば、*ApoA-1* による処置は、脂質ラフトの組成を変更することにより、*CD40* の刺激後に、マクロファージにおける炎症促進性シグナル伝達を阻害することが示された。Yinら、*J. Atherosclerosis and Thrombosis* 19巻：923～36頁、2012年を参照されたい。*ApoA-1* は、脂質ラフトへの *TRAF-6* 動員の減少、および *NF-κB* の活性化の減少を引き起こすことも示された。同文献参照。別の研究は、*ApoA-1* または *ApoA-1* ミメティック *4F* によるヒト単球およびマクロファージの処置が、*LPS* に対するそれらの応答を変更し、炎症性サイトカイン *MCP-1*、*MIP-1*、*RANTES*、*IL-6* および *TNFα* の産生減少をもたらしたが、*IL-10* の産生を増加させたことを示した。Smythiesら、*Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 298巻：C1538～48頁、2010年、doi：1152/ajpcell.00467.2009を参照されたい。別の研究は、*ApoA-1* による処置が、*THP-1* 細胞からの *LPS* 誘導性 *MCP-1* 放出を有意に減少させ、*CD11b* および *VCAM-1* の発現を阻害したことを示した。Wangら、*Cytokine* 49巻：194～2000頁、2010年を参照されたい。よって、*ApoA-1* は、ヒト単球およびマクロファージの活性化および接着を阻害し、抗炎症性表現型への分化による著明な機能変化を誘導する。

【0113】

炎症性肺疾患は、本明細書に記載されている *ApoA-1* 融合分子により処置することができる炎症性疾患の1種である。血清 *ApoA-1* は、アトピーおよび喘息の組合せを有する患者において *FEV1* と正に相関するが、喘息がないアトピー性および非アトピー性対象においては正に相関しないことが見出された。Barochiaら、*Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 191巻：990～1000頁、2015年を参照されたい。別の研究では、特発性肺線維症患者は、対照と比較して ($P < 0.01$)、細気管支洗浄液に低レベルの *ApoA-1* を有した。Kimら、*Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 182巻：633～642頁、2010年を参照されたい。さらに、ブレオマイシンで処置したマウスにおける *ApoA-1* による鼻腔内処置は、肺における炎症性細胞の数およびコラーゲン沈着の低下において非常に有効であった。同文献参照。

【0114】

肥満は、本発明に従った *ApoA-1* 融合分子による処置を受け入れられる別の炎症性疾患である。証拠は、肥満と戦うための *ApoA-1* および *HDL* の使用を支持する。例えば、Mineoら、*Circ. Res.* 111巻：1079～1090頁、2012年を参照されたい。例えば、*ApoA-1* の過剰発現または *ApoA-1* ミメティックペプチド *D-4F* の投与は、高脂肪食を与えたマウスにおいて、白色脂肪質量およびインスリン抵抗性を減少させ、エネルギー支出を増加させることが示された。さらに、*ob/ob* マウスにおいて、*ApoA-1* ミメティック *L-4F* は、脂肪症および炎症を低め、耐糖能を改善することが示された。同文献 (Id.)。

【0115】

本発明に従った *ApoA-1* 融合分子により処置することができるな別々の障害は、患者における心血管疾患のより高いリスクを伴うネフローゼ症候群 (*NS*) である。濾過可

10

20

30

40

50

能なHDL（すなわち、HDL3）の尿中消耗および脂質が不十分なapoA1は、ネフローゼ症候群患者の共通の特色である。これは、典型的には、腎近位尿細管におけるキュブリン（cubulin）／メガリン受容体を介したこれらの分子の再取り込み減少によるものである。Barthら、Trends Cardiovasc. Med. 11巻：26～31頁、2001年を参照されたい。本明細書に記載されているFc領域を含むapoA-1融合分子は、Fcドメインの存在によりFcRnを介してリサイクルされているため、この通常の様式における再取り込みの必要を迂回するであろう。

【0116】

本明細書に記載されている融合分子は、がん患者の治療法に使用することもできる。本発明のapoA-1融合ポリペプチドおよび二量体タンパク質が、炎症促進性応答を低下させつつ、CD8⁺T細胞の活性化および腫瘍浸潤を増強することが予想される。研究は、がんの動物モデルにおけるapoA-1治療法の有効性を支持し、apoA-1治療法が、腫瘍におけるCD8⁺T細胞の特異的な増加を引き起こし得ることを示した。例えば、Zamanian-Daryoushら、J. Biol. Chem. 288巻：21237～21252頁、2013年を参照されたい。一部の態様では、本発明のapoA-1融合分子は、例えば、抗がん免疫療法等、1種または複数の他の抗がん療法との組合せにおいて有用である。

【0117】

ある特定の態様では、本発明は、二量体形成ドメイン（例えば、Fcドメイン）とapoA-1ポリペプチドまたはその機能的バリエーション、断片もしくはミメティックのC末端の間に可動性リンカーを配置することにより、活性apoA-1二量体を安定化する仕方を提供する一方で、プレーベータ粒子から円盤状粒子および球状粒子への成熟化の制御も行う。リンカーを含有しない以前のapoA-1-Ig分子は、野生型apoA1と比較して、コレステロール流出アッセイにおける低い活性を示す。対照的に、本発明の二量体形成融合ポリペプチドは、コレステロール流出アッセイにおいてapoA-1活性を保持し、例えば、二量体形成ドメインに対しC末端へのRNase（例えば、RNase 1）または他のポリペプチドセグメントの融合等のさらなる改善も可能にする。ある特定の好まれる実施形態では、二量体形成ドメインとしてのFc領域の使用も、二量体の半減期増加を可能にする。

【0118】

理論による制約を意図するものではないが、リンカーの長さが、コレステロールを吸収するにつれて拡大する安定したapoA-1二量体の能力を制御することが考えられる。本発明は、apoA-1ポリペプチドまたはそのバリエーション、断片もしくはミメティックのC末端と例えば、Fcドメイン等の二量体形成ドメインのN末端の間に可動性リンカーを含有するapoA-1融合分子を提供する。リンカーは、apoA-1またはその機能的バリエーション、断片もしくはミメティックが、コレステロール逆転送（RCT）における初期のかつ重大な意味を持つステップである、細胞からのコレステロール流出を媒介することを可能にするのに十分な長さのものである。リンカーは、典型的には、2～60アミノ酸の間の長さである。代替的なリンカーの長さを有するapoA-1融合分子は、apoA-1のC末端の制約によりHDL粒子の成熟化を制御することにより、別個の機能特性を有することが考えられる。中間サイズのHDL円盤状粒子は、改善された粥状保護特性を有することができ、改善されたCNS輸送特性を有することができる。本発明の分子は、このような中間円盤状ステージにおけるHDL成熟化の進行を変化させ、これにより、野生型apoA-1タンパク質と比べて、本発明の融合タンパク質の有効性を改善することができる。本発明の分子は、三量体apoA-1粒子で構成された球状HDL粒子の構造および組成に影響を与える可能性がある（Silvaら、Natl. Acad. Sci. USA 105巻：12176～12181頁、2008年を参照）。本発明の分子は、より大型の球状HDL粒子の形成において天然apoA-1と相互作用する可能性がある。

【0119】

ある特定の実施形態では、二量体形成ドメインは、免疫グロブリンFc領域である。本発明のapoA-1-Fc融合分子は、apoA-1コレステロール逆流出を保持し、大

10

20

30

40

50

規模な脂質製剤化の必要性を排除しながら、ApoA-1半減期を延長する。加えて、Fc領域の存在は、抗体およびFc融合タンパク質製造における標準的な慣例に従って、固定化されたプロテインAを使用した精製を可能にする。

【0120】

ApoA-1の構造研究（例えば、Gogonea、Frontiers Pharmacol. 6巻：318頁、2016年を参照されたい）は、ApoA-1が、脂質不含単量体からより高次の形態へと成熟するにつれて、複数の立体構造を仮定することを示す。小角中性子散乱（SANS）に由来する近年のデータは、スーパーダブルヘリックス（DSH）モデルと呼ばれる、脂質コアを取り巻く開放型立体配置のApoA-1二量体の低分解能構造を示す。SANS研究による他の構造は、脂質コアの組成に応じて、異なる開放型立体配置のApoA-1を示す；これらの構造において、ApoA-1単量体のC末端は、互いと比べて異なる位置にある。同様に、第3のApoA-1単量体を取り込む球状ApoA-1粒子は、二量体円盤状ApoA-1における位置と比較して、異なる位置における各単量体のC末端を示す。例えば、Gogonea、上記を参照されたい。本開示の可動性リンカーは、ApoA-1が立体構造制約なしでこれらの位置を仮定するのに十分な長さのものである。

10

【0121】

ある特定の実施形態では、本発明のApoA-1- [リンカー] - [二量体形成ドメイン] 分子は、二量体形成ドメインに対しカルボキシル末端に融合された追加的なポリペプチドセグメントを含む。このような変種は、ApoA-1機能活性および第2の生物学的活性を有する二重特異性分子の作製を可能にする。

20

【0122】

本発明の一部の態様では、(i) コレステロール逆転送活性を有し、ApoA1ポリペプチドまたはその機能的バリエーションもしくは断片、あるいはApoA1ミメティックのいずれかである、第1のポリペプチドセグメントと、(ii) 第1のポリペプチドセグメントに対しカルボキシル末端にある第2のポリペプチドセグメントであって、RNase、パラオキシナーゼ、血小板活性化因子アセチルヒドロラーゼ（PAF-AH）、コレステロールエステル転送タンパク質（CEPT）、レシチン・コレステロールアシルトランスフェラーゼ（LCAT）、およびアミロイドベータに特異的に結合するポリペプチドから選択される第2のポリペプチドセグメントとを含む、二重特異性融合分子が提供される。このような第2のポリペプチドは、天然起源のタンパク質またはその機能的バリエーションもしくは断片となることができる。一部の実施形態では、リンカーおよび二量体形成ドメインが、上に要約されている第1および第2のポリペプチドの間に含まれる。代替的な実施形態では、融合ポリペプチドは、二量体形成ドメインを欠く。

30

【0123】

Fc領域を欠く本ApoA-1融合分子の一部の実施形態では、融合分子は、PEGにコンジュゲートして、延長された半減期をもたらすことができる。このような変種は、例えば、RNase、パラオキシナーゼ、血小板活性化因子アセチルヒドロラーゼ（PAF-AH）、コレステロールエステル転送タンパク質（CEPT）、レシチン・コレステロールアシルトランスフェラーゼ（LCAT）、またはアミロイドベータに特異的に結合するポリペプチドを含む融合分子等、本明細書に記載されている二重特異性分子を含むことができる。

40

【0124】

上に要約されている二重特異性分子の一部の実施形態では、第2のポリペプチドセグメントは、RNaseである。好まれるRNaseは、ヒトRNase 1またはその機能的バリエーションもしくは断片である。特定の変種では、RNaseは、細胞質阻害剤による阻害に対するその感受性を保持し、細胞にとって非常に低い毒性を有するが、細胞外で高度に活性がある。RNaseは、炎症性細胞外RNAの消化による抗炎症特性を有し、心血管疾患（例えば、冠動脈疾患、脳卒中）、自己免疫性疾患、炎症性疾患、2型糖尿病、感染性疾患および神経変性疾患（例えば、アルツハイマー病）を含む様々な疾患の処置のための追加的な治療利益をもたらす。

50

【0125】

例えば、本明細書に記載されているRNaseセグメントを含む二重特異性ApoA-1融合分子は、例えば、炎症性肺疾患等、例えば、炎症性疾患の処置に使用することができる。一研究は、RNAセンサーであるTLR3が、ウイルス性病原体の非存在下におけるARDS様病理の発症において主要な役割を有することを示した。Murrayら、Am. J.

Respir. Crit. Care Med. 178巻：1227～1237頁、2008年を参照されたい。酸素療法は、ARDSにおける主要な治療介入であるが、さらなる肺損傷およびウイルス感染に対する感受性に寄与する。酸素療法は、培養されたヒト上皮細胞における増加したTLR3発現および活性化のための主要な刺激であり、TLR3の非存在または遮断は、高酸素条件への曝露後の肺傷害および炎症からマウスを保護した。Murrayら、上記参照。別の研究は、細胞外RNAによるTLR3活性化が、急性低酸素に応答して起こり、RNaseAによるマウスにおける治療法が、急性低酸素後の肺炎症を縮小したことを示した。Biswasら、Eur. J. Immunol. 45巻：3158～3173頁、2015年を参照されたい。本明細書に記載されているRNaseセグメントを含む二重特異性ApoA-1融合分子は、例えば、全身性エリテマトーデス（SLE）等、例えば、自己免疫性疾患の処置に使用することもできる。研究は、例えば、SLE疾患病理発生におけるTLR7を含むRNA免疫複合体およびRNA受容体の役割、ならびにSLEのマウスモデルにおけるRNase過剰発現の保護効果を示す。例えば、Sunら、J. Immunol. 190巻：2536～2543頁、2013年を参照されたい。

10

【0126】

上に要約されている二重特異性分子の他の実施形態では、第2のポリペプチドセグメントは、パラオキシナーゼである。好まれるパラオキシナーゼは、ヒトパラオキシナーゼ1（PON1）またはその機能的バリエーションもしくは断片である。パラオキシナーゼ二重特異性融合分子は、例えば、その粥状保護、抗酸化、抗炎症および／または神経保護特性によるものを含む、ApoA-1媒介性治療法を受け入れられる疾患の処置のための追加的な治療利益をもたらす。一部の代替的な実施形態では、PON1は、ApoA-1に対するその天然の高い親和性結合により、本発明のApoA-1融合分子に取り付けることができ、その結合は、PON1のTy r 71によって媒介される（Huangら、J. Clin. Invest. 123巻：3815～3828頁、2013年を参照）。投与に先立つ組換えまたは天然PON1とApoA-1融合分子とのインキュベートは、ApoA-1融合分子へのPON1の「負荷」に十分であろう。

20

30

【0127】

本明細書に記載されているパラオキシナーゼセグメントを含む二重特異性ApoA-1融合分子は、例えば、自己免疫性疾患または炎症性疾患の処置に使用することができる。例えば、研究は、全身性エリテマトーデス（SLE）等、自己免疫性疾患の処置のためのパラオキシナーゼの使用を支持する。多くの全身性エリテマトーデス（SLE）患者における自己抗体力価は、PON1の活性の喪失と相関し（Batuklaら、Ann. NY Acad. Sci. 1108巻：137～146頁、2007年を参照）、SLEDAIによって評価されるSLE疾患活動性およびSLICC/ACR損傷指標によって評価されるSLE疾患関連の臓器損傷は、PON1活性とマイナスに相関する（Ahmedら、EXCLI Journal 12巻：719～732頁、2013年を参照）。PON1活性は、SLE患者において有意に低下し、粥状動脈硬化のリスク因子である。Kissら、Ann. NY Acad. Sci. 108巻：83～91頁、2007年を参照されたい。加えて、他の研究は、炎症性肺疾患等、炎症性疾患の処置のためのパラオキシナーゼの使用を支持する。一研究は、喘息、慢性閉塞性肺疾患（COPD）および気管支拡張症を含む、硫黄マスタードガス（SM）に曝露してからかなり経った後の後期（late）肺疾患の患者が、細気管支洗浄液において有意に低下したレベルのPON1を有する（ $p < 0.0001$ ）ことを示した。Golmaneshら、Immunopharmacol. Immunotoxicol. 35巻：419～425頁、2013年を参照されたい。別の研究は、20年前にSMに曝露したイラン人の退役軍人が依然として、PON1活性の有意に低い血清レベルを有し、低いPON1が、肺疾患重症度と相関したことを示し

40

50

た。Taravatiら、Immunopharmacol. Immunotoxicol. 34巻：706～713頁、2012年を参照されたい。

【0128】

本明細書に記載されているRNaseセグメントまたはパラオキシナーゼセグメントのいずれかを含む二重特異性ApoA-1融合分子は、例えば、神経学的疾患の処置に使用することもできる。このような二重特異性分子は、脳に輸送され、そこで、保護性パラオキシナーゼまたはRNase酵素を送達する。例えば、PON1は、その抗酸化特性のため、脳において保護性であり、RNaseは、TLR7および他のRNA受容体の刺激により炎症を促進する細胞外RNAを消化することにより保護性である。本発明のApoA-1/パラオキシナーゼまたはApoA1/RNase二重特異性分子を使用した処置を受け入れられる例示的な神経学的疾患は、多発性硬化症、パーキンソン病およびアルツハイマー病を含む。

10

【0129】

本発明のApoA-1融合分子へのミエロペルオキシダーゼ(MPO)阻害剤の取り付けは、MPOによって媒介される酸化による不活性化からApoA-1を保護する仕方として特に望ましくなることができ、PON1等のパラオキシナーゼを含む二重特異性融合ポリペプチドの文脈においては、MPO媒介性酸化および不活性化からパラオキシナーゼを同様に保護することもできる。ApoA-1のミエロペルオキシダーゼ媒介性酸化は、ApoA-1の架橋を促進し、in vivoでアテローム硬化性プラークにおいてアミロイド沈着をもたらす機構に関係づけることができる。Chanら、J. Biol. Chem. 290巻：10958～71頁、2015年を参照されたい。MPO阻害剤の総説については、Malleら、Br J Pharmacol. 152巻：838～854頁、2007年を参照されたい。本発明の分子へのMPO阻害剤の取り付けは、MPO阻害を局在化して、抗菌活性において重要なMPO活性を保存しつつ、酸化からApoA-1を選択的に保護することもできる。

20

【0130】

上に要約されている二重特異性分子の他の実施形態では、第2のポリペプチドセグメントは、コレステロールエステル転送タンパク質(CEETP)およびレシチン・コレステロールアシルトランスフェラーゼ(LCAT)から選択される。CEETPは、HDL粒子が、特に、コレステロールを取り外しLDLに転移し、続いてLDL受容体を介して肝臓にコレステロールを戻し輸送することにより、コレステロール逆転送(RCT)のプロセスにおいて肝臓にコレステロールを送達することができる、主要な機構の1種に参与する。この取り外しプロセスは、CEETPを必要とする。本明細書に提供されるもの等、改善されたApoA-1分子の送達によりRCT経路の初期部分を改善することにより、他のRCT成分の付加は、魅力的なかつ潜在的に相乗的な治療アプローチをもたらすことができる。ApoA-1を含有する二重特異性融合分子の形態でより多くの外因的CEETPを提供することは、CEETP活性および全体的コレステロール逆転送を増強することができる。

30

【0131】

LCATを含有する二重特異性融合体は、内在性CEETPを増強する代替手段をもたらすことができる。レシチン・コレステロールアシルトランスフェラーゼ(LCAT)は、HDLに会合し、遊離コレステロールをコレステリルエステルに変換し、続いてこれをHDL粒子内に隔離し、その球形の形成を可能にする酵素である。LCATを欠くマウスに与えたヒト組換えLCATは、HDL-Cレベルを有意に改善し、ヒトApoA-1トランスジェニックマウスに与えた場合、HDL-Cの増加は8倍であり、相乗作用を示唆する。Roussetら、J Pharmacol Exp Ther. 335巻：140～8頁、2010年を参照されたい。Fcへの組換えヒトLCAT融合が報告されており(Spahrら、Protein Sci. 22巻：1739～53頁、2013年を参照)、ApoA-1およびLCATの両方を含有する二重特異性分子は、どちらか単独の単一特異性タンパク質よりも効率的にRCTを改善することもできる。

40

50

【0132】

上に要約されている二重特異性分子の他の実施形態では、第2のポリペプチドセグメントは、アミロイドベータ ($A\beta$) に特異的に結合するポリペプチドである。特異的な変種では、第2のポリペプチドは、例えば、 $A\beta$ 特異的 $scFv$ 等、 $A\beta$ 特異的単鎖抗体である。アミロイドベータペプチドに特異的な $scFv$ は、例えば、Cattepoelら、PLoS One 6巻：e18296頁、2011年によって記載されている。このような実施形態では、 $A\beta$ 結合ポリペプチドは、典型的に、 $apoA-1$ に対しC末端に、または存在する場合は二量体形成ドメインに対しC末端に融合される。この二重特異性融合分子は、アルツハイマー病患者の治療法のための改善された特性を有する。

II. 融合ポリペプチドおよび二量体タンパク質

10

【0133】

したがって、一態様では、本発明は、アミノ末端位置からカルボキシル末端位置へと、 $apoA1-L1-D$ を含む融合ポリペプチドであって、式中、 $apoA1$ は、コレステロール流出活性を有する第1のポリペプチドセグメントであり、これは、(i)天然起源の $apoA-1$ ポリペプチドまたはその機能的バリエーションもしくは断片および(ii) $apoA-1$ ミメティックから選択され； $L1$ は、第1のポリペプチドリンカーであり； D は、二量体形成ドメインである、融合ポリペプチドを提供する。一部の実施形態では、融合ポリペプチドは、二量体形成ドメインに対しカルボキシル末端側に位置する第2のポリペプチドセグメントをさらに含む。特定の変種では、第2のポリペプチドセグメントは、(a)天然起源のRNase、パラオキシナーゼ、血小板活性化因子アセチルヒドロラーゼ ($PAF-AH$)、コレステロールエステル転送タンパク質 ($CETP$) もしくはレシチン・コレステロールアシルトランスフェラーゼ ($LCAT$)；(b)(a)に特定されている天然起源のタンパク質のいずれかの機能的バリエーションもしくは断片；または(c)例えば、 $A\beta$ 特異的 $scFv$ 等、アミロイドベータ ($A\beta$) に特異的に結合するポリペプチドである。第2のポリペプチドセグメントを含むこのような融合ポリペプチドは、式 $apoA1-L1-D-L2-P$ (アミノ末端位置からカルボキシル末端位置へと)によって表すことができ、式中、 $apoA1$ 、 $L1$ および D はそれぞれ、以前に定義された通りであり、 $L2$ は、第2のポリペプチドリンカーであり、任意選択で存在し、 P は、第2のポリペプチドセグメントである。

20

【0134】

30

別の態様では、本発明は、コレステロール流出活性を有する第1のポリペプチドセグメントであって、(i)天然起源の $apoA-1$ ポリペプチドまたはその機能的バリエーションもしくは断片および(ii) $apoA-1$ ミメティックから選択される第1のポリペプチドセグメントと、第1のポリペプチドセグメントに対しカルボキシル末端側に位置する第2のポリペプチドセグメントであって、(a)天然起源のRNase、パラオキシナーゼ、血小板活性化因子アセチルヒドロラーゼ ($PAF-AH$)、コレステロールエステル転送タンパク質 ($CETP$) もしくはレシチン・コレステロールアシルトランスフェラーゼ ($LCAT$)；(b)(a)に特定されている天然起源のタンパク質のいずれかの機能的バリエーションもしくは断片；または(c)例えば、 $A\beta$ 特異的 $scFv$ 等、アミロイドベータ ($A\beta$) に特異的に結合するポリペプチドである第2のポリペプチドセグメントとを含む融合ポリペプチドを提供する。一部の態様では、融合ポリペプチドは、第1のポリペプチドセグメントに対しカルボキシル末端側に位置し、第2のポリペプチドセグメントに対しアミノ末端側に位置するリンカーポリペプチドをさらに含む。一部の実施形態では、融合ポリペプチドは、例えば、第1のポリペプチドセグメントに対しカルボキシル末端側に位置し、第2のポリペプチドセグメントに対しアミノ末端側に位置する二量体形成ドメインをさらに含む。

40

【0135】

上に特定されている特定の天然起源のタンパク質の機能的バリエーションは、天然タンパク質に対応する関連性のある生物学的または生化学的活性に関してバリエーションを評価するためのルーチンアッセイを使用して容易に同定することができる。例えば、 $apoA-1$ の

50

場合は、バリエーションは、本明細書に記載されているもの等、公知のコレステロール流出アッセイを使用して、コレステロール流出を誘導するその能力に関してアッセイすることができる。例えば、Tangら、J Lipid Res. 47巻：107～14頁、2006年を参照されたい。ヒトRNase 1等、RNaseの場合は、バリエーションは、リボヌクレアーゼ活性を評価するための公知のアッセイによって、一本鎖または二本鎖RNAを消化するその能力に関してアッセイすることができる。例えば、LibonatiおよびSorrentino、Methods Enzymol. 341234～248頁、2001年を参照されたい。パラオキシナーゼ1 (PON1) バリエーションは、基質としてジエチルp-リン酸ニトロフェノール (パラオクソン) を使用してホスホトリエステラーゼ活性に関して、または基質として酢酸フェニルを使用してアリアルエステラーゼ活性に関してアッセイすることができる。例えば、GravesおよびScott、Curr Chem Genomics 2巻：51～61頁、2008年を参照されたい。関連性のあるCETPおよびLCAT活性を評価するためのアッセイも公知である。例えば、LCATおよびCETP酵素活性を測定するためのアッセイは、市販されており、例えば、LCATについてはCell Biolabs Cat. No. STA-615、Sigma-Aldrich Cat. No. MAK107およびRoar Biomedical Cat. No. RB-LCAT、ならびにCETPについてはAbcam Cat. No. ab65383およびSigma-Aldrich Cat. No. MAK106を含む。

【0136】

Aβ結合活性の場合は、例えば、単鎖抗体等のポリペプチドは、様々な公知のアッセイのいずれかを使用して、結合活性に関して評価することができる。例えば、あるアッセイ系は、市販のバイオセンサー機器 (BIAcore (商標)、Pharmacia Biosensor、Piscataway, NJ) を用い、それによると、結合タンパク質 (例えば、抗体等のAβ結合候補) が、センサーチップの表面に固定化され、可溶性抗原 (例えば、Aβペプチド) を含有する被験試料が、セルを通過させられる。固定化されたタンパク質は、抗原に対し親和性を有する場合、抗原に結合し、媒体の屈折率に変化を引き起こし、これは、金膜の表面プラズモン共鳴の変化として検出されるであろう。この系は、オンおよびオフレートの設定を可能にし、そこから結合親和性を計算することができ、結合の化学量論の評価ができる。この機器の使用は、例えば、Karlsson (J. Immunol. Methods 145巻：229～240頁、1991年) ならびにCunninghamおよびWells (J. Mol. Biol. 234巻：554～563頁、1993年) によって開示されている。Aβ結合ポリペプチドは、本技術分野で公知の他のアッセイ系内で使用することもできる。そのような系は、結合親和性の決定のためのScatchard解析 (Scatchard, Ann. NY Acad. Sci. 51巻：660～672頁、1949年を参照) および熱量測定アッセイ (Cunninghamら、Science 253巻：545～548頁、1991年; Cunninghamら、Science 254巻：821～825頁、1991年を参照) を含む。

【0137】

本発明に従った使用のための天然起源のポリペプチドセグメント (例えば、天然起源のApoA-1ポリペプチド、RNase、パラオキシナーゼまたは血小板活性化因子アセチルヒドロラーゼ) は、例えば、本開示と一貫した対立遺伝子バリエーションおよび種間ホモログ等、天然起源のバリエーションを含む。

【0138】

特定の参照ポリペプチド (例えば、野生型ヒトApoA-1) の機能的バリエーションは一般に、参照ポリペプチドと比べて1個または複数のアミノ酸置換、欠失または付加を有するものとして特徴付けられる。これらの変化は、好ましくは、主要でない性質のものであり、これは、保存的アミノ酸置換 (例えば、いくつかの例示的な保存的アミノ酸置換を収載する表2、下記を参照されたい) およびタンパク質またはポリペプチドのフォールディングまたは活性に有意に影響を与えない他の置換; 小型の欠失、典型的には、1～約30アミノ酸の; ならびにアミノ末端メチオニン残基等、小型のアミノもしくはカルボキシル末端伸長、小型のリンカーペプチド、またはポリヒスチジントラクト (tract)、プロテ

インA (Nilssonら、EMBO J. 4巻：1075頁、1985年；Nilssonら、Methods Enzymol. 198巻：3頁、1991年)、グルタチオンSトランスフェラーゼ (SmithおよびJohnson、Gene 67巻：31頁、1988年)、もしくは他の抗原性エピトープもしくは結合ドメイン等、精製を容易にする小型の伸長 (親和性タグ) である (全般的には、Fordら、Protein Expression and Purification 2巻：95～107頁、1991年を参照)。親和性タグをコードするDNAは、商業的供給業者 (例えば、Pharmacia Biotech、Piscataway、NJ) から入手することができる。保存的置換は、次から選択することもできる：1) アラニン、グリシン；2) アスパラギン酸、グルタミン酸；3) アスパラギン、グルタミン；4) アルギニン、リシン；5) イソロイシン、ロイシン、メチオニン、バリン；6) フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン；7) セリン、スレオニン；および8) システイン、メチオニン (例えば、Creighton、Proteins (1984年) を参照されたい)。

【表2】

表2:保存的アミノ酸置換

塩基性	酸性	極性	疎水性	芳香族	小型
アルギニン	グルタミン酸	グルタミン	ロイシン	フェニルアラニン	グリシン
リシン	アスパラギン酸	アスパラギン	イソロイシン	トリプトファン	アラニン
ヒスチジン			バリン メチオニン	チロシン	セリン スレオニン メチオニン

【0139】

天然起源のポリペプチドにおける必須アミノ酸は、部位特異的突然変異誘発またはアラニンスキニング突然変異誘発等、本技術分野で公知の手順に従って同定することができる (CunninghamおよびWells、Science 244巻：1081～1085頁、1989年；Bassら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88巻：4498～4502頁、1991年)。後者の技法では、単一のアラニン突然変異が、分子中の全ての残基に導入され、その結果得られる突然変異体分子が、生物学的活性 (例えば、Ap o A-1 バリエーションのコレステロール流出) に関して検査されて、分子の活性にとって重大な意味を持つアミノ酸残基を同定する。加えて、関連性のあるタンパク質相互作用の部位は、核磁気共鳴、結晶学または光親和性標識等の技法によって決定される結晶構造の解析によって決定することができる。必須アミノ酸の同一性は、関連タンパク質 (例えば、同じタンパク質機能を保持する種オルソログ) との相同性の解析から推論することもできる。

【0140】

Reidhaar-OlsonおよびSauer、Science 241巻：53～57頁、1988年またはBo wieおよびSauer、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86巻：2152～2156頁、1989年によって開示されている方法等、突然変異誘発およびスクリーニングの公知の方法を使用して、複数のアミノ酸置換を作製し検査することができる。簡潔に説明すると、これらの著者らは、ポリペプチドにおける2個またはそれを超える位置を同時にランダム化し、機能的ポリペプチドを選択し、続いて突然変異誘発されたポリペプチドを配列決定して、各位置における許容可能な置換の範囲を決定するための方法を開示する。使用することができる別の方法は、領域指定突然変異誘発である (Derbyshireら、Gene 46巻：145頁、1986年；Nerら、DNA 7巻：127頁、1988年)。

【0141】

バリエーションヌクレオチドおよびポリペプチド配列は、DNAシャッフリングにより生成することもできる（例えば、Stemmer、Nature 370巻：389頁、1994年；Stemmer、Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 91巻：10747頁、1994年；国際公開番号WO97/20078を参照）。簡潔に説明すると、バリエーションDNA分子は、親DNAをランダムに断片化し、続いてPCRを使用して再集合し、ランダムに導入された点突然変異をもたらすことによる、*in vitro*相同組換えによって生成される。この技法は、対立遺伝子バリエーションまたは異なる種由来のDNA分子等、親DNA分子のファミリーを使用することにより修飾して、このプロセスに追加的な可変性を導入することができる。所望の活性の選択またはスクリーニングと、続く突然変異誘発およびアッセイの追加的な反復は、望ましい突然変異を選択しつつ、同時に有害な変化を除外選択することにより、配列の急速な「進化」をもたらす。

10

【0142】

以前に記述された通り、本発明に従ったポリペプチド融合体は、特定のポリペプチドの「機能的断片」に対応するポリペプチドセグメントを含むことができる。核酸分子のルーチンの欠失解析を行って、所定のポリペプチドをコードする核酸分子の機能的断片を得ることができる。例証として、配列番号1の残基70～816のヌクレオチド配列を有するApoA-1コードDNA分子は、Bal31ヌクレアーゼで消化して、一連のネステッド（nested）欠失を得ることができる。次に、断片を適正な読み枠で発現ベクターに挿入し、発現されたポリペプチドを単離し、コレステロール流出を誘導する能力に関して検査する。エキソヌクレアーゼ消化の代替の1つは、オリゴヌクレオチド指定突然変異誘発を使用して、欠失または終止コドンを導入して、所望の断片の産生を特定することである。あるいは、ポリペプチドをコードする遺伝子の特定の断片は、ポリメラーゼ連鎖反応を使用して合成することができる。

20

【0143】

したがって、上に記す等の方法を使用して、当業者は、（i）参照ポリペプチド（例えば、ヒト野生型ApoA-1ポリペプチドについては、配列番号2の残基19～267または25～267）と実質的に同一であり、（ii）参照ポリペプチドの所望の機能特性を保持する、様々なポリペプチドを調製することができる。

【0144】

本発明で使用されるポリペプチドセグメント（例えば、ApoA-1、RNase、パラオキシナーゼ、血小板活性化因子アセチルヒドロラーゼ、例えば、Fc断片等の二量体形成ドメインに対応するポリペプチドセグメント）は、様々な種から得ることができる。タンパク質が、ヒトにおいて治療用に使用されるべきである場合、ヒトポリペプチド配列が用いられることが好まれる。しかし、バリエーション配列と同様に、非ヒト配列を使用することができる。*in vitro*診断使用および獣医学使用を含む他の使用のために、ヒトまたは非ヒト動物由来のポリペプチド配列を用いることができるが、患者と同じ種由来の配列が、*in vivo*獣医学使用または分子間反応の種特異性が存在する場合の*in vitro*使用に好まれることがある。よって、本発明の使用のためのポリペプチドセグメントは、限定することなく、ヒト、非ヒト霊長類、齧歯類、イヌ、ネコ、ウマ、ウシ、ヒツジ、ブタ、ウサギ類および鳥類ポリペプチドならびにこれらのバリエーションとなること

30

40

【0145】

ある特定の実施形態では、第1のポリペプチドセグメントは、ヒト野生型ApoA-1ポリペプチドまたはその機能的バリエーションもしくは断片である。例えば、一部の実施形態では、第1のポリペプチドセグメントは、配列番号2のアミノ酸残基19～267または25～267と少なくとも80%同一性を有するアミノ酸配列を含む。より特定の実施形態では、第1のポリペプチドセグメントは、配列番号2のアミノ酸残基19～267または25～267と少なくとも85%、少なくとも90%または少なくとも95%同一性を有するアミノ酸配列を含む。なお他の実施形態では、第1のポリペプチドセグメントは、配列番号2のアミノ酸残基19～267または25～267と少なくとも96%、少なく

50

とも97%、少なくとも98%、少なくとも99%または100%配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。特異的な変種では、成熟ヒト野生型ApoA-1の位置156に対応するアミノ酸位置におけるバリンは、リシンによって置き換えられている、および/または成熟ヒト野生型ApoA-1の位置173に対応するアミノ酸位置におけるアルギニンは、システインによって置き換えられている（それぞれ本明細書において、V156KおよびR173Cバリエーションまたは突然変異とも称される）。成熟ヒト野生型ApoA-1の位置156は、配列番号2のアミノ酸位置180に対応し、成熟ヒト野生型ApoA-1の位置173は、配列番号2のアミノ酸位置197に対応する。V156KおよびR173C突然変異は、野生型ApoA-1と比較して、アテローム硬化性マウスにおいて改善された活性および半減期を有する。Choら、Exp Mol Med 41巻：417頁、2009年を参照されたい。

10

【0146】

他の実施形態では、第1のポリペプチドセグメントは、例えば、4Fペプチド等、ApoA-1ミメティックである（Songら、Int. J. Biol. Sci. 5巻：637～646頁、2009年を参照）。ApoA-1ミメティックは、一般に、本技術分野で公知であり、Reddyら、Curr. Opin. Lipidol. 25巻：304～308頁、2014年に総説が記載されている。

【0147】

第1のポリペプチドセグメントに対しカルボキシル末端側（例えば、二量体形成ドメインに対しカルボキシル末端側）の第2のポリペプチドセグメントを含むある特定の実施形態では、第2のポリペプチドセグメントは、RNaseである。一部の実施形態では、RNaseは、ヒトRNase 1またはその機能的バリエーションもしくは断片である。例えば、一部の実施形態では、第2のポリペプチドセグメントは、配列番号4のアミノ酸残基542～675と少なくとも80%同一性を有するアミノ酸配列を含む。より特定の実施形態では、第2のポリペプチドセグメントは、配列番号4のアミノ酸残基542～675と少なくとも85%、少なくとも90%または少なくとも95%同一性を有するアミノ酸配列を含む。なお他の実施形態では、第2のポリペプチドセグメントは、配列番号4のアミノ酸残基542～675と少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%または100%配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

20

【0148】

第1のポリペプチドセグメントに対しカルボキシル末端側（例えば、二量体形成ドメインに対しカルボキシル末端側）の第2のポリペプチドセグメントを含む他の実施形態では、第2のポリペプチドセグメントは、パラオキシナーゼである。一部の実施形態では、パラオキシナーゼは、ヒトパラオキシナーゼ1（PON1）またはその機能的バリエーションもしくは断片である。例えば、一部の実施形態では、第2のポリペプチドセグメントは、配列番号12のアミノ酸残基16～355、配列番号42のアミノ酸残基16～355または配列番号44のアミノ酸残基16～355と少なくとも80%同一性を有するアミノ酸配列を含む。より特定の実施形態では、第2のポリペプチドセグメントは、配列番号12のアミノ酸残基16～355、配列番号42のアミノ酸残基16～355または配列番号44のアミノ酸残基16～355と少なくとも85%、少なくとも90%または少なくとも95%同一性を有するアミノ酸配列を含む。なお他の実施形態では、第2のポリペプチドセグメントは、配列番号12のアミノ酸残基16～355、配列番号42のアミノ酸残基16～355または配列番号44のアミノ酸残基16～355と少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%または100%配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

30

40

【0149】

第1のポリペプチドセグメントに対しカルボキシル末端側（例えば、二量体形成ドメインに対しカルボキシル末端側）の第2のポリペプチドセグメントを含むなお他の実施形態では、第2のポリペプチドセグメントは、血小板活性化因子アセチルヒドロラーゼ（PAF-AH）である。一部の実施形態では、血小板活性化因子アセチルヒドロラーゼは、ヒ

50

ト P A F - A H またはその機能的バリエーションもしくは断片である。例えば、一部の実施形態では、第 2 のポリペプチドセグメントは、配列番号 32 のアミノ酸残基 22 ~ 441 と少なくとも 80 % 同一性を有するアミノ酸配列を含む。より特定の実施形態では、第 2 のポリペプチドセグメントは、配列番号 32 のアミノ酸残基 22 ~ 441 と少なくとも 85 %、少なくとも 90 % または少なくとも 95 % 同一性を有するアミノ酸配列を含む。なお他の実施形態では、第 2 のポリペプチドセグメントは、配列番号 32 のアミノ酸残基 22 ~ 441 と少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 % または 100 % 配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0150】

第 1 のポリペプチドセグメントに対しカルボキシル末端側（例えば、二量体形成ドメインに対しカルボキシル末端側）の第 2 のポリペプチドセグメントを含むさらに他の実施形態では、第 2 のポリペプチドセグメントは、コレステロールエステル転送タンパク質（CETP）である。一部の実施形態では、コレステロールエステル転送タンパク質は、ヒト CETP またはその機能的バリエーションもしくは断片である。例えば、一部の実施形態では、第 2 のポリペプチドセグメントは、配列番号 30 のアミノ酸残基 18 ~ 493 と少なくとも 80 % 同一性を有するアミノ酸配列を含む。より特定の実施形態では、第 2 のポリペプチドセグメントは、配列番号 30 のアミノ酸残基 18 ~ 493 と少なくとも 85 %、少なくとも 90 % または少なくとも 95 % 同一性を有するアミノ酸配列を含む。なお他の実施形態では、第 2 のポリペプチドセグメントは、配列番号 30 のアミノ酸残基 18 ~ 493 と少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 %、少なくとも 99 % または 100 % 配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0151】

本発明に従った使用のためのポリペプチドリンカーは、天然起源、合成または両者の組合せとなることができる。リンカーは、2 個の別々のポリペプチド領域（例えば、二量体形成ドメインおよび ApoA-1 ポリペプチド）を接続し、より長いポリペプチドの別々のかつ個別のドメインとして連結されたポリペプチド領域を維持する。リンカーは、別々の個別のドメインが、別々の特性を維持しながら、協働することを可能にすることができる（例えば、ApoA-1 ポリペプチドに連結された Fc 領域二量体形成ドメインの場合は、Fc 領域のために Fc 受容体（例えば、FcRn）結合を維持することができる一方で、ApoA-1 ポリペプチドの機能特性（例えば、脂質結合）が維持されるであろう）。異種ポリペプチドを接続するための天然起源および人工のペプチドリンカーの使用の例については、例えば、Hallewell ら、J. Biol. Chem. 264 巻、5260 ~ 5268 頁、1989 年；Alfthan ら、Protein Eng. 8 巻、725 ~ 731 頁、1995 年；Robinson および Sauer、Biochemistry 35 巻、109 ~ 116 頁、1996 年；Khandekar ら、J. Biol. Chem. 272 巻、32190 ~ 32197 頁、1997 年；Fares ら、Endocrinology 139 巻、2459 ~ 2464 頁、1998 年；Smallshaw ら、Protein Eng. 12 巻、623 ~ 630 頁、1999 年；米国特許第 5,856,456 号を参照されたい。

【0152】

典型的には、リンカーポリペプチド内の残基は、全体的な親水性特徴をもたらす、非免疫原性および可動性となるように選択される。本明細書において使用される場合、「可動性」リンカーは、溶液における実質的に安定したより高次の立体構造を欠くリンカーであるが、局所的安定性の領域は容認できる。一般に、小型、極性および親水性の残基が好まれ、かさばったおよび疎水性の残基は望ましくない。局所的電荷の区域は回避するべきである；リンカーポリペプチドが、荷電残基を含む場合、これは通常、ポリペプチドの小型の領域内に正味の中性電荷をもたらすように配置されるであろう。したがって、荷電残基を反対の電荷の残基に隣接して置くことが好まれる。一般に、リンカーポリペプチド内の包含に好まれる残基は、Gly、Ser、Ala、Thr、Asn および Gln を含み；より好まれる残基は、Gly、Ser、Ala および Thr を含み；最も好まれる残基は、Gly および Ser である。一般に、Phe、Tyr、Trp、Pro、Leu、Il

e、L y sおよびA r g残基は回避されるであろう（リンカーの免疫グロブリンヒンジ領域内に存在する場合を除き）、その理由として、P r o残基は、その疎水性および可動性の欠如のため、L y sおよびA r g残基は、潜在的な免疫原性のためである。リンカーの配列は、また、望まれないタンパク質分解を回避するように設計されるであろう。

【0153】

ある特定の実施形態では、リンカーL 1は、少なくとも2または少なくとも3個のアミノ酸残基（例えば、少なくとも5、少なくとも10、少なくとも16、少なくとも26または少なくとも36個のアミノ酸残基）を含む。特定の変種では、L 1は、2～60個のアミノ酸残基、3～60個のアミノ酸残基、5～40個のアミノ酸残基または15～40個のアミノ酸残基からなる。他の変種では、L 1は、2～50、2～40、2～36、2
10
～35、2～30、2～26、3～50、3～40、3～36、3～35、3～30、3～26、5～60、5～50、5～40、5～36、5～35、5～30、5～26、10～60、10～50、10～40、10～36、10～35、10～30、10～26、15～60、15～50、15～36、15～35、15～30または15～26個のアミノ酸残基からなる。他の変種では、L 1は、16～60、16～50、16～40または16～36個のアミノ酸残基からなる。なお他の変種では、L 1は、20～60、20～50、20～40、20～36、25～60、25～50、25～40または25～36個のアミノ酸残基からなる。さらに他の変種では、L 1は、26～60、26～50、26～40または26～36個のアミノ酸残基からなる。より特異的な変種では、L 1
20
は、16個のアミノ酸残基、21個のアミノ酸残基、26個のアミノ酸残基、31個のアミノ酸残基または36個のアミノ酸残基からなる。一部の実施形態では、L 1は、配列番号2の残基268～293、配列番号26の残基268～288、配列番号22の残基268～283、配列番号54、または配列番号24の残基268～303に示すアミノ酸配列を含むまたはこれからなる。

【0154】

例示的なL 2リンカーは、少なくとも3個のアミノ酸残基を含み、典型的には、最大60個のアミノ酸残基である。ある特定の変種では、L 2リンカーは、L 1に関する上述の通りの配列長さの範囲を有する。式A p o A 1-L 1-D-L 2-Pを含み、式中、L 2が存在し、PがR N a s eであるポリペプチドの特異的な実施形態では、L 2は、配列番号4の残基526～541に示すアミノ酸配列を含むまたはこれからなる。

【0155】

ある特定の実施形態では、ポリペプチドリinkerは、複数のグリシン残基（reside）を含む。例えば、一部の実施形態では、ポリペプチドリinker（例えば、L 1）は、複数のグリシン残基および任意選択で、少なくとも1個のセリン残基を含む。特定の変種では、ポリペプチドリinker（例えば、L 1）は、配列G l y-G l y-G l y-G l y-S e r（配列番号15）を含み、例えば、配列番号15のアミノ酸配列の2個またはそれを超えるタンデムリピート等が挙げられる。一部の実施形態では、リンカーは、配列[G l y-G l y-G l y-G l y-S e r]_n（[配列番号15]_n）を含み、式中、nは、例えば、1～5、2～5、3～5、1～6、2～6、3～6または4～6の整数等、正の整数である。式[G l y-G l y-G l y-G l y-S e r]_nを含むポリペプチドリinkerの特異的な変種では、nは、4である。式[G l y-G l y-G l y-G l y-S e r]_nを含むポリペプチドリinkerの別の特異的な変種では、nは、3である。式[G l y-G l y-G l y-G l y-S e r]_nを含むポリペプチドリinkerのさらに別の特異的な変種では、nは、5である。式[G l y-G l y-G l y-G l y-S e r]_nを含むポリペプチドリinkerのさらに別の特異的な変種では、nは、6である。ある特定の実施形態では、ポリペプチドリinkerは、ポリペプチドリinker（例えば、本明細書に記載されているポリペプチドリinker配列のいずれか）の2個の他の配列の間に挿入された、一連のグリシンおよびセリン残基（例えば、[G l y-G l y-G l y-G l y-S e r]_n、式中、nは、上述の通りに定義されている）を含む。他の実施形態では、ポリペプチドリinkerは、ポリペプチドリinker（例えば、本明細書に記載されているポリペプチド
40
50

リンカー配列のいずれか)の別の配列の一方または両方の末端に取り付けられた、グリシンおよびセリン残基(例えば、 $[Gly-Gly-Gly-Gly-Ser]_n$ 、式中、 n は、上述の通りに定義されている)を含む。一実施形態では、ポリペプチドリンカーは、上部ヒンジ領域(例えば、IgG1、IgG2、IgG3またはIgG4分子に由来する)の少なくとも部分、中央ヒンジ領域(例えば、IgG1、IgG2、IgG3またはIgG4分子に由来する)の少なくとも部分、ならびに一連のグリシンおよびセリンアミノ酸残基(例えば、 $[Gly-Gly-Gly-Gly-Ser]_n$ 、式中、 n は、上述の通りに定義されている)を含む。

【0156】

別の実施形態では、ポリペプチドリンカーは、非天然起源の免疫グロブリンヒンジ領域、例えば、免疫グロブリンに天然に存在しないヒンジ領域、および/または天然起源の免疫グロブリンヒンジ領域とはアミノ酸配列が異なるように変更されたヒンジ領域を含む。一実施形態では、突然変異をヒンジ領域に作製して、ポリペプチドリンカーを作製することができる。一実施形態では、ポリペプチドリンカーは、天然起源の数のシステインを含まないヒンジドメインを含む、すなわち、ポリペプチドリンカーは、天然起源のヒンジ分子よりも少ないシステインまたはより多い数のシステインのいずれかを含む。

【0157】

様々な二量体形成ドメインが、本明細書に記載されている融合ポリペプチドおよび二量体融合タンパク質に従った使用に適している。ある特定の実施形態では、二量体形成ドメインは、Fc領域等、免疫グロブリン重鎖定常領域である。Fc領域は、ネイティブ配列Fc領域またはバリエーションFc領域となることができる。一部の実施形態では、Fc領域は、1種または複数のエフェクター機能(例えば、ADCCおよびCDCエフェクター機能の一方または両方)を欠く。

【0158】

一部の実施形態では、二量体形成ドメインは、N297(ヒトIgG重鎖定常領域のためのEUナンバリング)(配列番号2のアミノ酸位置375に対応)が挙げられるがこれに限定されない、分子がグリコシル化されないようにCH2領域に突然変異を有するヒト抗体のFc領域である。別の実施形態では、Fc領域は、ヒンジ領域の3個のシステイン(C220、C226、C229)をそれぞれセリンに変化させ、CH2ドメインの位置238におけるプロリンをセリンに変化させた、ヒトIgG1($\gamma 1$)である。別の好まれる実施形態では、Fc領域は、N297を他の任意のアミノ酸に変化させた、ヒト $\gamma 1$ である。別の実施形態では、Fc領域は、Eu位置292~300の間に1個または複数のアミノ酸置換を有するヒト $\gamma 1$ である。別の実施形態では、Fc領域は、残基292~300の間の任意の位置に1個または複数のアミノ酸付加または欠失を有するヒト $\gamma 1$ である。別の実施形態では、Fc領域は、SCCヒンジ(すなわち、システインC220がセリンに変化され、Eu位置226および229のそれぞれにシステインを有する)またはSSSヒンジ(すなわち、Eu位置220、226および229における3個のシステインのそれぞれが、セリンに変化された)を有するヒト $\gamma 1$ である。さらなる実施形態では、Fc領域は、SCCヒンジおよびP238突然変異を有するヒト $\gamma 1$ である。別の実施形態では、Fcドメインは、半減期に重要なFcRn結合に影響を与えることなく、Fcガンマ受容体(I、II、III)による結合を変更する突然変異を有するヒト $\gamma 1$ である。さらなる実施形態では、Fc領域は、EhrhardtおよびCooper、Curr. Top. Microbiol. Immunol. 2010年8月3日(Immunoregulatory Roles for Fc Receptor-Like Molecules); Davisら、Ann. Rev. Immunol. 25巻: 525~60頁、2007年(Fc receptor-like molecules); またはSwainsonら、J. Immunol. 184巻: 3639~47頁、2010年に開示されている通りである。

【0159】

Fc二量体形成ドメインを含む融合ポリペプチドの一部の実施形態では、Fc領域は、融合タンパク質の抗原非依存性エフェクター機能を変更するアミノ酸置換を含む。一部のこのような実施形態では、Fc領域は、その結果得られる分子の循環半減期を変更するア

10

20

30

40

50

ミノ酸置換を含む。このような抗体誘導体は、そのような置換を欠く抗体と比較して、FcRnへの結合の増加または減少のいずれかを示し、したがって、それぞれ増加または減少した血清中半減期を有する。FcRnに対する親和性が改善されたFcバリエーションは、より長い血清半減期を有することが期待され、このような抗体は、投与された抗体の長い半減期が所望される場合の、哺乳動物を処置する方法において有用な適用を有する。対照的に、減少したFcRn結合親和性を有するFcバリエーションは、より短い半減期を有することが予想され、このような抗体は、また、例えば、短縮された循環時間が有利となり得る場合の、例えば、出発抗体が、循環中に延長された期間存在すると有毒な副作用を有する場合の、哺乳動物への投与に有用である。減少したFcRn結合親和性を有するFcバリエーションは、また、胎盤を通過する可能性が低いことから、妊婦における疾患または障害の処置においても有用である。加えて、低下したFcRn結合親和性が所望され得る他の適用は、脳、腎臓および／または肝臓への局在化が所望される適用を含む。例示的な一実施形態では、本発明の抗体は、脈管構造から腎臓系球体の上皮を越えた輸送の低下を示す。別の実施形態では、本発明の融合タンパク質は、脳から血管空間への血液脳関門(BB)を越えた輸送の低下を示す。一実施形態では、変更されたFcRn結合を有する融合タンパク質は、Fcドメインの「FcRn結合ループ」内に1個または複数のアミノ酸置換を有するFc領域を含む。FcRn結合活性を変更する例示的なアミノ酸置換は、参照により本明細書に組み込む、国際PCT公開番号WO 05/047327に開示されている。

10

【0160】

20

他の実施形態では、本発明の融合ポリペプチドは、例えば、野生型Fc領域と比較して、ポリペプチドの抗原依存性エフェクター機能、特に、ADCCまたは補体活性化を変更するアミノ酸置換を含むFcバリエーションを含む。例示的な実施形態では、このような融合ポリペプチドは、Fcガンマ受容体(FcγR、例えば、CD16)への結合の変更を示す。このような融合ポリペプチドは、野生型ポリペプチドと比較して、FcγRへの結合の増加または減少のいずれかを示し、したがって、それぞれ増強または低下したエフェクター機能を媒介する。FcγRに対する親和性が改善されたFcバリエーションは、エフェクター機能を増強することが期待され、このような融合タンパク質は、標的分子破壊が所望される場合の、哺乳動物を処置する方法における有用な適用を有する。対照的に、減少したFcγR結合親和性を有するFcバリエーションは、エフェクター機能を低下させることが予想され、このような融合タンパク質も、例えば、正常細胞が標的分子を発現し得る場合の、または抗体の慢性投与が望まれない免疫系活性化をもたらす得る場合の、例えば、標的細胞破壊が望ましくない状態の処置に有用である。一実施形態では、Fc領域を含む融合ポリペプチドは、野生型Fc領域を含むポリペプチドと比較して、オプソニン作用、ファゴサイトーシス、補体依存性細胞傷害、抗原依存性細胞性細胞傷害(ADCC)またはエフェクター細胞モジュレーションからなる群から選択される少なくとも1種の変更された抗原依存性エフェクター機能を示す。

30

【0161】

一実施形態では、Fc領域を含む融合ポリペプチドは、活性化FcγR(例えば、FcγI、FcγIIaまたはFcγRIIIa)への結合の変更を示す。別の実施形態では、融合タンパク質は、阻害性FcγR(例えば、FcγRIIb)に対する結合親和性の変更を示す。FcRまたは補体結合活性を変更する例示的なアミノ酸置換は、参照により本明細書に組み込む、国際PCT公開番号WO 05/063815に開示されている。

40

【0162】

Fc領域を含む融合ポリペプチドは、Fc領域のグリコシル化を変更するアミノ酸置換を含むこともできる。例えば、融合タンパク質のFcドメインは、グリコシル化(例えば、NまたはO結合型グリコシル化)の低下をもたらす突然変異を有することができる、または野生型Fcドメインの変更されたグリコフォーム(例えば、低フコースまたはフコース不含グリカン)を含むことができる。別の実施形態では、分子は、グリコシル化モチーフ、例えば、アミノ酸配列NXTまたはNXSを含有するN結合型グリコシル化モチーフ

50

の付近にまたはその内にアミノ酸置換を有する。グリコシル化を低下または変更する例示的なアミノ酸置換は、参照により本明細書に組み込む、国際PCT公開番号WO 05/018572および米国特許出願公開第2007/0111281号に開示されている。

【0163】

当業者であれば、文脈がそれ以外のことを明らかに示さない限り、本明細書に記載されているFcバリエーションの様々な実施形態を、本発明の融合ポリペプチドにおいて組み合わせることができることを理解できよう。

【0164】

一部の実施形態では、二量体形成ドメインは、(i) 配列番号2の残基294～525もしくは294～524または(ii) 配列番号13の残基294～525もしくは294～524に示す配列から選択されるアミノ酸配列と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%または少なくとも95%同一性を有するアミノ酸配列を含むFc領域である。なお他の実施形態では、Fc領域は、(i) 配列番号2の残基294～525もしくは294～524または(ii) 配列番号13の残基294～525もしくは294～524に示すアミノ酸配列と少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%または100%配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0165】

上述の通りのApoA1-L1-Dを含む融合ポリペプチドの一部の実施形態では、融合ポリペプチドは、(i) 配列番号2の残基19～525、19～524、25～525もしくは25～524、(ii) 配列番号13の残基19～525、19～524、25～525もしくは25～524、(iii) 配列番号20の残基19～501、19～500、25～501もしくは25～501、(iv) 配列番号22の残基19～515、19～514、25～515もしくは25～514、(v) 配列番号26の残基19～520、19～519、25～520もしくは25～519または(vi) 配列番号24の残基19～535、19～534、25～535もしくは25～534に示す配列から選択されるアミノ酸配列と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%または少なくとも95%同一性を有するアミノ酸配列を含む。なお他の実施形態では、融合ポリペプチドは、(i) 配列番号2の残基19～525、19～524、25～525もしくは25～524、(ii) 配列番号13の残基19～525、19～524、25～525もしくは25～524、(iii) 配列番号20の残基19～501、19～500、25～501もしくは25～501、(iv) 配列番号22の残基19～515、19～514、25～515もしくは25～514、(v) 配列番号26の残基19～520、19～519、25～520もしくは25～519または(vi) 配列番号24の残基19～535、19～534、25～535もしくは25～534に示すアミノ酸配列と少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%または100%配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0166】

上述の通りのApoA1-L1-D-L2-Pを含み、式中、Pが、RNaseである融合ポリペプチドの一部の実施形態では、融合ポリペプチドは、(i) 配列番号4の残基19～675もしくは25～675または(ii) 配列番号14の残基19～675もしくは25～675に示すアミノ酸配列と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%または少なくとも95%同一性を有するアミノ酸配列を含む。なお他の実施形態では、融合ポリペプチドは、(i) 配列番号4の残基19～675もしくは25～675または(ii) 配列番号14の残基19～675もしくは25～675に示すアミノ酸配列と少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%または100%配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0167】

上述の通りのApoA1-L1-D-L2-Pを含み、式中、Pが、パラオキシナゼである融合ポリペプチドの一部の実施形態では、融合ポリペプチドは、(i) 配列番号28の残基19～883もしくは25～883、(ii) 配列番号38の残基19～873

もしくは25～873、(i i i)配列番号46の残基19～883もしくは25～883または(i v)配列番号48の残基19～883もしくは25～883に示すアミノ酸配列と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%または少なくとも95%同一性を有するアミノ酸配列を含む。なお他の実施形態では、融合ポリペプチドは、(i)配列番号28の残基19～883もしくは25～883、(i i)配列番号38の残基19～873もしくは25～873、(i i i)配列番号46の残基19～883もしくは25～883または(i v)配列番号48の残基19～883もしくは25～883に示すアミノ酸配列と少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%または100%配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0168】

上述の通りのApoA1-L1-D-L2-Pを含み、式中、Pが、血小板活性化因子アセチルヒドロラーゼ(PAF-AH)である融合ポリペプチドの一部の実施形態では、融合ポリペプチドは、配列番号34の残基19～963または25～963に示すアミノ酸配列と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%または少なくとも95%同一性を有するアミノ酸配列を含む。なお他の実施形態では、融合ポリペプチドは、配列番号34の残基19～963または25～963に示すアミノ酸配列と少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%または100%配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0169】

上述の通りのApoA1-L1-D-L2-Pを含み、式中、Pが、コレステロールエステル転送タンパク質(CEETP)である融合ポリペプチドの一部の実施形態では、融合ポリペプチドは、配列番号40の残基19～1019または25～1019に示すアミノ酸配列と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%または少なくとも95%同一性を有するアミノ酸配列を含む。なお他の実施形態では、融合ポリペプチドは、配列番号40の残基19～1019または25～1019に示すアミノ酸配列と少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%または100%配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0170】

本発明は、上述の通りの第1および第2のポリペプチド融合体を含む二量体タンパク質も提供する。したがって、別の態様では、本発明は、第1の融合ポリペプチドおよび第2の融合ポリペプチドを含む二量体タンパク質であって、第1および第2のポリペプチド融合体のそれぞれが、アミノ末端位置からカルボキシル末端位置へと、ApoA1-L1-Dを含み、式中、ApoA1は、コレステロール流出活性を有する第1のポリペプチドセグメントであり、これは、(i)天然起源のApoA-1ポリペプチドまたはその機能的バリエーションもしくは断片および(ii)ApoA-1ミメティックから選択され；L1は、第1のポリペプチドリンカーであり；Dは、二量体形成ドメインである、二量体タンパク質を提供する。一部の実施形態では、第1および第2の融合ポリペプチドのそれぞれが、二量体形成ドメインに対しカルボキシル末端側に位置する第2のポリペプチドセグメントをさらに含む。特定の変種では、第2のポリペプチドセグメントは、(a)天然起源のRNase、パラオキシナーゼ、血小板活性化因子アセチルヒドロラーゼ(PAF-AH)、コレステロールエステル転送タンパク質(CEETP)もしくはレシチン・コレステロールアシルトランスフェラーゼ(LCAT)；(b)(a)に特定されている天然起源のタンパク質のいずれかの機能的バリエーションもしくは断片；または(c)例えば、Aβ特異的scFv等、アミロイドベータ(Aβ)に特異的に結合するポリペプチドである。第2のポリペプチドセグメントを含むこのような融合ポリペプチドは、式ApoA1-L1-D-L2-P(アミノ末端位置からカルボキシル末端位置へと)によって表すことができ、式中、ApoA1、L1およびDはそれぞれ、以前に定義された通りであり、L2は、第2のポリペプチドリンカーであり、任意選択で存在し、Pは、第2のポリペプチドセグメントである。

【0171】

別の態様では、本発明は、第1の融合ポリペプチドおよび第2の融合ポリペプチドを含む二量体タンパク質であって、第1および第2の融合ポリペプチドのそれぞれが、第1のポリペプチドセグメント、第2のポリペプチドセグメントおよび二量体形成ドメインを含み、第1のポリペプチドセグメントが、コレステロール流出活性を有し、(i)天然起源のApoA-1ポリペプチドまたはその機能的バリエーションもしくは断片および(ii)ApoA-1ミメティックから選択され、第2のポリペプチドセグメントが、第1のポリペプチドセグメントに対しカルボキシル末端側に位置し、(a)天然起源のRNase、パラオキシナーゼ、血小板活性化因子アセチルヒドロラーゼ(PAF-AH)、コレステロールエステル転送タンパク質(CEPT)もしくはレシチン・コレステロールアシルトランスフェラーゼ(LCAT)、(b)(a)に特定されている天然起源のタンパク質のいずれかの機能的バリエーションもしくは断片または(c)例えば、Aβ特異的scFv等、アミロイドベータ(Aβ)に特異的に結合するポリペプチドである、二量体タンパク質を提供する。一部の実施形態では、二量体形成ドメインは、第1のポリペプチドセグメントに対しカルボキシル末端側に位置し、第2のポリペプチドセグメントに対しアミノ末端側に位置する。

【0172】

別の態様では、本発明は、(a)ApoA-1ポリペプチドまたはApoA-1ミメティックに対しカルボキシル末端側に連結された免疫グロブリン重鎖を含む第1の融合ポリペプチドと、(b)ApoA-1ポリペプチドまたはApoA-1ミメティックに対しカルボキシル末端側に連結された免疫グロブリン軽鎖を含む第2の融合ポリペプチドを提供する。第1および第2の融合ポリペプチドを同時発現させて、2個のダブルベルトApoA-1二量体で構成された安定した四量体であって、ApoA-1と重鎖の間およびApoA-1と軽鎖の間のリンカーが、コレステロール流出およびコレステロール逆転送を可能にするのに十分な長さのものである、四量体を作製することができる。

【0173】

二量体融合タンパク質を含む本発明の融合ポリペプチドは、エフェクター部分にさらにコンジュゲートすることができる。エフェクター部分は、例えば、放射性標識もしくは蛍光標識等の標識部分、TLRリガンドもしくは結合ドメイン、酵素、または治療部分を含む、任意の数の分子となることができる。特定の実施形態では、エフェクター部分は、ミエロペルオキシダーゼ(MPO)阻害剤である。MPO阻害剤は、一般に公知であり(例えば、Malleら、Br J Pharmacol. 152巻: 838~854頁、2007年を参照)、本明細書に記載されている通り融合ポリペプチドに容易にコンジュゲートすることができる。例示的なMPO阻害剤は、3-アルキルインドール誘導体に基づく阻害剤(Soubhyeら、J Med Chem 56巻: 3943~58頁、2013年を参照; MPOの高度かつ選択的な阻害(IC50=18nM)を有する化合物を含む、選択的かつ高度に強力なミエロペルオキシダーゼ阻害剤としての3-アルキルインドール誘導体の研究について記載); 3-(アミノアルキル)-5-フルオロインドールに基づく阻害剤(Soubhyeら、J Med Chem 53巻: 8747~8759頁、2010年を参照); 2H-インダゾールおよび1H-インダゾロンに基づく阻害剤(Rothら、Bioorg Med Chem 22巻: 6422~6429頁、2014年を参照; 2H-インダゾールおよび1H-インダゾロンの評価ならびにIC50値<1μMを有する化合物の同定について記載); ならびに安息香酸ヒドラジド含有化合物(Huangら、Arch Biochem Biophys 570巻: 14~22頁、2015年を参照; エステル結合の切断によってより大型の重鎖からMPOの軽鎖サブユニットが取り除かれる、安息香酸ヒドラジド含有化合物によるMPOの不活性化を示す)を含む。

【0174】

別の実施形態では、二量体融合タンパク質を含む本発明の融合ポリペプチドは、例えば、血清半減期を延長するために融合タンパク質に少なくとも1分子を取り付けることによる等、半減期を延長するように修飾される。取り付けのためのこのような分子は、例えば、ポリエチレン(polyethylene)グリコール(PEG)基、血清アルブミン、トランスフ

10

20

30

40

50

ェリン、トランスフェリン受容体もしくはそのトランスフェリン結合部分、またはこれらの組合せを含むことができる。このような修飾のための方法は、本技術分野で一般に周知である。本明細書において使用される場合、単語「取り付けた」は、共有結合によりまたは非共有結合によりコンジュゲートされた物質を指す。コンジュゲーションは、遺伝子工学または化学的手段によるものであり得る。

III. ポリペプチド融合体および二量体タンパク質を作製するための材料および方法 【0175】

本発明は、上に開示されている融合ポリペプチドをコードする、DNAおよびRNA分子を含むポリヌクレオチド分子も提供する。本発明のポリヌクレオチドは、一本鎖および二本鎖分子の両方を含む。核酸の組換え操作のための公知の方法を使用して、融合ポリペ

10

【0176】

ApoA-1、RNases（例えば、RNase 1）、パラオキシナーゼ（例えば、PON1）、血小板活性化因子アセチルヒドロラーゼ（PAF-AH）、コレステロールエステル転送タンパク質（CEPT）およびレシチン・コレステロールアシルトランスフェラーゼ（LCAT）をコードするDNA配列は、本技術分野で公知である。様々な二量体形成ドメイン（例えば、Fc断片等、免疫グロブリン重鎖定常領域）をコードするDNA配列も公知である。組換え抗体発現ライブラリー（例えば、ファージディスプレイ発現ライブラリー）のスクリーニング等、本技術分野で周知の技法を使用して、例えば、scFvを含むAβ結合抗体の可変領域をコードするポリヌクレオチドも容易に同定可能である。これらのポリペプチドのいずれかをコードする追加的なDNA配列は、当業者であれば、遺伝暗号に基づき容易に生成することができる。対応するRNA配列は、Tに代えてUを置換することによって生成することができる。当業者であれば、遺伝暗号の縮重を考慮して、所定のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド分子の間で相当な配列変種が可能であることを容易に認識するであろう。このようなポリペプチドの機能的バリエーションおよび断片をコードするDNAおよびRNAを、ポリヌクレオチド配列に変種を導入するための公知の組換え方法を使用して得ることもでき、コードされたポリペプチドの発現と、適切なスクリーニングアッセイを使用した機能活性（例えば、コレステロール流出）の決定が続く。

20

30

【0177】

DNAおよびRNAを調製するための方法は、本技術分野で周知である。例えば、相補的DNA（cDNA）クローンは、目的のポリペプチドをコードする大量のRNAを産生する組織または細胞から単離されたRNAから調製することができる。全RNAは、グアニジンHCl抽出に続くCsCl勾配における遠心分離による単離を使用して調製することができる（Chirgwinら、Biochemistry 18巻：52～94頁、1979年）。ポリ（A）⁺RNAは、AvivおよびLeder（Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69巻：1408～1412頁、1972年）の方法を使用して、全RNAから調製される。相補的DNAは、公知の方法を使用してポリ（A）⁺RNAから調製される。代替法において、ゲノムDNAを単離することができる。cDNAおよびゲノムクローンを同定および単離するための方法は、周知かつ当業者のレベルの範囲内にあり、ライブラリーをプローブ探索またはプライマー探索するための本明細書に開示されている配列またはその一部の使用を含む。目的のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、例えば、ハイブリダイゼーションまたはポリメラーゼ連鎖反応（「PCR」、Mullis、米国特許第4,683,202号）によって同定および単離される。目的のポリペプチドに対する抗体、受容体断片または他の特異的結合パートナーにより、発現ライブラリーをプローブ探索することができる。

40

【0178】

50

本発明のポリヌクレオチドは、自動合成によって調製することもできる。短い二本鎖セグメント（60～80 bp）の産生は、技術的に単純明快であり、相補鎖を合成し、続いて両鎖をアニーリングすることにより達成することができる。より長いセグメント（典型的には>300 bp）は、20～100ヌクレオチドの長さの一本鎖断片からモジュラー形態にアSEMBLされる。ポリヌクレオチドの自動合成は、当業者のレベルの範囲内にあり、適した機器および試薬は、商業的供給業者から入手できる。全般的には、GlickおよびPasternak、Molecular Biotechnology, Principles & Applications of Recombinant DNA、ASM Press、Washington, D.C.、1994年；Itakuraら、Ann. Rev. Biochem. 53巻：323～356頁、1984年；ならびにClimieら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87巻：633～637頁、1990年を参照されたい。

10

【0179】

別の態様では、融合ポリペプチドを含む二量体タンパク質を含む、本発明のポリペプチド融合体を産生するための材料および方法が提供される。融合ポリペプチドは、従来の技法に従って遺伝子操作された宿主細胞において産生することができる。適した宿主細胞は、外因的DNAにより形質転換またはトランスフェクトし、培養下で育成することができる細胞型であり、細菌、真菌細胞および培養高等真核細胞（多細胞生物の培養細胞を含む）、特に、培養哺乳動物細胞を含む。クローニングされたDNA分子を操作し、外因的DNAを様々な宿主細胞に導入するための技法は、Sambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual、第2版、Cold Spring Harbor Laboratory Press、Cold Spring Harbor、NY、1989年およびAusubelら編、Current Protocols in Molecular Biology、Green and Wiley and Sons、NY、1993年によって開示されている。

20

【0180】

一般に、融合ポリペプチドをコードするDNA配列は、発現ベクター内で、転写プロモーターおよびターミネーターを一般に含む、その発現に必要とされる他の遺伝的エレメントに作動可能に連結される。ベクターは、1種または複数の選択可能マーカーおよび1種または複数の複製起点も一般的に含有するであろうが、当業者であれば、ある特定の系の内において、選択可能マーカーを別々のベクターに配置することができ、外因的DNAの複製は、宿主細胞ゲノムへの組み込みによって行うことができることを認識するであろう。プロモーター、ターミネーター、選択可能マーカー、ベクターおよび他のエレメントの選択は、当業者のレベルの範囲内にあるルーチンの設計の問題である。多くのこのようなエレメントは、文献に記載されており、商業的供給業者を介して入手できる。

30

【0181】

宿主細胞の分泌性経路へとApoA-1融合ポリペプチドを方向づけるために、分泌性シグナル配列が、発現ベクターに配置される。分泌性シグナル配列は、ネイティブApoA-1ポリペプチドのものであっても、または別の分泌タンパク質（例えば、t-PA；米国特許第5,641,655号を参照）に由来しても、de novoで合成してもよい。操作された切断部位が、分泌性ペプチドとポリペプチド融合体の残り部分の間の接合部に含まれて、宿主細胞におけるタンパク質分解性プロセッシングを最適化することができる。分泌性シグナル配列は、ポリペプチド融合体をコードするDNA配列に作動可能に連結される、すなわち、この2配列は、正しい読み枠で接続され、宿主細胞の分泌性経路へと新たに合成されたポリペプチド融合体を方向づけるように位置する。分泌性シグナル配列は一般的に、目的のポリペプチドをコードするDNA配列に対し5'に位置するが、ある特定のシグナル配列は、目的のDNA配列中の他の部分に位置することがある（例えば、Welchら、米国特許第5,037,743号；Hollandら、米国特許第5,143,830号を参照）。本発明に従った使用に適した分泌性シグナル配列は、例えば、配列番号2のアミノ酸残基1～18をコードするポリヌクレオチドを含む。

40

【0182】

宿主細胞分泌性経路を経た、二量体形成ドメインを含む融合ポリペプチドの発現は、二量体タンパク質の産生をもたらすことが予想される。したがって、別の態様では、本発明は、上述の通りの第1および第2の融合ポリペプチドを含む二量体タンパク質（例えば、

50

第1の融合ポリペプチドおよび第2の融合ポリペプチドを含む二量体タンパク質であって、第1および第2の融合ポリペプチドのそれぞれが、アミノ末端位置からカルボキシル末端位置へと、本明細書に記載されているApoA1-L1-DまたはApoA1-L1-D-L2-Pを含む、二量体タンパク質)を提供する。二量体は、適した条件下での成分ポリペプチドのインキュベーションにより、*in vitro*でアセンブルすることもできる。一般に、*in vitro*アセンブリは、変性および還元条件下でタンパク質混合物をインキュベートし、続いてポリペプチドをリフォールディングおよび再酸化して、二量体を形成することを含むであろう。細菌細胞において発現されたタンパク質の回収およびアセンブリは、下に開示されている。

【0183】

培養哺乳動物細胞は、本発明での使用に適した宿主である。哺乳動物宿主細胞に外因的DNAを導入するための方法は、リン酸カルシウム媒介性トランスフェクション (Wiglerら、Cell 14巻: 725頁、1978年; CorsaroおよびPearson、Somatic Cell Genetics 7巻: 603頁、1981年; GrahamおよびVan der Eb、Virology 52巻: 456頁、1973年)、エレクトロポレーション (Neumannら、EMBO J. 1巻: 841~845頁、1982年)、DEAE-デキストラン媒介性トランスフェクション (Ausubelら、上記参照) およびリボソーム媒介性トランスフェクション (Hawley-Nelsonら、Focus 15巻: 73頁、1993年; Ciccaroneら、Focus 15巻: 80頁、1993年)を含む。培養哺乳動物細胞における組換えポリペプチドの産生は、例えば、Levinsonら、米国特許第4, 713, 339号; Hagenら、米国特許第4, 784, 950号; Palmi 20 terら、米国特許第4, 579, 821号; およびRingold、米国特許第4, 656, 134号によって開示されている。適した培養哺乳動物細胞は、COS-1 (ATCC No. CRL 1650)、COS-7 (ATCC No. CRL 1651)、BHK (ATCC No. CRL 1632)、BHK 570 (ATCC No. CRL 10314)、293 (ATCC No. CRL 1573; Grahamら、J. Gen. Virol. 36巻: 59~72頁、1977年) およびチャイニーズハムスター卵巣 (例えば、CHO-K1、ATCC No. CCL 61; CHO-DG44、Urlaubら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77巻: 4216~4220頁、1980年) 細胞株を含む。追加的な 30 適した細胞株は、本技術分野で公知であり、アメリカ合衆国培養細胞系統保存機関、Manassas、Virginia等の公共の寄託機関から入手できる。SV-40、サイトメガロウイルスまたは骨髄増殖性肉腫ウイルス由来のプロモーター等、強い転写プロモーターを使用することができる。例えば、米国特許第4, 956, 288号および米国特許出願公開第20030103986号を参照されたい。他の適したプロモーターは、メタロチオネイン遺伝子由来のプロモーター (米国特許第4, 579, 821号および同第4, 601, 978号) およびアデノウイルス主要後期プロモーターを含む。哺乳動物細胞における使用のための発現ベクターは、アメリカ合衆国培養細胞系統保存機関、10801 University Blvd.、Manassas、VA USAにそれぞれ 30 受託番号98669、98668およびPTA-5266で寄託された、pZP-1、pZP-9およびpZMP21、ならびにこれらのベクターの誘導体を含む。

【0184】

薬物選択は一般に、外来性DNAが挿入された培養哺乳動物細胞を選択するために使用される。このような細胞は一般的に、「トランスフェクタント」と称される。選択的薬剤の存在下で培養され、その後代に目的の遺伝子を受け渡すことができる細胞は、「安定したトランスフェクタント」と称される。例示的な選択可能マーカーは、抗生物質ネオマイシンに対する抵抗性をコードする遺伝子である。選択は、G-418またはその類似物等、ネオマイシン型の薬物の存在下で行われる。選択系を使用して、目的の遺伝子の発現レベルを増加させることもでき、これは、「増幅」と称されるプロセスである。増幅は、低レベルの選択的薬剤の存在下でトランスフェクタントを培養し、続いて選択的薬剤の量を 40 増加させて、導入された遺伝子の高レベルの産物を産生する細胞を選択することにより行われる。例示的な増幅可能な選択可能マーカーは、メトトレキセートに対する抵抗性を付 50

与するジヒドロ葉酸レダクターゼである。他の薬物抵抗性遺伝子（例えば、ハイグロマイシン抵抗性、多剤抵抗性、ピューロマイシンアセチルトランスフェラーゼ）を使用することもできる。細胞表面マーカーおよび他の表現型選択マーカーを使用して、トランスフェクトされた細胞の同定を容易にすることができ（例えば、蛍光標識細胞分取によって）、そのようなものとして、例えば、CD8、CD4、神経増殖因子受容体、緑色蛍光タンパク質その他が挙げられる。

【0185】

昆虫細胞、植物細胞および鳥類細胞を含む、他の高等真核細胞を宿主として使用することもできる。植物細胞において遺伝子を発現させるためのベクターとしての *Agrobacterium rhizogenes* の使用は、Sinkarら、J. Biosci. (Bangalore) 11巻：47～58頁、1987年によって総説が記載されている。昆虫細胞の形質転換およびその中の外来性ポリペプチドの産生は、Guarinoら、米国特許第5,162,222号およびWIPO公開WO94/06463によって開示されている。

【0186】

昆虫細胞を、*Autographa californica* 核多角体病ウイルス (AcNPV) に一般的に由来する組換えバキュロウイルスに感染させることができる。KingおよびPossee、The Baculovirus Expression System: A Laboratory Guide、Chapman & Hall、London；O'Reillyら、Baculovirus Expression Vectors: A Laboratory Manual、Oxford University Press、New York、1994年；ならびにRichardson編、Baculovirus Expression Protocols. Methods in Molecular Biology、Humana Press、Totowa, NJ、1995年を参照されたい。組換えバキュロウイルスは、Luckowら (J. Virol. 67巻：4566～4579頁、1993年) によって記載されたトランスポゾンに基づく系の使用により産生することもできる。移入ベクターを利用するこの系は、キット形態で市販されている (BAC-T-O-BACキット；Life Technologies、Gaithersburg、MD)。移入ベクター（例えば、PFAS TBAC1；Life Technologies）は、「バクミド (bacmid)」と呼ばれる大型のプラスミドとしてE. coli中に維持されるバキュロウイルスゲノムに目的のタンパク質をコードするDNAを移動するためのTn7トランスポゾンを含む。Hill-PerkinsおよびPossee、J. Gen. Virol. 71巻：971～976頁、1990年；Bonningら、J. Gen. Virol. 75巻：1551～1556頁、1994年；ならびにChazenbalkおよびRapoport、J. Biol. Chem. 270巻：1543～1549頁、1995年を参照されたい。本技術分野で公知の技法を使用して、ポリペプチド融合体をコードする移入ベクターをE. coli宿主細胞へと形質転換し、組換えバキュロウイルスを示す中断されたlacZ遺伝子を含むバクミドに関して細胞をスクリーニングする。共通技法を使用して、組換えバキュロウイルスゲノムを含むバクミドDNAを単離し、Sf9細胞等、Spodoptera frugiperda細胞のトランスフェクトに使用する。ポリペプチド融合体を発現する組換えウイルスがその後産生される。本技術分野で一般的に使用される方法によって、組換えウイルスストックを作製する。

【0187】

タンパク質産生のため、組換えウイルスを使用して、典型的には、ツマジロクサヨトウ (fall armyworm)、Spodoptera frugiperda（例えば、Sf9またはSf21細胞）またはTrichoplusia ni（例えば、HIGH FIVE細胞；Invitrogen、Carlsbad、CA）に由来する細胞株である宿主細胞を感染させる。全般的には、GlickおよびPasternak、上記参照。米国特許第5,300,435号も参照されたい。無血清培地を使用して、細胞を育成および維持する。適した培地製剤は、本技術分野で公知であり、商業的供給業者から得ることができる。細胞を、接種密度およそ $2 \sim 5 \times 10^5$ 細胞から密度 $1 \sim 2 \times 10^6$ 細胞まで育成し、この時点で、組換えウイルスストックを、感染多重度 (MOI) 0.1～10、より典型的には3付近で添加する。使用される手順は一般に、利用できる実験室マニュアルに記載されている（例えば、KingおよびPossee、上記参照；O'Reillyら、上記参照；Richardson、上記参

照)。

【0188】

本発明で酵母細胞を含む真菌細胞を使用することもできる。この点に関して特に興味深い酵母種は、*Saccharomyces cerevisiae*、*Pichia pastoris*および*Pichia methanolica*を含む。外因的DNAで*S. cerevisiae*細胞を形質転換し、そこから組換えポリペプチドを産生するための方法は、例えば、Kawasaki、米国特許第4,599,311号；Kawasakiら、米国特許第4,931,373号；Brake、米国特許第4,870,008号；Welchら、米国特許第5,037,743号；およびMurrayら、米国特許第4,845,075号によって開示されている。形質転換された細胞は、一般的に、薬物抵抗性または特定の栄養素（例えば、ロイシン）の非存在下で成長する能力である、選択可能マーカーによって決定される表現型によって選択される。*Saccharomyces cerevisiae*における使用のための例示的なベクター系は、Kawasakiら（米国特許第4,931,373号）によって開示されたPOT1ベクター系であり、これは、形質転換された細胞が、グルコース含有培地における成長によって選択されることを可能にする。酵母における使用に適したプロモーターおよびターミネーターは、解糖酵素遺伝子（例えば、Kawasaki、米国特許第4,599,311号；Kingsmanら、米国特許第4,615,974号；およびBitter、米国特許第4,977,092号を参照）およびアルコールデヒドロゲナーゼ遺伝子に由来するものを含む。米国特許第4,990,446号；同第5,063,154号；同第5,139,936号；および同第4,661,454号も参照されたい。Hansenula polymorpha、Schizosaccharomyces pombe、Kluyveromyces lactis、Kluyveromyces fragilis、Ustilago maydis、Pichia pastoris、Pichia methanolica、Pichia guilliermondiiおよびCandida maltosaを含む他の酵母のための形質転換系は、本技術分野で公知である。例えば、Gleesonら、J. Gen. Microbiol.132巻：3459～3465頁、1986年；Cregg、米国特許第4,882,279号；およびRaymondら、Yeast 14巻：11～23頁、1998年を参照されたい。Aspergillus細胞は、McKnightら、米国特許第4,935,349号の方法に従って利用することができる。Acromonium chrysogenumを形質転換するための方法は、Suminoら、米国特許第5,162,228号によって開示されている。Neurosporaを形質転換するための方法は、Lambowitz、米国特許第4,486,533号によって開示されている。Pichia methanolicaにおける組換えタンパク質の産生は、米国特許第5,716,808号；同第5,736,383号；同第5,854,039号；および同第5,888,768号に開示されている。

【0189】

細菌Escherichia coli、Bacillusおよび他の属の系統を含む原核生物の宿主細胞も、本発明で有用な宿主細胞である。これらの宿主を形質転換し、その中でクローニングされた外来性DNA配列を発現させるための技法は、本技術分野で周知である（例えば、Sambrookら、上記参照）。E. coli等の細菌において融合ポリペプチドを発現すると、ポリペプチドは、典型的には不溶性顆粒として細胞質中に保持され得る、または細菌分泌配列によって細胞膜周辺腔へと方向づけられ得る。前者の場合、細胞が溶解され、顆粒が回収され、例えば、グアニジンHClまたは尿素を使用して変性される。次に、尿素ならびに還元および酸化型グルタチオンの組合せの溶液に対する透析と、それに続く緩衝食塩水溶液に対する透析による等、変性剤を希釈することにより、変性されたポリペプチドをリフォールディングおよび二量体形成させることができる。代替法において、タンパク質は、可溶性形態で細胞質から回収することができ、変性剤を使用せずに単離することができる。タンパク質は、例えば、リン酸緩衝食塩水における水性抽出物として細胞から回収される。目的のタンパク質を捕捉するために、抽出物を、固定化された抗体またはヘパリンーセファロースカラム等、クロマトグラフィー媒体に直接的にア

10

20

30

40

50

プライする。分泌されたポリペプチドは、細胞を破壊し（例えば、超音波処理または浸透圧ショックにより）、タンパク質を回収することにより、可溶性かつ機能的な形態で細胞膜周辺腔から回収し、これにより、変性およびリフォールディングの必要を取り除くことができる。例えば、Luら、J. Immunol. Meth. 267巻：213～226頁、2002年を参照されたい。

【0190】

形質転換またはトランスフェクトされた宿主細胞は、選択された宿主細胞の成長に必要とされる栄養素および他の成分を含有する培養培地において、従来の手順に従って培養される。限定培地および複合培地を含む様々な適した培地は、本技術分野で公知であり、炭素源、窒素源、必須アミノ酸、ビタミンおよびミネラルを一般に含む。培地は、必要に応じて増殖因子または血清等の成分を含有することもできる。成長培地は一般に、例えば、発現ベクター上に存するまたは宿主細胞にコトランスフェクトされた選択可能マーカーによって補完される薬物選択または必須栄養素の欠乏により、外因的に加えられたDNAを含有する細胞を選択するであろう。

【0191】

本発明のタンパク質は、従来のタンパク質精製方法、典型的には、クロマトグラフィー技法の組合せによって精製される。全般的には、Affinity Chromatography: Principles & Methods、Pharmacia LKB Biotechnology、Uppsala、Sweden、1988年；およびScopes、Protein Purification: Principles and Practice、Springer-Verlag、New York、1994年を参照されたい。免疫グロブリン重鎖ポリペプチドを含むタンパク質は、固定化されたプロテインAにおける親和性クロマトグラフィーによって精製することができる。ゲル濾過等、追加的な精製ステップを使用して、所望のレベルの純度を得ることができる、または脱塩、バッファー交換その他をもたらしすることができる。

【0192】

例えば、分画および／または従来の精製方法を使用して、組換え宿主細胞から精製された本発明の融合ポリペプチドおよび二量体タンパク質を得ることができる。一般に、硫酸アンモニウム沈殿および酸またはカオトロブ抽出を試料の分画に使用することができる。例示的な精製ステップは、ヒドロキシアパタイト、分子ふるい、FPLCおよび逆相高速液体クロマトグラフィーを含むことができる。適したクロマトグラフィー媒体は、誘導体化デキストラン、アガロース、セルロース、ポリアクリルアミド、特殊シリカその他を含む。PEI、DEAE、QAEおよびQ誘導体が適する。例示的なクロマトグラフィー媒体は、フェニルセファロースFF（Pharmacia）、Toyopearlブチル650（Toso Haas、Montgomeryville、PA）、オクチルセファロース（Pharmacia）その他等、フェニル、ブチルもしくはオクチル基により誘導体化された培地；またはAmberchrom CG 71（Toso Haas）その他等、ポリアクリル酸樹脂を含む。適した固体支持体は、使用される条件下で不溶性である、ガラスビーズ、シリカに基づく樹脂、セルロース樹脂、アガロースビーズ、架橋アガロースビーズ、ポリスチレンビーズ、架橋ポリアクリルアミド樹脂その他を含む。これらの支持体は、アミノ基、カルボキシル基、スルフヒドリル基、ヒドロキシル基および／または炭水化物部分によるタンパク質の取り付けを可能にする反応性の基により修飾することができる。

【0193】

カップリング化学の例として、臭化シアン活性化、N-ヒドロキシサクシニミド活性化、エポキシド活性化、スルフヒドリル活性化、ヒドラジド活性化、ならびにカルボジイミドカップリング化学のためのカルボキシルおよびアミノ誘導体が挙げられる。上述および他の固体培地は、本技術分野で周知であり、広く使用されており、商業的供給業者から入手できる。ポリペプチド単離および精製のための特定の方法の選択は、ルーチンの設計の問題であり、部分的には、選択された支持体の特性によって決定される。例えば、Affinity Chromatography: Principles & Methods（Pharmacia LKB Biotechnology 1988年）；およびDoonan、Protein Purification Protocols（The Humana Press 1

10

20

30

40

50

９９６年）を参照されたい。

【０１９４】

タンパク質単離および精製における追加的な変種は、当業者であれば考案することができる。例えば、本明細書に記載されている融合ポリペプチドまたは二量体タンパク質に特異的に結合する抗体（例えば、ApoA-1に対応するポリペプチドセグメントに特異的に結合する抗体）を使用して、免疫親和性精製により大量のタンパク質を単離することができる。

【０１９５】

本発明のタンパク質は、特定の特性の活用によって単離することもできる。例えば、固定化された金属イオン吸着（IMAC）クロマトグラフィーを使用して、ポリヒスチジンタグを含むタンパク質を含む、ヒスチジンリッチタンパク質を精製することができる。簡潔に説明すると、ゲルに先ず、二価金属イオンを充填して、キレートを形成する（Sulkowski, Trends in Biochem. 3巻：1頁、1985年）。ヒスチジンリッチタンパク質は、使用した金属イオンに応じて異なる親和性でこのマトリックスに吸着され、競合的溶出、pHの低下または強いキレート剤の使用によって溶出されるであろう。他の精製方法は、レクチン親和性クロマトグラフィーおよびイオン交換クロマトグラフィーによるグリコシル化タンパク質の精製を含む（例えば、M. Deutscher（編）、Meth. Enzymol. 182巻：529頁、1990年を参照）。本発明の追加的な実施形態内で、目的のポリペプチドおよび親和性タグ（例えば、マルトース結合タンパク質、免疫グロブリンドメイン）の融合体を構築して、精製を容易にすることができる。さらに、融合ポリペプチドまたはその二量体の受容体またはリガンド結合特性は、精製に活用することができる。例えば、Aβ結合ポリペプチドセグメントを含む融合ポリペプチドは、親和性クロマトグラフィーを使用することにより単離することができ、それによると、標準クロマトグラフィー方法を使用して、アミロイドベータ（Aβ）ペプチドがカラムに結合され、融合ポリペプチドが結合され、その後に溶出される。

【０１９６】

本発明のポリペプチドは、典型的には、混入高分子、特に、他のタンパク質および核酸に関して、少なくとも約80%純度まで、より典型的には、少なくとも約90%純度まで、好ましくは、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%または少なくとも約99%純度まで精製され、感染性および発熱性因子を含まない。本発明のポリペプチドは、99.9%純粋を超える、薬学的に純粋な状態まで精製することもできる。ある特定の調製物において、精製されたポリペプチドは、他のポリペプチド、特に、動物起源の他のポリペプチドを実質的に含まない。

IV. 使用方法および医薬組成物

【０１９７】

本発明の融合ポリペプチドおよび二量体タンパク質を使用して、様々な疾患または障害の処置のためのApoA-1媒介性治療法を提供することができる。本明細書に記載されている第2のポリペプチドセグメント（例えば、RNaase、パラオキシナーゼ、血小板活性化因子アセチルヒドロラーゼ（PAF-AH）、コレステロールエステル転送タンパク質（CEPTP）またはレシチン・コレステロールアシルトランスフェラーゼ（LCAT））をさらに含む二重特異性融合体に関する一部の態様では、融合ポリペプチドおよび二量体タンパク質は、このような処置のための1種または複数の追加的な生物学的活性をさらに提供することができる。

【０１９８】

特定の態様では、本発明は、粥状動脈硬化によって特徴付けられる心血管疾患、神経変性疾患、アミロイド沈着物によって特徴付けられる疾患、自己免疫性疾患、炎症性疾患、感染性疾患、肥満、メタボリックシンドローム、ネフローゼ症候群、熱傷、硫黄マスタードガスへの曝露、有機リン酸エステルへの曝露、およびがんから選択される疾患または障害を処置するための方法を提供する。本方法は一般に、疾患または障害を有する対象に、有効量の本明細書に記載されている融合ポリペプチドまたは二量体タンパク質を投与する

ステップを含む。

【0199】

本発明に従った処置を受け入れられるアテローム硬化性心血管疾患は、例えば、冠動脈心疾患および脳卒中を含む。冠動脈心疾患の処置の一部の変種では、冠動脈心疾患は、急性冠症候群によって特徴付けられる。一部の実施形態では、アテローム硬化性心血管疾患は、大脳動脈疾患（例えば、頭蓋外大脳動脈疾患、頭蓋内大脳動脈疾患）、動脈硬化性大動脈疾患、腎動脈疾患、腸間膜動脈疾患および末梢動脈疾患（例えば、大動脈腸骨動脈閉塞性疾患）から選択される。

【0200】

本発明に従った処置を受け入れられる神経変性疾患は、例えば、アミロイド沈着物および／または認知症によって特徴付けられる神経変性疾患を含む。アミロイド沈着物によって特徴付けられる例示的な神経変性疾患は、アルツハイマー病である。認知症によって特徴付けられる例示的な神経変性疾患は、アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病および筋萎縮性（amyotrophic）側索硬化症（ALS）を含む。一部の実施形態では、神経変性疾患は、例えば、CNSの脱髄性炎症性疾患（例えば、多発性硬化症（MS））であり、これは、例えば、脊髄－視覚（spino-optical）MS、原発性進行性MS（PPMS）および再発寛解型MS（RRMS）を含む）等、炎症性疾患である。

【0201】

神経変性疾患（例えば、アルツハイマー病またはパーキンソン病）を処置するための方法の一部の実施形態では、神経変性疾患処置のための融合分子は、構造ApoA1-L1-D-L2-RNase（例えば、ApoA1-L1-[Fc領域]-L2-RNase1）もしくはApoA1-L1-D-L2-パラオキシナーゼ（例えば、ApoA1-L1-[Fc領域]-L2-PON1）を有するポリペプチド、または前述の融合ポリペプチドのいずれかの二量体形成によって形成された二量体タンパク質であり；一部のこのような実施形態では、融合ポリペプチドは、（i）配列番号4のアミノ酸残基19～675もしくは25～675、（ii）配列番号14のアミノ酸残基19～657もしくは25～675、（iii）配列番号28のアミノ酸残基19～883もしくは25～883、（iv）配列番号38のアミノ酸残基19～873もしくは25～873、（v）配列番号46のアミノ酸残基19～883もしくは25～883、または（vi）配列番号48のアミノ酸残基19～883もしくは25～883と少なくとも90%、少なくとも95%または100%同一性を有するアミノ酸配列を含むまたはこれからなる。

【0202】

本発明に従った処置を受け入れられる自己免疫性疾患は、例えば、関節リウマチ、全身性エリテマトーデス、多発性硬化症および1型糖尿病を含む。他の実施形態では、自己免疫性疾患は、セリアック病、神経炎、多発性筋炎、若年性関節リウマチ、乾癬、乾癬性関節炎、白斑、シェーグレン症候群、自己免疫性膵炎、炎症性腸疾患（例えば、クローン病、潰瘍性大腸炎）、活動性慢性肝炎、糸球体腎炎、ループス腎炎、強皮症、抗リン脂質症候群、自己免疫性血管炎、サルコイドーシス、自己免疫性甲状腺疾患、橋本甲状腺炎、グレーブス病、ウェゲナー肉芽腫症、重症筋無力症、アジソン病、自己免疫性網膜ぶどう膜炎、尋常性天疱瘡、原発性胆汁性肝硬変、悪性貧血、交感性眼炎（ophthalmia）、ぶどう膜炎、自己免疫性溶血性貧血、肺線維症、慢性ベリリウム症および特発性肺線維症から選択される。一部の变種では、自己免疫性疾患は、関節リウマチ、若年性関節リウマチ、乾癬性関節炎、全身性エリテマトーデス、ループス腎炎、強皮症、乾癬、シェーグレン症候群、1型糖尿病、抗リン脂質症候群および自己免疫性血管炎から選択される。

【0203】

一部の実施形態では、自己免疫性疾患の処置のための融合分子は、構造ApoA1-L1-D（例えば、ApoA1-L1-[Fc領域]）、ApoA1-L1-D-L2-RNase（例えば、ApoA1-L1-[Fc領域]-L2-RNase1）もしくはApoA1-L1-D-L2-パラオキシナーゼ（例えば、ApoA1-L1-[Fc領域]-L2-PON1）を有するポリペプチド、または前述の融合ポリペプチドのいずれか

の二量体形成によって形成された二量体タンパク質であり；一部のこのような実施形態では、融合ポリペプチドは、（i）配列番号2のアミノ酸残基19～525、19～524、25～525もしくは25～524、（ii）配列番号13のアミノ酸残基19～525、19～524、25～525もしくは25～524、（iii）配列番号20のアミノ酸残基19～501、19～500、25～501もしくは25～501、（iv）配列番号22のアミノ酸残基19～515、19～514、25～515もしくは25～514、（v）配列番号24のアミノ酸残基19～535、19～534、25～535もしくは25～534、（vi）配列番号4のアミノ酸残基19～675もしくは25～675、（vii）配列番号14のアミノ酸残基19～657もしくは25～675、（viii）配列番号28のアミノ酸残基19～883もしくは25～883、（ix）配列番号38のアミノ酸残基19～873もしくは25～873、（x）配列番号46のアミノ酸残基19～883もしくは25～883、または（xi）配列番号48のアミノ酸残基19～883もしくは25～883と少なくとも90%、少なくとも95%または100%同一性を有するアミノ酸配列を含むまたはこれからなる。関節リウマチ（RA）を処置するための方法の一部の特定の変種では、RA処置のための融合分子は、構造ApoA1-L1-D（例えば、ApoA1-L1-[Fc領域]）を有するポリペプチド、または前述の融合ポリペプチドの二量体形成によって形成された二量体タンパク質であり；一部のこのような実施形態では、融合ポリペプチドは、（i）配列番号2のアミノ酸残基19～525、19～524、25～525もしくは25～524、（ii）配列番号13のアミノ酸残基19～525、19～524、25～525もしくは25～524、（iii）配列番号20のアミノ酸残基19～501、19～500、25～501もしくは25～501、（iv）配列番号22のアミノ酸残基19～515、19～514、25～515もしくは25～514、または（v）配列番号24のアミノ酸残基19～535、19～534、25～535もしくは25～534と少なくとも90%、少なくとも95%または100%同一性を有するアミノ酸配列を含むまたはこれからなる。全身性エリテマトーデス（SLE）を処置するための方法の一部の特定の変種では、SLE処置のための融合分子は、構造ApoA1-L1-D-L2-RNase（例えば、ApoA1-L1-[Fc領域]-L2-RNase1）もしくはApoA1-L1-D-L2-パラオキシナーゼ（例えば、ApoA1-L1-[Fc領域]-L2-PON1）を有するポリペプチド、または前述の融合ポリペプチドのいずれかの二量体形成によって形成された二量体タンパク質であり；一部のこのような実施形態では、融合ポリペプチドは、（i）配列番号4のアミノ酸残基19～675もしくは25～675、（ii）配列番号14のアミノ酸残基19～657もしくは25～675、（iii）配列番号28のアミノ酸残基19～883もしくは25～883、（iv）配列番号38のアミノ酸残基19～873もしくは25～873、（v）配列番号46のアミノ酸残基19～883もしくは25～883、または（vi）配列番号48のアミノ酸残基19～883もしくは25～883と少なくとも90%、少なくとも95%または100%同一性を有するアミノ酸配列を含むまたはこれからなる。多発性硬化症（MS）を処置するための方法の一部の特定の変種では、MS処置のための融合分子は、構造ApoA1-L1-D-L2-パラオキシナーゼ（例えば、ApoA1-L1-[Fc領域]-L2-PON1）を有するポリペプチド、または前述の融合ポリペプチドの二量体形成によって形成された二量体タンパク質であり；一部のこのような実施形態では、融合ポリペプチドは、（i）配列番号28のアミノ酸残基19～883もしくは25～883、（ii）配列番号38のアミノ酸残基19～873もしくは25～873、（iii）配列番号46のアミノ酸残基19～883もしくは25～883、または（iv）配列番号48のアミノ酸残基19～883もしくは25～883と少なくとも90%、少なくとも95%または100%同一性を有するアミノ酸配列を含むまたはこれからなる。

【0204】

本発明に従った処置を受け入れられる炎症性疾患は、例えば、関節リウマチ、全身性エリテマトーデス、多発性硬化症、1型糖尿病、2型糖尿病および肥満を含む。一部の実施

10

20

30

40

50

形態では、炎症性疾患は、例えば、多発性硬化症、アルツハイマー病またはパーキンソン病等、神経変性炎症性疾患である。他の実施形態では、炎症性疾患は、アテローム硬化性疾患（例えば、冠動脈心疾患または脳卒中）である。なお他の変種では、炎症性疾患は、肝炎（例えば、非アルコール性脂肪性肝炎）、強直性脊椎炎、関節炎（例えば、変形性関節症、関節リウマチ（RA）、乾癬性関節炎）、クローン病、潰瘍性大腸炎、皮膚炎、憩室炎、線維筋痛症、過敏性腸症候群（IBS）および腎炎から選択される。他の実施形態では、炎症性疾患は、炎症性肺疾患であり；一部のこのような実施形態では、炎症性肺疾患は、喘息、慢性閉塞性肺疾患（COPD）、気管支拡張症、特発性肺線維症、過酸素症、低酸素症および急性呼吸促迫症候群（ARDS）から選択される。一部の变種では、炎症性肺疾患を有する患者は、硫黄マスタードガス（SM）に曝露された患者である。他の変種では、炎症性肺疾患を有する患者は、殺虫剤または他の神経毒等、有機リン酸エステルに曝露された患者である。

10

【0205】

一部の実施形態では、炎症性疾患（例えば、炎症性肺疾患）の処置のための融合分子は、構造ApoA1-L1-D（例えば、ApoA1-L1-[Fc領域]）、ApoA1-L1-D-L2-RNase（例えば、ApoA1-L1-[Fc領域]-L2-RNase1）もしくはApoA1-L1-D-L2-パラオキシナーゼ（例えば、ApoA1-L1-[Fc領域]-L2-PON1）を有するポリペプチド、または前述の融合ポリペプチドのいずれかの二量体形成によって形成された二量体タンパク質であり；一部のこのような実施形態では、融合ポリペプチドは、（i）配列番号2のアミノ酸残基19～525、19～524、25～525もしくは25～524、（ii）配列番号13のアミノ酸残基19～525、19～524、25～525もしくは25～524、（iii）配列番号20のアミノ酸残基19～501、19～500、25～501もしくは25～501、（iv）配列番号22のアミノ酸残基19～515、19～514、25～515もしくは25～514、（v）配列番号24のアミノ酸残基19～535、19～534、25～535もしくは25～534、（vi）配列番号4のアミノ酸残基19～675もしくは25～675、（vii）配列番号14のアミノ酸残基19～657もしくは25～675、（viii）配列番号28のアミノ酸残基19～883もしくは25～883、（ix）配列番号38のアミノ酸残基19～873もしくは25～873、（x）配列番号46のアミノ酸残基19～883もしくは25～883、または（xi）配列番号48のアミノ酸残基19～883もしくは25～883と少なくとも90%、少なくとも95%または100%同一性を有するアミノ酸配列を含むまたはこれからなる。特発性肺線維症を処置するための方法の一部の特定の変種では、特発性肺線維症処置のための融合分子は、構造ApoA1-L1-D（例えば、ApoA1-L1-[Fc領域]）を有するポリペプチド、または前述の融合ポリペプチドの二量体形成によって形成された二量体タンパク質であり；一部のこのような実施形態では、融合ポリペプチドは、（i）配列番号2のアミノ酸残基19～525、19～524、25～525もしくは25～524、（ii）配列番号13のアミノ酸残基19～525、19～524、25～525もしくは25～524、（iii）配列番号20のアミノ酸残基19～501、19～500、25～501もしくは25～501、（iv）配列番号22のアミノ酸残基19～515、19～514、25～515もしくは25～514、または（v）配列番号24のアミノ酸残基19～535、19～534、25～535もしくは25～534と少なくとも90%、少なくとも95%または100%同一性を有するアミノ酸配列を含むまたはこれからなる。硫黄マスタードガス（SM）または有機リン酸エステルに曝露された患者における炎症性肺疾患を処置するための方法の一部の特定の変種では、処置のための融合分子は、構造ApoA1-L1-D-L2-パラオキシナーゼ（例えば、ApoA1-L1-[Fc領域]-L2-PON1）を有するポリペプチド、または前述の融合ポリペプチドの二量体形成によって形成された二量体タンパク質であり；一部のこのような実施形態では、融合ポリペプチドは、（i）配列番号28のアミノ酸残基19～883もしくは25～883、（ii）配列番号38のアミノ酸残基19～873もしくは25～873

20

30

40

50

、(i i i) 配列番号46のアミノ酸残基19～883もしくは25～883、または(i v) 配列番号48のアミノ酸残基19～883もしくは25～883と少なくとも90%、少なくとも95%または100%同一性を有するアミノ酸配列を含むまたはこれからなる。急性呼吸促迫症候群(ARDS)、低酸素症または過酸素症を処置するための方法の一部の特定の変種では、処置のための融合分子は、構造ApoA1-L1-D-L2-RNase(例えば、ApoA1-L1-[Fc領域]-L2-RNase1)を有するポリペプチド、または前述の融合ポリペプチドのいずれかの二量体形成によって形成された二量体タンパク質であり；一部のこのような実施形態では、融合ポリペプチドは、(i) 配列番号4のアミノ酸残基19～675もしくは25～675、または(i i) 配列番号14のアミノ酸残基19～657もしくは25～675と少なくとも90%、少なくとも95%または100%同一性を有するアミノ酸配列を含むまたはこれからなる。ある特定の実施形態では、このようなApoA1-L1-D-L2-RNase変種は、延長された期間、酸素で処置されている未熟児の処置に使用される。

10

【0206】

一部の実施形態では、硫黄マスタードガス(SM)への曝露または有機リン酸エステルへの曝露の処置のための融合分子は、構造ApoA1-L1-D-L2-パラオキシナーゼ(例えば、ApoA1-L1-[Fc領域]-L2-PON1)を有するポリペプチド、または前述の融合ポリペプチドの二量体形成によって形成された二量体タンパク質であり；一部のこのような実施形態では、融合ポリペプチドは、(i) 配列番号28のアミノ酸残基19～883もしくは25～883、(i i) 配列番号38のアミノ酸残基19～873もしくは25～873、(i i i) 配列番号46のアミノ酸残基19～883もしくは25～883、または(i v) 配列番号48のアミノ酸残基19～883もしくは25～883と少なくとも90%、少なくとも95%または100%同一性を有するアミノ酸配列を含むまたはこれからなる。

20

【0207】

本発明に従った処置を受け入れられる感染性疾患は、例えば、細菌感染および寄生虫感染を含む。一部の実施形態では、寄生虫感染は、Trypanosoma bruceiまたはLeishmania感染である。他の実施形態では、細菌感染は、Pseudomonas aeruginosa感染である。

【0208】

Pseudomonas aeruginosa感染を処置するための方法の一部の実施形態では、Pseudomonas aeruginosa感染処置のための融合分子は、構造ApoA1-L1-D-L2-パラオキシナーゼ(例えば、ApoA1-L1-[Fc領域]-L2-PON1)を有するポリペプチド、または前述の融合ポリペプチドの二量体形成によって形成された二量体タンパク質であり；一部のこのような実施形態では、融合ポリペプチドは、(i) 配列番号28のアミノ酸残基19～883もしくは25～883、(i i) 配列番号38のアミノ酸残基19～873もしくは25～873、(i i i) 配列番号46のアミノ酸残基19～883もしくは25～883、または(i v) 配列番号48のアミノ酸残基19～883もしくは25～883と少なくとも90%、少なくとも95%または100%同一性を有するアミノ酸配列を含むまたはこれからなる。

30

40

【0209】

一部の実施形態では、感染性疾患(例えば、炎症性肺疾患)の処置のための融合分子は、構造ApoA1-L1-D(例えば、ApoA1-L1-[Fc領域])を有するポリペプチド、または前述の融合ポリペプチドの二量体形成によって形成された二量体タンパク質であり；一部のこのような実施形態では、融合ポリペプチドは、(i) 配列番号2のアミノ酸残基19～525、19～524、25～525もしくは25～524、(i i) 配列番号13のアミノ酸残基19～525、19～524、25～525もしくは25～524、(i i i) 配列番号20のアミノ酸残基19～501、19～500、25～501もしくは25～501、(i v) 配列番号22のアミノ酸残基19～515、19

50

～514、25～515もしくは25～514、または(v)配列番号24のアミノ酸残基19～535、19～534、25～535もしくは25～534と少なくとも90%、少なくとも95%または100%同一性を有するアミノ酸配列を含むまたはこれからなる。

【0210】

本発明に従って処置することができるがんは、例えば、次のものを含む：頭頸部のがん（例えば、口腔、中咽頭（oropharynx）、上咽頭、下咽頭、鼻腔または副鼻腔、喉頭、口唇または唾液腺のがん）；肺がん（例えば、非小細胞肺がん、小細胞癌または中皮腫（mesothelioma））；胃腸管がん（例えば、結腸直腸がん、胃がん、食道がんまたは肛門がん）；消化管間質腫瘍（GIST）；膵臓腺癌；膵腺房細胞癌；小腸のがん；肝臓または胆樹のがん（例えば、肝臓細胞腺腫、肝細胞癌、血管肉腫、肝外または肝内胆管肉腫（cholangiosarcoma）、ファーター膨大部のがん、または胆嚢がん）；乳がん（例えば、転移性乳がんまたは炎症性乳がん）；婦人科がん（例えば、子宮頸部がん、卵巣がん、卵管がん、腹膜癌、膣がん、外陰部がん、妊娠性トロホプラスト腫瘍、または子宮内膜がんもしくは子宮肉腫を含む子宮がん）；尿路のがん（例えば、前立腺がん；膀胱がん；陰茎がん；尿道がん、または例えば、腎細胞癌もしくは移行細胞癌等の腎臓がん、これは腎盂および尿管を含む）；精巣がん；頭蓋内腫瘍（例えば、星状細胞腫、未分化星状細胞腫、神経膠芽腫、乏突起神経膠腫、退形成乏突起膠腫、上衣腫、原発性CNSリンパ腫、髄芽腫、胚細胞腫瘍、松果体新生物、髄膜腫、下垂体腫瘍、神経鞘の腫瘍（例えば、シュワン腫）、脊索腫、頭蓋咽頭腫、脈絡叢（choroid plexus）腫瘍（例えば、脈絡叢癌）；または神経細胞もしくはグリア起源の他の頭蓋内腫瘍）または脊髄の腫瘍（例えば、シュワン腫、髄膜腫）等、中枢神経系（CNS）のがん；内分泌新生物（例えば、甲状腺癌、髄様がんもしくは甲状腺リンパ腫等、例えば、甲状腺がん；例えば、インスリノーマもしくはグルカゴノーマ等、膵内分泌腫瘍；例えば、褐色細胞腫等、副腎癌；カルチノイド腫瘍；または副甲状腺癌）；皮膚がん（例えば、扁平上皮癌；基底細胞癌；カポジ肉腫；または例えば、眼球内メラノーマ等の悪性メラノーマ）；骨がん（例えば、骨肉腫、骨軟骨腫またはユーイング肉腫等、例えば、骨の肉腫）；多発性骨髄腫；緑色腫；軟部組織肉腫（例えば、線維性腫瘍または線維組織球腫瘍）；平滑筋または骨格筋の腫瘍；血管またはリンパ管の管周囲腫瘍（例えば、カポジ肉腫）；滑膜腫瘍；中皮腫瘍；神経腫瘍；傍神経節腫瘍；骨外性軟骨性または骨様腫瘍；および多能性間葉系腫瘍。一部のこのような実施形態では、本明細書に記載されているApoA-1融合分子は、例えば、非ApoA1媒介性免疫調節療法（例えば、免疫チェックポイント阻害剤を含む治療法）、放射線療法または化学療法を含む併用療法等、併用療法の別個の治療法の1つとして、がん患者に投与される。

【0211】

ある特定の実施形態では、併用がん療法は、本明細書に記載されているApoA-1融合分子と、例えば、特異的な細胞表面もしくは細胞外抗原を標的とする治療用モノクローナル抗体、または細胞内タンパク質（例えば、細胞内酵素）を標的とする小分子等の標的化療法とを含む。例示的な抗体標的化療法は、抗VEGF（例えば、ベバシズマブ）、抗EGFR（例えば、セツキシマブ）、抗CTLA-4（例えば、イピリムマブ）、抗PD-1（例えば、ニボルマブ）および抗PD-L1（例えば、ペムブロリズマブ）を含む。例示的な小分子標的化療法は、プロテアソーム阻害剤（例えば、ボルテゾミブ）、チロシンキナーゼ阻害剤（例えば、イマチニブ）、サイクリン依存性キナーゼ阻害剤（例えば、セリシクリブ（seliciclib））；BRAf阻害剤（例えば、ベムラフェニブまたはダブラフェニブ）；およびMEKキナーゼ阻害剤（例えば、トラメチニブ（trametinib））を含む。

【0212】

免疫チェックポイント阻害剤を含む一部のがん併用療法変種では、併用療法は、抗PD-1/PD-L1治療法、抗CTLA-4治療法、またはその両方を含む。ある特定の態様では、本明細書に記載されているApoA-1融合分子は、抗CTLA-4または抗P

10

20

30

40

50

D-1/PD-L1 治療法のいずれかに対する奏効率と共に、抗CTLA-4 プラス抗PD-1/PD-L1 治療法の組合せに対する奏効率を増加させることができる。本発明の融合分子は、抗CTLA-4、抗PD-1/PD-L1 またはこれらの組合せに伴う毒性の低下に有用となることもできる。

【0213】

ある特定の変種では、本発明に従って処置されるがんは、悪性メラノーマ、腎細胞癌、非小細胞肺癌、膀胱がんおよび頭頸部がんから選択される。これらのがんは、免疫チェックポイント阻害剤の抗PD-1/PD-L1 および抗CTLA-4 に対する応答を示した。Grimaldiら、Expert Opin. Biol. Ther. 16巻：433～41頁、2016年；Gunturiら、Curr. Treat. Options Oncol. 15巻：137～46頁、2014年；Topalianら、Nat. Rev. Cancer 16巻：275～87頁、2016年を参照されたい。よって、一部のより特異的な変種では、これらのがんのいずれかは、抗PD-1/PD-L1 治療法、抗CTLA-4 治療法、またはその両方と組み合わせて、本明細書に記載されているAp o A-1 融合分子で処置される。

【0214】

一部の実施形態では、がんの処置のための融合分子は、構造Ap o A1-L1-D（例えば、Ap o A1-L1-[Fc領域]）、Ap o A1-L1-D-L2-RNase（例えば、Ap o A1-L1-[Fc領域]-L2-RNase1）もしくはAp o A1-L1-D-L2-パラオキシナーゼ（例えば、Ap o A1-L1-[Fc領域]-L2-PON1）を有するポリペプチド、または前述の融合ポリペプチドのいずれかの二量体形成によって形成された二量体タンパク質であり；一部のこのような実施形態では、融合ポリペプチドは、（i）配列番号2のアミノ酸残基19～525、19～524、25～525もしくは25～524、（ii）配列番号13のアミノ酸残基19～525、19～524、25～525もしくは25～524、（iii）配列番号20のアミノ酸残基19～501、19～500、25～501もしくは25～501、（iv）配列番号22のアミノ酸残基19～515、19～514、25～515もしくは25～514、（v）配列番号24のアミノ酸残基19～535、19～534、25～535もしくは25～534、（vi）配列番号4のアミノ酸残基19～675もしくは25～675、（vii）配列番号14のアミノ酸残基19～657もしくは25～675、（viii）配列番号28のアミノ酸残基19～883もしくは25～883、（ix）配列番号38のアミノ酸残基19～873もしくは25～873、（x）配列番号46のアミノ酸残基19～883もしくは25～883、または（xi）配列番号48のアミノ酸残基19～883もしくは25～883と少なくとも90%、少なくとも95%または100%同一性を有するアミノ酸配列を含むまたはこれからなる。

【0215】

治療目的の使用のため、本明細書に記載されている融合ポリペプチドまたは二量体タンパク質は、処置が探究されている疾患または障害の管理に関連する従来の方法論と一貫した様式で送達される。本明細書における開示に従って、有効量の融合ポリペプチドまたは二量体タンパク質は、疾患または障害の予防または処置に十分な時間および条件下、このような処置を必要とする対象に投与される。

【0216】

本明細書に記載されている融合ポリペプチドまたは二量体タンパク質の投与のための対象は、特定の疾患または障害を発症するリスクが高い患者と共に、現存する疾患または障害を呈する患者を含む。ある特定の実施形態では、対象は、処置が探究されている疾患または障害を有すると診断された。さらに、対象は、疾患または障害の任意の変化に関して（例えば、疾患または障害の臨床症状の増加または減少に関して）処置の経過においてモニターすることができる。また、一部の变種では、対象は、Ap o A-1 タンパク質の投与が関与する処置を必要とする別の疾患または障害を患わない。

【0217】

予防目的の適用において、医薬組成物または医薬物は、疾患のリスクの排除もしくは低

10

20

30

40

50

下またはその発症遅延に十分な量で、特定の疾患に対して感受性があるまたは他の点でそのリスクがある患者に投与される。治療目的の適用において、組成物または医薬物は、疾患およびその合併症の症状の治癒または少なくとも部分的な抑止に十分な量で、このような疾患が疑われるまたはこれを既に患う患者に投与される。このような達成に適切な量は、治療または薬学的有効用量または量と称される。予防および治療レジームの両方において、薬剤は通常、十分な応答（例えば、冠動脈心疾患における粥状動脈硬化退縮または現存するプラークの安定化）が達成されるまで、いくつかの投薬量で投与される。典型的には、応答はモニターされ、所望の応答が衰え始めたら、反復した投薬量が与えられる。

【0218】

本発明の方法に従った処置のための対象患者を同定するために、認容されるスクリーニング方法を用いて、特異的な疾患に関連するリスク因子を決定することができる、または対象における同定された現存する疾患の状態を決定することができる。このような方法は、例えば、個体が、特定の疾患と診断された親族を有するか決定するステップを含むことができる。スクリーニング方法は、例えば、遺伝性成分を有することが公知の特定の疾患の家族性状態を決定するための従来の精密検査を含むこともできる。この目標に向けて、ヌクレオチドプローブをルーチンに用いて、目的の特定の疾患に関連する遺伝的マーカーを保有する個体を同定することができる。加えて、特異的な疾患のマーカーの同定に有用な、多種多様な免疫学的方法が本技術分野で公知である。スクリーニングは、公知の患者症候学、年齢因子、関連するリスク因子等によって示される通りに実行することができる。これらの方法は、臨床医が、処置のために本明細書に記載されている方法を必要とする患者をルーチンに選択することを可能にする。これらの方法に従って、本発明の融合ポリペプチドまたは二量体タンパク質を使用した処置は、独立した処置プログラムとして、または経過観察、補助剤もしくは他の処置に対する協調的処置レジメンとして実行することができる。

【0219】

投与のため、本発明に従った融合ポリペプチドまたは二量体タンパク質は、医薬組成物として製剤化される。本明細書に記載されている融合ポリペプチドまたは二量体タンパク質を含む医薬組成物は、薬学的に有用な組成物を調製するための公知の方法に従って製剤化することができ、それによって、治療用分子は、薬学的に許容される担体との混合物において組み合わされる。その投与が、レシピエント患者による耐容性を示すことができる場合、組成物は、「薬学的に許容される担体」と言われる。無菌リン酸緩衝食塩水は、薬学的に許容される担体の一例である。他の適した担体は、当業者に周知である。例えば、Gennaro（編）、Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Company、第19版、1995年)を参照されたい。製剤は、1種または複数の賦形剤、保存料、可溶化剤、緩衝剤、バイアル表面におけるタンパク質損失を予防するためのアルブミン等をさらに含むことができる。

【0220】

本発明の融合ポリペプチドまたは二量体タンパク質を含む医薬組成物は、有効量で対象に投与される。融合ポリペプチドまたは二量体タンパク質は、例えば、筋肉内、皮下、静脈内、心房内、関節内、非経口的、鼻腔内、肺内、経皮的、胸膜内、くも膜下腔内および経口経路の投与を含む様々な投与機序によって対象に投与することができる。予防および処置目的で、融合ポリペプチドまたは二量体タンパク質は、単一ボーラス送達において、延長した期間にわたる持続的送達（例えば、持続的経皮的送達）により、または反復投与プロトコル（例えば、毎時間、毎日または毎週ベースで）において、対象に投与することができる。

【0221】

この文脈における有効投薬量の決定は、典型的には、動物モデル研究とそれに続くヒト臨床試験に基づき、モデル対象における対象疾患または障害の出現または重症度を有意に低下させる有効投薬量および投与プロトコルを決定することによりガイドされる。本発明の組成物の有効用量は、投与手段、標的部位、患者の生理的状态、患者がヒトであるか

動物であるか、投与される他の薬物療法、処置が予防的であるか治療的であるか、ならびに組成物それ自体の特異的活性および個体において所望の応答を誘発するその能力を含む多くの異なる因子に応じて変動する。通常、患者はヒトであるが、一部の疾患では、患者は、非ヒト哺乳動物であり得る。典型的には、投薬量レジメンは、最適な治療応答をもたらすように、すなわち、安全性および有効性を最適化するように調整される。したがって、治療または予防有効量は、有益な効果が、任意の望まれない付随的効果を上回る量でもある（例えば、アテローム硬化性心血管疾患の処置の場合は、HDLの増加、粥状動脈硬化退縮および／またはプラーク安定化等、任意の有益な効果が、任意の望まれない付随的効果を上回る）。本発明の融合ポリペプチドまたは二量体タンパク質の投与のため、投薬量は、典型的には、約 $0.1 \mu\text{g} \sim 100 \text{mg}/\text{kg}$ または $1 \mu\text{g}/\text{kg} \sim 50 \text{mg}/\text{kg}$ 、より通常には、 $10 \mu\text{g} \sim 5 \text{mg}/\text{kg}$ 対象体重に及ぶ。より特異的な実施形態では、有効量の薬剤は、約 $1 \mu\text{g}/\text{kg} \sim 20 \text{mg}/\text{kg}$ の間、約 $10 \mu\text{g}/\text{kg} \sim 10 \text{mg}/\text{kg}$ の間または約 $0.1 \text{mg}/\text{kg} \sim 5 \text{mg}/\text{kg}$ の間である。この範囲内の投薬量は、例えば、1日当たり複数の投与、または毎日、毎週、隔週もしくは毎月の投与を含む、単一または複数の投与によって達成することができる。例えば、ある特定の変種では、レジメンは、初期投与と、それに続く毎週または隔週の間隔での複数のその後の投与からなる。別のレジメンは、初期投与と、それに続く毎月または隔月の間隔での複数のその後の投与からなる。あるいは、疾患もしくは障害の臨床症状のモニタリングおよび／または疾患バイオマーカーもしくは他の疾患相関因子（例えば、アテローム硬化性心血管疾患の場合は、HDLレベル）のモニタリングによって示される通り、投与は、不規則な基準で行うことができる。

10

20

【0222】

粥状動脈硬化の処置のための本発明のApoA-1組成物の有効性を評価するための特に適した動物モデルは、例えば、低密度リポタンパク質受容体（LDLR）またはApoEが欠損した公知のマウスモデルを含む。LDLR欠損マウスは、12週間高脂肪食を食べた後に、アテローム硬化性プラークを発症し、ヒトApoA-1（脂質により再構成）は、このモデルにおけるプラークの低下に有効である。ApoE欠損マウスも、粥状動脈硬化の研究に一般的に使用され、ヒトApoA-1（脂質により再構成）は、このモデルにおいて急速に機能する。肝臓リパーゼに関してトランスジェニックであるウサギは、ApoA-1組成物を検査するための別の公知の粥状動脈硬化モデルである。

30

【0223】

アルツハイマー病のモデルの1種は、マウスにおける突然変異体アミロイド-β前駆体タンパク質（APP）およびプレセニリン1の過剰発現を使用する。このようなマウスにおいて、ヒトApoA-1の過剰発現は、記憶および学習欠陥を予防した。Lewisら、J Biol. Chem. 285巻：36958～36968頁、2010年を参照されたい。

【0224】

関節リウマチ（RA）のコラーゲン誘導性関節炎（CIA）モデルも公知である。CIAは、RAと同様の免疫学的および病理学的特色を共有し、これにより、ApoA-1組成物の有効性を評価するための理想的なモデルとなる。例えば、Charles-Schoemanら、Clin Immunol. 127巻：234～44頁、2008年（CIAモデルにおけるApoA-1ミメティックペプチド、D-4Fの有効性を示す研究について記載）を参照されたい。RAの別の公知のモデルは、雌LewisラットにおけるPG-多糖（PG-PS）誘導性関節炎である。これらのマウスにおいて、ApoA-1タンパク質または再構成されたHDLの投与は、急性および慢性の関節炎症を低減させた。Wuら、Arterioscler Thromb Vasc Biol 34巻：543～551頁、2014年。

40

【0225】

多発性硬化症（MS）の動物モデルは、例えば、実験的アレルギー性脳脊髄炎（EAE）モデルを含み、これは、炎症、脱髄および脱力をもたらす、CNS抗原（EAEの文脈において「脳炎誘発物質」とも称される）による免疫化によるCNSにおける自己免疫応答の誘導に頼る。ApoA-1欠損マウスは、このモデルにおいて野生型動物よりも多く

50

の神経変性およびより悪化した疾患を示すことが示された。Meyersら、J. Neuroimmunol. 277巻：176～185頁、2014年を参照されたい。

【0226】

本発明の融合分子は、例えば、不十分に免疫原性の腫瘍であるB16メラノーマ等、動物腫瘍モデルにおける抗腫瘍活性に関して評定することができる。腫瘍免疫療法の複数のモデルについて研究されている。Ngiowら、Adv. Immunol. 130巻：1～24頁、2016年を参照されたい。B16メラノーマモデルは、チェックポイント阻害剤の抗CTLA-4、抗PD-1およびこれらの組合せにより大規模に研究された。抗CTLA-4単独は、GM-CSF形質導入腫瘍ワクチンと組み合わせたまたは抗PD-1と組み合わせた場合においてのみ、このモデルにおいて強力な治療効果を有する。Weber、Semin. Oncol. 37巻：430～439頁、2010年；Aiら、Cancer Immunol. Immunother. 64巻：885～92頁、2015年；Haanenら、Prog. Tumor Res. 42巻：55～66頁、2015年を参照されたい。悪性メラノーマの処置のためのApoA-1融合分子の有効性は、例えば、触知できる皮下腫瘍小結節を形成したB16メラノーママウスへの投与後に、遅くなった腫瘍成長によって示される。ApoA-1融合分子の有効性は、単独で、あるいは、別の抗がん治療法（例えば、腫瘍ワクチンありもしくはなし、または抗PD-1/PD-L1ありもしくはなしの、抗CTLA-4）と組み合わせて、B16メラノーママウスにおいて評定することができる。例えば、腫瘍ワクチンの非存在下における、本明細書に記載されているApoA-1融合分子および抗CTLA-4の組合せを使用した、B16メラノーママウスにおける腫瘍拒絶は、ApoA-1治療法を使用した、抗CTLA-4に対する応答増強を実証する。マウスにおいて機能的に活性を有するが、これらのモデルにおいて免疫原性であることが予想される（これにより、7～10日後に中和抗体の形成をもたらす可能性がある）、ヒトタンパク質配列を含むApoA-1融合分子を評定するための例示的な研究において、マウスに、本発明の融合分子を短い期間（例えば、1週間、例えば、3日間あけた2用量の約40mg/kgで投与される）投与することができ、次に、典型的には、融合分子による注射後2～3週間、腫瘍成長をモニターすることができる。

【0227】

医薬組成物の投薬量は、標的部位における所望の濃度を維持するために、担当臨床医によって変動され得る。例えば、静脈内送達機序が選択される場合、標的組織における血流中の薬剤の局所的濃度は、対象の状態および推定される測定される応答に応じて、1リットル当たり約1～50ナノモルの間の組成物、場合により、1リットル当たり約1.0ナノモル～1リットル当たり10、15または25ナノモルの間であり得る。送達機序、例えば、経皮送達対粘膜表面への送達に基づき、より高いまたはより低い濃度を選択することができる。投薬量は、また、投与された製剤の放出速度、例えば、点鼻薬対粉末、持続放出経口または注射粒子、経皮的製剤等に基づいて調整されるべきである。同じ血清濃度レベルを達成するために、例えば、5ナノモルの放出速度（標準条件下で）を有する緩徐放出粒子は、10ナノモルの放出速度を有する粒子の投薬量の約2倍投与されるであろう。

【0228】

本明細書に記載されている融合ポリペプチドまたは二量体タンパク質を含む医薬組成物は、液体形態で、エアロゾルでまたは固体形態で供給することができる。液体形態は、注射用溶液、エアロゾル、液滴、位相幾何学的溶液および経口懸濁液によって例証されている。例示的な固体形態は、カプセル、錠剤および放出制御形態を含む。後者の形態は、ミニ浸透圧ポンプおよびインプラントによって例証される。例えば、Bremerら、Pharm. Biotechnol. 10巻：239頁、1997年；Ranade「Implants in Drug Delivery」、Drug Delivery Systems内95～123頁（RanadeおよびHollinger編、CRC Press 1995年）；Bremerら「Protein Delivery with Infusion Pumps」Protein Delivery: Physical Systems内239～254頁（SandersおよびHendren編、Plenum Press 1997年）；Yeweyら「Delivery of Proteins from a Controlled Release Inj

ectable Implant」、Protein Delivery: Physical Systems内93～117頁(SandersおよびHendren編、Plenum Press 1997年)を参照されたい。他の固体形態は、クリーム、ペースト、他の位相幾何学的適用その他を含む。

【0229】

分解性ポリマーマイクロスフェアは、治療用タンパク質の高い全身性レベルを維持するように設計された。マイクロスフェアは、ポリ(ラクチド-ε-グリコリド)(PLG)等の分解性ポリマー、ポリ酸無水物、ポリ(オルトエステル)、非生分解性エチルビニルアセテートポリマーから調製され、タンパク質は、ポリマー中に封入されている。例えば、GombotzおよびPettit、Bioconjugate Chem. 6巻: 332頁、1995年; Ranade「Role of Polymers in Drug Delivery」、Drug Delivery Systems内51～93頁

10

(RanadeおよびHollinger編、CRC Press 1995年); RoskosおよびMaskiewicz「Degradable Controlled Release Systems Useful for Protein Delivery」、Protein Delivery: Physical Systems内45～92頁(SandersおよびHendren編、Plenum Press 1997年); Bartusら、Science 281巻: 1161頁、1998年; PutneyおよびBurke、Nature Biotechnology 16巻: 153頁、1998年; Putney、Curr. Opin. Chem. Biol. 2巻: 548頁、1998年を参照されたい。ポリエチレングリコール(PEG)コーティングされたナノスフェアは、治療用タンパク質の静脈内投与のための担体を提供することもできる。例えば、Grefら、Pharm. Biotechnol. 10巻: 167頁、1997年を参照されたい。

【0230】

20

例えば、AnselおよびPopovich、Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems (Lea & Febiger、第5版、1990年); Gennaro(編)、Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Company、第19版、1995年)ならびにRanadeおよびHollinger、Drug Delivery Systems (CRC Press 1996年)によって示される通り、当業者であれば他の剤形を考案することができる。

【0231】

本明細書に記載されている医薬組成物は、併用療法の文脈において使用することもできる。用語「併用療法」は、対象に、少なくとも1つの治療有効用量の本明細書に記載されている融合ポリペプチドまたは二量体タンパク質および別の治療剤が投与されることを表示するように本明細書で使用されている。

30

【0232】

医薬組成物は、本明細書に記載されている融合ポリペプチドまたは二量体タンパク質を含む容器を含むキットとして供給することができる。治療用分子は、例えば、単一もしくは複数用量のための注射用溶液の形態で、または注射前に再構成されるであろう無菌粉末として提供することができる。あるいは、このようなキットは、治療用タンパク質の投与のための、乾燥粉末分散機、液体エアロゾル発生器またはネブライザーを含むことができる。このようなキットは、医薬組成物の効能および使用に関する書面の情報をさらに含むことができる。

【0233】

本発明を、次の非限定例によってさらに例証する。

40

【実施例】

【0234】

(実施例1)

分子設計および調製: 2種のApoA-1-Fc cDNA構築物を設計し、合成し、COS7細胞の一過的トランスフェクションによって発現させ、次に、発現されたタンパク質をプロテインAクロマトグラフィーによって精製した。一方の構築物は、配列番号1に示すヌクレオチド配列を有し、配列番号2の融合ポリペプチドをコードし、本明細書において、ApoA-1(26)FcまたはTHER4とも称される。この構築物は、ヒトApoA-1(配列番号2の残基1～267)のC末端側の末端とヒトγ1 Fcバリエント(配列番号2の残基294～525)の間に、26アミノ酸リンカー(配列番号2の

50

残基 268～293) をコードする DNA セグメントを含有した。哺乳動物細胞における発現および分泌性シグナルペプチド (残基 1～18) の切断、およびプロペプチド (残基 19～24) の任意の潜在的な切断後に、この融合ポリペプチドは、配列番号 2 の残基 19～525、19～524、25～525 もしくは 25～524 (Fc 領域の C 末端リシンは、Fc 含有タンパク質の産生において高頻度で切断されることが公知である) に対応する予測されるアミノ酸配列を有した。他方の構築物は、ApoA-1 (26) Fc 構築物と同一の ApoA-1 および Fc 領域を含有したが、ヒト ApoA-1 と Fc 領域の間に (gly4ser) リンカーを欠いた; この構築物は、本明細書において、ApoA-1 (2) Fc (Theripion) または THERO (gly4ser) 反復単位なしのため) とも称される。この構築物は、ApoA-1 領域とヒト IgG1 のヒンジ領域の間の重複する制限部位の挿入により、2 アミノ酸リンカーを含有した。

10

【0235】

コレステロール流出: *in vitro* アッセイを使用して、ApoA-I 融合タンパク質のコレステロール流出活性を測定した。Tangら、J Lipid Res. 47 巻: 107～14 頁、2006 年を参照されたい。放射標識されたコレステロールおよびミフェプリストン (mifepristone) 誘導性ヒト ABCA1 を発現する BHK 細胞を使用して、*in vitro* コレステロール流出アッセイを行った。処理 24 時間前に、細胞コレステロールを標識するために H3-コレステロールを成長培地に添加し、10 nM ミフェプリストンを 16～20 時間使用して、ABCA1 が誘導される。融合タンパク質ありまたはなしで細胞を 2 時間 37℃ でインキュベートし、氷上で冷却し、培地および細胞を分離して、放射標識されたコレステロールを測定することにより、コレステロール流出を測定した。野生型ヒト ApoA-1 タンパク質を陽性対照として使用した。ApoA-1 と Fc 領域の間にいかなるリンカーも含まず Fc へと直接的に連結された、市販の ApoA-1-Fc タンパク質 (APOA1 組換えヒトタンパク質、hIgG1-Fc タグ; Sino Biological, Inc.) も検査し、これは本明細書において、ApoA-1 (0) Fc (Sino Biol) と称される。このアッセイの結果を図 1 に示す。コレステロール流出は、2 アミノ酸リンカーを有する ApoA-1-Fc (ApoA-1 (2) Fc (Theripion)) またはリンカーなしの ApoA-1-Fc (ApoA-1 (0) Fc (Sino Biol)) のいずれかと比較して、26 アミノ酸リンカーを有する ApoA-1-Fc (ApoA-1 (26) Fc) を含有する培養物において増加した。ApoA-1 (26) Fc は、また、野生型ヒト ApoA-1 (対照 ApoA-1) と同様の活性を有した。

20

30

(実施例 2)

融合構築物の生成および配列検証

【0236】

追加的な ApoA1 融合構築物を設計し、融合遺伝子配列を遺伝子合成のために Blue Heron (Bothell, WA) に提出した。ApoA1 融合タンパク質の設計のための、機能ドメインの位置の基礎的な模式化を図 2A および図 2B に示す。pUC に基づくベクターに挿入された融合遺伝子構築物を、制限酵素消化によって単離し、融合遺伝子をコードする断片を哺乳動物発現ベクター pDG にサブクローニングした。簡潔に説明すると、HindIII+XbaI フランキング制限部位を、ベクターからの各発現遺伝子の除去に使用し、ゲル電気泳動によって細断片を単離し、QIAquick 精製カラムを使用して DNA を抽出し、30 マイクロリットル EB バッファー中に溶出した。断片を HindIII+XbaI 消化 pDG ベクターにライゲーションし、ライゲーション反応物を NEB 5-アルファ、化学的コンピテント細菌に形質転換した。クローンを 100 μg/ml アンピシリン入りの 3 ml LB ブロスに接種し、200 rpm で振盪しつつ、37℃ で一晩育成し、QIAGEN スピンプラスミドミニプレップキットをメーカーの説明書に従って使用して、プラスミド DNA を調製した。IDT Integrated DNA Technologies (Coralville, IA) から配列決定プライマーを得、これらは、次の配列を含んだ:

40

50

p d g F-2 : 5' - g g t t t t g g c a g t a c a t c a a t g g - 3' (配列番号 16) ;

p d g R-2 : 5' - c t a t t g t c t t c c c a a t c c t c c c - 3' (配列番号 17) ;

h i g g r a s : 5' - a c c t t g c a c t t g t a c t c c t t - 3' (配列番号 18) 。

【0237】

プラスミドDNA (800 ng) および配列決定プライマー (25 pmol または 5 μl の 5 pmol / μl ストック) を混合し、GENEWIZ (South Plainfield, NJ) によるDNA配列決定のために提出した。次に、クロマトグラムを解析し、配列をコンティグにアセンブルし、Vector Nti Advance 11.5 ソフトウェア (Life Technologies, Grand Island, NY) を使用して配列を検証した。

(実施例3)

一過的HEK 293Tトランスフェクション系における融合タンパク質の発現

【0238】

本実施例は、プラスミド構築物のトランスフェクションおよび哺乳動物の一過的トランスフェクション系における本明細書に記載されている融合タンパク質の発現を例証する。正しい配列を有するIg融合遺伝子断片を哺乳動物発現ベクターpDGに挿入し、QIAGENプラスミド調製キット (QIAGEN, Valencia, CA) を使用して、陽性クローン由来のDNAを増幅した。5種の異なる構築物を生成した。これらはそれぞれ、ヒトApoA-1遺伝子 (配列番号36に示すアミノ酸配列をコードする、配列番号35に示すヌクレオチド配列) のネイティブコード配列を含んだ。各配列は、アポリポタンパク質A-1の野生型シグナルペプチド (配列番号36のアミノ酸1~18をコードする配列番号35のヌクレオチド1~54) およびプロペプチド配列 (配列番号36のアミノ酸19~24をコードする、配列番号35のヌクレオチド55~72) を含んだ。ApoA-1配列のC末端Q (Gln) 残基を、可変的な長さのリンカーセグメントを介して、ヒトIgG1ヒンジ、CH2およびCH3ドメインに連結して、単鎖 (ApoA-1) -1lnk-ヒトIgG1Fc融合遺伝子/タンパク質を作製した。ヒトIgG1のヒンジ配列は、3個のシステインがセリン残基に置換されて、融合タンパク質の適正なフォールディングを損なう可能性がある、この領域におけるジスルフィド結合形成または対形成していないシステインを排除するように、突然変異している。CH2のP238およびP331残基も、セリンに突然変異して、ADCCおよび補体固定等のエフェクター機能を排除する。各構築物は、アポリポタンパク質A-1 (配列...TKKLNNTQ (配列番号35残基261~267) で終わる) のカルボキシル末端とヒトFc (モチーフ...EPKSSDKT... (配列番号2残基294~301) から始まる) のヒンジ配列の初めの間に挿入されたリンカー配列も含んだ。このリンカー配列は、構築物に応じて、2個のアミノ酸 (またはフランキングドメインとの重複が含まれる場合は4個) ~36個のアミノ酸の長さに及んだ。

【0239】

最短リンカーは、2個の重複する制限部位 (BglIIおよびXhoI) のみを含み、6個の追加的なヌクレオチドまたは2個の追加的な非ネイティブアミノ酸のリンカー長さを有した。必要とされる2個の追加的なアミノ酸のみがアミノ酸配列に付加されるように、分子のコード配列に制限部位を取り込んだ。リンカーのBglII部位は、ApoA-1のC末端グルタミンのコードと重複し、XhoI部位をコードするヌクレオチドのうち3個が、ヒンジの最初のアミノ酸 (E-グルタミン酸) のコードを形成する。リンカーアミノ酸配列 (2個の重複するアミノ酸を含む) は、配列番号20の残基267~270に示されており、これは、配列番号19のヌクレオチド816~825によってコードされる。この構築物の融合遺伝子およびタンパク質は、THERO ((gly4ser) 反復単位が存在しないため) またはapoA-1lnk (2) hIgGとして同定される。

THE R0のヌクレオチドおよびアミノ酸配列は、配列番号19および配列番号20として収載されている。図面は、この構築物を特定するためにTHE R0命名法を使用する。

【0240】

第2の構築物は、制限部位で挟まれた2個の(gly4ser)配列をコードするリンカー(16アミノ酸リンカー)を含み、この構築物の融合遺伝子およびタンパク質は、THE R2(またはapoA-1-link(16)-hIgG1またはapoA-1-(g4s)2-hIgG1)として同定される。THE R2のヌクレオチドおよびアミノ酸配列は、それぞれ配列番号21および配列番号22として収載されている。(gly4ser)2リンカー配列は、配列番号22の残基268~283に示されており、(gly4ser)2リンカーのコードヌクレオチド配列は、配列番号21の残基817~864に示されている。

10

【0241】

第3の構築物は、制限部位で挟まれた4個の(gly4ser)配列をコードするリンカー(26アミノ酸リンカー)を含み、この構築物の融合遺伝子およびタンパク質は、THE R4(またはapoA-1-(g4s)4-mthIgGまたはapoA-1-link(26)-mthIgG)として同定され、「THE R4」の「4」は、(gly4ser)反復単位の数に指し、数26は、非ネイティブの導入されたリンカー配列においてコードされるアミノ酸の総数を指す。THE R4のヌクレオチドおよびアミノ酸配列は、それぞれ配列番号1および配列番号2として収載されている。(gly4ser)4リンカー配列は、配列番号50(配列番号2の残基268~293)に示されており、(gly4ser)4リンカーのコードヌクレオチド配列は、配列番号49(配列番号1の残基817~894)に示されている。

20

【0242】

第4の構築物は、制限部位で挟まれた6個の(gly4ser)配列をコードするリンカー(36アミノ酸リンカー)を含み、この構築物の融合遺伝子およびタンパク質は、THE R6(またはapoA-1-(g4s)6-mthIgGまたはapoA-1-link(36)-mthIgG)として同定される。THE R6のヌクレオチドおよびアミノ酸配列は、それぞれ配列番号23および配列番号24として収載されている。(gly4ser)6リンカー配列は、配列番号52(配列番号24の残基268~303)に示されており、(gly4ser)6リンカーのコードヌクレオチド配列は、配列番号51(配列番号23の残基817~924)に示されている。

30

【0243】

第5の構築物は、制限部位で挟まれた4個の(gly4ser)配列をコードするリンカー(36アミノ酸リンカー)を含んだが、それに加えて、構築物は、IgG1ドメインのカルボキシル末端に第2のリンカーおよび酵素配列を含んだ。(gly4ser)4リンカー配列は、THE R4に関する上述の通りである(それぞれ配列番号49および配列番号50に示すヌクレオチドおよびアミノ酸配列)。第2のリンカーは、N結合型グリコシル化部位を含む、18アミノ酸長配列(VDGASSPVNVSSPSVQDI;配列番号7のヌクレオチド1~54によってコードされる、配列番号8のアミノ酸残基1~18)であり、その後ヒトRNase1酵素活性をコードする配列が続く。リンカー配列は、配列番号7の最初の54ヌクレオチドまたは配列番号8の最初の18アミノ酸として収載されており、その後RNase配列が続く。ApoA-1-link-hIgG1セグメントは、NLG-RNaseに融合され、この構築物は、THE R4RNA2として同定される。ヌクレオチドおよびアミノ酸配列は、それぞれ配列番号3および配列番号4として同定される。

40

【0244】

5種の構築物のそれぞれのミニプレップDNAを調製し、Nanodrop解析によって濃度をチェックした。

【0245】

トランスフェクション前日に、およそ 1.2×10^6 個の293T細胞を60mmディ

50

ッシュに蒔いた。ミニプラスミド調製物（60mmプレートに対し4.0μg DNA）を、QIAGEN POLYFECT（登録商標）試薬（カタログ#301105/301107）を使用してメーカーの説明書に従った293Tトランスフェクションに使用した。トランスフェクション48～72時間後に培養上清を採取した。大部分のトランスフェクションに関して、トランスフェクション24時間後に培地を無血清培地に交換し、採取に先立ちさらに48時間培養物をインキュベートした。

【0246】

さらなる解析のために培養上清を直接的に使用した。一過的にトランスフェクトした細胞由来の7μlの各無血清培養上清を、ゲルに負荷し、4×LDS試料バッファー（Life Technologies、Grand Island、NY）の4×希釈を各試料に添加して、1×LDSローディングバッファーの最終濃度を得た。還元ゲルのため、1/10最終容量まで試料還元剤を添加した。試料を72℃で10分間加熱し、NuPAGE（登録商標）4～12% Bis-Trisゲル（Life Technologies/ThermoFisher Scientific、Grand Island、NY）に負荷した。ゲルを、1×NuPAGE（登録商標）MOPS SDS-PAGEランニングバッファー（NP0001、Life Technologies/ThermoFisher）における180ボルトで1.5時間の電気泳動に付し、XCell II（商標）Blot Module（カタログ#EI002/EI9051、Life Technologies/ThermoFisher、Grand Island、NY）を使用して、タンパク質をニトロセルロースに30ボルトで1時間転写した。5%脱脂乳を含有するPBSにおいてブロットを一晩4℃でブロッキングした。西洋わさびペルオキシダーゼコンジュゲートヤギ抗ヒトIgG（Jackson ImmunoResearch、カタログ#109-036-098、Lot#122301）の1:250、000×希釈物と共にブロットをインキュベートした。ブロットを30分間に3回、それぞれPBS/0.05% Tween 20において洗浄し、ThermoScientific ECL試薬（カタログ#32106）において1分間発色させた。ブロットをオートラジオグラフィフィルムに、ブロットに応じて30秒間～2分間露光させた。図3は、代表的293T一過的トランスフェクション由来の培養上清のウエスタンブロット解析を示す。陽性および陰性対照（それぞれCD40IgGおよび偽トランスフェクション/DNAなし）を各トランスフェクションシリーズに含めた。トランスフェクトされた試料は、図3に示されている通りである；左から右に、レーンは次の通りである：レーン#1 - 偽トランスフェクション；レーン#2 - CD40IgG；レーン#3 - MWマーカー；レーン#4 - THER0；レーン#5 - THER2；レーン#6 - THER4；レーン#7 - THER6；レーン#8 - MWマーカー；レーン#9 - THER4RNA2。

【0247】

THER0、THER2、THER4およびTHER6融合タンパク質は、50kDa分子量マーカーより上の位置に泳動された。これらの融合タンパク質に予測される分子量は、それぞれおよそ55、56、56.6および57kDaとなる筈である。増加するリンカー長さは、融合タンパク質毎の移動度変更によって明らかである。THER4RNA2分子は、およそ73.2kDaであると予測される一方、ApoA-1は、28.6kDaに泳動されると予測される。CD40IgG対照は、およそ55kDaに泳動されると予想される。

（実施例4）

安定したCHO細胞株におけるTHERmt h IgGおよびマルチサブユニットIg融合構築物および融合タンパク質の発現

【0248】

本実施例は、真核細胞株における本明細書に記載されている異なるIg融合遺伝子の発現、ならびにSDS-PAGEおよびIgGサンドイッチELISAによる発現された融合タンパク質の特徴付けを例証する。

融合タンパク質を発現する安定した細胞株のトランスフェクションおよび選択

【0249】

チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) CHO DG44細胞への、CMVプロモーターの制御下におけるTHER-mt h IgG cDNA (変動する長さのリンカーによってヒトIgG1のヒンジおよびFcドメインから分離された、ヒトap o A-1型) を含有する選択可能で増幅可能なプラスミドpDGのエレクトロポレーションによって、Ig融合タンパク質の安定した産生を達成した。

【0250】

pDGベクターは、プラスミドの淘汰圧を増加させるために減弱されたプロモーターを有するDHFR選択可能マーカーをコードするpcDNA3の修飾バージョンである。Q I A G E N H I S P E E D (登録商標) マキシプレップ (maxiprep) キットを使用してプラスミドDNA (200 μg) を調製し、精製されたプラスミドを特有のA s c I部位において直鎖化し (New England Biolabs、Ipswich、MA、カタログ#R0558)、フェノール抽出 (Sigma-Aldrich、St. Louis、MO) によって精製し、エタノール沈殿し、洗浄し、EX-CELL (登録商標) 302組織培養培地 (カタログ#14324、SAFC/Sigma Aldrich、St. Louis、MO) に再懸濁した。フェノール抽出およびエタノール沈殿の直前に、キャリアDNAとしてサケ精子DNA (Sigma-Aldrich、St. Louis、MO) を添加した。プラスミドおよびキャリアDNAを共沈殿させ、400 μgを使用して、エレクトロポレーションによって 2×10^7 個のCHO DG44細胞をトランスフェクトした。

【0251】

グルタミン (4 mM)、ピルビン酸塩、組換えインスリン (1 μg/ml)、ペニシリン-ストレプトマイシンおよび2×DMEM非必須アミノ酸 (全てLife Technologies、Grand Island、NY製) を含有するEX-CELL (登録商標) 302培地 (カタログ#13424C、SAFC Biosciences、St. Louis、MO) (以降、「EX-CELL 302完全」培地と称される) において、トランスフェクションのため、CHO DG44細胞を対数期まで育成した。未トランスフェクト細胞およびトランスフェクトしようとする細胞のための培地も、HT (ヒポキサンチンおよびチミジンの100×溶液から希釈) (Invitrogen/Life Technologies、Grand Island、NY) を含有した。キャパシタンスエクステンダを備えるBioRad (Hercules、CA) GENEPULSER (登録商標) エレクトロポレーションユニットを使用して、280ボルト、950マイクロファラッドでエレクトロポレーションを行った。0.4 cmギャップ無菌使い捨てキュベットにおいてエレクトロポレーションを行った。エレクトロポレーション後に、培養物をT75フラスコ内の非選択的EX-CELL 302完全培地に移す前に、エレクトロポレーションされた細胞を5分間インキュベートした。

【0252】

トランスフェクトされた細胞を、非選択的培地において一晚回復させ、その後、250細胞/ウェル (2500細胞/ml) ~ 2000細胞/ウェル (20,000細胞/ml) に及ぶ変動する系列希釈で、96ウェル平底プレート (Costar) において選択的プレティングを行った。細胞クロニングのための培養培地は、50 nMメトトレキサート含有するEX-CELL 302完全培地であった。トランスフェクションプレートに、5日間の間隔で、80 μlの新鮮培地を与えた。最初の2回の培地供給後に、培地を除去し、新鮮培地で置き換えた。プレートをモニターし、クロンの増殖物 (outgrowth) がほとんどコンフルエントとなるまで、クロンの入った個々のウェルに培地を与え、その後、1 ml培地を含有する24ウェルディッシュへとクロンを増大させた。24ウェルプレートにおいて細胞を移し増大させる前に、本来の96ウェルプレート由来の培養上清のアリコートを実験の96ウェルプレートに採取した。IgG濃度を推定するためのELISA解析まで、この第2のプレートを凍結した。

組換え融合タンパク質の産生レベルに関する培養上清のスクリーニング

【0253】

初期トランスフェクタントのクローンの増殖物が十分なものになったら、マスターウェル由来の培養上清の系列希釈物を解凍し、この希釈物を、IgGサンドイッチELISAの使用により、Ig融合タンパク質の発現に関してスクリーニングした。簡潔に説明すると、NUNC MAXISORP（登録商標）プレートを、PBSにおける $2\mu\text{g}/\text{ml}$ F(ab')₂ ヤギ抗ヒトIgG（Jackson ImmunoResearch、West Grove、PA；カタログ#109-006-098）で4℃にて一晩コーティングした。プレートをPBS/3%BSAにおいてブロッキングし、培養上清の系列希釈物を室温で2～3時間または一晩4℃でインキュベートした。プレートをPBS/0.05% Tween 20において3回洗浄し、PBS/0.5% BSAにおける1:7500～1:10,000の西洋わさびペルオキシダーゼコンジュゲートF(ab')₂ ヤギ抗ヒトIgG（Jackson ImmunoResearch、West Grove、PA、カタログ#109-036-098）と共に1～2時間、室温でインキュベートした。プレートをPBS/0.05% Tween 20において5回洗浄し、SUREBLUE RESERVE（商標）TMB基質（KPL Labs、Gaithersburg、MD；カタログ#53-00-02）により結合を検出した。等容量の1N HClの添加により反応を停止し、各プレートにおけるウェル当たりの吸光度を、SYNERGY（商標）HTプレートリーダー（Biotek、Winooski、VT）において450nmで読み取った。培養上清の希釈物のOD₄₅₀を、公知標準である、THERクローンと同一のIg尾部を有するプロテインA精製されたヒトIgG融合タンパク質の系列希釈を使用して作成された検量線と比較することにより、濃度を推定した。データを収集し、GEN5（商標）ソフトウェア（Biotek、Winooski、VT）およびMicrosoft Office EXCEL（登録商標）表計算ソフトウェアを使用して解析した。

【0254】

CHOトランスフェクタントの初期スクリーニングの結果は、表3および図4A～図4Eおよび図5A～図5Cに要約されている。表3は、スクリーニングされたクローンの数、初期96ウェル培養物から観察された発現レベルの範囲、ならびに初期T25および/または24ウェル使用済みの培養物から観察された発現の概要を示す。図4A～図4Eは、トランスフェクションシリーズの各CHOクローンから得られる産生レベルを表す一連の円柱グラフを示す。THER0、THER2、THER4、THER6およびTHER4RNA2トランスフェクション由来のクローンは、図示されている5枚のパネルのそれぞれにおける群として表される。各クローンを、IgGサンドイッチELISAによって少なくとも1回スクリーニングして、融合タンパク質の発現レベルを評価した。図5A～図5Cは、初期スクリーニング後に最高の発現量を有するCHOトランスフェクタントからの融合タンパク質発現の6および10日間アッセイの結果を示す3枚のパネルを示す。T25フラスコに 1×10^5 生細胞/ml（ 5×10^5 初期接種材料）の5ml培養物を設置することにより、6および10日間アッセイを行った。培養物を6日間育成し、その後、1mlアリコートを除くし、生および死細胞を計数した。次に、細胞を遠心分離し、IgGサンドイッチELISAおよび他の解析によるさらなる解析のために培養上清を確保した。10日目まで、培養物の残りをさらに4日間インキュベートし、細胞数、生存率のために細胞を計数し、IgGサンドイッチELISAのために上清試料を採取した。6日目および10日目の細胞数、生存率および融合タンパク質の濃度のグラフに示す通り、結果をクローン毎に円柱形式で作表する。

【表 3】

表3:安定にトランスフェクトされたCHO DG44細胞におけるApoA1-IgG融合タンパク質の発現

構築物	スクリーニングされたクローン	96ウェル上清発現範囲(μg/ml)	使用済みのT25最良の産生株(μg/ml)	最良のクローンにおける6/10日間アッセイ(μg/ml)
THER0	45	0-46.5	135	60/230
THER2	135	0-36	145	45/125
THER4	237	0-76	165	70/200
THER6	192	0-57	145	85/250
THER4RNA2	50	0-45	90	50/118

【0255】

融合タンパク質の最高の産生量を有するクローンをT25、次いでT75フラスコにおいて増大して、凍結および融合タンパク質産生のスケールアップに適切な数の細胞をもたらした。メトトレキセート含有培養培地における漸進的な増幅によって、4個の最良のクローン由来の培養物における産生レベルをさらに増加させた。連続的細胞継代のそれぞれにおいて、DHFRプラスミドを増幅した細胞のみが生存し得るように、EX-CELL

302完全培地は、増加した濃度のメトトレキセートを含有した。選択的増幅下でのトランスフェクションのための培地は、達成された増幅の程度に応じて、50nM~1μMに及ぶ変動レベルのメトトレキセート(Sigma-Aldrich)を選択的薬剤として含有した。

培養上清からの融合タンパク質の精製

【0256】

ApoA1-IgG1構築物を発現する使用済みのCHO細胞培養物から上清を収集し、0.2μm PESエクスプレスフィルター(Nalgene, Rochester, N. Y.)を通して濾過し、プロテインA-アガロース(IPA300架橋アガロースまたはIPA400HC架橋アガロース)カラム(Repligen, Waltham, Mass.)上で重力流親和性クロマトグラフィーに付した。カラムを0.1Mクエン酸塩バッファー、pH2.2で条件付けし、続いて上清を0.5M NHCO₃でpH8.0に調整し、重力流によって負荷して、融合タンパク質の結合を可能にした。次に、溶出に先立ち、数カラム容量のカラム洗浄バッファー(90mM Tris塩基、150mM NaCl、0.05%アジ化ナトリウム、pH8.7)またはダルベッコ変法PBS、pH7.4でカラムを洗浄した。0.1Mクエン酸塩バッファー、pH3.2を使用して、結合したタンパク質を溶出させた。画分(0.8~0.9ml)を0.2mlの0.5M NaCO₃-NaHCO₃バッファーに収集して、各画分を中和した。各画分由来のアリコート(2μl)のタンパク質濃度を、Nanodrop(Wilmington DE)微量試料分光光度計を使用して280nmにおいて決定し、10:1のv:v比の0.1Mクエン酸塩バッファー、pH3.2、0.5M NaCO₃を使用してブランクを決定した。融合タンパク質を含有する画分をプールし、Spectrum Laboratories G2(Ranch Dominguez, CA、カタログ#G235057、Fisher Scientificカタログ#08-607-007)FLOAT-ALYZER(登録商標)ユニット(MWCO 20kDa)を使用したD-PBS(Hyclone、ThermoFisher Scientific、Dallas, TX)、pH7.4に対する透析によってバッファー交換を行った。無菌2.2リットルCorningローラーボトルにおいて4℃で一晩透析を行った。

10

20

30

40

50

【0257】

透析後に、0.2 μ M フィルターユニットを使用してタンパク質を濾過し、PYROTELL (登録商標) LAL ゲルクロット (gel clot) システム単一検査バイアル (STV) (カタログ#G2006、Associates of Cape Cod、East Falmouth、MA) を使用して、内毒素混入に関してアリコートを検査した。VECTOR NTI (登録商標) バージョン11.5 ソフトウェアパッケージ (Informax、North Bethesda、MD) 内のタンパク質解析ツールおよびオンライン ExPASy タンパク質解析ツール由来の予測される切断部位を使用して、THER4 融合タンパク質の1 mg/ml 溶液の予測される OD280 は、1.19 (シグナルペプチドまたは6 アミノ酸プロペプチドのいずれかを含まない成熟タンパク質) または 1.27 (6 アミノ酸プロペプチドを含む) と決定された。CHO 細胞から分泌される融合タンパク質が、組換え分子からのプロペプチドの完全切断に関して均一であるかは不明である。これらのツールを使用して、精製された融合タンパク質毎の OD280 を補正した。

10

apo A-1 Ig 融合タンパク質の還元および非還元 SDS-PAGE 解析

【0258】

SDS-ポリアクリルアミド4~12% Bis-Tris NuPAGE (登録商標) ゲル (Life Technologies、Grand Island、NY) における電気泳動によって、精製された融合タンパク質を解析した。ジスルフィド結合の還元ありおよびなしで、LDS 試料バッファー中で融合タンパク質試料を72℃で10分間加熱し、4~12% BIS-Tris ゲル (カタログ#NP0301、Life Technologies、Grand Island、NY) にアプライした。5 マイクログラムの各精製されたタンパク質をゲルに負荷した。IMPERIAL (商標) タンパク質染色剤 (Pierce Imperial タンパク質染色試薬、カタログ#24615、ThermoFisher Scientific/Pierce、Rockford、IL) によって、電気泳動後にタンパク質を可視化し、蒸留水中で脱染した。同じゲルに分子量マーカを含めた (KALEIDOSCOPE (商標) 着色済み標準、カタログ#161-0324、Bio-Rad、Hercules、CA)。代表的な非還元および還元ゲルの結果をそれぞれ図6Aおよび図6Bに示す。レーンは左から右に次の通りである：レーン#1 - KALEIDOSCOPE 着色済みMWマーカ；レーン#2 - THER0；レーン#3 - THER2；レーン#4 - THER4；レーン#5 - THER6；レーン#6 - THER4RNA2；レーン#7 - KALEIDOSCOPE 着色済みMWマーカ。およその分子量を図面に示す。

20

30

【0259】

重ねて、異なる融合タンパク質の間のリンカーの長さの差は、還元および非還元ゲルの両方で明らかであり、THER0 タンパク質は、50 kDa の少し上に泳動される。ヒンジジスルフィドの非存在は、還元または非還元条件下で電気泳動した際の、それぞれのタンパク質の同様の移動度によって明らかである。

apo A-1 IgG 融合タンパク質のネイティブゲル電気泳動

【0260】

プロテインA精製された融合タンパク質を、ネイティブPAGE解析に付した。4~16% Bis-Tris ネイティブPAGE (商標) ゲル (Life Technologies/ThermoFisher) と、メーカーの説明書に従って調製された陰極および陽極バッファーを使用して、BLUE ネイティブPAGE ゲルを泳動した。加熱せずに、洗剤を含まない4×試料バッファーを使用して、試料 (4.5 μ g の各融合タンパク質) を調製した。ゲルを30分間150ボルトで、次いで1時間180ボルトで、最後の1時間は220ボルトで泳動した。ゲルを蒸留水中で洗浄し、IMPERIAL (商標) タンパク質染色剤中で2時間インキュベートした。蒸留水における反復した洗浄により、ゲルを一晩大規模に脱染して、ゲル泳動に使用した陰極バッファーに存在する青色色素を除去した。図7は、これらの条件を使用した代表的なネイティブゲルを示す。分子量マー

40

50

カーは、GE Healthcare 高分子量校正マーカーであり、これは、やはり洗剤が添加されていない試料に使用されるローディングバッファーに再懸濁された、6 種の大型の多成分タンパク質の混合物である。試料を次の通りに負荷した：レーン#1 — ORENCIA（登録商標）（アバタセプト；CTLA4hIgG）；レーン#2 — 抗マウスCD40モノクローナル抗体1C10；レーン#3 — THER4RNA2；レーン#4 — GE Healthcare 高MW校正マーカー；レーン#5 — THER6；レーン#6 — THER4；レーン#7 — THER2；レーン#8 — THER0；レーン#9 — GE Healthcare 高MWマーカー；レーン#10 — Athens Research Apo A-1。

【0261】

ネイティブApoA1-IgG融合タンパク質は、140～233kDaマーカーの間のいずれかの位置のおよその分子量に泳動され、同じヒトIgG1 Fcドメインを有するCTLA4Ig融合タンパク質であるORENCIA（登録商標）（アバタセプト）と同様の移動度を有した。THER4RNase二重特異性融合タンパク質は、IMPERIAL染色剤で十分に染色されず、これはおそらく、RNaseドメインの高度に塩基性の組成によるものであるが、より拡散したパターンで移動すると思われ、優勢な可視バンドは、233～440kDa標準の間を移動する。

（実施例5）

THER Apo A-1 融合タンパク質の結合を評価するためのIgG/Apo A-1 サンドイッチELISAの使用

【0262】

抗原結合ELISAを行って、結合する固定化抗ヒトIgG（Fc特異的）によって捕捉され、ヒトアポリポタンパク質A-1に特異的な西洋わさびペルオキシダーゼコンジュゲート抗体によって検出される、Ig融合タンパク質の能力を評価した。高タンパク質結合96ウェルELISAプレート（NUNC MAXISORP（登録商標）プレート、ThermoFisher Scientific）を、1.5μg/mlヤギ抗ヒトIgG（Jackson ImmunoResearch）でコーティングした。プレートをPBS/3% BSAにより一晚4℃でブロッキングした。5μg/mlから開始した各THER融合タンパク質の系列希釈物を一晚4℃でインキュベートした。プレートを3回洗浄し、続いて1:1500希釈した西洋わさびペルオキシダーゼコンジュゲート抗ヒトアポリポタンパク質A-1（ThermoFisher Scientific、カタログ#PAI-28965）と共にインキュベートした。プレートを室温で2時間インキュベートした。プレートを4回洗浄し、続いてSUREBLUE RESERVE（商標）TMB基質（カタログ#：53-00-02、KPL、Gaithersburg、MD）を80μl/ウェルでプレートに添加した。80μl/ウェル1N HClの添加により発色を停止した。SYNERGY（商標）HT Biotekプレートリーダー（Biotek Instruments、Winooski、VT）を使用して450nmで試料を読み取り、GEN5（商標）2.0ソフトウェアを使用してデータを解析した。

【0263】

図8は、代表的なApo A-1結合ELISAの結果を示す。融合タンパク質の濃度に対してOD450をプロットする。THER 0、2、4、6およびTHER4RNA2融合タンパク質は全て、同様の用量応答曲線を示し、分子はそれぞれ、Ig尾部への結合によって捕捉することができ、ヒトApo A-1に標的化された抗体へのApo A-1ドメインの結合によって検出することができることを示す。ヒトアポリポタンパク質A-1（Athens Research & Technology、カタログ#16-16-120101）を対照として含め、これは、抗ヒトFc特異的抗体によって捕捉されなかった。より高い濃度では、分子は、Apo A-1に標的化された抗体による弱い結合を示し、Apo A-1が、抗Fc抗体によって捕捉されることなく、プラスチックに弱く結合した可能性を示す。

（実施例6）

RNase二機能性酵素脂質輸送融合分子の発現および検査 【0264】

Apo A-1 IgG RNase融合タンパク質 (THER4RNA2) のため、RNase活性をアッセイして、融合構築物のカルボキシル末端への酵素の融合が、RNAを消化する分子の能力に干渉したか決定した。図9および図10は、SYNERGY (商標) HTプレートリーダーの蛍光および動態アッセイ機能を使用して行われたRNA SEALERT (商標) アッセイ (IDT、Coralville、IA) の結果を示す。RNA SEALERT (商標) 基質は、一方の末端にフルオレセイン (R) を有し、他の末端にダーククエンチャー (dark quencher) (Q) を有する合成RNAオリゴヌクレオチドである。インタクトである場合、基質は、蛍光がほとんどまたは全くないが、RNaseによって切断された場合、基質は、緑色の蛍光を発生 (490nm励起、520nm発光)、適切に装備された蛍光プレートリーダーにより検出することができる。このアッセイにおける陽性シグナルは、試料 (複数可) 中に存在するRNaseによる基質の切断により、時間と共に増加する蛍光シグナルを示す。96ウェルプレートの各ウェルに添加されたRNA SEALERT基質 (固定濃度の20 pmol/μl)、1×RNA SEALERTバッファーおよび融合タンパク質または酵素対照希釈物と共に、マイクロプレートをインキュベートした。試料毎に3回酵素活性アッセイを行い、動態アッセイを45分間進め、60秒間毎に連続的に読み取りを行った。各時点における増加する蛍光は、図9において、時間の関数としてのRFU/ウェルのトレースとしてウェル毎に表される。酵素/融合タンパク質の系列希釈物は、20 pmol/μl、13.4 pmol/μl、8.9 pmol/μl、6 pmol/μl、4 pmol/μl、2.7 pmol/μl、1.8 pmol/μlおよび酵素なしを含んだ。THER4RNA2融合タンパク質と比較するために、RNase A (Ambion/ThermoFisher、カタログ#AM2270) を陽性対照として含め、THER4 (apo A-1-link26-hIgG) を陰性対照として含めた。4 pmol/μl酵素を使用して作成されたトレースの重ね合わせを図10に示す。2回複製のRNase A、THER4RNA2およびTHER4を示す。全酵素は4 pmol/μlであり、基質は20 pmol/μlで存在する。

(実施例7)

融合タンパク質アクセプターへのコレステロール流出の測定

【0265】

2種の別々のアッセイを使用して、THER0、THER2、THER4、THER6およびTHER4RNA2融合タンパク質を、予め負荷された単球/マクロファージ哺乳動物細胞株からのコレステロール逆転送のためのアクセプター分子として作用するその能力に関して評価した。第1のアッセイは、ヒト単球/マクロファージ細胞株THP-1および蛍光標識されたコレステロール誘導体であるBODIPY-コレステロールまたはTOPFLUOR-コレステロール (ステロール炭素-24に連結された蛍光ボロンジピロメタン (dipyrrromethene) ニフッ化物を有するコレステロール化合物) (Avanti Polar Lipids、Alabaster、AL) を使用した。THP-1細胞を、4mMグルタミン、10% FBSを含有するRPMIにおいて育成し、プレATINGに先立ち中期 (mid) 対数増殖に維持した。Sankaranarayananら (J. Lipid Res. 52巻: 2332~2340頁、2011年) およびZhangら (ASSAY and Drug Development Technologies: 136~146頁、2011年) に概要を述べる手順からプロトコルを適応させた。細胞を採取し、33 ng/ml PMAを含有する100 μl RPMI培地において2×10⁶細胞/mlまたは2×10⁵細胞/ウェルとなるよう96ウェル平底組織培養プレートに蒔いた。細胞を培養に36~48時間維持して、アッセイに先立ち分化を起こさせた。培養培地を吸引し、プレートを1×PBSにおいて洗浄した。次の成分 (培地サプリメントを含有するフェノールレッド不含RPMI、0.2% FBSとACAT阻害剤2 μg/ml、Sandoz 58-035 (Sigma-Aldrich、St. Louis MO)、LXRアゴニストTO-901317、2.5 μM (Sigma-Aldrich、St. Louis、MO)、35 ng/ml PMA (S

10

20

30

40

50

igma-Aldrich、St. Louis、MO) および 1.25 mM メチルベーターシクロデキストリン (Sigma-Aldrich、St. Louis、MO)、50 μ M コレステロール (Sigma-Aldrich、St. Louis、MO) および 25 μ M TOPFLUOR コレステロール (Avanti Polar Lipids、Alabaster、AL) からなる標識培地を 100 μ l / ウェルの容量で添加し、37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ にて 10 ~ 12 時間インキュベートした。平衡化培地、RPMI 完全と 10% FBS、33 ng/ml PMA (100 μ l / ウェル) を各ウェルに添加し、8 時間インキュベートし、その後、アクセプターとのインキュベーションを行った。標識 / 平衡化培地をプレートから吸引し、プレートを 200 μ l / ウェル PBS + 0.15%

BSA で 2 回洗浄した。流出アクセプター試薬を流出バッファー中、個々のウェルに添加し、アッセイに先立ち 2 時間インキュベートした。アクセプターを、アッセイに応じて 100 nM ~ 500 nM に及ぶ濃度で流出バッファーに添加した。流出バッファーは、成長サプリメントおよび 0.15% BSA を含有するフェノールレッド不含 RPMI であった。試料を条件 / アクセプター当たり 6 ~ 12 のセットにおいて実行し、最小で 5 回の複製を統計解析に使用した。APO A-1 を陽性対照として実行し、流出培地単独をバックグラウンド陰性対照 (ベースライン流出) として使用した。流出反応を 2 時間進め、その後、培養培地を黒色平底 96 ウェルプレート (培地読み取り値) に採取した。流出プレートの各ウェルへの 100 μ l の 0.1 N NaOH の添加と、4 $^{\circ}$ C のプレート振盪機における 15 分間インキュベーションによって、細胞ライセートを調製した。細胞ライセートを黒色 96 ウェルプレート (ライセート読み取り値) に移し、励起 485 nm および発光 528 nm による SYNERGY (商標) HT プレートリーダーを使用して、培地およびライセート試料の蛍光を測定した。蛍光測定値の比として流出を計算した: (培地 / (培地 + ライセート) $\times$ 100)。被験アクセプター毎に、総流出 / 試料からアクセプターが存在しない試料のベースライン読み取り値を減算することにより、特異的流出を計算した。GraphPad Prism v4.0 ソフトウェア (San Diego、CA) を使用して、データ解析を行った。アッセイ結果を図 11 に示す。

【0266】

第 2 のアッセイは、マウスマクロファージ細胞株 J774A.1 (ATCC、Manassas、VA) を使用して、Sankaranarayanan ら (J. Lipid Res. 52 巻: 2332 ~ 2340 頁、2011 年) および Yancey ら (J. Lipid Res. 45 巻: 337 ~ 346 頁、2004 年) によって記載されているコレステロールの放射性誘導体である [³H]-コレステロールを使用して、コレステロール逆転送 (RCT) を評価した。簡潔に説明すると、5% FBS、ACAT 阻害剤 Sandoz 58-035 (2 μ g/ml) および 4 μ Ci/ml の [³H]-コレステロールを補充した 0.25 ml の RPMI 培地において、J774 細胞 (24 ウェルプレートにおけるウェル当たり 3.5×10^5 個) を 24 時間インキュベートした。ACAT 阻害剤は、アッセイにおいて全時点で存在した。アクセプターとのインキュベーションに先立ち、cAMP (0.3 mM) ありまたはなしの培地において細胞を 16 ~ 24 時間平衡化した。cAMP の存在は、ABCA1 分子を上方調節する。標識された細胞を、1% BSA を含有する培地において洗浄し、続いてアクセプター分子を MEM-HEPES 培地において 50、100 および 200 nM で添加し、測定に先立ち 4 時間インキュベートした。全処理を 3 回行った。次に、100 μ l の培地における [³H] コレステロールを液体シンチレーションカウントによって測定した。パーセンテージ流出は、流出インキュベーション前の細胞 (t_0 試料) に存在する総 [³H] コレステロールに基づいた。細胞に存在する [³H] コレステロールを測定するために、イソプロパノール中で細胞単層を一晩インキュベートすることにより、細胞脂質を抽出した。脂質抽出後に、脂質抽出物中に存在する総 [³H] コレステロールを液体シンチレーションカウントによって測定した。GraphPad Prism ソフトウェア 4.0 (San Diego、CA) を使用してデータ解析を行った。アッセイ結果を図 12 に示す。

(実施例 8)

PON1二機能性酵素脂質輸送融合分子の構築

【0267】

上述のapoA-1-IgG-RNase発現構築物に加えて、他の酵素ドメインの活性部位にapoA-1リン脂質輸送機能を物理的に連結する追加的な分子が構築される。このような分子の1種は、それぞれ配列番号11および配列番号12に示すヌクレオチドおよびコードされるアミノ酸配列を有する、ヒトパラオキシナーゼ (paraoxanase) 1 (PON1) に対応するセグメントを含有する。このアリールエステラーゼ酵素は、高密度リポタンパク質 (HDL) と排他的に会合して、ヒト血清中に存在し、低密度リポタンパク質分子の酸化を阻害する。このような酸化からの保護は、血管性および冠血管疾患の発症も阻害する。PON1の成熟タンパク質型は、分泌後にそのアミノ末端シグナルペプチド (配列番号11のヌクレオチド残基1~45によってコードされる、配列番号12のアミノ酸残基1~15) を保持するという点において特有である。切断可能アミノ末端を有するPON1の突然変異体型の発現は、PON1が、先ずapoA-1に結合するのではなく直接的にリン脂質に結合することにより、そのアミノ末端を介してリポタンパク質と会合することを実証した。Sorensonら、Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology 19巻: 2214~2225頁、1999年を参照されたい。シグナル配列の除去は、リン脂質、プロテオリポソームおよび血清リポタンパク質へのPON1部分の結合を排除することが見出された。その上、リン脂質の非存在下において、野生型PON1は、apoA-1に直接的に結合しない。Sorensonら、上記参照。このようなPON1シグナル配列突然変異体は、おそらく、最適なリン脂質基質に結合することができないことから、低下した酵素活性を示した。そうであるにもかかわらず、このシグナル配列を失っている、組換え活性型のヒトPON1が細菌において発現された。Stevensら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 105巻: 12780~12784頁、2008年を参照されたい。apoA-1の存在は、酵素のアリールエステラーゼ活性を安定化するものと思われる。

【0268】

PON1のアミノ末端シグナル配列 (およびしたがって、リン脂質結合部分) の除去、およびヒtapoA-1-link-IgGによるこの領域の置換は、酵素活性とapoA-1のリン脂質結合ドメインを直接的に連結し、apoA-1ドメインに結合した最適な基質をもたらしつつ、アリールエステラーゼ酵素活性を安定化する。このような分子は依然として往来し、apoA-1によって結合されたリン脂質により輸送され、代替リン脂質結合ドメインによるシグナル配列ドメインの置換により酵素活性を保持する。加えて、これら2個のドメインを融合する二機能性分子は、改善された発現を示し、apoA-1の活性な結合により脈絡叢へのPON1活性の標的化を容易にする。PON1は、インスリン受容体標的化抗体のカルボキシル末端で発現された (Boadoら、Mol. Pharm. 5巻: 1037~1043頁、2008年; Boadoら、Biotechnology and Bioengineering 108巻: 186~196頁、2011年を参照); しかし、アミノ末端シグナルペプチドは、この融合タンパク質に含まれた。本明細書に記載されている融合遺伝子およびタンパク質は、apoA-1ドメインへのトランケートされた酵素の直接的物理的カップリングによりシグナルペプチドの必要性を排除し、これにより、PON1の結合機能およびアリールエステラーゼ活性の両方を保存および安定化する、PON1融合タンパク質発現の新規方法を提供する。

【0269】

融合遺伝子およびタンパク質の配列は、THER4PON1については配列番号27および配列番号28 (それぞれヌクレオチドおよびアミノ酸配列)、ならびにTHER2PON1については配列番号37および配列番号38 (それぞれヌクレオチドおよびアミノ酸配列) に示されている。同様の融合遺伝子およびタンパク質は、hIgG1-リンカー-PON1セグメント (複数可) に融合されたapoA-1の代替リンカー型を含有する。THER4PON1およびTHER2PON1分子内のPON1配列は、ヒトPON1のQ192対立遺伝子に対応する。

【0270】

PON1の代替型も、PON1をApo A-1に連結する二機能性融合分子の構築に使用される。異なる基質に対する酵素活性に影響を与える配列多型は、PON1配列の192位に存在する。Stevenら、上記参照。この位置におけるアミノ酸は、ヒトではグルタミン（Q）もしくはアルギニン（R）、またはウサギではリシン（K）となることができ

る。192位におけるアルギニン対立遺伝子は、*in vitro*および*in vivo*でより高い触媒活性を有することが報告された。同様に、192位にリシンを有するPON1のウサギ型は、*in vitro*および*in vivo*でより安定した触媒活性を有することが報告された（Stevenら、上記参照；Richterら、Circulation Cardiovascular Genetics 1巻：147～152頁、2008年を参照）。これらの代替PON1配列は、PON1 Q192K型については配列番号41（ヌクレオチド）および配列番号42（アミノ酸）、ならびにPON1 Q192R型については配列番号43（ヌクレオチド）および配列番号44（アミノ酸）に示されている。これらの代替PON1型とTHER4配列（apoA-1（g4s）4hlgGNLG-…）の間の融合構築物は、PON1配列のアミノ酸192（または配列番号46および配列番号48に示すTHER4PON1Qバリエーションのアミノ酸720）においてPON1配列に存在する多型に応じて、THER4PON1 Q192K（それぞれ配列番号45および配列番号46に示すヌクレオチドおよびアミノ酸配列）またはTHER4PON1 Q192R（それぞれ配列番号47および配列番号48に示すヌクレオチドおよびアミノ酸配列）と命名される。同様に、融合遺伝子／タンパク質のTHER2型は、THER2PON1 Q192KまたはTHER2PON1Q192Rと示される。これらの融合構築物の全てに関して、PON1アミノ末端シグナル配列（配列番号12のアミノ酸1～15）が除去される。

【0271】

PON1を含む二重特異性酵素リポタンパク質転送タンパク質は、無毒性基質4-（クロロメチル）酢酸フェニル（CMPA）および酢酸フェニルを使用して、アリールエステラーゼ／PON1活性に関してスクリーニングされる（Richterら、上記参照）。基質および反応産物は、有機リン酸エステル駆除薬と比較して相対的に無毒性であるため、これらの基質は、活性のスクリーニングに好ましい。CMPA基質（Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, MO）は、融合タンパク質の系列希釈物と共にインキュベートされ、CMPA加水分解の速度が、紫外線透過の96ウェルプレート（Costar, Cambridge, Mass）を使用して、280nmで4分間、25℃にてアッセイされる。希釈物を3回または4回アッセイを実行し、20mM Tris-HCl（pH8.0）、1.0mM CaCl₂における3mmol/Lに基質濃度を固定する。同様に、アリールエステラーゼアッセイは、基質としての酢酸フェニルにおいて行われる。PA加水分解の速度は、高および低塩条件下の両方で、270nmで4分間測定される。

（実施例9）

PAFAHまたはCETP二機能性酵素脂質輸送融合分子の構築

【0272】

上述のapoA-1-IgG-RNaseおよびapoA-1-IgG-PON1発現構築物に加えて、他の酵素ドメインの活性部位にApoA-1リン脂質輸送機能を物理的に連結する追加的な分子が構築される。

【0273】

このような分子の1種は、それぞれ配列番号31および配列番号32（GenBank受託番号NM_005084（転写物バリエーション1）も参照）に示すヌクレオチドおよびコードされるアミノ酸配列を有する、ヒトPAFAH（リポタンパク質関連ホスホリパーゼA2、ヒトホスホリパーゼA2群VII、血小板活性化因子アセチルヒドロラーゼ）に対応するセグメントを含有する。PAFAHアミノ酸配列は、ヌクレオチド1593～1595に終止コドンを含む。配列番号31のヌクレオチド270～1592によってコードされる。融合遺伝子およびタンパク質は、N結合型グリコシル化を有するヒトIgG

のカルボキシル末端において P A F A H コード配列を融合して、この 2 分子の間にリンカーを挿入して、設計される。T H E R 4 P A F A H スクレオチドおよびコードされるアミノ酸配列は、それぞれ配列番号 3 3 および配列番号 3 4 として示されている。2 1 アミノ酸シグナルペプチド (M V P P K L H V L F C L C G C L A V V Y P ; 配列番号 3 2 の残基 1 ~ 2 1) を含まない P A F A H 配列は、配列番号 3 4 のアミノ酸位置 5 4 4 において N L G リンカーに融合される。

【0 2 7 4】

別のこのような分子は、それぞれ配列番号 2 9 および配列番号 3 0 (G e n B a n k 受託番号 N M _ 0 0 0 0 7 8 も参照) に示すスクレオチドおよびコードされるアミノ酸配列を有する、ヒト C E T P またはコレステリルエステル転送タンパク質 (C E T P)、転写物バリエーション 1 に対応するセグメントを含有する。C E T P タンパク質は、配列番号 2 9 のスクレオチド 5 8 ~ 1 5 3 7 によってコードされる。融合遺伝子およびタンパク質は、N 結合型グリコシル化を有するヒト I g G のカルボキシル末端において C E T P コード配列を融合して、この 2 分子の間にリンカーを挿入して、設計される。T H E R 4 C E T P (またはヒト a p o A - 1 - (g 4 s) 4 - h I g G - N L G - C E T P) スクレオチドおよびコードされるアミノ酸配列は、それぞれ配列番号 3 9 および配列番号 4 0 として示されている。N L G リンカー配列と C E T P 成熟ペプチドの間の融合遺伝子を作製するために、シグナルペプチド (配列番号 3 0 のアミノ酸 1 ~ 1 7) をコードするスクレオチド (配列番号 2 9 の 5 7 ~ 1 0 7) は除去される。これら 2 個のタンパク質ドメインの間の融合接合部は、配列番号 4 0 のアミノ酸 5 4 4 に位置する。

【0 2 7 5】

前述から、本発明の特異的な実施形態について本明細書において例証目的で記載してきたが、本発明の精神および範囲から逸脱することなく、様々な修正を行うことができることが認められよう。したがって、本発明は、添付の特許請求の範囲によるものを除いて限定されない。本明細書に引用されているあらゆる刊行物、特許および特許出願は、あらゆる目的のため、これらの全体を参照により本明細書に組み込む。

本発明の実施形態の例として、以下の項目が挙げられる。

(項目 1)

アミノ末端位置からカルボキシル末端位置へと、A p o A 1 - L 1 - D を含む融合ポリペプチドであって、

A p o A 1 が、配列番号 2 のアミノ酸残基 1 9 ~ 2 6 7 または 2 5 ~ 2 6 7 と少なくとも 9 5 % 同一性を有するアミノ酸配列を含む第 1 のポリペプチドセグメントであり、前記第 1 のポリペプチドセグメントが、コレステロール流出活性を有し、

L 1 が、第 1 のポリペプチドリンカーであり、

D が、二量体形成ドメインである、

融合ポリペプチド。

(項目 2)

L 1 が、少なくとも 2 個のアミノ酸残基を含む、項目 1 に記載の融合ポリペプチド。

(項目 3)

L 1 が、少なくとも 1 6 個のアミノ酸残基を含む、項目 1 に記載の融合ポリペプチド。

(項目 4)

L 1 が、2 ~ 6 0 個のアミノ酸残基からなる、項目 1 に記載の融合ポリペプチド。

(項目 5)

L 1 が、5 ~ 4 0 個のアミノ酸残基からなる、項目 1 に記載の融合ポリペプチド。

(項目 6)

L 1 が、1 5 ~ 4 0 個のアミノ酸残基からなる、項目 1 に記載の融合ポリペプチド。

(項目 7)

L 1 が、1 6 ~ 3 6 個のアミノ酸残基からなる、項目 1 に記載の融合ポリペプチド。

(項目 8)

L 1 が、1 6 個のアミノ酸残基、2 1 個のアミノ酸残基、2 6 個のアミノ酸残基、3 1

個のアミノ酸残基または36個のアミノ酸残基からなる、項目1に記載の融合ポリペプチド。

(項目9)

L1が、配列番号22の残基268～283、配列番号26の残基268～288、配列番号2の残基268～293、配列番号54、または配列番号24の残基268～303に示すアミノ酸配列を有する、項目8に記載の融合ポリペプチド。

(項目10)

前記第1のポリペプチドセグメントが、配列番号2の残基19～267または25～267に示すアミノ酸配列を有する、項目1～9のいずれか一項に記載の融合ポリペプチド。

10

(項目11)

Dが、免疫グロブリン重鎖定常領域である、項目1～10のいずれか一項に記載の融合ポリペプチド。

(項目12)

前記免疫グロブリン重鎖定常領域が、免疫グロブリンFc領域である、項目11に記載の融合ポリペプチド。

(項目13)

前記Fc領域が、ヒトFc領域である、項目12に記載の融合ポリペプチド。

(項目14)

前記ヒトFc領域が、野生型ヒト配列と比べて1個または複数のアミノ酸置換を含むFcバリエーションである、項目13に記載の融合ポリペプチド。

20

(項目15)

前記Fc領域が、ヒトγ1Fc領域またはヒトγ3Fc領域である、項目13または14に記載の融合ポリペプチド。

(項目16)

前記Fc領域が、Eu残基C220がセリンによって置き換えられた、ヒトγ1Fcバリエーションである、項目14に記載の融合ポリペプチド。

(項目17)

Eu残基C226およびC229がそれぞれ、セリンによって置き換えられた、項目16に記載の融合ポリペプチド。

30

(項目18)

Eu残基P238が、セリンによって置き換えられた、項目17に記載の融合ポリペプチド。

(項目19)

前記Fc領域が、Eu残基P331がセリンによって置き換えられた、ヒトγ1Fcバリエーションである、項目15に記載の融合ポリペプチド。

(項目20)

Eu残基P331が、セリンによって置き換えられた、項目16～18のいずれか一項に記載の融合ポリペプチド。

(項目21)

前記Fcバリエーションが、野生型ヒト配列と比べてグリコシル化を低下させるアミノ酸置換を含む、項目14および16～20のいずれか一項に記載の融合ポリペプチド。

40

(項目22)

Eu残基N297が、別のアミノ酸により置き換えられた、項目21に記載の融合ポリペプチド。

(項目23)

前記Fcバリエーションが、Fc受容体に対する結合親和性を増加または低下させるアミノ酸置換を含む、項目14および16～22のいずれか一項に記載の融合ポリペプチド。

(項目24)

前記Fcバリエーションが、FcγRI、FcγRIIおよびFcγRIIIのうち少なく

50

とも１種に対する結合親和性を増加または低下させるアミノ酸置換を含む、項目２３に記載の融合ポリペプチド。

(項目２５)

Fcバリエーションが、新生児Fc受容体(FcRn)に対する結合親和性を増加または低下させるアミノ酸置換を含む、項目２３または２４に記載の融合ポリペプチド。

(項目２６)

前記Fc領域が、(i)配列番号２の残基２９４～５２５もしくは２９４～５２４または(ii)配列番号１３の残基２９４～５２５もしくは２９４～５２４に示すアミノ酸配列を有する、項目１２に記載の融合ポリペプチド。

(項目２７)

(i)配列番号２の残基１９～５２５、１９～５２４、２５～５２５もしくは２５～５２４、

(ii)配列番号１３の残基１９～５２５、１９～５２４、２５～５２５もしくは２５～５２４、

(iii)配列番号２０の残基１９～５０１、１９～５００、２５～５０１もしくは２５～５０１、

(iv)配列番号２２の残基１９～５１５、１９～５１４、２５～５１５もしくは２５～５１４、

(v)配列番号２６の残基１９～５２０、１９～５１９、２５～５２０もしくは２５～５１９、または

(vi)配列番号２４の残基１９～５３５、１９～５３４、２５～５３５もしくは２５～５３４

と少なくとも９５％同一性を有するアミノ酸配列を含む、項目１に記載の融合ポリペプチド。

(項目２８)

(i)配列番号２の残基１９～５２５、１９～５２４、２５～５２５もしくは２５～５２４、

(ii)配列番号１３の残基１９～５２５、１９～５２４、２５～５２５もしくは２５～５２４、

(iii)配列番号２０の残基１９～５０１、１９～５００、２５～５０１もしくは２５～５０１、

(iv)配列番号２２の残基１９～５１５、１９～５１４、２５～５１５もしくは２５～５１４、

(v)配列番号２６の残基１９～５２０、１９～５１９、２５～５２０もしくは２５～５１９、または

(vi)配列番号２４の残基１９～５３５、１９～５３４、２５～５３５もしくは２５～５３４

に示すアミノ酸配列を含む、項目２７に記載の融合ポリペプチド。

(項目２９)

前記二量体形成ドメインに対しカルボキシル末端側に位置する第２のポリペプチドセグメントをさらに含む融合ポリペプチドであって、前記第２のポリペプチドセグメントが、RNaase、パラオキシナーゼ、血小板活性化因子アセチルヒドロラーゼおよびコレステロールエステル転送タンパク質からなる群から選択される、項目１～２７のいずれか一項に記載の融合ポリペプチド。

(項目３０)

アミノ末端位置からカルボキシル末端位置へと、ApoA1-L1-D-L2-Pを含む融合ポリペプチドであって、

ApoA1が、配列番号２のアミノ酸残基１９～２６７または２５～２６７と少なくとも９５％同一性を有するアミノ酸配列を含む第１のポリペプチドセグメントであり、前記第１のポリペプチドセグメントが、コレステロール流出活性を有し、

10

20

30

40

50

L 1 が、第 1 のポリペプチドリンカーであり、
D が、二量体形成ドメインであり、
L 2 が、第 2 のポリペプチドリンカーであり、L 2 が、任意選択で存在し、
P が、R N a s e、パラオキシナーゼ、血小板活性化因子アセチルヒドロラーゼおよび
コレステロールエステル転送タンパク質からなる群から選択される第 2 のポリペプチドセ
グメントである、
融合ポリペプチド。

(項目 3 1)

L 1 が、少なくとも 2 個のアミノ酸残基を含む、項目 3 0 に記載の融合ポリペプチド。

(項目 3 2)

L 1 が、少なくとも 1 6 個のアミノ酸残基を含む、項目 3 0 に記載の融合ポリペプチド。

(項目 3 3)

L 1 が、2 ～ 6 0 個のアミノ酸残基からなる、項目 3 0 に記載の融合ポリペプチド。

(項目 3 4)

L 1 が、5 ～ 4 0 個のアミノ酸残基からなる、項目 3 0 に記載の融合ポリペプチド。

(項目 3 5)

L 1 が、1 5 ～ 4 0 個のアミノ酸残基からなる、項目 3 0 に記載の融合ポリペプチド。

(項目 3 6)

L 1 が、1 6 ～ 3 6 個のアミノ酸残基からなる、項目 3 0 に記載の融合ポリペプチド。

(項目 3 7)

L 1 が、1 6 個のアミノ酸残基、2 1 個のアミノ酸残基、2 6 個のアミノ酸残基、3 1
個のアミノ酸残基または 3 6 個のアミノ酸残基からなる、項目 3 0 に記載の融合ポリペ
チド。

(項目 3 8)

L 1 が、配列番号 2 2 の残基 2 6 8 ～ 2 8 3、配列番号 2 6 の残基 2 6 8 ～ 2 8 8、配
列番号 2 の残基 2 6 8 ～ 2 9 3、配列番号 5 4、または配列番号 2 4 の残基 2 6 8 ～ 3 0
3 に示すアミノ酸配列を有する、項目 3 7 に記載の融合ポリペプチド。

(項目 3 9)

前記第 1 のポリペプチドセグメントが、配列番号 2 のアミノ酸残基 1 9 ～ 2 6 7 または
2 5 ～ 2 6 7 と少なくとも 9 5 % 同一性を有する、項目 3 0 ～ 3 8 のいずれか一項に記載
の融合ポリペプチド。

(項目 4 0)

D が、免疫グロブリン重鎖定常領域である、項目 3 9 に記載の融合ポリペプチド。

(項目 4 1)

前記免疫グロブリン重鎖定常領域が、免疫グロブリン F c 領域である、項目 4 0 に記載
の融合ポリペプチド。

(項目 4 2)

前記 F c 領域が、ヒト F c 領域である、項目 4 1 に記載の融合ポリペプチド。

(項目 4 3)

前記ヒト F c 領域が、野生型ヒト配列と比べて 1 個または複数のアミノ酸置換を含む F
c バリエントである、項目 4 2 に記載の融合ポリペプチド。

(項目 4 4)

前記 F c 領域が、ヒト γ 1 F c 領域またはヒト γ 3 F c 領域である、項目 4 2 また
は 4 3 に記載の融合ポリペプチド。

(項目 4 5)

前記 F c 領域が、E u 残基 C 2 2 0 がセリンによって置き換えられた、ヒト γ 1 F c
バリエントである、項目 4 3 に記載の融合ポリペプチド。

(項目 4 6)

E u 残基 C 2 2 6 および C 2 2 9 がそれぞれ、セリンによって置き換えられた、項目 4

10

20

30

40

50

5に記載の融合ポリペプチド。

(項目47)

E u 残基 P 2 3 8 が、セリンによって置き換えられた、項目46に記載の融合ポリペプチド。

(項目48)

前記 F c 領域が、E u 残基 P 3 3 1 がセリンによって置き換えられた、ヒト γ 1 F c バリエントである、項目44に記載の融合ポリペプチド。

(項目49)

E u 残基 P 3 3 1 が、セリンによって置き換えられた、項目45～47のいずれか一項に記載の融合ポリペプチド。

(項目50)

前記 F c バリエントが、野生型ヒト配列と比べてグリコシル化を低下させるアミノ酸置換を含む、項目41および43～49のいずれか一項に記載の融合ポリペプチド。

(項目51)

E u 残基 N 2 9 7 が、別のアミノ酸により置き換えられた、項目50に記載の融合ポリペプチド。

(項目52)

前記 F c バリエントが、F c 受容体に対する結合親和性を増加または低下させるアミノ酸置換を含む、項目41および43～51のいずれか一項に記載の融合ポリペプチド。

(項目53)

前記 F c バリエントが、F c γ R I、F c γ R I I および F c γ R I I I のうち少なくとも1種に対する結合親和性を増加または低下させるアミノ酸置換を含む、項目52に記載の融合ポリペプチド。

(項目54)

F c バリエントが、新生児 F c 受容体 (F c R n) に対する結合親和性を増加または低下させるアミノ酸置換を含む、項目52または53に記載の融合ポリペプチド。

(項目55)

前記 F c 領域が、配列番号2の残基294～525または配列番号13の残基294～525に示すアミノ酸配列を有する、項目41に記載の融合ポリペプチド。

(項目56)

L 2 が、存在し、配列番号4の残基526～541に示すアミノ酸配列を有する、項目30～55のいずれか一項に記載の融合ポリペプチド。

(項目57)

配列番号2のアミノ酸残基19～267または25～267と少なくとも95%同一性を有するアミノ酸配列を含む第1のポリペプチドセグメントであって、コレステロール流出活性を有する第1のポリペプチドセグメントと、

前記第1のポリペプチドセグメントに対しカルボキシル末端側に位置する第2のポリペプチドセグメントであって、R N a s e、パラオキシナーゼ、血小板活性化因子アセチルヒドロラーゼおよびコレステロールエステル転送タンパク質からなる群から選択される第2のポリペプチドセグメントと

を含む融合ポリペプチド。

(項目58)

前記第1のポリペプチドセグメントが、配列番号2の残基19～267または25～267に示すアミノ酸配列を有する、項目57に記載の融合ポリペプチド。

(項目59)

前記第1のポリペプチドセグメントに対しカルボキシル末端側に位置し、前記第2のポリペプチドセグメントに対しアミノ末端側に位置するリンカーポリペプチドをさらに含む、項目57または58に記載の融合ポリペプチド。

(項目60)

前記第2のポリペプチドセグメントが、R N a s e である、項目29～59のいずれか

10

20

30

40

50

一項に記載の融合ポリペプチド。

(項目 6 1)

前記 R N a s e が、配列番号 4 のアミノ酸残基 5 4 2 ～ 6 7 5 と少なくとも 9 5 % 同一性を有する、項目 6 0 に記載の融合ポリペプチド。

(項目 6 2)

前記 R N a s e が、配列番号 4 の残基 5 4 2 ～ 6 7 5 に示すアミノ酸配列を有する、項目 6 1 に記載の融合ポリペプチド。

(項目 6 3)

(i) 配列番号 4 の残基 1 9 ～ 6 7 5 もしくは 2 5 ～ 6 7 5、または

(i i) 配列番号 1 4 の残基 1 9 ～ 6 7 5 もしくは 2 5 ～ 6 7 5

と少なくとも 9 5 % 同一性を有するアミノ酸配列を含む、項目 6 0 に記載の融合ポリペプチド。

(項目 6 4)

(i) 配列番号 4 の残基 1 9 ～ 6 7 5 もしくは 2 5 ～ 6 7 5、または

(i i) 配列番号 1 4 の残基 1 9 ～ 6 7 5 もしくは 2 5 ～ 6 7 5

に示すアミノ酸配列を含む、項目 6 3 に記載の融合ポリペプチド。

(項目 6 5)

前記第 2 のポリペプチドセグメントが、パラオキシナーゼ (paraxonase) である、項目 2 9 ～ 5 9 のいずれか一項に記載の融合ポリペプチド。

(項目 6 6)

前記パラオキシナーゼが、配列番号 1 2 のアミノ酸残基 1 6 ～ 3 5 5、配列番号 4 2 のアミノ酸残基 1 6 ～ 3 5 5 または配列番号 4 4 のアミノ酸残基 1 6 ～ 3 5 5 と少なくとも 9 5 % 同一性を有する、項目 6 5 に記載の融合ポリペプチド。

(項目 6 7)

前記パラオキシナーゼが、配列番号 1 2 の残基 1 6 ～ 3 5 5、配列番号 4 2 の残基 1 6 ～ 3 5 5 または配列番号 4 4 の残基 1 6 ～ 3 5 5 に示すアミノ酸配列を有する、項目 6 6 に記載の融合ポリペプチド。

(項目 6 8)

(i) 配列番号 2 8 の残基 1 9 ～ 8 8 3 もしくは 2 5 ～ 8 8 3、

(i i) 配列番号 3 8 の残基 1 9 ～ 8 7 3 もしくは 2 5 ～ 8 7 3、

(i i i) 配列番号 4 6 の残基 1 9 ～ 8 8 3 もしくは 2 5 ～ 8 8 3、または

(i v) 配列番号 4 8 の残基 1 9 ～ 8 8 3 もしくは 2 5 ～ 8 8 3

と少なくとも 9 5 % 同一性を有するアミノ酸配列を含む、項目 6 5 に記載の融合ポリペプチド。

(項目 6 9)

(i) 配列番号 2 8 の残基 1 9 ～ 8 8 3 もしくは 2 5 ～ 8 8 3、

(i i) 配列番号 3 8 の残基 1 9 ～ 8 7 3 もしくは 2 5 ～ 8 7 3、

(i i i) 配列番号 4 6 の残基 1 9 ～ 8 8 3 もしくは 2 5 ～ 8 8 3、または

(i v) 配列番号 4 8 の残基 1 9 ～ 8 8 3 もしくは 2 5 ～ 8 8 3

に示すアミノ酸配列を含む、項目 6 8 に記載の融合ポリペプチド。

(項目 7 0)

前記第 2 のポリペプチドセグメントが、血小板活性化因子アセチルヒドロラーゼである、項目 2 9 ～ 5 9 のいずれか一項に記載の融合ポリペプチド。

(項目 7 1)

前記血小板活性化因子アセチルヒドロラーゼが、配列番号 3 2 のアミノ酸残基 2 2 ～ 4 4 1 と少なくとも 9 5 % 同一性を有する、項目 7 0 に記載の融合ポリペプチド。

(項目 7 2)

前記血小板活性化因子アセチルヒドロラーゼが、配列番号 3 2 の残基 2 2 ～ 4 4 1 に示すアミノ酸配列を有する、項目 7 1 に記載の融合ポリペプチド。

(項目 7 3)

10

20

30

40

50

配列番号 34 の残基 19～963 または 25～963 と少なくとも 95% 同一性を有するアミノ酸配列を含む、項目 70 に記載の融合ポリペプチド。

(項目 74)

配列番号 34 の残基 19～963 または 25～963 に示すアミノ酸配列を含む、項目 73 に記載の融合ポリペプチド。

(項目 75)

前記第 2 のポリペプチドセグメントが、コレステロールエステル転送タンパク質である、項目 29～59 のいずれか一項に記載の融合ポリペプチド。

(項目 76)

前記コレステロールエステル転送タンパク質が、配列番号 30 のアミノ酸残基 18～493 と少なくとも 95% 同一性を有する、項目 75 に記載の融合ポリペプチド。

(項目 77)

前記コレステロールエステル転送タンパク質が、配列番号 30 の残基 18～493 に示すアミノ酸配列を有する、項目 76 に記載の融合ポリペプチド。

(項目 78)

配列番号 40 の残基 19～1019 または 25～1019 と少なくとも 95% 同一性を有するアミノ酸配列を含む、項目 75 に記載の融合ポリペプチド。

(項目 79)

配列番号 40 の残基 19～1019 または 25～1019 に示すアミノ酸配列を含む、項目 78 に記載の融合ポリペプチド。

(項目 80)

二量体形成ドメインをさらに含む、項目 57～62、65～67、70～72 および 75～77 のいずれか一項に記載の融合ポリペプチド。

(項目 81)

ミエロペルオキシダーゼ (MPO) 阻害剤に連結された、項目 1～80 のいずれか一項に記載の融合ポリペプチド。

(項目 82)

ミエロペルオキシダーゼ (MPO) 阻害剤に連結された、項目 1～56、63、64 および 80 のいずれか一項に記載の融合ポリペプチド。

(項目 83)

第 1 の融合ポリペプチドおよび第 2 の融合ポリペプチドを含む二量体タンパク質であって、前記第 1 および第 2 の融合ポリペプチドのそれぞれが、項目 1～56、63、64 および 80 のいずれか一項に規定されている融合ポリペプチドである、二量体タンパク質。

(項目 84)

第 1 の融合ポリペプチドおよび第 2 の融合ポリペプチドを含む二量体タンパク質であって、前記第 1 および第 2 の融合ポリペプチドのそれぞれが、項目 82 に規定されている融合ポリペプチドである、二量体タンパク質。

(項目 85)

項目 1～80 のいずれか一項に記載の融合ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド。

(項目 86)

次に挙げる作動可能に連結されたエレメント、
転写プロモーター、

項目 1～80 のいずれか一項に記載の融合ポリペプチドをコードする DNA セグメント、および

転写ターミネーター
を含む発現ベクター。

(項目 87)

項目 86 に記載の発現ベクターが導入された培養細胞であって、前記 DNA セグメントを発現する細胞。

10

20

30

40

50

(項目 8 8)

融合ポリペプチドを作製する方法であって、

項目 8 6 に記載の発現ベクターが導入された細胞を培養するステップであって、前記細胞が、前記 DNA セグメントを発現し、前記コードされた融合ポリペプチドが、産生されるステップと、

前記融合ポリペプチドを回収するステップと

を含む方法。

(項目 8 9)

二量体タンパク質を作製する方法であって、

項目 8 6 に記載の発現ベクターが導入された細胞を培養するステップであって、前記細胞が、前記 DNA セグメントを発現し、前記コードされた融合ポリペプチドが、二量体タンパク質として産生されるステップと、

前記二量体タンパク質を回収するステップと

を含む方法。

(項目 9 0)

項目 1 ～ 8 2 のいずれか一項に記載の融合ポリペプチドと、

薬学的に許容される担体と

を含む組成物。

(項目 9 1)

項目 8 3 または 8 4 に記載の二量体タンパク質と、

薬学的に許容される担体と

を含む組成物。

(項目 9 2)

粥状動脈硬化によって特徴付けられる心血管疾患を処置するための方法であって、

前記心血管疾患を有する対象に、項目 1 ～ 8 2 のいずれか一項に記載の融合ポリペプチドまたは項目 8 3 もしくは 8 4 に記載の二量体融合タンパク質の有効量を投与するステップ

を含む方法。

(項目 9 3)

前記心血管疾患が、冠動脈心疾患および脳卒中からなる群から選択される、項目 9 2 に記載の方法。

(項目 9 4)

前記冠動脈心疾患が、急性冠症候群によって特徴付けられる、項目 9 3 に記載の方法。

(項目 9 5)

神経変性疾患を処置するための方法であって、

前記神経変性疾患を有する対象に、項目 1 ～ 8 2 のいずれか一項に記載の融合ポリペプチドまたは項目 8 3 もしくは 8 4 に記載の二量体融合タンパク質の有効量を投与するステップ

を含む方法。

(項目 9 6)

前記神経変性疾患が、アルツハイマー病および多発性硬化症からなる群から選択される、項目 9 5 に記載の方法。

(項目 9 7)

前記神経変性疾患が、認知症によって特徴付けられる、項目 9 5 に記載の方法。

(項目 9 8)

アミロイド沈着物によって特徴付けられる疾患を処置するための方法であって、

アミロイド沈着物によって特徴付けられる前記疾患を有する対象に、項目 1 ～ 8 2 のいずれか一項に記載の融合ポリペプチドまたは項目 8 3 もしくは 8 4 に記載の二量体融合タンパク質の有効量を投与するステップ

を含む方法。

10

20

30

40

50

(項目 9 9)

前記疾患が、アルツハイマー病である、項目 9 5、9 7 および 9 8 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 1 0 0)

自己免疫性疾患を処置するための方法であって、

前記自己免疫性疾患を有する対象に、項目 1 ～ 8 2 のいずれか一項に記載の融合ポリペプチドまたは項目 8 3 もしくは 8 4 に記載の二量体融合タンパク質の有効量を投与するステップ

を含む方法。

(項目 1 0 1)

前記自己免疫性疾患が、関節リウマチ、全身性エリテマトーデス、多発性硬化症および 1 型糖尿病からなる群から選択される、項目 1 0 0 に記載の方法。

(項目 1 0 2)

炎症性疾患を処置するための方法であって、

前記炎症性疾患を有する対象に、項目 1 ～ 8 2 のいずれか一項に記載の融合ポリペプチドまたは項目 8 3 もしくは 8 4 に記載の二量体融合タンパク質の有効量を投与するステップ

を含む方法。

(項目 1 0 3)

前記炎症性疾患が、関節リウマチ、全身性エリテマトーデス、多発性硬化症、1 型糖尿病、2 型糖尿病、肥満、非アルコール性脂肪性肝炎、冠動脈心疾患および脳卒中からなる群から選択される、項目 1 0 2 に記載の方法。

(項目 1 0 4)

前記炎症性疾患が、炎症性肺疾患である、項目 1 0 3 に記載の方法。

(項目 1 0 5)

前記炎症性肺疾患が、喘息、慢性閉塞性肺疾患 (COPD)、気管支拡張症、特発性肺線維症、過酸素症、低酸素症および急性呼吸促進症候群からなる群から選択される、項目 1 0 4 に記載の方法。

(項目 1 0 6)

感染性疾患を処置するための方法であって、

前記感染性疾患を有する対象に、項目 1 ～ 8 2 のいずれか一項に記載の融合ポリペプチドまたは項目 8 3 もしくは 8 4 に記載の二量体融合タンパク質の有効量を投与するステップ

を含む方法。

(項目 1 0 7)

前記感染性疾患が、細菌感染によって特徴付けられる、項目 1 0 6 に記載の方法。

(項目 1 0 8)

硫黄マスタードガスまたは有機リン酸エステルへの曝露を処置するための方法であって、

前記硫黄マスタードガスまたは前記有機リン酸エステルに曝露された対象に、項目 1 ～ 8 2 のいずれか一項に記載の融合ポリペプチドまたは項目 8 3 もしくは 8 4 に記載の二量体融合タンパク質の有効量を投与するステップ

を含む方法。

(項目 1 0 9)

がんを処置するための方法であって、

がんを有する対象に、項目 1 ～ 8 2 のいずれか一項に記載の融合ポリペプチドまたは項目 8 3 もしくは 8 4 に記載の二量体融合タンパク質の有効量を投与するステップ

を含む方法。

(項目 1 1 0)

前記がんが、悪性メラノーマ、腎細胞癌、非小細胞肺癌、膀胱がんおよび頭頸部がん

10

20

30

40

50

からなる群から選択される、項目 1 0 9 に記載の方法。

(項目 1 1 1)

前記がん処置が、併用療法である、項目 1 0 9 または 1 1 0 に記載の方法。

(項目 1 1 2)

前記併用療法が、非 A p o A 1 媒介性免疫調節療法を含む、項目 1 1 1 に記載の方法。

(項目 1 1 3)

前記非 A p o A 1 媒介性免疫調節療法が、抗 P D - 1 / P D - L 1 治療法、抗 C T L A - 4 治療法またはその両方を含む、項目 1 1 2 に記載の方法。

(項目 1 1 4)

前記併用療法が、放射線療法を含む、項目 1 1 1 に記載の方法。

(項目 1 1 5)

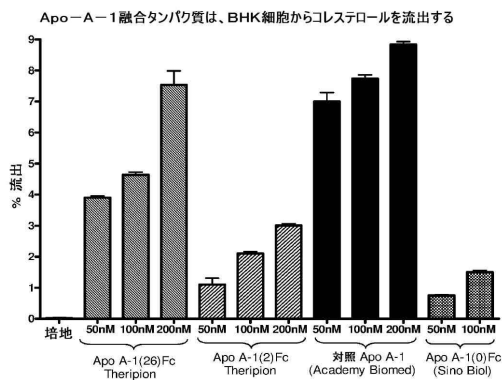
前記併用療法が、化学療法を含む、項目 1 1 1 に記載の方法。

(項目 1 1 6)

前記併用療法が、標的化療法を含む、項目 1 1 1 に記載の方法。

10

【図 1】



【図 2】

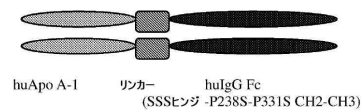


FIG. 2A

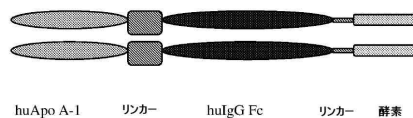


FIG. 2B

【図 3】

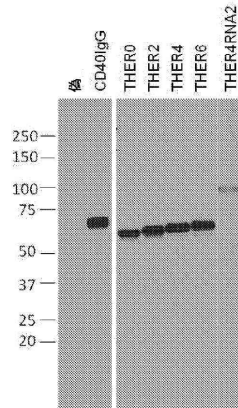


FIG. 3

【図 4 - 1】

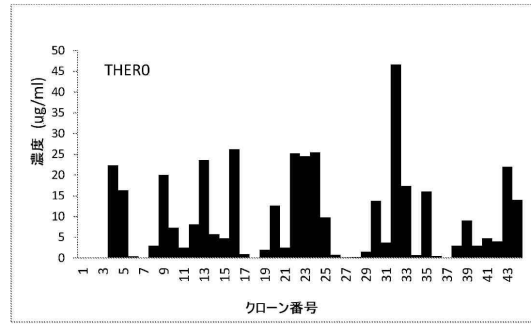


FIG. 4A

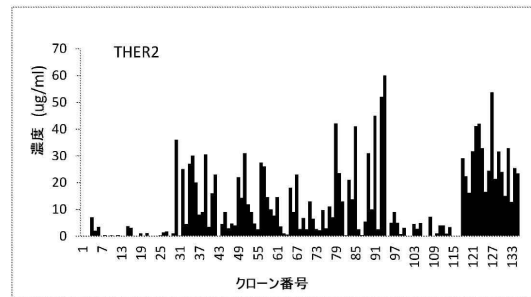


FIG. 4B

【図 4 - 2】

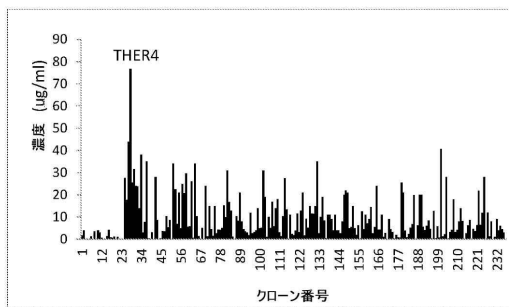


FIG. 4C

【図 4 - 3】

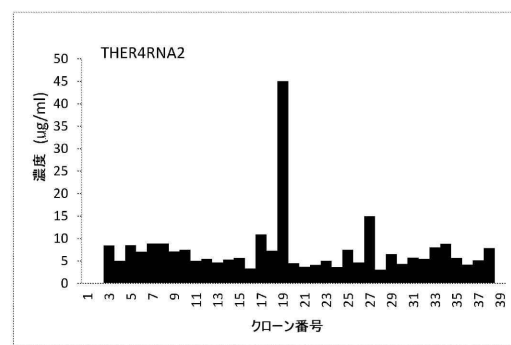


FIG. 4E

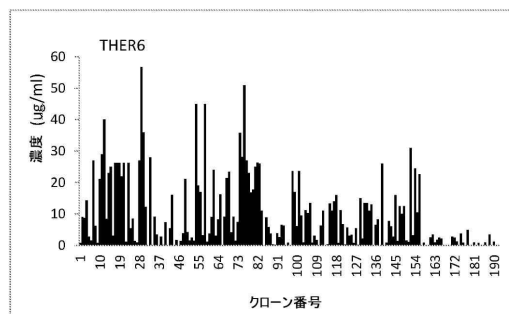


FIG. 4D

【図 5 - 1】

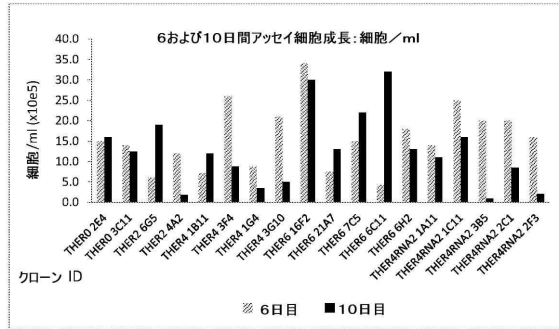


FIG. 5A

【図 5 - 2】

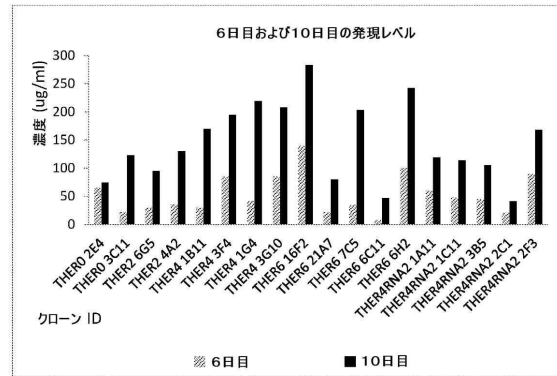


FIG. 5C

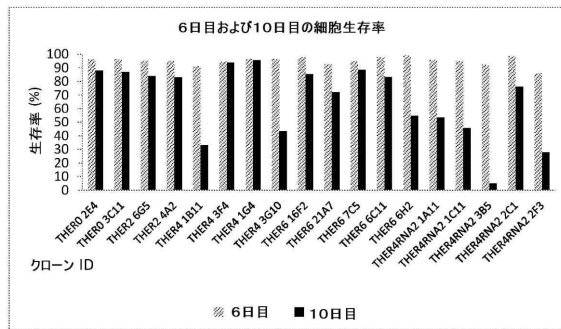


FIG. 5B

【図 6】

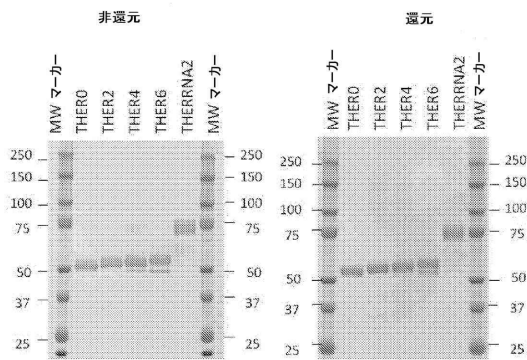


FIG. 6A

FIG. 6B

【図 7】

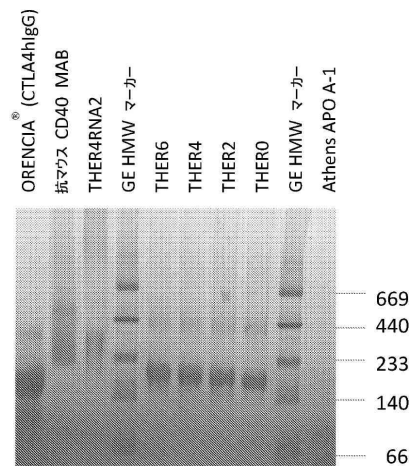


FIG. 7

【図 8】

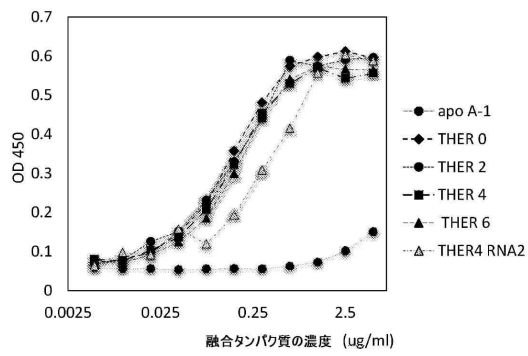


FIG. 8

【図 9】

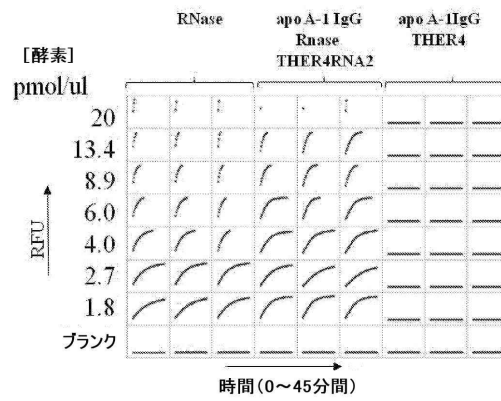


FIG. 9

【図 10】

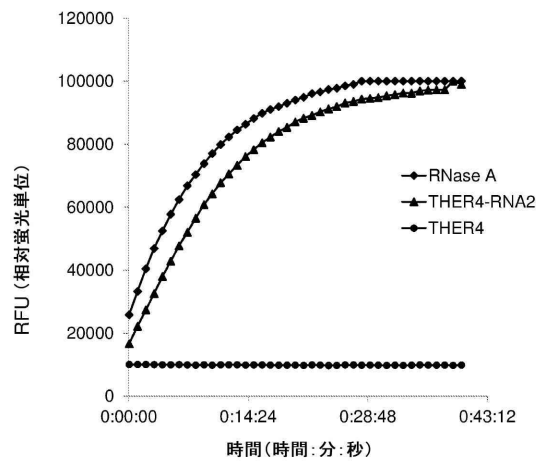


FIG. 10

【図 11】

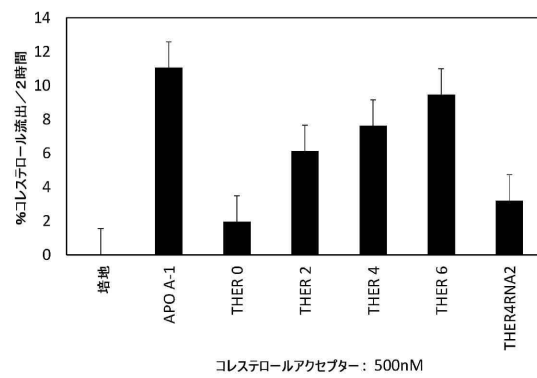


FIG. 11

【 図 1 2 】

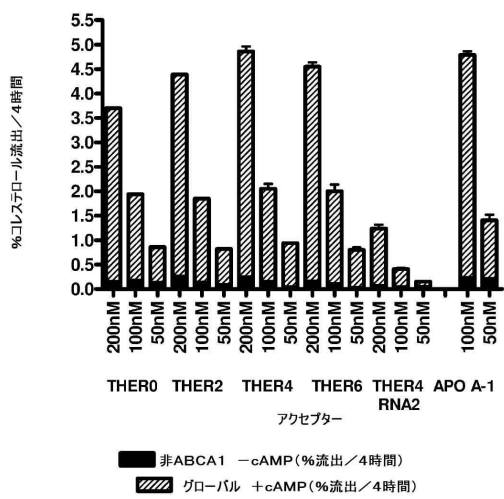


FIG. 12

【 配 列 表 】

0006953020000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.

F I

A 6 1 K	47/68	(2017.01)	A 6 1 K	47/68	
A 6 1 P	1/16	(2006.01)	A 6 1 P	1/16	
A 6 1 P	3/04	(2006.01)	A 6 1 P	3/04	
A 6 1 P	9/00	(2006.01)	A 6 1 P	9/00	
A 6 1 P	9/10	(2006.01)	A 6 1 P	9/10	
A 6 1 P	11/00	(2006.01)	A 6 1 P	9/10	1 0 1
A 6 1 P	11/06	(2006.01)	A 6 1 P	9/10	1 0 3
A 6 1 P	19/02	(2006.01)	A 6 1 P	11/00	
A 6 1 P	25/00	(2006.01)	A 6 1 P	11/06	
A 6 1 P	25/28	(2006.01)	A 6 1 P	19/02	
A 6 1 P	29/00	(2006.01)	A 6 1 P	25/00	
A 6 1 P	31/00	(2006.01)	A 6 1 P	25/28	
A 6 1 P	31/04	(2006.01)	A 6 1 P	29/00	
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 P	31/00	
A 6 1 P	37/02	(2006.01)	A 6 1 P	31/04	
C 0 7 K	14/775	(2006.01)	A 6 1 P	35/00	
C 0 7 K	19/00	(2006.01)	A 6 1 P	37/02	
C 1 2 N	1/15	(2006.01)	C 0 7 K	14/775	
C 1 2 N	1/19	(2006.01)	C 0 7 K	19/00	
C 1 2 N	1/21	(2006.01)	C 1 2 N	1/15	
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N	1/19	
C 1 2 N	9/16	(2006.01)	C 1 2 N	1/21	
C 1 2 N	9/22	(2006.01)	C 1 2 N	5/10	
C 1 2 N	15/52	(2006.01)	C 1 2 N	9/16	B
C 1 2 N	15/63	(2006.01)	C 1 2 N	9/16	Z
C 1 2 P	21/02	(2006.01)	C 1 2 N	9/22	
			C 1 2 N	15/52	Z
			C 1 2 N	15/63	Z N A Z
			C 1 2 P	21/02	C

- (72)発明者 ハイデンーレッドベター, マーサ エス.
アメリカ合衆国 ワシントン 9 8 1 7 7, ショアライン, リッジフィールド ロード エヌ
ダブリュー 1 8 7 9 8
- (72)発明者 レッドベター, ジェフリー エー.
アメリカ合衆国 ワシントン 9 8 1 7 7, ショアライン, リッジフィールド ロード エヌ
ダブリュー 1 8 7 9 8
- (72)発明者 モンテス, ヴィンス
アメリカ合衆国 ワシントン 9 8 2 0 8, エバレット, 5 8 ティーエイチ アベニュー エ
スイー 1 1 4 2 6

審査官 長谷川 強

- (56)参考文献 米国特許出願公開第 2 0 1 1 / 0 1 7 8 0 2 9 (US, A 1)
米国特許出願公開第 2 0 0 4 / 0 1 1 5 1 8 3 (US, A 1)
米国特許出願公開第 2 0 1 4 / 0 3 6 3 4 2 8 (US, A 1)
Database UniProt[online], Accession No.P02647, 2014-11-26 uploaded, [retrieved on 2020
-08-28], <<https://www.uniprot.org/uniprot/P02647.txt?version=198>>, Definition: RecNam

e: Full=Apolipoprotein A-I

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/62

A61K 38/16

A61K 38/46

A61K 45/00

A61K 47/65

A61K 47/68

A61P 1/16

A61P 3/04

A61P 9/00

A61P 9/10

A61P 11/00

A61P 11/06

A61P 19/02

A61P 25/00

A61P 25/28

A61P 29/00

A61P 31/00

A61P 31/04

A61P 35/00

A61P 37/02

C07K 14/775

C07K 19/00

C12N 1/15

C12N 1/19

C12N 1/21

C12N 5/10

C12N 9/16

C12N 9/22

C12N 15/52

C12N 15/63

C12P 21/02

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)

CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

UniProt/GeneSeq