

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2023-507846

(P2023-507846A)

(43)公表日 令和5年2月27日(2023.2.27)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
C 1 2 N	15/12 (2006.01)	C 1 2 N	15/12	Z N A	4 B 0 6 4
C 1 2 N	15/10 (2006.01)	C 1 2 N	15/10	2 0 0 Z	4 B 0 6 5
C 0 7 K	14/47 (2006.01)	C 0 7 K	14/47		4 C 0 7 6
C 0 7 K	19/00 (2006.01)	C 0 7 K	19/00		4 C 0 8 4
C 0 7 K	16/00 (2006.01)	C 0 7 K	16/00		4 H 0 4 5
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全117頁) 最終頁に続く
(21)出願番号	特願2022-538728(P2022-538728)			(71)出願人	518086619
(86)(22)出願日	令和2年12月23日(2020.12.23)				デナリ セラピューティクス インコーポ
(85)翻訳文提出日	令和4年8月1日(2022.8.1)				レイテッド
(86)国際出願番号	PCT/US2020/066831				Denali Therapeutics
(87)国際公開番号	WO2021/133907				Inc.
(87)国際公開日	令和3年7月1日(2021.7.1)				アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0
(31)優先権主張番号	62/953,099				8 0 , サウス サンフランシスコ, オ
(32)優先日	令和1年12月23日(2019.12.23)				イスター ポイント ブールバード 1 6 1
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)			(74)代理人	100102978
(31)優先権主張番号	63/091,819				弁理士 清水 初志
(32)優先日	令和2年10月14日(2020.10.14)			(74)代理人	100102118
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)				弁理士 春名 雅夫
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA			(74)代理人	100160923
		最終頁に続く			弁理士 山口 裕孝
				(74)代理人	100119507
				最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 プログラニュリン変異体

(57)【要約】

プログラニュリン変異体、及びプログラニュリン変異体とFcポリペプチドとを含む融合タンパク質を本明細書において提供する。プログラニュリン関連障害（例えば、前頭側頭型認知症（FTD）などの神経変性疾患）を処置するために、そのようなタンパク質を使用する方法も、本明細書において提供される。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号 2 に対して少なくとも 90% の同一性を有する配列、及び配列番号 2 の残基 574 から 576 に対応する位置における $X_1 X_2 X_3$ により定義される配列を含む、プログラニュリン変異体であって、

ここで、 X_1 、 X_2 、及び X_3 が、それぞれ独立にアミノ酸であり、合わさって QLL ではない、

プログラニュリン変異体。

【請求項 2】

配列番号 2 に対して少なくとも 95% の同一性を有する、請求項 1 に記載のプログラニュリン変異体。

10

【請求項 3】

配列番号 2 に対して少なくとも 98% の同一性を有する、請求項 1 または 2 に記載のプログラニュリン変異体。

【請求項 4】

配列番号 2 に対して少なくとも 99% の同一性を有する、請求項 1 ～ 3 のいずれか 1 項に記載のプログラニュリン変異体。

【請求項 5】

配列番号 2 に対して少なくとも 95% の同一性を有する配列を含む、請求項 1 に記載のプログラニュリン変異体。

20

【請求項 6】

配列番号 2 に対して少なくとも 98% の同一性を有する配列を含む、請求項 1 または 5 に記載のプログラニュリン変異体。

【請求項 7】

配列番号 2 に対して少なくとも 99% の同一性を有する配列を含む、請求項 1、5、及び 6 のいずれか 1 項に記載のプログラニュリン変異体。

【請求項 8】

配列：

TRCPDGGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTSLRHLGGPCQVDAHCSAGHSCI
FTVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCCPRGRFHCSADGRSCFQSGNNSVGAIQCPDSQF
ECPDFSTCCVMVDGSGCCPMPQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCITPTGTHPL
AKKLPAQRTNRAVALSSVMCPDARSRCPDGSTCCELP SGKYGCCPMPNATCCSDH
LHCCPQD TVCDLIQSKCLSKENATTDLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDGYTCCRL
QSGAWGCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGP HQVPWMEKAPAHLSLP
DPQALKRDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGEWGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVA
EGQCQRGSEIVAGLEKMPARRASLSHPRDIGCDQHTSCPVGQTCCPSLGGSWACCQL
PHA VCCEDRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVVSAQPATFLARSPHVGVDVECGEG
HFCHDNQTCCRDNRQGWACCPYRQGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRREAPR
WDAPLRDPALRX₁X₂X₃ (配列番号 3)

30

40

を有する、請求項 1 ～ 7 のいずれか 1 項に記載のプログラニュリン変異体。

【請求項 9】

X_1 が、R、H、K、D、E、S、T、N、Q、L、F、Y、P、または V である、請求項 1 ～ 8 のいずれか 1 項に記載のプログラニュリン変異体。

【請求項 10】

X_2 が、H、K、D、E、S、T、N、Q、G、P、A、Y、V、I、F、L、または R である、請求項 1 ～ 9 のいずれか 1 項に記載のプログラニュリン変異体。

【請求項 11】

X_3 が、L、Y、または P である、請求項 1 ～ 10 のいずれか 1 項に記載のプログラニュリン変異体。

50

【請求項 1 2】

$X_1 X_2 X_3$ が、 $X_1 I L$ 、 $X_1 F L$ 、 $X_1 Q L$ 、 $P X_2 L$ 、 $Q X_2 L$ 、または $V X_2 L$ である、請求項 1～11 のいずれか 1 項に記載のプログラニュリン変異体。

【請求項 1 3】

$X_1 X_2 X_3$ が、 $X_1 X_2 L$ である、請求項 1～11 のいずれか 1 項に記載のプログラニュリン変異体。

【請求項 1 4】

X_2 が、A、R、N、D、C、Q、E、G、H、I、K、M、F、P、S、T、W、Y、または V である、請求項 1 3 に記載のプログラニュリン変異体。

【請求項 1 5】

$X_1 X_2 X_3$ が、 $P I L$ 、 $P F L$ 、 $Q Q L$ 、 $V V L$ 、または $V T L$ である、請求項 1～11 のいずれか 1 項に記載のプログラニュリン変異体。

【請求項 1 6】

$X_1 X_2 X_3$ が、 $P P L$ 、 $P Y L$ 、 $Q Q L$ 、 $Q H L$ 、または $Q R L$ である、請求項 1～11 のいずれか 1 項に記載のプログラニュリン変異体。

【請求項 1 7】

配列番号 2 に対して少なくとも 90% の同一性を有する配列、及び配列番号 2 の残基 576 に対応する位置に隣接しかつその C 末端側にある $Y_1 Y_2 Q L L$ (配列番号 137) により定義される配列を含む、プログラニュリン変異体であって、

ここで、 Y_1 が L であるか、または存在せず、かつ Y_2 が R であるか、または存在しない、プログラニュリン変異体。

【請求項 1 8】

前記プログラニュリン変異体が、配列：

TRCPDGGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLSRHLGGPCQVDAHCSAGHSCI
FTVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCCPRGFHCSADGRSCFQRSNNNSVGAIQCPDSQF
ECPDFSTCCVMVDGSGCCPMPQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCITPTGTHPL
AKKLPAQRTNRAVALSSVMCPDARSRCPDGSTCCCELPSGKYGCCPMPNATCCSDH
LHCCPQDTVCDLIQSKCLSKENATTDLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDGYTCCRL
QSGAWGCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPVQVPWMEKAPAHLSLP
DPQALKRDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGEWGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVA
EGQCQRGSEIVAGLEKMPARRASLSHPRDIGCDQHTSCPVGQTCCPSLGGSWACCQL
PHAVCCEDRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVVSAQPATFLARSPHVGKDVCEGEG
HFCHDNQTCCRDNRQGWACCPYRQGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRREAPR
WDAPLRDPALRQLLY₁Y₂QLL (配列番号 55)

を含み、

ここで、 Y_1 が L であるか、または存在せず、かつ Y_2 が R であるか、または存在しない、

請求項 1 7 に記載のプログラニュリン変異体。

【請求項 1 9】

Y_1 が L である、請求項 1 7 または 1 8 に記載のプログラニュリン変異体。

【請求項 2 0】

Y_2 が R である、請求項 1 7～19 のいずれか 1 項に記載のプログラニュリン変異体。

【請求項 2 1】

Y_1 及び Y_2 が両方とも存在しない、請求項 1 7 または 1 8 に記載のプログラニュリン変異体。

【請求項 2 2】

配列番号 2 に対して少なくとも 90% の同一性を有する配列、及び配列番号 2 の残基 574 から 576 に対応する位置における $X_1 X_2 X_3$ により定義される配列を含む、プロ

10

20

30

40

50

グラニューリン変異体であって、

ここで、 X_1 、 X_2 、及び X_3 が、それぞれ独立にアミノ酸であり、合わさってQLLではない、

プログラニューリン変異体

を含む、ポリペプチド。

【請求項 23】

前記プログラニューリン変異体が、配列番号 2 に対して少なくとも 95% の同一性を有する、請求項 22 に記載のポリペプチド。

【請求項 24】

前記プログラニューリン変異体が、配列番号 2 に対して少なくとも 98% の同一性を有する、請求項 22 または 23 に記載のポリペプチド。

【請求項 25】

前記プログラニューリン変異体が、配列番号 2 に対して少なくとも 99% の同一性を有する、請求項 22 ～ 24 のいずれか 1 項に記載のポリペプチド。

【請求項 26】

前記プログラニューリン変異体が、配列：

TRCPDGGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLSRHLGGPCQVDAHCSAGHSCI
FTVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCCPRGFHCSADGRSCFQRSGNNSVGAIQCPDSQF
ECPDFSTCCVMVDGSGCCPMPQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCITPTGTHPL
AKKLPAQRTNRAVALSSSV MCPDARSRCPDGSTCCELP SGKYGCCPMPNATCCSDH
LHCCPQD TVCDLIQSKCLSKENATTDLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDGYTCCRL
QSGAWGCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGP HQVPWMEKAPAHLSLP
DPQALKRDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGEWGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVA
EGQCQRGSEIVAGLEKMPARRASLSHPRDIGCDQHTSCPVGQTCCPSLGGSWACCQL
PHAVCCEDRQHCCPAGYT CNVKARSCEKEV VSAQPATFLARSPHVGVKDVCEGEG
HFCHDNQTCCRDNRQGWACCPYRQGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRREAPR
WDAPLRDPALRX₁X₂X₃ (配列番号 3)

を有する、請求項 22 ～ 25 のいずれか 1 項に記載のポリペプチド。

【請求項 27】

X_1 が、R、H、K、D、E、S、T、N、Q、L、F、Y、P、または V である、請求項 22 ～ 26 のいずれか 1 項に記載のポリペプチド。

【請求項 28】

X_2 が、H、K、D、E、S、T、N、Q、G、P、A、Y、V、I、F、L、または R である、請求項 22 ～ 27 のいずれか 1 項に記載のポリペプチド。

【請求項 29】

X_3 が、L、Y、または P である、請求項 22 ～ 28 のいずれか 1 項に記載のポリペプチド。

【請求項 30】

$X_1 X_2 X_3$ が、 $X_1 I L$ 、 $X_1 F L$ 、または $X_1 Q L$ である、請求項 22 ～ 29 のいずれか 1 項に記載のポリペプチド。

【請求項 31】

$X_1 X_2 X_3$ が、 $P X_2 L$ 、 $Q X_2 L$ 、または $V X_2 L$ である、請求項 22 ～ 29 のいずれか 1 項に記載のポリペプチド。

【請求項 32】

$X_1 X_2 X_3$ が、 $X_1 X_2 L$ である、請求項 22 ～ 29 のいずれか 1 項に記載のポリペプチド。

【請求項 33】

X_2 が、A、R、N、D、C、Q、E、G、H、I、K、M、F、P、S、T、W、Y、または V である、請求項 32 に記載のポリペプチド。

【請求項 3 4】

$X_1 X_2 X_3$ が P I L である、請求項 2 2 ～ 3 0 のいずれか 1 項に記載のポリペプチド。

【請求項 3 5】

$X_1 X_2 X_3$ が P F L である、請求項 2 2 ～ 3 0 のいずれか 1 項に記載のポリペプチド。

【請求項 3 6】

$X_1 X_2 X_3$ が Q Q L である、請求項 2 2 ～ 3 0 のいずれか 1 項に記載のポリペプチド。

【請求項 3 7】

$X_1 X_2 X_3$ が V V L である、請求項 2 2 ～ 2 9 及び 3 1 のいずれか 1 項に記載のポリペプチド。

【請求項 3 8】

$X_1 X_2 X_3$ が V T L である、請求項 2 2 ～ 2 9 及び 3 1 のいずれか 1 項に記載のポリペプチド。

【請求項 3 9】

$X_1 X_2 X_3$ が P P L である、請求項 2 2 ～ 2 9 及び 3 1 のいずれか 1 項に記載のポリペプチド。

【請求項 4 0】

$X_1 X_2 X_3$ が P Y L である、請求項 2 2 ～ 2 9 及び 3 1 のいずれか 1 項に記載のポリペプチド。

【請求項 4 1】

$X_1 X_2 X_3$ が Q R L である、請求項 2 2 ～ 2 9 及び 3 1 のいずれか 1 項に記載のポリペプチド。

【請求項 4 2】

$X_1 X_2 X_3$ が Q H L である、請求項 2 2 ～ 2 9 及び 3 1 のいずれか 1 項に記載のポリペプチド。

【請求項 4 3】

配列番号 2 に対して少なくとも 9 0 % の同一性を有する配列、及び配列番号 2 の残基 5 7 6 に対応する位置に隣接しかつその C 末端側にある $Y_1 Y_2 Q L L$ (配列番号 1 3 7) により定義される配列を含む、プログラニユリン変異体であって、

ここで、 Y_1 が L であるか、または存在せず、かつ Y_2 が R であるか、または存在しない、

プログラニユリン変異体

を含む、ポリペプチド。

【請求項 4 4】

前記プログラニユリン変異体が、配列：

TRCPDGGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLSRHLGGPCQVDAHCSAGHSCI
FTVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCCPRGRFHCSADGRSCFQRSGNNSVGAIQCPDSQF
ECPDFSTCCVMVDGSGCCPMPQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCITPTGTHPL
AKKLPAQRTNRAVALSSSVMCPCDARSRCPDGSTCCCLPSGKYGCCPMPNATCCSDH
LHCCPQDQTVCDLIQSKCLSKENATTDLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDGYTCCRL
QSGAWGCCPFTQAVCCEDHHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPHQVPWMEKAPAHLSLP
DPQALKRDPVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGEWGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVA
EGQCQRGSEIVAGLEKMPARRASLSHPRDIGCDQHTSCPVGQTCCPSLGGSWACCQL
PHAVCCEDRQHCCPAGYTENVKARSCEKEVVSAQPATFLARSPHVGVDVECGEG
HFCHDNQTCCRDNRQGWACCPYRQGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRREAPR
WDAPLRDPALRQLLY₁Y₂QLL (配列番号 55)

を含み、

ここで、 Y_1 が L であるか、または存在せず、かつ Y_2 が R であるか、または存在しない、
請求項 43 に記載のポリペプチド。

【請求項 45】

Y_1 が L である、請求項 44 に記載のポリペプチド。

【請求項 46】

Y_2 が R である、請求項 43 ～ 45 のいずれか 1 項に記載のポリペプチド。

【請求項 47】

Y_1 及び Y_2 が両方とも存在しない、請求項 43 または 44 に記載のポリペプチド。

【請求項 48】

前記プログラニュリン変異体に連結している Fc ポリペプチドをさらに含む、請求項 22 ～ 47 のいずれか 1 項に記載のポリペプチド。

【請求項 49】

前記 Fc ポリペプチドの N 末端または C 末端が、前記プログラニュリン変異体に連結している、請求項 48 に記載のポリペプチド。

【請求項 50】

前記 Fc ポリペプチドが、ペプチド結合により、またはポリペプチドリンカーにより前記プログラニュリン変異体に連結している、請求項 48 または 49 に記載のポリペプチド。

【請求項 51】

前記ポリペプチドリンカーが 1 ～ 50 アミノ酸長である、請求項 50 に記載のポリペプチド。

【請求項 52】

前記ポリペプチドリンカーが柔軟なポリペプチドリンカーである、請求項 50 または 51 に記載のポリペプチド。

【請求項 53】

前記柔軟なポリペプチドリンカーが、グリシンリッチなリンカーである、請求項 52 に記載のポリペプチド。

【請求項 54】

前記グリシンリッチなリンカーが、 G_4S （配列番号 90）または $(G_4S)_2$ （配列番号 91）である、請求項 53 に記載のポリペプチド。

【請求項 55】

前記 Fc ポリペプチドが、配列番号 64 ～ 67 からなる群から選択される配列を含む、請求項 48 ～ 54 のいずれか 1 項に記載のポリペプチド。

【請求項 56】

前記 Fc ポリペプチドが、トランスフェリン受容体に特異的に結合する改変 Fc ポリペプチドである、請求項 48 ～ 54 のいずれか 1 項に記載のポリペプチド。

【請求項 57】

前記 Fc ポリペプチドが、配列番号 68 ～ 87 及び 129 ～ 132 からなる群から選択される配列を含む、請求項 56 に記載のポリペプチド。

【請求項 58】

前記 Fc ポリペプチドが、配列番号 70、75、80、85、及び 129 ～ 132 から選択される配列を含む、請求項 57 に記載のポリペプチド。

【請求項 59】

(a) 請求項 1 ～ 21 のいずれか 1 項に記載のプログラニュリン変異体；

(b) (a) のプログラニュリン変異体に連結している第 1 の Fc ポリペプチド；及び

(c) 前記第 1 の Fc ポリペプチドと共に Fc ポリペプチド二量体を形成する第 2 の Fc ポリペプチド

を含む、融合タンパク質。

【請求項 60】

10

20

30

40

50

前記第2のFcポリペプチドが、請求項1～21のいずれか1項に記載の第2のプログラニユリン変異体に連結している、請求項59に記載の融合タンパク質。

【請求項61】

前記第1のFcポリペプチドが、ペプチド結合により、またはポリペプチドリンカーにより前記プログラニユリン変異体に連結しており、かつ／または前記第2のFcポリペプチドが、ペプチド結合により、またはポリペプチドリンカーにより前記プログラニユリン変異体に連結している、請求項59または60に記載の融合タンパク質。

【請求項62】

前記ポリペプチドリンカーが1～50アミノ酸長である、請求項61に記載の融合タンパク質。

【請求項63】

前記ポリペプチドリンカーが、柔軟なポリペプチドリンカーである、請求項61または62に記載の融合タンパク質。

【請求項64】

前記柔軟なポリペプチドリンカーが、グリシンリッチなリンカーである、請求項63に記載の融合タンパク質。

【請求項65】

前記グリシンリッチなリンカーが、G₄S（配列番号90）または（G₄S）₂（配列番号91）である、請求項64に記載の融合タンパク質。

【請求項66】

前記第1のFcポリペプチドのC末端が、前記プログラニユリンのN末端に連結しており、かつ／または前記第2のFcポリペプチドのC末端が、前記プログラニユリン変異体のN末端に連結している、請求項59～65のいずれか1項に記載の融合タンパク質。

【請求項67】

前記第1のFcポリペプチドまたは前記第2のFcポリペプチドが、トランスフェリン受容体に特異的に結合する、請求項59～66のいずれか1項に記載の融合タンパク質。

【請求項68】

前記第1のFcポリペプチド及び前記第2のFcポリペプチドがそれぞれ、ヘテロ二量体化を促進する改変を含む、請求項59～67のいずれか1項に記載の融合タンパク質。

【請求項69】

（i）前記第1のFcポリペプチドが、EUNアンバリングによる、T366W置換を含み、かつ前記第2のFcポリペプチドが、T366S、L368A、及びY407V置換を含む；または

（ii）前記第1のFcポリペプチドが、EUNアンバリングによる、T366S、L368A、及びY407V置換を含み、かつ前記第2のFcポリペプチドが、T366W置換を含む、

請求項68に記載の融合タンパク質。

【請求項70】

前記第1のFcポリペプチド及び／または前記第2のFcポリペプチドが独立に、エフェクター機能を低下させる改変を含む、請求項59～69のいずれか1項に記載の融合タンパク質。

【請求項71】

エフェクター機能を低下させる改変が、EUNアンバリングによる、L234A及びL235A置換である、請求項70に記載の融合タンパク質。

【請求項72】

前記第1のFcポリペプチドが、配列番号64～67からなる群から選択される配列を含む、請求項59～71のいずれか1項に記載の融合タンパク質。

【請求項73】

前記第2のFcポリペプチドが、配列番号68～87及び129～132からなる群から選択される配列を含む、請求項59～72のいずれか1項に記載の融合タンパク質。

10

20

30

40

50

【請求項 7 4】

前記第 2 の F c ポリペプチドが、配列番号 7 0、7 5、8 0、8 5、及び 1 2 9 ~ 1 3 2 からなる群から選択される配列を含む、請求項 7 3 に記載の融合タンパク質。

【請求項 7 5】

ヒンジ領域またはその一部が、前記第 1 の F c ポリペプチド及び／または前記第 2 の F c ポリペプチドに連結している、請求項 5 9 ~ 7 4 のいずれか 1 項に記載の融合タンパク質。

【請求項 7 6】

前記プログラニュリン変異体に連結している第 1 の F c ポリペプチドが、配列番号 9 8 の配列を含み、かつ前記第 2 の F c ポリペプチドが、配列番号 7 5 の配列を含む、請求項 5 9 ~ 7 5 のいずれか 1 項に記載の融合タンパク質。

10

【請求項 7 7】

前記プログラニュリン変異体に連結している第 1 の F c ポリペプチドが、配列番号 9 8 の配列を含み、かつ前記第 2 の F c ポリペプチドが、配列番号 1 3 0 の配列を含む、請求項 5 9 ~ 7 5 のいずれか 1 項に記載の融合タンパク質。

【請求項 7 8】

前記プログラニュリン変異体に連結している第 1 の F c ポリペプチドが、配列番号 9 9 の配列を含み、かつ前記第 2 の F c ポリペプチドが、配列番号 7 5 の配列を含む、請求項 5 9 ~ 7 5 のいずれか 1 項に記載の融合タンパク質。

【請求項 7 9】

前記プログラニュリン変異体に連結している第 1 の F c ポリペプチドが、配列番号 9 9 の配列を含み、かつ前記第 2 の F c ポリペプチドが、配列番号 1 3 0 の配列を含む、請求項 5 9 ~ 7 5 のいずれか 1 項に記載の融合タンパク質。

20

【請求項 8 0】

前記プログラニュリン変異体に連結している第 1 の F c ポリペプチドが、配列番号 1 0 0 の配列を含み、かつ前記第 2 の F c ポリペプチドが、配列番号 7 5 の配列を含む、請求項 5 9 ~ 7 5 のいずれか 1 項に記載の融合タンパク質。

【請求項 8 1】

前記プログラニュリン変異体に連結している第 1 の F c ポリペプチドが、配列番号 1 0 0 の配列を含み、かつ前記第 2 の F c ポリペプチドが、配列番号 1 3 0 の配列を含む、請求項 5 9 ~ 7 5 のいずれか 1 項に記載の融合タンパク質。

30

【請求項 8 2】

前記プログラニュリン変異体に連結している第 1 の F c ポリペプチドが、配列番号 1 0 1 の配列を含み、かつ前記第 2 の F c ポリペプチドが、配列番号 7 5 の配列を含む、請求項 5 9 ~ 7 5 のいずれか 1 項に記載の融合タンパク質。

【請求項 8 3】

前記プログラニュリン変異体に連結している第 1 の F c ポリペプチドが、配列番号 1 0 1 の配列を含み、かつ前記第 2 の F c ポリペプチドが、配列番号 1 3 0 の配列を含む、請求項 5 9 ~ 7 5 のいずれか 1 項に記載の融合タンパク質。

【請求項 8 4】

前記プログラニュリン変異体に連結している第 1 の F c ポリペプチドが、配列番号 1 0 2 の配列を含み、かつ前記第 2 の F c ポリペプチドが、配列番号 7 5 の配列を含む、請求項 5 9 ~ 7 5 のいずれか 1 項に記載の融合タンパク質。

40

【請求項 8 5】

前記プログラニュリン変異体に連結している第 1 の F c ポリペプチドが、配列番号 1 0 2 の配列を含み、かつ前記第 2 の F c ポリペプチドが、配列番号 1 3 0 の配列を含む、請求項 5 9 ~ 7 5 のいずれか 1 項に記載の融合タンパク質。

【請求項 8 6】

前記プログラニュリン変異体に連結している第 1 の F c ポリペプチドが、配列番号 1 2 3 の配列を含み、かつ前記第 2 の F c ポリペプチドが、配列番号 7 5 の配列を含む、請求

50

項 5 9 ～ 7 5 のいずれか 1 項に記載の融合タンパク質。

【請求項 8 7】

前記プログラニュリン変異体に連結している第 1 の F c ポリペプチドが、配列番号 1 2 3 の配列を含み、かつ前記第 2 の F c ポリペプチドが、配列番号 1 3 0 の配列を含む、請求項 5 9 ～ 7 5 のいずれか 1 項に記載の融合タンパク質。

【請求項 8 8】

前記プログラニュリン変異体に連結している第 1 の F c ポリペプチドが、配列番号 1 2 4 の配列を含み、かつ前記第 2 の F c ポリペプチドが、配列番号 7 5 の配列を含む、請求項 5 9 ～ 7 5 のいずれか 1 項に記載の融合タンパク質。

【請求項 8 9】

前記プログラニュリン変異体に連結している第 1 の F c ポリペプチドが、配列番号 1 2 4 の配列を含み、かつ前記第 2 の F c ポリペプチドが、配列番号 1 3 0 の配列を含む、請求項 5 9 ～ 7 5 のいずれか 1 項に記載の融合タンパク質。

【請求項 9 0】

前記プログラニュリン変異体に連結している第 1 の F c ポリペプチドが、配列番号 1 2 5 の配列を含み、かつ前記第 2 の F c ポリペプチドが、配列番号 7 5 の配列を含む、請求項 5 9 ～ 7 5 のいずれか 1 項に記載の融合タンパク質。

【請求項 9 1】

前記プログラニュリン変異体に連結している第 1 の F c ポリペプチドが、配列番号 1 2 5 の配列を含み、かつ前記第 2 の F c ポリペプチドが、配列番号 1 3 0 の配列を含む、請求項 5 9 ～ 7 5 のいずれか 1 項に記載の融合タンパク質。

【請求項 9 2】

前記プログラニュリン変異体に連結している第 1 の F c ポリペプチドが、配列番号 1 2 6 の配列を含み、かつ前記第 2 の F c ポリペプチドが、配列番号 7 5 の配列を含む、請求項 5 9 ～ 7 5 のいずれか 1 項に記載の融合タンパク質。

【請求項 9 3】

前記プログラニュリン変異体に連結している第 1 の F c ポリペプチドが、配列番号 1 2 6 の配列を含み、かつ前記第 2 の F c ポリペプチドが、配列番号 1 3 0 の配列を含む、請求項 5 9 ～ 7 5 のいずれか 1 項に記載の融合タンパク質。

【請求項 9 4】

チャイニーズハムスター卵巣 (C H O) 細胞において生成される、請求項 5 9 ～ 9 3 のいずれか 1 項に記載の融合タンパク質。

【請求項 9 5】

実質的に実施例 1 に記載のとおりに精製されている、請求項 9 4 に記載の融合タンパク質。

【請求項 9 6】

前記融合タンパク質の第 1 のポリペプチド中のプログラニュリン変異体の 5 0 % 超が、C 末端で短縮されていない、請求項 5 9 ～ 9 5 のいずれか 1 項に記載の融合タンパク質。

【請求項 9 7】

前記融合タンパク質のソルチリン結合についての K_D 値が、約 1 0 0 n M 未満である、請求項 5 9 ～ 9 6 のいずれか 1 項に記載の融合タンパク質。

【請求項 9 8】

前記融合タンパク質のソルチリン結合についての E C₅₀ が、約 2 5 n M 未満である、請求項 5 9 ～ 9 7 のいずれか 1 項に記載の融合タンパク質。

【請求項 9 9】

E C₅₀ が E L I S A により測定される、請求項 9 8 に記載の融合タンパク質。

【請求項 1 0 0】

前記 E L I S A アッセイが、実質的に実施例 4 に記載のとおりに実施される、請求項 9 9 に記載の融合タンパク質。

【請求項 1 0 1】

10

20

30

40

50

前記融合タンパク質のソルチリン結合についての E C 5 0 が、基準融合タンパク質と比べて、ソルチリン結合における 1 0 倍未満の低下を示し、ここで、前記基準融合タンパク質が、(i) 配列番号 2 を含む第 1 のポリペプチドと、(i i) 前記第 1 の F c ポリペプチドと共に F c ポリペプチド二量体を形成する第 2 の F c ポリペプチドとを含む、請求項 5 9 ~ 1 0 0 のいずれか 1 項に記載の融合タンパク質。

【請求項 1 0 2】

前記融合タンパク質のソルチリン結合についての E C 5 0 が、基準融合タンパク質と比べて、ソルチリン結合における 1 0 倍未満の低下を示し、ここで、前記基準融合タンパク質が、(i) 配列番号 1 0 8 を含む第 1 のポリペプチドと、(i i) 前記第 1 の F c ポリペプチドと共に F c ポリペプチド二量体を形成する第 2 の F c ポリペプチドとを含む、請求項 5 9 ~ 1 0 1 のいずれか 1 項に記載の融合タンパク質。

10

【請求項 1 0 3】

前記基準融合タンパク質が H E K 細胞において生成される、請求項 1 0 1 または 1 0 2 に記載の融合タンパク質。

【請求項 1 0 4】

前記基準融合タンパク質が、実質的に実施例 1 に記載のとおりに精製されている、請求項 1 0 3 に記載の融合タンパク質。

【請求項 1 0 5】

請求項 1 ~ 2 1 のいずれか 1 項に記載のプログラニュリン変異体、請求項 2 2 ~ 5 8 のいずれか 1 項に記載のポリペプチド、または請求項 5 9 ~ 1 0 4 のいずれか 1 項に記載の融合タンパク質と、薬学的に許容される担体とを含む、医薬組成物。

20

【請求項 1 0 6】

複数の、請求項 5 9 ~ 1 0 4 のいずれか 1 項に記載の融合タンパク質と、薬学的に許容される担体とを含む、医薬組成物。

【請求項 1 0 7】

前記複数の融合タンパク質の 5 0 % 超が、前記融合タンパク質のプログラニュリン変異体におけるインタクトな C 末端を含む、請求項 1 0 6 に記載の医薬組成物。

【請求項 1 0 8】

神経変性疾患、アテローム性動脈硬化症、T D P - 4 3 に関連する障害、加齢黄斑変性 (A M D)、またはプログラニュリン関連障害を有する対象を処置する方法であって、請求項 1 ~ 2 1 のいずれか 1 項に記載のプログラニュリン変異体、請求項 2 2 ~ 5 8 のいずれか 1 項に記載のポリペプチド、請求項 5 9 ~ 1 0 4 のいずれか 1 項に記載の融合タンパク質、または請求項 1 0 5 ~ 1 0 7 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物を前記対象に投与することを含む、前記方法。

30

【請求項 1 0 9】

対象において、プログラニュリンまたはその変異体の量を増加させる方法であって、請求項 1 ~ 2 1 のいずれか 1 項に記載のプログラニュリン変異体、請求項 2 2 ~ 5 8 のいずれか 1 項に記載のポリペプチド、請求項 5 9 ~ 1 0 4 のいずれか 1 項に記載の融合タンパク質、または請求項 1 0 5 ~ 1 0 7 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物を前記対象に投与することを含む、前記方法。

40

【請求項 1 1 0】

対象においてカテプシン D 活性を低下させる方法であって、請求項 1 ~ 2 1 のいずれか 1 項に記載のプログラニュリン変異体、請求項 2 2 ~ 5 8 のいずれか 1 項に記載のポリペプチド、請求項 5 9 ~ 1 0 4 のいずれか 1 項に記載の融合タンパク質、または請求項 1 0 5 ~ 1 0 7 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物を前記対象に投与することを含む、前記方法。

【請求項 1 1 1】

プログラニュリン関連障害を有する対象においてリソソーム分解を増加させる方法であって、請求項 1 ~ 2 1 のいずれか 1 項に記載のプログラニュリン変異体、請求項 2 2 ~ 5 8 のいずれか 1 項に記載のポリペプチド、請求項 5 9 ~ 1 0 4 のいずれか 1 項に記載の融

50

合タンパク質、または請求項 105～107 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物を前記対象に投与することを含む、前記方法。

【請求項 112】

プログラニリン関連障害を有する対象においてリソソーム機能を改善するまたは回復させる方法であって、請求項 1～21 のいずれか 1 項に記載のプログラニリン変異体、請求項 22～58 のいずれか 1 項に記載のポリペプチド、請求項 59～104 のいずれか 1 項に記載の融合タンパク質、または請求項 105～107 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物を前記対象に投与することを含む、前記方法。

【請求項 113】

前記対象が、神経変性疾患、アテローム性動脈硬化症、TDP-43 に関連する障害、または AMD を有する、請求項 109～112 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 114】

前記対象が神経変性疾患を有する、請求項 108～113 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 115】

前記神経変性疾患が、前頭側頭型認知症 (FTD)、神経セロイドリポフスチン症 (NCL)、ニーマン・ピック病 A 型 (NPA)、ニーマン・ピック病 B 型 (NPB)、ニーマン・ピック病 C 型 (NPC)、C9ORF72 関連筋萎縮性側索硬化症 (ALS) / FTD、孤発性 ALS、アルツハイマー病 (AD)、ゴーシェ病、及びパーキンソン病からなる群から選択される、請求項 114 に記載の方法。

【請求項 116】

前記神経変性疾患が FTD である、請求項 115 に記載の方法。

【請求項 117】

前記対象がプログラニリンをコードする遺伝子において変異を有する、請求項 108～116 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 118】

請求項 1～21 のいずれか 1 項に記載のプログラニリン変異体または請求項 22～58 のいずれか 1 項に記載のポリペプチドをコードする核酸配列を含む、ポリヌクレオチド。

【請求項 119】

請求項 118 に記載のポリヌクレオチドを含む、ベクター。

【請求項 120】

請求項 118 に記載のポリヌクレオチドまたは請求項 119 に記載のベクターを含む、宿主細胞。

【請求項 121】

第 2 の Fc ポリペプチドをコードする核酸配列を含むポリヌクレオチドをさらに含む、請求項 120 に記載の宿主細胞。

【請求項 122】

前記第 2 の Fc ポリペプチドが、配列番号 61 及び 64～87 のいずれか 1 つから選択される配列を有する、請求項 121 に記載の宿主細胞。

【請求項 123】

ポリペプチドを生成するための方法であって、請求項 118 に記載のポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチドが発現する条件下で宿主細胞を培養することを含む、前記方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2019 年 12 月 23 日出願の米国特許仮出願第 62 / 953, 099 号、及び 2020 年 10 月 14 日出願の米国特許仮出願第 63 / 091, 819 号の優先権を

10

20

30

40

50

主張し、それらの開示は、あらゆる目的のために、それらの全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0002】

配列表

本出願は、ASCIIフォーマットで電子的に提出されており、その全体が参照により本明細書に組み込まれる配列表を含む。2020年12月14日に作成された前記ASCIIコピーは、102342-003920PC-1219188__SL.txtと名付けられており、サイズは543,756バイトである。

【背景技術】

【0003】

背景

前頭側頭型認知症（FTD）は、認知症を有する全患者の5～10%を占めかつ65歳未満で認知症を発症した患者の10～20%を占める、進行性の神経変性障害である（Rademakers et al., Nat Rev Neurol. 8（8）：423-34, 2012（非特許文献1））。いくつかの遺伝子がFTDに関連付けられているが、FTDにおいて最も頻繁に変異する遺伝子のうちの1つがGRNであり、これは、ヒト染色体17q21に位置し、システインリッチなタンパク質であるプログラニュリン（PGRN）（プロエピセリン及びアクログラニンとしても公知）をコードする。GRNにおける浸透性の高い変異は、家族性FTDの常染色体優性形態の原因として、2006年に最初に報告された（Baker et al., Nature. 442（7105）：916-9, 2006（非特許文献2）；Cruts et al., Nature. 2006 Aug 24；442（7105）：920-4（非特許文献3）；Gass et al., Hum Mol Genet. 15（20）：2988-3001, 2006（非特許文献4））。最近の推定では、GRN変異は、家族歴が陽性であるFTD患者の5～20%、及び孤発性症例の1～5%を占めると示唆されている（Rademakers et al., 前出）。

【0004】

FTDの原因としてGRN変異が同定された後に、プログラニュリンのレベルの低下及びプログラニュリン機能喪失が、アルツハイマー病（AD）、パーキンソン病（PD）、筋萎縮性側索硬化症（ALS）、及びリソソーム蓄積症が原因である神経変性障害を含む複数の神経変性疾患及び障害に関連付けられている（Petkau and Leavitt. 2014. Trends Neurosci 37（7）：388-398（非特許文献5））。したがって、プログラニュリン機能の喪失もしくはプログラニュリンのレベルの低下が原因である障害、またはプログラニュリンのレベルの上昇が有益である障害に対処することができる治療を開発する必要がある。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0005】

【非特許文献1】Rademakers et al., Nat Rev Neurol. 8（8）：423-34, 2012

【非特許文献2】Baker et al., Nature. 442（7105）：916-9, 2006

【非特許文献3】Cruts et al., Nature. 2006 Aug 24；442（7105）：920-4

【非特許文献4】Gass et al., Hum Mol Genet. 15（20）：2988-3001, 2006

【非特許文献5】Petkau and Leavitt. 2014. Trends Neurosci 37（7）：388-398

【発明の概要】

【0006】

概要

プログラニュリン変異体、ならびにプログラニュリンまたはその変異体を含む融合タンパク質、ならびに神経変性疾患（例えば、F T D）、アテローム性動脈硬化症、T D P - 4 3に関連する障害、加齢黄斑変性（A M D）、またはプログラニュリン関連障害を含む、プログラニュリンのレベルの上昇が有益である任意の疾患を処置するためにそのような変異体または融合タンパク質を使用する方法を、本明細書において提供する。本明細書において提供されるプログラニュリン変異体は、野生型プログラニュリンのC末端に改変または付加を有する。本明細書に記載のとおり、プログラニュリン変異体を含む融合タンパク質は、そのタンパク質がチャイニーズハムスター卵巣（C H O）細胞から組み換え発現され、かつ精製されるときに、野生型プログラニュリンを含む融合タンパク質と比較して、そのタンパク質のプログラニュリン部分においてC末端切断を受けにくい。

10

【0007】

一態様では、本開示は、配列番号2に対して少なくとも90%（例えば、少なくとも91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%）の同一性または100%の同一性を有する配列、及び配列番号2の残基574から576に対応する位置における $X_1 X_2 X_3$ により定義される配列（ここで、 X_1 、 X_2 、及び X_3 は、それぞれ独立にアミノ酸であり、合わさってQ L Lではない）を含むプログラニュリン変異体の特徴とする。一部の実施形態では、プログラニュリン変異体は、配列番号2に対して少なくとも95%（例えば、少なくとも96%、97%、98%、または99%）の同一性または100%の同一性を有する。一部の実施形態では、プログラニュリン変異体は、配列番号2に対して少なくとも98%の同一性（例えば、少なくとも99%）を有する。一部の実施形態では、プログラニュリン変異体は、配列番号2に対して少なくとも95%（例えば、少なくとも96%、97%、98%、または99%）の同一性または100%の同一性を有する配列を含む。一部の実施形態では、プログラニュリン変異体は、配列番号2に対して少なくとも98%の同一性（例えば、少なくとも99%）を有する配列を含む。

20

【0008】

この態様の一部の実施形態では、プログラニュリン変異体は、配列：
 TRCPDGGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLRHLGGPCQVDAHCSAGHSCI
 FTVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCCPRGRFHCSADGRSCFQRSNNNSVGAIQCPDSQF
 ECPDFSTCCVMVDGSGWCCPMPQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCITPTGTHTPL
 AKKLPAQRTNRAVALSSVMCPDARSRCPDGSTCCCELPSGKYGCCPMPNATCCSDH
 LHCCPQDQTVCDLIQSKCLSKENATTDLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDGYTCCRL
 QSGAWGCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPVWMEKAPAHLSLP
 DPQALKRDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGEWGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVA
 EGQCQRGSEIVAGLEKMPARRASLSHPRDIGCDQHTSCPVGQTCCPSLGGSWACCQL
 PHAVCCEDRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVVSQAQPATFLARSPHVGKDVCEGEG
 HFCHDNQTCCRDNRQGWACCPYRQGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRREAPR
 WDAPLRDPALRX₁X₂X₃ (配列番号3)

30

40

を含み、ここで、 $X_1 X_2 X_3$ は合わさってQ L Lではない。

【0009】

一部の実施形態では、 X_1 は、R、H、K、D、E、S、T、N、Q、L、F、Y、P、またはVである。一部の実施形態では、 X_2 は、H、K、D、E、S、T、N、Q、G、P、A、Y、V、I、F、L、またはRである。一部の実施形態では、 X_3 は、L、Y、またはPである。

【0010】

一部の実施形態では、 $X_1 X_2 X_3$ は、 $X_1 I L$ 、 $X_1 F L$ 、 $X_1 Q L$ 、 $P X_2 L$ 、 $Q X_2 L$ 、または $V X_2 L$ である。一部の実施形態では、 $X_1 X_2 X_3$ は、 $X_1 X_2 L$ であり、一部の実施形態では、 $X_1 X_2 L$ 中の X_2 は、A、R、N、D、C、Q、E、G、H、

50

I、K、M、F、P、S、T、W、Y、またはVである。

【0011】

特定の実施形態では、 $X_1 X_2 X_3$ は、PIL、PFL、QQL、VVL、またはVTLである。特定の実施形態では、 $X_1 X_2 X_3$ は、PLL、PYL、QQL、QHL、またはQRLである。

【0012】

別の態様では、本開示は、配列番号2に対して少なくとも90%（例えば、少なくとも91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%）の同一性または100%の同一性を有する配列、及び配列番号2の残基576に対応する位置に隣接しかつそのC末端側にある $Y_1 Y_2 QLL$ （配列番号137）により定義される配列（ここで、 Y_1 は、Lであるか、または存在せず、かつ Y_2 は、Rであるか、または存在しない）を含むプログラニュリン変異体の特徴とする。

10

【0013】

一部の実施形態では、プログラニュリン変異体は、配列：

TRCPDGGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLRHLGGPCQVDAHCSAGHSCI
FTVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCCPRGFHCSADGRSCFQSRGNNNSVGAIQCPDSQF
ECPDFSTCCVMVDGSGCCPMPQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCITPTGTHPL
AKKLPAQRTNRAVALSSVMCPDARSRCPDGSTCCCELPSGKYGCCPMPNATCCSDH
LHCCPQDTVCDLIQSKCLSKENATTDLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDGYTCCRL
QSGAWGCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPVQVPWMEKAPAHLSLP
DPQALKRDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGEWGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVA
EGQCQRGSEIVAGLEKMPARRASLSHPRDIGCDQHTSCPVGQTCCPSLGGSWACCQL
PHAVCCEDRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVVSQAQPATFLARSPHVGKDVCEGEG
HFCHDNQTCCRDNRQGWACCPYRQGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRREAPR
WDAPLRDPALRQLLY₁Y₂QLL（配列番号55）

20

を含む。

【0014】

一部の実施形態では、 Y_1 はLである。一部の実施形態では、 Y_2 はRである。一部の実施形態では、 Y_1 及び Y_2 は両方とも存在しない。

30

【0015】

別の態様では、本開示は、配列番号2に対して少なくとも90%（例えば、少なくとも91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%）の同一性または100%の同一性を有する配列、及び配列番号2の残基574から576に対応する位置における $X_1 X_2 X_3$ により定義される配列（ここで、 X_1 、 X_2 、及び X_3 は、それぞれ独立にアミノ酸であり、合わさってQLLではない）を含むプログラニュリン変異体を含むポリペプチドを特徴とする。一部の実施形態では、ポリペプチド中のプログラニュリン変異体は、配列番号2に対して少なくとも95%（例えば、少なくとも96%、97%、98%、または99%）の同一性を有する。一部の実施形態では、ポリペプチド中のプログラニュリン変異体は、配列番号2に対して少なくとも95%（例えば、少なくとも96%、97%、98%、または99%）の同一性を有する配列を含む。

40

【0016】

この態様の一部の実施形態では、ポリペプチド中のプログラニュリン変異体は、配列：

TRCPDGGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLSRHLGGPCQVDAHCSAGHSCI
FTVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCCPRGFHCSADGRSCFQSGNNSVGAIQCPDSQF
ECPDFSTCCVMVDGSGCCPMPQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCITPTGTHPL
AKKLPAQRTNRAVALSSSV MCPDARSRCPDGSTCCELPSGKYGCCPMPNATCCSDH
LHCCPQDQTVCDLIQSKCLSKENATTDLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDGYTCCRL
QSGAWGCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPVWMEKAPAHLSLP
DPQALKRDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGEWGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVA
EGQCQRGSEIVAGLEKMPARRASLSHPRDIGCDQHTSCPVGQTCCPSLGGSWACCQL
PHAVCCEDRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVVSAPATFLARSPHVGKDVCEGEG
HFCHDNQTCCRDNRQGWACCPYRQGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRREAPR
WDAPLRDPALRX₁X₂X₃ (配列番号 3)

10

を含み、ここで、 $X_1 X_2 X_3$ は $Q Q L$ ではない。

【0017】

この態様の一部の実施形態では、 X_1 は、 R 、 H 、 K 、 D 、 E 、 S 、 T 、 N 、 Q 、 L 、 F 、 Y 、 P 、または V である。一部の実施形態では、 X_2 は、 H 、 K 、 D 、 E 、 S 、 T 、 N 、 Q 、 G 、 P 、 A 、 Y 、 V 、 I 、 F 、 L 、または R である。一部の実施形態では、 X_3 は、 L 、 Y 、または P である。

【0018】

一部の実施形態では、 $X_1 X_2 X_3$ は $X_1 I L$ である。ある特定の実施形態では、 $X_1 I L$ 中の X_1 は、 R 、 H 、 K 、 E 、 P 、 N 、 F 、または Y （例えば、 R 、 H 、 K 、 E 、または P ）であってよい。

20

【0019】

一部の実施形態では、 $X_1 X_2 X_3$ は $X_1 F L$ である。ある特定の実施形態では、 $X_1 F L$ 中の X_1 は、 R 、 H 、 K 、 D 、 E 、 S 、 T 、 N 、 Q 、 L 、 F 、 Y 、または P であってよい。

【0020】

一部の実施形態では、 $X_1 X_2 X_3$ は $X_1 Q L$ である。ある特定の実施形態では、 $X_1 Q L$ 中の X_1 は、 R 、 H 、 K 、 D 、 E 、 N 、 L 、 F 、 Y 、または Q であってよい。

【0021】

一部の実施形態では、 $X_1 X_2 X_3$ は $P X_2 L$ である。ある特定の実施形態では、 $P X_2 L$ 中の X_2 は、 H 、 K 、 D 、 E 、 S 、 T 、 N 、 Q 、 G 、 P 、 A 、 Y 、 V 、 I 、 F 、 L 、または R （例えば、 H 、 K 、 D 、 E 、 S 、 T 、 N 、 Q 、 G 、 P 、 A 、 Y 、 V 、 I 、または F ）であってよい。

30

【0022】

一部の実施形態では、 $X_1 X_2 X_3$ は $Q X_2 L$ である。ある特定の実施形態では、 $Q X_2 L$ 中の X_2 は、 R 、 H 、 K 、 D 、 E 、 N 、 P 、 Y 、または Q であってよい。

【0023】

一部の実施形態では、 $X_1 X_2 X_3$ は $V X_2 L$ である。ある特定の実施形態では、 $V X_2 L$ 中の X_2 は、 V または T であってよい。

40

【0024】

一部の実施形態では、 $X_1 X_2 X_3$ は $X_1 X_2 L$ である。ある特定の実施形態では、 $X_1 X_2 L$ 中の X_2 は、 A 、 R 、 N 、 D 、 C 、 Q 、 E 、 G 、 H 、 I 、 K 、 M 、 F 、 P 、 S 、 T 、 W 、 Y 、または V である。

【0025】

一部の実施形態では、 $X_1 X_2 X_3$ は $P I L$ である。一部の実施形態では、 $X_1 X_2 X_3$ は $P F L$ である。一部の実施形態では、 $X_1 X_2 X_3$ は $Q Q L$ である。一部の実施形態では、 $X_1 X_2 X_3$ は $V V L$ である。一部の実施形態では、 $X_1 X_2 X_3$ は $V T L$ である。一部の実施形態では、 $X_1 X_2 X_3$ は $P P L$ である。一部の実施形態では、 $X_1 X_2 X_3$ は $P Y L$ である。一部の実施形態では、 $X_1 X_2 X_3$ は $Q R L$ である。一部の実施形態

50

では、 $X_1 X_2 X_3$ はQHLである。

【0026】

別の態様では、本開示は、プログラニユリン変異体を含むポリペプチドを特徴とし、ここで、プログラニユリン変異体は、配列番号2に対して少なくとも90%（例えば、少なくとも91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%）の同一性または100%の同一性、及び配列番号2の残基576に対応する位置に隣接しかつそのC末端側にある $Y_1 Y_2 Q L L$ （配列番号137）により定義される配列を含み、ここで、 Y_1 は、Lであるか、または存在せず、かつ Y_2 は、Rであるか、または存在しない。一部の実施形態では、ポリペプチドは、配列：

TRCPDGGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLRHLGGPCQVDAHCSAGHSCI
FTVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCCPRGFHCSADGRSCFQSRGNNNSVGAIQCPSQF
ECPDFSTCCVMVDGSGCCPMPQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCITPTGTHPL
AKKLPAQRTNRAVALSSVMCPDARSRCPDGSTCCELPSGKYGCCPMPNATCCSDH
LHCCPQDTVCDLIQSKCLSKENATTDLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDGYTCCRL
QSGAWGCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPHQVPWMEKAPAHLSLP
DPQALKRDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGEWGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVA
EGQCQRGSEIVAGLEKMPARRASLSHPRDIGCDQHTSCPVGQTCCPSLGGSWACCQL
PHAVCCEDRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVVSAQPATFLARSPHVGKDVCEGEG
HFCHDNQTCCRDNRQGWACCPYRQGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRREAPR
WDAPLRDPALRQLLY₁Y₂QLL（配列番号55）

10

20

を有するプログラニユリン変異体を含む。

【0027】

一部の実施形態では、 Y_1 はLである。一部の実施形態では、 Y_2 はRである。一部の実施形態では、 Y_1 及び Y_2 は両方とも存在しない。

【0028】

一部の実施形態では、本明細書に記載のポリペプチドはさらに、プログラニユリン変異体に連結しているFcポリペプチドを含む。FcポリペプチドのN末端またはC末端が、プログラニユリン変異体に連結してよい。一部の実施形態では、Fcポリペプチドは、ペプチド結合により、またはポリペプチドリンカーによりプログラニユリン変異体に連結している。一部の実施形態では、ポリペプチドリンカーは、1～50（例えば、1～45、1～40、1～35、1～30、1～25、1～20、1～15、1～10、1～5、5～50、10～50、15～50、20～50、25～50、30～50、35～50、40～50、45～50、1、5、10、15、20、25、30、35、40、または45）アミノ酸長である。一部の実施形態では、ポリペプチドリンカーは、柔軟なポリペプチドリンカー、例えば、グリシンリッチなリンカーである。ある特定の実施形態では、グリシンリッチなリンカーは、G₄S（配列番号90）または（G₄S）₂（配列番号91）である。

30

【0029】

ある特定の実施形態では、Fcポリペプチドは、配列番号64～67からなる群から選択される配列を含む。ある特定の実施形態では、Fcポリペプチドは、トランスフェリン受容体（TfR；すなわち、TfR結合Fcポリペプチド）に特異的に結合する改変Fcポリペプチドである。一部の実施形態では、Fcポリペプチド（例えば、TfR結合Fcポリペプチド）は、配列番号68～87及び129～132（例えば、配列番号70、75、80、85、及び129～132）からなる群から選択される配列を含む。

40

【0030】

特定の実施形態では、Fcポリペプチド（例えば、TfR結合Fcポリペプチド）は、配列番号70、75、80、85、及び129～132から選択される配列を含む。

【0031】

別の態様では、本開示は、（a）本明細書に記載のプログラニユリン変異体；（b）（

50

a) のプログラニュリン変異体に連結している第 1 の F c ポリペプチド；及び (c) 第 1 の F c ポリペプチドと共に F c ポリペプチド二量体を形成する第 2 の F c ポリペプチドを含む融合タンパク質を特徴とする。この態様の一部の実施形態では、第 2 の F c ポリペプチドはまた、野生型プログラニュリンまたは本明細書に記載のプログラニュリン変異体（すなわち、第 2 のプログラニュリンポリペプチド）に連結している。第 1 の F c ポリペプチドに連結しているプログラニュリン変異体及び第 2 の F c ポリペプチドに連結しているプログラニュリン変異体は、同じであっても、または異なってもよい。

【0032】

一部の実施形態では、第 1 の F c ポリペプチドは、ペプチド結合により、またはポリペプチドリンカーにより、プログラニュリン変異体に連結しており、かつ／または第 2 の F c ポリペプチドは、ペプチド結合により、またはポリペプチドリンカーにより、プログラニュリン変異体に連結している。一部の実施形態では、ポリペプチドリンカーは、1～50（例えば、1～45、1～40、1～35、1～30、1～25、1～20、1～15、1～10、1～5、5～50、10～50、15～50、20～50、25～50、30～50、35～50、40～50、45～50、1、5、10、15、20、25、30、35、40、または45）アミノ酸長である。一部の実施形態では、ポリペプチドリンカーは、柔軟なポリペプチドリンカー、例えば、グリシンリッチなリンカーである。ある特定の実施形態では、グリシンリッチなリンカーは、G₄S（配列番号90）または（G₄S）₂（配列番号91）である。

10

【0033】

この態様の一部の実施形態では、第 1 の F c ポリペプチドの C 末端は、プログラニュリンの N 末端に連結しており、かつ／または第 2 の F c ポリペプチドの C 末端は、プログラニュリン変異体の N 末端に連結している。

20

【0034】

一部の実施形態では、第 1 の F c ポリペプチドまたは第 2 の F c ポリペプチドは、トランスフェリン受容体に特異的に結合する。ある特定の実施形態では、第 1 の F c ポリペプチドまたは第 2 の F c ポリペプチドは独立に、配列番号 68～87 及び 129～132 からなる群から選択される配列を含む。ある特定の実施形態では、第 1 の F c ポリペプチドまたは第 2 の F c ポリペプチドは独立に、配列番号 70、75、80、85、及び 129～132 から選択される配列を含む。

30

【0035】

一部の実施形態では、第 1 の F c ポリペプチド及び第 2 の F c ポリペプチドはそれぞれ、ヘテロ二量体化を促進する改変を含む。例えば、第 1 の F c ポリペプチドは、EUN 番号による、T366S、L368A、及び Y407V 置換を含み、かつ第 2 の F c ポリペプチドは、T366W 置換を含む。一部の実施形態では、第 1 の F c ポリペプチドは、EUN 番号による、T366W 置換を含み、かつ第 2 の F c ポリペプチドは、T366S、L368A、及び Y407V 置換を含む。

【0036】

一部の実施形態では、第 1 の F c ポリペプチド及び／または第 2 の F c ポリペプチドは独立に、エフェクター機能を低下させる改変を含む。ある特定の実施形態では、エフェクター機能を低下させる改変は、EUN 番号による、L234A 及び L235A 置換である。

40

【0037】

一部の実施形態では、第 1 の F c ポリペプチドは、配列番号 64～67 からなる群から選択される配列を含む。一部の実施形態では、第 2 の F c ポリペプチドは、配列番号 68～87 及び 129～132 からなる群から選択される配列（例えば、配列番号 70、75、80、85、及び 129～132）を含む。

【0038】

この態様の一部の実施形態では、第 1 の F c ポリペプチドは、EUN 番号による、T366S、L368A、及び Y407V 置換ならびに L234A 及び L235A 置換

50

を含み、かつ第2のFcポリペプチドは、T366W置換ならびにL234A及びL235A置換を含む。一部の実施形態では、第1のFcポリペプチドは、EUナンバリングによる、T366W置換ならびにL234A及びL235A置換を含み、かつ第2のFcポリペプチドは、T366S、L368A、及びY407V置換ならびにL234A及びL235A置換を含む。

【0039】

この態様の一部の実施形態では、ヒンジ領域またはその一部が、第1のFcポリペプチド及び／または第2のFcポリペプチドに連結している。

【0040】

一部の実施形態では、融合タンパク質のソルチリン結合についての K_D は、約100 nM未満（例えば、約95 nM、90 nM、85 nM、80 nM、75 nM、70 nM、65 nM、60 nM、55 nM、50 nM、45 nM、または40 nM未満）である。一部の実施形態では、融合タンパク質のソルチリン結合についての K_D は、第1のポリペプチド中に配列番号2を含む融合タンパク質と比べて、ソルチリン結合の10倍未満の低下を示す。一部の実施形態では、融合タンパク質のソルチリン結合についての K_D は、第1のポリペプチドにおいて配列番号2を含む融合タンパク質と比べて、ソルチリン結合の5倍未満の低下を示す。

【0041】

一部の実施形態では、融合タンパク質のソルチリン結合についてのEC50は、約25 nM未満（例えば、約20 nM、15 nM、10 nM、5 nM、4 nM、3 nM、2.5 nM、2 nM、1.5 nM、または1 nM未満）である。特定の実施形態では、融合タンパク質のソルチリン結合についてのEC50は、第1のポリペプチド中に配列番号2を含む融合タンパク質と比べて、ソルチリン結合の10倍未満の低下を示す。ある特定の実施形態では、EC50は、本明細書に記載のとおり（例えば、実施例4に記載のとおり）ELISAにより測定される。

【0042】

一部の実施形態では、本明細書に記載の融合タンパク質ソルチリン結合についてのEC50は、基準融合タンパク質と比べて、ソルチリン結合の10倍未満の低下を示し、ここで、基準融合タンパク質は、(i) 配列番号2を含む第1のポリペプチド及び(ii) 第1のFcポリペプチドと共にFcポリペプチド二量体を形成する第2のFcポリペプチドを含む。

【0043】

一部の実施形態では、融合タンパク質のソルチリン結合についてのEC50は、基準融合タンパク質と比べて、ソルチリン結合の10倍未満の低下を示し、ここで、基準融合タンパク質は、(i) 配列番号108を含む第1のポリペプチド及び(ii) 第1のFcポリペプチドと共にFcポリペプチド二量体を形成する第2のFcポリペプチドを含む。

【0044】

一部の実施形態では、基準融合タンパク質をHEK細胞において生成する。一部の実施形態では、基準融合タンパク質を、実質的に本明細書に記載のとおり（例えば、実施例1に記載のとおり）精製する。

【0045】

一部の実施形態では、融合タンパク質をチャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞において生成する。特定の実施形態では、融合タンパク質の50%超（例えば、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、または99%超）は、融合タンパク質のプログラニュリン変異体部分のC末端で切断されない。一部の実施形態では、融合タンパク質を、プロテインAクロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性相互作用カラムクロマトグラフィー、及び透析からなる群から選択される1つまたは複数の方法により、融合タンパク質発現細胞を含む細胞培養培地から精製する。一部の実施形態では、融合タンパク質を、実質的に本明細書に記載のとおり（例えば、実施例1に記載のとおり）精製する。

10

20

30

40

50

【0046】

別の態様では、本開示は、本明細書に記載のプログラニュリン変異体または融合タンパク質と、薬学的に許容される担体とを含む医薬組成物を特徴とする。

【0047】

別の態様では、本開示は、複数の本明細書に記載の融合タンパク質と、薬学的に許容される担体とを含む医薬組成物を特徴とする。一部の実施形態では、複数の融合タンパク質のうちの50%超（例えば、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、または95%超）が、融合タンパク質のプログラニュリン変異体におけるインタクトなC末端を含む。

【0048】

別の態様では、本開示は、神経変性疾患、アテローム性動脈硬化症、TDP-43に関連する障害、AMD、またはプログラニュリン関連障害を有する対象を処置する方法であって、本明細書に記載のプログラニュリン変異体、本明細書に記載の融合タンパク質、または本明細書に記載の医薬組成物を対象に投与することを含む前記方法の特徴とする。特定の実施形態では、対象は神経変性疾患を有する。

【0049】

別の態様では、本開示は、対象においてプログラニュリンまたはその変異体の量を増加させる方法であって、本明細書に記載のプログラニュリン変異体、本明細書に記載の融合タンパク質、または本明細書に記載の医薬組成物を対象に投与することを含む前記方法の特徴とする。ある特定の実施形態では、対象は、神経変性疾患、アテローム性動脈硬化症、TDP-43に関連する障害、AMD、またはプログラニュリン関連障害を有する。特定の実施形態では、対象は神経変性疾患を有する。

【0050】

別の態様では、本開示は、対象においてカテプシンD活性を低下させる方法であって、本明細書に記載のプログラニュリン変異体、本明細書に記載の融合タンパク質、または本明細書に記載の医薬組成物を対象に投与することを含む前記方法の特徴とする。ある特定の実施形態では、対象は、神経変性疾患、アテローム性動脈硬化症、TDP-43に関連する障害、AMD、またはプログラニュリン関連障害を有する。特定の実施形態では、対象は神経変性疾患を有する。

【0051】

別の態様では、本開示は、対象においてリソソーム分解を増加させるか、またはリソソーム機能を改善する方法であって、本明細書に記載のプログラニュリン変異体、本明細書に記載の融合タンパク質、または本明細書に記載の医薬組成物を対象に投与することを含む前記方法の特徴とする。ある特定の実施形態では、対象は、神経変性疾患、アテローム性動脈硬化症、TDP-43に関連する障害、AMD、またはプログラニュリン関連障害を有する。特定の実施形態では、対象は神経変性疾患を有する。

【0052】

本明細書に記載の方法の一部の実施形態では、神経変性疾患は、前頭側頭型認知症（FTD）、神経セロイドリポフスチン症（NCL）、ニーマン・ピック病A型（NPAA）、ニーマン・ピック病B型（NPB）、ニーマン・ピック病C型（NPC）、C9ORF72関連筋萎縮性側索硬化症（ALS）／FTD、孤発性ALS、アルツハイマー病（AD）、ゴーシェ病、またはパーキンソン病である。ある特定の実施形態では、神経変性疾患はFTDである。

【0053】

実施形態は、FTDの処置を、それを必要とする対象において行う方法であって、本明細書に記載のプログラニュリン変異体または融合タンパク質を対象に投与することを含む前記方法にも関する。一部の実施形態では、FTDはC9ORF72関連FTDである。

【0054】

前述の方法のいずれかの一部の実施形態では、対象は、プログラニュリンをコードする遺伝子に変異を有する。

10

20

30

40

50

【0055】

別の態様では、本開示は、本明細書に記載のプログラニユリン変異体またはポリペプチドをコードする核酸配列を含むポリヌクレオチドを特徴とする。別の態様では、本開示は、本明細書に記載のポリヌクレオチドを含むベクターを特徴とする。別の態様では、本開示は、本明細書に記載のポリヌクレオチドまたはベクターを含む宿主細胞を特徴とする。一部の実施形態では、宿主細胞はさらに、第2のFcポリペプチドをコードする核酸配列を含むポリヌクレオチドを含む。ある特定の実施形態では、第2のFcポリペプチドは、配列番号61及び64～87のいずれか1つから選択される配列を有する。別の態様では、本開示は、ポリペプチドを生成するための方法であって、宿主細胞を、本明細書に記載のポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチドが発現される条件下で培養することを含む前記方法の特徴とする。

10

【0056】

別の態様では、本明細書に記載の疾患または障害を処置するために、化合物を評価する、または本明細書に記載のプログラニユリン変異体もしくは融合タンパク質、またはその医薬組成物もしくは投薬レジメンに対する対象の応答をモニタリングするための方法であって、(a)プログラニユリン関連障害を有する対象からの試験試料における1種または複数のビス(モノアシルグリセロ)ホスファート(BMP)種及び／またはグルコシルスフィンゴシン(GlcSph)の存在量を測定することであって、その際、試験試料または対象が、化合物またはその医薬組成物で処置されている(例えば、本明細書に記載の融合タンパク質で処置されている)、前記測定すること；(b)(a)において測定された1種または複数のBMP種及び／またはGlcSphと、1種または複数の基準値との間の存在量の差異を比較すること；ならびに(c)比較から、化合物、その医薬組成物、または投薬レジメン(例えば、本明細書に記載の融合タンパク質)が疾患または障害を処置するために1種または複数のBMP種レベル及び／またはGlcSphレベルを改善するか否かを決定することを含む前記方法を提供する。

20

【0057】

一部の実施形態では、本明細書において提供される方法はさらに、別の試験試料または対象を別の化合物で処置すること、及び1種または複数のBMP種レベル及び／またはGlcSphレベルを改善する候補化合物を選択することを含む。

【0058】

一部の実施形態では、本明細書において提供される方法はさらに、(d)試験試料または対象に対する化合物(例えば、本明細書に記載の融合タンパク質)の投与の量または頻度を維持する、または調節すること；及び(e)化合物を試験試料または対象に投与することを含む。

30

【0059】

一部の実施形態では、本明細書において提供される方法はさらに、プログラニユリン関連障害を処置するために、対象に、本明細書に記載のプログラニユリン変異体を投与して、1種または複数のBMP種レベル及び／またはGlcSphレベルを改善することを含む。一部の実施形態では、プログラニユリン関連障害の1つまたは複数の徴候または症状のうちの少なくとも1つが、処置後に寛解される。

40

【0060】

一部の実施形態では、処置は、本明細書に記載の融合タンパク質を対象に投与することを含む。一部の実施形態では、処置は、化合物のライブラリを複数の対象または試験試料に投与することを含む。

【0061】

一部の実施形態では、1種または複数のBMP種の存在量及びGlcSphの存在量の両方を対象からの同じ試験試料から測定することができる。他の実施形態では、2つの試験試料(例えば、同じ時間に、または異なる時間に採取)を対象から採取することができ、その際、一方の試験試料は、1種または複数のBMP種の存在量を測定するために使用することができ、他方の試験試料は、GlcSphの存在量を測定するために使用すること

50

ができる。2つの試験試料は、対象の同じ体液、細胞、または組織（例えば、全血、血漿、細胞、組織、血清、脳脊髄液、間質液、痰、尿、またはリンパ液）から採取することができる。他の実施形態では、2つの試験試料は、対象の異なる体液、細胞、または組織から採取することができ、例えば、一方の試料は血漿であってよく、他方の試料は脳組織であってよい。

【0062】

一部の実施形態では、基準値は、基準対象または基準対象の集団（例えば、平均値）から得られた基準試料において測定される。一部の実施形態では、基準値は、基準試料で測定された1種または複数のBMP種の存在量である。一部の実施形態では、基準値は、基準試料において測定されたGlcSpHの存在量である。一部の実施形態では、基準試料は、試験試料と同じ種類の細胞、組織、または体液である。一部の実施形態では、異なる種類の細胞、組織、または体液からの少なくとも2つの基準値を測定する。

10

【0063】

一部の実施形態では、基準試料は、健康な対照である。一部の実施形態では、基準対象または基準対象の集団は、プログラニュリン関連障害またはプログラニュリンのレベルの低下を有さない。特定の実施形態では、基準対象または基準対象の集団は、そのようないずれの徴候または症状も有さない。

【0064】

一部の実施形態では、BMP種レベルが、健康な対照またはプログラニュリン関連障害に関連しない対照と比較して、プログラニュリン関連障害を有するか、または有するリスクがある対象の骨髓細胞からインビトロで得られた骨髓由来マクロファージ（BMDM）では上昇している。

20

【0065】

一部の実施形態では、BMP種レベルが、健康な対照またはプログラニュリン関連障害に関連しない対照と比較して、プログラニュリン関連障害を有するか、または有するリスクがある対象の肝臓、脳、脳脊髄液、血漿、または尿では低下している。

【0066】

一部の実施形態では、GlcSpHレベルが、健康な対照またはプログラニュリン関連障害に関連しない対照と比較して、プログラニュリン関連障害を有するか、または有するリスクがある対象の例えば、全血、血漿、細胞、組織、血清、脳脊髄液、間質液、痰、尿、リンパ液、またはそれらの組合せでは上昇している。特定の実施形態では、GlcSpHレベルの上昇を、対象の血漿において見い出すことができる。

30

【0067】

一部の実施形態では、GlcSpHレベルが、健康な対照またはプログラニュリン関連障害に関連しない対照と比較して、プログラニュリン関連障害を有するか、または有するリスクがある対象の脳では、例えば、脳の前頭葉及び／または側頭葉では上昇している。特定の実施形態では、GlcSpHレベルの上昇を、前頭葉、例えば、上前頭回、中前頭回、下前頭回、及び／または中心前回の1つまたは複数の領域において見い出すことができる。

【0068】

一部の実施形態では、GlcSpHレベルが、健康な対照またはプログラニュリン関連障害に関連しない対照と比較して、プログラニュリン関連障害を有するか、または有するリスクがある対象の血液細胞、脳細胞、末梢血単核細胞（PBMC）、骨髓由来マクロファージ（BMDM）、網膜色素上皮（RPE）細胞、赤血球、白血球、神経細胞、ミクログリア細胞、大脳皮質細胞、脊髄細胞、骨髓細胞、肝臓細胞、腎臓細胞、脾細胞、肺細胞、眼細胞、絨毛膜絨毛細胞、筋細胞、皮膚細胞、線維芽細胞、心臓細胞、リンパ節細胞、またはそれらの組合せなどの細胞では上昇している。一部の実施形態では、GlcSpHレベルの上昇が、血液細胞において見い出され得る。一部の実施形態では、GlcSpHレベルの上昇が、脳細胞において見い出され得る。

40

【0069】

50

一部の実施形態では、G l c S p hレベルが、健康な対照またはプログラニユリン関連障害に関連しない対照と比較して、プログラニユリン関連障害を有するか、または有するリスクがある対象の脳組織、大脳皮質組織、脊髄組織、肝臓組織、腎臓組織、筋肉組織、心臓組織、眼組織、網膜組織、リンパ節、骨髄、皮膚組織、血管組織、肺組織、脾臓組織、心臓弁組織、またはそれらの組合せなどの組織では上昇している。一部の実施形態では、G l c S p hレベルの上昇が、対象の脳の前頭葉または側頭葉からの脳組織などの脳組織において見い出され得る。特定の実施形態では、G l c S p hレベルの上昇が、前頭葉の上前頭回、中前頭回、下前頭回、及び／または中心前回において見い出され得る。

【0070】

さらなる実施形態では、G l c S p hレベルが、健康な対照またはプログラニユリン関連障害に関連しない対照と比較して、プログラニユリン関連障害を有するか、または有するリスクがある対象のエンドソーム、リソソーム、細胞外小胞、エキソソーム、マイクロベシクル、またはそれらの組合せでは上昇している。

【0071】

一部の実施形態では、プログラニユリン関連障害を有するか、または有するリスクがある対象の試験試料におけるBMP種及び／またはG l c S p hの存在量は、健康な対照またはプログラニユリン関連障害に関連しない対照などの対照の基準値と比較して、少なくとも約1.2倍、1.5倍、または2倍の差を有する。他の実施形態では、プログラニユリン関連障害を有するか、または有するリスクがある対象の試験試料におけるBMP種及び／またはG l c S p hの存在量は、健康な対照またはプログラニユリン関連障害に関連しない対照などの対照の基準値と比較して、約1.2倍から約5倍（例えば、約1.5倍、2倍、2.5倍、3倍、3.5倍、4倍、4.5倍、または5倍）の差を有する。一部の実施形態では、基準値と比較しての差は、約2倍から約3倍（例えば、約2倍、2.1倍、2.2倍、2.3倍、2.4倍、2.5倍、2.6倍、2.7倍、2.8倍、2.9倍、または3倍）である。一部の実施形態では、対象は、プログラニユリンのレベルの低下に関連する障害及び／またはプログラニユリンのレベルの低下に関連する障害の1つもしくは複数の徴候もしくは症状を有する。

【0072】

一部の実施形態では、基準値は、処置前のBMP種値及び／またはG l c S p h値である。一部の実施形態では、対象を、プログラニユリンのレベルの低下またはプログラニユリン関連障害について処置し、かつ試験試料は、処置を開始する前に対象から得られた1つまたは複数の処置前試験試料、及び処置を開始した後に対象から得られた1つまたは複数の処置後試験試料を含む。一部の実施形態では、前記方法はさらに、処置後の1種または複数のBMP種及び／またはG l c S p hのうちの少なくとも1つの存在量が、健康な対照と比べて、処置前の1種または複数のBMP種及び／またはG l c S p hよりも改善を示すときに、対象が処置に応答していると決定することを含む。

【0073】

一部の実施形態では、前記方法は、（a）対象から得られた試験試料において1種または複数のBMP種及び／またはG l c S p hの存在量を測定すること；（b）試験試料または対象を化合物、医薬組成物、またはその投薬レジメンで処置すること（例えば、試験試料または対象を本明細書に記載のFc二量体：PGRN融合タンパク質で処置すること）；（c）処置された対象から得られた試験試料において1種または複数のBMP種及び／またはG l c S p hの存在量を測定すること、ならびに（d）ステップ（a）及び（c）において測定された1種または複数のBMP種及び／またはG l c S p hの存在量を比較すること；ならびに（e）化合物または投薬レジメンが、プログラニユリン関連障害を処置するためにBMPレベル及び／またはG l c S p hレベルを改善するか否かを決定することを含む。

【0074】

一部の実施形態では、2つ以上の処置後試験試料を、処置を開始した後の異なる時点で得て、前記方法はさらに、処置後試料において測定された1種または複数のBMP種のう

10

20

30

40

50

ちの少なくとも1つの存在量が、処置前試料において測定された対応する1種または複数のBMP種の存在量よりも、a) BMDMでは低いか、またはb) 肝臓、脳、脳脊髄液、血漿、または尿では高いときに、対象が処置に応答していると決定することを含む。一部の実施形態では、処置後試料において測定された1種または複数のBMP種のうちの少なくとも1つの存在量が、処置前試料において測定された対応する1種または複数のBMP種の存在量よりも、a) BMDMでは少なくとも約1.2倍低いか、またはb) 肝臓、脳、脳脊髄液、血漿、または尿では少なくとも約1.2倍高いときに、対象が処置に応答していると決定する。

【0075】

一部の実施形態では、2つ以上の処置後試験試料を、処置を開始した後の異なる時点で得て、前記方法はさらに、処置後試料において測定されたGlcsphの存在量が、処置前試料において測定されたGlcsphの存在量よりも、例えば、全血、血漿、細胞、組織、血清、脳脊髄液、間質液、痰、尿、またはリンパ液では低いときに、対象が処置に応答していると決定することを含む。一部の実施形態では、処置後試料において測定されたGlcsphの存在量が、処置前試料において測定されたGlcsphの存在量よりも、例えば、全血、血漿、細胞、組織、血清、脳脊髄液、間質液、痰、尿、またはリンパ液では少なくとも約1.2倍（例えば、少なくとも約1.5倍、2倍、2.5倍、3倍、3.5倍、4倍、4.5倍、5倍、5.5倍、6倍、6.5倍、7倍、7.5倍、8倍、8.5倍、9倍、9.5倍、または10倍）低いときに、対象は、処置に応答していると決定する。

【0076】

一部の実施形態では、BMP種レベル及び／またはGlcsphレベルの改善は、健康な対照またはプログラニユリン関連障害と関連しない対照などの対照の基準値と比べて、処置前のBMP種レベル及び／またはGlcsphレベルを上回る改善である。一部の実施形態では、改善されたBMP種レベル及び／またはGlcsphレベルは、値において、処置前BMP種レベル及び／またはGlcsphレベルが対照に対するよりも、対照に近い。一部の実施形態では、改善されたBMP種レベル及び／またはGlcsphレベルは、対照と比較して、20%、15%、10%、または5%未満の差を有する。一部の実施形態では、改善されたBMP種レベル及び／またはGlcsphレベルは、健康な対照と比較して、10%または5%未満の差を有する。一部の実施形態では、改善されたBMP種レベル及び／またはGlcsphレベルは、健康な対照と比較して、5%未満の差を有する。

【0077】

一部の実施形態では、前記方法はさらに、1つまたは複数の処置後試験試料のうちの少なくとも1つにおいて測定された1種または複数のBMP種及び／またはGlcsphのうちの少なくとも1つの存在量が、健康な対照の対応する基準値とおよそ同じであるときに、対象が処置に応答していると決定することを含む。

【0078】

一部の実施形態では、試験もしくは基準試料または1つもしくは複数の基準値は、細胞、組織、全血、血漿、血清、脳脊髄液、間質液、痰、尿、大便、気管支肺胞上皮洗浄液、リンパ液、精液、母液、羊水、またはそれらの組合せを含むか、またはそれに関する。一部の実施形態では、細胞は、末梢血単核細胞(PBMC)、BMDM、網膜色素上皮(RPE)細胞、血液細胞、赤血球、白血球、神経細胞、ミクログリア細胞、脳細胞、大脳皮質細胞、脊髄細胞、骨髄細胞、肝臓細胞、腎臓細胞、脾細胞、肺細胞、眼細胞、絨毛膜絨毛細胞、筋細胞、皮膚細胞、線維芽細胞、心臓細胞、リンパ節細胞、またはそれらの組合せである。一部の実施形態では、細胞は培養細胞である。一部の実施形態では、培養細胞は、BMDMまたはRPE細胞である。

【0079】

一部の実施形態では、組織は、脳組織、大脳皮質組織、脊髄組織、肝臓組織、腎臓組織、筋肉組織、心臓組織、眼組織、網膜組織、リンパ節、骨髄、皮膚組織、血管組織、肺組

10

20

30

40

50

織、脾臓組織、心臓弁組織、またはそれらの組合せを含む。一部の実施形態では、試験及び／または基準試料を細胞及び／または組織から精製し、これは、エンドソーム、リソソーム、細胞外小胞、エキソソーム、マイクロベシクル、またはそれらの組合せを含む。

【0080】

一部の実施形態では、1種または複数のBMP種は、2種以上のBMP種を含む。一部の実施形態では、1種または複数のBMP種は、BMP (16:0__18:1)、BMP (16:0__18:2)、BMP (18:0__18:0)、BMP (18:0__18:1)、BMP (18:1__18:1)、BMP (16:0__20:3)、BMP (18:1__20:2)、BMP (18:0__20:4)、BMP (16:0__22:5)、BMP (20:4__20:4)、BMP (22:6__22:6)、BMP (20:4__20:5)、BMP (18:2__18:2)、BMP (16:0__20:4)、BMP (18:0__18:2)、BMP (18:0e__22:6)、BMP (18:1e__20:4)、BMP (18:3__22:5)、BMP (20:4__22:6)、BMP (18:0e__20:4)、BMP (18:2__20:4)、BMP (18:1__22:6)、BMP (18:1__20:4)、BMP (18:0__22:6)、またはそれらの組合せを含む。

10

【0081】

一部の実施形態では、1種または複数のBMP種は、BMP (18:1__18:1)、BMP (18:0__20:4)、BMP (20:4__20:4)、BMP (22:6__22:6)、BMP (20:4__22:6)、BMP (18:1__22:6)、BMP (18:1__20:4)、BMP (18:0__22:6)、BMP (18:3__22:5)、またはそれらの組合せを含む。

20

【0082】

一部の実施形態では、試験試料は培養細胞を含み、かつ1種または複数のBMP種はBMP (18:1__18:1)を含む。一部の実施形態では、試験試料は、血漿、組織、尿、脳脊髄液(CSF)、及び／または脳もしくは肝臓組織を含み、かつ1種または複数のBMP種はBMP (22:6__22:6)を含む。一部の実施形態では、試験試料は肝臓組織を含み、かつ1種または複数のBMP種は、BMP (22:6__22:6)、BMP (18:3__22:5)、またはそれらの組合せを含む。一部の実施形態では、試験試料はCSFまたは尿を含み、かつ1種または複数のBMP種はBMP (22:6__22:6)を含む。一部の実施形態では、試験試料はミクログリアを含み、かつ1種または複数のBMP種はBMP (18:3__22:5)を含む。

30

【0083】

一部の実施形態では、1種または複数のBMP種及び／またはGl c Sphの存在量を、液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析法(LC-MS/MS)を使用して測定する。一部の実施形態では、内部BMP及び／またはGl c Sph標準を、ステップ(a)において1種または複数のBMP種及び／またはGl c Sphの存在量を測定するために、及び／または対応する基準値を決定するために使用する。一部の実施形態では、内部BMP及び／またはGl c Sph標準は、対象及び／または基準対象または基準対象の集団には天然には存在しないBMP種及び／またはGl c Sphを含む。一部の実施形態では、内部BMP標準は、BMP (14:0__14:0)を含む。一部の実施形態では、内部Gl c Sph標準は、ジュウテリウム標識Gl c Sphを含む。

40

【0084】

一部の実施形態では、対象は、プログラニュリン発現、プロセッシング、グリコシル化、細胞取り込み、輸送、及び／または機能に関連する障害を有するか、またはそれを発症するリスクがある。一部の実施形態では、対象及び／または基準対象もしくは基準対象の集団は、プログラニュリンのレベルの低下及び／またはプログラニュリンのレベルの低下に関連する障害を有し、かつ試験試料は候補化合物(例えば、本明細書に記載のFc二量体: PGRN融合タンパク質)と接触している。一部の実施形態では、対象及び／または基準対象もしくは基準対象の集団は、プログラニュリンのレベルの低下に関連する障害の1つまたは複数の徴候または症状を有する。一部の実施形態では、対象及び／または基準対

50

象もしくは基準対象の集団は、グラニューリン（GRN）遺伝子において変異を有する。一部の実施形態では、GRN遺伝子における変異は、プログラニューリン発現及び／または活性を低下させる。一部の実施形態では、対象は、アテローム性動脈硬化症、ゴーシェ病（例えば、ゴーシェ病1、2、または3型）、またはAMDを有するか、またはそれを発症するリスクがある。一部の実施形態では、対象は、TDP-43に関連する障害（例えば、ADまたはALS）を有するか、またはそれを発症するリスクがある。

【0085】

一部の実施形態では、対象及び／または基準対象は、ヒト、非ヒト霊長類、げっ歯類、イヌ、またはブタである。

【0086】

別の態様では、本開示は、対象においてプログラニューリン変異体レベルをモニタリングするためのキットを提供する。一部の実施形態では、前記キットは、対象から得られた試験試料及び／または基準対象もしくは基準対象の集団から得られた基準試料において1種または複数のBMP種及び／またはGlcSpHの存在量を測定するためのBMP及び／またはGlcSpH標準を含む。一部の実施形態では、BMP及び／またはGlcSpH標準は、対象及び／または基準対象に天然には存在しないBMP種及び／またはGlcSpHを含む。一部の実施形態では、BMP標準は、BMP（14：0__14：0）を含む。一部の実施形態では、GlcSpH標準は、ジュウテリウム標識GlcSpHである。

【0087】

一部の実施形態では、キットはさらに、対象及び／または基準対象から試料を得る、試料をプロセッシングする、1種または複数のBMP種の存在量を測定する、GlcSpHの存在量を測定する、またはそれらの組合せのための試薬を含む。一部の実施形態では、キットはさらに、取扱説明書を含む。

【図面の簡単な説明】

【0088】

【図1】A及びBは、本明細書に開示のとおり例示的な融合タンパク質が純度98%超まで精製されたことを実証するクロマトグラフィートレースを示している。

【図2】種々の緩衝液中での、本明細書に開示のとおり例示的な融合タンパク質の熱特性を実証する表を示している。

【図3】本明細書に開示のとおり例示的な融合タンパク質の凍結解凍安定性を示すクロマトグラムを含む。

【図4】本明細書に開示の例示的な融合タンパク質のソルチリン結合を示すグラフである。

【図5】本明細書に開示のとおり例示的な融合タンパク質が、GRN KO/hTfR・KIマウスの骨髄から得られた培養細胞においてインビトロでBMPレベルを低下させ得ることを示すグラフである。

【図6A】GRN KO/hTfR・KIマウスの血漿（7日間）における本明細書に開示の例示的な融合タンパク質のタンパク質濃度の代表的なプロットを示している。

【図6B】GRN KO/hTfR・KIマウスの脳（投薬後7日）における本明細書に開示の例示的な融合タンパク質のタンパク質濃度の代表的なプロットを示している。

【図6C】GRN KO/hTfR・KIマウスの肝臓（投薬後7日）における本明細書に開示の例示的な融合タンパク質のタンパク質濃度の代表的なプロットを示している。

【図7A】本明細書に開示の例示的な融合タンパク質の投与後の、投薬後7日目でのGRN KO/hTfR・KIマウスの脳におけるTREM2レベルの代表的なプロットを含む。

【図7B】本明細書に開示の例示的な融合タンパク質の投与後の、投薬後7日目でのGRN KO/hTfR・KIマウスの肝臓におけるTREM2レベルの代表的なプロットを含む。

【図8A】本明細書に開示の例示的な融合タンパク質の投与後の、投薬後7日目でのGRN KO/hTfR・KIマウスの脳におけるBMPレベルの代表的なプロットを含む。

10

20

30

40

50

【図 8 B】本明細書に開示の例示的な融合タンパク質の投与後の、投薬後 7 日目での GRN KO/hTfR. KIマウスの肝臓における BMP レベルの代表的なプロットを含む。

【図 9】本明細書に開示のとおり融合体 1 が、GRN KO/hTfR. KIマウスの脳において G l c S p h レベルを低下させ得ることを示すグラフである。

【図 10】本明細書に開示のとおり融合体 1 が、GRN KO/hTfR. KIマウスの脳において G l c S p h レベルを低下させ得ることを示すグラフである。

【図 11】本明細書に開示のとおり融合体 1 が、GRN KO/hTfR. KIマウスにおいて BMP ジー 18 : 1 レベルを修正し得ることを示すグラフである。

【図 12】本明細書に開示のとおり融合体 1 が、GRN KO/hTfR. KIマウスにおいて BMP ジー 22 : 6 レベルを修正し得ることを示すグラフである。

【図 13】本明細書に開示のとおり融合体 1 が、投薬後 2 週目に、GRN KO/hTfR. KIマウスの脳におけるグルコセレブロンダーゼ (G C アーゼ) 活性を野生型レベルに修正し得ることを示すグラフである。

【図 14】8 週間の投薬後の、GRN KO/hTfR. KIマウスにおける本明細書に開示の例示的な融合タンパク質の脳タンパク質レベルを示す散布図である。平均 ± S E M 及び p 値：ダネット多重比較検定と共に一元 A N O V A を表示している；**** p < 0 . 0 0 0 1。

【図 15】8 週間の投薬後の、GRN KO/hTfR. KIマウスにおける本明細書に開示の例示的な融合タンパク質の肝臓タンパク質レベルを示す散布図である。平均 ± S E M 及び p 値：ダネット多重比較検定と共に一元 A N O V A を表示している；** p < 0 . 0 1 及び**** p < 0 . 0 0 0 1。

【図 16】本明細書に開示の例示的な融合タンパク質の 8 週間の投薬後の、GRN KO/hTfR. KIマウスの脳における代表的な BMP 種のレベルを示す散布図である。平均 ± S E M 及び p 値：ダネット多重比較検定と共に一元 A N O V A を表示している；** p < 0 . 0 1 及び**** p < 0 . 0 0 0 1。

【図 17】本明細書に開示の例示的な融合タンパク質の 8 週間の投薬後の、GRN KO/hTfR. KIマウスにおける代表的な BMP 種の C S F レベルを示す散布図である。平均 ± S E M 及び p 値：ダネット多重比較検定と共に一元 A N O V A を表示している；* p < 0 . 0 5 及び**** p < 0 . 0 0 0 1。

【図 18】本明細書に開示の例示的な融合タンパク質の 8 週間の投薬後の、GRN KO/hTfR. KIマウスの肝臓における代表的な BMP 種のレベルを示す散布図である。

【図 19】本明細書に開示の例示的な融合タンパク質の 8 週間の投薬後の、GRN KO/hTfR. KIマウスにおける代表的な BMP 種の血漿レベルを示す散布図である。

【図 20】本明細書に開示の例示的な融合タンパク質の 8 週間の投薬後の、GRN KO/hTfR. KIマウスにおける脳グルコシルスフィンゴシン (G l c S p h) レベルを示す散布図である。平均 ± S E M 及び p 値：ダネット多重比較検定と共に一元 A N O V A を表示している；**** p < 0 . 0 0 0 1。

【図 21】本明細書に開示の例示的な融合タンパク質の 8 週間の投薬後の、GRN KO/hTfR. KIマウスにおける肝臓グルコシルスフィンゴシン (G l c S p h) レベルを示す散布図である。

【図 22】本明細書に開示の例示的な融合タンパク質の 8 週間の投薬後の、GRN KO/hTfR. KIマウスにおける C S F ニューロフィラメント (N f - L) レベルを示す散布図である。

【図 23】本明細書に開示の例示的な融合タンパク質の 8 週間の投薬後の、GRN KO/hTfR. KIマウスにおける相対的脳 T r e m 2 レベルを示す散布図である。平均 ± S E M 及び p 値：ダネット多重比較検定と共に一元 A N O V A を表示している；* p < 0 . 0 5 及び**** p < 0 . 0 0 0 1。

【図 24】本明細書に開示の例示的な融合タンパク質の 8 週間の投薬後の、GRN KO/hTfR. KIマウスにおける相対的脳 C D 6 8 レベルを示す散布図である。平均 ± S E M 及び p 値：ダネット多重比較検定と共に一元 A N O V A を表示している；** p < 0

10

20

30

40

50

． 0 1 及び * * * $p < 0 . 0 0 1$ 。

【図 2 5】本明細書に開示の例示的な融合タンパク質の 8 週間の投薬後の、G R N K O / h T f R . K I マウスにおける相対的脳 I b a 1 レベルを示す散布図である。

【図 2 6】本明細書に開示の例示的な融合タンパク質の 8 週間の投薬後の、G R N K O / h T f R . K I マウスにおける相対的脳 G F A P レベルを示す散布図である。

【図 2 7】本明細書に開示の例示的な融合タンパク質の 8 週間の投薬後の、G R N K O / h T f R . K I マウスにおける B M P 種及び脂質の相対的变化を示すヒートマップである。

【図 2 8】本明細書に開示の例示的な融合タンパク質の 8 週間の投薬後の、G R N K O / h T f R . K I マウスのニューロン、星状細胞、及びミクログリア細胞における代表的な B M P 種のレベルを示す散布図を提供している。

【図 2 9】本明細書に開示の例示的な融合タンパク質の 8 週間の投薬後の、G R N K O / h T f R . K I マウスのニューロン、星状細胞、及びミクログリア細胞における代表的な B M P 種のレベルを示す散布図を提供している。

【図 3 0】本明細書に開示の例示的な融合タンパク質の 8 週間の投薬後の、G R N K O / h T f R . K I マウスのニューロン、星状細胞、及びミクログリア細胞における代表的な B M P 種のレベルを示す散布図を提供している。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 8 9 】

詳細な説明

I . 序文

プログラニュリンのレベルを上昇させることは、特に対象のプログラニュリンレベルが低下している場合に、多くの疾患を処置するために有用であり得る。本発明者らは、野生型プログラニュリンの C 末端が、C H O 細胞で発現される場合に切断されていて、そのことがソルチリン結合の障害をもたらすことを発見した。ソルチリンはプログラニュリンに直接的に結合して、細胞リソソームへのプログラニュリンの取り込み及び輸送に関係する。この切断を減少させるために、本発明者らは、C 末端にアミノ酸改変を有するプログラニュリン変異体、さらには、F c ポリペプチドに連結した 1 つまたは複数のプログラニュリン変異体を含む融合タンパク質を開発した。具体的には、本明細書に記載のある特定の変異体は、野生型プログラニュリンと比較して、野生型プログラニュリンの C 末端の Q L L 配列中に 1 つまたは複数のアミノ酸置換を有するか、または C 末端に付加された追加のアミノ酸を有する。重要なことに、これらのプログラニュリン変異体は、ソルチリン結合を維持し得る。したがって、本明細書に記載のプログラニュリン変異体及び融合タンパク質は、神経変性疾患（例えば、F T D）、アテローム性動脈硬化症、T D P - 4 3 に関連する障害、A M D、またはプログラニュリン関連障害を含む、そのような疾患を処置するために適切である。

【 0 0 9 0 】

これらのプログラニュリン変異体の開発に加えて、本発明者らは、F c 分子に融合したプログラニュリン変異体を含む融合タンパク質も開発した。場合によっては、融合タンパク質は、二量体 F c ポリペプチドを含み、その際、F c ポリペプチドモノマーの少なくとも一方は、プログラニュリン変異体に連結している。F c ポリペプチドは、プログラニュリンレベルを上昇させることができ、場合によっては、追加の機能特性をタンパク質に付与するように改変することができる。

【 0 0 9 1 】

本発明者らは、血液脳関門（B B B）を通過してのプログラニュリンまたはその変異体の送達を促進する融合タンパク質も開発した。これらのタンパク質は、二量体を形成する F c ポリペプチド及び改変 F c ポリペプチドと、F c 領域及び／または改変 F c 領域に連結しているプログラニュリンまたはその変異体とを含む。改変 F c 領域は、T f R などの B B B 受容体に特異的に結合し得る。対象に投与されると、融合タンパク質は、B B B を形成する内皮上に存在する T f R 受容体に結合する。融合タンパク質は、B B B を通過し

10

20

30

40

50

て経細胞輸送され得、したがって、脳におけるその濃度を、例えば、と比較して上昇させる。

【0092】

プログラニュリン (PGRN) (プロエピセリン及びアクログラニンとしても公知) は、遺伝子 GRN によりコードされるシステインリッチなタンパク質であり、ヒト染色体 17q21 に位置する。プログラニュリンは、リソソームタンパク質、さらには、それぞれ約 60 アミノ酸長である保存グラニュリンペプチドの 7.5 回タンデムリピートからなる分泌タンパク質であり、かつ様々な細胞外プロテアーゼ (例えば、エラスターゼ) 及びリソソームプロテアーゼ (例えば、カテプシン L) による切断により放出され得る (Kao et al., Nat Rev Neurosci, 18 (6): 325-333, 2017)。概して、プログラニュリンは、先天免疫の制御における細胞自律的及び非細胞自律的役割の両方、さらには、リソソームの機能の役割を果たすと考えられ、その際、様々なカテプシン及び他のヒドロラーゼの活性及びレベルを調節する (Kao et al., 前出)。プログラニュリンは、神経栄養機能も有し、神経突起伸展及びニューロン生存を促進する (Kao et al., 前出)。

10

【0093】

II. 定義

本明細書で使用される場合、単数形「1つの (a)」、「1つの (an)」、及び「その (the)」は、内容が明らかに別段に指定していない限り、複数の言及も含む。したがって、例えば、「1つのポリペプチド (a polypeptide)」への言及は、2つ以上のそのような分子を含み得る、などである。

20

【0094】

本明細書で使用される場合、「約」及び「およそ」という用語は、数値または範囲において指定された量を修飾するために使用される場合、その数値、さらには、当業者に公知の値から合理的な偏差、例えば $\pm 20\%$ 、 $\pm 10\%$ 、または $\pm 5\%$ が、挙げられている値の意図されている意味の範囲内であることを示す。

【0095】

「プログラニュリン」または「PRGN」は、遺伝子 GRN によりコードされるシステインリッチなリソソームタンパク質を指す。プログラニュリンは、ヒトプログラニュリン配列、例えば、配列番号 1 または 2 の配列を含んでよい。プログラニュリンは、配列番号 1 の配列を含んでよく、その際、最初の 17 のアミノ酸はシグナルペプチドを示す。プログラニュリンは、成熟プログラニュリンを含んでよく、その際、17 アミノ酸シグナルペプチドは切断されている。成熟プログラニュリンは、配列番号 2 の配列を含んでよい。プログラニュリンは、シグナルペプチドを含む形態か、または成熟形態かのいずれかでの非ヒト種、例えば、マウス (アクセッション番号 NP_032201.2)、ラット (NP_058809.2 または NP_001139314.1)、及びチンパンジー (XP_016787144.1 または XP_016787145.1) からの配列を含んでよい。

30

【0096】

「プログラニュリン変異体」または「PRGN 変異体」は、野生型プログラニュリンの配列変異体を指す。プログラニュリン変異体は、野生型プログラニュリンの機能と同様か、または実質的に同じ機能を有することができ、例えば、プログラニュリン変異体も、ソルチリンまたはプロサポシンに結合し、様々なリソソームタンパク質 (例えば、カテプシン) の活性及びレベルを調節し、神経突起伸展及びニューロン生存、及び／または本明細書に記載の任意の他の機能を促進する。

40

【0097】

「プログラニュリン関連障害」という用語は、発現、プロセッシング、グリコシル化、細胞取り込み、輸送、及び／または機能を含む、プログラニュリンに関する任意の病的状態を指す。「プログラニュリンのレベルの低下に関連する障害」という用語は、細胞、組織、及び／または対象内での正常な生理学的機能を可能にするには不十分である (すなわち

50

、可能にするには低すぎる) プログラニュリンのレベルから直接的または間接的に生じる任意の病的状態、さらには、そのような状態の前兆を指す。例えば、プログラニュリン関連障害は、プログラニュリン遺伝子 (GRN) における変異が原因であり得るか、またはそれと関連し得る。一部の実施形態では、プログラニュリン関連障害は、神経変性疾患 (例えば、FTD) またはリソソーム貯蔵障害である。

【0098】

「プログラニュリンレベル」という用語は、対象か、または試料 (例えば、対象から得られた試料) のいずれかに存在するプログラニュリンの量、濃度、及び／または活性レベルを指す。プログラニュリンレベルは、存在するプログラニュリンの絶対的な量、濃度、及び／または活性レベルを指し得るか、または相対的な量、濃度、及び／または活性レベルを指し得る。この用語はまた、存在するプログラニュリン及び／またはプログラニュリン mRNA (例えば、GRN 遺伝子から発現される) の量または濃度を指す。

10

【0099】

「骨髄由来マクロファージ」または「BMDM」という用語は、哺乳類骨髄 (例えば、対象から得られた骨髄) からインビトロで生成されるか、または誘導されるマクロファージ細胞を指す。非限定的例として、BMDM は、マクロファージコロニー刺激因子 (M-CSF) などのサイトカインの存在下で未分化骨髄細胞を培養することにより生成することができる。

【0100】

「トランスフェリン受容体」または「TfR」は、本開示の文脈で使用される場合、トランスフェリン受容体タンパク質 1 を指す。ヒトトランスフェリン受容体 1 ポリペプチド配列は、配列番号 109 において記述される。他の種からのトランスフェリン受容体タンパク質 1 配列も公知である (例えば、チンパンジー、アクセッション番号 XP_003310238.1; アカゲザル、NP_001244232.1; イヌ、NP_001003111.1; ウシ、NP_001193506.1; マウス、NP_035768.1; ラット、NP_073203.1; 及びニワトリ、NP_990587.1)。「トランスフェリン受容体」という用語は、トランスフェリン受容体タンパク質 1 染色体遺伝子座にある遺伝子によりコードされる例示的な基準配列、例えば、ヒト配列の対立遺伝子変異型も包含する。全長トランスフェリン受容体タンパク質は、短い N 末端細胞内領域、膜貫通領域、及び大きい細胞外ドメインを含む。細胞外ドメインは、3つのドメイン: プロテアーゼ様ドメイン、らせんドメイン、及び頂端ドメインにより特徴づけられる。

20

30

【0101】

本明細書で使用される場合、「Fc ポリペプチド」という用語は、構造ドメインとして Ig フォールドにより特徴づけられる天然に存在する免疫グロブリン重鎖ポリペプチドの C 末端領域を指す。Fc ポリペプチドは、少なくとも CH2 ドメイン及び／または CH3 ドメインを含む定常領域配列を含み、かつヒンジ領域の少なくとも一部を含んでよい。一般に、Fc ポリペプチドは可変領域を含まない。

【0102】

「改変 Fc ポリペプチド」は、野生型免疫グロブリン重鎖 Fc ポリペプチド配列と比較した場合に少なくとも 1 つの変異、例えば、置換、欠失、または挿入を有するが、天然 Fc ポリペプチドの Ig フォールドまたは構造全体を維持している Fc ポリペプチドを指す。

40

【0103】

本明細書で使用される場合、「Fc ポリペプチド二量体」という用語は、2つの Fc ポリペプチドの二量体を指す。一部の実施形態では、2つの Fc ポリペプチドは、2つの CH3 ドメインの間での相互作用により二量体化する。ヒンジ領域またはヒンジ領域の一部が 2つの Fc ポリペプチド中に存在するならば、1つまたは複数のジスルフィド結合が、2つの二量体化 Fc ポリペプチドのヒンジ領域間でも形成し得る。

【0104】

「改変 Fc ポリペプチド二量体」は、少なくとも 1 つの Fc ポリペプチドが、野生型免

50

疫グロブリン重鎖Fcポリペプチド配列と比較した場合に少なくとも1つの変異、例えば、置換、欠失、または挿入を有する改変Fcポリペプチドである、2つのFcポリペプチドの二量体を指す。例えば、改変Fcポリペプチド二量体は、TfRに特異的に結合し、かつ野生型免疫グロブリン重鎖Fcポリペプチド配列と比較した場合に少なくとも1つの変異、例えば、置換、欠失、または挿入を有する少なくとも1つの改変Fcポリペプチドを有するものであってよい。

【0105】

「CH3ドメイン」及び「CH2ドメイン」という用語は、本明細書で使用される場合、免疫グロブリン定常領域ドメインポリペプチドを指す。本出願の目的では、CH3ドメインポリペプチドは、EUNANBARINGスキームによりナンバリングされた場合に、およそ341位からおよそ447位のアミノ酸のセグメントを指し、かつCH2ドメインポリペプチドは、EUNANBARINGスキームによりナンバリングされた場合に、およそ231位からおよそ340位のアミノ酸のセグメントを指し、かつヒンジ領域配列を含まない。CH2及びCH3ドメインポリペプチドは、IMGT (ImMunoGeneTics) ナンバリングスキームによりナンバリングされてもよく、その際、IMGT Scientificチャートナンバリング (IMGTウェブサイト) によれば、CH2ドメインナンバリングは1~110であり、かつCH3ドメインナンバリングは1~107である。CH2及びCH3ドメインは、免疫グロブリンのFc領域の一部である。Fc領域は、EUNANBARINGスキームによりナンバリングされた場合に、およそ231位からおよそ447位のアミノ酸のセグメントを指すが、本明細書で使用される場合、抗体のヒンジ領域の少なくとも一部を含んでよい。例示的なヒンジ領域配列は、ヒトIgG1ヒンジ配列EPKSCDKTHTCPPCP (配列番号88) である。

10

20

【0106】

CH3またはCH2ドメインに関する「野生型」、「天然」、及び「天然に存在する」という用語は、天然に生じる配列を有するドメインを指すために本明細書において使用される。

【0107】

本開示の文脈では、ミュータントポリペプチドまたはミュータントポリヌクレオチドに関する「ミュータント」という用語は、「変異体」と互換的に使用される。所与の野生型CH3またはCH2ドメイン基準配列に対する変異体は、天然に存在する対立遺伝子変異型を含んでよい。「非天然に」生じるCH3またはCH2ドメインは、細胞中に天然に存在せず、かつ遺伝子改変により、例えば、天然CH3ドメインまたはCH2ドメインポリヌクレオチドまたはポリペプチドの遺伝子工学技術または変異誘発技術を使用して生成される変異体またはミュータントドメインを指す。「変異体」は、野生型に対して少なくとも1つのアミノ酸変異を含む任意のドメインを含む。変異には、置換、挿入、及び欠失が含まれ得る。

30

【0108】

「アミノ酸」という用語は、天然に存在するアミノ酸及び合成アミノ酸、さらには天然に存在するアミノ酸と同様に機能するアミノ酸類似体及びアミノ酸模倣体を指す。

【0109】

天然に存在するアミノ酸は、遺伝コードによりコードされるもの、さらには、後で改変されるアミノ酸、例えば、ヒドロキシプロリン、γ-カルボキシグルタマート及びオ-ホスホセリンである。「アミノ酸類似体」は、天然に存在するアミノ酸と同じ基本化学構造、すなわち、水素、カルボキシル基、アミノ基、及びR基に結合したα炭素を有する化合物、例えば、ホモセリン、ノルロイシン、メチオニンスルホキシド、メチオニンメチルスルホニウムを指す。そのような類似体は、改変されたR基 (例えば、ノルロイシン) または改変されたペプチド主鎖を有するが、天然に存在するアミノ酸と同じ基本化学構造を維持している。「アミノ酸模倣体」は、アミノ酸の一般化学構造とは異なる構造を有するが、天然に存在するアミノ酸と同様に機能する化学化合物を指す。

40

【0110】

50

天然に存在する α -アミノ酸には、限定ではないが、アラニン (Ala)、システイン (Cys)、アスパラギン酸 (Asp)、グルタミン酸 (Glu)、フェニルアラニン (Phe)、グリシン (Gly)、ヒスチジン (His)、イソロイシン (Ile)、アルギニン (Arg)、リシン (Lys)、ロイシン (Leu)、メチオニン (Met)、アスパラギン (Asn)、プロリン (Pro)、グルタミン (Gln)、セリン (Ser)、トレオニン (Thr)、バリン (Val)、トリプトファン (Trp)、チロシン (Tyr)、及びそれらの組合せが含まれる。天然に存在する α -アミノ酸の立体異性体には、限定ではないが、D-アラニン (D-Ala)、D-システイン (D-Cys)、D-アスパラギン酸 (D-Asp)、D-グルタミン酸 (D-Glu)、D-フェニルアラニン (D-Phe)、D-ヒスチジン (D-His)、D-イソロイシン (D-Ile)、D-アルギニン (D-Arg)、D-リシン (D-Lys)、D-ロイシン (D-Leu)、D-メチオニン (D-Met)、D-アスパラギン (D-Asn)、D-プロリン (D-Pro)、D-グルタミン (D-Gln)、D-セリン (D-Ser)、D-トレオニン (D-Thr)、D-バリン (D-Val)、D-トリプトファン (D-Trp)、D-チロシン (D-Tyr)、及びそれらの組合せが含まれる。

10

【0111】

アミノ酸は本明細書において、それらの一般に公知の3文字記号によっても、またはIUPAC-IUB Biochemical Nomenclature Commissionが推奨する1文字記号によっても言及され得る。

20

【0112】

「ポリペプチド」及び「ペプチド」という用語は本明細書において、一本鎖中のアミノ酸残基のポリマーに言及するために互換的に使用される。この用語は、1個または複数のアミノ酸残基が、対応する天然に存在するアミノ酸の人工の化学的模倣体であるアミノ酸ポリマー、さらには、天然に存在するアミノ酸ポリマー及び天然に存在しないアミノ酸ポリマーに当てはまる。アミノ酸ポリマーは、もっぱらL-アミノ酸、もっぱらD-アミノ酸、またはL及びDアミノ酸の混合物を含んでよい。

【0113】

「タンパク質」という用語は、本明細書で使用される場合、一本鎖ポリペプチドのポリペプチドまたは二量体（すなわち、2つ）または多量体（すなわち、3つ以上）のいずれかを指す。タンパク質の一本鎖ポリペプチドは、共有結合、例えば、ジスルフィド結合により、または非共有結合性相互作用により接続してよい。

30

【0114】

「保存的置換」、「保存的変異」、または「保存的改変変異体」という用語は、同様の特徴を有すると分類され得る別のアミノ酸でのアミノ酸置換をもたらす改変形態を指す。この手法で定義される保存的アミノ酸基のカテゴリーの例には、Glu（グルタミン酸またはE）、Asp（アスパラギン酸またはD）、Asn（アスパラギンまたはN）、Gln（グルタミンまたはQ）、Lys（リシンまたはK）、Arg（アルギニンまたはR）、及びHis（ヒスチジンまたはH）を含む「荷電／極性基」；Phe（フェニルアラニンまたはF）、Tyr（チロシンまたはY）、Trp（トリプトファンまたはW）、及びHis（ヒスチジンまたはH）を含む「芳香族基」；ならびにGly（グリシンまたはG）、Ala（アラニンまたはA）、Val（バリンまたはV）、Leu（ロイシンまたはL）、Ile（イソロイシンまたはI）、Met（メチオニンまたはM）、Ser（セリンまたはS）、Thr（トレオニンまたはT）、及びCys（システインまたはC）を含む「脂肪族基」が含まれ得る。各グループの中で、サブグループも同定することができる。例えば、荷電または極性アミノ酸のグループは、Lys、Arg及びHisを含む「正に荷電したサブグループ」；Glu及びAspを含む「負に荷電したサブグループ」；ならびにAsn及びGlnを含む「極性サブグループ」を含むサブグループに細分することができる。別の例では、芳香族または環式基は、Pro、His及びTrpを含む「窒素環サブグループ」；ならびにPhe及びTyrを含む「フェニルサブグループ」を含むサブグループに細分することができる。さらに別の例では、脂肪族基は、サブグループ、例えば、

40

50

Val、Leu、Gly、及びAlaを含む「脂肪族非極性サブグループ」；ならびにMet、Ser、Thr、及びCysを含む「脂肪族弱極性サブグループ」に細分することができる。保存的変異のカテゴリの例には、これらに限定されないが：正電荷が維持され得るように、ArgからLys、またはその逆；負電荷が維持され得るように、AspからGlu、またはその逆；遊離-OHが維持され得るように、ThrからSer、またはその逆；及び遊離-NH₂が維持され得るように、AsnからGln、またはその逆など、上のサブグループ内でのアミノ酸のアミノ酸置換が含まれる。一部の実施形態では、天然に存在する疎水性アミノ酸は、疎水性を保存するために、例えば、活性部位において、疎水性アミノ酸で置換される。

【0115】

2つ以上のポリペプチド配列の文脈における「同一の」または「同一性」パーセントという用語は、配列比較アルゴリズムを使用して、または手動のアラインメント及び外観検査により測定された場合に、比較ウィンドウ、または指名領域にわたる最大対応のために比較し、アラインさせた場合に、同じであるか、または特定の領域にわたって同一であるアミノ酸残基の特定のパーセンテージ、例えば、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、もしくは少なくとも99%またはそれ以上を有する、2つ以上の配列またはサブ配列を指す。

【0116】

ポリペプチドの配列比較では、典型的には、1つのアミノ酸配列が、基準配列としての役割を果たし、それに対して、候補配列が比較される。アラインメントは、当業者が利用可能な様々な方法、例えば、目視によるアラインメントを使用して、または公知のアルゴリズムを使用する公共利用可能なソフトウェアを使用して最大アラインメントを達成することにより実行することができる。そのようなプログラムには、BLASTプログラム、ALIGN、ALIGN-2 (Genentech、South San Francisco、Calif.) またはMegalign (DNASTAR) が含まれる。最大アラインメントを達成するためにアラインメントで使用するパラメーターは、当業者により決定され得る。本出願の目的でのポリペプチド配列の配列比較では、2つのタンパク質配列をデフォルトのパラメーターでアラインさせるためにBLASTPアルゴリズム標準タンパク質BLASTを使用する。

【0117】

「に対応する」、「を参照して決定された」、または「を参照してナンバリングされた」という用語は、ポリペプチド配列中の所与のアミノ酸残基を同定する文脈において使用される場合、所与のアミノ酸配列が基準配列と最大にアラインされて比較された場合の特定の基準配列の残基の位置を指す。したがって、例えば、改変Fcポリペプチド中のアミノ酸残基が、配列番号61中のアミノ酸「に対応する」のは、その残基が、配列番号61と最適にアラインさせた場合に配列番号61中のアミノ酸とアラインするときである。基準配列とアラインさせるポリペプチドは、基準配列と同じ長さである必要はない。

【0118】

「結合親和性」は、本明細書で使用される場合、2つの分子、例えば、ポリペプチド上の単一の結合部位と、それが結合する標的、例えば、トランスフェリン受容体との間の非共有結合性相互作用の強度を指す。したがって、例えば、この用語は、別段に示されていない限り、または文脈から明らかでない限り、ポリペプチドとその標的との間の1:1相互作用を指し得る。結合親和性は、会合速度定数 (k_a 、 $\text{time}^{-1}\text{M}^{-1}$) で割った解離速度定数 (k_d 、 time^{-1}) を指す平衡解離定数 (K_D) を測定することにより定量化することができる。 K_D は、例えば、表面プラスモン共鳴 (SPR) 法、例えば、Biacore (商標) システム；KinExA (登録商標) などの結合平衡除外アッセイ；及びバイオレイヤー干渉法 (例えば、ForteBio (登録商標) Octet (登録商標) プラットフォームを使用) を使用して、複合体形成及び解離のキネティクスを測定することにより決定することができる。本明細書で使用される場合、「結合親和性」には、ポリペプチドとその標的との間の1:1相互作用を反映するものなどの正規の結合親

10

20

30

40

50

和性だけではなく、 K_D がそのために計算されてアビド結合 (avid binding) を反映し得る見掛けの親和性も含まれる。

【0119】

標的、例えば、トランスフェリン受容体に「特異的に結合する」または「選択的に結合する」という語句は、本明細書に記載のとおりトランスフェリン受容体結合改変Fcポリペプチドを含むポリペプチドに関する場合、構造的に異なる標的、例えば、トランスフェリン受容体ファミリーではない標的に結合するよりも高い親和性、高い結合活性、及び／または長い期間で、そのポリペプチドが標的に結合する結合反応を指す。典型的な実施形態では、ポリペプチドは、同じ親和性アッセイ条件下でアッセイされた場合に、関連しない標的と比較して、トランスフェリン受容体について少なくとも5倍、10倍、25倍、50倍、100倍、1000倍、10,000倍、またはそれよりも高い親和性を有する。特定の標的（例えば、TfR）「に特異的に結合すること」、「に特異的に結合する」、または「について特異的である」という用語は、本明細書で使用される場合、例えば、結合する標的について、例えば、 10^{-4} Mまたはそれ以下、例えば、 10^{-5} M、 10^{-6} M、 10^{-7} M、 10^{-8} M、 10^{-9} M、 10^{-10} M、 10^{-11} M、または 10^{-12} Mの平衡解離定数 K_D を有する分子により示され得る。一部の実施形態では、改変Fcポリペプチドは、複数の種のうちで保存されている（例えば、複数の種のうちで構造的に保存されている）、例えば、非ヒト霊長類とヒト種との間で保存されている（例えば、非ヒト霊長類とヒト種との間で構造的に保存されている）トランスフェリン受容体上のエピトープに特異的に結合する。一部の実施形態では、ポリペプチドは、ヒトトランスフェリン受容体に排他的に結合し得る。

10

20

【0120】

「処置」、「処置すること」などという用語は本明細書において、所望の薬理学的及び／または生理的作用を得ることを一般に意味するために使用される。「処置すること」または「処置」は、減退、寛解、患者の生存の向上、生存時間もしくは率の上昇、症状の減少もしくは障害を患者にとってより許容可能なものとする、変性もしくは衰退の速度を減速させること、または患者の身体的もしくは心理的健康を改善することなどの任意の客観的または主観的パラメータを含めて、神経変性疾患（例えば、FTD、NCL、NPA、NPB、NPC、C9ORF72関連ALS／FTD、孤発性ALS、AD、ゴーシェ病（例えば、ゴーシェ病1、2、または3型）、及びパーキンソン病）、アテローム性動脈硬化症、TDP-43に関連する障害、AMD、及びプログランユリン関連障害を含む疾患の処置または寛解の成功の任意の兆候を指す。症状の処置または寛解は、客観的または主観的パラメータに基づき得る。処置の作用は、処置を受けていない個体もしくは個体のプールと、または処置前もしくは処置中の異なる時点での同じ患者と比較することができる。

30

【0121】

「対象」、「個体」、及び「患者」という用語は、本明細書において互換的に使用される場合、これらに限定されないが、ヒト、非ヒト霊長類、げっ歯類（例えば、ラット、マウス、及びモルモット）、ウサギ、ウシ、ブタ、ウマ、及び他の哺乳類種を含む哺乳類を指す。一実施形態では、患者はヒトである。

40

【0122】

「薬学的に許容される添加剤」という用語は、これらに限定されないが、緩衝剤、担体、または防腐剤など、ヒトまたは動物において使用するために生物学的または薬理学的に適合性である非医薬品活性成分を指す。

【0123】

本明細書で使用される場合、作用物質の「治療量」または「治療有効量」は、対象において疾患の症状を処置する作用物質の量である。

【0124】

「投与する」という用語は、作用物質、化合物、または組成物を生物学的作用の所望の部位に送達する方法を指す。これらの方法には、これらに限定されないが、局所送達、非

50

経口送達、静脈内送達、皮内送達、筋肉内送達、髄腔内送達、結腸送達、直腸送達、または腹腔内送達が含まれる。一実施形態では、本明細書に記載のポリペプチドを静脈内投与する。

【0125】

III. プログラニュリン補充療法

一部の態様では、プログラニュリン変異体及びそれを含む融合タンパク質を、本明細書において記載する。本明細書に記載の融合タンパク質は、Fcポリペプチド二量体及びプログラニュリン変異体を含む。一部の実施形態では、本明細書に記載の融合タンパク質はさらに、第2のプログラニュリンまたはその変異体（例えば、野生型プログラニュリンまたはプログラニュリン変異体）を含む。Fcポリペプチド二量体中のFcポリペプチドは、改変（例えば、ヘテロ二量体化を促進する1つまたは複数の改変）を含んでもよいし、または野生型Fcポリペプチドであってもよい。一部の実施形態では、Fcポリペプチド二量体中の一方または両方のFcポリペプチドは、BBB受容体、例えば、TfRへの結合をもたらす改変を含んでもよい。Fcポリペプチド二量体中の一方または両方のFcポリペプチドは、TfR結合Fcポリペプチドであってもよい。プログラニュリンまたはプログラニュリン変異体は、N末端またはC末端でFcポリペプチド（例えば、野生型FcポリペプチドまたはTfR結合Fcポリペプチド）に接続してよい。一部の実施形態では、プログラニュリンまたはプログラニュリン変異体は、直接的に（例えば、ペプチド結合を介して）、またはリンカーにより、Fcポリペプチド（例えば、野生型FcポリペプチドまたはTfR結合Fcポリペプチド）に接続してよい。さらなる実施形態では、ヒンジ領域またはその一部が、Fcポリペプチド（例えば、野生型FcポリペプチドまたはTfR結合Fcポリペプチド）のN末端に存在してもよい。ヒンジ領域またはその一部が存在する場合、プログラニュリンまたはプログラニュリン変異体は、直接的に、またはリンカーによりヒンジ領域またはその一部のN末端に接続してよい。

【0126】

神経変性疾患では、プログラニュリンが不足していることがある。FTDで、さらには、ゴーシェ病及びADなどの他の疾患では、プログラニュリンが不足していることがある。融合タンパク質に組み込まれたプログラニュリンまたはプログラニュリン変異体は、ソルチリンまたはプロサポシンに結合し得る（例えば、ソルチリンに結合し得る）。

【0127】

一部の実施形態では、本明細書に記載の融合タンパク質中に存在するプログラニュリンまたはプログラニュリン変異体は、FcポリペプチドまたはTfR結合Fcポリペプチドと接続していない場合のその活性と比較して、その活性の少なくとも25%を維持する。一部の実施形態では、本明細書に記載の融合タンパク質中に存在するプログラニュリンまたはプログラニュリン変異体は、FcポリペプチドまたはTfR結合Fcポリペプチドと接続していない場合のその活性と比較して、その活性の少なくとも10%、または少なくとも15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、もしくは95%（例えば、少なくとも80%、85%、90%、または95%）を維持する。

【0128】

一部の実施形態では、FcポリペプチドまたはTfR結合Fcポリペプチドとの融合は、プログラニュリンまたはプログラニュリン変異体の発現及び／または活性を低下させない。

【0129】

IV. プログラニュリン変異体

野生型プログラニュリンのC末端にアミノ酸改変または付加を有するプログラニュリン変異体を、本明細書において提供する。プログラニュリン変異体は、成熟野生型プログラニュリン（例えば、配列番号2）に対して少なくとも90%の配列同一性（例えば、少なくとも91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%の配列同一性）、ならびに野生型プログラニュリンのC末端にアミノ酸改変または付加

を有する野生型プログラニュリンの機能性変異体である。

【0130】

一部の実施形態では、プログラニュリン変異体は、プログラニュリン変異体のC末端の最後の3つのアミノ酸がQLLではないように、野生型プログラニュリンのC末端に改変を含む。例えば、プログラニュリン変異体は、配列番号2に対して少なくとも90%（例えば、少なくとも91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%）同一である配列を有し得、その際、配列番号2の残基574～576に対応する位置は、 $X_1X_2X_3$ により定義されるアミノ酸配列を有し、ただし、 $X_1X_2X_3$ が合わさってQLLではないことを条件とする。一部の実施形態では、プログラニュリン変異体は配列：

TRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLSRHLGGPCQVDAHCSAGHSCI
FTVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCCPRGFHCSADGRSCFQRSGNNSVGAIQCPDSQF
ECPDFSTCCVMVDGSGCCPMPQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCITPTGTHPL
AKKLPAQRTNRAVALSSVMCPDARSRCPDGSTCCELPSGKYGCCPMPNATCCSDH
LHCCPQDTVCDLIQSKCLSKENATTDLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDGYTCCRL
QSGAWGCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPVHVPWMEKAPAHLSLP
DPQALKRDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGEWGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVA
EGQCQRGSEIVAGLEKMPARRASLSHPRDIGCDQHTSCPVGQTCCPSLGGSWACCQL
PHAVCCEDRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVVSQAQPATFLARSPHVGKDVCEGEG
HFCHDNQTCCRDNRQGWACCPYRQGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRREAPR
WDAPLRDPALRX₁X₂X₃ (配列番号3)

を有し、ここで、 X_1 、 X_2 、及び X_3 のそれぞれは独立にアミノ酸であり、かつ $X_1X_2X_3$ は合わさってQLLではない。ある特定の実施形態では、 X_1 は、R、H、K、D、E、S、T、N、Q、L、F、Y、P、またはVである。ある特定の実施形態では、 X_2 は、H、K、D、E、S、T、N、Q、G、P、A、Y、V、I、F、L、またはRである。ある特定の実施形態では、 X_3 は、L、Y、またはPである。

【0131】

一部の実施形態では、 $X_1X_2X_3$ は、 PX_2L である。ある特定の実施形態では、 PX_2L 中の X_2 は、H、K、D、E、S、T、N、Q、G、P、A、Y、V、I、F、L、またはR（例えば、H、K、D、E、S、T、N、Q、G、P、A、Y、V、I、またはF）であってよい。例えば、プログラニュリン変異体は、配列番号4～18のいずれか1つの配列に対して少なくとも90%（例えば、少なくとも91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%）の同一性または100%の同一性を有する配列を有してよく、その際、プログラニュリン変異体は、C末端にPHL、PKL、PDL、PEL、PSL、PTL、PNL、PQL、PGL、PPL、PAL、PYL、PVL、PIL、またはPFLを有する。特に、プログラニュリン変異体は、配列番号13の配列に対して少なくとも90%（例えば、少なくとも91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%）の同一性または100%の同一性を有する配列を有してよく、その際、プログラニュリン変異体は、C末端にPPLを有する。一部の実施形態では、プログラニュリン変異体は、配列番号13の配列を有する。特に、プログラニュリン変異体は、配列番号15の配列に対して少なくとも90%（例えば、少なくとも91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%）の同一性または100%の同一性を有する配列を有してよく、その際、プログラニュリン変異体は、C末端にPYLを有する。一部の実施形態では、プログラニュリン変異体は、配列番号15の配列を有する。特に、プログラニュリン変異体は、配列番号17の配列に対して少なくとも90%（例えば、少なくとも91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%）の同一性または100%の同一性を有する配列を有してよく、その際、プログラニュリン変異体は、C末端にPILを有する。一部の実施形態では、プログラニュリン変異体は、配列番号17の配列を有す

る。特に、プログラニュリン変異体は、配列番号 18 の配列に対して少なくとも 90 % (例えば、少なくとも 91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、または 99 %) の同一性または 100 % の同一性を有する配列を有してよく、その際、プログラニュリン変異体は C 末端に P F L を有する。一部の実施形態では、プログラニュリン変異体は、配列番号 18 の配列を有する。

【0132】

一部の実施形態では、 $X_1 X_2 X_3$ は $Q X_2 L$ である。ある特定の実施形態では、 $Q X_2 L$ 中の X_2 は、R、H、K、D、E、N、P、Y、または Q であり得る。例えば、プログラニュリン変異体は、配列番号 19 ~ 27 のいずれか 1 つの配列に対して少なくとも 90 % (例えば、少なくとも 91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、または 99 %) の同一性または 100 % の同一性を有する配列を有してよく、その際、プログラニュリン変異体は、C 末端に Q R L、Q H L、Q K L、Q D L、Q E L、Q N L、Q P L、Q Y L、または Q Q L を有する。特に、プログラニュリン変異体は、配列番号 19 の配列に対して少なくとも 90 % (例えば、少なくとも 91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、または 99 %) の同一性または 100 % の同一性を有する配列を有してよく、その際、プログラニュリン変異体は、C 末端に Q R L を有する。一部の実施形態では、プログラニュリン変異体は、配列番号 19 の配列を有する。特に、プログラニュリン変異体は、配列番号 20 の配列に対して少なくとも 90 % (例えば、少なくとも 91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、または 99 %) の同一性または 100 % の同一性を有する配列を有してよく、その際、プログラニュリン変異体は、C 末端に Q H L を有する。一部の実施形態では、プログラニュリン変異体は、配列番号 20 の配列を有する。特に、プログラニュリン変異体は、配列番号 27 の配列に対して少なくとも 90 % (例えば、少なくとも 91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、または 99 %) の同一性または 100 % の同一性を有する配列を有してよく、その際、プログラニュリン変異体は C 末端に Q Q L を有する。一部の実施形態では、プログラニュリン変異体は、配列番号 27 の配列を有する。

【0133】

一部の実施形態では、 $X_1 X_2 X_3$ は、 $V X_2 L$ である。ある特定の実施形態では、 $V X_2 L$ 中の X_2 は、V または T であってよい。例えば、プログラニュリン変異体は、配列番号 28 及び 29 のいずれか 1 つの配列に対して少なくとも 90 % (例えば、少なくとも 91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、または 99 %) の同一性または 100 % の同一性を有する配列を有してよく、その際、プログラニュリン変異体は、C 末端に V V L または V T L を有する。特に、プログラニュリン変異体は、配列番号 28 の配列に対して少なくとも 90 % (例えば、少なくとも 91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、または 99 %) の同一性または 100 % の同一性を有する配列を有してよく、その際、プログラニュリン変異体は、C 末端に V V L を有する。一部の実施形態では、プログラニュリン変異体は、配列番号 28 の配列を有する。特に、プログラニュリン変異体は、配列番号 29 の配列に対して少なくとも 90 % (例えば、少なくとも 91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、または 99 %) の同一性または 100 % の同一性を有する配列を有してよく、その際、プログラニュリン変異体は、C 末端に V T L を有する。一部の実施形態では、プログラニュリン変異体は、配列番号 29 の配列を有する。

【0134】

一部の実施形態では、 $X_1 X_2 X_3$ は、 $X_1 I L$ である。ある特定の実施形態では、 $X_1 I L$ 中の X_1 は、R、H、K、E、P、N、F、または Y (例えば、R、H、K、E、または P) であってよい。例えば、プログラニュリン変異体は、配列番号 30 ~ 33 及び 17 のいずれか 1 つの配列に対して少なくとも 90 % (例えば、少なくとも 91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、または 99 %) の同一性または 100 % の同一性を有する配列を有してよく、その際、プログラニュリン変異体は、C 末

端に R I L、H I L、K I L、E I L、または P I L を有する。

【0135】

一部の実施形態では、 $X_1 X_2 X_3$ は、 $X_1 F L$ である。ある特定の実施形態では、 $X_1 F L$ 中の X_1 は、R、H、K、D、E、S、T、N、Q、L、F、Y、または P であってよい。例えば、プログラニュリン変異体は、配列番号 34～45 及び 18 のいずれか 1 つの配列に対して少なくとも 90%（例えば、少なくとも 91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または 99%）の同一性または 100% の同一性を有する配列を有してよく、その際、プログラニュリン変異体は、C 末端に R F L、H F L、K F L、D F L、E F L、S F L、T F L、N F L、Q F L、L F L、F F L、Y F L、または P F L を有する。

10

【0136】

一部の実施形態では、 $X_1 X_2 X_3$ は、 $X_1 Q L$ である。ある特定の実施形態では、 $X_1 Q L$ 中の X_1 は、R、H、K、D、E、N、L、F、Y、または Q であってよい。例えば、プログラニュリン変異体は、配列番号 46～54 及び 27 のいずれか 1 つの配列に対して少なくとも 90%（例えば、少なくとも 91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または 99%）の同一性または 100% の同一性を有する配列を有してよく、その際、プログラニュリン変異体は、C 末端に R Q L、H Q L、K Q L、D Q L、E Q L、N Q L、L Q L、F Q L、Y Q L、または Q Q L を有する。

【0137】

さらなる実施形態では、 $X_1 X_2 X_3$ は、 $X_1 X_2 L$ であり、その際、 X_2 は、A、R、N、D、C、Q、E、G、H、I、K、M、F、P、S、T、W、Y、または V である。

20

【0138】

他の実施形態では、プログラニュリン変異体は、野生型プログラニュリンと比較して、C 末端に追加のアミノ酸を含む。例えば、プログラニュリン変異体は、野生型プログラニュリンの C 末端に付加されたアミノ酸 Q L L または L R Q L L（配列番号 58）を含んでよい。例えば、プログラニュリン変異体は、配列番号 2 の配列に対して少なくとも 90%（例えば、少なくとも 91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または 99%）の同一性または 100% の同一性を有する配列及び配列番号 2 の残基 576 に対応する位置に隣接しかつその C 末端側にある $Y_1 Y_2 Q L L$ （配列番号 137）により定義される配列を含んでよく、その際、 Y_1 は、L であるか、または存在せず、かつ Y_2 は、R であるか、または存在しない。一部の実施形態では、プログラニュリン変異体は、配列：

30

TRCPDGGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLSRHLGGPCQVDAHCSAGHSCI
FTVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCCPRGFHCSADGRSCFQSRGNNNSVGAIQCPDSQF
ECPDFSTCCVMVDGSGCCPMPQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCITPTGTGTHPL
AKKLPAQRTNRAVALSSVMCPDARSRCPDGSTCCELPSGKYGCCPMPNATCCSDH
LHCCPQDTVCDLIQSKCLSKENATTDLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDGYTCCRL
QSGAWGCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPVWMEKAPAHLSLP
DPQALKRDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGEWGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVA
EGQCQRGSEIVAGLEKMPARRASLSHPRDIGCDQHTSCPVGQTCCPSLGGSWACCQL
PHAVCCEDRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVVSQAQPATFLARSPHVGKDVCEGEG
HFCHDNQTCCRDNRQGWACCPYRQGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRREAPR
WDAPLRDPALRQLLY₁Y₂QLL（配列番号 55）

40

を含む。

【0139】

一部の実施形態では、プログラニュリン変異体は、配列番号 56 の配列に対して少なくとも 90%（例えば、少なくとも 91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または 99%）の同一性または 100% の同一性を有する配列を有してよ

50

く、その際、プログラニュリン変異体は、C末端にアミノ酸Q L L Q L L（配列番号59）を有する。特定の実施形態では、プログラニュリン変異体は、配列番号56の配列を有する。一部の実施形態では、プログラニュリン変異体は、配列番号57の配列に対して少なくとも90%（例えば、少なくとも91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%）の同一性または100%の同一性を有する配列を有してよく、その際、プログラニュリン変異体は、C末端にアミノ酸Q L L L R Q L L（配列番号60）を有する。特定の実施形態では、プログラニュリン変異体は、配列番号57の配列を有する。

【0140】

本明細書に記載のプログラニュリン変異体（例えば、配列番号3～57、111～121、127、及び128のいずれか1つの配列を有するプログラニュリン変異体は、N末端またはC末端でFcポリペプチド（例えば、野生型Fcポリペプチドまたは改変Fcポリペプチド）に接続してよい。一部の実施形態では、Fcポリペプチドに連結しているプログラニュリン変異体は、配列番号13、15、17、18、19、20、及び27～29のいずれか1つから選択される配列を有してよい）。一部の実施形態では、プログラニュリン変異体は、直接的に（例えば、ペプチド結合を介して）、またはリンカーによりFcポリペプチド（例えば、野生型Fcポリペプチドまたは改変Fcポリペプチド）に接続してよい。ヒンジ領域またはその一部がFcポリペプチド（例えば、野生型Fcポリペプチドまたは改変Fcポリペプチド）のN末端に存在するならば、プログラニュリン変異体は、直接的に、またはリンカーによりヒンジ領域またはその一部のN末端に接続してよい。

【0141】

さらに、本明細書に記載のプログラニュリン変異体は、CHO細胞から生成することができる。特定の実施形態では、生成されるプログラニュリン変異体のうちの50%超（例えば、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、または99%超）は、C末端で短縮されていない（例えば、インタクトなまま）。特定の実施形態では、プログラニュリン変異体のうちの50%超（例えば、55%、65%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、または99%超）は、野生型プログラニュリン（例えば、HEK細胞から生成される野生型プログラニュリン）と比べて10倍未満（例えば、9倍、8倍、7倍、6倍、または5倍未満）低下したK_D値で、ソルチリンに結合し得る。例えば、プロテインAクロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性相互作用カラムクロマトグラフィー、及び／または透析を含む精製スキームにより、プログラニュリン変異体を、プログラニュリン変異体発現細胞を含有する細胞培養培地から精製することができる。

【0142】

V. Fcポリペプチド及びその改変

一部の態様では、本明細書に記載の融合タンパク質は、プログラニュリン変異体と、二量体中のいずれか一方または両方のFcポリペプチドが野生型Fcポリペプチドと比べてアミノ酸改変を含有するFcポリペプチド二量体とを含んでよい。一部の実施形態では、Fcポリペプチド（例えば、改変Fcポリペプチド）中のアミノ酸改変は、BBB受容体（例えば、TfR）へのFcポリペプチド二量体の結合をもたらし、二量体中の2つのFcポリペプチドのヘテロ二量体化を促進し、エフェクター機能を調節し、血清半減期を延長し、グリコシル化に影響を及ぼし、及び／またはヒトにおける免疫原性を低下させることができる。一部の実施形態では、融合タンパク質中に存在するFcポリペプチドは独立に、対応する野生型Fcポリペプチド（例えば、ヒトIgG1、IgG2、IgG3、またはIgG4Fcポリペプチド）に対して少なくとも約85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%のアミノ酸配列同一性を有する。改変Fcポリペプチド（例えば、TfR結合Fcポリペプチド）の例及び説明は、例えば、その全体が参照により本明細書に援用される国際特許公開WO2018/152326において見い出すことができる。

10

20

30

40

50

【0143】

BBB受容体結合のためのFcポリペプチド改変

BBBを通過して輸送され得るプログラニュリン変異体を含む融合タンパク質を、本明細書において提供する。そのようなタンパク質は、BBB受容体に結合する改変Fcポリペプチドを含む。BBB受容体は、BBB内皮、さらには他の細胞及び組織種上に発現される。一部の実施形態では、BBB受容体はTfRである。

【0144】

BBB受容体、例えば、TfRに結合する改変Fcポリペプチドに導入されるものを含めて、様々なFc改変において指定されるアミノ酸残基は本明細書では、EUインデックスナンバリングを使用してナンバリングされる。任意のFcポリペプチド、例えば、IgG1、IgG2、IgG3、またはIgG4 Fcポリペプチドは、本明細書に記載のとおり1つまたは複数の位置において改変、例えば、アミノ酸置換を有し得る。一部の実施形態では、BBB（例えば、TfR）受容体結合活性のために改変されるドメインは、IgG1 CH3ドメインなどのヒトIgG CH3ドメインである。CH3ドメインは、任意のIgGサブタイプのもので、すなわち、IgG1、IgG2、IgG3、またはIgG4からのものであってもよい。IgG1抗体の文脈では、CH3ドメインは、EUナンバリングスキームによりナンバリングされた場合におよそ341位からおよそ447位のアミノ酸のセグメントを指す。

【0145】

一部の実施形態では、TfRに特異的に結合する改変Fcポリペプチドは、TfRの頂端ドメインに結合し、かつTfRへのトランスフェリンの結合を遮断する、または別段に阻害することなくTfRに結合し得る。一部の実施形態では、TfRへのトランスフェリンの結合は、実質的に阻害されない。一部の実施形態では、TfRへのトランスフェリンの結合は、約50%未満（例えば、約45%、40%、35%、30%、25%、20%、15%、10%、または5%未満）阻害される。

【0146】

一部の実施形態では、本明細書に記載の融合タンパク質中に存在するBBB（例えば、TfR）受容体結合Fcポリペプチドは、1つもしくは複数、少なくとも1、2、または3つの置換；及び一部の実施形態では、少なくとも4、5、6、7、8、9、または10の置換を、EUナンバリングスキームによる266、267、268、269、270、271、295、297、298、及び299を含むアミノ酸位置を含む。一部の実施形態では、本明細書に記載の融合タンパク質中に存在するBBB（例えば、TfR）受容体結合Fcポリペプチドは、少なくとも1、2、または3つの置換；及び一部の実施形態では、少なくとも4、5、6、7、8、または9つの置換を、EUナンバリングスキームによる274、276、283、285、286、287、288、289、及び290を含むアミノ酸位置を含む。一部の実施形態では、本明細書に記載の融合タンパク質中に存在するBBB（例えば、TfR）受容体結合Fcポリペプチドは、少なくとも1、2、または3つの置換；及び一部の実施形態では、少なくとも4、5、6、7、8、または9つの置換を、EUナンバリングスキームによる272、274、276、322、324、326、329、330、及び331を含むアミノ酸位置を含む。一部の実施形態では、本明細書に記載の融合タンパク質中に存在するBBB（例えば、TfR）受容体結合Fcポリペプチドは、少なくとも1、2、または3つの置換；及び一部の実施形態では、少なくとも4、5、6、または7つの置換を、EUナンバリングスキームによる345、346、347、349、437、438、439、及び440を含むアミノ酸位置を含む。

【0147】

一部の実施形態では、本明細書に記載の融合タンパク質中に存在するBBB（例えば、TfR）受容体結合Fcポリペプチドは、少なくとも1、2、または3つの置換；及び一部の実施形態では、少なくとも4、5、6、7、8、または9つの置換を、EUNANバリングスキームによるアミノ酸位置384、386、387、388、389、390、413、416、及び421に含む。一部の実施形態では、388及び／または421位のアミノ酸は、芳香族アミノ酸、例えば、Trp、Phe、またはTyrである。一部の実施形態では、388位のアミノ酸はTrpである。一部の実施形態では、421位の芳香族アミノ酸は、TrpまたはPheである。追加の実施形態では、BBB（例えば、TfR）受容体結合Fcポリペプチドはさらに、1つまたは複数の置換を、EUNANバリングスキームによる391、392、414、415、424、及び426位を含む位置に含む。一部の実施形態では、414位は、Lys、Arg、Gly、またはProであり；424位は、Ser、Thr、Glu、またはLysであり；及び／または426位は、Ser、Trp、またはGlyである。追加の実施形態では、改変Fcポリペプチドはさらに、1、2、または3つの置換を、EUNANバリングスキームによる414、424、及び426を含む位置に含む。一部の実施形態では、414位は、Lys、Arg、Gly、またはProであり；424位は、Ser、Thr、Glu、またはLysであり；及び／または426位は、Ser、Trp、またはGlyである。

10

【0148】

一部の実施形態では、BBB（例えば、TfR）受容体結合Fcポリペプチドは、配列番号68の配列に対して少なくとも90%（例えば、少なくとも91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%）の同一性または100%の同一性を有し、かつ一部の実施形態では、150位にGlu、154位にTyr、156位にThr、157位にGlu、158位にTrp、159位にAla、160位にAsn、183位にThr、185位にGlu、186位にGlu、及び191位にPheを有し、その際、各位は配列番号68を参照してナンバリングされている。特定の実施形態では、BBB（例えば、TfR）受容体結合Fcポリペプチドは、配列番号68の配列を有する。本明細書に記載の融合タンパク質の一部の実施形態では、Fcポリペプチド二量体中の2つのFcポリペプチドの一方は、配列番号68の配列を有するBBB（例えば、TfR）受容体結合Fcポリペプチドであってよく、Fcポリペプチド二量体中の他方のFcポリペプチドは、野生型Fcポリペプチドの配列（例えば、配列番号61）を有する。本明細書に記載の融合タンパク質の他の実施形態では、Fcポリペプチド二量体中のFcポリペプチドは両方とも、配列番号68の配列を有するBBB（例えば、TfR）受容体結合Fcポリペプチドであってよい。

20

30

【0149】

一部の実施形態では、BBB（例えば、TfR）受容体結合Fcポリペプチドは、配列番号78の配列に対して少なくとも90%（例えば、少なくとも91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%）の同一性または100%の同一性を有し、かつ一部の実施形態では、150位にLeu、154位にTyr、156位にThr、157位にGlu、158位にTrp、159位にSer、160位にSer、183位にThr、185位にGlu、186位にGlu、及び191位にPheを有し、その際、各位は配列番号78を参照してナンバリングされている。特定の実施形態では、BBB（例えば、TfR）受容体結合Fcポリペプチドは、配列番号78の配列を有する。本明細書に記載の融合タンパク質の一部の実施形態では、Fcポリペプチド二量体中の2つのFcポリペプチドの一方は、配列番号78の配列を有するBBB（例えば、TfR）受容体結合Fcポリペプチドであってよく、Fcポリペプチド二量体中の他方のFcポリペプチドは、野生型Fcポリペプチド（例えば、配列番号61）の配列を有してよい。本明細書に記載の融合タンパク質の他の実施形態では、Fcポリペプチド二量体中のFcポリペプチドは両方とも、配列番号78の配列を有するBBB（例えば、TfR）受容体結合Fcポリペプチドであってよい。

40

【0150】

50

ヘテロ二量体化のための F c ポリペプチド改変

一部の実施形態では、融合タンパク質中に存在する F c ポリペプチドは、ヘテロ二量体形成を促進し、かつホモ二量体形成を妨害するノブ及びホール変異を含む。一般に、それらの改変は、突起がキャビティに配置され得、ヘテロ二量体形成を促進し、したがってホモ二量体形成を妨害するように、第 1 のポリペプチドの界面に突起（「ノブ」）を、及び第 2 のポリペプチドの界面に対応するキャビティ（「ホール」）を導入する。第 1 のポリペプチドの界面からの小さなアミノ酸側鎖を、より大きな側鎖（例えば、チロシンまたはトリプトファン）で置き換えることにより、突起は構築される。大きなアミノ酸側鎖を、より小さな側鎖（例えば、アラニンまたはトレオニン）で置き換えることにより、突起と同一または同様のサイズの補償キャビティを第 2 のポリペプチドの界面に作製する。一部の

10

【0151】

二量体化のためのノブ及びホールアプローチの一例示的实施形態では、融合タンパク質中に存在する F c ポリペプチドの一方の 366 位（E U ナンバリングスキームによりナンバリング）が、天然トレオニンの代わりにトリプトファンを含む。二量体中の他方の F c ポリペプチドは、天然チロシンの代わりに、407 位（E U ナンバリングスキームによりナンバリング）にバリンを有する。他方の F c ポリペプチドはさらに、366 位（E U ナンバリングスキームによりナンバリング）の天然トレオニンがセリンで置き換えられていて、かつ 368 位（E U ナンバリングスキームによりナンバリング）の天然ロイシンがアラニンで置き換えられている置換を含んでよい。したがって、本明細書に記載の融合タンパク質の F c ポリペプチドの一方は、T366W ノブ変異を有し、かつ他方の F c ポリペプチドは、典型的には T366S 及び L368A ホール変異を伴う Y407V 変異を有する。

20

【0152】

一部の実施形態では、本明細書に記載の融合タンパク質中に存在する一方または両方の F c ポリペプチドを、ヘテロ二量体化のための他の改変、例えば、天然に荷電されている C H 3 - C H 3 界面内の接触残基の静電操作または疎水性パッチ改変を含むように操作することもできる。

【0153】

例えば、一部の実施形態では、本明細書に記載の融合タンパク質は、T366W ノブ変異及び配列番号 64 の配列に対して少なくとも 90 %（例えば、少なくとも 91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、または 99 %）の同一性または 100 % の同一性を有する一方の F c ポリペプチドと、T366S、L368A、及び Y407V ホール変異及び配列番号 66 の配列に対して少なくとも 90 %（例えば、少なくとも 91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、または 99 %）の同一性または 100 % の同一性を有する他方の F c ポリペプチドとを有する、F c ポリペプチド二量体を含むし得る。ある特定の実施形態では、F c ポリペプチド二量体中の一方または両方の F c ポリペプチドは、T f R 結合 F c ポリペプチドであってよい。特定の実施形態では、本明細書に記載の融合タンパク質は、（i）配列番号 66 の配列に対して少なくとも 90 %（例えば、少なくとも 91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、または 99 %）の同一性または 100 % の同一性を有し、その際、その配列が、配列番号 66 を参照してナンバリングされる位置で、136 位に S e r、138 位に A l a、及び 177 位に V a l を含む第 1 の F c ポリペプチドと、（ii）配列番号 69 の配列に対して少なくとも 90 %（例えば、少なくとも 91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、または 99 %）の同一性または 100 % の同一性を有し、その際、その配列が、配列番号 69 を参照してナンバリングされる位置で、136 位に T r p を含み、かつ一部の実施形態では 150 位に G l u、154 位に T y r、156 位に T h r、157 位に G l u、158 位に T r p、159 位に A l a、160 位に A s n、183 位に T h r、185 位に G l u、186 位に G l u、及び 191

30

40

50

位に P h e を有する第 2 の F c ポリペプチドとを有する F c ポリペプチド二量体を含んでよい。特定の実施形態では、本明細書に記載の融合タンパク質は、(i) 配列番号 6 6 の配列に対して少なくとも 9 0 % (例えば、少なくとも 9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、または 9 9 %) の同一性または 1 0 0 % の同一性を有し、その際、その配列が、配列番号 6 6 を参照してナンバリングされる位置で、1 3 6 位に S e r、1 3 8 位に A l a、及び 1 7 7 位に V a l を含む第 1 の F c ポリペプチドと、(i i) 配列番号 7 9 の配列に対して少なくとも 9 0 % (例えば、少なくとも 9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、または 9 9 %) の同一性または 1 0 0 % の同一性を有し、その際、その配列が、配列番号 7 9 を参照してナンバリングされる位置で、1 3 6 位に T r p を含み、かつ一部の実施形態では、1 5 0 位に L e u、1 5 4 位に T y r、1 5 6 位に T h r、1 5 7 位に G l u、1 5 8 位に T r p、1 5 9 位に S e r、1 6 0 位に S e r、1 8 3 位に T h r、1 8 5 位に G l u、1 8 6 位に G l u、及び 1 9 1 位に P h e を有する第 2 の F c ポリペプチドとを有する F c ポリペプチド二量体を含んでよい。

10

【0154】

特定の実施形態では、本明細書に記載の融合タンパク質は、(i) 配列番号 6 4 の配列に対して少なくとも 9 0 % (例えば、少なくとも 9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、または 9 9 %) の同一性または 1 0 0 % の同一性を有し、その際、その配列が、配列番号 6 4 を参照してナンバリングされる位置で、1 3 6 位に T r p を含む第 1 の F c ポリペプチドと、(i i) 配列番号 7 1 の配列に対して少なくとも 9 0 % (例えば、少なくとも 9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、または 9 9 %) の同一性または 1 0 0 % の同一性を有し、その際、その配列が、配列番号 7 1 を参照してナンバリングされる位置で、1 3 6 位に S e r、1 3 8 位に A l a、及び 1 7 7 位に V a l を含み、かつ一部の実施形態では、1 5 0 位に G l u、1 5 4 位に T y r、1 5 6 位に T h r、1 5 7 位に G l u、1 5 8 位に T r p、1 5 9 位に A l a、1 6 0 位に A s n、1 8 3 位に T h r、1 8 5 位に G l u、1 8 6 位に G l u、及び 1 9 1 位に P h e を有する第 2 の F c ポリペプチドとを含んでよい。特定の実施形態では、本明細書に記載の融合タンパク質は、(i) 配列番号 6 4 の配列に対して少なくとも 9 0 % (例えば、少なくとも 9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、または 9 9 %) の同一性または 1 0 0 % の同一性を有し、その際、その配列が、配列番号 6 4 を参照してナンバリングされる位置で、1 3 6 位に T r p を含む第 1 の F c ポリペプチド二量体と、(i i) 配列番号 8 1 の配列に対して少なくとも 9 0 % (例えば、少なくとも 9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、または 9 9 %) の同一性または 1 0 0 % の同一性を有し、その際、その配列が、配列番号 8 1 を参照してナンバリングされる位置で、1 3 6 位に S e r、1 3 8 位に A l a、及び 1 7 7 位に V a l を含み、かつ一部の実施形態では、1 5 0 位に L e u、1 5 4 位に T y r、1 5 6 位に T h r、1 5 7 位に G l u、1 5 8 位に T r p、1 5 9 位に S e r、1 6 0 位に S e r、1 8 3 位に T h r、1 8 5 位に G l u、1 8 6 位に G l u、及び 1 9 1 位に P h e を有する第 2 の F c ポリペプチドとを含んでよい。

20

30

【0155】

エフェクター機能を調節するための F c ポリペプチド改変

一部の実施形態では、本明細書に記載の融合タンパク質中に存在する一方または両方の F c ポリペプチドは、エフェクター機能を低下させる改変を含んでよく、すなわち、エフェクター機能を媒介するエフェクター細胞上に発現される F c 受容体に結合したときに、ある特定の生物学的機能を誘導する能力が低下している。抗体エフェクター機能の例には、これらに限定されないが、C 1 q 結合及び補体依存性細胞傷害性 (C D C)、F c 受容体結合、抗体依存性細胞媒介細胞傷害性 (A D C C)、抗体依存性細胞媒介性食作用 (A D C P)、細胞表面受容体 (例えば、B 細胞受容体) の下方調節、及び B 細胞活性化が含まれる。エフェクター機能は、抗体クラスで変化し得る。例えば、天然ヒト I g G 1 及び I g G 3 抗体は、免疫系細胞上に存在する適切な F c 受容体に結合すると、A D C C 及び

40

50

C D C 活性を誘発し得；かつ天然ヒト I g G 1、I g G 2、I g G 3、及び I g G 4 は、免疫細胞上に存在する適切な F c 受容体に結合すると、A D C P 機能を誘発し得る。

【0156】

一部の実施形態では、本明細書に記載の融合タンパク質中に存在する一方または両方の F c ポリペプチドは、エフェクター機能を低下させる、または除去する改変を含んでよい。エフェクター機能を低下させる例示的な F c ポリペプチド変異は、これらに限定されないが、C H 2 ドメインにおける、例えば、E U ナンバリングスキームによる 2 3 4 及び 2 3 5 位における置換を含む。例えば、一部の実施形態では、一方または両方の F c ポリペプチドが、2 3 4 及び 2 3 5 位にアラニン残基を含んでよい。したがって、一方または両方の F c ポリペプチドが L 2 3 4 A 及び L 2 3 5 A (L A L A) 置換を有してよい。

10

【0157】

エフェクター機能を調節する追加の F c ポリペプチド変異には、これに限定されないが、次が含まれる：3 2 9 位は、プロリンがグリシンもしくはアルギニン、または F c のプロリン 3 2 9 と F c γ R I I I のトリプトファン残基 T r p 8 7 及び T r p 1 1 0 との間で形成される F c / F c γ 受容体界面を破壊するために十分に大きなアミノ酸残基で置換されている変異を有する。追加の例示的な置換には、E U ナンバリングスキームによる S 2 2 8 P、E 2 3 3 P、L 2 3 5 E、N 2 9 7 A、N 2 9 7 D、及び P 3 3 1 S が含まれる。複数の置換、例えば、E U ナンバリングスキームによる、ヒト I g G 1 F c 領域の L 2 3 4 A 及び L 2 3 5 A；ヒト I g G 1 F c 領域の L 2 3 4 A、L 2 3 5 A、及び P 3 2 9 G；ヒト I g G 4 F c 領域の S 2 2 8 P 及び L 2 3 5 E；ヒト I g G 1 F c 領域の L 2 3 4 A 及び G 2 3 7 A；ヒト I g G 1 F c 領域の L 2 3 4 A、L 2 3 5 A、及び G 2 3 7 A；ヒト I g G 2 F c 領域の V 2 3 4 A 及び G 2 3 7 A；ヒト I g G 4 F c 領域の L 2 3 5 A、G 2 3 7 A、及び E 3 1 8 A；ならびにヒト I g G 4 F c 領域の S 2 2 8 P 及び L 2 3 6 E が存在してもよい。一部の実施形態では、一方または両方の F c ポリペプチドは、A D C C を調節する 1 つまたは複数のアミノ酸置換、例えば、E U ナンバリングスキームによる 2 9 8、3 3 3、及び／または 3 3 4 位に置換を有してよい。

20

【0158】

例えば、一部の実施形態では、本明細書に記載の融合タンパク質は、(i) 配列番号 6 7 の配列に対して少なくとも 9 0 % (例えば、少なくとも 9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、または 9 9 %) の同一性または 1 0 0 % の同一性を有し、その際、その配列が配列番号 6 7 を参照してナンバリングされる位置で、4 位に A l a、5 位に A l a、1 3 6 位に S e r、1 3 8 位に A l a、及び 1 7 7 位に V a l を含む第 1 の F c ポリペプチドと、(i i) 配列番号 7 0 の配列に対して少なくとも 9 0 % (例えば、少なくとも 9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、または 9 9 %) の同一性または 1 0 0 % の同一性を有し、その際、その配列が配列番号 7 0 を参照してナンバリングされる位置で、4 位に A l a、5 位に A l a、1 3 6 位に T r p を含み、かつ一部の実施形態では、1 5 0 位に G l u、1 5 4 位に T y r、1 5 6 位に T h r、1 5 7 位に G l u、1 5 8 位に T r p、1 5 9 位に A l a、1 6 0 位に A s n、1 8 3 位に T h r、1 8 5 位に G l u、1 8 6 位に G l u、及び 1 9 1 位に P h e を有する第 2 の F c ポリペプチドとを有する F c ポリペプチド二量体を含有し得る。一部の実施形態では、本明細書に記載の融合タンパク質は、(i) 配列番号 6 7 の配列に対して少なくとも 9 0 % (例えば、少なくとも 9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、または 9 9 %) の同一性または 1 0 0 % の同一性を有し、その際、その配列が、配列番号 6 7 を参照してナンバリングされる位置で、4 位に A l a、5 位に A l a、1 3 6 位に S e r、1 3 8 位に A l a、及び 1 7 7 位に V a l を含む第 1 の F c ポリペプチドと、(i i) 配列番号 8 0 の配列に対して少なくとも 9 0 % (例えば、少なくとも 9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、または 9 9 %) の同一性または 1 0 0 % の同一性を有し、その際、その配列が、配列番号 8 0 を参照してナンバリングされる位置で、4 位に A l a、5 位に A l a、1 3 6 位に T r p を含み

30

40

50

、かつ一部の実施形態では、150位にLeu、154位にTyr、156位にThr、157位にGlu、158位にTrp、159位にSer、160位にSer、183位にThr、185位にGlu、186位にGlu、及び191位にPheを有する第2のFcポリペプチドとを有するFcポリペプチド二量体を含むし得る。

【0159】

一部の実施形態では、本明細書に記載の融合タンパク質は、(i) 配列番号65の配列に対して少なくとも90% (例えば、少なくとも91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%) の同一性または100%の同一性を有し、その際、その配列が、配列番号65を参照してナンバリングされる位置で、4位にAla、5位にAla、及び136位にTrpを含む第1のFcポリペプチドと、(ii) 配列番号72の配列に対して少なくとも90% (例えば、少なくとも91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%) の同一性または100%の同一性を有し、その際、その配列が、配列番号72を参照してナンバリングされる位置で、4位にAla、5位にAla、136位にSer、138位にAla、及び177位にValを含み、かつ一部の実施形態では、150位にGlu、154位にTyr、156位にThr、157位にGlu、158位にTrp、159位にAla、160位にAsn、183位にThr、185位にGlu、186位にGlu、及び191位にPheを有する第2のFcポリペプチドとを有するFcポリペプチド二量体を含むし得る。一部の実施形態では、本明細書に記載の融合タンパク質は、(i) 配列番号65の配列に対して少なくとも90% (例えば、少なくとも91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%) の同一性または100%の同一性を有し、その際、その配列が配列番号65を参照してナンバリングされる位置で、4位にAla、5位にAla、及び136位にTrpを含む第1のFcポリペプチドと、(ii) 配列番号82の配列に対して少なくとも90% (例えば、少なくとも91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%) の同一性または100%の同一性を有し、その際、その配列が、配列番号82を参照してナンバリングされる位置で、4位にAla、5位にAla、136位にSer、138位にAla、及び177位にValを含み、かつ一部の実施形態では、150位にLeu、154位にTyr、156位にThr、157位にGlu、158位にTrp、159位にSer、160位にSer、183位にThr、185位にGlu、186位にGlu、及び191位にPheを含む第2のFcポリペプチドとを有するFcポリペプチド二量体を含むし得る。

【0160】

血清半減期を延長するためのFcポリペプチド改変

一部の実施形態では、血清半減期を増強する改変を導入してよい。例えば、一部の実施形態では、本明細書に記載の融合タンパク質中に存在する一方または両方のFcポリペプチドは、EUナンバリングスキームによりナンバリングされた場合に、252位にチロシン、254位にトレオニン、及び256位にグルタミン酸を含んでよい。したがって、一方または両方のFcポリペプチドは、M252Y、S254T、及びT256E置換を有してよい。別法では、一方または両方のFcポリペプチドは、EUナンバリングスキームによりナンバリングされた場合に、M428L及びN434S置換を有してよい。別法では、一方または両方のFcポリペプチドは、N434SまたはN434A置換を有してよい。

【0161】

一部の実施形態では、Fcポリペプチドの一方または両方は、その露出C末端リシン (例えば、EUナンバリングによる、Fcポリペプチドの447位のLys残基) を除去されている。C末端リシン残基は、Fcドメインにおいて高度に保存されていて、タンパク質産生の間に、細胞機構により完全に、または部分的に除去され得る。一部の実施形態では、Fcポリペプチド中のC末端リシンの除去は、融合タンパク質の安定性を向上させ得る。

【0162】

10

20

30

40

50

一部の実施形態では、ヒンジ領域（例えば、配列番号 88）またはその一部（例えば、配列番号 89）を、Fc ポリペプチドまたは本明細書に記載の改変 Fc ポリペプチドに接続させることができる。ヒンジ領域は、任意の免疫グロブリンサブクラスまたはアイソタイプからのものであってよい。例示的な免疫グロブリンヒンジは、IgG1 ヒンジ領域、例えば、ヒト IgG1 ヒンジアミノ酸配列 E P K S C D K T H T C P P C P（配列番号 88）またはその一部（例えば、D K T H T C P P C P；配列番号 89）などの IgG ヒンジ領域である。一部の実施形態では、ヒンジ領域は、Fc ポリペプチドの N 末端の領域にある。

【0163】

VI. プログラニュリンと Fc ポリペプチドとの間の連結

一部の実施形態では、Fc ポリペプチドは、リンカー、例えば、ポリペプチドリンカーにより、プログラニュリンまたはプログラニュリン変異体に接続している。一部の実施形態では、Fc ポリペプチドは、ペプチド結合により、またはポリペプチドリンカーによりプログラニュリンまたはプログラニュリン変異体に接続しており、例えば、融合ポリペプチドである。ポリペプチドリンカーは、接続する Fc ポリペプチドに対してプログラニュリンまたはプログラニュリン変異体の回転を許す；及び／またはプロテアーゼによる消化に対する耐性を示すように構成されてよい。ポリペプチドリンカーは、天然アミノ酸、非天然アミノ酸、またはそれらの組合せを含んでよい。一部の実施形態では、ポリペプチドリンカーは、例えば、Gly、Asn、Ser、Thr、Ala などのアミノ酸を含有する柔軟なリンカーであってよい。そのようなリンカーは、既知のパラメーターを使用して設計され、かつ任意の長さであってよく、かつ任意の長さのリピート単位（例えば、Gly 及び Ser 残基のリピート単位）を任意の数で含有してよい。例えば、リンカーは、2、3、4、5、またはそれ以上の Gly₄-Ser（配列番号 90）リピートなどのリピートまたは単一の Gly₄-Ser（配列番号 90）を有してよい。一部の実施形態では、ポリペプチドリンカーは、例えば、中枢神経系中に存在する酵素により切断可能なプロテアーゼ切断部位を含んでよい。一部の実施形態では、ヒンジ領域（例えば、配列番号 88）またはその一部（例えば、配列番号 89）が Fc ポリペプチドの N 末端と接続している場合、プログラニュリンまたはその変異体の C 末端は、ヒンジ領域またはその一部の N 末端に、ペプチド結合により、またはポリペプチドリンカー（例えば、Gly₄-Ser（配列番号 90）リピートまたは単一の Gly₄-Ser（配列番号 90））により接続してよい。

【0164】

一部の実施形態では、プログラニュリンまたはプログラニュリン変異体は、例えば、Gly₄-Ser リンカー（配列番号 90）または（Gly₄-Ser）₂ リンカー（配列番号 91）により、Fc ポリペプチドの N 末端に接続している。一部の実施形態では、Fc ポリペプチドは、ヒンジ配列または一部のヒンジ配列を、リンカーに接続しているか、またはプログラニュリンに直接接続している N 末端に含んでよい。

【0165】

一部の実施形態では、プログラニュリンまたはプログラニュリン変異体は、例えば、Gly₄-Ser リンカー（配列番号 90）または（Gly₄-Ser）₂ リンカー（配列番号 91）により、Fc ポリペプチドの C 末端に接続している。一部の実施形態では、Fc ポリペプチドの C 末端は、プログラニュリンに直接接続している。

【0166】

一部の実施形態では、Fc ポリペプチドとプログラニュリンまたはプログラニュリン変異体との間のポリペプチドリンカーは、3～50、3～25、3～10、3～5、3、5、7、10、25、または 50）アミノ酸を有し得る。適切なポリペプチドリンカーは当技術分野で公知であり（例えば、Chen et al. Adv. Drug Deliv Rev. 65（10）：1357-1369，2013 に記載のとおり）、例えば、グリシン及びセリンなどの柔軟なアミノ酸残基を含有するポリペプチドリンカーを含む。ある特定の実施形態では、ポリペプチドリンカーは、ポリグリシンリンカー、例えば、（Gl

10

20

30

40

50

y)_n (配列番号138)であってよく、ここで、nは、1から10の間の整数である。ある特定の実施形態では、ポリペプチドリンカーは、(GS)_n (配列番号139)、(GGS)_n (配列番号140)、(GGGS)_n (配列番号133)、(GSGS)_n (配列番号134)、または(SGGG)_n (配列番号135)のモチーフ、例えば、複数またはリピートモチーフを含み得、ここで、nは、1から10の間の整数である。他の実施形態では、ポリペプチドリンカーは、グリシン及びセリン以外のアミノ酸、例えば、KESGSVSSEQLAQFRSLD (配列番号94)、EGKSSGSGSESKST (配列番号95)、及びGSAGSAAAGSGEF (配列番号96)も含有し得る。他の実施形態では、ポリペプチドリンカーは、硬いポリペプチドリンカーであってもよい。一部の実施形態では、硬いポリペプチドリンカーは、セグメント内 (intra-segment) 水素結合及び／またはセグメント内塩橋により安定化され得るαヘリックス構造を取り入れることができる。Chen et al. Adv. Drug Deliv. Rev. 65 (10): 1357-1369, 2013に記載されているとおり、硬いポリペプチドリンカーの例には、これらに限定されないが、A(EAAAK)_nA (配列番号136) (ここで、nは、1から5の間の整数である)、及び(XP)_n (配列番号141) (ここで、Xは、Ala、Lys、またはGluであり、かつnは、1から10の間の整数である)が含まれる。

10

20

30

40

50

【0167】

一部の実施形態では、プログラニュリンまたはプログラニュリン変異体は、化学的架橋作用物質によりFcポリペプチドに接続している。そのようなコンジュゲートは、周知の化学的架橋試薬及びプロトコルを用いて生成することができる。例えば、当業者に公知であり、かつポリペプチドを目的の作用物質と架橋するために有用である多数の化学的架橋作用物質がある。例えば、架橋作用物質は、段階的に分子を連結するために使用することができるヘテロ二官能性架橋剤である。ヘテロ二官能性架橋剤は、タンパク質をコンジュゲートするために、より特異的なカップリング方法を設計し、それにより、ホモタンパク質ポリマーなどの望ましくない副反応の発生を減少させる能力を提供する。広範囲の様々なヘテロ二官能性架橋剤が、当技術分野で公知であり、それには、N-ヒドロキシスクシンイミド (NHS) またはその水溶性類似体N-ヒドロキシスルホスクシンイミド (スルホ-NHS)、スクシンイミジル4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシラート (SMCC)、m-マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル (MBS)；N-スクシンイミジル(4-ヨードアセチル)アミノベンゾアート (SIAB)、スクシンイミジル4-(p-マレイミドフェニル)ブチラート (SMPB)、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミドヒドロクロリド (EDC)；4-スクシンイミジルオキシカルボニル-a-メチル-a-(2-ピリジルジチオ)-トールエン (SMPT)、N-スクシンイミジル3-(2-ピリジルジチオ)プロピオナート (SPDP)、及びスクシンイミジル6-[3-(2-ピリジルジチオ)プロピオナート]ヘキサノアート (LC-SPDP)が含まれる。N-ヒドロキシスクシンイミド部分を有する架橋剤は、一般に高い水溶性を有するN-ヒドロキシスルホスクシンイミド類似体として入手することができる。加えて、連結鎖内にジスルフィド架橋を有する架橋剤を、インビボでのリンカー切断の量を減少させるように、代わりにアルキル誘導体として合成することができる。ヘテロ二官能性架橋剤に加えて、ホモ二官能性及び光反応性架橋剤を含む多くの他の架橋剤が存在する。ジスクシンイミジルスベラート (Disuccinimidyl suberate) (DSS)、ビスマレイミドヘキサン (BMH) 及びジメチルピメルイミダート・2HCl (DMP) が、有用なホモ二官能性架橋剤の例であり、かつビス-[B-(4-アジドサリチルアミド)エチル]ジスルフィド (BASED) 及びN-スクシンイミジル-6(4'-アジド-2'-ニトロフェニルアミノ)ヘキサノアート (SANPAH) が、有用な光反応性架橋剤の例である。

【0168】

VII. 例示的な融合タンパク質

一部の態様では、本明細書に記載の融合タンパク質は、プログラニュリン変異体に連結

している第1のFcポリペプチドと；第1のFcポリペプチドとFcポリペプチド二量体を形成する第2のFcポリペプチドとを含む。一部の実施形態では、本明細書に記載の融合タンパク質はさらに、第2のプログラニュリンまたはその変異体（例えば、野生型プログラニュリンまたはプログラニュリン変異体）を含む。一部の実施形態では、第1のFcポリペプチドは、改変Fcポリペプチドであり、かつ／または第2のFcポリペプチドは、改変Fcポリペプチドである。一部の実施形態では、改変Fcポリペプチドは、他方のFcポリペプチドとのそのヘテロ二量体化を促進する1つまたは複数の改変を含む。一部の実施形態では、改変Fcポリペプチドは、エフェクター機能を低下させる1つまたは複数の改変を含む。一部の実施形態では、改変Fcポリペプチドは、血清半減期を延長する1つまたは複数の改変を含む。一部の実施形態では、改変Fcポリペプチドは、BBB受容体、例えば、TfRへの結合を付与する1つまたは複数の改変を含む。

10

【0169】

他の態様では、本明細書に記載の融合タンパク質は、Fcポリペプチドを含む第1のポリペプチド鎖と、BBB（例えば、TfR）受容体に特異的に結合する改変Fcポリペプチド、例えば、TfR結合Fcポリペプチドを含み、第1のポリペプチド鎖中のFcポリペプチドと二量体化してFcポリペプチド二量体を形成する第2のポリペプチド鎖とを含む。一部の実施形態では、融合タンパク質は、第1または第2のポリペプチド鎖のいずれかに接続してよいプログラニュリン変異体を含む。ある特定の実施形態では、プログラニュリン変異体は、ポリペプチドリンカーにより、第1のポリペプチド鎖のN末端またはC末端に接続している。ある特定の実施形態では、プログラニュリン変異体は、ポリペプチドリンカーにより第2のポリペプチド鎖のN末端またはC末端に接続している。

20

【0170】

一部の実施形態では、融合タンパク質は、2つのプログラニュリン変異体を含む。ある特定の実施形態では、第1のプログラニュリン変異体は、第1のポリペプチド鎖のN末端に接続しており、かつ第2のプログラニュリン変異体は、第2のポリペプチド鎖のN末端に接続している。ある特定の実施形態では、第1のプログラニュリン変異体は、第1のポリペプチド鎖のN末端に接続しており、かつ第2のプログラニュリン変異体は、第2のポリペプチド鎖のC末端に接続している。ある特定の実施形態では、第1のプログラニュリン変異体は、第1のポリペプチド鎖のC末端に接続しており、かつ第2のプログラニュリン変異体は、第2のポリペプチド鎖のN末端に接続している。ある特定の実施形態では、第1のプログラニュリン変異体は、第1のポリペプチド鎖のC末端に接続しており、かつ第2のプログラニュリン変異体は、第2のポリペプチド鎖のC末端に接続している。

30

【0171】

一部の実施形態では、融合タンパク質は、プログラニュリン変異体及び野生型プログラニュリンを含む。ある特定の実施形態では、プログラニュリン変異体は、第1のポリペプチド鎖のN末端に接続しており、かつ野生型プログラニュリンは、第2のポリペプチド鎖のN末端に接続している。ある特定の実施形態では、プログラニュリン変異体は、第1のポリペプチド鎖のN末端に接続しており、かつ野生型プログラニュリンは、第2のポリペプチド鎖のC末端に接続している。ある特定の実施形態では、プログラニュリン変異体は、第1のポリペプチド鎖のC末端に接続しており、かつ野生型プログラニュリンは、第2のポリペプチド鎖のN末端に接続している。ある特定の実施形態では、プログラニュリン変異体は、第1のポリペプチド鎖のC末端に接続しており、かつ野生型プログラニュリンは、第2のポリペプチド鎖のC末端に接続している。ある特定の実施形態では、野生型プログラニュリンは、第1のポリペプチド鎖のN末端に接続しており、かつプログラニュリン変異体は、第2のポリペプチド鎖のN末端に接続している。ある特定の実施形態では、野生型プログラニュリンは、第1のポリペプチド鎖のC末端に接続しており、かつプログラニュリン変異体は、第2のポリペプチド鎖のN末端に接続している。ある特定の

40

50

おり、かつプログラニュリン変異体は、第2のポリペプチド鎖のC末端に接続している。

【0172】

一部の実施形態では、本明細書に記載の融合タンパク質のソルチリン結合についてのK_Dは、約100 nM未満（例えば、約95 nM、90 nM、85 nM、80 nM、75 nM、70 nM、65 nM、60 nM、55 nM、50 nM、45 nM、または40 nM未満）である。一部の実施形態では、本明細書に記載の融合タンパク質のソルチリン結合についてのEC50は、約25 nM未満（例えば、約20 nM、15 nM、10 nM、5 nM、4 nM、3 nM、2.5 nM、2 nM、1.5 nM、または1 nM未満）である。特定の実施形態では、融合タンパク質のソルチリン結合についてのEC50は、ソルチリン結合において、第1のポリペプチド中に配列番号2を含む融合タンパク質と比べて、約10倍未満（例えば、約9倍、8倍、7倍、6倍、または5倍未満）の低下を示す。一部の実施形態では、融合タンパク質のソルチリン結合についてのEC50は、ソルチリン結合において、第1のポリペプチド中に配列番号108を含む融合タンパク質と比べて、約10倍未満（例えば、約9倍、8倍、7倍、6倍、または5倍未満）の低下を示す。ある特定の実施形態では、EC50は、ELISAにより測定される。ELISAによりソルチリン結合についてのEC50を測定するための例示的な方法を、本明細書において記載する。

10

【0173】

一部の実施形態では、本明細書に記載の融合タンパク質をCHO細胞において生成する。特定の実施形態では、融合タンパク質（例えば、CHO細胞から生成された融合タンパク質）の50%超（例えば、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、または99%超）は、融合タンパク質のプログラニュリン変異体部分のC末端で切断されない。

20

【0174】

特定の実施形態では、本明細書に記載の融合タンパク質は、(a) T366S、L368A、及びY407V（ホール）置換ならびにL234A及びL235A（LALA）置換を含む改変Fcポリペプチドに接続しているプログラニュリン変異体を含む第1のポリペプチド鎖と；(b) TFRに結合し、かつT366W（ノブ）置換ならびにL234A及びL235A（LALA）置換を含む改変Fcポリペプチドを含む第2のポリペプチド鎖とを含む。プログラニュリン変異体は、配列番号4～54、111～121、及び127～128のいずれか1つの配列に対して少なくとも90%（例えば、少なくとも91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%）の同一性または100%の同一性を有し、その際、プログラニュリン変異体の574～576位が、配列番号4～54、111～121、及び127～128において定義されたとおりである配列を含み得る。一部の実施形態では、プログラニュリン変異体は、配列番号56に対して少なくとも90%（例えば、少なくとも91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%）の同一性または100%の同一性を有し、その際、プログラニュリン変異体の574～579位が配列番号56において定義されているとおりである配列を含み得る。一部の実施形態では、プログラニュリン変異体は、配列番号57に対して少なくとも90%（例えば、少なくとも91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%）の同一性または100%の同一性を有し、その際、プログラニュリン変異体の574～581位が配列番号57において定義されているとおりである配列を含み得る。一部の実施形態では、プログラニュリン変異体は、改変FcポリペプチドのN末端またはC末端（例えば、C末端）に接続してよい。特定の実施形態では、ヒンジ領域またはその一部は、第1及び第2のポリペプチド鎖中の改変FcポリペプチドのそれぞれのN末端に接続している。特定の実施形態では、ポリペプチドリンカー（例えば、GGGGSG（配列番号90）またはGGGGSGGGGS（配列番号91））は、第1のポリペプチド鎖中のプログラニュリン変異体と改変Fcポリペプチドとの間に存在する。

30

40

【0175】

50

一部の実施形態では、本明細書に記載の融合タンパク質は、(a) プログラニュリン変異体及び改変Fcポリペプチドを含み、その際、配列番号98の配列に対して少なくとも90% (例えば、少なくとも95%、98%、または99%) の同一性または100%の同一性を有する配列を含み、その配列が、配列番号98を参照してナンバリングされる位置で、14位にAla、15位にAla、146位にSer、148位にAla、187位にVal、811位にPro、812位にIle、及び813位にLeuを含む第1のポリペプチド鎖と、(b) 配列番号75の配列に対して少なくとも90% (例えば、少なくとも95%、98%、または99%) の同一性または100%の同一性を有する配列を含み、その際、その配列が、配列番号75を参照してナンバリングされる位置で、14位にAla、15位にAla、146位にTrp、160位にGlu、164位にTyr、166位にThr、167位にGlu、168位にTrp、169位にAla、170位にAsn、193位にThr、195位にGlu、196位にGlu、及び201位にPheを含む第2のポリペプチド鎖とを含む。一部の実施形態では、第1のポリペプチド鎖は配列番号98の配列を含み、かつ第2のポリペプチド鎖は配列番号75の配列を含む。一部の実施形態では、第1のポリペプチド鎖は配列番号98の配列を含み、かつ第2のポリペプチド鎖は配列番号130の配列を含む。

10

【0176】

一部の実施形態では、本明細書に記載の融合タンパク質は、(a) プログラニュリン変異体及び改変Fcポリペプチドを含み、その際、配列番号99の配列に対して少なくとも90% (例えば、少なくとも95%、98%、または99%) の同一性または100%の同一性を有する配列を含み、その配列が、配列番号99を参照してナンバリングされる位置で、14位にAla、15位にAla、146位にSer、148位にAla、187位にVal、811位にPro、812位にPhe、及び813位にLeuを含む第1のポリペプチド鎖と、(b) 配列番号75の配列に対して少なくとも90% (例えば、少なくとも95%、98%、または99%) の同一性または100%の同一性を有する配列を含み、その際、その配列が、配列番号75を参照してナンバリングされる位置で、14位にAla、15位にAla、146位にTrp、160位にGlu、164位にTyr、166位にThr、167位にGlu、168位にTrp、169位にAla、170位にAsn、193位にThr、195位にGlu、196位にGlu、及び201位にPheを含む第2のポリペプチド鎖とを含む。一部の実施形態では、第1のポリペプチド鎖は配列番号99の配列を含み、かつ第2のポリペプチド鎖は配列番号75の配列を含む。一部の実施形態では、第1のポリペプチド鎖は配列番号99の配列を含み、かつ第2のポリペプチド鎖は配列番号130の配列を含む。

20

30

【0177】

一部の実施形態では、本明細書に記載の融合タンパク質は、(a) プログラニュリン変異体及び改変Fcポリペプチドを含み、その際、配列番号100の配列に対して少なくとも90% (例えば、少なくとも95%、98%、または99%) の同一性または100%の同一性を有する配列を含み、その配列が、配列番号100を参照してナンバリングされる位置で、14位にAla、15位にAla、146位にSer、148位にAla、187位にVal、811位にGln、812位にGln、及び813位にLeuを含む第1のポリペプチド鎖と、(b) 配列番号75の配列に対して少なくとも90% (例えば、少なくとも95%、98%、または99%) の同一性または100%の同一性を有する配列を含み、その際、その配列が、配列番号75を参照してナンバリングされる位置で、14位にAla、15位にAla、146位にTrp、160位にGlu、164位にTyr、166位にThr、167位にGlu、168位にTrp、169位にAla、170位にAsn、193位にThr、195位にGlu、196位にGlu、及び201位にPheを含む第2のポリペプチド鎖とを含む。一部の実施形態では、第1のポリペプチド鎖は、配列番号100の配列を含み、かつ第2のポリペプチド鎖は、配列番号75の配列を含む。一部の実施形態では、第1のポリペプチド鎖は、配列番号100の配列を含み、かつ第2のポリペプチド鎖は、配列番号130の配列を含む。

40

50

【0178】

一部の実施形態では、本明細書に記載の融合タンパク質は、(a) プログラニュリン変異体及び改変Fcポリペプチドを含み、その際、配列番号101の配列に対して少なくとも90%（例えば、少なくとも95%、98%、または99%）の同一性または100%の同一性を有する配列を含み、その配列が、配列番号101を参照してナンバリングされる位置で、14位にAla、15位にAla、146位にSer、148位にAla、187位にVal、811位にVal、812位にVal、及び813位にLeuを含む第1のポリペプチド鎖と、(b) 配列番号75の配列に対して少なくとも90%（例えば、少なくとも95%、98%、または99%）の同一性または100%の同一性を有する配列を含み、その際、その配列が、配列番号75を参照してナンバリングされる位置で、14位にAla、15位にAla、146位にTrp、160位にGlu、164位にTyr、166位にThr、167位にGlu、168位にTrp、169位にAla、170位にAsn、193位にThr、195位にGlu、196位にGlu、及び201位にPheを含む第2のポリペプチド鎖とを含む。一部の実施形態では、第1のポリペプチド鎖は、配列番号101の配列を含み、かつ第2のポリペプチド鎖は、配列番号75の配列を含む。一部の実施形態では、第1のポリペプチド鎖は、配列番号101の配列を含み、かつ第2のポリペプチド鎖は、配列番号130の配列を含む。

10

【0179】

一部の実施形態では、本明細書に記載の融合タンパク質は、(a) プログラニュリン変異体及び改変Fcポリペプチドを含み、その際、配列番号102の配列に対して少なくとも90%（例えば、少なくとも95%、98%、または99%）の同一性または100%の同一性を有する配列を含み、その配列が、配列番号102を参照してナンバリングされる位置で、14位にAla、15位にAla、146位にSer、148位にAla、187位にVal、811位にVal、812位にThr、及び813位にLeuを含む第1のポリペプチド鎖と、(b) 配列番号75の配列に対して少なくとも90%（例えば、少なくとも95%、98%、または99%）の同一性または100%の同一性を有する配列を含み、その際、その配列が、配列番号75を参照してナンバリングされる位置で、14位にAla、15位にAla、146位にTrp、160位にGlu、164位にTyr、166位にThr、167位にGlu、168位にTrp、169位にAla、170位にAsn、193位にThr、195位にGlu、196位にGlu、及び201位にPheを含む第2のポリペプチド鎖とを含む。一部の実施形態では、第1のポリペプチド鎖は、配列番号102の配列を含み、かつ第2のポリペプチド鎖は、配列番号75の配列を含む。一部の実施形態では、第1のポリペプチド鎖は、配列番号102の配列を含み、かつ第2のポリペプチド鎖は、配列番号130の配列を含む。

20

30

【0180】

一部の実施形態では、本明細書に記載の融合タンパク質は、(a) プログラニュリン変異体及び改変Fcポリペプチドを含み、その際、配列番号123の配列に対して少なくとも90%（例えば、少なくとも95%、98%、または99%）の同一性または100%の同一性を有する配列を含み、その配列が、配列番号123を参照してナンバリングされる位置で、14位にAla、15位にAla、146位にSer、148位にAla、187位にVal、811位にPro、812位にPro、及び813位にLeuを含む第1のポリペプチド鎖と、(b) 配列番号75の配列に対して少なくとも90%（例えば、少なくとも95%、98%、または99%）の同一性または100%の同一性を有する配列を含み、その際、その配列が、配列番号75を参照してナンバリングされる位置で、14位にAla、15位にAla、146位にTrp、160位にGlu、164位にTyr、166位にThr、167位にGlu、168位にTrp、169位にAla、170位にAsn、193位にThr、195位にGlu、196位にGlu、及び201位にPheを含む第2のポリペプチド鎖とを含む。一部の実施形態では、第1のポリペプチド鎖は、配列番号123の配列を含み、かつ第2のポリペプチド鎖は、配列番号75の配列を含む。一部の実施形態では、第1のポリペプチド鎖は、配列番号123の配列を含み

40

50

、かつ第2のポリペプチド鎖は、配列番号130の配列を含む。

【0181】

一部の実施形態では、本明細書に記載の融合タンパク質は、(a) プログラニュリン変異体及び改変Fcポリペプチドを含み、その際、配列番号124の配列に対して少なくとも90%（例えば、少なくとも95%、98%、または99%）の同一性または100%の同一性を有する配列を含み、その配列が、配列番号124を参照してナンバリングされる位置で、14位にAla、15位にAla、146位にSer、148位にAla、187位にVal、811位にPro、812位にTyr、及び813位にLeuを含む第1のポリペプチド鎖と、(b) 配列番号75の配列に対して少なくとも90%（例えば、少なくとも95%、98%、または99%）の同一性または100%の同一性を有する配列を含み、その際、その配列が、配列番号75を参照してナンバリングされる位置で、14位にAla、15位にAla、146位にTrp、160位にGlu、164位にTyr、166位にThr、167位にGlu、168位にTrp、169位にAla、170位にAsn、193位にThr、195位にGlu、196位にGlu、及び201位にPheを含む第2のポリペプチド鎖とを含む。一部の実施形態では、第1のポリペプチド鎖は、配列番号124の配列を含み、かつ第2のポリペプチド鎖は、配列番号75の配列を含む。一部の実施形態では、第1のポリペプチド鎖は、配列番号124の配列を含み、かつ第2のポリペプチド鎖は、配列番号130の配列を含む。

10

【0182】

一部の実施形態では、本明細書に記載の融合タンパク質は、(a) プログラニュリン変異体及び改変Fcポリペプチドを含み、その際、配列番号125の配列に対して少なくとも90%（例えば、少なくとも95%、98%、または99%）の同一性または100%の同一性を有する配列を含み、その配列が、配列番号125を参照してナンバリングされる位置で、14位にAla、15位にAla、146位にSer、148位にAla、187位にVal、811位にGln、812位にArg、及び813位にLeuを含む第1のポリペプチド鎖と、(b) 配列番号75の配列に対して少なくとも90%（例えば、少なくとも95%、98%、または99%）の同一性または100%の同一性を有する配列を含み、その際、その配列が、配列番号75を参照してナンバリングされる位置で、14位にAla、15位にAla、146位にTrp、160位にGlu、164位にTyr、166位にThr、167位にGlu、168位にTrp、169位にAla、170位にAsn、193位にThr、195位にGlu、196位にGlu、及び201位にPheを含む配列を含む第2のポリペプチド鎖とを含む。一部の実施形態では、第1のポリペプチド鎖は、配列番号125の配列を含み、かつ第2のポリペプチド鎖は、配列番号75の配列を含む。一部の実施形態では、第1のポリペプチド鎖は、配列番号125の配列を含み、かつ第2のポリペプチド鎖は、配列番号130の配列を含む。

20

30

【0183】

一部の実施形態では、本明細書に記載の融合タンパク質は、(a) プログラニュリン変異体及び改変Fcポリペプチドを含み、その際、配列番号126の配列に対して少なくとも90%（例えば、少なくとも95%、98%、または99%）の同一性または100%の同一性を有する配列を含み、その配列が、配列番号126を参照してナンバリングされる位置で、14位にAla、15位にAla、146位にSer、148位にAla、187位にVal、811位にGln、812位にHis、及び813位にLeuを含む第1のポリペプチド鎖と、(b) 配列番号75の配列に対して少なくとも90%（例えば、少なくとも95%、98%、または99%）の同一性または100%の同一性を有する配列を含み、その際、その配列が、配列番号75を参照してナンバリングされる位置で、14位にAla、15位にAla、146位にTrp、160位にGlu、164位にTyr、166位にThr、167位にGlu、168位にTrp、169位にAla、170位にAsn、193位にThr、195位にGlu、196位にGlu、及び201位にPheを含む第2のポリペプチド鎖とを含む。一部の実施形態では、第1のポリペプチド鎖は、配列番号126の配列を含み、かつ第2のポリペプチド鎖は、配列番号75の配

40

50

列を含む。一部の実施形態では、第1のポリペプチド鎖は、配列番号126の配列を含み、かつ第2のポリペプチド鎖は、配列番号130の配列を含む。

【0184】

一部の実施形態では、本明細書に記載の融合タンパク質は、(a) プログラニュリン変異体及び改変Fcポリペプチドを含み、その際、配列番号98の配列に対して少なくとも90%（例えば、少なくとも95%、98%、または99%）の同一性または100%の同一性を有する配列を含み、その配列が、配列番号98を参照してナンバリングされる位置で、14位にAla、15位にAla、146位にSer、148位にAla、187位にVal、811位にPro、812位にIle、及び813位にLeuを含む第1のポリペプチド鎖と、(b) 配列番号85の配列に対して少なくとも90%の同一性（例えば、少なくとも95%、98%、または99%の同一性）を有する配列を含み、その際、その配列が、配列番号85を参照してナンバリングされる位置で、14位にAla、15位にAla、146位にTrp、160位にLeu、164位にTyr、166位にThr、167位にGlu、168位にTrp、169位にSer、170位にSer、193位にThr、195位にGlu、196位にGlu、及び201位にPheを含む第2のポリペプチド鎖とを含む。一部の実施形態では、第1のポリペプチド鎖は、配列番号98の配列を含み、かつ第2のポリペプチド鎖は、配列番号85の配列を含む。一部の実施形態では、第1のポリペプチド鎖は、配列番号98の配列を含み、かつ第2のポリペプチド鎖は、配列番号132の配列を含む。

10

【0185】

一部の実施形態では、本明細書に記載の融合タンパク質は、(a) プログラニュリン変異体及び改変Fcポリペプチドを含み、その際、配列番号99の配列に対して少なくとも90%（例えば、少なくとも95%、98%、または99%）の同一性または100%の同一性を有する配列を含み、その配列が、配列番号99を参照してナンバリングされる位置で、14位にAla、15位にAla、146位にSer、148位にAla、187位にVal、811位にPro、812位にPhe、及び813位にLeuを含む第1のポリペプチド鎖と、(b) 配列番号85の配列に対して少なくとも90%（例えば、少なくとも95%、98%、または99%）の同一性または100%の同一性を有する配列を含み、その際、その配列が、配列番号85を参照してナンバリングされる位置で、14位にAla、15位にAla、146位にTrp、160位にLeu、164位にTyr、166位にThr、167位にGlu、168位にTrp、169位にSer、170位にSer、193位にThr、195位にGlu、196位にGlu、及び201位にPheを含む第2のポリペプチド鎖とを含む。一部の実施形態では、第1のポリペプチド鎖は、配列番号99の配列を含み、かつ第2のポリペプチド鎖は、配列番号85の配列を含む。一部の実施形態では、第1のポリペプチド鎖は、配列番号99の配列を含み、かつ第2のポリペプチド鎖は、配列番号132の配列を含む。

20

30

【0186】

一部の実施形態では、本明細書に記載の融合タンパク質は、(a) プログラニュリン変異体及び改変Fcポリペプチドを含み、その際、配列番号100の配列に対して少なくとも90%（例えば、少なくとも95%、98%、または99%）の同一性または100%の同一性を有する配列を含み、その配列が、配列番号100を参照してナンバリングされる位置で、14位にAla、15位にAla、146位にSer、148位にAla、187位にVal、811位にGln、812位にGln、及び813位にLeuを含む第1のポリペプチド鎖と、(b) 配列番号85の配列に対して少なくとも90%（例えば、少なくとも95%、98%、または99%）の同一性または100%の同一性を有する配列を含み、その際、その配列が、配列番号85を参照してナンバリングされる位置で、14位にAla、15位にAla、146位にTrp、160位にLeu、164位にTyr、166位にThr、167位にGlu、168位にTrp、169位にSer、170位にSer、193位にThr、195位にGlu、196位にGlu、及び201位にPheを含む第2のポリペプチド鎖とを含む。一部の実施形態では、第1のポリペプチ

40

50

ド鎖は、配列番号 100 の配列を含み、かつ第 2 のポリペプチド鎖は、配列番号 85 の配列を含む。一部の実施形態では、第 1 のポリペプチド鎖は、配列番号 100 の配列を含み、かつ第 2 のポリペプチド鎖は、配列番号 132 の配列を含む。

【0187】

一部の実施形態では、本明細書に記載の融合タンパク質は、(a) プログラニュリン変異体及び改変 Fc ポリペプチドを含み、その際、配列番号 101 の配列に対して少なくとも 90 % (例えば、少なくとも 95 %、98 %、または 99 %) の同一性または 100 % の同一性を有する配列を含み、その配列が、配列番号 101 を参照してナンバリングされる位置で、14 位に A l a、15 位に A l a、146 位に S e r、148 位に A l a、187 位に V a l、811 位に V a l、812 位に V a l、及び 813 位に L e u を含む第 1 のポリペプチド鎖と、(b) 配列番号 85 の配列に対して少なくとも 90 % (例えば、少なくとも 95 %、98 %、または 99 %) の同一性または 100 % の同一性を有する配列を含み、その際、その配列が、配列番号 85 を参照してナンバリングされる位置で、14 位に A l a、15 位に A l a、146 位に T r p、160 位に L e u、164 位に T y r、166 位に T h r、167 位に G l u、168 位に T r p、169 位に S e r、170 位に S e r、193 位に T h r、195 位に G l u、196 位に G l u、及び 201 位に P h e を含む第 2 のポリペプチド鎖とを含む。一部の実施形態では、第 1 のポリペプチド鎖は、配列番号 101 の配列を含み、かつ第 2 のポリペプチド鎖は、配列番号 85 の配列を含む。一部の実施形態では、第 1 のポリペプチド鎖は、配列番号 101 の配列を含み、かつ第 2 のポリペプチド鎖は、配列番号 132 の配列を含む。

10

20

【0188】

一部の実施形態では、本明細書に記載の融合タンパク質は、(a) プログラニュリン変異体及び改変 Fc ポリペプチドを含み、その際、配列番号 102 の配列に対して少なくとも 90 % (例えば、少なくとも 95 %、98 %、または 99 %) の同一性または 100 % の同一性を有する配列を含み、その配列が、配列番号 102 を参照してナンバリングされる位置で、14 位に A l a、15 位に A l a、146 位に S e r、148 位に A l a、187 位に V a l、811 位に V a l、812 位に T h r、及び 813 位に L e u を含む第 1 のポリペプチド鎖と、(b) 配列番号 85 の配列に対して少なくとも 90 % (例えば、少なくとも 95 %、98 %、または 99 %) の同一性または 100 % の同一性を有する配列を含み、その際、その配列が、配列番号 85 を参照してナンバリングされる位置で、14 位に A l a、15 位に A l a、146 位に T r p、160 位に L e u、164 位に T y r、166 位に T h r、167 位に G l u、168 位に T r p、169 位に S e r、170 位に S e r、193 位に T h r、195 位に G l u、196 位に G l u、及び 201 位に P h e を含む第 2 のポリペプチド鎖とを含む。一部の実施形態では、第 1 のポリペプチド鎖は、配列番号 102 の配列を含み、かつ第 2 のポリペプチド鎖は、配列番号 85 の配列を含む。一部の実施形態では、第 1 のポリペプチド鎖は、配列番号 102 の配列を含み、かつ第 2 のポリペプチド鎖は、配列番号 132 の配列を含む。

30

【0189】

特定の実施形態では、本明細書に記載の融合タンパク質は、(a) T f R に結合し、かつ T 3 6 6 S、L 3 6 8 A、及び Y 4 0 7 V (ホール) 置換ならびに L 2 3 4 A 及び L 2 3 5 A (L A L A) 置換を含む改変 Fc ポリペプチドを含む第 1 のポリペプチド鎖と；(b) T 3 6 6 W (ノブ) 置換ならびに L 2 3 4 A 及び L 2 3 5 A (L A L A) 置換を含む改変 Fc ポリペプチドに接続しているプログラニュリン変異体を含む第 2 のポリペプチド鎖とを含む。プログラニュリン変異体は、配列番号 3 ~ 57、111 ~ 121、及び 127 ~ 128 のいずれか 1 つの配列に対して少なくとも 90 % (例えば、少なくとも 95 %、98 %、または 99 %) の同一性または 100 % の同一性を有する配列を有し得る。一部の実施形態では、プログラニュリン変異体は、改変 Fc ポリペプチドの N 末端または C 末端 (例えば、C 末端) に接続してよい。特定の実施形態では、ヒンジ領域またはその一部は、第 1 及び第 2 のポリペプチド鎖中の改変 Fc ポリペプチドのそれぞれの N 末端に接続している。特定の実施形態では、ポリペプチドリンカー (例えば、G G G G S (配

40

50

列番号 90) または G G G G S G G G G S (配列番号 91)) が、第 2 のポリペプチド鎖中のプログラニユリン変異体と改変 F c ポリペプチドとの間に存在する。

【0190】

一部の実施形態では、本明細書に記載の融合タンパク質は、(a) 配列番号 77 の配列に対して少なくとも 90% (例えば、少なくとも 95%、98%、または 99%) の同一性または 100% の同一性を有する配列を含み、その際、その配列が、配列番号 77 を参照してナンバリングされる位置で、14 位に A l a、15 位に A l a、146 位に S e r、148 位に A l a、160 位に G l u、164 位に T y r、166 位に T h r、167 位に G l u、168 位に T r p、169 位に A l a、170 位に A s n、187 位に V a l、193 位に T h r、195 位に G l u、196 位に G l u、及び 201 位に P h e を含む第 1 のポリペプチド鎖と、(b) プログラニユリン変異体及び改変 F c ポリペプチドを含み、その際、配列番号 103 の配列に対して少なくとも 90% (例えば、少なくとも 95%、98%、または 99%) の同一性または 100% の同一性を有する配列を含み、その配列が、配列番号 103 を参照してナンバリングされる位置で、14 位に A l a、15 位に A l a、146 位に T r p、811 位に P r o、812 位に I l e、及び 813 位に L e u を含む第 2 のポリペプチド鎖とを含む。

10

【0191】

一部の実施形態では、本明細書に記載の融合タンパク質は、(a) 配列番号 77 の配列に対して少なくとも 90% (例えば、少なくとも 95%、98%、または 99%) の同一性または 100% の同一性を有する配列を含み、その際、その配列が、配列番号 77 を参照してナンバリングされる位置で、14 位に A l a、15 位に A l a、146 位に S e r、148 位に A l a、160 位に G l u、164 位に T y r、166 位に T h r、167 位に G l u、168 位に T r p、169 位に A l a、170 位に A s n、187 位に V a l、193 位に T h r、195 位に G l u、196 位に G l u、及び 201 位に P h e を含む第 1 のポリペプチド鎖と、(b) プログラニユリン変異体及び改変 F c ポリペプチドを含み、その際、配列番号 104 の配列に対して少なくとも 90% (例えば、少なくとも 95%、98%、または 99%) の同一性または 100% の同一性を有する配列を含み、その配列が、配列番号 104 を参照してナンバリングされる位置で、14 位に A l a、15 位に A l a、146 位に T r p、811 位に P r o、812 位に P h e、及び 813 位に L e u を含む第 2 のポリペプチド鎖とを含む。

20

30

【0192】

一部の実施形態では、本明細書に記載の融合タンパク質は、(a) 配列番号 77 の配列に対して少なくとも 90% (例えば、少なくとも 95%、98%、または 99%) の同一性または 100% の同一性を有する配列を含み、その際、その配列が、配列番号 77 を参照してナンバリングされる位置で、14 位に A l a、15 位に A l a、146 位に S e r、148 位に A l a、160 位に G l u、164 位に T y r、166 位に T h r、167 位に G l u、168 位に T r p、169 位に A l a、170 位に A s n、187 位に V a l、193 位に T h r、195 位に G l u、196 位に G l u、及び 201 位に P h e を含む第 1 のポリペプチド鎖と、(b) プログラニユリン変異体及び改変 F c ポリペプチドを含み、その際、配列番号 105 の配列に対して少なくとも 90% (例えば、少なくとも 95%、98%、または 99%) の同一性または 100% の同一性を有する配列を含み、その配列が、配列番号 105 を参照してナンバリングされる位置で、14 位に A l a、15 位に A l a、146 位に T r p、811 位に G l n、812 位に G l n、及び 813 位に L e u を含む第 2 のポリペプチド鎖とを含む。

40

【0193】

一部の実施形態では、本明細書に記載の融合タンパク質は、(a) 配列番号 77 の配列に対して少なくとも 90% (例えば、少なくとも 95%、98%、または 99%) の同一性または 100% の同一性を有する配列を含み、その際、その配列が、配列番号 77 を参照してナンバリングされる位置で、14 位に A l a、15 位に A l a、146 位に S e r、148 位に A l a、160 位に G l u、164 位に T y r、166 位に T h r、167

50

位に G l u、168 位に T r p、169 位に A l a、170 位に A s n、187 位に V a l、193 位に T h r、195 位に G l u、196 位に G l u、及び 201 位に P h e を含む第 1 のポリペプチド鎖と、(b) プログラニュリン変異体及び改変 F c ポリペプチドを含み、その際、配列番号 106 の配列に対して少なくとも 90 % (例えば、少なくとも 95 %、98 %、または 99 %) の同一性または 100 % の同一性を有する配列を含み、その配列が、配列番号 106 を参照してナンバリングされる位置で、14 位に A l a、15 位に A l a、146 位に T r p、811 位に V a l、812 位に V a l、及び 813 位に L e u を含む第 2 のポリペプチド鎖とを含む。

【0194】

一部の実施形態では、本明細書に記載の融合タンパク質は、(a) 配列番号 77 の配列に対して少なくとも 90 % (例えば、少なくとも 95 %、98 %、または 99 %) の同一性または 100 % の同一性を有する配列を含み、その際、その配列が、配列番号 77 を参照してナンバリングされる位置で、14 位に A l a、15 位に A l a、146 位に S e r、148 位に A l a、160 位に G l u、164 位に T y r、166 位に T h r、167 位に G l u、168 位に T r p、169 位に A l a、170 位に A s n、187 位に V a l、193 位に T h r、195 位に G l u、196 位に G l u、及び 201 位に P h e を含む第 1 のポリペプチド鎖と、(b) プログラニュリン変異体及び改変 F c ポリペプチドを含み、その際、配列番号 107 の配列に対して少なくとも 90 % (例えば、少なくとも 95 %、98 %、または 99 %) の同一性または 100 % の同一性を有する配列を含み、その配列が、配列番号 107 を参照してナンバリングされる位置で、14 位に A l a、15 位に A l a、146 位に T r p、811 位に V a l、812 位に T h r、及び 813 位に L e u を含む第 2 のポリペプチド鎖とを含む。

【0195】

一部の実施形態では、本明細書に記載の融合タンパク質は、(a) 配列番号 87 の配列に対して少なくとも 90 % (例えば、少なくとも 95 %、98 %、または 99 %) の同一性または 100 % の同一性を有する配列を含み、その際、その配列が、配列番号 87 を参照してナンバリングされる位置で、14 位に A l a、15 位に A l a、146 位に S e r、148 位に A l a、160 位に L e u、164 位に T y r、166 位に T h r、167 位に G l u、168 位に T r p、169 位に S e r、170 位に S e r、187 位に V a l、193 位に T h r、195 位に G l u、196 位に G l u、及び 201 位に P h e を含む第 1 のポリペプチド鎖と、(b) プログラニュリン変異体及び改変 F c ポリペプチドを含み、その際、配列番号 103 の配列に対して少なくとも 90 % (例えば、少なくとも 95 %、98 %、または 99 %) の同一性または 100 % の同一性を有する配列を含み、その配列が、配列番号 103 を参照してナンバリングされる位置で、14 位に A l a、15 位に A l a、146 位に T r p、811 位に P r o、812 位に I l e、及び 813 位に L e u を含む第 2 のポリペプチド鎖とを含む。

【0196】

一部の実施形態では、本明細書に記載の融合タンパク質は、(a) 配列番号 87 の配列に対して少なくとも 90 % (例えば、少なくとも 95 %、98 %、または 99 %) の同一性または 100 % の同一性を有する配列を含み、その際、その配列が、配列番号 87 を参照してナンバリングされる位置で、14 位に A l a、15 位に A l a、146 位に S e r、148 位に A l a、160 位に L e u、164 位に T y r、166 位に T h r、167 位に G l u、168 位に T r p、169 位に S e r、170 位に S e r、187 位に V a l、193 位に T h r、195 位に G l u、196 位に G l u、及び 201 位に P h e を含む第 1 のポリペプチド鎖と、(b) プログラニュリン変異体及び改変 F c ポリペプチドを含み、その際、配列番号 104 の配列に対して少なくとも 90 % (例えば、少なくとも 95 %、98 %、または 99 %) の同一性または 100 % の同一性を有する配列を含み、その配列が、配列番号 104 を参照してナンバリングされる位置で、14 位に A l a、15 位に A l a、146 位に T r p、811 位に P r o、812 位に P h e、及び 813 位に L e u を含む第 2 のポリペプチド鎖とを含む。

【0197】

一部の実施形態では、本明細書に記載の融合タンパク質は、(a) 配列番号87の配列に対して少なくとも90% (例えば、少なくとも95%、98%、または99%) の同一性または100%の同一性を有する配列を含み、その際、その配列が、配列番号87を参照してナンバリングされる位置で、14位にA l a、15位にA l a、146位にS e r、148位にA l a、160位にL e u、164位にT y r、166位にT h r、167位にG l u、168位にT r p、169位にS e r、170位にS e r、187位にV a l、193位にT h r、195位にG l u、196位にG l u、及び201位にP h eを含む第1のポリペプチド鎖と、(b) プログラニュリン変異体及び改変Fcポリペプチドを含み、その際、配列番号105の配列に対して少なくとも90% (例えば、少なくとも95%、98%、または99%) の同一性または100%の同一性を有する配列を含み、その配列が、配列番号105を参照してナンバリングされる位置で、14位にA l a、15位にA l a、146位にT r p、811位にG l n、812位にG l n、及び813位にL e uを含む第2のポリペプチド鎖とを含む。

10

【0198】

一部の実施形態では、本明細書に記載の融合タンパク質は、(a) 配列番号87の配列に対して少なくとも90% (例えば、少なくとも95%、98%、または99%) の同一性または100%の同一性を有する配列を含み、その際、その配列が、配列番号87を参照してナンバリングされる位置で、14位にA l a、15位にA l a、146位にS e r、148位にA l a、160位にL e u、164位にT y r、166位にT h r、167位にG l u、168位にT r p、169位にS e r、170位にS e r、187位にV a l、193位にT h r、195位にG l u、196位にG l u、及び201位にP h eを含む第1のポリペプチド鎖と、(b) プログラニュリン変異体及び改変Fcポリペプチドを含み、その際、配列番号106の配列に対して少なくとも90% (例えば、少なくとも95%、98%、または99%) の同一性または100%の同一性を有する配列を含み、その配列が、配列番号106を参照してナンバリングされる位置で、14位にA l a、15位にA l a、146位にT r p、811位にV a l、812位にV a l、及び813位にL e uを含む第2のポリペプチド鎖とを含む。

20

【0199】

一部の実施形態では、本明細書に記載の融合タンパク質は、(a) 配列番号87の配列に対して少なくとも90% (例えば、少なくとも95%、98%、または99%) の同一性または100%の同一性を有する配列を含み、その際、その配列が、配列番号87を参照してナンバリングされる位置で、14位にA l a、15位にA l a、146位にS e r、148位にA l a、160位にL e u、164位にT y r、166位にT h r、167位にG l u、168位にT r p、169位にS e r、170位にS e r、187位にV a l、193位にT h r、195位にG l u、196位にG l u、及び201位にP h eを含む第1のポリペプチド鎖と、(b) プログラニュリン変異体及び改変Fcポリペプチドを含み、その際、配列番号107の配列に対して少なくとも90% (例えば、少なくとも95%、98%、または99%) の同一性または100%の同一性を有する配列を含み、その配列が、配列番号107を参照してナンバリングされる位置で、14位にA l a、15位にA l a、146位にT r p、811位にV a l、812位にT h r、及び813位にL e uを含む第2のポリペプチド鎖とを含む。

30

40

【0200】

V I I I . 結合特性

本明細書に記載の融合タンパク質は、幅広い結合親和性を有し得る。例えば、一部の実施形態では、タンパク質は、B B B受容体、例えば、T f Rについて、1 p M ~ 1 0 μ M 程度の範囲の親和性を有する。一部の実施形態では、T f Rについての親和性は、1 n M ~ 5 μ M、または1 0 n M ~ 1 μ Mの範囲である。

【0201】

B B B受容体、例えば、T f Rへの結合を分析するために結合親和性、結合キネティク

50

ス、及び交差反応性を分析するための方法は、当技術分野で公知である。これらの方法には、これらに限定されないが、固相结合アッセイ（例えば、ELISAアッセイ）、免疫沈降、表面プラスモン共鳴（例えば、Biacore（商標）（GE Healthcare、Piscataway、NJ））、結合平衡除外アッセイ（例えば、KinExA（登録商標））、フローサイトメトリー、蛍光標識細胞分取（FACS）、BioLayer干渉法（例えば、Octet（登録商標）（ForteBio, Inc.、Menlo Park、CA））、及びウェスタンブロット分析が含まれる。一部の実施形態では、ELISAを使用して、結合親和性及び／または交差反応性を決定する。ELISAアッセイを実行するための方法は当技術分野で公知であり、下の実施例セクションにおいても記載する。一部の実施形態では、表面プラスモン共鳴（SPR）を使用して、結合親和性、結合キネティクス、及び／または交差反応性を決定する。一部の実施形態では、結合平衡除外アッセイを使用して、結合親和性、結合キネティクス、及び／または交差反応性を決定する。一部の実施形態では、バイオレイヤー干渉アッセイを使用して、結合親和性、結合キネティクス、及び／または交差反応性を決定する。

10

【0202】

融合タンパク質の作用の評価

インビトロまたはインビボで活性を測定するアッセイを含む様々なアッセイを使用して、プログラニュリンまたはその変異体を含む本明細書に記載の融合タンパク質の活性を評価することができる。実施例において記載されているとおり、骨髓由来マクロファージ（BMDM）を使用し、かつヒトプログラニュリン及びヒトFcに対する抗体を用いて免疫染色して、本明細書に記載の融合タンパク質の細胞取り込みをアッセイすることができる。細胞を本明細書に記載の融合タンパク質（実施例6及び7）で処理した後に、GRN変異が原因である細胞作用（例えば、カテプシンD活性の増大ならびにCtssl、Tmem106b、及びPsa pなどのリソソーム遺伝子のmRNAレベルの上昇）を再び評価することができる。蛍光プローブ及びqPCR技術をこれらのアッセイにおいて使用することができる。最後に、実施例9及び10に示されているとおり、野生型及び／または遺伝子導入マウスを使用して、本明細書に記載の融合タンパク質の薬物動態特性及び脳取り込みを決定することができる。

20

【0203】

細胞試料では、アッセイは、細胞を崩壊させ、オープンなマイクロベシクルを破壊することを含み得る。細胞の崩壊は、凍結解凍及び／または音波処理を使用することにより達成することができる。一部の実施形態では、組織試料を評価する。マイクロベシクルが確実に分解されてオープンになるように、音波処理ステップ前に実行される複数回、例えば、2、3、4、5、またはそれ以上の凍結解凍サイクルを使用して、組織試料を評価することができる。

30

【0204】

本明細書に記載のアッセイにより評価することができる試料には、例えば、脳、肝臓、腎臓、肺、脾臓、血漿、血清、脳脊髄液（CSF）、及び尿が含まれる。一部の実施形態では、本明細書に記載のとおりプログラニュリンまたはその変異体を含む融合タンパク質を与えられた患者からのCSF試料を評価することができる。

40

【0205】

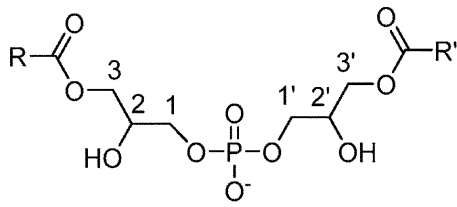
IX．ビス（モノアシルグリセロ）ホスファート（BMP）

（例えば、試料における、細胞における、組織における、及び／または対象における）プログラニュリンまたはプログラニュリン変異体のレベルをモニタリングする方法であって、プログラニュリンまたはプログラニュリン変異体レベルの決定が、（例えば、試料における、細胞における、組織における、及び／または対象における）BMPの存在量を測定することを含む、前記方法を本明細書において提供する。

【0206】

BMPは、式I：

50



(I)

で図示される構造を有する、負の電荷をもつ（例えば、後期エンドソーム及びリソソーム内で通常は存在する pH で）グリセロリン脂質である。BMP 分子は、2 つの脂肪酸側鎖を含む。式 I 中の R 及び R' は、典型的には 14、16、18、20、または 22 個の炭素原子をそれぞれ含有する、独立に選択される飽和または不飽和脂肪族鎖を表す。脂肪酸側鎖が不飽和である場合、これは、1、2、3、4、5、6 つ、またはそれよりも多い炭素-炭素二重結合を含有し得る。さらに、BMP 分子は、1 個または 2 個のアルキルエーテル置換基を含有してよく、その際、一方または両方の脂肪酸側鎖のカルボニル酸素が、2 個の水素原子で置き換えられる。特定の BMP 種を記載するために本明細書において使用されている命名法は、2 つの脂肪酸側鎖を有する種に関し、その際、脂肪酸側鎖の構造が、BMP フォーマットの括弧内に示される（例えば、BMP(18:1_18:1)）。数字は、「脂肪酸炭素原子：二重結合の数」の数の標準的な脂肪酸表記フォーマットに従っている。接頭辞「e-」は、アルキルエーテル置換基の存在を示すために使用され、その際、脂肪酸側鎖のカルボニル酸素は 2 個の水素原子で置き換えられている。例えば、「BMP(16:0e_18:0)」中の「e」は、16 個の炭素原子を有する側鎖がアルキルエーテル置換基であることを示している。

10

20

【0207】

本開示の方法の一部の実施形態では、1 種の BMP 種の存在量を測定する。一部の実施形態では、2 種以上の BMP 種の存在量を測定する。一部の実施形態では、表 1 中の BMP 種の少なくとも 2、3、4、5 種、またはそれ以上の存在量を測定する。2 種以上の BMP 種の存在量を測定する場合、異なる BMP 種の任意の組合せを使用することができる。

【0208】

一部の実施形態では、1 種よりも多い BMP 種の存在量を合計することができ、総存在量を、基準値と比較する。例えば、1 種または複数の BMP 種（例えば、表 1 に列挙されている BMP 種）の存在量を合計し、次いで、総存在量を基準値と比較することができる。

30

【0209】

(表 1) BMP 種

名称	総炭素原子： 総不飽和	名称	総炭素原子： 総不飽和	名称	総炭素原子： 総不飽和
BMP(14:0_14:0)	BMP(28:0)	BMP(16:0e_20:5)	BMP(36:5)	BMP(18:3_20:3)	BMP(38:6)
BMP(14:0_16:0)	BMP(30:0)	BMP(16:0e_22:4)	BMP(38:4)	BMP(18:3_20:4)	BMP(38:7)
BMP(14:0_16:1)	BMP(30:1)	BMP(16:0e_22:6)	BMP(38:6)	BMP(18:3_20:5)	BMP(38:8)
BMP(14:0_18:0)	BMP(32:0)	BMP(16:1e_14:0)	BMP(30:1)	BMP(18:3_22:4)	BMP(40:7)

40

50

名称	総炭素原子： 総不飽和	名称	総炭素原子： 総不飽和	名称	総炭素原子： 総不飽和
BMP(14:0 18:1)	BMP(32:1)	BMP(16:1e 16:0)	BMP(32:1)	BMP(18:3 22:5)	BMP(40:8)
BMP(14:0 18:2)	BMP(32:2)	BMP(16:1e 18:0)	BMP(34:1)	BMP(18:3 22:6)	BMP(40:9)
BMP(14:0 18:3)	BMP(32:3)	BMP(16:1e 18:1)	BMP(34:2)	BMP(18:0e 14:0)	BMP(32:0)
BMP(14:0 20:1)	BMP(34:1)	BMP(16:1e 18:2)	BMP(34:3)	BMP(18:0e 16:0)	BMP(34:0)
BMP(14:0 20:2)	BMP(34:2)	BMP(16:1e 18:3)	BMP(34:4)	BMP(18:0e 18:0)	BMP(36:0)
BMP(14:0 20:3)	BMP(34:3)	BMP(16:1e 20:3)	BMP(36:4)	BMP(18:0e 18:1)	BMP(36:1)
BMP(14:0 20:4)	BMP(34:4)	BMP(16:1e 20:4)	BMP(36:5)	BMP(18:0e 18:2)	BMP(36:2)
BMP(14:0 20:5)	BMP(34:5)	BMP(16:1e 20:5)	BMP(36:6)	BMP(18:0e 18:3)	BMP(36:3)
BMP(14:0 22:4)	BMP(36:4)	BMP(16:1e 22:4)	BMP(38:5)	BMP(18:0e 20:3)	BMP(38:3)
BMP(14:0 22:5)	BMP(36:5)	BMP(16:1e 22:6)	BMP(38:7)	BMP(18:0e 20:4)	BMP(38:4)
BMP(14:0 22:6)	BMP(36:6)	BMP(18:0 18:0)	BMP(36:0)	BMP(18:0e 20:5)	BMP(38:5)
BMP(16:0 16:0)	BMP(32:0)	BMP(18:0 18:1)	BMP(36:1)	BMP(18:0e 22:4)	BMP(40:4)
BMP(16:0 16:1)	BMP(32:1)	BMP(18:0 18:2)	BMP(36:2)	BMP(18:0e 22:6)	BMP(40:6)
BMP(16:0 18:0)	BMP(34:0)	BMP(18:0 18:3)	BMP(36:3)	BMP(18:1e 14:0)	BMP(32:1)
BMP(16:0 18:1)	BMP(34:1)	BMP(18:0 20:1)	BMP(38:1)	BMP(18:1e 16:0)	BMP(34:1)
BMP(16:0 18:2)	BMP(34:2)	BMP(18:0 20:2)	BMP(38:2)	BMP(18:1e 18:0)	BMP(36:1)
BMP(16:0 18:3)	BMP(34:3)	BMP(18:0 20:3)	BMP(38:3)	BMP(18:1e 18:1)	BMP(36:2)
BMP(16:0 20:1)	BMP(36:1)	BMP(18:0 20:4)	BMP(38:4)	BMP(18:1e 18:2)	BMP(36:3)
BMP(16:0 20:2)	BMP(36:2)	BMP(18:0 20:5)	BMP(38:5)	BMP(18:1e 18:3)	BMP(36:4)
BMP(16:0 20:3)	BMP(36:3)	BMP(18:0 22:4)	BMP(40:4)	BMP(18:1e 20:3)	BMP(38:4)
BMP(16:0 20:4)	BMP(36:4)	BMP(18:0 22:5)	BMP(40:5)	BMP(18:1e 20:4)	BMP(38:5)
BMP(16:0 20:5)	BMP(36:5)	BMP(18:0 22:6)	BMP(40:6)	BMP(18:1e 20:5)	BMP(38:6)
BMP(16:0 22:4)	BMP(38:4)	BMP(18:1 18:1)	BMP(36:2)	BMP(18:1e 22:4)	BMP(40:5)
BMP(16:0 22:5)	BMP(38:5)	BMP(18:1 18:2)	BMP(36:3)	BMP(18:1e 22:6)	BMP(40:7)
BMP(16:0 22:6)	BMP(38:6)	BMP(18:1 18:3)	BMP(36:4)	BMP(20:3 20:3)	BMP(40:6)
BMP(16:1 16:1)	BMP(32:2)	BMP(18:1 20:1)	BMP(38:2)	BMP(20:3 20:4)	BMP(40:7)
BMP(16:1 18:0)	BMP(34:1)	BMP(18:1 20:2)	BMP(38:3)	BMP(20:3 20:5)	BMP(40:8)
BMP(16:1 18:1)	BMP(34:2)	BMP(18:1 20:3)	BMP(38:4)	BMP(20:3 22:4)	BMP(42:7)
BMP(16:1 18:2)	BMP(34:3)	BMP(18:1 20:4)	BMP(38:5)	BMP(20:3 22:5)	BMP(42:8)
BMP(16:1 18:3)	BMP(34:4)	BMP(18:1 20:5)	BMP(38:6)	BMP(20:3 22:6)	BMP(42:9)
BMP(16:1 20:1)	BMP(36:2)	BMP(18:1 22:4)	BMP(40:5)	BMP(20:4 20:4)	BMP(40:8)
BMP(16:1 20:2)	BMP(36:3)	BMP(18:1 22:5)	BMP(40:6)	BMP(20:4 20:5)	BMP(40:9)
BMP(16:1 20:3)	BMP(36:4)	BMP(18:1 22:6)	BMP(40:7)	BMP(20:4 22:4)	BMP(42:8)
BMP(16:1 20:4)	BMP(36:5)	BMP(18:2 18:2)	BMP(36:4)	BMP(20:4 22:5)	BMP(42:9)
BMP(16:1 20:5)	BMP(36:6)	BMP(18:2 18:3)	BMP(36:5)	BMP(20:4 22:6)	BMP(42:10)
BMP(16:1 22:4)	BMP(38:5)	BMP(18:2 20:1)	BMP(38:3)	BMP(20:5 20:5)	BMP(40:10)
BMP(16:1 22:5)	BMP(38:6)	BMP(18:2 20:2)	BMP(38:4)	BMP(20:5 22:4)	BMP(42:9)
BMP(16:1 22:6)	BMP(38:7)	BMP(18:2 20:3)	BMP(38:5)	BMP(20:5 22:5)	BMP(42:10)
BMP(16:0e 14:0)	BMP(40:0)	BMP(18:2 20:4)	BMP(38:6)	BMP(20:5 22:6)	BMP(42:11)
BMP(16:0e 16:0)	BMP(32:0)	BMP(18:2 20:5)	BMP(38:7)	BMP(22:4 22:4)	BMP(44:8)
BMP(16:0e 18:0)	BMP(34:0)	BMP(18:2 22:4)	BMP(40:6)	BMP(22:4 22:5)	BMP(44:9)
BMP(16:0e 18:1)	BMP(34:1)	BMP(18:2 22:5)	BMP(40:7)	BMP(22:4 22:6)	BMP(44:10)
BMP(16:0e 18:2)	BMP(34:2)	BMP(18:2 22:6)	BMP(40:8)	BMP(22:6 22:6)	BMP(44:12)
BMP(16:0e 18:3)	BMP(34:3)	BMP(18:3 18:3)	BMP(36:6)		
BMP(16:0e 20:3)	BMP(36:3)	BMP(18:3 20:1)	BMP(38:4)		
BMP(16:0e 20:4)	BMP(36:4)	BMP(18:3 20:2)	BMP(38:5)		

10

20

30

40

50

【 0 2 1 0 】

場合によっては、1種または複数のBMP種が、他と比較した場合に、ある種類の試料で、例えば、細胞ベースの試料（例えば、培養細胞）と組織ベースまたは血液試料などで示差的に発現されることがある（例えば、より豊富に、またはより少なく）。したがって、一部の実施形態では、1種または複数のBMP種の選択（すなわち、存在量を測定するための）は、試料の種類に依存する。一部の実施形態では、例えば、試料（例えば、試験試料及び／または基準試料）がBMDMを含む場合には、1種または複数のBMP種は、BMP（18:1__18:1）を含む。他の実施形態では、例えば、試料が組織（例えば、脳組織、肝臓組織）または血漿、尿、もしくはCSFを含む場合、1種または複数のB

M P 種は、B M P (2 0 : 4 _ 2 0 : 4) を含む。他の実施形態では、例えば、試料が組織（例えば、脳組織、肝臓組織）または血漿、尿、もしくは C S F を含む場合、1 種または複数の B M P 種は、B M P (2 2 : 6 _ 2 2 : 6) を含む。

【 0 2 1 1 】

一部の実施形態では、内部 B M P 標準（例えば、B M P (1 4 : 0 _ 1 4 : 0) ）を使用して、試料中の 1 種または複数の B M P 種の存在量を測定する、及び／または基準値を決定する（例えば、基準試料中の 1 種または複数の B M P 種の存在量を測定する）。例えば、試料中に存在する 1 種または複数の B M P 種の量を決定することができるよう、既知の量の内部 B M P 標準を試料（例えば、試験試料及び／または基準試料）に添加して、校正点として役立てることができる。一部の実施形態では、試料から B M P を抽出または単離する際に使用される試薬（例えば、メタノール）を、内部 B M P 標準で「スパイクする」。典型的には、内部 B M P 標準は、対象において天然には生じないものである。

10

【 0 2 1 2 】

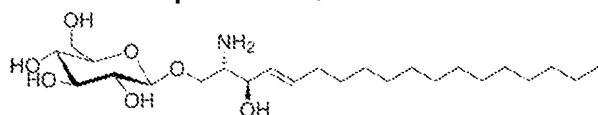
X . グルコシルスフィンゴシン (G L C S P H)

（例えば、試料における、細胞における、組織における、及び／または対象における）プログラニュリンまたはプログラニュリン変異体のレベルをモニタリングする方法であって、プログラニュリンまたはプログラニュリン変異体のレベルの決定が、（例えば、試料における、細胞における、組織における、及び／または対象における）グルコシルスフィンゴシン (G l c S p h) の存在量を測定することを含む、前記方法を本明細書において提供する。

20

【 0 2 1 3 】

G l c S p h は、式 I :



(I)

で図示される構造を有するリソグリコスフィンゴ脂質である。

【 0 2 1 4 】

G l c S p h は、グルコセレブロシダーゼ (G C アーゼ) の基質であり、G C アーゼ活性の低下を示すヒトゴーシェ病患者及びマウスモデルの細胞及び組織において蓄積することが見い出されている。G l c S p h の蓄積は、ゴーシェ病において観察される内臓及びニューロン病変に関係している。

30

【 0 2 1 5 】

一部の実施形態では、G l c S p h の存在量を基準値と比較することができる。一部の実施形態では、プログラニュリン関連障害を有するか、または有するリスクがある対象は、基準値と比較して G l c S p h レベルが上昇しており、例えば、対象の試験試料における G l c S p h の存在量は、基準値の少なくとも約 1 . 2 倍（例えば、約 1 . 2 倍、1 . 3 倍、1 . 4 倍、1 . 5 倍、2 倍、2 . 5 倍、3 倍、3 . 5 倍、4 倍、4 . 5 倍、5 倍、5 . 5 倍、6 倍、6 . 5 倍、7 倍、7 . 5 倍、8 倍、8 . 5 倍、9 倍、9 . 5 倍、1 0 倍、またはそれ以上）であり得る。一部の実施形態では、基準値は、対象が処置を受ける前の、プログラニュリン関連障害を有するか、または有するリスクがある対象の試験試料における G l c S p h レベルである。

40

【 0 2 1 6 】

前記方法の一部の実施形態では、基準値を、基準対象または基準対象の集団から得られた基準試料において測定する。基準対象または基準対象の集団は、健康な対照対象または健康な対照対象の集団であり得る。基準対象または基準対象の集団は、プログラニュリン関連障害またはプログラニュリンのレベルの低下を有さない対象または対象集団であり得る。一部の実施形態では、プログラニュリン関連障害を有するか、または有するリスクがある対象が処置を受けた後に、対象からの試験試料における G l c S p h レベルは、対象

50

が任意の処置を受ける前の対象からの試験試料における G l c S p h レベルを超えて改善し得る。一部の実施形態では、改善された G l c S p h レベルは、対象が処置を受ける前の、プログラニューリン関連障害を有するか、または有するリスクがある対象における G l c S p h レベルよりも、基準値（例えば、健康な対照対象または健康な対照対象の集団から得られた基準試料で測定された基準値）に近く、例えば、改善された G l c S p h レベルは、基準レベルの約 20 %、15 %、10 %、または 5 % 以内である。一部の実施形態では、改善された G l c S p h レベルは、基準レベルと実質的に同じである。

【0217】

場合によっては、プログラニューリン関連障害を有するか、または有するリスクがある対象では、基準値と比較しての G l c S p h レベルの上昇が、例えば、対象の全血、血漿、細胞、組織、血清、脳脊髄液、間質液、痰、尿、リンパ液、またはそれらの組合せにおいて見い出され得る。特定の実施形態では、G l c S p h レベルの上昇が、対象の血漿において見い出され得る。本開示の方法の一部の実施形態では、プログラニューリン関連障害を有するか、もしくは有するリスクがある対象から採取された試験試料または 1 つもしくは複数の基準値は、血漿を含むか、それに関してよい。

10

【0218】

さらに、プログラニューリン関連障害を有するか、または有するリスクがある対象では、基準値と比較しての G l c S p h レベルの上昇が、対象の脳、例えば、脳の前頭葉及び／または側頭葉において見い出され得る。特定の実施形態では、G l c S p h の増加が、前頭葉の 1 つまたは複数の領域、例えば、上前頭回、中前頭回、下前頭回、及び／または中心前回において見い出され得る。

20

【0219】

本明細書に記載の方法において使用されるプログラニューリン関連障害を有するか、または有するリスクがある対象から採取された試験試料は、血液細胞、脳細胞、末梢血単核細胞（P B M C）、骨髓由来マクロファージ（B M D M）、網膜色素上皮（R P E）細胞、赤血球、白血球、神経細胞、ミクログリア細胞、大脳皮質細胞、脊髄細胞、骨髄細胞、肝臓細胞、腎臓細胞、脾臓細胞、肺細胞、眼細胞、絨毛膜絨毛細胞、筋細胞、皮膚細胞、線維芽細胞、心臓細胞、リンパ節細胞、またはそれらの組合せなどの細胞を含み得る。一部の実施形態では、試験試料は血液細胞を含む。一部の実施形態では、試験試料は脳細胞を含む。

30

【0220】

本明細書に記載の方法において使用されるプログラニューリン関連障害を有するか、または有するリスクがある対象から採取された試験試料は、脳組織、大脳皮質組織、脊髄組織、肝臓組織、腎臓組織、筋肉組織、心臓組織、眼組織、網膜組織、リンパ節、骨髄、皮膚組織、血管組織、肺組織、脾臓組織、心臓弁組織、またはそれらの組合せなどの組織を含み得る。一部の実施形態では、試験試料は、対象の脳の前頭葉または側頭葉からの脳組織などの脳組織を含む。特定の実施形態では、試験試料において使用される脳組織は、上前頭回、中前頭回、下前頭回、及び／または中心前回からのものであり得る。

【0221】

プログラニューリン関連障害を有するか、または有するリスクがある対象から採取された試験試料は、エンドソーム、リソソーム、細胞外小胞、エキソソーム、マイクロベシクル、またはそれらの組合せを含み得る。

40

【0222】

一部の実施形態では、内部 G l c S p h 標準を使用して、プログラニューリン関連障害を有するか、または有するリスクがある対象からの試験試料における G l c S p h の存在量を測定する、及び／または基準値を決定する（例えば、基準試料における G l c S p h の存在量を測定する）。例えば、試料中に存在する G l c S p h の量を決定することができるように、既知の量の内部 G l c S p h 標準を試料（例えば、試験試料及び／または基準試料）に添加して、校正点として役立てることができる。一部の実施形態では、試料から G l c S p h を抽出または単離する際に使用される試薬（例えば、メタノール）を、内部

50

G l c S p h 標準で「スパイクする」。典型的には、内部 G l c S p h 標準は、対象において天然には生じないものである。一部の実施形態では、内部 G l c S p h は、実施例において使用される G l c S p h (d 5) など、ジュウテリウム標識 G l c S p h である。

【 0 2 2 3 】

X I . 処置に対する応答のモニタリング

一態様では、本開示は、対象（例えば、標的対象）においてプログラニュリンレベルまたはプログラニュリン変異体レベルをモニタリングする方法を提供する。別の態様では、疾患または障害（例えば、本明細書に記載のいずれか）を処置するための本明細書に記載のプログラニュリン変異体もしくは融合タンパク質、またはその医薬組成物もしくは投薬レジメンに対する、対象の応答をモニタリングする方法を提供する。

10

【 0 2 2 4 】

典型的には、試験試料における 1 種または複数の B M P 種及び／または G l c S p h のそれぞれの存在量を、1 つまたは複数の基準値（例えば、対応する基準値）と比較する。一部の実施形態では、B M P 値及び／または G l c S p h 値を処置前、及び処置後の 1 つまたは複数の時点で測定する。後の時点で得られた存在量の値を、処置前の値と、さらに、健康な、または罹患対照のものなどの対照値と比較して、対象が治療に対してどのように応答しているかを決定することができる。1 つまたは複数の基準値は、試験試料の細胞、組織、または体液に対応する異なる細胞、組織、または体液からであってよい。

【 0 2 2 5 】

一部の実施形態では、基準値は、基準試料において測定される 1 種または複数の B M P 種の存在量である。一部の実施形態では、基準値は、基準試料において測定される G l c S p h の存在量である。基準値は、測定された存在量の値（例えば、基準試料において測定された存在量の値）であってもよいし、または測定された存在量の値に由来するか、もしくはそれから外挿されてもよい。一部の実施形態では、例えば、基準値が複数の試料または対象の集団から得られる場合には、基準値は、ある範囲の値である。さらに、基準値は、単一の値（例えば、測定された存在量の値、平均値、または中央値）、またはある範囲の値として、標準偏差または標準誤差を伴って、または伴わずに表され得る。

20

【 0 2 2 6 】

2 つ以上の試験試料を（例えば、対象から）得る場合、それらを得る時点は、約 1、1 2、2 4 時間、もしくはそれ以上；約 1、2、3、4、5、6、7 日、もしくはそれ以上；約 1、2、3、4、5、6、7、8、9、1 0 週間、もしくはそれ以上；またはさらに長く、離れていてよい。3 つ以上の試験試料を得る場合、各試験試料を得る時間の間の時間間隔はすべて、同じであってもよいし、間隔はすべて異なってもよいし、またはそれらの組合せであってもよい。

30

【 0 2 2 7 】

一部の実施形態では、第 1 の試験試料及び第 2 の試験試料を両方とも、対象を処置した後に対象（例えば、標的対象）から得る、すなわち、第 1 の試験試料を処置中に、第 2 の試験試料よりも早い時点で対象から得る。一部の実施形態では、第 1 の試験試料を、対象をプログラニュリンのレベルの低下に関連する障害について処置する前に得て（すなわち、処置前試験試料）、かつ第 2 の試験試料を、対象をプログラニュリンのレベルの低下に関連する障害について処置した後に得る（すなわち、処置後試験試料）。一部の実施形態では、1 つより多い（例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、1 0、またはそれ以上の）処置前及び／または処置後試験試料を対象から得る。さらに、得られる処置前及び処置後試験試料の数は、同じである必要はない。

40

【 0 2 2 8 】

一部の実施形態では、測定される B M P 種の存在量が、対象が何らかの処置を受ける前に対象からの基準試料において得られた基準値の約 1 %、2 %、3 %、4 %、5 %、6 %、7 %、8 %、9 %、1 0 %、1 1 %、1 2 %、1 3 %、1 4 %、1 5 %、1 6 %、1 7 %、1 8 %、1 9 %、または 2 0 % 以内である場合に、対象が処置に応答していないと決定することができる。

50

【0229】

一部の実施形態では、測定されるBMP種の存在量が、健康な対照対象からの基準試料において得られた基準値の約1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、または20%以内である場合に、対象が処置に応答していると決定することができる。

【0230】

一部の実施形態では、測定されるGlcsphの存在量が、対象が何らかの処置を受ける前に対象からの基準試料において得られた基準値の約1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、または20%以内である場合に、対象が処置に応答していないと決定することができる。

10

【0231】

一部の実施形態では、測定されるGlcsphの存在量が、健康な対照対象からの基準試料において得られた基準値の約1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、または20%以内である場合に、対象が処置に応答していると決定することができる。

【0232】

対象（例えば、標的対象）が、（例えば、プログラニユリンのレベルの低下に関連する障害についての）処置に応答していない場合、一部の実施形態では、1種または複数の治療薬（例えば、プログラニユリン）の投薬量を変更する（例えば、増加させる）、及び／または投薬間隔を変更する（例えば、投与の間の時間を短縮する）。一部の実施形態では、対象が処置に応答していない場合、別の治療薬を選択する。一部の実施形態では、対象が処置に応答していない場合、1種または複数の治療薬を中止する。

20

【0233】

XII. BMP及びGlcsph検出技術

一部の実施形態では、抗体を使用して、1種または複数のBMP種及び／またはGlcsphの存在量を検出する、及び／または測定することができる。一部の実施形態では、抗体に結合したBMP種を、顕微鏡法またはELISAなどにより検出することができる。一部の実施形態では、抗体に結合したGlcsphを、顕微鏡法またはELISAなどにより検出することができる。

30

【0234】

他の実施形態では、質量分析法（MS）を使用して、本開示の方法により1種または複数のBMP種及び／またはGlcsphの存在量を検出する、及び／または測定する。質量分析法は、化合物をイオン化して、生じたイオンをそれらの質量電荷比（ m/Q 、 m/q 、 m/Z 、または m/z と省略）により選別する技術である。気体、液体、または固体で存在し得る試料（例えば、BMP分子及び／またはGlcsph分子を含む）をイオン化し、次いで、生じたイオンを電場及び／または磁場を介して加速して、それらが、それらの質量電荷比により分離するようにする。イオンは最終的に、イオン検出器に衝突して、質量スペクトログラムを生成する。検出イオンの質量電荷比をそれらの相対存在度と一緒に使用して、時には既知の質量（例えば、全体か、またはインタクトな分子の質量）を検出されたイオンの質量に対して補正することにより、及び／または質量スペクトログラムにおいて検出されるパターンを認識することにより、親化合物（複数可）を同定することができる。

40

【0235】

一部の実施形態では、1種または複数のBMP種及び／またはGlcsphを、単一の質量分析器（例えば、四重極型）を使用する単一のMSにより検出することができる。一部の実施形態では、典型的には合間に分子断片化ステップを有する複数のラウンドの質量分析法を実行するために一連の質量分析器（例えば、3つの質量分析器）を使用するタンデム質量分析法（MS/MS）により、1種または複数のBMP種及び／またはGlcsph

50

p hを検出することができる。

【0236】

断片化のために、これらに限定されないが、衝突誘起解離 (CID)、電子捕獲解離 (ECD)、電子移動解離 (ETD)、赤外多光子解離 (IRMPD)、黒体赤外放射解離 (BIRD)、電子脱離解離 (EDD)、及び表面誘起解離 (SID)を含むいくつかの方法を使用することができる。

【0237】

タンデム質量分析計を使用して、フルスキャン、プロダクトイオンスキャン、プリカーサーイオンスキャン、ニュートラルロススキャン、及び選択 (または複数) 反応モニタリング (SRMまたはMRM) スキャンを含む異なる種類の実験を実行することができる。フルスキャン実験では、両方の質量分析計 (例えば、Q1及びQ3) の全体の質量範囲 (またはその一部) をスキャンし、第2の質量分析計 (例えば、Q2) はいかなる衝突ガスも含有しない。これにより、試料中に含有されるすべてのイオンを検出することができる。プロダクトイオンスキャン実験では、特定の質量電荷比を第1の質量分析計 (例えば、Q1) 用を選択し、第2の質量分析計 (例えば、Q2) を衝突ガスで充満させて、選択した質量電荷比を有するイオンを断片化し、次いで、第3の質量分析計 (例えば、Q3) の全体の質量範囲 (またはその一部) をスキャンする。これにより、選択したプリカーサーイオンのすべての断片イオンを検出することができる。プリカーサーイオンスキャン実験では、第1の質量分析 (例えば、Q1) の全体の質量範囲 (またはその一部) をスキャンし、第2の質量分析計 (例えば、Q2) を衝突ガスで充満させて、スキャン範囲内のイオンを断片化し、特定の質量電荷比を第3の質量分析計 (例えば、Q3) 用を選択する。プロダクトイオンの検出の間の時間と、その検出の直前に選択した特定の質量電荷比とを相関させることにより、この種類の実験により、ユーザーは、どのプリカーサーイオン (複数可) が目的のプロダクトイオンを生成させた可能性があるのかを決定することができる。ニュートラルロススキャン実験では、第1の質量分析計 (例えば、Q1) の全体の質量範囲 (またはその一部) をスキャンし、第2の質量分析計 (例えば、Q2) を衝突ガスで充満させて、スキャン範囲内のすべてのイオンを断片化し、第3の質量分析計 (例えば、Q3) を、プリカーサーイオンスキャン範囲内のすべての潜在的なイオンに生じた単一の特定の質量の断片化誘起喪失に対応する特定の範囲にわたってスキャンする。この種類の実験により、目的の特定の化学基 (例えば、メチル基) を共通して喪失したすべてのプリカーサーの同定が可能となる。MRM実験では、ある特定の質量電荷比を第1の質量分析計 (例えば、Q1) 用を選択し、第2の質量分析計 (例えば、Q2) を衝突ガスで充満させ、第3の質量分析計 (例えば、Q3) を別の特定の質量電荷比用に設定する。この種類の実験により、第3の質量分析計において選択された生成物に断片化されることが既知である分子の高度に特異的な検出が可能となる。MS及びMS/MS方法は、あらゆる目的のためにその全体が参照により本明細書に組み込まれるGrebe et al. Clin. Biochem. Rev. (2011) 32: 5-31においてさらに記載されている。

【0238】

さらに、MS及びMS/MS技術を液体クロマトグラフィー (LC) またはガスクロマトグラフィー (GC) 技術と連結することができる。そのような液体クロマトグラフィー質量分析法 (LC-MS)、液体クロマトグラフィータンデム質量分析法 (LC-MS/MS)、ガスクロマトグラフィー質量分析法 (GC-MS)、及びガスクロマトグラフィータンデム質量分析法 (GC-MS/MS) 方法は、典型的にはMSまたはMS/MS単独で可能であるものを超えて強化された質量分解及び質量決定を可能にする。

【0239】

液体クロマトグラフィーは、流体が均一に微細物質のカラムを通して、またはキャピラリー通路を通して浸透する際に、流体溶液の1つ以上の構成成分を選択的に遅延させるプロセスを指す。その遅延は、1つまたは複数の固定相とバルク流体 (すなわち、移動相) との間において、流体が固定相 (複数可) に対して動く際の、混合物の構成成分の分布から生じる。ときには「高圧液体クロマトグラフィー」としても公知の高速液体クロマトグ

ラフィー（HPLC）は、移動相を圧力下で固定相、典型的には、密に充填されたカラムに押し入れることにより分離度が向上しているLCの変形である。

【0240】

さらに、「超高压液体クロマトグラフィー」、または「超高性能液体クロマトグラフィー（UPLC）」としても公知の超高速液体クロマトグラフィー（UHPLC）は、慣用のHPLC技術よりもかなり高い圧力を使用して実行されるHPLCの変形である。

【0241】

ガスクロマトグラフィーは、分解せずに気化させ得る化合物を分離及び／または分析するための方法を指す。移動相は典型的には、不活性なガス（例えば、ヘリウム）または非反応性ガス（例えば、窒素）であるキャリアガスであり、固定相は典型的には、「カラム」として役立つガラス製または金属製管内部の不活性な固体支持体に配置された微視的液体またはポリマー層である。目的のガス状化合物がカラム内の固定相と相互作用するにつれて、それらは示差的に遅延して、異なる時間にカラムから溶出する。次いで、分離化合物を質量分析計に導入することができる。

【0242】

一部の実施形態では、抗体ベースの方法を使用して、1種または複数のBMP種及び／またはGlcsphの存在量を検出する、及び／または測定する。適切な方法の非限定的例には、ELISA、免疫蛍光、及びラジオイムノアッセイ（RIA）技術が含まれる。ELISA、免疫蛍光、及びRIA技術を実行するための方法は、当技術分野で公知である。

【0243】

試料が、検出のために十分な量でBMP及び／またはGlcsphを含んでいて、その存在量を測定することができる限り、任意の数の試料の種類を試験試料及び／または基準試料として、本開示の方法において使用することができる。非限定的例には、細胞、組織、血液（例えば、全血、血漿、血清）、体液（例えば、脳脊髄液、尿、気管支肺胞上皮洗浄液、リンパ液、精液、母液、羊水）、糞便、痰、またはそれらの任意の組合せが含まれる。適切な細胞型の非限定的例には、BMDM、血液細胞（例えば、PBMC、赤血球、白血球）、神経細胞（例えば、脳細胞、大脳皮質細胞、脊髄細胞）、骨髄細胞、肝臓細胞、腎臓細胞、脾臓細胞、肺細胞、眼細胞（例えば、RPE細胞などの網膜細胞）、絨毛膜絨毛細胞、筋細胞、皮膚細胞、線維芽細胞、心臓細胞、リンパ節細胞、またはそれらの組合せを含む。一部の実施形態では、試料は、細胞の一部を含む。一部の実施形態では、試料を細胞または組織から精製する。精製試料の非限定的例には、エンドソーム、リソソーム、細胞外小胞（例えば、エキソソーム、マイクロベシクル）、及びそれらの組合せが含まれる。

【0244】

一部の実施形態では、試料（例えば、試験試料及び／または基準試料）は、培養細胞である細胞を含む。非限定的例には、BMDM及びRPE細胞が含まれる。例えば、PBMCを含む試料を調達して、そこに含まれる単球を培養することにより、BMDMを得ることができる。

【0245】

適切な組織試料種の非限定的例には、神経組織（例えば、脳組織、大脳皮質組織、脊髄組織）、肝臓組織、腎臓組織、筋肉組織、心臓組織、眼組織（例えば、網膜組織）、リンパ節、骨髄、皮膚組織、血管組織、肺組織、脾臓組織、心臓弁組織、及びそれらの組合せが含まれる。一部の実施形態では、試験試料及び／または基準試料は、脳組織または肝臓組織を含む。一部の実施形態では、試験及び／または基準試料は血漿を含む。

【0246】

XIII. 核酸、ベクター、及び宿主細胞

本明細書に記載のとおり融合タンパク質中に含有されるポリペプチド鎖を典型的には、組み換え方法を使用して調製する。したがって、一部の態様では、本開示は、本明細書に記載のとおりプログランユリン変異体、ポリペプチド、または融合タンパク質のい

10

20

30

40

50

れかをコードする核酸配列を含む単離核酸、及びその核酸が導入されていて、ポリペプチドをコードする核酸を複製する、及び／またはポリペプチドを発現するために使用される宿主細胞を提供する。一部の実施形態では、宿主細胞は真核、例えば、ヒト細胞である。

【0247】

別の態様では、本明細書に記載のプログラニユリン変異体及びポリペプチド鎖をコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドを提供する。前記ポリヌクレオチドは、一本鎖または二本鎖であってよい。一部の実施形態では、ポリヌクレオチドはDNAである。特定の実施形態では、ポリヌクレオチドはcDNAである。一部の実施形態では、ポリヌクレオチドはRNAである。

【0248】

本開示は、配列番号98～108及び123～126のいずれか1つの配列を有するポリペプチドをコードする核酸配列を含む単離核酸を提供する。配列番号3～57、111～121、127、及び128のいずれか1つの配列を有するプログラニユリン変異体をコードする核酸配列を含む単離核酸も本明細書において提供する。

【0249】

一部の実施形態では、ポリヌクレオチドは、核酸コンストラクト内に含まれる。一部の実施形態では、コンストラクトは、複製可能なベクターである。一部の実施形態では、ベクターは、プラスミド、ウイルス性ベクター、ファージミド、酵母染色体ベクター、及び非エピソーム哺乳類ベクターから選択される。

【0250】

一部の実施形態では、ポリヌクレオチドは、発現コンストラクト中の1つまたは複数の調節ヌクレオチド配列に作動可能に連結している。一連の実施形態では、核酸発現コンストラクトを、表面発現ライブラリとして使用するために適応させる。一部の実施形態では、ライブラリを、酵母における表面発現のために適応させる。一部の実施形態では、ライブラリを、ファージにおける表面発現のために適応させる。別の一連の実施形態では、核酸発現コンストラクトを、ミリグラムまたはグラム量でのポリペプチドの単離を可能にするシステムにおけるポリペプチドの発現のために適応させる。一部の実施形態では、システムは、哺乳類細胞発現系である。一部の実施形態では、システムは酵母細胞発現系である。

【0251】

組み換えポリペプチドを生成するための発現ビヒクルには、プラスミド及び他のベクターが含まれる。例えば、適切なベクターには、E. coliなどの原核細胞における発現では、次の種類のプラスミドが含まれる：pBR322由来プラスミド、pEMBL由来プラスミド、pEX由来プラスミド、pBTac由来プラスミド、及びpUC由来プラスミド。pcDNA1/amp、pcDNA1/neo、pRC/CMV、pSV2gpt、pSV2neo、pSV2-dhfr、pTk2、pRSVneo、pMSG、pSVT7、pkneo、及びpHyg由来ベクターは、真核細胞のトランスフェクションに適切な哺乳類発現ベクターの例である。別法では、ウシパピローマウイルス(BPV-1)、またはエプスタイン-バーウイルス(pHEBo、pREP由来、及びp205)などのウイルスの誘導体を、真核細胞におけるポリペプチドの一過性発現のために使用することができる。一部の実施形態では、バキュロウイルス発現系の使用により組み換えポリペプチドを発現させることが望ましいことがある。そのようなバキュロウイルス発現系の例には、pVL由来ベクター(pVL1392、pVL1393、及びpVL941など)、pAcUW由来ベクター(pAcUW1など)、及びpBlueBac由来ベクターが含まれる。追加の発現系には、アデノウイルス性、アデノ随伴ウイルス、及び他のウイルス発現系が含まれる。

【0252】

ベクターを任意の適切な宿主細胞に形質転換することができる。一部の実施形態では、宿主細胞、例えば、細菌または酵母細胞を、表面発現ライブラリとして使用するために適合させることができる。一部の細胞では、比較的大量のポリペプチドを発現させるために

10

20

30

40

50

、ベクターを宿主細胞で発現させる。そのような宿主細胞には、哺乳類細胞、酵母細胞、昆虫細胞、及び原核細胞が含まれる。一部の実施形態では、細胞は、CHO細胞、ベビーハムスター腎臓（BHK）細胞、NSO細胞、YO細胞、HEK293細胞、COS細胞、Vero細胞、またはHeLa細胞などの哺乳類細胞である。特定の実施形態では、細胞はCHO細胞である。

【0253】

本明細書に記載の融合タンパク質のための1つまたは複数のプログラニュリン変異体をコードする発現ベクターをトランスフェクトされた宿主細胞は、1つまたは複数のポリペプチドの発現が生じることを可能にする適切な条件下で培養することができる。ポリペプチド（複数可）が分泌されて、細胞とポリペプチド（複数可）を含有する培地との混合物から単離され得る。別法では、ポリペプチド（複数可）は、細胞質中に、または膜分画中に保持され、所望の方法を使用して、細胞を採取し、溶解し、単離されたポリペプチド（複数可）を単離することができる。

10

【0254】

XIV. 医薬組成物及びキット

他の態様では、本開示によるプログラニュリン変異体または融合タンパク質を含む医薬組成物及びキットを提供する。

【0255】

医薬組成物

本開示において使用するための製剤を調製するためのガイダンスは、当業者に知られている医薬調製及び処方のための任意の数のハンドブックにおいて見い出すことができる。

20

【0256】

一部の実施形態では、医薬組成物は、本明細書に記載のとおりプログラニュリン変異体または融合タンパク質を含み、かつさらに、1種または複数の薬学的に許容される担体及び／または添加剤を含む。薬学的に許容される担体には、生理学的に適合性であり、かつ活性薬剤の活性を妨害しないか、または別段に阻害しない任意の溶媒、分散媒体、またはコーティングが含まれる。

【0257】

プログラニュリン変異体または融合タンパク質は、注射による非経口投与のために製剤化することができる。典型的には、インピボ投与において使用するための医薬組成物は無菌であり、例えば、熱滅菌、蒸気滅菌、滅菌濾過、または照射されている。

30

【0258】

本明細書に記載の医薬組成物の投薬量及び所望の薬物濃度は、構想されている特定の使用に応じて変化し得る。

【0259】

キット

一部の実施形態では、本明細書に記載のプログラニュリン変異体または融合タンパク質を含む、神経変性疾患（例えば、FTD、NCL、NPA、NPB、NPC、C9ORF72関連ALS／FTD、孤発性ALS、AD、ゴーシェ病（例えば、ゴーシェ病2及び3型）、及びパーキンソン病）、アテローム性動脈硬化症、TDP-43に関連する障害、及びAMD、及びプログラニュリン関連障害）を処置する際に使用するためのキットを提供する。

40

【0260】

一部の実施形態では、キットはさらに、1種または複数の追加の治療薬を含む。例えば、一部の実施形態では、キットは、本明細書に記載のとおりプログラニュリン変異体または融合タンパク質を含み、さらに、本明細書に記載のいずれかの疾患または障害（例えば、神経変性疾患（例えば、FTD））の処置において使用するための1種または複数の追加の治療薬を含む。一部の実施形態では、キットはさらに、本明細書に記載の方法を実行するための用法（すなわち、プロトコル）を含む指示用資料（例えば、プログラニュリン変異体を含む融合タンパク質を投与するためにキットを使用するための指示書）を含む

50

。指示用資料は典型的には、文書によるか、または印刷された資料を含むが、それらは、そのようなものに限定されない。そのような指示を保存し、かつ、それらをエンドユーザーに伝達することができる任意の媒体を本開示は企図している。そのような媒体には、これらに限定されないが、電子記憶媒体（例えば、磁気ディスク、テープ、カートリッジ、チップ）、光学媒体（例えば、CD-ROM）などが含まれる。そのような媒体には、そのような指示用資料を提供するインターネットサイトのアドレスも含まれ得る。

【0261】

XV. 適応症

一部の実施形態では、本明細書に記載のプログラニュリン変異体及び融合タンパク質を、1つの神経変性疾患または複数の神経変性疾患を処置するために使用する。例えば、本明細書に記載の融合タンパク質は、AD、原発性加齢性タウオパチー、レビー小体型認知症、進行性核上麻痺（PSP）、FTD、染色体17番に連鎖したパーキンソン症候群を伴うFTD、嗜銀顆粒性認知症、ALS、グアム島のALS／パーキンソン症候群－認知症複合（ALS-PDC）、大脳皮質基底核変性症、慢性外傷性脳症、クロイツフェルトーヤコブ病、ボクサー認知症、石灰沈着を伴うびまん性神経原線維変化病、ダウン症候群、家族性イギリス型認知症、家族性デンマーク型認知症、ゲルストマン－シュトラウスラー－シャインカー病、球状グリア性タウオパチー、認知症を伴うグアドループ島パーキンソン症候群、グアドループ島PSP、ハレルフォルデンスパッツ病、スフェロイドを伴う遺伝性びまん性白質脳症（HDLs）、封入体筋炎、多発性萎縮症、筋強直性ジストロフィー、那須－ハコラ病、神経原線維変化優位型認知症、NPC、パリドーポントー黒質変性症、パーキンソン病、ピック病、脳炎後パーキンソン症候群、プリオンタンパク質脳アミロイドアンギオパチー、進行性皮質下グリオーシス、亜急性硬化性全脳炎、及び神経原線維変化型認知症からなる群から選択される1つまたは複数の神経変性疾患を処置するために使用することができる。

【0262】

いくつかの神経変性疾患は、細胞及び生体機能障害、さらには臨床的異常を最終的にもたらす非消化または部分的に消化された高分子の蓄積により特徴づけられるリソソーム貯蔵障害が原因であるか、またはそれに関連し得る。リソソームの貯蔵障害は、蓄積した基質の種類により定義され、コレステロール貯蔵障害、スフィンゴ脂質蓄積症、オリゴ糖代謝異常、ムコリピドーシス、ムコ多糖症、リポタンパク質貯蔵障害、神経セロイドリポフスチン症などと分類され得る。場合によっては、リソソームの貯蔵障害には、リソソーム酵素の正常な翻訳後修飾に必要なタンパク質、または適正なリソソーム輸送に重要なタンパク質などの高分子の蓄積をもたらすタンパク質の不足または欠失も含まれる。リソソーム貯蔵障害が原因であるか、またはそれに関連し得る神経変性疾患の例には、例えば、FTD、NCL、NPA、NPB、NPC、C9ORF72関連ALS／FTD、孤発性ALS、AD、ゴーシェ病（例えば、ゴーシェ病2及び3型）、及びパーキンソン病が含まれる。一部の実施形態では、本明細書に記載のプログラニュリン変異体及び融合タンパク質を使用して、例えば、前述の神経変性疾患のいずれかを含むリソソーム貯蔵障害が原因であるか、またはそれに関連する神経変性疾患を処置する。

【0263】

他の障害の例には、アテローム性動脈硬化症、TDP-43に関連する障害、及びAMDが含まれる。そのような障害は、本明細書に記載のプログラニュリン変異体または融合タンパク質の投与から利益を受け得る。

【0264】

一部の実施形態では、本明細書に記載のプログラニュリン変異体及び融合タンパク質を使用して、FTDを処置する。FTDは、進行性神経変性障害である。FTDは、前頭葉及び側頭葉の選択的関与を示す幅広い臨床的、病的、及び遺伝的に不均一な疾患を含む（Gazzina et al., Eur J Pharmacol. 817: 76-85, 2017）。FTDの臨床症状には、行動及び人格の変化、前頭葉実行欠損、及び言語機能障害が含まれる。臨床的表現型の相違に基づき、行動障害型FTD（bvFTD）、

及び非流暢性／失文法性亜型 P P A (a v P P A) または意味性亜型 P P A (s v P P A) のいずれかであり得る原発性進行性失語症 (P P A) などの種々の症状が同定されている。これらの臨床症状は、大脳皮質基底核症候群 (C B S) 、進行性核上麻痺 (P S P) 、及び A L S などの非定型パーキンソン症候群とも重複し得る (G a z z i n a e t a l . , E u r J P h a r m a c o l . 8 1 7 : 7 6 - 8 5 , 2 0 1 7) 。 F T D は、ニューロン及び星状細胞におけるタウ病変またはニューロンにおける細胞質ユビキチン封入体を含む様々な神経病理学的特徴に関連する。43 k D a (T D P - 4 3) の分子量を有するトランス活性化 D N A 結合タンパク質は、F T D 、さらには A L S の症例の大部分において蓄積する最も顕著なユビキチン化タンパク質病変である (P e t k a u a n d L e a v i t t , 前出) 。 F T D は、早発性認知症の重大な原因であり、症例の最高 8 0 % が 4 5 から 6 4 歳の間に現れる。この疾患は、有意な家族性要素も示し、症例の約 3 0 ~ 5 0 % で疾患の家族歴が報告されている (P e t k a u a n d L e a v i t t , 前出) 。

10

【0265】

一部の実施形態では、本明細書に記載のプログラニュリン変異体及び融合タンパク質を使用して、G R N の変異に関連するか、またはそれに随伴する障害を処置する。いくつかの遺伝子が F T D に関連しているが、F T D において最も頻繁に変異している遺伝子の 1 つが G R N であり、これは、ヒト染色体 1 7 q 2 1 に位置し、システインリッチなタンパク質プログラニュリン (プロエピセリン及びアクログラニンとしても公知) をコードする。最近の推定では、G R N 変異は、家族歴が陽性である F T D 患者の 5 ~ 2 0 % 及び孤発性症例の 1 ~ 5 % を占めることが示唆されている (R a d e m a k e r s e t a l . , 前出) 。 G R N 関連 F T D における神経変性及び疾患プロセスの根底にある正確な分子及び細胞機構は未知であるが、患者の脳の組織分析と組み合わせた G R N ノックアウトマウスの表現型特性決定により、炎症及びリソソーム欠損の両方が疾患の中核であることが示唆されている (K a o e t a l . , N a t R e v N e u r o s c i . 1 8 (6) : 3 2 5 - 3 3 3 , 2 0 1 7) 。実際に、大量のグリオーシスが患者の皮質領域に存在し (L u i e t a l . , C e l l . 1 6 5 (4) : 9 2 1 - 3 5 , 2 0 1 6) 、リソソーム障害を示すリソソーム色素であるリポフスチンが、発症前個体及び患者の両方を含む変異 G R N 保因者の眼及び皮質において報告されている (W a r d e t a l . , S c i T r a n s l M e d . 9 (3 8 5) , 2 0 1 7) 。

20

30

【0266】

70 を超える G R N 疾患変異が報告されていて、遺伝子全体にマッピングされており、その結果として、それらは機能喪失 (L O F) アレルであると確認または予測されている (J i e t a l . J M e d G e n e t . 5 4 : 1 4 5 - 1 5 4 , 2 0 1 7) 。 F T D に関連する多くのヘテロ接合変異は、主にナンセンス m R N A 崩壊の結果としての m R N A レベルの約 5 0 % の低下、及び匹敵するプログラニュリンタンパク質レベルの低下を引き起こす (P e t k a u a n d L e a v i t t , 前出 ; K a o e t a l . , 前出) 。低レベルのプログラニュリンは、発症前個体を含む保因者の血液 (血清) 及び脳脊髄液 (C S F) においても見い出される (F i n c h e t a l . , N a t R e v N e u r o s c i . 1 8 (6) : 3 2 5 - 3 3 3 , 2 0 1 7 ; G o o s s e n s e t a l . , A l z h e i m e r s R e s T h e r . 1 0 (1) : 3 1 , 2 0 1 8 ; M e e t e r e t a l . , D e m e n t G e r i a t r C o g n D i s E x t r a . 6 (2) : 3 3 0 - 3 4 0 , 2 0 1 6) 。したがって、ハプロ不全が G R N 関連 F T D における主な疾患機構であると考えられ、保因者においてプログラニュリンレベルを上昇させる治療アプローチが F T D の発症年齢、さらには、進行を遅延させ得ることを示唆している (P e t k a u a n d L e a v i t t , 前出 ; K a o e t a l . , 前出) 。この見解は、遺伝子 T M E M 1 0 6 B の変異体がプログラニュリンのレベルを 2 5 % 上昇させ、かつ G R N 関連 F T D の発症時期を 1 3 年遅延させることを示すヒト遺伝子研究により裏付けられている (N i c h o l s o n a n d R a d e m a k e r s , A c t a N e u r o p a t h o l . 1 3 2 (5) : 6 3 9 - 6 5 1 , 2 0 1 6) 。

40

50

【0267】

ホモ接合型GRN変異も報告されているが、保因者は、リソソーム貯蔵障害であるNCL（バッテン病；生児出生100,000あたり発生率1～2.5；Cotman et al., Curr Neurol Neurosci Rep. 13(8):366, 2013）として公知のかなり異なる臨床表現型を表す（Smith et al., Am J Hum Genet. 90(6):1102-7, 2012；Almeida et al., Neurobiol Aging. 41:200.e1-200.e5, 2016）。GRNは実際に、NCLに関連すると報告されている14の神経セロイドリポフスチン症（CLN）遺伝子のうちの1つであり、GRNは、CLN11としても公知である（Kollmann et al., Biochim Biophys Acta. 1832(11):1866-81, 2013）。本明細書に記載のプログラニュリン変異体または融合タンパク質は、抗炎症特性及びリソソーム機能の増強を示し得、そのいずれも、NCLにおいて有利であり得る。一部の実施形態では、本明細書に記載のプログラニュリン変異体及び融合タンパク質を使用して、NCLを処置することができる。

10

【0268】

GBA遺伝子にホモ接合型変異を保有するゴーシェ病の患者は、それらの血清において低レベルのプログラニュリンを有する（Jian et al., EBioMedicine 11:127-137, 2016）。GBAにヘテロ接合型変異を有するパーキンソン病患者も、低レベルのプログラニュリンを有することがある。一部の実施形態では、本明細書に記載のプログラニュリン変異体及び融合タンパク質を使用して、ゴーシェ病またはパーキンソン病を処置することができる。

20

【0269】

GRNにおける変異体は、ADに関連しており（Rademakers et al., 前出；Brouwers et al., Neurology. 71(9):656-64, 2008；Lee et al., Neurodegener Dis. 8(4):216-20, 2011；Viswanathan et al., Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet. 150B(5):747-50, 2009）、かつTDP-43病変はAD患者の脳において共通している（Yomans and Wolozin, Exp Neurol. 237(1):90-5, 2012）。プログラニュリン遺伝子送達は、ADのマウスモデルにおいてアミロイド負荷量を減少させることも示されている（van Kampen and Kay, PLoS One. 12(8):e0182896, 2017）。したがって、一部の実施形態では、本明細書に記載のプログラニュリン変異体及び融合タンパク質を使用して、ADを処置することができる。

30

【0270】

NPA及びNPBは、酸性スフィンゴミエリナーゼ（SMPD1）をコードする遺伝子における変異から生じる。NPCは、コレステロール輸送に関係する遺伝子、すなわち、NPC1及びNPC2における変異から生じる（Kolter and Sandhoff, Annu Rev Cell Dev Biol. 21:81-103, 2005；Kobayashi et al., Nat Cell Biol. 1(2):113-8, 1999）。一部の実施形態では、本明細書に記載のプログラニュリン変異体及び融合タンパク質を使用して、NPA、NPB、及び／またはNPCを処置することができる。

40

【0271】

大部分のALS症例が、TDP-43病変を示し、これは、GRN変異を持つ患者とも共有される（Petkau and Leavitt, Trends Neurosci. 37(7):388-98, 2014；Rademakers et al., Nat Rev Neurol. 8(8):423-34, 2012）。すべてのALS症例のうちでも、C9ORF72遺伝子内のGGGGCCリピート伸長が、ALSの最も共通する原因及びFTDの重大な原因である。北米及び欧州の個体群において報告された平均変異

50

頻度は、家族性ALSで37%、孤発性ALSで6%、家族性FTDで21%、かつ孤発性FTD患者で6%である(Rademakers et al., 前出)。加えて、GRN関連FTDにおいて防護的であるTMEM106B変異体は、C9ORF72遺伝子においてリピート伸長を保有するFTD患者においても防護的である(van Blitterswijk et al., Acta Neuropathol. 127(3): 397-406, 2014)。一部の実施形態では、本明細書に記載のプログラニュリン変異体及び融合タンパク質を使用して、例えば、リソソーム機能を促進する、及び／または炎症を減少させることにより、C9ORF72関連ALS/FTDにおけるTDP-43病変を減少させることができる。

【0272】

AMDは、変性疾患であり、先進国における失明の主要原因である。これは、網膜の中心近傍の小さな点であり鮮明な中心視覚に必要な眼の一部である黄斑に、損傷を引き起こす。眼内の変性変化及び視覚の喪失は、リソソーム機能の障害及び網膜後部の有害なタンパク質の蓄積に起因し得る(Viri et al., PLoS One. 8(7): e69563, 2013)。疾患が進行するにつれて、中心視覚領域における網膜の感覚細胞が損傷し、中心視覚の喪失に至る。一部の実施形態では、本明細書に記載のプログラニュリン変異体及び融合タンパク質を使用して、AMDを処置することができる。

【0273】

XVI. 治療方法

本明細書に記載のプログラニュリン変異体または融合タンパク質を使用して、神経変性疾患(例えば、FTD、NCL、NPA、NPB、NPC、C9ORF72関連ALS/FTD、孤発性ALS、AD、ゴーシェ病(例えば、ゴーシェ病2型及び3型)、及びパーキンソン病)、アテローム性動脈硬化症、TDP-43に関連する障害、AMD、またはプログラニュリン関連障害を治療的に処置することができる。

【0274】

本明細書に記載のプログラニュリン変異体または融合タンパク質を対象に、治療有効量または用量で投与することができる。投薬量は、投与頻度、選択された投与経路、組成物の処方、患者応答、状態の重症度、対象の体重、及び処方医の判断を含む複数の因子により変化し得る。投薬量は、個々の患者による必要に応じて、経時的に増加または減少させることができる。一部の実施形態では、患者は最初に低用量を与えられ、次いでこれを、患者に許容される有効な投薬量まで増加させる。

【0275】

様々な実施形態では、本明細書に記載のプログラニュリン変異体または融合タンパク質を任意の経路により投与する。一部の実施形態では、前記タンパク質を非経口送達により投与する。一部の実施形態では、前記タンパク質を静脈内投与する。一部の実施形態では、前記タンパク質を腹腔内送達により投与する。

【実施例】

【0276】

XVII. 実施例

本開示を、具体的な例により、さらに詳細に記載することとする。次の実施例は、例示を目的として提供するものにすぎず、本開示を何らかの手法で限定することを意図したものではない。当業者は、本質的に同じ結果を得るために変更または改変することができる様々な重大ではないパラメータを容易に認めるであろう。使用される数値(例えば、量、温度など)に関して確度を保証する努力は成されているが、多少の実験誤差及び偏差が存在し得る。本開示の実行では、別段に示されていない限り、当技術分野の技能の範囲内のタンパク質化学、生化学、組み換えDNA技術及び薬理学の従来の方法を用いることとする。そのような技術は、文献において完全に説明されている。加えて、ある特定のライブラリに適用されたとおりの操作方法を、本明細書に記載の他のライブラリにも適用することができることは当業者には明らかであるはずである。

【0277】

実施例 1．組み換えFc二量体：PGRN融合タンパク質の発現及び精製

組み換えFc二量体：PGRN融合タンパク質を発現させるために、PEI Max (MW40,000, Linear, Polysciences) を1:4のDNA (μg) 対PEI (μL) の比で用いるGlutamine Synthetase (GS) ノックアウトチャイニーズハムスター卵巣 (CHO) K1細胞 (Horizon Discovery) の一過性トランスフェクションにより、コンストラクトを発現させた。細胞を初めに増殖させ、かつBalanced Transfectory CHO (Irvine Scientific) 中で、37℃でトランスフェクトした。トランスフェクション後に、細胞培養温度を32℃にシフトさせ、培養の持続期間を5%CO₂及び湿度80%で、オービタルシェーカー (Infors Multitron) 内で維持した。栄養素供給物であるBalanced CHO Feed 4 (Irvine Scientific) を培養の1日目に、初期培養体積の20%で添加した。7日後に、タンパク質を遠心により採取し、続いて、0.22 μm PES フィルターを用いて濾過した。

10

20

30

40

50

【0278】

HEK細胞で発現される融合タンパク質については、Expi293 (ThermoFisher) において、製造者指示 (ThermoFisher) に従ってExpiFectamine (商標) 293 / プラスミドDNA複合体を細胞に、密度 2×10^6 細胞/mLでトランスフェクトした。トランスフェクション後に、細胞を37℃で、CO₂ 6~8%の加湿雰囲気、オービタルシェーカー (Infors HT Multitron) 内でインキュベートした。トランスフェクション後1日目に、ExpiFectamine (商標) トランスフェクション促進剤1及び2を培養物に添加した。培地上清をトランスフェクションから96時間後に遠心により採取した。清澄化上清に、EDTA非含有プロテアーゼ阻害薬 (Roche) を補充し、-80℃で貯蔵した。

【0279】

組み換え融合タンパク質精製のために、清澄化培地上清をHiTrap MabSelect Prisma Protein Aアフィニティーカラム (GE Healthcare Life Sciences) に負荷し、0.5M NaClを含むPBS緩衝液、pH7.4中0.5% (v/v) Triton X-100) で洗浄した。融合タンパク質を、100mM NaClを含む50mMクエン酸緩衝液、pH3.5~3.6で溶離した。アフィニティーカラムからの溶離液を(1) 1×PBSの最終緩衝液へのタンデム緩衝液交換 (tandem buffer exchange) のために、HiTrap (登録商標) 脱塩カラム (GE Healthcare Life Sciences) に負荷するか、または(2) 溶離液のpHを調節するために、アルギニン-コハク酸緩衝液 (1Mアルギニン、685mMコハク酸、pH5.0) を添加することにより中和した。ある特定の融合タンパク質では、アフィニティーカラムからの溶離液を、カチオン交換カラム (SP HP、HiTrap (商標)) に負荷して、200mM NaCl、pH5.0でカラムを洗浄することによりさらに処理した。次いで、融合タンパク質を、20カラム体積超のNaCl溶液の勾配 (200mM~500mM) を適用することによりカラムから溶離した。次いで、タンパク質95%超を含有する画分を一緒にプールした。プールした画分に、硫酸アンモニウムを約1Mの最終濃度まで添加し、その後、溶液を、疎水性相互作用カラム (Butyl HP、HiTrap (商標)) に負荷した。カラムを0.1Mクエン酸緩衝液中1M硫酸アンモニウム、pH6.0で洗浄し、20カラム体積超の硫酸アンモニウムの勾配 (1Mから0へ) を適用することにより、タンパク質を溶離した。タンパク質95%超を含有するプールした画分を合わせ、スクロース6%を含有する10mMリン酸ナトリウム緩衝液中で透析した。精製タンパク質を10mMリン酸ナトリウム、スクロース6%、pH6.5で得た。下の表2及び3は、例示的な融合タンパク質の配列を示している。

【0280】

図1A及びBは、融合タンパク質が純度98%超まで精製されたことを示す代表的なデータを含む。

【 0 2 8 1 】

(表 2) Fc 二量体：PGRN 融合タンパク質の配列

Fc 二量体:PGRN	第1のFcポリペプチド	第2のFcポリペプチド-PGRN
融合体 1	配列番号 75	配列番号 98
融合体 2	配列番号 75	配列番号 99
融合体 3	配列番号 75	配列番号 100
融合体 4	配列番号 75	配列番号 101
融合体 5	配列番号 75	配列番号 102
融合体 6	配列番号 85	配列番号 98
融合体 7	配列番号 85	配列番号 99
融合体 8	配列番号 85	配列番号 100
融合体 9	配列番号 85	配列番号 101
融合体 10	配列番号 85	配列番号 102
融合体 11	配列番号 85	配列番号 108
融合体 32	配列番号 75	配列番号 123
融合体 34	配列番号 75	配列番号 124
融合体 36	配列番号 75	配列番号 125
融合体 37	配列番号 75	配列番号 126

10

【 0 2 8 2 】

(表 3) Fc 二量体：PGRN 融合タンパク質の追加の配列

Fc 二量体:PGRN	第1のFcポリペプチド	第2のFcポリペプチド-PGRN		
		部分的ヒンジ + Fc	リンカー	PGRN 変異体
融合体 12	配列番号 85	配列番号 110	配列番号 91	配列番号 111
融合体 13	配列番号 85	配列番号 110	配列番号 91	配列番号 112
融合体 14	配列番号 85	配列番号 110	配列番号 91	配列番号 113
融合体 15	配列番号 85	配列番号 110	配列番号 91	配列番号 114
融合体 16	配列番号 85	配列番号 110	配列番号 91	配列番号 115
融合体 17	配列番号 85	配列番号 110	配列番号 91	配列番号 116
融合体 18	配列番号 85	配列番号 110	配列番号 91	配列番号 117
融合体 19	配列番号 85	配列番号 110	配列番号 91	配列番号 118
融合体 20	配列番号 85	配列番号 110	配列番号 91	配列番号 119
融合体 21	配列番号 85	配列番号 110	配列番号 91	配列番号 120
融合体 22	配列番号 85	配列番号 110	配列番号 91	配列番号 121
融合体 23	配列番号 75	配列番号 110	配列番号 91	配列番号 4
融合体 24	配列番号 75	配列番号 110	配列番号 91	配列番号 5

20

30

40

50

Fc 二量体:PGRN	第1のFcポリペプチド	第2のFcポリペプチド-PGRN		
		部分的ヒンジ+ Fc	リンカー	PGRN 変異体
融合体 25	配列番号 75	配列番号 110	配列番号 91	配列番号 6
融合体 26	配列番号 75	配列番号 110	配列番号 91	配列番号 7
融合体 27	配列番号 75	配列番号 110	配列番号 91	配列番号 8
融合体 28	配列番号 75	配列番号 110	配列番号 91	配列番号 9
融合体 29	配列番号 75	配列番号 110	配列番号 91	配列番号 10
融合体 30	配列番号 75	配列番号 110	配列番号 91	配列番号 11
融合体 31	配列番号 75	配列番号 110	配列番号 91	配列番号 12
融合体 32	配列番号 75	配列番号 110	配列番号 91	配列番号 13
融合体 33	配列番号 75	配列番号 110	配列番号 91	配列番号 14
融合体 34	配列番号 75	配列番号 110	配列番号 91	配列番号 15
融合体 35	配列番号 75	配列番号 110	配列番号 91	配列番号 16
融合体 36	配列番号 75	配列番号 110	配列番号 91	配列番号 19
融合体 37	配列番号 75	配列番号 110	配列番号 91	配列番号 20
融合体 38	配列番号 75	配列番号 110	配列番号 91	配列番号 21
融合体 39	配列番号 75	配列番号 110	配列番号 91	配列番号 22
融合体 40	配列番号 75	配列番号 110	配列番号 91	配列番号 23
融合体 41	配列番号 75	配列番号 110	配列番号 91	配列番号 24
融合体 42	配列番号 75	配列番号 110	配列番号 91	配列番号 25
融合体 43	配列番号 75	配列番号 110	配列番号 91	配列番号 26
融合体 44	配列番号 75	配列番号 110	配列番号 91	配列番号 30
融合体 45	配列番号 75	配列番号 110	配列番号 91	配列番号 31
融合体 46	配列番号 75	配列番号 110	配列番号 91	配列番号 32
融合体 47	配列番号 75	配列番号 110	配列番号 91	配列番号 33
融合体 48	配列番号 75	配列番号 110	配列番号 91	配列番号 34
融合体 49	配列番号 75	配列番号 110	配列番号 91	配列番号 35
融合体 50	配列番号 75	配列番号 110	配列番号 91	配列番号 36
融合体 51	配列番号 75	配列番号 110	配列番号 91	配列番号 37
融合体 52	配列番号 75	配列番号 110	配列番号 91	配列番号 38
融合体 53	配列番号 75	配列番号 110	配列番号 91	配列番号 39
融合体 54	配列番号 75	配列番号 110	配列番号 91	配列番号 40
融合体 55	配列番号 75	配列番号 110	配列番号 91	配列番号 41
融合体 56	配列番号 75	配列番号 110	配列番号 91	配列番号 42
融合体 57	配列番号 75	配列番号 110	配列番号 91	配列番号 43
融合体 58	配列番号 75	配列番号 110	配列番号 91	配列番号 44
融合体 59	配列番号 75	配列番号 110	配列番号 91	配列番号 45
融合体 60	配列番号 75	配列番号 110	配列番号 91	配列番号 46
融合体 61	配列番号 75	配列番号 110	配列番号 91	配列番号 47
融合体 62	配列番号 75	配列番号 110	配列番号 91	配列番号 48
融合体 63	配列番号 75	配列番号 110	配列番号 91	配列番号 49
融合体 64	配列番号 75	配列番号 110	配列番号 91	配列番号 50
融合体 65	配列番号 75	配列番号 110	配列番号 91	配列番号 51
融合体 66	配列番号 75	配列番号 110	配列番号 91	配列番号 52
融合体 67	配列番号 75	配列番号 110	配列番号 91	配列番号 53
融合体 68	配列番号 75	配列番号 110	配列番号 91	配列番号 54
融合体 69	配列番号 75	配列番号 110	配列番号 91	配列番号 56
融合体 70	配列番号 75	配列番号 110	配列番号 91	配列番号 57
融合体 71	配列番号 75	配列番号 110	配列番号 91	配列番号 127
融合体 72	配列番号 75	配列番号 110	配列番号 91	配列番号 128

10

20

30

40

【0283】

実施例 2. Fc 二量体: PGRN 融合タンパク質の C 末端切断のトップダウン質量分析

Exactive plus EMR 質量分析計に連結された Thermo Ultimate 3000 UHPLC を使用して、ペプチドマッピングにより、またはトップダウン質量分析法により、CHO 細胞から発現されて精製されたインタクトな Fc 二量体: PGRN 融合タンパク質を測定した。比較のために、HEK293 細胞または CHO 細胞で発現された野生型 PGRN 配列を含有する融合タンパク質 (融合体 11) も評価した。

【0284】

50

トップダウン質量分析

PBS緩衝液または配合緩衝液（10 mMリン酸緩衝液、pH 6.5、6%スクロース）中のおよそ10 µgの試料を分析のために注入した。Thermo MabPAC RPLカラム（4 µm、2.1×50 mm、P/N 88648）を用いて、55℃のカラム温度で、H₂O中の0.1トリフルオロ酢酸（TFA）の移動相（A）及びアセトニトリルの移動相（B）を0.3 mL／分の流速で用いて、液体クロマトグラフィー（LC）を実行した。勾配を（B）20%で開始し、（B）70%まで増加させ、その後、（B）20%に戻した。214 nm及び280 nmでUV／Visを用いて、検出を実施した。EMR質量分析計を2つのALL Ion Fragmentation Analysis（AIF）スキャンで操作した。

【0285】

第1のAIF設定：スキャン範囲350～5000 m/z。CE：25。インソースCID 90 eV。解像度設定：17, 500及びAGCターゲット3e6、最大IT：200 ms。マイクロスキャン：1。

【0286】

第2のAIF設定：スキャン範囲350～5000 m/z。CE：200。インソースCID 90 eV。解像度設定：35, 000及びAGCターゲット1e6、最大IT：200 ms。マイクロスキャン：5。

【0287】

エレクトロスプレーイオン化（ESI）源条件：シースガス流速：25、Auxガス速度：4。スプレー電圧3 kV、キャピラリー温度325℃、SレンズRFレベル125。Auxガスヒーター温度300℃。EMRモード、オン。捕捉ガス圧設定2.0。

【0288】

トップダウン気相反応は、PGRNのC末端の切断を、アスパラギン酸（D）及びプロリン（P）（これらは、配列番号2の569位及び570位に対応する）のアミノ酸の間で誘導して、異なるプログラニユリン変異体の別個のC末端配列に対応する配列を有する7アミノ酸長のインタクトなペプチドを生成した。切断されたペプチドは、C末端からの連続喪失を呈した。ペプチドXICピークを、20 ppm（百万分率）を使用して抽出し、曲線下面積（AUC）を使用して、全タンパク質に対するインタクトなタンパク質のパーセンテージを計算した。

【0289】

ペプチドマッピング分析

試料を調製するために、50 mM炭酸水素塩（pH 7.8）中のおよそ40 µgの試料をAspN（New England Biolabs、Cat. P8014S）と共に、1：40（w/w）の酵素：タンパク質比で、30分間にわたって37℃でインキュベートした。ギ酸（1%）を添加して反応をクエンチし、試料を分析のためにLCMSバイアルに移した。UV／Vis及びQ Exactive Orbitrapエレクトロスプレーイオン化質量分析計（Thermo Scientific、CA, USA）に連結されたUHPLC Vanquish（Thermo Scientific、CA, USA）での液体クロマトグラフィーにより、ペプチドマッピング分析を実行した。各分析のために、0.20 mL／分の流速を用いて、40℃で、陽イオン化モード下で、試料25 µLをCSH C18 1.7 µm、2.1×150 mmカラム（Waters）に注入した。移動相Aは、0.1%ギ酸を含む水からなり、移動相Bは、0.1%ギ酸を含むアセトニトリルからなった。勾配を（B）1%で開始し、50分かけて3ステップで（B）1%から10%、（B）10%から40%まで、及び（B）40%から70%まで増加させ、その後、（B）1%に戻した。UV／Visトレースを280 nm及び214 nmの波長で記録し、ポジティブモード下でのFull MS-ddMS2捕捉を使用して、データを収集した。ピーク面積を使用して、インタクトなペプチド及び切断されたペプチドのパーセンテージを計算した。

【0290】

10

20

30

40

50

下の表 4 は、融合体 1 の 95 % 超が、インタクトな C 末端を有し、かつ融合体 2 の 80 % 超が、インタクトな C 末端を有することを示している。短縮型融合タンパク質（例えば、C 末端で 1 ～ 3 個のアミノ酸を失っている融合タンパク質）の存在は、5 % 未満（融合体 1）及び 20 % 未満（融合体 2）であった。表 4 において、「-L」、「-IL」、「-PIL」、「-FL」、及び「-PFL」は、融合タンパク質から切断された末端アミノ酸を指す。追加の融合タンパク質でのデータは、表 8 A 及び 8 B において見い出すことができる。基準点として、HEK 細胞で発現された場合、野生型 PGRN を含有する融合タンパク質（融合体 11）の約 95 % がインタクトなままであった一方で、CHO 細胞で発現された場合、融合体 11 の 7 % がインタクトなままであった。

【0291】

（表 4）

	融合体 1 (PIL)			融合体 2 (PFL)	
	エリア数	相対面積%		エリア数	相対面積%
インタクト	50114249	95.6	インタクト	41831754	80.3
-L	2206596	4.2	-L	9100294	17.5
-IL	12728	0.0	-FL	529791	1.0
-PIL	76847	0.1	-PFL	608392	1.2

【0292】

実施例 3．熱安定性及び凍結解凍安定性

融合タンパク質の熱安定性を Prometheus 機器 (NanoTemper) により測定した。溶融プロファイル (T_m 、 T_{onset}) を作成するために、内部蛍光を使用して、温度上昇中のタンパク質をモニタリングする。融合体 1 及び融合体 2 での結果を図 2 に例示する。

【0293】

融合タンパク質に対して凍結解凍分析を行った。簡単に述べると、タンパク質試料をドライアイス上で約 10 分間にわたってインキュベートし、その後、試料を室温にして、30 分間インキュベートした。その凍結解凍サイクルを 5 回繰り返し、その後、試料を 4℃ にし、SEC-HPLC (Waters BEH SEC カラム、200 Å 1.7 µm、30 cm、10 % (v/v) エタノールを含む 2 × PBS の移動相を使用、流速 0.2 mL/分) を使用して分析した。融合体 1 及び融合体 2 の結果は図 3 に図示されている。

【0294】

融合体 1 及び融合体 2 で得られた結果 (図 2 及び 3) は、その 2 つの融合タンパク質が良好な熱安定性及び良好な凍結解凍安定性を有することを示している。

【0295】

実施例 4．ソルチリンへの組み換え Fc 二量体：PGRN 融合タンパク質の結合

GE Healthcare Biacore 8K 機器で、Series S Sensor Chip CM5 及び HBS-EP + 泳動緩衝液を用いて 25℃ で、すべての表面プラスモン共鳴 (SPR) 実験を実行した。ソルチリンについての Fc 二量体：PGRN 融合タンパク質の結合親和性を測定するために、GE Healthcare Human Antibody Capture Kit (ヒトソルチリン用) または Biacore (商標) Sensor Chip Protein A (カニクイザル及びマウスソルチリン用、Cytiva、#29127555) で固定化されたセンサーチップを用いて、融合タンパク質を捕捉した。マルチサイクルキネティクスを 0.4 nM ～ 100 nM の範囲のソルチリン分析物の 3 倍濃度系列で用いて、300 秒の接触時間、600 秒

の解離時間、及び30 μL／分の流速を可能にした。1：1キネティクスモデルを使用して、ソルチリン結合の結合キネティクスを評価した。ソルチリンへのFc二量体：PGRN融合タンパク質のBiacore結合データは、下の表5～7に示されている。ソルチリン分析物は次のとおり供給された：ヒトソルチリン（R&D Systems）；マウスソルチリン（R&D Systems）；カニクイザルソルチリン（社内、UniProt A0A2K5VHG2に基づく）。

【0296】

表5に示されているとおり、融合体1は、融合体2と比べてヒトソルチリンについて強い親和性を示した。HEK細胞で発現される野生型PGRNを含有する融合タンパク質（融合体11）に対して、融合体1は、融合体2（およそ14倍）よりも、ヒトソルチリンについて、結合親和性のより小さな低下（およそ3倍）を示した。ヒトソルチリン結合親和性の低下は、野生型PGRN融合タンパク質と比べて、融合体1及び融合体2の両方についての急速なオフレートキネティクスから生じていると考えられる。HEK細胞で発現される野生型PGRN融合タンパク質（融合体11）に対して、融合体1は、マウスソルチリンについてはほぼ同じ結合親和性、及びカニクイザルソルチリンについては約2～3倍弱い結合親和性を示した。

【0297】

（表5）ヒトソルチリン結合

融合タンパク質	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	融合体11 (HEK) との 倍数差
融合体11 (HEK)	1.08E+05	1.66E-03	1.53E-08	1.0
融合体1 (CHO)	9.59E+04	4.66E-03	4.85E-08	3.2
融合体2 (CHO)	8.50E+04	1.82E-02	2.14E-07	14.0

【0298】

（表6）マウスソルチリン結合

融合タンパク質	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)
融合体11 (HEK)	3.87×10^4	2.94×10^{-3}	7.61×10^{-8}
融合体1 (CHO)	2.03×10^5	1.38×10^{-2}	6.38×10^{-8}

【0299】

（表7）カニクイザルソルチリン結合

融合タンパク質	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)
融合体11 (HEK)	5.38×10^4	1.43×10^{-3}	2.65×10^{-8}
融合体1 (CHO)	4.49×10^4	2.96×10^{-3}	6.58×10^{-8}

【0300】

追加の融合タンパク質のソルチリン結合をSPR（前出に記載）により、または固定化ソルチリンへのFc二量体：PGRN融合タンパク質の結合を測定する標準的な比色ELISAアッセイにより分析した。ELISAにより測定するために、組み換えHisタグ付きソルチリン（R&D Systems、Cat. 3154-ST-050）を、ニッケルコーティングされた96ウェルプレート上に固定化した。インタクトなタンパク質及びC末端切断されたタンパク質の混合物を含有する融合タンパク質（表8A及び8B中の「インタクト%」）を系列希釈法で3%BSA／TBST中で希釈して、コーティングされたウェルに添加した。融合タンパク質と共に室温で2時間にわたってインキュベートした後に、ウェルをTBSTで洗浄した。3%BSA／TBST中で希釈された抗ヒトIgG抗体（ヤギ抗ヒトIgG HRP抗体、Jackson ImmunoResearch

h Cat. 109-035-088) と共に、室温で1時間にわたってインキュベートすることにより、結合した融合タンパク質を検出した。検出抗体と共にインキュベートした後に、ウェルをTBSTで洗浄し、TMB溶液 (Surmodics、Cat. TMB W-1000-01) と共に5分間にわたってインキュベートした。顕色反応を450nm停止液 (Surmodics、Cat. LSTP-1000-01) で停止し、Bio Tek Synergy Plate Reader (Model Neo2) を使用して、吸光度を450nmで測定した。例示的な融合タンパク質での結果を表8A及び8Bに提示する。示されている場合を除いて、表8A及び8Bに列挙されているすべての融合タンパク質はCHO細胞から発現させた。

【0301】

(表8A)

融合タンパク質	下記による QLLの置換	インタクト% (トップ ダウンMS)	インタクト% (ペプチド マッピング)	ソルチリン EC50 (nM) (ELISA)	EC50における 倍数差
融合体 11 (HEK)	---	95%	---	2.8	1.0
融合体 11 (CHO)	---	7%	---	60±12.7	21.0
融合体 6	PIL	98%	---	13.5	4.8
融合体 7	PFL	87%	---	14.3	5.1
融合体 8	QQL	59%	---	19.1	6.8
融合体 9	VVL	39%	---	18.6	6.6
融合体 10	VTL	29%	---	23.9	8.5
融合体 12	NIL	3%	---	34.4	12.3
融合体 13	LLL	< 1%	---	56.5	20.2
融合体 14	PLL	< 1%	---	55	19.6
融合体 15	PRL	< 1%	---	120	42.9
融合体 16	YIL	---	0.6%	> 100	> 50
融合体 17	VLL	---	2.5%	> 100	> 50
融合体 18	VIV	---	35%	> 100	> 50
融合体 19	FIL	---	4.4%	> 100	> 50
融合体 20	MLL	---	0.7%	> 100	> 50
融合体 21	QLLG (配列番号142)	0%	---	> 100	> 50
融合体 22	QLLGK (配列番号 143)	0%	---	> 100	> 50

【0302】

(表8B)

10

20

30

40

50

融合タンパク質	下記による QLLの置換	インタクト% (ペプチド マッピング)	ソルチリンK _D (M) (SPR)	K _D における倍数差
融合体 11 (HEK)	---	85.8%	9.70E-09	1.0
融合体 1	PIL	91.0%	3.27E-08	3.4
融合体 23	PHL	---	5.18E-08	5.3
融合体 24	PKL	38.0%	1.10E-08	1.1
融合体 25	PDL	---	4.88E-08	5.0
融合体 26	PEL	51.4%	2.98E-08	3.1
融合体 27	PSL	---	7.96E-08	8.2
融合体 28	PTL	---	5.51E-08	5.7
融合体 29	PNL	---	1.04E-07	10.7
融合体 31	PGL	---	4.67E-08	4.8
融合体 32	PPL	89.70%	9.30E-09	1.0
融合体 34	PYL	77.8%	2.62E-08	2.7
融合体 35	PVL	---	4.57E-08	4.7
融合体 36	QRL	64.7%	1.24E-08	1.3
融合体 37	QHL	62.6%	1.17E-08	1.2
融合体 38	QKL	62.7%	1.57E-08	1.6
融合体 39	QDL	---	4.04E-08	4.2
融合体 41	QNL	36.5%	2.68E-08	2.8
融合体 42	QPL	---	6.25E-08	6.4
融合体 52	EFL	0.00%	6.84E-09	0.7
融合体 54	TFL	0.0%	1.66E-08	1.7
融合体 60	RQL	0.10%	7.75E-09	0.8
融合体 62	KQL	2.4%	1.91E-08	2.0
融合体 68	YQL	0.60%	8.81E-09	0.9
融合体 70	QLLLRQLL (配列番号 60)	5.0%	1.19E-08	1.2

10

20

30

【0303】

融合体30、33、40、43～51、53、55～59、61、62～67、69、71、及び72は、SPRにより測定すると、ソルチリン結合をほとんど示さないか、まったく示さなかった。

【0304】

融合体1及び融合体2を、ヒトTfRへの結合について表面プラズモン共鳴（SPR）によってもアッセイした。表面プラズモン共鳴（SPR）実験を、GE Healthcare Biacore 8K機器で、Series S Sensor Chip CM5及びHBS-EP+泳動緩衝液を用いて25℃で実行した。hTfRについての融合タンパク質の結合親和性を測定するために、センサーチップにストレプトアビジンを固定化し、ビオチン化-AviTag-hTfRを捕捉した。シングルサイクルキネティクスを、25nM～2μMの範囲である3倍濃度系列の融合タンパク質分析物で用いて、80秒の接触時間、180秒の解離時間、及び30μL／分の流速を可能にした。定常状態親和性モデルを使用して、融合タンパク質が約50nM～150nMの親和性でhTfRに結合し得ることを実証した。

40

【0305】

50

実施例 5．インビトロ機能アッセイ

Trouplin et al. J. Vis. Exp. 2013 (81) 50966 においてと同様の方法を用いて、BMDMを、GRN KO/hTfR.KIマウスの骨髓からインビトロで得たが（下記）、組み換えM-CSFを細胞増殖培地に直接添加して、分化を誘導した。48時間にわたって、片対数タイトレーションでの融合体11、融合体1、及び融合体2で、BMDMを処理した。細胞脂質を、内部標準混合物を含有するメタノールの添加により抽出し、BMP存在量を、液体クロマトグラフィー質量分析法（LC-MS/MS）によりQ-trap 6500（SCIEX）で測定した。GRN KO/hTfR.KI BMDMは、GRN WT/hTfR.KI BMDMと比べて、BMP36：2の約2.5倍の増加を有した。融合体1及び融合体2の両方が、同等の有効性で、用量依存的にBMP蓄積を回復させた（図5）。野生型PGRNを含有する融合タンパク質（融合体11）と比べて、融合体1は、非常に類似したインビトロ効力を示した。

10

【0306】

液体クロマトグラフィー質量分析法

BMP分析を、エレクトロスプレー質量分析法（Sciex 6500+ QTRAP、Sciex、Framingham, MA, USA）に連結された液体クロマトグラフィー（Shimadzu Nexera X2 system、Shimadzu Scientific Instrument、Columbia, MD, USA）により実行した。各分析で、試料5 µLを、0.40 mL/分の流速を使用して55℃でBEHアミド1.7 µm、2.1×150 mmカラム（Waters Corporation、Milford, Massachusetts, USA）上に注入した。移動相Aは、10 mMギ酸アンモニウム+0.1%ギ酸を含む水からなった。移動相Bは、0.1%ギ酸を含むアセトニトリルからなった。勾配を次のとおりにプログラムした：B95%で0.0~1.0分；1.0~7.0分でB50%に；7.0~7.1分でB95%に；及びB95%で7.1~12.0分。エレクトロスプレーイオン化を、次の設定を用いて陰イオンモードで実行した：カーテングスは25；衝突ガスは中等度に設定；イオンスプレー電圧は-4500；温度は600；イオン源ガス1は50；イオン源ガス2は60；衝突エネルギーは-50、CXPは-15；DPは-60；EPは-10；滞留時間は20 ms。Analyst 1.6.3（Sciex）を多重反応モニタリングモード（MRM）で、以前に記載されたもの（Ullman et al. 2020. Sci Transl Med 12 (545) : eaay1163）と同様の収集パラメーターでを使用して、データ収集を実行した。MRM遷移パラメーターを用いて、BMP種を検出した。内部標準としてBMP（14：0__14：0）を使用して、BMP種を定量化した。BMP種をそれらの保持時間及びMRM特性に基づき同定した。同位体重複について補正した後に、MultiQuant 3.02（Sciex）を用いて、定量化を実行した。BMP種を総タンパク質量、組織重量または生物体液体積のいずれかに対して正規化した。ピシンコニン酸（BCA）アッセイ（Pierce、Rockford, IL, USA）を使用して、タンパク質濃度を測定した。

20

30

【0307】

ブリカーサー（Q1）[M-H]⁻及びプロダクトイオン（Q3）m/z遷移を使用して、BMP種を測定した。本明細書では、略語を使用して、2つの側鎖を有する種に言及するが、その際、脂肪酸側鎖の構造を、BMPフォーマットの括弧内に示す（例えば、BMP（18：1__18：1））。数字は、脂肪酸炭素原子の数：二重結合の数の標準的な脂肪酸表記フォーマットに従っている。別法では、BMP種は、一般的に、炭素原子の総数：二重結合の総数により言及され得；同様の値を有する種は、それらのQ1及びQ3値により識別され得る。

40

【0308】

実施例 6．GRN KO/hTfR.KIマウスにおいて融合タンパク質はBBBを通過して、関連する薬力学的エンドポイントを補正する

50

BBBを通過するその能力を試験するために、融合体1（表2）を、hTfR KIマウスと交雑させたGRN KOマウス（Jackson Laboratory、Stock No. 013175）（GRN KO/hTfR. KIマウス）に、尾静脈を介して注射した。hTfR KIマウスは国際特許公開WO2018152285に記載されている。GRN KO/hTfR. KIマウスを作製するために、第1のラウンドの交配で、GRNヘテロ接合型（GRN HET）マウスをTfR^{ms}/hu KIホモ接合型（TfR^{ms}/hu. KI HOM）マウスと交雑させて、GRN HET×TfR^{ms}/hu. KI HET後代を作製した。次いで、GRN HET×TfR^{ms}/hu. KI HETマウスをTfR^{ms}/hu. KI HOMマウスと交雑させて、この第2のラウンドでGRN HET×TfR^{ms}/hu. KI HOM後代を得た。第3の最終ラウンドの交配で、GRN HET×TfR^{ms}/hu. KI HOMマウスをGRN HET×TfR^{ms}/hu. KI HOMマウスと交雑させて、最終のGRN KO×TfR^{ms}/hu. KI HOMマウスを作製し、それをこの研究で使用した。

10

【0309】

2～3か月齢のGRN KO/hTfR. KIマウスに、単回用量の滅菌生理食塩水（ビヒクル）または0.5、1.5、5、もしくは15mg/kgの融合体1を、尾静脈を介して静脈内投与した。血漿単離のために、投与後3日目に、マウスから、顎下採血により採血した。投与後7日目に、マウスをアベルチンで鎮静させ、心臓穿刺を実行して、血漿単離のために全血を収集した。動物を、5mL/分の速度で、5～8分にわたって、または肝臓から血液が除去されるまで、冷却した1×PBSで経心的に灌流した。肝臓及び脳の左半球の一部分100mgを収集した。血液試料を4℃にて1000×gで遠心し、その後、上部血漿層を取り出し、ドライアイスで瞬間凍結し、下記のとおり分析するまで－80℃以下で貯蔵した。すべての組織試料を直ちにドライアイスで瞬間凍結し、下記のとおり分析するまで－80℃以下で貯蔵した。

20

【0310】

（表9）研究設計／実験群

分子	細胞株	遺伝子型	用量 (mg/kg)	N/群
生理食塩水	N/A	TfR.KI	N/A	8
生理食塩水	N/A	GRN KO/TfR.KI	N/A	6
融合体 1	CHO	GRN KO/TfR.KI	0.5	6
融合体 1	CHO	GRN KO/TfR.KI	1.5	6
融合体 1	CHO	GRN KO/TfR.KI	5	6
融合体 1	CHO	GRN KO/TfR.KI	15	6

30

【0311】

組織試料において融合タンパク質含有率を測定するために、組織試料を秤量し、1×プロテアーゼ阻害薬（Roche）及び1×ホスファターゼ阻害薬（Roche）を補充された10倍重量体積（volume by weight）の細胞溶解緩衝液（Cell Signaling Technologies；20mMトリス-HCl pH7.5、150mM NaCl、1mM Na₂EDTA、1mM EGTA、1% Triton、2.5mMピロリン酸ナトリウム、1mMベータグリセロホスファート、1mM Na₃VO₄、及び1μg/mLロイペプチン）中で均質化した。Tissue Lysateを3mm金属ビーズと共に2×3分間にわたって29Hzで使用して、試料を均質化した。均質化の後に、テーブルトップ型遠心分離器で、最大速度で、20分間にわたって4℃で試料を回転させた。上清を新たな管に移し、上清の一部をFc-PGRN ELISA

40

50

A アッセイ (Fc 捕捉及び PGRN 検出 ELISA) 及び Fc-Fc ELISA アッセイ (Fc 捕捉及び Fc 検出 ELISA) により分析した。

【0312】

試料での BMP 分析を実施例 5 に記載されているとおりに実施した。

【0313】

可溶性 TREM2 (sTREM2) レベルを次のとおりに測定した: Trem2 アッセイのために、 $1\mu\text{g}/\text{mL}$ ビオチン化ヒツジ抗マウス抗体 (R&D Systems BAF1729) で終夜、 4°C でコーティングすることにより、MSD GOLD 96w スモールスポットストレプトアビジンプレート (MSD L45SA) を調製した。翌日、MSD プレートを、トリトンを含むトリス緩衝生理食塩水 (TBST) ですすぎ、かつ 2 時間にわたって、TBST 中 3% ウシ血清アルブミンを用いて、 600rpm で振盪しながらブロックした。MSD プレートを再び、TBST ですすぎ、脳溶解産物を遮断溶液中で 5 倍希釈し、MSD プレートに添加して、1 時間にわたって 600rpm でインキュベートした。次の TBST でのすすぎの後に、スルホタグ付きヒツジ抗マウス抗体 (R&D Systems AFI729) をプレートに添加し、1 時間にわたって、再び 600rpm でインキュベートし、最後のすすぎを行い、その後、水中で希釈された $2\times\text{MSD}$ 読出し緩衝液を添加した。次いで、プレートを、MSD Meso Sector S600 を使用して読み取った。Trem2 シグナルをタンパク質濃度に対して正規化し、GraphPad Prism でプロットした。

【0314】

図 6A~6C は、GRN KO/hTfR. KI マウスの血漿、脳、及び肝臓における融合体 1 の薬物動態を図示している。中空の円形は、ビヒクル処置 GRN WT コホートを表し、四角形はビヒクル処置 GRN KO コホートを表す。融合タンパク質処置 GRN KO コホートは、三角形 ($15\text{mg}/\text{kg}$)、ひし形 ($5\text{mg}/\text{kg}$)、アステリスク ($1.5\text{mg}/\text{kg}$) 及び×印 ($0.5\text{mg}/\text{kg}$) により表されている。すべての用量で、投与後 7 日目に、融合タンパク質が血漿、脳及び肝臓から除去され、その際、組織中で検出されるタンパク質は 0.1nM 未満であり、かつ血漿中で検出されるタンパク質では約 1nM であった。

【0315】

図 7A 及び 7B は、投与後 7 日目の GRN KO/hTfR. KI マウスの脳及び肝臓組織における TREM2 レベルを図示している。中空の円形は、ビヒクル処置 GRN WT コホートを表し、四角形はビヒクル処置 GRN KO コホートを表す。融合タンパク質処置 GRN KO コホートは、三角形 ($15\text{mg}/\text{kg}$)、ひし形 ($5\text{mg}/\text{kg}$)、アステリスク ($1.5\text{mg}/\text{kg}$) 及び×印 ($0.5\text{mg}/\text{kg}$) により表されている。脳では $5\text{mg}/\text{kg}$ 及び $15\text{mg}/\text{kg}$ の用量レベルで TREM2 レベルを回復させることができた一方で、肝臓では $1.5\text{mg}/\text{kg}$ の低い用量レベルでも TREM2 レベルを回復させることができた。

【0316】

図 8A 及び 8B は、投与後 7 日目の GRN KO/hTfR. KI マウスの脳及び肝臓組織における BMP ($18:1/18:1$) のレベルを図示している。中空の円形は、ビヒクル処置 GRN WT コホートを表し、四角形はビヒクル処置 GRN KO コホートを表す。融合タンパク質処置 GRN KO コホートは、三角形 ($15\text{mg}/\text{kg}$)、ひし形 ($5\text{mg}/\text{kg}$)、アステリスク ($1.5\text{mg}/\text{kg}$) 及び×印 ($0.5\text{mg}/\text{kg}$) により表されている。脳では $1.5\text{mg}/\text{kg}$ の低い用量レベルでも BMP レベルを回復させることができた一方で、肝臓ではすべての用量で BMP レベルを回復させた。同様の結果が、BMP ($20:4/20:4$) 及び BMP ($22:6/22:6$) を含む他の BMP 種で観察された。

【0317】

図 6A~6C、7A 及び 7B、ならびに 8A 及び 8B のデータは、融合体 1 が GRN KO/hTfR. KI マウスの脳において BBB を通過して、グラニューリン欠損の関連 P

10

20

30

40

50

Dエンドポイントを補正することができることを示している。

【0318】

実施例7. GRN KO/hTfR. KIマウスの脳組織におけるグルコシルスフィンゴシンレベルの回復

脂質抽出及びグルコシルスフィンゴシン分析のための脳収集及び処理

融合体1(表2に記載のとおり)またはいずれのTfR結合能も有さない対応する融合タンパク質を、単回用量で、尾静脈を介して5mg/kgで、GRN KO/hTfR. KIマウス(図9における「Grn KO」)に注射した。対応する融合タンパク質は、配列番号122の配列を有する第1のポリペプチドと、配列番号108の配列を有する第2のポリペプチドとを含む。両方の融合タンパク質を、実施例1に記載されているとおり
10
にCHO細胞から発現させて、精製した。融合タンパク質の投与後7日目に、マウスを殺して、脳、肝臓及び血漿におけるグルコシルスフィンゴシン(GlcSph)レベルを検査した。致死量のトリプロモエタノールで麻酔をかけた後に、マウスを、氷冷PBSで心臓灌流した。次いで、前頭葉18~20mgを氷上で収集し、秤量し、1.5 Safe-Lockエッペンドルフ管に、3mmステンレス鋼床と一緒に移し、次いで、急速冷凍させた。リピドーム分析用に脳試料を調製するために、LCMSグレードのメタノール400μLを内部標準と共に試料に添加した。次いで、組織を、Qiagen Tissue
20
lyserを用いて30秒間にわたって、4℃にて25Hzで均質化した。次いで、試料を20分間にわたって4℃にて21,000xgで遠心した。回転の後に、上清を96ウェルV底ハーフディープウェルプレートに移し、-20℃で1時間にわたって貯蔵して、タンパク質をさらに沈澱させた。このインキュベーションの後に、試料をさらに10分間にわたって、4℃にて21,000xgで回転させた。100μLの上清を、ガラス
インサートを備えた96ウェルプレート(Analytical Sales & Services、Ref# 27350)に移した。次いで、試料を窒素流下で乾燥させ(約2時間)、次いで、5mMギ酸アンモニウム及び0.5%ギ酸を含むアセトニトリル/
イソプロパノール/水100μL(92.5/5/2.5、v/v/v)に再懸濁させた。

【0319】

グルコシルスフィンゴシンのためのLCMSアッセイ

グルコシルスフィンゴシン(GlcSph)分析を、エレクトロスプレー質量分析法(Sciex QTRAP 6500+ Sciex、Framingham、MA、USA)に連結した液体クロマトグラフィー(Shimadzu Nexera X2 system、Shimadzu Scientific Instrument、Columbia、MD、USA)により実行した。各分析のために、0.45mL/分の流速を使用して45℃で、試料10μLをHALO HILIC 2.0μm、3.0×150mmカラム(Advanced Materials Technology、PN 91813-701)に注入した。移動相Aは、5mMギ酸アンモニウム及び0.5%ギ酸を含む92.5/5/2.5のACN/IPA/H2Oからなった。移動相Bは、5mM
30
ギ酸アンモニウム及び0.5%ギ酸を含む92.5/5/2.5のH2O/IPA/ACNからなった。勾配は次のとおりにプログラムした：B100%で0.0~3.1分、B95%で3.2分、B85%で5.7分、B85%で7.1分まで保持、7.25分でB0%に低下、8.75分まで保持、10.65分で100%まで増加させて戻して11分まで保持。エレクトロスプレーイオン化を、次の設定を適用して陽イオンモードで実行した：カーテングスは25；衝突ガスは中等度に設定；イオンスプレー電圧は5500；温度は350℃；イオン源ガス1は55；イオン源ガス2は60。Analyst 1.6
40
(Sciex)を多重反応モニタリングモード(MRM)で次のパラメーターでを使用して、データ収集を実行した：滞留時間(ms)及び衝突エネルギー(CE)；エントランスポテンシャル(EP)は10；及び衝突セルイグジットポテンシャル(CXP)は12.5。データ収集パラメーターは、以前に記載されたもの(Ullman et al.
50
、2020. Sci Transl Med 12(545)：eay1163)と同

様であった。G l c S p hを、同位体標識内部標準G l c S p h (d 5) を使用して定量化した。M u l t i Q u a n t 3 . 0 2 (S c i e x) を用いて、定量化を実行した。

【0320】

グルコシルスフィンゴシンの脳での結果

GRN KO及びGRN WTマウス、さらには5mg/kg用量の融合体1または対応する融合タンパク質をIV投与されたGRN KOマウスの脳におけるG l c S p hレベルを評価した(図9)。GRN KO脳のG l c S p hレベルは平均で、WT同腹子の4.13倍の値であった(それぞれ $23.91 \pm 1.963 \text{ ng} / \mu\text{L}$ vs. $5.782 \pm 1.262 \text{ ng} / \mu\text{L}$ 、 $p < 0.0001$)。融合体1処置マウスでは、GRN WTマウスに対して88%の回復があった($7.866 \pm 0.8237 \text{ ng} / \mu\text{L}$ 、 $p = 0.0002$)。逆に、非CNS標的化の対応融合タンパク質で処置されたGRN KOマウスは、WT G l c S p hレベルに対して22%の回復しか示さなかった($19.92 \pm 3.486 \text{ ng} / \mu\text{L}$ 、 $p = 0.5619$)。

10

【0321】

実施例8. GRN KO/hTfR. KIマウスにおけるBMP及びグルコシルスフィンゴシン補正の永続性

融合体1(表2に記載のとおり、実施例1に記載のとおりCHO細胞から発現及び精製)を単回用量で尾静脈を介して、次の用量でGRN KO/hTfR. KIマウスに注射した: 1mg/kg、2.5mg/kg、及び5mg/kg。対照のために、GRN KO/hTfR. KI及びGRN野生型/hTfR. KIマウスに生理食塩水を注射した。

20

融合タンパク質または生理食塩水の投与後2、3及び6週間目に、マウスのコホートを殺して、脳におけるBMP及びグルコシルスフィンゴシン(G l c S p h)レベルを検査した。マウスに麻酔をかけ、それらの脳組織を実施例7に記載のとおり調製した。BMP及びG l c S p hレベルをそれぞれ、実施例5及び7に記載のとおり測定した。結果は、図10~12に図示されている。

【0322】

グルコシルスフィンゴシンの脳での結果

GRN KO/hTfR. KI及びGRN野生型/hTfR. KIマウスにおけるグルコシルスフィンゴシン(G l c S p h)レベルを評価した。図10に図示されているとおり、GRN KO/hTfR. KIにおけるG l c S p hレベルは、GRN野生型/hTfR. KIマウスと比べて約4倍上昇した。融合体1の投与はすべての用量で、GRN KO/hTfR. KIにおけるG l c S p hレベルの上昇を補正し、その際、投与された最大用量(5mg/kg)は、すべての融合タンパク質処置コホートの最大の改善を示した。投与後6週間でも部分的な補正が観察されたが、投与後2週目に、融合体1の単回用量で、ほぼGRN野生型レベルへの最大補正が観察された。

30

【0323】

BMPの脳での結果

以前に報告されたとおり、GRN KO/hTfR. KIにおけるBMPレベルは、不十分なレベルのプログラニュリンにより影響を受ける。融合体1をGRN KO/hTfR. KIに投与することで、この影響を補正することができた。代表的なBMP種のレベルは図11及び12に図示されている。融合体1の投与はすべての用量で、GRN KO/hTfR. KIにおけるBMPレベルを補正した。投与された最大用量で、投与後2週目にBMPレベルの最大補正が観察され、その際、投与後3週目に部分的な補正が維持された。

40

【0324】

実施例9. GRN KO/hTfR. KIマウスにおけるGCアーゼ活性の回復

融合体1(表2に記載されているとおり、実施例1に記載のとおりCHO細胞から発現及び精製)を、尾静脈を介して、実施例8に記載の用量で、GRN KO/hTfR. KIマウスに注射した。対照のために、GRN KO/hTfR. KI及びGRN野生型/hTfR. KIマウスに、生理食塩水を注射した。融合タンパク質または生理食塩水の

50

投与後2、3及び6週間目に、マウスのコホートを殺して、脳におけるグルコセレブロシダーゼ（GCアーゼ）酵素活性を検査した。マウスに麻酔をかけ、それらの脳組織を実施例7に記載のとおり調製した。GCアーゼ活性を次のとおりにアッセイした。脳組織をPBS緩衝液中1%NP-40中で溶解させた。脳溶解産物試料における総タンパク質レベルをBCAアッセイにより測定し、試料をGCアーゼ活性の測定のために正規化した。組織試料を初めに、GBA活性緩衝液（0.5%タウロコール酸ナトリウム及び0.25%Triton X-100を含むリン酸クエン酸緩衝液（Sigma-Aldrich cat# P4809））中で希釈し、96ウェルプレートのウェルに添加した。続いて、4-MUGルコース基質（Sigma-Aldrich、Cat. M3633-1G）を1mMの最終濃度まで各試料ウェルに添加した。プレートにカバーをし、700RPMで5分間にわたって室温で攪拌し、その後、非CO₂インキュベーターに移し、37℃で3時間にわたってインキュベートした。インキュベーション期間の終了時に、停止液（500mMグリシン、300mM NaOH、pH9.8）を試料に添加して酵素反応を停止し、BioTekプレートリーダーで酵素活性を測定した。結果は、図13に図示されている。

10

【0325】

図13に図示されているとおり、投与後2週目に、融合体1の投与は、GRN KO/hTfR. KIマウスの脳におけるGCアーゼ活性を野生型レベルまで補正した。

【0326】

実施例10. 融合タンパク質の長期投薬は、GRN KO/hTfR. KIマウスにおいて遠位バイオマーカーを回復させる

20

本明細書に記載のとおり融合タンパク質の長期投薬が遠位バイオマーカーを回復させるか否かを決定するために、研究を実施した。融合タンパク質を、7か月齢GRN KO/hTfR. KIマウスに、5mg/kgで1週間に1回、8週間にわたって腹腔内送達により投与した。対照のために、GRN KO/hTfR. KI及びGRN野生型/hTfR. KIマウス（「hTfR. KIマウス」とも称される）に生理食塩水を注射した。CD4の注射を各コホートのマウスに対して、融合タンパク質の最初の投与と共に開始し、かつその後は、2週ごとに与えた。血漿単離のために、（投与後）0、2、4、6、及び8週目に、血液試料を顎下採血により採血した。融合タンパク質の8回目の最後の投与から24時間後に、マウスのコホートを殺し；末端血液及びCSF試料を得、脳及び肝臓組織を収集し、既に記載したとおりに（実施例6）、保存した。実施例6に記載のFc:Fc:ELISAを使用して、投与された融合タンパク質の量を脳及び肝臓において測定した。BMP、グルコシルスフィンゴシン（GlcSph）、及びTrem2レベルを脳、肝臓、血漿、及び／またはCSFにおいて分析した。加えて、グリオーシスの特定のマーカー（CD68、Iba1、GFAP）を脳組織において分析し、ニューロフィラメント軽鎖（Nf-L）レベルをCSF及び血漿試料において分析した。BMP、TREM2、及びGlcSphレベルをそれぞれ実施例5、6、及び7に記載のとおり測定した。CSF Nf-Lレベル及びグリオーシスマーカーの脳レベルを、下記のとおり測定した。表10は実験設計の概要を提示しており、結果は、図14～28において図示されている。

30

40

【0327】

（表10）長期投薬研究のための研究設計／実験群

分子	第1の Fcポリペプチド	第2の Fcポリペプチド- PGRN	細胞株	遺伝子型	用量 (mg/kg)
生理食塩水	--	--	N/A	hTfR.KI	N/A
生理食塩水	--	--	N/A	<i>GRN</i> KO/hTfR.KI	N/A
融合体 1	配列番号75	配列番号98	CHO	<i>GRN</i> KO/hTfR.KI	5
融合体 11	配列番号85	配列番号108	HEK	<i>GRN</i> KO/hTfR.KI	5
Fc-PGRN (非TfR 結合)	配列番号122	配列番号108	CHO	<i>GRN</i> KO/hTfR.KI	5

10

【0328】

Nf-LのCSF及び血漿分析のための方法

既に記載されたとおりに、また製造者の推奨に従って (Ullman et al. 2020. Sci Transl Med 12 (545): eaay1163)、CSF及び血漿Nf-Lレベルを分析した。簡単に述べると、Quanterix Simoa Neurofilament Light Advantage (NFL) キットを用いる。簡単に述べると、試料希釈剤 (Quanterix 102252) で脳脊髄液を100倍希釈し、血漿を10倍希釈し、次いで、Simoa検出器試薬及びビーズ試薬 (Quanterix 103159、102246) を添加し、試料を30分間にわたって30℃で、800rpmで振盪しながらインキュベートした。この後、Simoa Microplate Washerで、Quanterix 2ステッププロトコルに従って、試料プレートをSimoa Wash Buffer A (Quanterix 103078) で洗浄し、SBG試薬 (Quanterix 102250) を添加し、試料を再び、30℃、800rpmで、さらに10分間にわたってインキュベートした。2ステップウォッシャープロトコルを継続し、その際、緩衝液の最終吸引の前に、試料ビーズをSimoa Wash Buffer B (Quanterix 103079) に2回再懸濁した。10分間にわたって室温で乾燥させた後に、試料Nf-L濃度を、Nf-L分析プロトコルを用いてQuanterix SR-X機器で測定し、Quanterix アッセイキットに備えられている校正曲線に対して挿入した。

20

30

【0329】

グリオーシスマーカーのためのアッセイ

PBS経心灌流及び4%PFA中での後固定の後に、マウス半脳を冠状切断した。簡単に述べると、多数の脳 (最高40) をトリムし、単一のゼラチンブロックに載せ、次いで、40µmの厚さで環状切断した。次いで、染色まで、包埋脳切片を含むゼラチンシートを抗原保存溶液 (50%PBS:50%エチレングリコール+1%PVP) 中で貯蔵した。切片をグリオーシスマーカーGFAP (ロバ抗ニフトリ、Novus NBP1-05198、1:1000)、Iba1 (ロバ抗ヤギ、Novus NB100-1028、1:1500) 及びCD68 (ロバ抗ラット、BioRad MCA1957、1:500) について染色した。簡単に述べると、切片を、振動させながら室温で4時間にわたって、ブロック緩衝液 (PBS+1%BSA+0.1%フィッシュゼラチン+0.5%トリトンX-100) 中でインキュベートし、次いで、上に列挙した濃度で一次抗体を含む抗体希釈緩衝液に移し、振動させながら4℃で終夜貯蔵した。PBS中で3回洗浄した後に、次いで、試料を、二次抗体を含む抗体希釈緩衝液に移し (1:500希釈)、振動

40

50

させながら室温で4時間にわたってインキュベートした。次いで、試料をPBS+DAPI (Invitrogen D1306 1:10,000)で20分間洗浄し、次いで、PBSでさらに2回洗浄し、その後、Prolong Glassハードセット・マウンティング媒体 (Life Tech P36984) と共に2×3インチスライドに載せ、終夜、室温で乾燥させた。Zeiss Axio Scan.Z1デジタルスライドスキャナを用いて、全脳半球を20倍で画像化した。Zeiss Zen Blue 3.2ソフトウェアを用いて、画像分析を完了した。視床ROIを抽出し、ローリングボール閾値化アプローチを使用して、総視床面積と比べて、各グリオーシスマーカーの面積を決定した。1つの脳あたり1~3個の切片を分析し、平均被覆パーセント値を画像全体で算出した。

10

【0330】

CNS細胞型の単離

CNS細胞を選別するための単一細胞懸濁液を調製するために、脳組織を解剖し、製造者プロトコルに従って成体脳解離キット (Miltenyi Biotec 130-107-677) を使用して、単一細胞懸濁液に処理した。細胞をFc遮断し (Biolegend #101320、1:100)、フローサイトメトリー分析のために、死細胞を除外するためのFixable Viability Stain BV510 (BD Biosciences #564406、1:100)、CD11b-BV421 (BD Biosciences 562605、1:100)、ACSA2-APC (Miltenyi #130-117-386、1:100)、及びThy1-PE (R&D #FAB7335P、1:100) を用いて染色した。細胞をPBS/1%BSAで洗浄し、100µmフィルターに通して濾過し、その後、100µmノズルを備えたFACS Aria III (BD Biosciences) で、CD11b+ミクログリア、ACSA2+星状細胞、及びThy1+ニューロンを選別した。選別された細胞を、リポドーム及びメタボローム分析のために内部標準が添加されているMSグレードのメタノールに直接収集した。実施例1に記載の方法と同様の方法を使用して、GAG、BMP、ガングリオシド、GlcCer、及びGalCerを測定するための細胞溶解産物調製及びLCMSアッセイを実行した。

20

【0331】

結果

図14及び15は、処置されたGRN KOマウスコホートの脳及び肝臓組織における、投与された融合タンパク質の濃度についての情報を提供している。図14及び15に図示されているとおり、融合体1及び11におけるTfR結合は、非TfR結合Fc:PGRNタンパク質と比べて、タンパク質の脳取り込みの有意な上昇を推し進めた。加えて、融合体1での8週までの毎週の処置は、同じものの単回腹腔内用量と比べて、タンパク質の脳取り込みを減少させなかった。他方で、肝臓におけるFc:PGRNの曝露量は、おそらく末梢からのTfR媒介クリアランスの欠如により、融合体1及び融合体11の曝露量よりも大きかった。

30

【0332】

図16~19は、処置されたGRN KOマウスコホートの脳、CSF、肝臓、及び血漿における例示的なBMP (ジ-22:6) のレベルについての情報を提供している。図16及び17において図示されているとおり、8週までの融合体1及び融合体11の毎週の投与は両方とも、ビヒクル処置またはFc:PGRNでの処置と比べて、CNSコンパートメント (脳、CSF) におけるBMPレベルの回復を改善した。末梢 (肝臓、血漿) では、Fc:PGRN、融合体1、及び融合体11の投与は、同等の効果で、BMPレベルを回復させた。

40

【0333】

図20及び21は、処置されたGRN KOマウスコホートの脳及び肝臓組織におけるGlcSphレベルについての情報を提供している。図20に図示されているとおり、8週までの融合体1及び融合体11の毎週の投与は、ビヒクル処置及びFc:PGRNでの

50

処置と比べて、脳における G l c S p h レベルを統計学的に有意に回復させた。末梢では（図 2 1）、F c : P G R N、融合体 1 及び融合体 1 1 の毎週の投与は、同等の効果で、G l c S p h レベルを回復させた。

【 0 3 3 4 】

図 2 2 は、処置された G R N K O マウスコホートにおける C S F N f - L レベルについての情報を提供している。図 2 2 において図示されているとおり、G R N K O マウスにおける融合体 1 の毎週投与の 8 週後に、C S F N f - L の減少傾向が観察された。対照的に、C S F N f - L は、F c : P G R N または融合体 1 1 での毎週処置により補正されないようであった。

【 0 3 3 5 】

図 2 3 は、処置された G R N K O マウスコホートの脳における相対的 T R E M 2 レベルについての情報を提供している。図 2 3 において図示されているとおり、8 週までの融合体 1 の毎週投与は、ビヒクル処置と比べて統計学的に有意に、脳組織における T R E M 2 レベルを低下させた。融合体 1 1 の毎週投与も、G R N K O マウスの脳において T R E M 2 レベルを低下させたが、効果は、融合体 1 の毎週投与で観察された効果ほどには大きくなかった。

【 0 3 3 6 】

図 2 4 ~ 2 6 は、処置された G R N K O マウスコホートの脳（視床）におけるグリオースマーカーについての情報を提供している。図 2 4 ~ 2 6 において図示されているとおり、8 週までの F c : P G R N、融合体 1、及び融合体 1 1 の毎週投与は、ビヒクル処置と比べて、G R N K O マウスの脳において C D 6 8、I b a 1、及び G F A P のレベルを低下させた。

【 0 3 3 7 】

図 2 7 は、処置された G R N K O マウスコホートの脳組織から選別されたニューロン、星状細胞、及びミクログリア細胞における B M P 及びある特定の脂質のヒートマップである。図 2 7 に図示されているとおり、8 週までの融合体 1 の毎週投与は、ミクログリア、星状細胞及びニューロン全体で、B M P 表現型を回復させた。この回復はミクログリア細胞において最も顕著であったが、星状細胞及びニューロンにおいても、補正がより低い程度で観察された。図 2 8 ~ 3 0 は、（ビヒクル処置された G R N 野生型（h T f R . K I）コホートの C N S 細胞と比べて）処置された G R N K O のニューロン、星状細胞、及びミクログリア細胞の選別された集団における、融合体 1 の投与時の、ある特定の B M P 種（B M P 1 8 : 1 / 1 8 : 1、B M P 2 2 : 6 / 2 2 : 6、及び B M P 2 0 : 4 / 2 0 : 4）を補正する傾向を図示している。

【 0 3 3 8 】

本明細書に記載の実施例及び実施形態が例示を目的としたものに過ぎないこと、及びその観点から様々な変更または変化が当業者に示唆され、かつ本出願の趣旨及び範囲ならびに添付の特許請求の範囲内に含まれ得ることは理解される。本明細書において引用された配列アクセッション番号の配列は、参照により本明細書に組み込まれる。

【 0 3 3 9 】

略式の配列表

10

20

30

40

50

配列番号	配列	説明
1	MWTLVSWVALTAGLVAGTRCPDGGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLRHLGGPCQVDAHCSA GHSCIFTVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCCPRGFHCSADGRSCFQSRSGNNSVGAIQCPDSQFECPDFSTCCV MVDGSGWGCCPMPQASCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCITPTGTHPLAKKLPQARTNRAVALSSVMCPD ARSRCPDGSTCCELP SGKYGCCPMPNATCCSDHLHCCPDQTVCDLIQSKCLSKENATD TLLTKLPAHTVGD VKCDMEVSCPDGYTCCRLQSGAWGCCPFQTAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPHQVPWMEKAP AHLSLDPDQALKRDVPDCNVSSCPSSDTCCQLTSGEWGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQRG SEIVAGLEKMPARRASLSHPRIDIGCDQHTSCPVGGQTCPSLGGSWACCCQLPHAVCCEDRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVVSAQPA VKARSCEKEVVSAQPAFTLARSHPVGVKDVCEGEGHFCHDNQTCRDNRRQGWACCPYRQGVCCADRRH CCPAGFRCAARGTKCLRREAPRWDAPLRDPALRQL	シグナルペプチド (アミノ酸1~17) 含有プログラニュー リン (PGRN) ポリペプチド
2	TRCPDGGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLRHLGGPCQVDAHCSAGHSCIFTVSGTSSCCPFPE AVACGDGHHCCPRGFHCSADGRSCFQSRSGNNSVGAIQCPDSQFECPDFSTCCVMVDGSGWGCCPMPQASC CEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCITPTGTHPLAKKLPQARTNRAVALSSVMCPDARSRCPDGSTCCELP SGK YGCCPMPNATCCSDHLHCCPDQTVCDLIQSKCLSKENATD TLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDGYTCCR LQSGAWGCCPFQTAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPHQVPWMEKAPHLSDPDPQALKRDVPDC NVSSCPSSDTCCQLTSGEWGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQRGSEIVAGLEKMPARRASLSH PRDIGCDQHTSCPVGGQTCPSLGGSWACCCQLPHAVCCEDRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVVSAQPAFTL ARSPHVGVKDVCEGEGHFCHDNQTCRDNRRQGWACCPYRQGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRRE APRWDAPLRDPALRQL	成熟 PGRN
3	TRCPDGGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLRHLGGPCQVDAHCSAGHSCIFTVSGTSSCCPFPE AVACGDGHHCCPRGFHCSADGRSCFQSRSGNNSVGAIQCPDSQFECPDFSTCCVMVDGSGWGCCPMPQASC CEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCITPTGTHPLAKKLPQARTNRAVALSSVMCPDARSRCPDGSTCCELP SGK YGCCPMPNATCCSDHLHCCPDQTVCDLIQSKCLSKENATD TLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDGYTCCR LQSGAWGCCPFQTAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPHQVPWMEKAPHLSDPDPQALKRDVPDC NVSSCPSSDTCCQLTSGEWGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQRGSEIVAGLEKMPARRASLSH PRDIGCDQHTSCPVGGQTCPSLGGSWACCCQLPHAVCCEDRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVVSAQPAFTL ARSPHVGVKDVCEGEGHFCHDNQTCRDNRRQGWACCPYRQGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRRE APRWDAPLRDPALRX ₁ X ₂ X ₃ , ここで、X ₁ 、X ₂ 、及びX ₃ のそれぞれは独立にアミノ酸であり、かつX ₁ X ₂ X ₃ は、 合わさってQLLではない	PGRN 変異体-1
4	TRCPDGGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLRHLGGPCQVDAHCSAGHSCIFTVSGTSSCCPFPE AVACGDGHHCCPRGFHCSADGRSCFQSRSGNNSVGAIQCPDSQFECPDFSTCCVMVDGSGWGCCPMPQASC CEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCITPTGTHPLAKKLPQARTNRAVALSSVMCPDARSRCPDGSTCCELP SGK YGCCPMPNATCCSDHLHCCPDQTVCDLIQSKCLSKENATD TLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDGYTCCR LQSGAWGCCPFQTAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPHQVPWMEKAPHLSDPDPQALKRDVPDC NVSSCPSSDTCCQLTSGEWGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQRGSEIVAGLEKMPARRASLSH PRDIGCDQHTSCPVGGQTCPSLGGSWACCCQLPHAVCCEDRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVVSAQPAFTL ARSPHVGVKDVCEGEGHFCHDNQTCRDNRRQGWACCPYRQGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRRE APRWDAPLRDPALRPHL	PGRN 変異体-2
5	TRCPDGGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLRHLGGPCQVDAHCSAGHSCIFTVSGTSSCCPFPE AVACGDGHHCCPRGFHCSADGRSCFQSRSGNNSVGAIQCPDSQFECPDFSTCCVMVDGSGWGCCPMPQASC CEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCITPTGTHPLAKKLPQARTNRAVALSSVMCPDARSRCPDGSTCCELP SGK YGCCPMPNATCCSDHLHCCPDQTVCDLIQSKCLSKENATD TLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDGYTCCR LQSGAWGCCPFQTAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPHQVPWMEKAPHLSDPDPQALKRDVPDC NVSSCPSSDTCCQLTSGEWGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQRGSEIVAGLEKMPARRASLSH PRDIGCDQHTSCPVGGQTCPSLGGSWACCCQLPHAVCCEDRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVVSAQPAFTL ARSPHVGVKDVCEGEGHFCHDNQTCRDNRRQGWACCPYRQGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRRE APRWDAPLRDPALRPKL	PGRN 変異体-3
6	TRCPDGGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLRHLGGPCQVDAHCSAGHSCIFTVSGTSSCCPFPE AVACGDGHHCCPRGFHCSADGRSCFQSRSGNNSVGAIQCPDSQFECPDFSTCCVMVDGSGWGCCPMPQASC CEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCITPTGTHPLAKKLPQARTNRAVALSSVMCPDARSRCPDGSTCCELP SGK YGCCPMPNATCCSDHLHCCPDQTVCDLIQSKCLSKENATD TLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDGYTCCR LQSGAWGCCPFQTAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPHQVPWMEKAPHLSDPDPQALKRDVPDC NVSSCPSSDTCCQLTSGEWGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQRGSEIVAGLEKMPARRASLSH PRDIGCDQHTSCPVGGQTCPSLGGSWACCCQLPHAVCCEDRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVVSAQPAFTL ARSPHVGVKDVCEGEGHFCHDNQTCRDNRRQGWACCPYRQGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRRE APRWDAPLRDPALRPDL	PGRN 変異体-4
7	TRCPDGGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLRHLGGPCQVDAHCSAGHSCIFTVSGTSSCCPFPE AVACGDGHHCCPRGFHCSADGRSCFQSRSGNNSVGAIQCPDSQFECPDFSTCCVMVDGSGWGCCPMPQASC CEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCITPTGTHPLAKKLPQARTNRAVALSSVMCPDARSRCPDGSTCCELP SGK YGCCPMPNATCCSDHLHCCPDQTVCDLIQSKCLSKENATD TLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDGYTCCR LQSGAWGCCPFQTAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPHQVPWMEKAPHLSDPDPQALKRDVPDC NVSSCPSSDTCCQLTSGEWGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQRGSEIVAGLEKMPARRASLSH PRDIGCDQHTSCPVGGQTCPSLGGSWACCCQLPHAVCCEDRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVVSAQPAFTL ARSPHVGVKDVCEGEGHFCHDNQTCRDNRRQGWACCPYRQGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRRE APRWDAPLRDPALRPEL	PGRN 変異体-5

配列番号	配列	説明
8	TRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLSRHLGGPCQVDAHCSAGHSCIFTVSGTSSCCPFPE AVACGDGHHCCPRGFHCSADGRSCFQSRGNNNSVGAIQCPDSQFECPDFSTCCVMVDGSGWCCPMPQASC CEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCITPTGTGTHPLAKKLPARTNRVALSSSVMPDARSRCPDGSTCCELP YGCCPMPNATCCSDHLHCCPDQTVCDLIQSKCLSKENATTDLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDGYTCCR LQSGAWGCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPHQVPWMEKAPAHLSLDPDQALKRDVPCD NVSSCPSSDTCCQLTSGEWGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQRGSEIVAGLEKMPARRASLSH PRDIGCDQHTSCPVGQTCPSLGGSWACQQLPHAVCCEDRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVVSAQPATFL ARSPHVGVKDVECGEGHFCHDNQTCRDRNRQGWACCPYRQGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRRE APRWDAPLRDPALRPSL	PGRN 変異体-6
9	TRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLSRHLGGPCQVDAHCSAGHSCIFTVSGTSSCCPFPE AVACGDGHHCCPRGFHCSADGRSCFQSRGNNNSVGAIQCPDSQFECPDFSTCCVMVDGSGWCCPMPQASC CEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCITPTGTGTHPLAKKLPARTNRVALSSSVMPDARSRCPDGSTCCELP YGCCPMPNATCCSDHLHCCPDQTVCDLIQSKCLSKENATTDLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDGYTCCR LQSGAWGCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPHQVPWMEKAPAHLSLDPDQALKRDVPCD NVSSCPSSDTCCQLTSGEWGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQRGSEIVAGLEKMPARRASLSH PRDIGCDQHTSCPVGQTCPSLGGSWACQQLPHAVCCEDRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVVSAQPATFL ARSPHVGVKDVECGEGHFCHDNQTCRDRNRQGWACCPYRQGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRRE APRWDAPLRDPALRPTL	PGRN 変異体-7
10	TRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLSRHLGGPCQVDAHCSAGHSCIFTVSGTSSCCPFPE AVACGDGHHCCPRGFHCSADGRSCFQSRGNNNSVGAIQCPDSQFECPDFSTCCVMVDGSGWCCPMPQASC CEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCITPTGTGTHPLAKKLPARTNRVALSSSVMPDARSRCPDGSTCCELP YGCCPMPNATCCSDHLHCCPDQTVCDLIQSKCLSKENATTDLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDGYTCCR LQSGAWGCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPHQVPWMEKAPAHLSLDPDQALKRDVPCD NVSSCPSSDTCCQLTSGEWGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQRGSEIVAGLEKMPARRASLSH PRDIGCDQHTSCPVGQTCPSLGGSWACQQLPHAVCCEDRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVVSAQPATFL ARSPHVGVKDVECGEGHFCHDNQTCRDRNRQGWACCPYRQGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRRE APRWDAPLRDPALRPNL	PGRN 変異体-8
11	TRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLSRHLGGPCQVDAHCSAGHSCIFTVSGTSSCCPFPE AVACGDGHHCCPRGFHCSADGRSCFQSRGNNNSVGAIQCPDSQFECPDFSTCCVMVDGSGWCCPMPQASC CEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCITPTGTGTHPLAKKLPARTNRVALSSSVMPDARSRCPDGSTCCELP YGCCPMPNATCCSDHLHCCPDQTVCDLIQSKCLSKENATTDLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDGYTCCR LQSGAWGCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPHQVPWMEKAPAHLSLDPDQALKRDVPCD NVSSCPSSDTCCQLTSGEWGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQRGSEIVAGLEKMPARRASLSH PRDIGCDQHTSCPVGQTCPSLGGSWACQQLPHAVCCEDRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVVSAQPATFL ARSPHVGVKDVECGEGHFCHDNQTCRDRNRQGWACCPYRQGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRRE APRWDAPLRDPALRPQL	PGRN 変異体-9
12	TRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLSRHLGGPCQVDAHCSAGHSCIFTVSGTSSCCPFPE AVACGDGHHCCPRGFHCSADGRSCFQSRGNNNSVGAIQCPDSQFECPDFSTCCVMVDGSGWCCPMPQASC CEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCITPTGTGTHPLAKKLPARTNRVALSSSVMPDARSRCPDGSTCCELP YGCCPMPNATCCSDHLHCCPDQTVCDLIQSKCLSKENATTDLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDGYTCCR LQSGAWGCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPHQVPWMEKAPAHLSLDPDQALKRDVPCD NVSSCPSSDTCCQLTSGEWGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQRGSEIVAGLEKMPARRASLSH PRDIGCDQHTSCPVGQTCPSLGGSWACQQLPHAVCCEDRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVVSAQPATFL ARSPHVGVKDVECGEGHFCHDNQTCRDRNRQGWACCPYRQGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRRE APRWDAPLRDPALRPLG	PGRN 変異体-10
13	TRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLSRHLGGPCQVDAHCSAGHSCIFTVSGTSSCCPFPE AVACGDGHHCCPRGFHCSADGRSCFQSRGNNNSVGAIQCPDSQFECPDFSTCCVMVDGSGWCCPMPQASC CEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCITPTGTGTHPLAKKLPARTNRVALSSSVMPDARSRCPDGSTCCELP YGCCPMPNATCCSDHLHCCPDQTVCDLIQSKCLSKENATTDLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDGYTCCR LQSGAWGCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPHQVPWMEKAPAHLSLDPDQALKRDVPCD NVSSCPSSDTCCQLTSGEWGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQRGSEIVAGLEKMPARRASLSH PRDIGCDQHTSCPVGQTCPSLGGSWACQQLPHAVCCEDRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVVSAQPATFL ARSPHVGVKDVECGEGHFCHDNQTCRDRNRQGWACCPYRQGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRRE APRWDAPLRDPALRPPL	PGRN 変異体-11
14	TRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLSRHLGGPCQVDAHCSAGHSCIFTVSGTSSCCPFPE AVACGDGHHCCPRGFHCSADGRSCFQSRGNNNSVGAIQCPDSQFECPDFSTCCVMVDGSGWCCPMPQASC CEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCITPTGTGTHPLAKKLPARTNRVALSSSVMPDARSRCPDGSTCCELP YGCCPMPNATCCSDHLHCCPDQTVCDLIQSKCLSKENATTDLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDGYTCCR LQSGAWGCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPHQVPWMEKAPAHLSLDPDQALKRDVPCD NVSSCPSSDTCCQLTSGEWGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQRGSEIVAGLEKMPARRASLSH PRDIGCDQHTSCPVGQTCPSLGGSWACQQLPHAVCCEDRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVVSAQPATFL ARSPHVGVKDVECGEGHFCHDNQTCRDRNRQGWACCPYRQGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRRE APRWDAPLRDPALRPAL	PGRN 変異体-12
15	TRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLSRHLGGPCQVDAHCSAGHSCIFTVSGTSSCCPFPE AVACGDGHHCCPRGFHCSADGRSCFQSRGNNNSVGAIQCPDSQFECPDFSTCCVMVDGSGWCCPMPQASC CEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCITPTGTGTHPLAKKLPARTNRVALSSSVMPDARSRCPDGSTCCELP YGCCPMPNATCCSDHLHCCPDQTVCDLIQSKCLSKENATTDLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDGYTCCR LQSGAWGCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPHQVPWMEKAPAHLSLDPDQALKRDVPCD NVSSCPSSDTCCQLTSGEWGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQRGSEIVAGLEKMPARRASLSH PRDIGCDQHTSCPVGQTCPSLGGSWACQQLPHAVCCEDRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVVSAQPATFL ARSPHVGVKDVECGEGHFCHDNQTCRDRNRQGWACCPYRQGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRRE APRWDAPLRDPALRPYL	PGRN 変異体-13

10

20

30

40

配列番号	配列	説明
16	TRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTSLRHLGGPCQVDAHCSAGHSCIFTVSGTSSCCPFPE AVACGDGHHCCPRGFHCSADGRSCFQSRGNNNSVGAIQCPDSQFECPDFSTCCVMVDGSGWCCPMPQASC CEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCITPTGTGTHPLAKKLPARTNRVALSSSVMPDARSRCPDGSTCCELP YGCCPMPNATCCSDHLHCCPDQTVCDLIQSKCLSKENATTDLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDGYTCCR LQSGAWGCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPHQVPWMEKAPAHLSLDPDQALKRDVPCD NVSSCPSSDTCCLTSGEWGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQRGSEIVAGLEKMPARRASLSH PRDIGCDQHTSCPVGQTCPSLGGSWACQQLPHAVCCEDRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVVSAQPATFL ARSPHVGVKDVECGEGHFCHDNQTCRDRNRQGWACCPYRQGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRRE APRWDAPLRDPALRPVL	PGRN 変異体-14
17	TRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTSLRHLGGPCQVDAHCSAGHSCIFTVSGTSSCCPFPE AVACGDGHHCCPRGFHCSADGRSCFQSRGNNNSVGAIQCPDSQFECPDFSTCCVMVDGSGWCCPMPQASC CEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCITPTGTGTHPLAKKLPARTNRVALSSSVMPDARSRCPDGSTCCELP YGCCPMPNATCCSDHLHCCPDQTVCDLIQSKCLSKENATTDLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDGYTCCR LQSGAWGCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPHQVPWMEKAPAHLSLDPDQALKRDVPCD NVSSCPSSDTCCLTSGEWGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQRGSEIVAGLEKMPARRASLSH PRDIGCDQHTSCPVGQTCPSLGGSWACQQLPHAVCCEDRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVVSAQPATFL ARSPHVGVKDVECGEGHFCHDNQTCRDRNRQGWACCPYRQGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRRE APRWDAPLRDPALRPIL	PGRN 変異体-15
18	TRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTSLRHLGGPCQVDAHCSAGHSCIFTVSGTSSCCPFPE AVACGDGHHCCPRGFHCSADGRSCFQSRGNNNSVGAIQCPDSQFECPDFSTCCVMVDGSGWCCPMPQASC CEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCITPTGTGTHPLAKKLPARTNRVALSSSVMPDARSRCPDGSTCCELP YGCCPMPNATCCSDHLHCCPDQTVCDLIQSKCLSKENATTDLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDGYTCCR LQSGAWGCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPHQVPWMEKAPAHLSLDPDQALKRDVPCD NVSSCPSSDTCCLTSGEWGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQRGSEIVAGLEKMPARRASLSH PRDIGCDQHTSCPVGQTCPSLGGSWACQQLPHAVCCEDRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVVSAQPATFL ARSPHVGVKDVECGEGHFCHDNQTCRDRNRQGWACCPYRQGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRRE APRWDAPLRDPALRPIL	PGRN 変異体-16
19	TRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTSLRHLGGPCQVDAHCSAGHSCIFTVSGTSSCCPFPE AVACGDGHHCCPRGFHCSADGRSCFQSRGNNNSVGAIQCPDSQFECPDFSTCCVMVDGSGWCCPMPQASC CEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCITPTGTGTHPLAKKLPARTNRVALSSSVMPDARSRCPDGSTCCELP YGCCPMPNATCCSDHLHCCPDQTVCDLIQSKCLSKENATTDLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDGYTCCR LQSGAWGCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPHQVPWMEKAPAHLSLDPDQALKRDVPCD NVSSCPSSDTCCLTSGEWGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQRGSEIVAGLEKMPARRASLSH PRDIGCDQHTSCPVGQTCPSLGGSWACQQLPHAVCCEDRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVVSAQPATFL ARSPHVGVKDVECGEGHFCHDNQTCRDRNRQGWACCPYRQGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRRE APRWDAPLRDPALRQL	PGRN 変異体-17
20	TRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTSLRHLGGPCQVDAHCSAGHSCIFTVSGTSSCCPFPE AVACGDGHHCCPRGFHCSADGRSCFQSRGNNNSVGAIQCPDSQFECPDFSTCCVMVDGSGWCCPMPQASC CEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCITPTGTGTHPLAKKLPARTNRVALSSSVMPDARSRCPDGSTCCELP YGCCPMPNATCCSDHLHCCPDQTVCDLIQSKCLSKENATTDLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDGYTCCR LQSGAWGCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPHQVPWMEKAPAHLSLDPDQALKRDVPCD NVSSCPSSDTCCLTSGEWGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQRGSEIVAGLEKMPARRASLSH PRDIGCDQHTSCPVGQTCPSLGGSWACQQLPHAVCCEDRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVVSAQPATFL ARSPHVGVKDVECGEGHFCHDNQTCRDRNRQGWACCPYRQGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRRE APRWDAPLRDPALRQHL	PGRN 変異体-18
21	TRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTSLRHLGGPCQVDAHCSAGHSCIFTVSGTSSCCPFPE AVACGDGHHCCPRGFHCSADGRSCFQSRGNNNSVGAIQCPDSQFECPDFSTCCVMVDGSGWCCPMPQASC CEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCITPTGTGTHPLAKKLPARTNRVALSSSVMPDARSRCPDGSTCCELP YGCCPMPNATCCSDHLHCCPDQTVCDLIQSKCLSKENATTDLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDGYTCCR LQSGAWGCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPHQVPWMEKAPAHLSLDPDQALKRDVPCD NVSSCPSSDTCCLTSGEWGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQRGSEIVAGLEKMPARRASLSH PRDIGCDQHTSCPVGQTCPSLGGSWACQQLPHAVCCEDRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVVSAQPATFL ARSPHVGVKDVECGEGHFCHDNQTCRDRNRQGWACCPYRQGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRRE APRWDAPLRDPALRQKL	PGRN 変異体-19
22	TRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTSLRHLGGPCQVDAHCSAGHSCIFTVSGTSSCCPFPE AVACGDGHHCCPRGFHCSADGRSCFQSRGNNNSVGAIQCPDSQFECPDFSTCCVMVDGSGWCCPMPQASC CEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCITPTGTGTHPLAKKLPARTNRVALSSSVMPDARSRCPDGSTCCELP YGCCPMPNATCCSDHLHCCPDQTVCDLIQSKCLSKENATTDLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDGYTCCR LQSGAWGCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPHQVPWMEKAPAHLSLDPDQALKRDVPCD NVSSCPSSDTCCLTSGEWGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQRGSEIVAGLEKMPARRASLSH PRDIGCDQHTSCPVGQTCPSLGGSWACQQLPHAVCCEDRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVVSAQPATFL ARSPHVGVKDVECGEGHFCHDNQTCRDRNRQGWACCPYRQGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRRE APRWDAPLRDPALRQDL	PGRN 変異体-20
23	TRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTSLRHLGGPCQVDAHCSAGHSCIFTVSGTSSCCPFPE AVACGDGHHCCPRGFHCSADGRSCFQSRGNNNSVGAIQCPDSQFECPDFSTCCVMVDGSGWCCPMPQASC CEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCITPTGTGTHPLAKKLPARTNRVALSSSVMPDARSRCPDGSTCCELP YGCCPMPNATCCSDHLHCCPDQTVCDLIQSKCLSKENATTDLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDGYTCCR LQSGAWGCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPHQVPWMEKAPAHLSLDPDQALKRDVPCD NVSSCPSSDTCCLTSGEWGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQRGSEIVAGLEKMPARRASLSH PRDIGCDQHTSCPVGQTCPSLGGSWACQQLPHAVCCEDRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVVSAQPATFL ARSPHVGVKDVECGEGHFCHDNQTCRDRNRQGWACCPYRQGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRRE APRWDAPLRDPALRQEL	PGRN 変異体-21

10

20

30

40

配列番号	配列	説明
24	TRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLSRHLGGPCQVDAHCSAGHSCIFTVSGTSSCCPFPE AVACGDGHHCCPRGFHCADGRSCFQSRGNNNSVGAIQCPDSQFECPDFSTCCVMVDGSGWCCPMPQASC CEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCITPTGTGTHPLAKKLPARTNRVALSSSVMPDARSRCPDGSTCCELP YGCCPMPNATCCSDHLHCCPDQTVCDLIQSKCLSKENATTDLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDGYTCCR LQSGAWGCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPHQVPWMEKAPAHLSLDPDQALKRDVPCD NVSSCPSSDTCCLTSGEWGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQRGSEIVAGLEKMPARRASLSH PRDIGCDQHTSCPVGQTCPSLGGSWACCLPHAVCCEDRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVVSAQPATFL ARSPHVGVKDVECGEGHFCHDNQTCRDRNRQGWACCPYRQGVCCADRRHCCPAGFRC AARGTKCLRRE APRWDAPLRDPALRQNL	PGRN 変異体-22
25	TRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLSRHLGGPCQVDAHCSAGHSCIFTVSGTSSCCPFPE AVACGDGHHCCPRGFHCADGRSCFQSRGNNNSVGAIQCPDSQFECPDFSTCCVMVDGSGWCCPMPQASC CEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCITPTGTGTHPLAKKLPARTNRVALSSSVMPDARSRCPDGSTCCELP YGCCPMPNATCCSDHLHCCPDQTVCDLIQSKCLSKENATTDLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDGYTCCR LQSGAWGCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPHQVPWMEKAPAHLSLDPDQALKRDVPCD NVSSCPSSDTCCLTSGEWGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQRGSEIVAGLEKMPARRASLSH PRDIGCDQHTSCPVGQTCPSLGGSWACCLPHAVCCEDRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVVSAQPATFL ARSPHVGVKDVECGEGHFCHDNQTCRDRNRQGWACCPYRQGVCCADRRHCCPAGFRC AARGTKCLRRE APRWDAPLRDPALRQPL	PGRN 変異体-23
26	TRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLSRHLGGPCQVDAHCSAGHSCIFTVSGTSSCCPFPE AVACGDGHHCCPRGFHCADGRSCFQSRGNNNSVGAIQCPDSQFECPDFSTCCVMVDGSGWCCPMPQASC CEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCITPTGTGTHPLAKKLPARTNRVALSSSVMPDARSRCPDGSTCCELP YGCCPMPNATCCSDHLHCCPDQTVCDLIQSKCLSKENATTDLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDGYTCCR LQSGAWGCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPHQVPWMEKAPAHLSLDPDQALKRDVPCD NVSSCPSSDTCCLTSGEWGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQRGSEIVAGLEKMPARRASLSH PRDIGCDQHTSCPVGQTCPSLGGSWACCLPHAVCCEDRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVVSAQPATFL ARSPHVGVKDVECGEGHFCHDNQTCRDRNRQGWACCPYRQGVCCADRRHCCPAGFRC AARGTKCLRRE APRWDAPLRDPALRQYL	PGRN 変異体-24
27	TRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLSRHLGGPCQVDAHCSAGHSCIFTVSGTSSCCPFPE AVACGDGHHCCPRGFHCADGRSCFQSRGNNNSVGAIQCPDSQFECPDFSTCCVMVDGSGWCCPMPQASC CEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCITPTGTGTHPLAKKLPARTNRVALSSSVMPDARSRCPDGSTCCELP YGCCPMPNATCCSDHLHCCPDQTVCDLIQSKCLSKENATTDLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDGYTCCR LQSGAWGCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPHQVPWMEKAPAHLSLDPDQALKRDVPCD NVSSCPSSDTCCLTSGEWGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQRGSEIVAGLEKMPARRASLSH PRDIGCDQHTSCPVGQTCPSLGGSWACCLPHAVCCEDRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVVSAQPATFL ARSPHVGVKDVECGEGHFCHDNQTCRDRNRQGWACCPYRQGVCCADRRHCCPAGFRC AARGTKCLRRE APRWDAPLRDPALRQQL	PGRN 変異体-25
28	TRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLSRHLGGPCQVDAHCSAGHSCIFTVSGTSSCCPFPE AVACGDGHHCCPRGFHCADGRSCFQSRGNNNSVGAIQCPDSQFECPDFSTCCVMVDGSGWCCPMPQASC CEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCITPTGTGTHPLAKKLPARTNRVALSSSVMPDARSRCPDGSTCCELP YGCCPMPNATCCSDHLHCCPDQTVCDLIQSKCLSKENATTDLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDGYTCCR LQSGAWGCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPHQVPWMEKAPAHLSLDPDQALKRDVPCD NVSSCPSSDTCCLTSGEWGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQRGSEIVAGLEKMPARRASLSH PRDIGCDQHTSCPVGQTCPSLGGSWACCLPHAVCCEDRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVVSAQPATFL ARSPHVGVKDVECGEGHFCHDNQTCRDRNRQGWACCPYRQGVCCADRRHCCPAGFRC AARGTKCLRRE APRWDAPLRDPALRVVL	PGRN 変異体-26
29	TRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLSRHLGGPCQVDAHCSAGHSCIFTVSGTSSCCPFPE AVACGDGHHCCPRGFHCADGRSCFQSRGNNNSVGAIQCPDSQFECPDFSTCCVMVDGSGWCCPMPQASC CEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCITPTGTGTHPLAKKLPARTNRVALSSSVMPDARSRCPDGSTCCELP YGCCPMPNATCCSDHLHCCPDQTVCDLIQSKCLSKENATTDLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDGYTCCR LQSGAWGCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPHQVPWMEKAPAHLSLDPDQALKRDVPCD NVSSCPSSDTCCLTSGEWGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQRGSEIVAGLEKMPARRASLSH PRDIGCDQHTSCPVGQTCPSLGGSWACCLPHAVCCEDRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVVSAQPATFL ARSPHVGVKDVECGEGHFCHDNQTCRDRNRQGWACCPYRQGVCCADRRHCCPAGFRC AARGTKCLRRE APRWDAPLRDPALRVTL	PGRN 変異体-27
30	TRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLSRHLGGPCQVDAHCSAGHSCIFTVSGTSSCCPFPE AVACGDGHHCCPRGFHCADGRSCFQSRGNNNSVGAIQCPDSQFECPDFSTCCVMVDGSGWCCPMPQASC CEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCITPTGTGTHPLAKKLPARTNRVALSSSVMPDARSRCPDGSTCCELP YGCCPMPNATCCSDHLHCCPDQTVCDLIQSKCLSKENATTDLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDGYTCCR LQSGAWGCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPHQVPWMEKAPAHLSLDPDQALKRDVPCD NVSSCPSSDTCCLTSGEWGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQRGSEIVAGLEKMPARRASLSH PRDIGCDQHTSCPVGQTCPSLGGSWACCLPHAVCCEDRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVVSAQPATFL ARSPHVGVKDVECGEGHFCHDNQTCRDRNRQGWACCPYRQGVCCADRRHCCPAGFRC AARGTKCLRRE APRWDAPLRDPALRRIL	PGRN 変異体-28
31	TRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLSRHLGGPCQVDAHCSAGHSCIFTVSGTSSCCPFPE AVACGDGHHCCPRGFHCADGRSCFQSRGNNNSVGAIQCPDSQFECPDFSTCCVMVDGSGWCCPMPQASC CEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCITPTGTGTHPLAKKLPARTNRVALSSSVMPDARSRCPDGSTCCELP YGCCPMPNATCCSDHLHCCPDQTVCDLIQSKCLSKENATTDLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDGYTCCR LQSGAWGCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPHQVPWMEKAPAHLSLDPDQALKRDVPCD NVSSCPSSDTCCLTSGEWGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQRGSEIVAGLEKMPARRASLSH PRDIGCDQHTSCPVGQTCPSLGGSWACCLPHAVCCEDRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVVSAQPATFL ARSPHVGVKDVECGEGHFCHDNQTCRDRNRQGWACCPYRQGVCCADRRHCCPAGFRC AARGTKCLRRE APRWDAPLRDPALRHIL	PGRN 変異体-29

10

20

30

40

50

配列番号	配列	説明
32	TRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLSRHLGGPCQVDAHCSAGHSCIFTVSGTSSCCPFPE AVACGDGHHCCPRGFHCSADGRSCFQSRGNNNSVGAIQCPDSQFECPDFSTCCVMVDGWSGCCPMPQASC CEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCITPTGTGTHPLAKKLPARTNRVALSSSVMPDARSRCPDGSTCCELP YGCCPMPNATCCSDHLHCCPDQTVCDLIQSKCLSKENATTDLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDGYTCCR LQSGAWGCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPHQVPWMEKAPAHLSLDPQALKRDVPCD NVSSCPSSDTCCLTSGEWGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQRGSEIVAGLEKMPARRASLSH PRDIGCDQHTSCPVGQTCPSLGGSWACQQLPHAVCCEDRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVVSAQPATFL ARSPHVGVKDVECGEGHFCHDNQTCRDRNRQGWACCPYRQGVCCADRRHCCPAGFRC AARGTKCLRRE APRWDAPLRDPALRKIL	PGRN 変異体-30
33	TRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLSRHLGGPCQVDAHCSAGHSCIFTVSGTSSCCPFPE AVACGDGHHCCPRGFHCSADGRSCFQSRGNNNSVGAIQCPDSQFECPDFSTCCVMVDGWSGCCPMPQASC CEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCITPTGTGTHPLAKKLPARTNRVALSSSVMPDARSRCPDGSTCCELP YGCCPMPNATCCSDHLHCCPDQTVCDLIQSKCLSKENATTDLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDGYTCCR LQSGAWGCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPHQVPWMEKAPAHLSLDPQALKRDVPCD NVSSCPSSDTCCLTSGEWGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQRGSEIVAGLEKMPARRASLSH PRDIGCDQHTSCPVGQTCPSLGGSWACQQLPHAVCCEDRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVVSAQPATFL ARSPHVGVKDVECGEGHFCHDNQTCRDRNRQGWACCPYRQGVCCADRRHCCPAGFRC AARGTKCLRRE APRWDAPLRDPALREIL	PGRN 変異体-31
34	TRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLSRHLGGPCQVDAHCSAGHSCIFTVSGTSSCCPFPE AVACGDGHHCCPRGFHCSADGRSCFQSRGNNNSVGAIQCPDSQFECPDFSTCCVMVDGWSGCCPMPQASC CEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCITPTGTGTHPLAKKLPARTNRVALSSSVMPDARSRCPDGSTCCELP YGCCPMPNATCCSDHLHCCPDQTVCDLIQSKCLSKENATTDLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDGYTCCR LQSGAWGCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPHQVPWMEKAPAHLSLDPQALKRDVPCD NVSSCPSSDTCCLTSGEWGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQRGSEIVAGLEKMPARRASLSH PRDIGCDQHTSCPVGQTCPSLGGSWACQQLPHAVCCEDRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVVSAQPATFL ARSPHVGVKDVECGEGHFCHDNQTCRDRNRQGWACCPYRQGVCCADRRHCCPAGFRC AARGTKCLRRE APRWDAPLRDPALRRFL	PGRN 変異体-32
35	TRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLSRHLGGPCQVDAHCSAGHSCIFTVSGTSSCCPFPE AVACGDGHHCCPRGFHCSADGRSCFQSRGNNNSVGAIQCPDSQFECPDFSTCCVMVDGWSGCCPMPQASC CEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCITPTGTGTHPLAKKLPARTNRVALSSSVMPDARSRCPDGSTCCELP YGCCPMPNATCCSDHLHCCPDQTVCDLIQSKCLSKENATTDLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDGYTCCR LQSGAWGCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPHQVPWMEKAPAHLSLDPQALKRDVPCD NVSSCPSSDTCCLTSGEWGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQRGSEIVAGLEKMPARRASLSH PRDIGCDQHTSCPVGQTCPSLGGSWACQQLPHAVCCEDRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVVSAQPATFL ARSPHVGVKDVECGEGHFCHDNQTCRDRNRQGWACCPYRQGVCCADRRHCCPAGFRC AARGTKCLRRE APRWDAPLRDPALRHFL	PGRN 変異体-33
36	TRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLSRHLGGPCQVDAHCSAGHSCIFTVSGTSSCCPFPE AVACGDGHHCCPRGFHCSADGRSCFQSRGNNNSVGAIQCPDSQFECPDFSTCCVMVDGWSGCCPMPQASC CEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCITPTGTGTHPLAKKLPARTNRVALSSSVMPDARSRCPDGSTCCELP YGCCPMPNATCCSDHLHCCPDQTVCDLIQSKCLSKENATTDLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDGYTCCR LQSGAWGCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPHQVPWMEKAPAHLSLDPQALKRDVPCD NVSSCPSSDTCCLTSGEWGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQRGSEIVAGLEKMPARRASLSH PRDIGCDQHTSCPVGQTCPSLGGSWACQQLPHAVCCEDRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVVSAQPATFL ARSPHVGVKDVECGEGHFCHDNQTCRDRNRQGWACCPYRQGVCCADRRHCCPAGFRC AARGTKCLRRE APRWDAPLRDPALRKFL	PGRN 変異体-34
37	TRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLSRHLGGPCQVDAHCSAGHSCIFTVSGTSSCCPFPE AVACGDGHHCCPRGFHCSADGRSCFQSRGNNNSVGAIQCPDSQFECPDFSTCCVMVDGWSGCCPMPQASC CEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCITPTGTGTHPLAKKLPARTNRVALSSSVMPDARSRCPDGSTCCELP YGCCPMPNATCCSDHLHCCPDQTVCDLIQSKCLSKENATTDLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDGYTCCR LQSGAWGCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPHQVPWMEKAPAHLSLDPQALKRDVPCD NVSSCPSSDTCCLTSGEWGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQRGSEIVAGLEKMPARRASLSH PRDIGCDQHTSCPVGQTCPSLGGSWACQQLPHAVCCEDRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVVSAQPATFL ARSPHVGVKDVECGEGHFCHDNQTCRDRNRQGWACCPYRQGVCCADRRHCCPAGFRC AARGTKCLRRE APRWDAPLRDPALRDFL	PGRN 変異体-35
38	TRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLSRHLGGPCQVDAHCSAGHSCIFTVSGTSSCCPFPE AVACGDGHHCCPRGFHCSADGRSCFQSRGNNNSVGAIQCPDSQFECPDFSTCCVMVDGWSGCCPMPQASC CEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCITPTGTGTHPLAKKLPARTNRVALSSSVMPDARSRCPDGSTCCELP YGCCPMPNATCCSDHLHCCPDQTVCDLIQSKCLSKENATTDLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDGYTCCR LQSGAWGCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPHQVPWMEKAPAHLSLDPQALKRDVPCD NVSSCPSSDTCCLTSGEWGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQRGSEIVAGLEKMPARRASLSH PRDIGCDQHTSCPVGQTCPSLGGSWACQQLPHAVCCEDRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVVSAQPATFL ARSPHVGVKDVECGEGHFCHDNQTCRDRNRQGWACCPYRQGVCCADRRHCCPAGFRC AARGTKCLRRE APRWDAPLRDPALREFL	PGRN 変異体-36
39	TRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLSRHLGGPCQVDAHCSAGHSCIFTVSGTSSCCPFPE AVACGDGHHCCPRGFHCSADGRSCFQSRGNNNSVGAIQCPDSQFECPDFSTCCVMVDGWSGCCPMPQASC CEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCITPTGTGTHPLAKKLPARTNRVALSSSVMPDARSRCPDGSTCCELP YGCCPMPNATCCSDHLHCCPDQTVCDLIQSKCLSKENATTDLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDGYTCCR LQSGAWGCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPHQVPWMEKAPAHLSLDPQALKRDVPCD NVSSCPSSDTCCLTSGEWGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQRGSEIVAGLEKMPARRASLSH PRDIGCDQHTSCPVGQTCPSLGGSWACQQLPHAVCCEDRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVVSAQPATFL ARSPHVGVKDVECGEGHFCHDNQTCRDRNRQGWACCPYRQGVCCADRRHCCPAGFRC AARGTKCLRRE APRWDAPLRDPALRSFL	PGRN 変異体-37

10

20

30

40

配列番号	配列	説明
40	TRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLSRHLGGPCQVDAHCSAGHSCIFTVSGTSSCCPFPE AVACGDGHHCCPRGFHCSDAGRSFCQFSGNNSVGAIQCPDSQFECPDFSTCCVMVDGSGWCCPMPQASC CEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCITPTGTGTHPLAKKLPQRTNRAVALSSSVMCPDARSRCPDGSTCCELP YGCCPMPNATCCSDHLHCCPDQTVCDLIQSKCLSKENATTDLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDGYTCCR LQSGAWGCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPHQVPWMEKAPAHLSLDPDQALKRDVPCD NVSSCPSSDTCCLTSGEWGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQRGSEIVAGLEKMPARRASLSH PRDIGCDQHTSCPVGQTCPSLGGSWACCLPHAVCCEDRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVVSAQPATFL ARSPHVGVKDVECGEGHFCHDNQTCRDRNRQGWACCPYRQGVCCADRRHCCPAGFRC AARGTKCLRRE APRWDAPLRDPALRITFL	PGRN 変異体-38
41	TRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLSRHLGGPCQVDAHCSAGHSCIFTVSGTSSCCPFPE AVACGDGHHCCPRGFHCSDAGRSFCQFSGNNSVGAIQCPDSQFECPDFSTCCVMVDGSGWCCPMPQASC CEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCITPTGTGTHPLAKKLPQRTNRAVALSSSVMCPDARSRCPDGSTCCELP YGCCPMPNATCCSDHLHCCPDQTVCDLIQSKCLSKENATTDLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDGYTCCR LQSGAWGCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPHQVPWMEKAPAHLSLDPDQALKRDVPCD NVSSCPSSDTCCLTSGEWGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQRGSEIVAGLEKMPARRASLSH PRDIGCDQHTSCPVGQTCPSLGGSWACCLPHAVCCEDRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVVSAQPATFL ARSPHVGVKDVECGEGHFCHDNQTCRDRNRQGWACCPYRQGVCCADRRHCCPAGFRC AARGTKCLRRE APRWDAPLRDPALRITFL	PGRN 変異体-39
42	TRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLSRHLGGPCQVDAHCSAGHSCIFTVSGTSSCCPFPE AVACGDGHHCCPRGFHCSDAGRSFCQFSGNNSVGAIQCPDSQFECPDFSTCCVMVDGSGWCCPMPQASC CEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCITPTGTGTHPLAKKLPQRTNRAVALSSSVMCPDARSRCPDGSTCCELP YGCCPMPNATCCSDHLHCCPDQTVCDLIQSKCLSKENATTDLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDGYTCCR LQSGAWGCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPHQVPWMEKAPAHLSLDPDQALKRDVPCD NVSSCPSSDTCCLTSGEWGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQRGSEIVAGLEKMPARRASLSH PRDIGCDQHTSCPVGQTCPSLGGSWACCLPHAVCCEDRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVVSAQPATFL ARSPHVGVKDVECGEGHFCHDNQTCRDRNRQGWACCPYRQGVCCADRRHCCPAGFRC AARGTKCLRRE APRWDAPLRDPALRITFL	PGRN 変異体-40
43	TRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLSRHLGGPCQVDAHCSAGHSCIFTVSGTSSCCPFPE AVACGDGHHCCPRGFHCSDAGRSFCQFSGNNSVGAIQCPDSQFECPDFSTCCVMVDGSGWCCPMPQASC CEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCITPTGTGTHPLAKKLPQRTNRAVALSSSVMCPDARSRCPDGSTCCELP YGCCPMPNATCCSDHLHCCPDQTVCDLIQSKCLSKENATTDLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDGYTCCR LQSGAWGCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPHQVPWMEKAPAHLSLDPDQALKRDVPCD NVSSCPSSDTCCLTSGEWGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQRGSEIVAGLEKMPARRASLSH PRDIGCDQHTSCPVGQTCPSLGGSWACCLPHAVCCEDRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVVSAQPATFL ARSPHVGVKDVECGEGHFCHDNQTCRDRNRQGWACCPYRQGVCCADRRHCCPAGFRC AARGTKCLRRE APRWDAPLRDPALRITFL	PGRN 変異体-41
44	TRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLSRHLGGPCQVDAHCSAGHSCIFTVSGTSSCCPFPE AVACGDGHHCCPRGFHCSDAGRSFCQFSGNNSVGAIQCPDSQFECPDFSTCCVMVDGSGWCCPMPQASC CEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCITPTGTGTHPLAKKLPQRTNRAVALSSSVMCPDARSRCPDGSTCCELP YGCCPMPNATCCSDHLHCCPDQTVCDLIQSKCLSKENATTDLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDGYTCCR LQSGAWGCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPHQVPWMEKAPAHLSLDPDQALKRDVPCD NVSSCPSSDTCCLTSGEWGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQRGSEIVAGLEKMPARRASLSH PRDIGCDQHTSCPVGQTCPSLGGSWACCLPHAVCCEDRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVVSAQPATFL ARSPHVGVKDVECGEGHFCHDNQTCRDRNRQGWACCPYRQGVCCADRRHCCPAGFRC AARGTKCLRRE APRWDAPLRDPALRITFL	PGRN 変異体-42
45	TRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLSRHLGGPCQVDAHCSAGHSCIFTVSGTSSCCPFPE AVACGDGHHCCPRGFHCSDAGRSFCQFSGNNSVGAIQCPDSQFECPDFSTCCVMVDGSGWCCPMPQASC CEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCITPTGTGTHPLAKKLPQRTNRAVALSSSVMCPDARSRCPDGSTCCELP YGCCPMPNATCCSDHLHCCPDQTVCDLIQSKCLSKENATTDLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDGYTCCR LQSGAWGCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPHQVPWMEKAPAHLSLDPDQALKRDVPCD NVSSCPSSDTCCLTSGEWGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQRGSEIVAGLEKMPARRASLSH PRDIGCDQHTSCPVGQTCPSLGGSWACCLPHAVCCEDRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVVSAQPATFL ARSPHVGVKDVECGEGHFCHDNQTCRDRNRQGWACCPYRQGVCCADRRHCCPAGFRC AARGTKCLRRE APRWDAPLRDPALRITFL	PGRN 変異体-43
46	TRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLSRHLGGPCQVDAHCSAGHSCIFTVSGTSSCCPFPE AVACGDGHHCCPRGFHCSDAGRSFCQFSGNNSVGAIQCPDSQFECPDFSTCCVMVDGSGWCCPMPQASC CEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCITPTGTGTHPLAKKLPQRTNRAVALSSSVMCPDARSRCPDGSTCCELP YGCCPMPNATCCSDHLHCCPDQTVCDLIQSKCLSKENATTDLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDGYTCCR LQSGAWGCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPHQVPWMEKAPAHLSLDPDQALKRDVPCD NVSSCPSSDTCCLTSGEWGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQRGSEIVAGLEKMPARRASLSH PRDIGCDQHTSCPVGQTCPSLGGSWACCLPHAVCCEDRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVVSAQPATFL ARSPHVGVKDVECGEGHFCHDNQTCRDRNRQGWACCPYRQGVCCADRRHCCPAGFRC AARGTKCLRRE APRWDAPLRDPALRITFL	PGRN 変異体-44
47	TRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLSRHLGGPCQVDAHCSAGHSCIFTVSGTSSCCPFPE AVACGDGHHCCPRGFHCSDAGRSFCQFSGNNSVGAIQCPDSQFECPDFSTCCVMVDGSGWCCPMPQASC CEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCITPTGTGTHPLAKKLPQRTNRAVALSSSVMCPDARSRCPDGSTCCELP YGCCPMPNATCCSDHLHCCPDQTVCDLIQSKCLSKENATTDLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDGYTCCR LQSGAWGCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPHQVPWMEKAPAHLSLDPDQALKRDVPCD NVSSCPSSDTCCLTSGEWGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQRGSEIVAGLEKMPARRASLSH PRDIGCDQHTSCPVGQTCPSLGGSWACCLPHAVCCEDRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVVSAQPATFL ARSPHVGVKDVECGEGHFCHDNQTCRDRNRQGWACCPYRQGVCCADRRHCCPAGFRC AARGTKCLRRE APRWDAPLRDPALRITFL	PGRN 変異体-45

10

20

30

40

配列番号	配列	説明
48	TRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLSRHLGGPCQVDAHCSAGHSCIFTVSGTSSCCPFPE AVACGDGHHCCPRGFHCSADGRSCFQSRSGNNSVGAIQCPDSQFECPDFSTCCVMVDGSGWCCPMPQASC CEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCITPTGTGTHPLAKKLPARTNRVALSSSVMPDARSRCPDGSTCCELP YGCCPMPNATCCSDHLHCCPDQTVCDLIQSKCLSKENATTDLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDGYTCCR LQSGAWGCCPFTQAVCCEDHHCPCAGFTCDTQKGTCEQGPHQVPWMEKAPAHLSLDPQALKRDVPCD NVSSCPSSDTCCLTSGEWGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQRGSEIVAGLEKMPARRASLSH PRDIGCDQHTSCPVGQTCPSLGGSWACQQLPHAVCCEDRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVVSAQPATFL ARSPHVGVKDVECEGEGHFCNDQTCRDRNRQGWACCPYRQGVCCADRRHCCPAGFRC AARGTKCLRRE APRWDAPLRDPA LRKQL	PGRN 変異体-46
49	TRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLSRHLGGPCQVDAHCSAGHSCIFTVSGTSSCCPFPE AVACGDGHHCCPRGFHCSADGRSCFQSRSGNNSVGAIQCPDSQFECPDFSTCCVMVDGSGWCCPMPQASC CEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCITPTGTGTHPLAKKLPARTNRVALSSSVMPDARSRCPDGSTCCELP YGCCPMPNATCCSDHLHCCPDQTVCDLIQSKCLSKENATTDLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDGYTCCR LQSGAWGCCPFTQAVCCEDHHCPCAGFTCDTQKGTCEQGPHQVPWMEKAPAHLSLDPQALKRDVPCD NVSSCPSSDTCCLTSGEWGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQRGSEIVAGLEKMPARRASLSH PRDIGCDQHTSCPVGQTCPSLGGSWACQQLPHAVCCEDRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVVSAQPATFL ARSPHVGVKDVECEGEGHFCNDQTCRDRNRQGWACCPYRQGVCCADRRHCCPAGFRC AARGTKCLRRE APRWDAPLRDPA LRDLQ	PGRN 変異体-47
50	TRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLSRHLGGPCQVDAHCSAGHSCIFTVSGTSSCCPFPE AVACGDGHHCCPRGFHCSADGRSCFQSRSGNNSVGAIQCPDSQFECPDFSTCCVMVDGSGWCCPMPQASC CEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCITPTGTGTHPLAKKLPARTNRVALSSSVMPDARSRCPDGSTCCELP YGCCPMPNATCCSDHLHCCPDQTVCDLIQSKCLSKENATTDLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDGYTCCR LQSGAWGCCPFTQAVCCEDHHCPCAGFTCDTQKGTCEQGPHQVPWMEKAPAHLSLDPQALKRDVPCD NVSSCPSSDTCCLTSGEWGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQRGSEIVAGLEKMPARRASLSH PRDIGCDQHTSCPVGQTCPSLGGSWACQQLPHAVCCEDRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVVSAQPATFL ARSPHVGVKDVECEGEGHFCNDQTCRDRNRQGWACCPYRQGVCCADRRHCCPAGFRC AARGTKCLRRE APRWDAPLRDPA LRQL	PGRN 変異体-48
51	TRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLSRHLGGPCQVDAHCSAGHSCIFTVSGTSSCCPFPE AVACGDGHHCCPRGFHCSADGRSCFQSRSGNNSVGAIQCPDSQFECPDFSTCCVMVDGSGWCCPMPQASC CEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCITPTGTGTHPLAKKLPARTNRVALSSSVMPDARSRCPDGSTCCELP YGCCPMPNATCCSDHLHCCPDQTVCDLIQSKCLSKENATTDLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDGYTCCR LQSGAWGCCPFTQAVCCEDHHCPCAGFTCDTQKGTCEQGPHQVPWMEKAPAHLSLDPQALKRDVPCD NVSSCPSSDTCCLTSGEWGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQRGSEIVAGLEKMPARRASLSH PRDIGCDQHTSCPVGQTCPSLGGSWACQQLPHAVCCEDRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVVSAQPATFL ARSPHVGVKDVECEGEGHFCNDQTCRDRNRQGWACCPYRQGVCCADRRHCCPAGFRC AARGTKCLRRE APRWDAPLRDPA LRNQL	PGRN 変異体-49
52	TRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLSRHLGGPCQVDAHCSAGHSCIFTVSGTSSCCPFPE AVACGDGHHCCPRGFHCSADGRSCFQSRSGNNSVGAIQCPDSQFECPDFSTCCVMVDGSGWCCPMPQASC CEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCITPTGTGTHPLAKKLPARTNRVALSSSVMPDARSRCPDGSTCCELP YGCCPMPNATCCSDHLHCCPDQTVCDLIQSKCLSKENATTDLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDGYTCCR LQSGAWGCCPFTQAVCCEDHHCPCAGFTCDTQKGTCEQGPHQVPWMEKAPAHLSLDPQALKRDVPCD NVSSCPSSDTCCLTSGEWGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQRGSEIVAGLEKMPARRASLSH PRDIGCDQHTSCPVGQTCPSLGGSWACQQLPHAVCCEDRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVVSAQPATFL ARSPHVGVKDVECEGEGHFCNDQTCRDRNRQGWACCPYRQGVCCADRRHCCPAGFRC AARGTKCLRRE APRWDAPLRDPA LRQL	PGRN 変異体-50
53	TRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLSRHLGGPCQVDAHCSAGHSCIFTVSGTSSCCPFPE AVACGDGHHCCPRGFHCSADGRSCFQSRSGNNSVGAIQCPDSQFECPDFSTCCVMVDGSGWCCPMPQASC CEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCITPTGTGTHPLAKKLPARTNRVALSSSVMPDARSRCPDGSTCCELP YGCCPMPNATCCSDHLHCCPDQTVCDLIQSKCLSKENATTDLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDGYTCCR LQSGAWGCCPFTQAVCCEDHHCPCAGFTCDTQKGTCEQGPHQVPWMEKAPAHLSLDPQALKRDVPCD NVSSCPSSDTCCLTSGEWGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQRGSEIVAGLEKMPARRASLSH PRDIGCDQHTSCPVGQTCPSLGGSWACQQLPHAVCCEDRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVVSAQPATFL ARSPHVGVKDVECEGEGHFCNDQTCRDRNRQGWACCPYRQGVCCADRRHCCPAGFRC AARGTKCLRRE APRWDAPLRDPA LRQL	PGRN 変異体-51
54	TRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLSRHLGGPCQVDAHCSAGHSCIFTVSGTSSCCPFPE AVACGDGHHCCPRGFHCSADGRSCFQSRSGNNSVGAIQCPDSQFECPDFSTCCVMVDGSGWCCPMPQASC CEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCITPTGTGTHPLAKKLPARTNRVALSSSVMPDARSRCPDGSTCCELP YGCCPMPNATCCSDHLHCCPDQTVCDLIQSKCLSKENATTDLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDGYTCCR LQSGAWGCCPFTQAVCCEDHHCPCAGFTCDTQKGTCEQGPHQVPWMEKAPAHLSLDPQALKRDVPCD NVSSCPSSDTCCLTSGEWGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQRGSEIVAGLEKMPARRASLSH PRDIGCDQHTSCPVGQTCPSLGGSWACQQLPHAVCCEDRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVVSAQPATFL ARSPHVGVKDVECEGEGHFCNDQTCRDRNRQGWACCPYRQGVCCADRRHCCPAGFRC AARGTKCLRRE APRWDAPLRDPA LRQL	PGRN 変異体-52
55	TRCPDGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLSRHLGGPCQVDAHCSAGHSCIFTVSGTSSCCPFPE AVACGDGHHCCPRGFHCSADGRSCFQSRSGNNSVGAIQCPDSQFECPDFSTCCVMVDGSGWCCPMPQASC CEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCITPTGTGTHPLAKKLPARTNRVALSSSVMPDARSRCPDGSTCCELP YGCCPMPNATCCSDHLHCCPDQTVCDLIQSKCLSKENATTDLLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDGYTCCR LQSGAWGCCPFTQAVCCEDHHCPCAGFTCDTQKGTCEQGPHQVPWMEKAPAHLSLDPQALKRDVPCD NVSSCPSSDTCCLTSGEWGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQRGSEIVAGLEKMPARRASLSH PRDIGCDQHTSCPVGQTCPSLGGSWACQQLPHAVCCEDRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVVSAQPATFL ARSPHVGVKDVECEGEGHFCNDQTCRDRNRQGWACCPYRQGVCCADRRHCCPAGFRC AARGTKCLRRE APRWDAPLRDPA LRQLLY ₁ Y ₂ QLL, ここで、Y ₁ はLであるか、または存在せず、かつY ₂ はRであるか、または存在しない	PGRN 変異体-53

10

20

30

40

50

配列番号	配列	説明
56	TRCPDGGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTSLRHLGGPCQVDAHCSAGHSCIFTVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCCPRGFHCSADGRSCFQSRSGNNSVGAIQCPDSQFECPDFSTCCVMVDGSGWGCCPMPQASC CEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCITPTGTHPLAKKLPARTNRAVALSSVMCPDARSRCPDGSTCCELPSPGKYGCCPMNPATCCSDHLHCCPDQTVCDLIQSKCLSKENATTDLTLKLPARTVGDVKCDMEVSCPDGYTCCR LQSGAWGCCPFQAVCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPQHVPWMEKAPAHLSLPDPQALKRDVPCD NVSSCPSSDTCCQLTSGEWGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQRGSEIVAGLEKMPARRASLSH PRDIGCDQHTSCPVGQTCCPSLGGSWACQPLHAVCCEDRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVVSQAQATFL ARSPHVGVKDVCEGEGHFCHDNQTCRDNRQGWACCPYRQGVCCADRRHCCPAGFRC AARGTKCLRRE APRWDAPLRDPAALRQLLQLL	PGRN 変異体-54
57	TRCPDGGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTSLRHLGGPCQVDAHCSAGHSCIFTVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCCPRGFHCSADGRSCFQSRSGNNSVGAIQCPDSQFECPDFSTCCVMVDGSGWGCCPMPQASC CEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCITPTGTHPLAKKLPARTNRAVALSSVMCPDARSRCPDGSTCCELPSPGKYGCCPMNPATCCSDHLHCCPDQTVCDLIQSKCLSKENATTDLTLKLPARTVGDVKCDMEVSCPDGYTCCR LQSGAWGCCPFQAVCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPQHVPWMEKAPAHLSLPDPQALKRDVPCD NVSSCPSSDTCCQLTSGEWGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQRGSEIVAGLEKMPARRASLSH PRDIGCDQHTSCPVGQTCCPSLGGSWACQPLHAVCCEDRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVVSQAQATFL ARSPHVGVKDVCEGEGHFCHDNQTCRDNRQGWACCPYRQGVCCADRRHCCPAGFRC AARGTKCLRRE APRWDAPLRDPAALRQLLQLL	PGRN 変異体-55
58	LRQLL	
59	QLLQLL	
60	QLLLRQLL	
61	APELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYITLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	野生型ヒトFe配列 231~447位 EUインデックス ナンバリング
62	APELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK	CH2ドメイン配列 231~340位 EUインデックス ナンバリング
63	GQPREPQVYITLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	CH3ドメイン配列 341~447位 EUインデックス ナンバリング
64	APELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYITLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	ノブ変異を含む Fe配列
65	APEAAGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYITLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	ノブ変異及び LALA変異を含む Fe配列
66	APELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYITLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	ホール変異を含む Fe配列
67	APEAAGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYITLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	ホール変異及び LALA変異を含む Fe配列
68	APELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYITLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESYGTWANYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVTKEEWQQGFVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	クローン CH3C.35.23.2
69	APELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYITLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESYGTWANYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVTKEEWQQGFVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	ノブ変異を含む クローンCH3C.35.23.2
70	APEAAGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYITLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESYGTWANYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVTKEEWQQGFVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	ノブ変異及び LALA変異を含む クローンCH3C.35.23.2
71	APELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYITLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESYGTWANYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVTKEEWQQGFVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	ホール変異を含む クローンCH3C.35.23.2

10

20

30

40

50

配列番号	配列	説明
72	APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPVETCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPDSIAVEWESYGTEWANYKTTPPVLDSGGSFFLVSKLTVTKEEWQQGFVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	ホール変異及びLALA変異を含むクローンCH3C.35.23.2
73	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPVETCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESYGTEWANYKTTPPVLDSGGSFFLVSKLTVTKEEWQQGFVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	部分的ヒンジ-クローンCH3C.35.23.2
74	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPVETCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESYGTEWANYKTTPPVLDSGGSFFLVSKLTVTKEEWQQGFVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	部分的ヒンジ-ノブ変異を含むクローンCH3C.35.23.2
75	DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPVETCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESYGTEWANYKTTPPVLDSGGSFFLVSKLTVTKEEWQQGFVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	部分的ヒンジ-ノブ変異及びLALA変異を含むクローンCH3C.35.23.2
76	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPVETCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESYGTEWANYKTTPPVLDSGGSFFLVSKLTVTKEEWQQGFVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	部分的ヒンジ-ホール変異を含むクローンCH3C.35.23.2
77	DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPVETCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESYGTEWANYKTTPPVLDSGGSFFLVSKLTVTKEEWQQGFVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	部分的ヒンジ-ホール変異及びLALA変異を含むクローンCH3C.35.23.2
78	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPVETCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVLWESYGTEWSSYKTTPPVLDSGGSFFLVSKLTVTKEEWQQGFVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	クローンCH3C.35.21.17
79	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPVETCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVLWESYGTEWSSYKTTPPVLDSGGSFFLVSKLTVTKEEWQQGFVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	ノブ変異を含むクローンCH3C.35.21.17
80	APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPVETCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVLWESYGTEWSSYKTTPPVLDSGGSFFLVSKLTVTKEEWQQGFVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	ノブ変異及びLALA変異を含むクローンCH3C.35.21.17
81	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPVETCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVLWESYGTEWSSYKTTPPVLDSGGSFFLVSKLTVTKEEWQQGFVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	ホール変異を含むクローンCH3C.35.21.17
82	APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPVETCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVLWESYGTEWSSYKTTPPVLDSGGSFFLVSKLTVTKEEWQQGFVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	ホール変異及びLALA変異を含むクローンCH3C.35.21.17
83	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPVETCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVLWESYGTEWSSYKTTPPVLDSGGSFFLVSKLTVTKEEWQQGFVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	部分的ヒンジ-クローンCH3C.35.21.17
84	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPVETCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVLWESYGTEWSSYKTTPPVLDSGGSFFLVSKLTVTKEEWQQGFVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	部分的ヒンジ-ノブ変異を含むクローンCH3C.35.21.17
85	DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPVETCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVLWESYGTEWSSYKTTPPVLDSGGSFFLVSKLTVTKEEWQQGFVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	部分的ヒンジ-ノブ変異及びLALA変異を含むクローンCH3C.35.21.17
86	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPVETCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVLWESYGTEWSSYKTTPPVLDSGGSFFLVSKLTVTKEEWQQGFVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	部分的ヒンジ-ホール変異を含むクローンCH3C.35.21.17

10

20

30

40

配列番号	配列	説明
87	DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKN QVLSLSCAVKGFYPSDIAVLWESYGTEWSSYKTTTPVLDSGDSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSVMSHEA LHNHYTQKSLSLSPGK	部分的ヒンジ ホール変異及び LALA変異を含む クロンCH3C.35. 21.17
88	EPKSCDKTHTCPPCP	ヒトIgG1ヒンジ アミノ酸配列
89	DKTHTCPPCP	ヒトIgG1ヒンジ配列 の一部(部分的 ヒンジ)
90	GGGGS	ポリペプチドリンカー
91	GGGSGGGGS	ポリペプチドリンカー
92	GGSG	ポリペプチドリンカー
93	SGGG	ポリペプチドリンカー
94	KESGSVSSEQLAQFRSLD	ポリペプチドリンカー
95	EGKSSGSGSESKST	ポリペプチドリンカー
96	GSAGSAAGSGEF	ポリペプチドリンカー
97	AEAAAKA	ポリペプチドリンカー
98	DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKN QVLSLSCAVKGFYPSDIAVWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSVMSHEA LHNHYTQKSLSLSPGKGGGSGGGGSTRCPDQGFQCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLRHLGGPC QVDAHCSAGHSCTFTVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCPRGFHCSADGRSCFQSRGNNVSGAIQCPDSQFE CPDFSTCCVMVDGSGWCCPMPQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCITPTGTHPLAKKLPQRTNRAVA LSSSV MCPDARSRCPDGSTCCELPSGKYGCCPMPNATCCSDHLHCCPQDITVCDLIQSKCLSKENATTDLT KLPAAHTVGDVVKCDMEVSCPDGYTCCRLQSGAWGCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGP HQ VPWMEKAPAHLSLPDPAALKRDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGEWGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCV AEGQCQRGSEIVAGLEKMPARRASLSHPRDIGCDQHTSCPVGQTCCPSLGGSWACCQLPHAVCCEDRQHC CPAGYTCNVKARSCEKEVVSQAQATFLARSPHVGVKDVCEGEGHFCHDNQTCCRDNRQGWACCPYRQG VCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRREAPRWDAPLRDPALRPIL	部分的ヒンジ ホール変異及び LALA変異を含む Feポリペプチド (G ₄ S) ₂ - PGRN(PIL)
99	DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKN QVLSLSCAVKGFYPSDIAVWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSVMSHEA LHNHYTQKSLSLSPGKGGGSGGGGSTRCPDQGFQCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLRHLGGPC QVDAHCSAGHSCTFTVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCPRGFHCSADGRSCFQSRGNNVSGAIQCPDSQFE CPDFSTCCVMVDGSGWCCPMPQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCITPTGTHPLAKKLPQRTNRAVA LSSSV MCPDARSRCPDGSTCCELPSGKYGCCPMPNATCCSDHLHCCPQDITVCDLIQSKCLSKENATTDLT KLPAAHTVGDVVKCDMEVSCPDGYTCCRLQSGAWGCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGP HQ VPWMEKAPAHLSLPDPAALKRDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGEWGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCV AEGQCQRGSEIVAGLEKMPARRASLSHPRDIGCDQHTSCPVGQTCCPSLGGSWACCQLPHAVCCEDRQHC CPAGYTCNVKARSCEKEVVSQAQATFLARSPHVGVKDVCEGEGHFCHDNQTCCRDNRQGWACCPYRQG VCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRREAPRWDAPLRDPALRPFL	部分的ヒンジ ホール変異及び LALA変異を含む Feポリペプチド (G ₄ S) ₂ - PGRN(PFL)
100	DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKN QVLSLSCAVKGFYPSDIAVWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSVMSHEA LHNHYTQKSLSLSPGKGGGSGGGGSTRCPDQGFQCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLRHLGGPC QVDAHCSAGHSCTFTVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCPRGFHCSADGRSCFQSRGNNVSGAIQCPDSQFE CPDFSTCCVMVDGSGWCCPMPQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCITPTGTHPLAKKLPQRTNRAVA LSSSV MCPDARSRCPDGSTCCELPSGKYGCCPMPNATCCSDHLHCCPQDITVCDLIQSKCLSKENATTDLT KLPAAHTVGDVVKCDMEVSCPDGYTCCRLQSGAWGCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGP HQ VPWMEKAPAHLSLPDPAALKRDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGEWGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCV AEGQCQRGSEIVAGLEKMPARRASLSHPRDIGCDQHTSCPVGQTCCPSLGGSWACCQLPHAVCCEDRQHC CPAGYTCNVKARSCEKEVVSQAQATFLARSPHVGVKDVCEGEGHFCHDNQTCCRDNRQGWACCPYRQG VCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRREAPRWDAPLRDPALRQQL	部分的ヒンジ ホール変異及び LALA変異を含む Feポリペプチド (G ₄ S) ₂ - PGRN(QQL)
101	DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKN QVLSLSCAVKGFYPSDIAVWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSVMSHEA LHNHYTQKSLSLSPGKGGGSGGGGSTRCPDQGFQCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPTTLRHLGGPC QVDAHCSAGHSCTFTVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCPRGFHCSADGRSCFQSRGNNVSGAIQCPDSQFE CPDFSTCCVMVDGSGWCCPMPQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCITPTGTHPLAKKLPQRTNRAVA LSSSV MCPDARSRCPDGSTCCELPSGKYGCCPMPNATCCSDHLHCCPQDITVCDLIQSKCLSKENATTDLT KLPAAHTVGDVVKCDMEVSCPDGYTCCRLQSGAWGCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGP HQ VPWMEKAPAHLSLPDPAALKRDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGEWGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCV AEGQCQRGSEIVAGLEKMPARRASLSHPRDIGCDQHTSCPVGQTCCPSLGGSWACCQLPHAVCCEDRQHC CPAGYTCNVKARSCEKEVVSQAQATFLARSPHVGVKDVCEGEGHFCHDNQTCCRDNRQGWACCPYRQG VCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRREAPRWDAPLRDPALRVVL	部分的ヒンジ ホール変異及び LALA変異を含む Feポリペプチド (G ₄ S) ₂ - PGRN(VVL)

10

20

30

40

50

配列番号	配列	説明
102	DKTHTCPPCPAPEAAGGSPVFLFPKPKDITLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKN QVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPGKGGGGGGGGGSTRCPDGGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPITLSRHLGGPC QVDAHCSAGHSCTFTVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCCPRGFHCSADGRSCFQRSNGNSVGAIQCPDSQF CPDFSTCCVMVDGSGWCCPMPQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCITPTGTHTPLAKKLP AQRTNRAVA LSSSVMCPDARSRCPDGSTCCELP SGKYGCCPMPNATCCSDHLHCCPQD TVCDLIQSKCLSKENATTDLT TKLPAHTVGDVKCDMEVSCP DGYTCRRLQSGAWGCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPHQ VWPWMEKAPAHLSLPDPQALKRDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGEWGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCV AEGQCQRGSEIVAGLEKMPARRASLSHPRDIGCDQHTSCPVGQTCPCSLGGSWACCCQLPHAVCCEDRQH CPAGYTCNVKARSCEKEVVSQAQATFLARSPHVGVKDVECGEGHFC HDNQTC CRDNRQGWACCPYRQ GVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRREAPRWDAPLRDPALRVTL	部分的ヒンジ -ホール変異及び LALA変異を含む Fcポリペプチド (G4S)- PGRN(VTL)
103	DKTHTCPPCPAPEAAGGSPVFLFPKPKDITLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKN QVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGGGGGGSTRCPDGGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPITLSRHLGGP CQVDAHCSAGHSCTFTVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCCPRGFHCSADGRSCFQRSNGNSVGAIQCPDSQF ECPDFSTCCVMVDGSGWCCPMPQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCITPTGTHTPLAKKLP AQRTNRAV ALSSVMCPDARSRCPDGSTCCELP SGKYGCCPMPNATCCSDHLHCCPQD TVCDLIQSKCLSKENATTDLT TKLPAHTVGDVKCDMEVSCP DGYTCRRLQSGAWGCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPH VWPWMEKAPAHLSLPDPQALKRDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGEWGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTC V AEGQCQRGSEIVAGLEKMPARRASLSHPRDIGCDQHTSCPVGQTCPCSLGGSWACCCQLPHAVCCEDRQH CPAGYTCNVKARSCEKEVVSQAQATFLARSPHVGVKDVECGEGHFC HDNQTC CRDNRQGWACCPYRQ GVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRREAPRWDAPLRDPALRPIL	部分的ヒンジ -ノブ変異及び LALA変異を含む Fcポリペプチド (G4S)- PGRN(PIL)
104	DKTHTCPPCPAPEAAGGSPVFLFPKPKDITLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKN QVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGGGGGGSTRCPDGGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPITLSRHLGGP CQVDAHCSAGHSCTFTVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCCPRGFHCSADGRSCFQRSNGNSVGAIQCPDSQF ECPDFSTCCVMVDGSGWCCPMPQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCITPTGTHTPLAKKLP AQRTNRAV ALSSVMCPDARSRCPDGSTCCELP SGKYGCCPMPNATCCSDHLHCCPQD TVCDLIQSKCLSKENATTDLT TKLPAHTVGDVKCDMEVSCP DGYTCRRLQSGAWGCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPH VWPWMEKAPAHLSLPDPQALKRDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGEWGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTC V AEGQCQRGSEIVAGLEKMPARRASLSHPRDIGCDQHTSCPVGQTCPCSLGGSWACCCQLPHAVCCEDRQH CPAGYTCNVKARSCEKEVVSQAQATFLARSPHVGVKDVECGEGHFC HDNQTC CRDNRQGWACCPYRQ GVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRREAPRWDAPLRDPALRPFL	部分的ヒンジ -ノブ変異及び LALA変異を含む Fcポリペプチド (G4S)- PGRN(PFL)
105	DKTHTCPPCPAPEAAGGSPVFLFPKPKDITLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKN QVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGGGGGGSTRCPDGGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPITLSRHLGGP CQVDAHCSAGHSCTFTVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCCPRGFHCSADGRSCFQRSNGNSVGAIQCPDSQF ECPDFSTCCVMVDGSGWCCPMPQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCITPTGTHTPLAKKLP AQRTNRAV ALSSVMCPDARSRCPDGSTCCELP SGKYGCCPMPNATCCSDHLHCCPQD TVCDLIQSKCLSKENATTDLT TKLPAHTVGDVKCDMEVSCP DGYTCRRLQSGAWGCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPH VWPWMEKAPAHLSLPDPQALKRDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGEWGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTC V AEGQCQRGSEIVAGLEKMPARRASLSHPRDIGCDQHTSCPVGQTCPCSLGGSWACCCQLPHAVCCEDRQH CPAGYTCNVKARSCEKEVVSQAQATFLARSPHVGVKDVECGEGHFC HDNQTC CRDNRQGWACCPYRQ GVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRREAPRWDAPLRDPALRQQL	部分的ヒンジ -ノブ変異及び LALA変異を含む Fcポリペプチド (G4S)- PGRN(QQL)
106	DKTHTCPPCPAPEAAGGSPVFLFPKPKDITLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKN QVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGGGGGGSTRCPDGGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPITLSRHLGGP CQVDAHCSAGHSCTFTVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCCPRGFHCSADGRSCFQRSNGNSVGAIQCPDSQF ECPDFSTCCVMVDGSGWCCPMPQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCITPTGTHTPLAKKLP AQRTNRAV ALSSVMCPDARSRCPDGSTCCELP SGKYGCCPMPNATCCSDHLHCCPQD TVCDLIQSKCLSKENATTDLT TKLPAHTVGDVKCDMEVSCP DGYTCRRLQSGAWGCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPH VWPWMEKAPAHLSLPDPQALKRDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGEWGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTC V AEGQCQRGSEIVAGLEKMPARRASLSHPRDIGCDQHTSCPVGQTCPCSLGGSWACCCQLPHAVCCEDRQH CPAGYTCNVKARSCEKEVVSQAQATFLARSPHVGVKDVECGEGHFC HDNQTC CRDNRQGWACCPYRQ GVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRREAPRWDAPLRDPALRVVL	部分的ヒンジ -ノブ変異及び LALA変異を含む Fcポリペプチド (G4S)- PGRN(VVL)
107	DKTHTCPPCPAPEAAGGSPVFLFPKPKDITLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKN QVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGGGGGGSTRCPDGGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPITLSRHLGGP CQVDAHCSAGHSCTFTVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCCPRGFHCSADGRSCFQRSNGNSVGAIQCPDSQF ECPDFSTCCVMVDGSGWCCPMPQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCITPTGTHTPLAKKLP AQRTNRAV ALSSVMCPDARSRCPDGSTCCELP SGKYGCCPMPNATCCSDHLHCCPQD TVCDLIQSKCLSKENATTDLT TKLPAHTVGDVKCDMEVSCP DGYTCRRLQSGAWGCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPH VWPWMEKAPAHLSLPDPQALKRDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGEWGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTC V AEGQCQRGSEIVAGLEKMPARRASLSHPRDIGCDQHTSCPVGQTCPCSLGGSWACCCQLPHAVCCEDRQH CPAGYTCNVKARSCEKEVVSQAQATFLARSPHVGVKDVECGEGHFC HDNQTC CRDNRQGWACCPYRQ GVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRREAPRWDAPLRDPALRVTL	部分的ヒンジ -ノブ変異及び LALA変異を含む Fcポリペプチド (G4S)- PGRN(VTL)

10

20

30

40

50

配列番号	配列	説明
108	DKTHTCPPCPAPEAAGGSPSVFLFPKPKDITLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKN QVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPGKGGGGGGGGGSTRCPDQGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPPTLSRHLGGPC QVDAHCSAGHSICFTVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCCPRGFHCSADGRSCFQRSNGNSVGAIQCPDSQFE CPDFSTCCVMVDGWSGCCPMPOASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCITPTGTHPLAKKLPARTNRAVA LSSSVMPDARSRCPDGSTCCELPSGKYGCCPMNPATCCSDHLHCCPDQTVCDLIQSKCLSKENATTDLT TKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDPGYTCRQLQSGAWGCCPFTQAVCCEDHHCPCAGFTCDTQKGTCEQGHQ VPWMEKAPAHLSLDPDQALKRDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGEWGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCV AEGQCQRGSEIVAGLEKMPARRASLSHPRDIDGCDQHTSCPVGQTCPCSLGGSWACCQLPHAVCCEDRQHC CPAGYTCNVKARSCEKEVVSQAQATFLARSPHVGVKDVCEGEGHFCHDNQTCRDNRQGWACCPYRQG VCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRREAPRWDAPLRDPALRQL	部分的ヒンジ- ホール変異及び LALA変異を含む Fcポリペプチド (G ₄ S)- PGRN
109	MMDQARSAFSNLFGGEPLSYTRFSLARQVDGDNHVMKLAVDDEENADNNTKANVTCKPKRCSGSICYG TIADVIFFLIGMIGLYGCKGVPEKTECERLAGTESPVREEPGEDFPAARRLYWDDLKRLSEKLDSTDF GTIKLLNENSYVPREAGSOKDENLALYVENQREFKLKSVWRDQHFVKIQVKDSQNSVIIVDKNGRLVY LVENPGGYVAYSAAATVTGKLVHANFGTKKDFEDLYTPVNGSIVIVRAGKITFAEKVANAESLNAIGVLIY MDQTKFPIVNAELSFVGHAGLGTGDPYTPGFPSFNHTQPPSRSSGLPNIPVQTISRAAAELFGNMEGDCPS DWKTDSTCRMVTSSESKNVKLTVSNVLKEIKILNIFGVIKGFVEPDHYVVVGAQRDAWGPGAAKSGVGTAL LLKLAQMFSMDMLVDGDFQPSRSIIASWSAGDFGSVGAWELEGYLSLHLKAFTYINLDKAVLTGSNFKV SASPLLYTLIEKTMQNVKHPVTGQFLYQDSNWASKVEKLTLDNAAFPFLAYSIPAVSFCFCEDTDYPYLG TTMDTYKELIERIPELNKKVARAAAEVAGQFVIKLTHDVELNLDYERYNSQLLSFVRDLNQYRADIKEMGLS LQWLVSARGDFFRATSRLLTDFGNAEKTRDFVMKKLNDRVMRVEYHFLSPYVSPKESPFHVFVWGS GSHITLPALENLKLKQNNGAFNETLFRNQLALATWTIQGAANALSGDVWDIDNEF	ヒトトランスフェリン 受容体タンパク質1 (TFR1)
110	DKTHTCPPCPAPEAAGGSPSVFLFPKPKDITLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKN QVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPGK	部分的ヒンジ- ホール変異及び LALA変異を含む Fc配列
111	TRCPDQGFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPPTLSRHLGGPCQVDAHCSAGHSICFTVSGTSSCCPFPE AVACGDGHHCCPRGFHCSADGRSCFQRSNGNSVGAIQCPDSQFCEPDEFSTCCVMVDGWSGCCPMPOASC CEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCITPTGTHPLAKKLPARTNRAVALSSSVMPDARSRCPDGSTCCELPSGK YGCCPMNPATCCSDHLHCCPDQTVCDLIQSKCLSKENATTDLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDPGYTCR LQSGAWGCCPFTQAVCCEDHHCPCAGFTCDTQKGTCEQGHQVQVPWMEKAPAHLSLDPDQALKRDVPCD NVSSCPSSDTCCQLTSGEWGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQRGSEIVAGLEKMPARRASLSH PRDIDGCDQHTSCPVGQTCPCSLGGSWACCQLPHAVCCEDRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVVSQAQATFL ARSPHVGVKDVCEGEGHFCHDNQTCRDNRQGWACCPYRQGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRRE APRWDAPLRDPALRNIL	PGRN 変異体 -56
112	TRCPDQGFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPPTLSRHLGGPCQVDAHCSAGHSICFTVSGTSSCCPFPE AVACGDGHHCCPRGFHCSADGRSCFQRSNGNSVGAIQCPDSQFCEPDEFSTCCVMVDGWSGCCPMPOASC CEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCITPTGTHPLAKKLPARTNRAVALSSSVMPDARSRCPDGSTCCELPSGK YGCCPMNPATCCSDHLHCCPDQTVCDLIQSKCLSKENATTDLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDPGYTCR LQSGAWGCCPFTQAVCCEDHHCPCAGFTCDTQKGTCEQGHQVQVPWMEKAPAHLSLDPDQALKRDVPCD NVSSCPSSDTCCQLTSGEWGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQRGSEIVAGLEKMPARRASLSH PRDIDGCDQHTSCPVGQTCPCSLGGSWACCQLPHAVCCEDRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVVSQAQATFL ARSPHVGVKDVCEGEGHFCHDNQTCRDNRQGWACCPYRQGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRRE APRWDAPLRDPALRLL	PGRN 変異体 -57
113	TRCPDQGFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPPTLSRHLGGPCQVDAHCSAGHSICFTVSGTSSCCPFPE AVACGDGHHCCPRGFHCSADGRSCFQRSNGNSVGAIQCPDSQFCEPDEFSTCCVMVDGWSGCCPMPOASC CEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCITPTGTHPLAKKLPARTNRAVALSSSVMPDARSRCPDGSTCCELPSGK YGCCPMNPATCCSDHLHCCPDQTVCDLIQSKCLSKENATTDLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDPGYTCR LQSGAWGCCPFTQAVCCEDHHCPCAGFTCDTQKGTCEQGHQVQVPWMEKAPAHLSLDPDQALKRDVPCD NVSSCPSSDTCCQLTSGEWGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQRGSEIVAGLEKMPARRASLSH PRDIDGCDQHTSCPVGQTCPCSLGGSWACCQLPHAVCCEDRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVVSQAQATFL ARSPHVGVKDVCEGEGHFCHDNQTCRDNRQGWACCPYRQGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRRE APRWDAPLRDPALRPL	PGRN 変異体 -58
114	TRCPDQGFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPPTLSRHLGGPCQVDAHCSAGHSICFTVSGTSSCCPFPE AVACGDGHHCCPRGFHCSADGRSCFQRSNGNSVGAIQCPDSQFCEPDEFSTCCVMVDGWSGCCPMPOASC CEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCITPTGTHPLAKKLPARTNRAVALSSSVMPDARSRCPDGSTCCELPSGK YGCCPMNPATCCSDHLHCCPDQTVCDLIQSKCLSKENATTDLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDPGYTCR LQSGAWGCCPFTQAVCCEDHHCPCAGFTCDTQKGTCEQGHQVQVPWMEKAPAHLSLDPDQALKRDVPCD NVSSCPSSDTCCQLTSGEWGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQRGSEIVAGLEKMPARRASLSH PRDIDGCDQHTSCPVGQTCPCSLGGSWACCQLPHAVCCEDRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVVSQAQATFL ARSPHVGVKDVCEGEGHFCHDNQTCRDNRQGWACCPYRQGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRRE APRWDAPLRDPALRPL	PGRN 変異体 -59
115	TRCPDQGFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPPTLSRHLGGPCQVDAHCSAGHSICFTVSGTSSCCPFPE AVACGDGHHCCPRGFHCSADGRSCFQRSNGNSVGAIQCPDSQFCEPDEFSTCCVMVDGWSGCCPMPOASC CEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCITPTGTHPLAKKLPARTNRAVALSSSVMPDARSRCPDGSTCCELPSGK YGCCPMNPATCCSDHLHCCPDQTVCDLIQSKCLSKENATTDLTKLPAHTVGDVKCDMEVSCPDPGYTCR LQSGAWGCCPFTQAVCCEDHHCPCAGFTCDTQKGTCEQGHQVQVPWMEKAPAHLSLDPDQALKRDVPCD NVSSCPSSDTCCQLTSGEWGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQRGSEIVAGLEKMPARRASLSH PRDIDGCDQHTSCPVGQTCPCSLGGSWACCQLPHAVCCEDRQHCCPAGYTCNVKARSCEKEVVSQAQATFL ARSPHVGVKDVCEGEGHFCHDNQTCRDNRQGWACCPYRQGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRRE APRWDAPLRDPALRYIL	PGRN 変異体 -60

10

20

30

40

50

40

配列番号	配列	説明
124	DKTHTCPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPVETCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKN QVSLSCAVKGFYPDSIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPGKGGGGGGGGGSTRCPDGGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPITLSRHLGGPC QVDAHCSAGHSCIFTVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCCPRGFHCSADGRSCFQSRGNNVSGAIQCPDSQFE CPDFTSTCCVMVDGSGWCCPMPQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCITPTGTHTPLAKKLPARTNRAVA LSSVMCPDARSRCPDGSTCCELPSPGYGCCPMPNATCCSDHLHCCPQDTVCDLIQSKCLSKENATTDLT KLPAHTVGDVVKCDMEVSCPDPGYTCRRLQSGAWGCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPHQ VPWMEKAPAHLSLPDPQALKRDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGEWGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCV AEGQCQRGSEIVAGLEKMPARRASLSHPRDIGCDQHTSCPVGQTCPSLGGSWACCQLPHAVCCEDRQHC CPAGYTCNVKARSCEKEVVSQAQPAFLARSPHVGVKDVCEGEGHFCHDNQTCRDRNRQGWACCOPYRQG VCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRREAPRWDAPLRDPALRPLY	部分的ヒンジ ホール変異及び LALA変異を含む Fcポリペプチド -(G ₄ S) ₂ - PGRN(PYL)
125	DKTHTCPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPVETCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKN QVSLSCAVKGFYPDSIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPGKGGGGGGGGGSTRCPDGGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPITLSRHLGGPC QVDAHCSAGHSCIFTVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCCPRGFHCSADGRSCFQSRGNNVSGAIQCPDSQFE CPDFTSTCCVMVDGSGWCCPMPQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCITPTGTHTPLAKKLPARTNRAVA LSSVMCPDARSRCPDGSTCCELPSPGYGCCPMPNATCCSDHLHCCPQDTVCDLIQSKCLSKENATTDLT KLPAHTVGDVVKCDMEVSCPDPGYTCRRLQSGAWGCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPHQ VPWMEKAPAHLSLPDPQALKRDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGEWGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCV AEGQCQRGSEIVAGLEKMPARRASLSHPRDIGCDQHTSCPVGQTCPSLGGSWACCQLPHAVCCEDRQHC CPAGYTCNVKARSCEKEVVSQAQPAFLARSPHVGVKDVCEGEGHFCHDNQTCRDRNRQGWACCOPYRQG VCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRREAPRWDAPLRDPALRQL	部分的ヒンジ ホール変異及び LALA変異を含む Fcポリペプチド -(G ₄ S) ₂ - PGRN(QRL)
126	DKTHTCPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPVETCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKN QVSLSCAVKGFYPDSIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPGKGGGGGGGGGSTRCPDGGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPITLSRHLGGPC QVDAHCSAGHSCIFTVSGTSSCCPFPEAVACGDGHHCCPRGFHCSADGRSCFQSRGNNVSGAIQCPDSQFE CPDFTSTCCVMVDGSGWCCPMPQASCCEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCITPTGTHTPLAKKLPARTNRAVA LSSVMCPDARSRCPDGSTCCELPSPGYGCCPMPNATCCSDHLHCCPQDTVCDLIQSKCLSKENATTDLT KLPAHTVGDVVKCDMEVSCPDPGYTCRRLQSGAWGCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPHQ VPWMEKAPAHLSLPDPQALKRDVPCDNVSSCPSSDTCCQLTSGEWGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCV AEGQCQRGSEIVAGLEKMPARRASLSHPRDIGCDQHTSCPVGQTCPSLGGSWACCQLPHAVCCEDRQHC CPAGYTCNVKARSCEKEVVSQAQPAFLARSPHVGVKDVCEGEGHFCHDNQTCRDRNRQGWACCOPYRQG VCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRREAPRWDAPLRDPALRQL	部分的ヒンジ ホール変異及び LALA変異を含む Fcポリペプチド -(G ₄ S) ₂ - PGRN(QHL)
127	TRCPDGGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPITLSRHLGGPCQVDAHCSAGHSCIFTVSGTSSCCPFPE AVACGDGHHCCPRGFHCSADGRSCFQSRGNNVSGAIQCPDSQFECPDFTSTCCVMVDGSGWCCPMPQASC CEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCITPTGTHTPLAKKLPARTNRAVALSSVMCPDARSRCPDGSTCCELPSPGK YGCCPMPNATCCSDHLHCCPQDTVCDLIQSKCLSKENATTDLT KLPAHTVGDVVKCDMEVSCPDPGYTCR LQSGAWGCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPHQVPWMEKAPAHLSLPDPQALKRDVPCD NVSSCPSSDTCCQLTSGEWGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQRGSEIVAGLEKMPARRASLSH PRDIGCDQHTSCPVGQTCPSLGGSWACCQLPHAVCCEDRQHCPCAGYTCNVKARSCEKEVVSQAQPAFL ARSPHVGVKDVCEGEGHFCHDNQTCRDRNRQGWACCOPYRQGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRRE APRWDAPLRDPALRQLY	PGRN 変異体-67
128	TRCPDGGQFCPVACCLDPGGASYSCCRPLLDKWPITLSRHLGGPCQVDAHCSAGHSCIFTVSGTSSCCPFPE AVACGDGHHCCPRGFHCSADGRSCFQSRGNNVSGAIQCPDSQFECPDFTSTCCVMVDGSGWCCPMPQASC CEDRVHCCPHGAFCDLVHTRCITPTGTHTPLAKKLPARTNRAVALSSVMCPDARSRCPDGSTCCELPSPGK YGCCPMPNATCCSDHLHCCPQDTVCDLIQSKCLSKENATTDLT KLPAHTVGDVVKCDMEVSCPDPGYTCR LQSGAWGCCPFTQAVCCEDHIHCCPAGFTCDTQKGTCEQGPHQVPWMEKAPAHLSLPDPQALKRDVPCD NVSSCPSSDTCCQLTSGEWGCCPIPEAVCCSDHQHCCPQGYTCVAEGQCQRGSEIVAGLEKMPARRASLSH PRDIGCDQHTSCPVGQTCPSLGGSWACCQLPHAVCCEDRQHCPCAGYTCNVKARSCEKEVVSQAQPAFL ARSPHVGVKDVCEGEGHFCHDNQTCRDRNRQGWACCOPYRQGVCCADRRHCCPAGFRCAARGTKCLRRE APRWDAPLRDPALRQLP	PGRN 変異体-68
129	APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPVETCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVK GFYPDSIAVEWESYGTEWANYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVTKEEWQGGFVFCFSVMHEALHNHYTQKS LSLSPG	ノブ変異及び LALA変異を含む クロンCH3C35.23. 2、短縮型
130	DKTHTCPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPVETCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKN QVSLWCLVKGFYPDSIAVEWESYGTEWANYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVTKEEWQGGFVFCFSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPG	部分的ヒンジ ノブ変異及び LALA変異を含む クロンCH3C35. 23.2、短縮型
131	APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPVETCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVK GFYPDSIAVLWESYGTEWSSYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVTKEEWQGGFVFCFSVMHEALHNHYTQKS LSLSPG	ノブ変異及び LALA変異を含む クロンCH3C35. 21.17、短縮型

配列番号	配列	説明
132	DKTHTCPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPVETCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKN QVSLWCLVKGFYPDSIAVLWESYGTEWSSYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVTKEEWQGGFVFCFSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPG	部分的ヒンジ ノブ変異及び LALA変異を含む クロンCH3C35.21. 17、短縮型

10

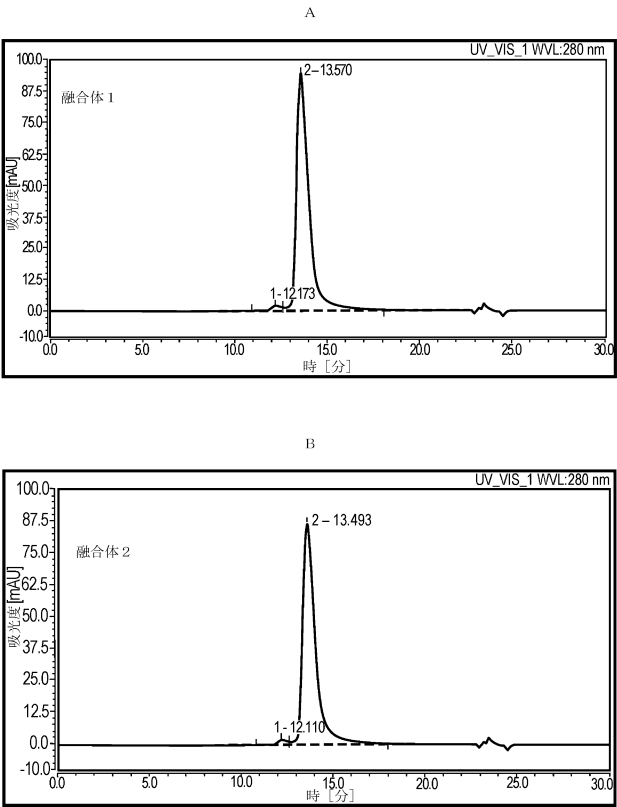
20

30

40

50

【図面】
【図 1】



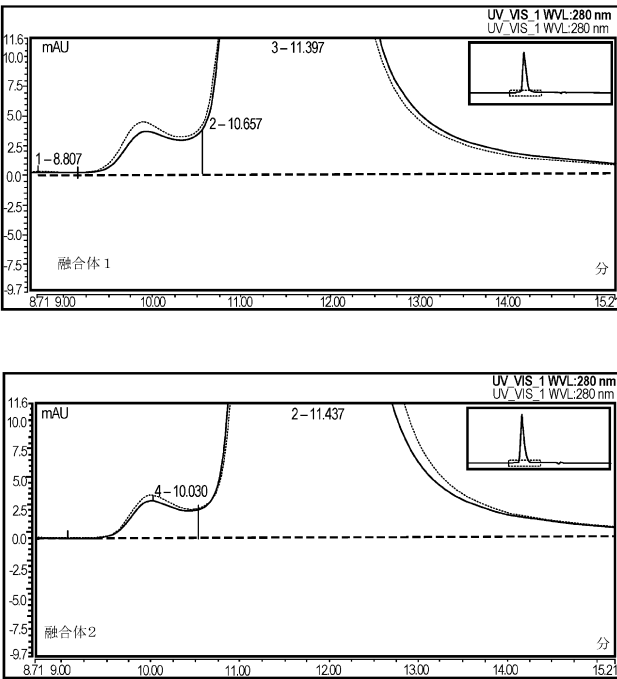
【図 2】

融合タンパク質	緩衝液	DSF Tm1	DSF TON
融合体 1	20 mM リン酸ナトリウム、 6 %スクロース、 pH6.5	69.32 (0.26)	63.19 (0.45)
融合体 2	20 mM リン酸ナトリウム、 6 %スクロース、 pH6.5	69.57 (0.27)	62.61 (0.52)

10

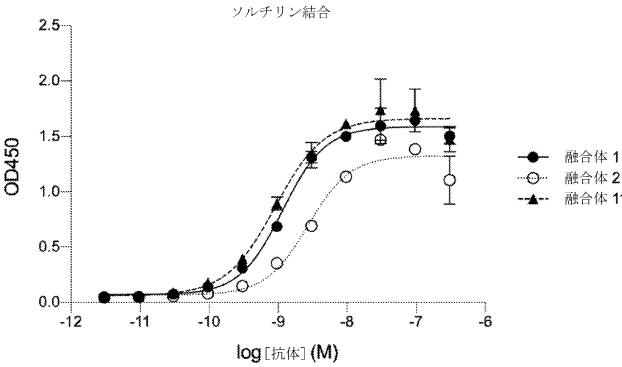
20

【図 3】



20 mMリン酸ナトリウム、6 %スクロース, pH6.5

【図 4】

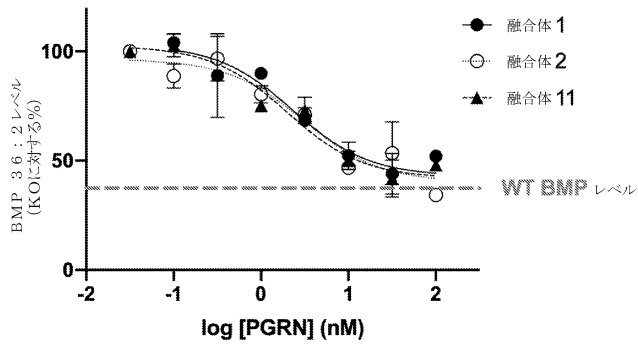


30

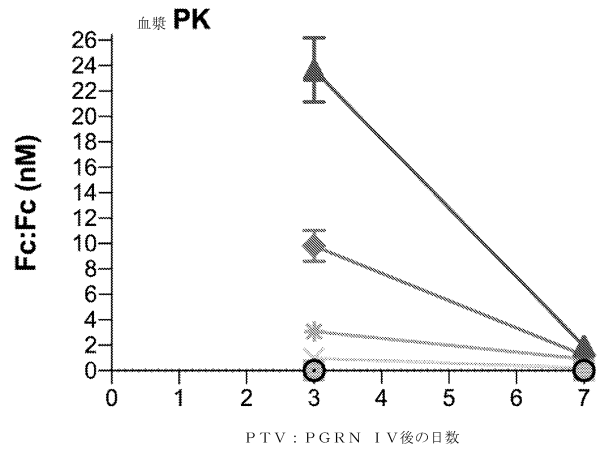
40

50

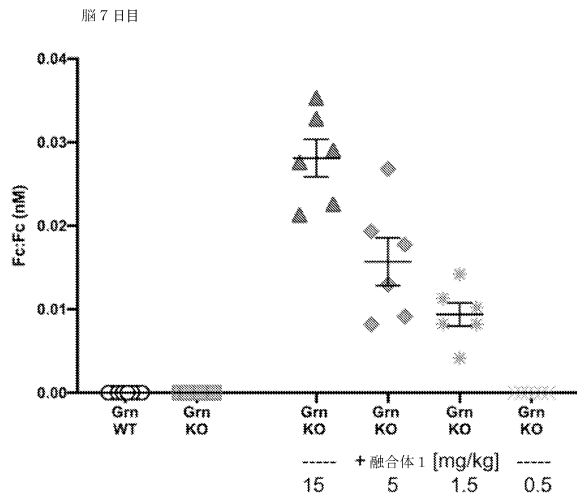
【図 5】



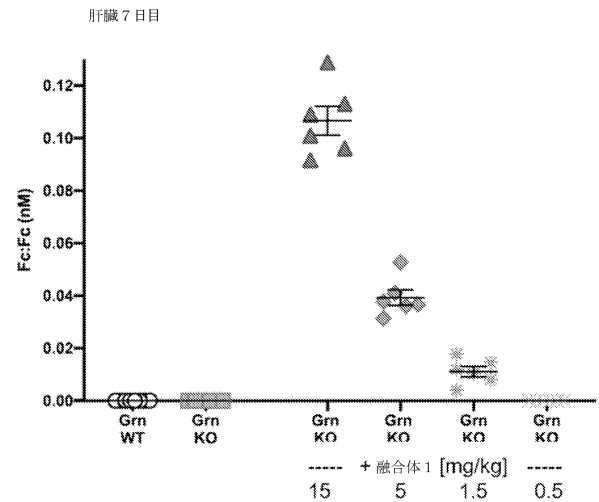
【図 6 A】



【図 6 B】



【図 6 C】



10

20

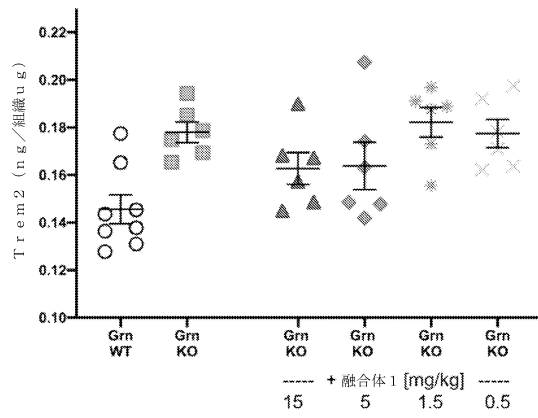
30

40

50

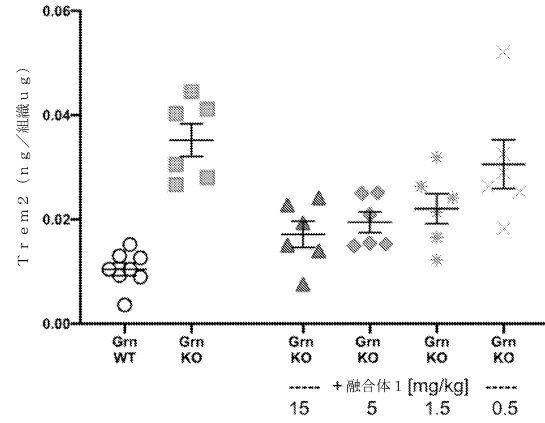
【図 7 A】

脳 7 日目



【図 7 B】

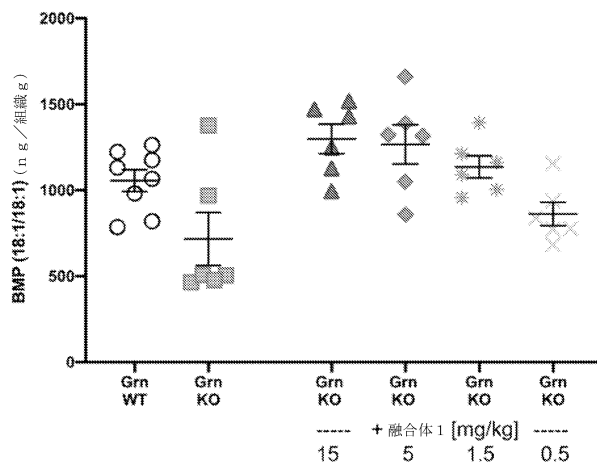
肝臓 7 日目



10

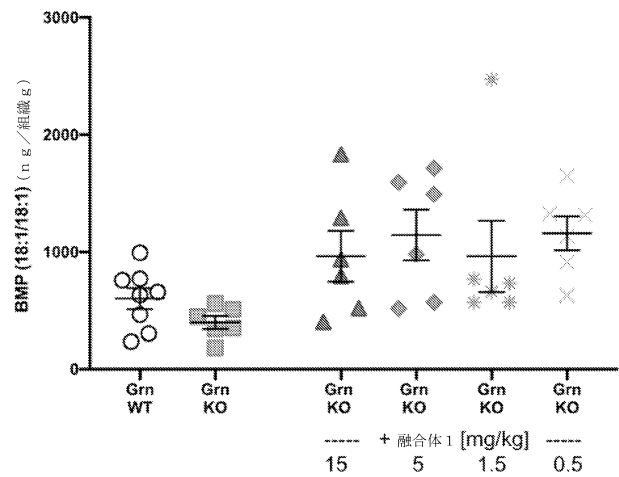
【図 8 A】

脳 7 日目



【図 8 B】

肝臓 7 日目



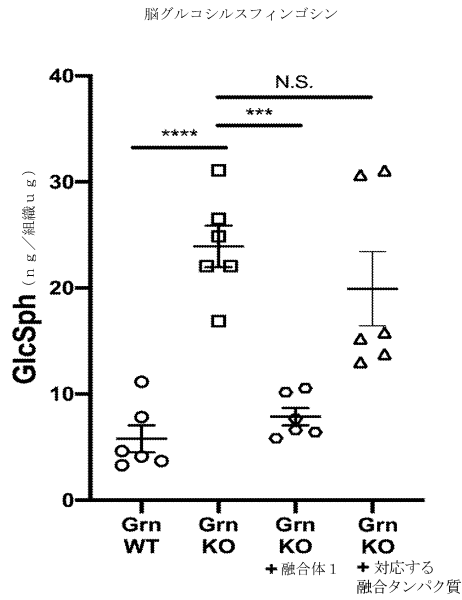
20

30

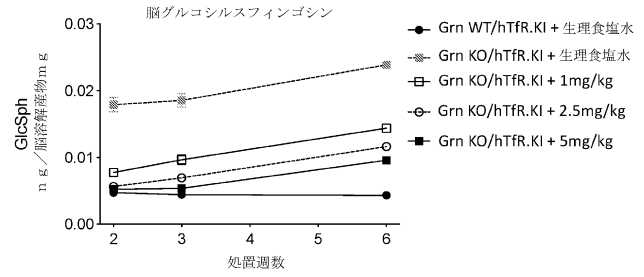
40

50

【図 9】

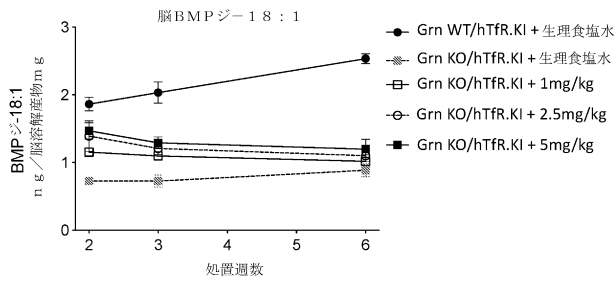


【図 10】

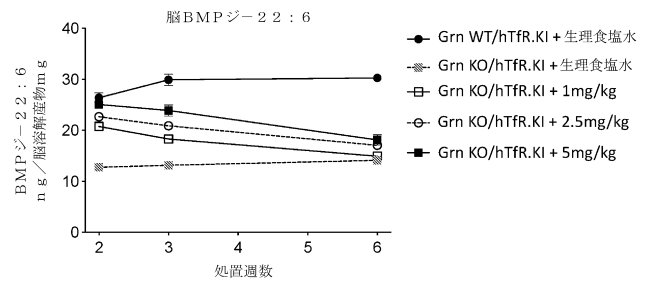


10

【図 11】



【図 12】



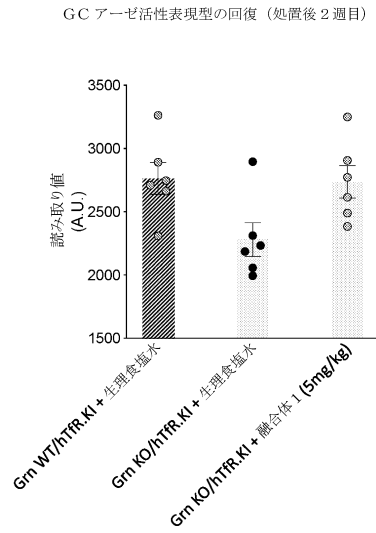
20

30

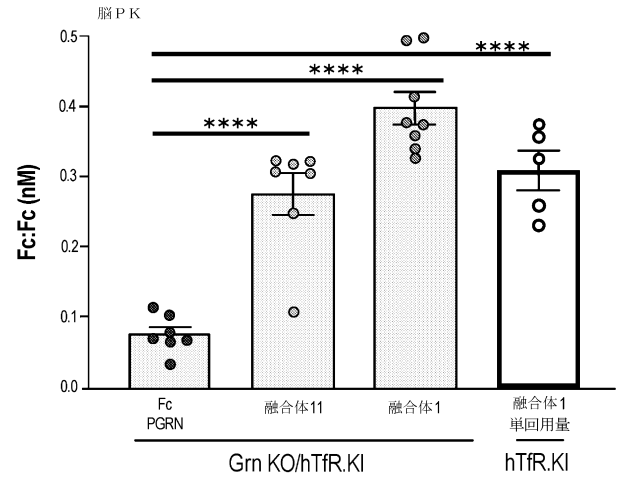
40

50

【図 1 3】

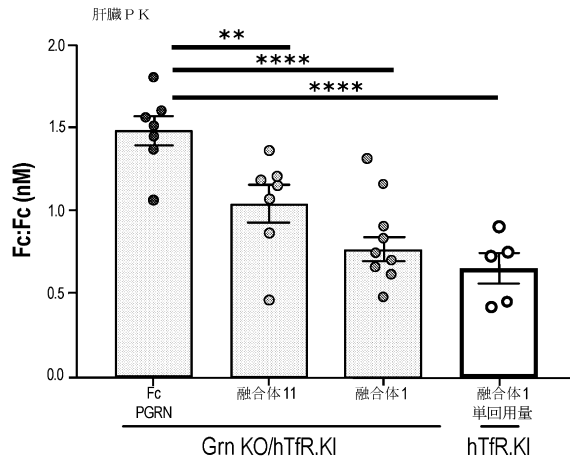


【図 1 4】

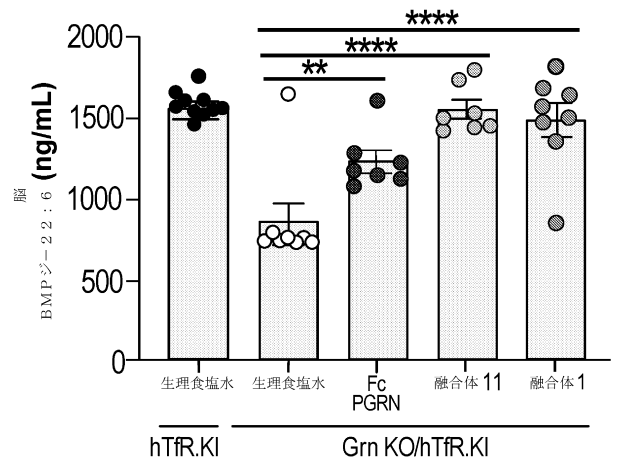


10

【図 1 5】



【図 1 6】



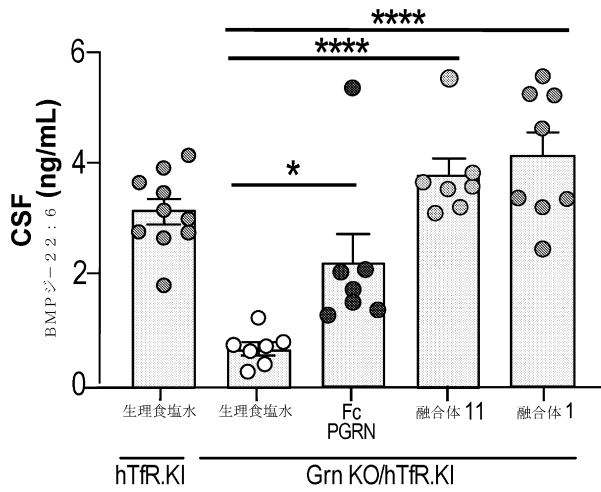
20

30

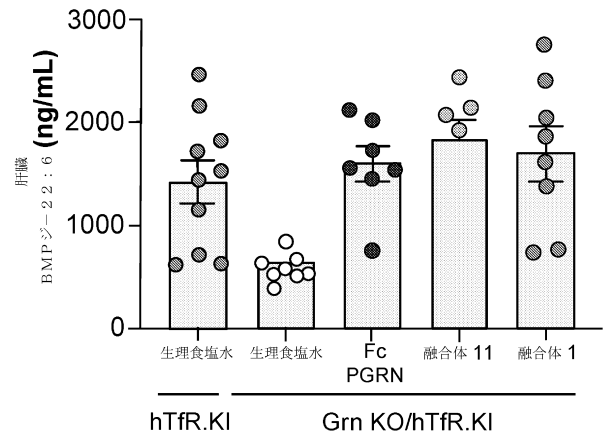
40

50

【図 17】

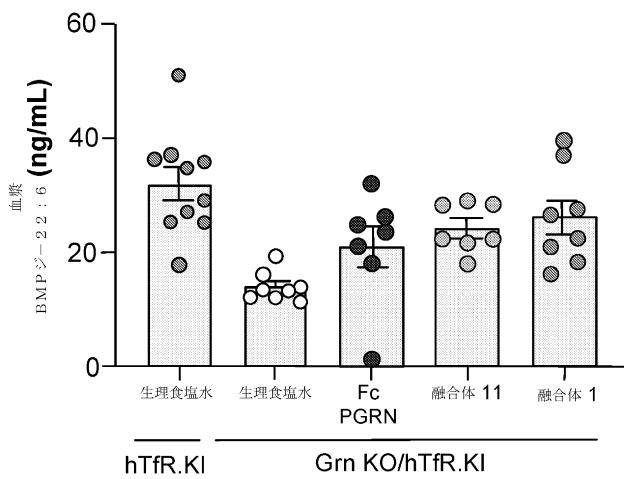


【図 18】

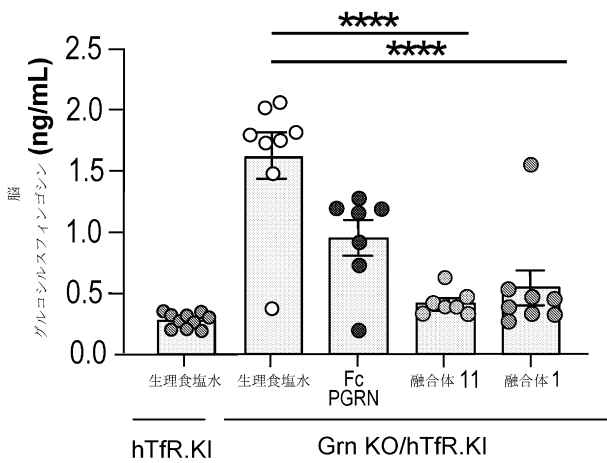


10

【図 19】



【図 20】



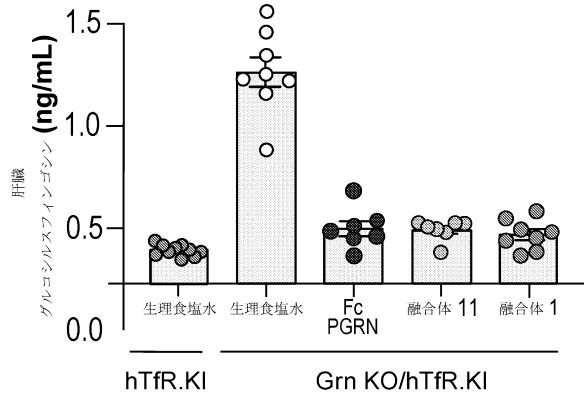
20

30

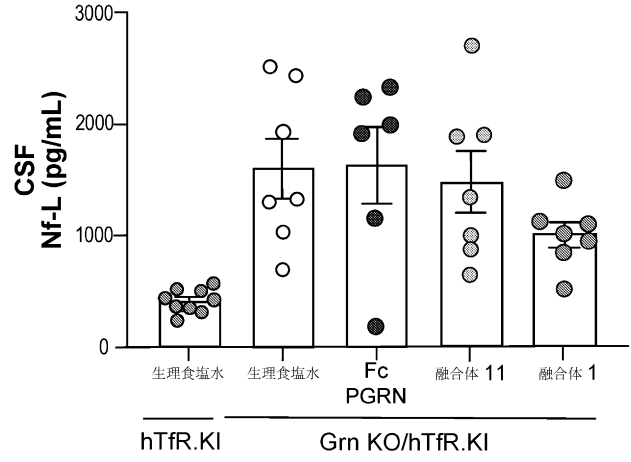
40

50

【図 2 1】

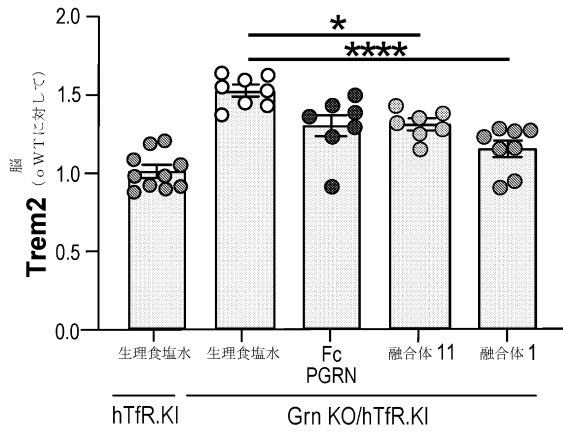


【図 2 2】

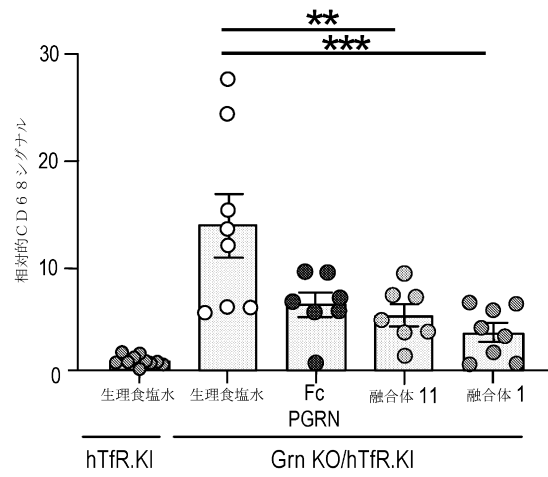


10

【図 2 3】



【図 2 4】



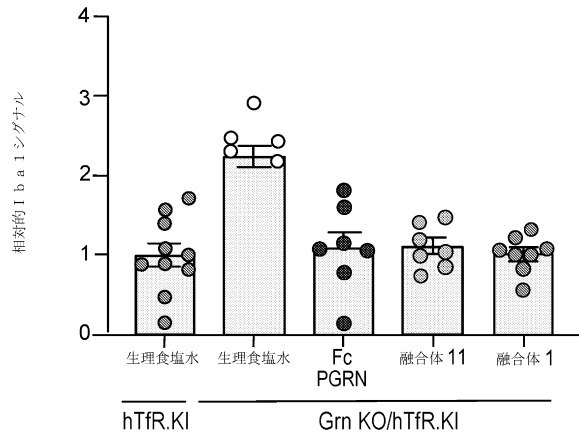
20

30

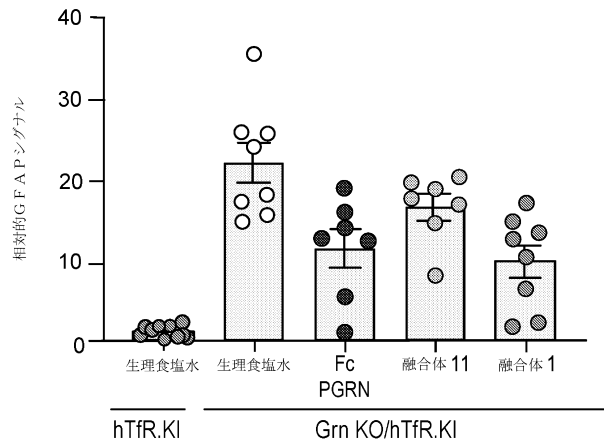
40

50

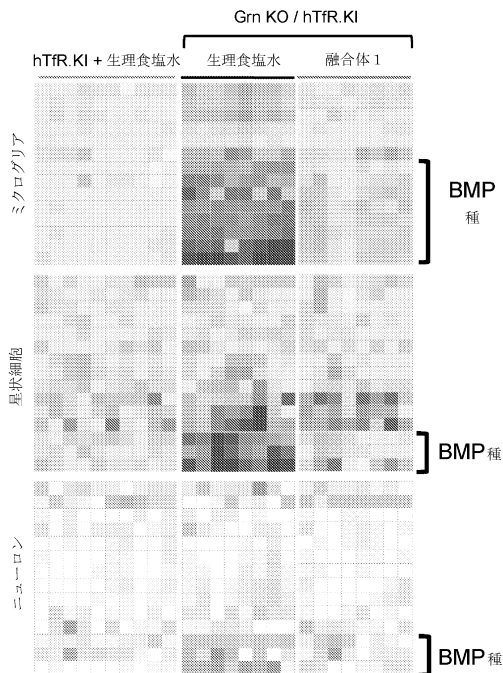
【図 25】



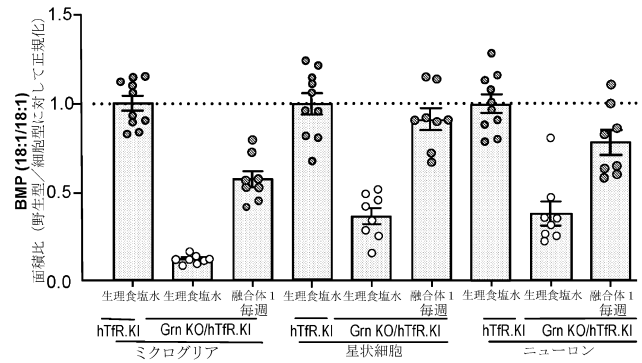
【図 26】



【図 27】



【図 28】



10

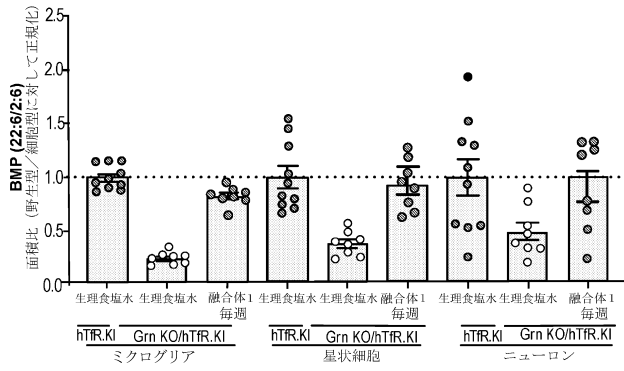
20

30

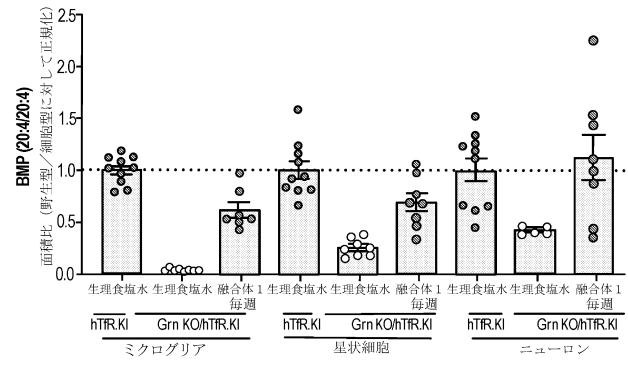
40

50

【図 29】



【図 30】



10

【配列表】

2023507846000001.app

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US2020/066831
Box No. I	Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)	
1.	With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing: a. ☒ forming part of the international application as filed: ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file. ☐ on paper or in the form of an image file. b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13~~ter~~.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file. c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only: ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13~~ter~~.1(a)). ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13~~ter~~.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).	10
2.	☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.	20
3.	Additional comments:	
		30
		40
		50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2020/066831

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C07K14/705 A61P25/28 A61K38/17 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61P C07K A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE NCBI [Online] 25 September 2018 (2018-09-25), Anonymous: "granulins [Piliocolobus tephrosceles] - Protein - NCBI", XP055781757, Database accession no. XP_026303427 abstract	1,9-14, 22, 27-29,32
X	----- WO 2018/013775 A2 (UNIV EMORY [US]) 18 January 2018 (2018-01-18) page 10, line 3 - line 8; figures 12a, 12c page 9, line 29 - line 31 page 40, line 3 - line 14 sequences 11, 14-19, 34, 35 ----- -/--	1-123
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.		
☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 9 March 2021		Date of mailing of the international search report 22/03/2021
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5618 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Schmitz, Till

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2020/066831

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	YANQIU ZHENG ET AL: "C-Terminus of Progranulin Interacts with the Beta-Propeller Region of Sortilin to Regulate Progranulin Trafficking", PLOS ONE, vol. 6, no. 6, 15 June 2011 (2011-06-15), page e21023, XP055305162, DOI: 10.1371/journal.pone.0021023 the whole document -----	1-123

Information on patent family members

International application No

PCT/US2020/066831

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
W0 2018013775 A2	18-01-2018	NONE	

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

テーマコード (参考)

C 1 2 N 15/13 (2006.01)
 C 1 2 N 15/63 (2006.01)
 C 1 2 N 1/15 (2006.01)
 C 1 2 N 1/19 (2006.01)
 C 1 2 N 1/21 (2006.01)
 C 1 2 N 5/10 (2006.01)
 C 1 2 P 21/02 (2006.01)
 A 6 1 K 38/18 (2006.01)
 A 6 1 P 25/00 (2006.01)
 A 6 1 P 25/28 (2006.01)
 A 6 1 P 27/02 (2006.01)
 A 6 1 P 25/16 (2006.01)
 A 6 1 P 9/10 (2006.01)
 A 6 1 K 47/68 (2017.01)

C 1 2 N 15/13
 C 1 2 N 15/63
 C 1 2 N 1/15
 C 1 2 N 1/19
 C 1 2 N 1/21
 C 1 2 N 5/10
 C 1 2 P 21/02
 A 6 1 K 38/18
 A 6 1 P 25/00
 A 6 1 P 25/28
 A 6 1 P 27/02
 A 6 1 P 25/16
 A 6 1 P 9/10
 A 6 1 K 47/68

Z

C

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

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. T R I T O N

弁理士 刑部 俊

(74)代理人 100142929

弁理士 井上 隆一

(74)代理人 100148699

弁理士 佐藤 利光

(74)代理人 100128048

弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506

弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100205707

弁理士 小寺 秀紀

(74)代理人 100114340

弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100121072

弁理士 川本 和弥

(72)発明者 シェルフ ジェラルド マックスウェル

アメリカ合衆国 9 4 0 8 0 カリフォルニア州 サウス サンフランシスコ オイスター ポイント
 ブールバード 1 6 1 デナリ セラピューティクス インコーポレイテッド内

(72)発明者 カナン グナセカラン

アメリカ合衆国 9 4 0 8 0 カリフォルニア州 サウス サンフランシスコ オイスター ポイント
 ブールバード 1 6 1 デナリ セラピューティクス インコーポレイテッド内

(72)発明者 レクサ カトリーナ ダブリュ.

アメリカ合衆国 9 4 0 8 0 カリフォルニア州 サウス サンフランシスコ オイスター ポイント
 ブールバード 1 6 1 デナリ セラピューティクス インコーポレイテッド内

(72)発明者 ロウ レイ エル. ワイ.

アメリカ合衆国 9 4 0 8 0 カリフォルニア州 サウス サンフランシスコ オイスター ポイント
ブルバード 1 6 1 デナリ セラピューティクス インコーポレイテッド内
(72)発明者 プロロク レイチェル
アメリカ合衆国 9 4 0 8 0 カリフォルニア州 サウス サンフランシスコ オイスター ポイント
ブルバード 1 6 1 デナリ セラピューティクス インコーポレイテッド内
(72)発明者 スリヴァスタヴァ アンキタ
アメリカ合衆国 9 4 0 8 0 カリフォルニア州 サウス サンフランシスコ オイスター ポイント
ブルバード 1 6 1 デナリ セラピューティクス インコーポレイテッド内
F ターム (参考) 4B064 AG01 CA19 CC24 CE12 DA01
4B065 AA91X AA92Y AA93X AA94Y AB01 AC14 BA05 CA24 CA44
4C076 AA95 CC01 CC11 CC30 EE41 EE59
4C084 AA02 AA06 AA07 BA01 BA02 BA22 BA41 CA17 CA53 DB52
NA14 ZA011 ZA012 ZA151 ZA152 ZA161 ZA162 ZA331 ZA332 ZA451 ZA452
ZC411 ZC412
4H045 AA10 AA20 AA30 BA41 CA40 EA20 EA21 EA23 FA74 GA26