

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6498601号
(P6498601)

(45) 発行日 平成31年4月10日 (2019. 4. 10)

(24) 登録日 平成31年3月22日 (2019. 3. 22)

(51) Int. Cl.

F I

C O 7 K	14/76	(2006. 01)	C O 7 K	14/76	Z N A
C 1 2 N	1/15	(2006. 01)	C 1 2 N	1/15	
C 1 2 N	1/19	(2006. 01)	C 1 2 N	1/19	
C 1 2 N	1/21	(2006. 01)	C 1 2 N	1/21	
C 1 2 N	5/10	(2006. 01)	C 1 2 N	5/10	

請求項の数 55 (全 143 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2015-521875 (P2015-521875)
 (86) (22) 出願日 平成25年7月12日 (2013. 7. 12)
 (65) 公表番号 特表2015-524799 (P2015-524799A)
 (43) 公表日 平成27年8月27日 (2015. 8. 27)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2013/050408
 (87) 国際公開番号 W02014/012082
 (87) 国際公開日 平成26年1月16日 (2014. 1. 16)
 審査請求日 平成28年7月8日 (2016. 7. 8)
 (31) 優先権主張番号 61/697, 245
 (32) 優先日 平成24年9月5日 (2012. 9. 5)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 61/758, 701
 (32) 優先日 平成25年1月30日 (2013. 1. 30)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 510214045
 ザイムワークス、インコーポレイテッド
 カナダ国 ブイ6エイチ 3ブイ9 プリ
 ティッシュ コロンビア州 パンクーバー
 ウェスト エイス アベニュー 138
 5 スイート 540
 (74) 代理人 100102978
 弁理士 清水 初志
 (74) 代理人 100102118
 弁理士 春名 雅夫
 (74) 代理人 100160923
 弁理士 山口 裕孝
 (74) 代理人 100119507
 弁理士 刑部 俊

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 多価ヘテロ多量体足場設計および構築物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

アルブミンポリペプチドの第一セグメントと少なくとも90%の同一性を有するアミノ酸配列を含む第一輸送体ポリペプチド、および少なくとも1つの第一カーゴポリペプチドとを含む第一ポリペプチド構築物;ならびに

アルブミンポリペプチドの第二セグメントと少なくとも90%の同一性を有するアミノ酸配列を含む第二輸送体ポリペプチドを含む第二ポリペプチド構築物を含み、

a) 前記アルブミンの第一セグメントおよび前記アルブミンの第二セグメントが、前記アルブミンポリペプチドのループ上に存在するセグメント化部位におけるセグメント化により得られ、前記セグメント化部位において0~3個のアミノ酸残基が欠失しており、

b) 前記第一輸送体ポリペプチドおよび前記第二輸送体ポリペプチドは、互いに異なり、ならびに

c) 前記第一および第二輸送体ポリペプチドが自己集合して、前記アルブミンポリペプチドの擬似ネイティブ構造を形成する、ヘテロ多量体。

【請求項 2】

前記アルブミンポリペプチドの擬似ネイティブ構造が、少なくとも65℃の融解温度を有する、請求項1記載のヘテロ多量体。

【請求項 3】

10

20

第一ポリペプチド構築物が、2つの第一カーゴポリペプチドを含む、請求項1または2記載のヘテロ多量体。

【請求項4】

前記第一カーゴポリペプチドが、抗原結合ポリペプチド構築物である、請求項1～3のいずれか一項記載のヘテロ多量体。

【請求項5】

抗原結合ポリペプチド構築物が、CD3、CD19、CD20、HER2、またはHER3に結合する、請求項4記載のヘテロ多量体。

【請求項6】

前記第二ポリペプチド構築物が、少なくとも1つの第二カーゴポリペプチドをさらに含むか、または第二ポリペプチド構築物が、2つの第二カーゴポリペプチドをさらに含む、請求項1～5のいずれか一項に記載のヘテロ多量体。 10

【請求項7】

前記第二カーゴポリペプチドが、抗原結合ポリペプチド構築物である、請求項6記載のヘテロ多量体。

【請求項8】

前記抗原結合ポリペプチド構築物が、CD3、CD19、CD20、HER2、またはHER3に結合する、請求項7記載のヘテロ多量体。

【請求項9】

前記第一カーゴポリペプチドが、CD3に結合し、かつ前記第二カーゴポリペプチドが、CD19またはCD20に結合する、請求項6～8のいずれか一項に記載のヘテロ多量体。 20

【請求項10】

前記第一カーゴポリペプチドが、HER2に結合し、かつ前記第二カーゴポリペプチドが、HER3に結合する、請求項6～8のいずれか一項に記載のヘテロ多量体。

【請求項11】

前記第一カーゴポリペプチドが、前記第一輸送体ポリペプチドにリンカーで融合され、および／または前記第二カーゴポリペプチドが、前記第二輸送体ポリペプチドにリンカーで融合される、請求項6～10のいずれか一項に記載のヘテロ多量体。

【請求項12】

セグメント化部位において0～2個のアミノ酸残基が欠失しているか、またはセグメント化部位において0または1個のアミノ酸残基が欠失している、請求項1～11のいずれか一項に記載のヘテロ多量体。 30

【請求項13】

前記セグメント化部位の位置が、配列番号1のアルブミンポリペプチドの配列の残基339および340の間、残基300および301の間、残基364および365の間、残基441および442の間、残基171および172の間、残基281および282の間、または残基114および115の間であり、ここで、残基のナンバリングはシグナル配列の後ろの最初の残基から開始される、請求項12記載のヘテロ多量体。

【請求項14】

前記セグメント化部位の位置が、配列番号1のアルブミンポリペプチドの配列の残基84および85の間であり、ここで、残基のナンバリングはシグナル配列の後ろの最初の残基から開始され、残基84が欠失している、請求項12記載のヘテロ多量体。 40

【請求項15】

第一および第二輸送体ポリペプチドのうちの少なくとも1つが、リンカーを含む、請求項1～14のいずれか一項に記載のヘテロ多量体。

【請求項16】

リンカーが、GGGSリンカーである、請求項15記載のヘテロ多量体。

【請求項17】

少なくとも1つのジスルフィド結合が、第一および第二輸送体ポリペプチドからの残基 50

間に形成され、かつジスルフィド結合が前記アルブミンポリペプチドにおいても観察される、請求項 1～16 のいずれか一項に記載のヘテロ多量体。

【請求項 18】

前記アルブミンポリペプチドが、配列番号 1 の配列（1乃至29位のシグナル配列を除く）を有するヒト血清アルブミンである、請求項 1～17 のいずれか一項に記載のヘテロ多量体。

【請求項 19】

（a）前記第一輸送体ポリペプチドが配列番号 39 を含む配列（1乃至27位のシグナル配列を除く）を有し、かつ前記第二輸送体ポリペプチドが配列番号 40 を含む配列（1乃至27位のシグナル配列を除く）を有するか；

10

（b）前記第一輸送体ポリペプチドが配列番号 41 を含む配列（1乃至27位のシグナル配列を除く）を有し、かつ前記第二輸送体ポリペプチドが配列番号 42 を含む配列（1乃至27位のシグナル配列を除く）を有するか；

（c）前記第一輸送体ポリペプチドが配列番号 43 を含む配列（1乃至27位のシグナル配列を除く）を有し、かつ前記第二輸送体ポリペプチドが配列番号 44 を含む配列（1乃至27位のシグナル配列を除く）を有するか；

（d）前記第一輸送体ポリペプチドが配列番号 45 を含む配列（1乃至27位のシグナル配列を除く）を有し、かつ前記第二輸送体ポリペプチドが配列番号 46 を含む配列（1乃至27位のシグナル配列を除く）を有するか；

（e）前記第一輸送体ポリペプチドが配列番号 47 を含む配列（1乃至27位のシグナル配列を除く）を有し、かつ前記第二輸送体ポリペプチドが配列番号 48 を含む配列（1乃至27位のシグナル配列を除く）を有するか；

20

（f）前記第一輸送体ポリペプチドが配列番号 49 を含む配列（1乃至27位のシグナル配列を除く）を有し、かつ前記第二輸送体ポリペプチドが配列番号 50 を含む配列（1乃至27位のシグナル配列を除く）を有するか；

（g）前記第一輸送体ポリペプチドが配列番号 51 を含む配列（1乃至27位のシグナル配列を除く）を有し、かつ前記第二輸送体ポリペプチドが配列番号 52 を含む配列（1乃至27位のシグナル配列を除く）を有するか；または

（h）前記第一輸送体ポリペプチドが配列番号 53 を含む配列（1乃至27位のシグナル配列を除く）を有し、かつ前記第二輸送体ポリペプチドが配列番号 54 を含む配列（1乃至27位のシグナル配列を除く）を有する、請求項 1 記載のヘテロ多量体。

30

【請求項 20】

アルブミンポリペプチドの第一セグメントと少なくとも 90% の同一性を有するアミノ酸配列を含む第一輸送体ポリペプチドを含む第一ポリペプチド構築物；および

アルブミンポリペプチドの第二セグメントと少なくとも 90% の同一性を有するアミノ酸配列を含む第二輸送体ポリペプチドを含む第二ポリペプチド構築物を含み、

a) 前記アルブミンの第一セグメントおよび前記アルブミンの第二セグメントが、前記アルブミンポリペプチドの ループを除去するセグメント化 により得られ、

40

b) 前記第一輸送体ポリペプチドは、前記第二輸送体ポリペプチドと異なり、

c) 前記第一および第二輸送体ポリペプチドの少なくとも 1 つがアミノ酸残基のシステイン へ の少なくとも 1 つの突然変異を含み、これにより前記システインが他方の輸送体ポリペプチドとジスルフィド結合を形成し、ここで、前記第一輸送体ポリペプチドが、A 194 C、L 198 C、W 214 C、A 217 C、L 331 C および A 335 C から選択される少なくとも 1 つの突然変異を含み、および／または前記第二輸送体ポリペプチドが、L 331 C、A 335 C、V 343 C、L 346 C、A 350 C、V 455 C、および N 458 C から選択される少なくとも 1 つの突然変異を含み、ここで、前記アミノ酸残基の位置は、成熟ヒト血清アルブミンポリペプチドの配列に関して同定される、かつ

d) 前記輸送体ポリペプチドが自己集合して前記アルブミンポリペプチドの擬似ネイテ

50

ィブ構造を形成する、
ヘテロ多量体。

【請求項 2 1】

a) 前記第一輸送体ポリペプチドが、A 2 1 7 C を含み、かつ前記第二輸送体ポリペプチドが、V 3 4 3 C を含むか、

b) 前記第一輸送体ポリペプチドが、L 3 3 1 C を含み、かつ前記第二輸送体ポリペプチドが、A 3 5 0 C を含むか、

c) 前記第一輸送体ポリペプチドが、A 2 1 7 C を含み、かつ前記第二輸送体ポリペプチドが、L 3 6 4 C を含むか、

d) 前記第一輸送体ポリペプチドが、W 2 1 4 C を含み、かつ前記第二輸送体ポリペプチドが、V 3 4 3 C を含むか、 10

e) 前記第一輸送体ポリペプチドが、A 3 3 5 C を含み、かつ前記第二輸送体ポリペプチドが、L 3 4 6 C を含むか、

f) 前記第一輸送体ポリペプチドが、L 1 9 8 C を含み、かつ前記第二輸送体ポリペプチドが、V 4 5 5 C を含むか、

g) 前記第一輸送体ポリペプチドが、A 2 1 7 C を含み、かつ前記第二輸送体ポリペプチドが、V 3 3 5 C を含むか、

h) 前記第一輸送体ポリペプチドが、A 2 1 7 C を含み、かつ前記第二輸送体ポリペプチドが、L 3 3 1 C を含むか、

i) 前記第一輸送体ポリペプチドが、L 1 9 8 C を含み、かつ前記第二輸送体ポリペプチドが、N 4 5 8 C を含むか、または 20

j) 前記第一輸送体ポリペプチドが、A 1 9 4 C を含み、かつ前記第二輸送体ポリペプチドが、V 4 5 5 C を含む、

請求項 2 0 記載のヘテロ多量体。

【請求項 2 2】

第一および第二輸送体ポリペプチドのうちの少なくとも 1 つが、リンカーをさらに含む、請求項 2 0 または 2 1 に記載のヘテロ多量体。

【請求項 2 3】

リンカーが、G G G G S リンカーである、請求項 2 2 記載のヘテロ多量体。

【請求項 2 4】

前記アルブミンポリペプチドが、配列番号 1 の配列（1乃至29位のシグナル配列を除く）を有するヒト血清アルブミンである請求項 2 0 ～ 2 3 のいずれか一項に記載のヘテロ多量体。 30

【請求項 2 5】

前記第一ポリペプチド構築物が、少なくとも 1 つの第一カーゴポリペプチドをさらに含むか、または第一ポリペプチド構築物が、2 つの第一カーゴポリペプチドをさらに含む、請求項 2 0 ～ 2 4 のいずれか一項に記載のヘテロ多量体。

【請求項 2 6】

第一カーゴポリペプチドが、抗原結合ポリペプチド構築物である、請求項 2 5 記載のヘテロ多量体。 40

【請求項 2 7】

抗原結合ポリペプチド構築物が、C D 3、C D 1 9、C D 2 0、H E R 2、または H E R 3 に結合する、請求項 2 6 記載のヘテロ多量体。

【請求項 2 8】

前記第二ポリペプチド構築物が、少なくとも 1 つの第二カーゴポリペプチドをさらに含むかまたは 2 つの第二カーゴポリペプチドをさらに含む、請求項 2 0 ～ 2 7 のいずれか一項に記載のヘテロ多量体。

【請求項 2 9】

少なくとも 1 つの第二カーゴポリペプチドが、抗原結合ポリペプチド構築物である、請求項 2 8 記載のヘテロ多量体。 50

【請求項 30】

前記抗原結合ポリペプチド構築物が、CD3、CD19、CD20、HER2、またはHER3に結合する、請求項29記載のヘテロ多量体。

【請求項 31】

前記第一カーゴポリペプチドが、CD3に結合し、かつ前記第二カーゴポリペプチドが、CD19またはCD20に結合する、請求項28～30のいずれか一項に記載のヘテロ多量体。

【請求項 32】

前記第一カーゴポリペプチドが、HER2に結合し、かつ前記第二カーゴポリペプチドが、HER3に結合する、請求項28～30のいずれか一項に記載のヘテロ多量体。

10

【請求項 33】

前記少なくとも1つの第一カーゴポリペプチドが、前記第一輸送体ポリペプチドにリンカーで融合され、および／または前記少なくとも1つの第二カーゴポリペプチドが、前記第二輸送体ポリペプチドにリンカーで融合される、請求項28～32のいずれか一項に記載のヘテロ多量体。

【請求項 34】

前記第一および第二輸送体ポリペプチドが、アルブミンポリペプチドのセグメントと少なくとも99%の同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項1～33のいずれか一項に記載のヘテロ多量体。

【請求項 35】

前記ヘテロ多量体がFcRnに結合する、請求項1～34のいずれか一項に記載のヘテロ多量体。

20

【請求項 36】

前記アルブミンポリペプチドの第一セグメントおよび前記アルブミンポリペプチドの第二セグメントが、アロアルブミン由来である、請求項1～17ならびに20～23のいずれか一項に記載のヘテロ多量体。

【請求項 37】

前記アルブミンポリペプチドの第一セグメントおよび前記アルブミンポリペプチドの第二セグメントが、同一型のアルブミン由来であるか、または異なる型のアルブミン由来である、請求項1～17ならびに20～23のいずれか一項に記載のヘテロ多量体。

30

【請求項 38】

前記アルブミンポリペプチドの第一セグメントおよび前記アルブミンポリペプチドの第二セグメントが、哺乳動物アルブミン由来である、請求項1～17ならびに20～23のいずれか一項に記載のヘテロ多量体。

【請求項 39】

前記アルブミンポリペプチドの第一セグメントおよび前記アルブミンポリペプチドの第二セグメントが、非哺乳動物アルブミン由来である、請求項1～17ならびに20～23のいずれか一項に記載のヘテロ多量体。

【請求項 40】

前記アルブミンポリペプチドの第一セグメントおよび前記アルブミンポリペプチドの第二セグメントの一方が、ヒト血清アルブミン由来であり、および他方がアロアルブミン由来である、請求項1～17ならびに20～23のいずれか一項に記載のヘテロ多量体。

40

【請求項 41】

第一ポリペプチド構築物が、標的抗原に結合する少なくとも1つの第一カーゴポリペプチドをさらに含み、かつ前記標的抗原が、IL-2Rの α -鎖(CD25)、アミロイドベータ、抗EpCAM、抗CD3、CD16、CD20、CD22、CD23、CD3、CD4、CD52、CD80、CTLA-4、EGFR、EpCAM、RSVのFプロテイン、G250、糖タンパク質IIB/IIIaR、HER2、HER3、IGF1R、EGFR、HSP90、IgE抗体、IL-12、IL-23、IL-1 β 、IL-5、IL-6、RANKL、TNFアルファ、TNFR、TRAIL、VEGF-A、グルカ

50

ゴン受容体、G L P受容体、およびL D L受容体のうちの少なくとも1つである、請求項1～4 0のいずれか一項に記載のヘテロ多量体。

【請求項4 2】

前記第一カーゴポリペプチドが、酵素、ホルモン、治療用ポリペプチド、抗原、化学毒素、放射性毒素、サイトカインもしくはその変異体またはその断片である、請求項1～4 1のいずれか一項に記載のヘテロ多量体。

【請求項4 3】

カーゴポリペプチドの活性が、輸送体ポリペプチドへの融合においてその非融合フォーマットに対し選択的に変更される、請求項1～4 2のいずれか一項記載のヘテロ多量体。

【請求項4 4】

セグメント化部位で導入されるCおよび／またはN末端が、G G G G Sペプチド配列に融合される、請求項1～4 3のいずれか一項に記載のヘテロ多量体。

【請求項4 5】

請求項1～4 4のいずれか一項に記載のヘテロ多量体の有効量を含有する、癌の治療のための治療薬。

【請求項4 6】

請求項1～4 4のいずれか一項に記載のヘテロ多量体の有効量を含有する、腫瘍の増殖の抑制のための治療薬。

【請求項4 7】

請求項1～4 4のいずれか一項に記載のヘテロ多量体の有効量を含有する、腫瘍の萎縮のための治療薬。

【請求項4 8】

請求項1～4 4のいずれか一項に記載のヘテロ多量体をコードする、核酸または核酸のセット。

【請求項4 9】

請求項4 8に記載の核酸または核酸のセットを含む、ベクターまたはベクターのセット。

【請求項5 0】

請求項4 9に記載のベクターまたはベクターのセットを含む、宿主細胞。

【請求項5 1】

請求項4 8に記載の核酸または核酸のセットを発現させることを含む、請求項1～4 4のいずれか一項に記載のヘテロ多量体を製造する方法。

【請求項5 2】

請求項1～4 4のいずれか一項に記載のヘテロ多量体およびアジュバントを含む薬学的組成物。

【請求項5 3】

アルブミンから自己会合ポリペプチドを設計する方法であって、少なくとも1つのセグメント化部位で前記アルブミンをセグメント化して、自己集合してヘテロ多量体を形成する少なくとも2つのポリペプチドセグメントを獲得することを包含し、ここで前記ヘテロ多量体は前記アルブミンの擬似ネイティブ単量体構造を形成し、

a. 高度の溶媒接触表面積を有しかつ前記アルブミンの残りの構造との接触が限定されているアルブミンの少なくとも1つのループを選択するステップ、および

b. 選択したループ当たり1つのセグメント化部位を導入し、少なくとも2つのポリペプチドセグメント間に相補的界面を生じるステップであり、ここで界面は無極性であり、広大で且つ互いに噛み合うステップ、を包含する方法。

【請求項5 4】

ポリペプチドセグメント間に少なくとも1つのジスルフィド結合を導入することを包含する、請求項5 3記載の方法。

【請求項5 5】

ヘテロ多量体がポリペプチドセグメント間に共有結合を含まないようセグメント化が実施されるか、またはヘテロ多量体がポリペプチドセグメント間に少なくとも1つの共有結合を含むようセグメント化が実施される、請求項53記載の方法。

【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、米国特許出願61/671,640(2012年7月13日出願)、米国特許出願61/697,245(2012年9月05日出願)、米国特許出願61/758,701(2013年1月30日出願)および米国特許出願61/845,945(2013年7月12日出願)(これらの記載内容は参照により本明細書中で援用される)の利益を主張する。

10

【0002】

本発明の技術分野

本発明の技術分野は、生物学的療法のカスタム開発のための足場の合理的設計である。

【背景技術】

【0003】

関連技術の説明

治療用タンパク質の領域において、それらの多価標的結合特徴を有する抗体は、薬剤候補の設計のための優れた足場である。これらの特徴をさらに進展させると、設計される二重特異性抗体およびその他の融合多重特異性治療薬は、二重または多重標的特異性を示し、そして新規作用様式を有する薬剤を創生する格好の機会を示す。好ましい薬物動態および機能的活性を有するこのような多価および多重特異性治療用タンパク質の開発が挑戦されてきた。

20

【0004】

ヒト血清アルブミン(HSAまたはHA)は成熟形態で585アミノ酸のタンパク質であり、血清の浸透圧に大きく関与し、また内因性および外因性リガンドの担体としても機能する。担体分子としてのアルブミンの役割およびその安定性は、*in vivo*でのポリペプチドの担体および輸送体としての使用のための望ましい特性である。

【0005】

30

ヒト血清アルブミンは、多数の望ましい特質を有する。HSAは身体全体に見出され、しかしさらに具体的には、間質空間および血中に40g/Lの血清濃度で見出され、これは、0.7mMと等価である(Yeh et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:1904-1908(1992))。HSAは、血清の最も豊富なタンパク質であると考えられ、モル浸透圧濃度の維持に関与する。HSAは、好ましい薬物動態特性を有し、肝臓および腎臓により非常にゆっくり掃去されて、数週間までの*in vivo*半減期を示す(Yeh et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:1904-1908(1992); Waldmann, T. A., albumin Structure, Function and Uses, pp. 255-273(1977); Sarav et al., J Am Soc Nephrol 20:1941-1952(2009))。HSAは、酵素活性および抗原性を欠き、それにより潜在的に望ましくない副作用を排除する。HSAは、内因性ならびに外因性リガンドのための担体として作用する。HSAはまた、腫瘍の間質に浸透し、保持されることも既知である(Elsadek and Kratz, J. Control. Release(2012)157:4-28参照)。併せて、これらの特徴は、少なくとも部分的に、アルブミンベースの融合タンパク質に広げられ得る。その場合、治療用タンパク質により示される不十分な薬物動態特性が回避され得る。

40

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

50

本発明の目的は、多価ヘテロ多量体足場およびその設計方法を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0007】

本発明の一態様において、(i) 第一輸送体ポリペプチドを含む第一ポリペプチド構築物;および(ii) 第二輸送体ポリペプチドを含む第二ポリペプチド構築物を含むヘテロ多量体であって;前記第一および第二輸送体ポリペプチドの各々が、アルブミンポリペプチドのセグメントと少なくとも90%同一性を有するアミノ酸配列を含み;およびセグメント化がセグメント化部位での0~3アミノ酸残基の欠失を生じるように、前記第一および第二輸送体ポリペプチドが、セグメント化部位での前記アルブミンポリペプチドのセグメント化により得られ;前記輸送体ポリペプチドが自己集合して単量体形態の前記アルブミンポリペプチドの擬似ネイティブ構造を形成するヘテロ多量体が提供される。

10

【0008】

本発明の別の態様では、(i) 第一輸送体ポリペプチドを含む第一ポリペプチド構築物;および(ii) 第二輸送体ポリペプチドを含む第二ポリペプチド構築物を含むヘテロ多量体であって;前記第一および第二輸送体ポリペプチドの各々が、アルブミンポリペプチドのセグメントと少なくとも90%同一性を有するアミノ酸配列を含み;かつ前記第一および第二輸送体ポリペプチドがセグメント化部位での前記アルブミンポリペプチドのセグメント化により得られ;かつ前記輸送体ポリペプチドが自己集合して単量体形態の前記アルブミンポリペプチドの擬似ネイティブ構造を形成するように、前記第一および第二輸送体ポリペプチドがアミノ酸残基のシステインまたはその類似体への少なくとも1つの突然変異を含み、これにより前記システインが他方の輸送体ポリペプチドとジスルフィド結合を形成するヘテロ多量体が提供される。

20

【0009】

本発明の別の態様では、(i) 第一輸送体ポリペプチド;および(ii) CD3、CD19、CD20、HER2またはHER3と結合する抗原結合ポリペプチド構築物である少なくとも1つの第一カーゴポリペプチドを含む第一ポリペプチド構築物;ならびに(iii) 第二輸送体ポリペプチド;および(iv) 少なくとも1つの第二カーゴポリペプチドを含む第二ポリペプチド構築物を含むヘテロ多量体であって;前記第一および第二輸送体ポリペプチドの各々が、アルブミンポリペプチドのセグメントと少なくとも90%同一性を有するアミノ酸配列を含み;かつ前記第一および第二輸送体ポリペプチドがセグメント化部位での前記アルブミンポリペプチドのセグメント化により得られ;前記輸送体ポリペプチドが自己集合して単量体形態の前記アルブミンポリペプチドの擬似ネイティブ構造を形成するヘテロ多量体が提供される。

30

【0010】

本発明の別の態様では、本発明のヘテロ多量体をコードする核酸を含む宿主細胞が提供される。

【0011】

本発明の別の態様では、本発明のヘテロ多量体およびアジュバントを含む薬学的組成物が提供される。

【0012】

本発明の別の態様では、癌の処置方法であって、それを必要とする患者に、本発明の薬学的組成物の有効量を提供することを包含する方法が提供される。

40

【0013】

本発明の別の態様では、腫瘍の増殖の抑制方法であって、本発明のヘテロ多量体の有効量と腫瘍を接触させることを包含する方法が提供される。

【0014】

本発明の別の態様では、腫瘍の萎縮方法であって、本発明のヘテロ多量体の有効量と腫瘍を接触させることを包含する方法が提供される。

【0015】

本発明の別の態様では、目的のタンパク質から自己会合ポリペプチドを設計する方法で

50

あって、少なくとも1つのセグメント化部位で前記タンパク質をセグメント化して少なくとも2つのポリペプチドセグメントを獲得し、これにより前記ポリペプチドセグメントが自己集合してヘテロ多量体を形成すること（ここで、前記ヘテロ多量体は、前記タンパク質の擬似ネイティブ単量体構造を形成する）を包含する方法であり、高度の溶媒接触表面積を有しかつタンパク質の残りの構造との接触が限定されている、目的タンパク質の少なくとも1つのループを選択するステップ；および選択ループ当たり1つのセグメント化部位を導入して、少なくとも2つのポリペプチドセグメント間に相補的界面を生じるステップ（ここで前記界面は無極性で、広大で、且つ互いに噛み合う）を包含する方法が提供される。

【0016】

本発明の別の態様では、本発明の方法により設計されるヘテロ多量体が提供される。

【0017】

本発明の別の態様では、本発明の方法により設計されるヘテロ多量体を含む治療用足場が提供される。

【0018】

多機能性ヘテロ多量体およびその設計方法が、本明細書中で提供される。ある実施形態では、各ヘテロ多量体は、少なくとも1つのカーゴ分子および第一輸送体ポリペプチドを含む少なくとも1つの第一ポリペプチド構築物；ならびに少なくとも1つのカーゴ分子および第二輸送体ポリペプチドを含む少なくとも1つの第二ポリペプチド構築物を含むヘテロ多量体であって；輸送体ポリペプチドが自己集合してタンパク質またはその類似体の擬似ネイティブ構造を形成するように、前記輸送体ポリペプチドは前記タンパク質のセグメント化により得られる。ある実施形態では、少なくとも1つのカーゴ分子は薬剤または治療薬である。ある実施形態では、同一の性質を有する1つより多くのカーゴ分子が輸送体ポリペプチド上に存在する。ある実施形態では、少なくとも1つのカーゴ分子は生体分子である。一実施形態では、少なくとも1つの生体分子は、DNA、RNA、PNAまたはポリペプチドである。一実施形態では、少なくとも1つのカーゴ分子はポリペプチドである。ある実施形態では、各輸送体ポリペプチドは不安定であり、少なくとも1つの他の輸送体ポリペプチドを有するヘテロ多量体を優先的に形成する。ある実施形態では、各輸送体ポリペプチドは安定であり少なくとも1つの他の輸送体ポリペプチドを有するヘテロ多量体を優先的に形成する。ある実施形態では、ヘテロ多量体化界面は少なくとも1つのジスルフィド結合を含む。ある実施形態では、ヘテロ多量体化界面はジスルフィド結合を含まない。

【0019】

ある実施形態では、少なくとも2つのポリペプチド構築物を含み、各ポリペプチド構築物が輸送体ポリペプチドと結合された少なくとも1つのカーゴポリペプチドを含むヘテロ多量体であって、前記輸送体ポリペプチドがタンパク質のセグメント化により前記タンパク質に由来し、各輸送体ポリペプチドが前記タンパク質のセグメントと少なくとも90%の同一性を有するアミノ酸を含み、および前記輸送体ポリペプチドが自己集合して前記タンパク質またはその類似体の擬似ネイティブ単量体構造を形成するヘテロ多量体が提供される。ある実施形態では、ヘテロ多量体はヘテロ二量体である。一実施形態では、ヘテロ二量体は二重特異性である。一実施形態では、ヘテロ多量体は多重特異性である。ある実施形態では、ヘテロ多量体は二価である。一実施形態では、ヘテロ多量体は多価である。一実施形態では、ヘテロ多量体は多機能性である。ある実施形態では、少なくとも1つの輸送体ポリペプチドは抗体に由来しない。ある実施形態では、輸送体ポリペプチドは抗体に由来しない。ある実施形態では、輸送体ポリペプチドはアルブミンの誘導体である。本明細書中に記載されるヘテロ多量体のある実施形態では、輸送体ポリペプチドは配列番号1のヒト血清アルブミン（HSAまたはHA）に由来する。本明細書中に記載されるある実施形態では、輸送体ポリペプチドはアロアルブミン（HAA）に由来する。本明細書中に記載されるヘテロ多量体のある実施形態では、輸送体ポリペプチドは、配列番号1のヒト血清アルブミン（HSAまたはHA）と相同の配列に由来する。ある実施形態では、輸

10

20

30

40

50

送体ポリペプチドは、前記H A Sが配列番号1で示されるような配列を含むヒト血清アルブミン（H S AまたはH A）の断片に由来する。

【0020】

本明細書中に記載されるヘテロ多量体のいくつかの実施形態では、輸送体ポリペプチドはアネキシントタンパク質の誘導体である。一実施形態では、輸送体ポリペプチドは異なるアネキシントタンパク質に由来する。ある実施形態では、輸送体ポリペプチドは同一のアネキシントタンパク質に由来する。一実施形態では、少なくとも1つの輸送体ポリペプチドはアネキシンA1またはリポicolチンIに由来する。ヘテロ多量体のある実施形態では、輸送体ポリペプチドはすべて、配列番号14のアネキシンA1に由来する。ヘテロ多量体のある実施形態では、少なくとも1つの輸送体ポリペプチドは配列番号14と相同の配列に由来する。一実施形態では、少なくとも1つの輸送体ポリペプチドはアネキシンA2またはアネキシンIIに由来する。ヘテロ多量体のある実施形態では、輸送体ポリペプチドはすべて、アネキシンA2またはリポicolチンIIに由来する。一実施形態では、少なくとも1つの輸送体ポリペプチドはアネキシン様タンパク質に由来する。ヘテロ多量体のある実施形態では、輸送体ポリペプチドはすべて、アネキシン様タンパク質に由来する。一実施形態では、少なくとも1つの輸送体ポリペプチドは、アネキシンA1～アネキシンA7からなる群に由来する。本明細書中に記載されるヘテロ多量体の一実施形態では、輸送体ポリペプチドはすべて、アネキシンA1～アネキシンA7、配列番号～14からなる群に由来する。ある実施形態では、第一アネキシンベースの輸送体ポリペプチドは配列番号15からなる配列を有し、および第二アネキシンベースの輸送体ポリペプチドは配列番号16からなる配列を有する。

【0021】

本明細書中に記載されるヘテロ多量体のいくつかの実施形態では、輸送体ポリペプチドはトランスフェリンの誘導体である。一実施形態では、少なくとも1つの輸送体ポリペプチドはトランスフェリンに由来する。ヘテロ多量体のある実施形態では、少なくとも1つの輸送体ポリペプチドは配列番号19のトランスフェリンまたはその類似体に由来する。ヘテロ多量体のある実施形態では、少なくとも1つの輸送体ポリペプチドはトランスフェリンと相同のポリペプチド配列に由来する。本明細書中に記載されるヘテロ多量体のある実施形態では、少なくとも1つの輸送体ポリペプチドはアポトランスフェリンに由来する。ある実施形態では、第一トランスフェリンベースの輸送体ポリペプチドは配列番号15からなる配列を有し、および第二トランスフェリンベースの輸送体ポリペプチドは配列番号16からなる配列を有する。

【0022】

ヘテロ多量体のある実施形態では、少なくとも1つのカーゴ分子はカーゴポリペプチドである。本明細書中に記載されるヘテロ多量体の一実施形態では、すべてのカーゴ分子はカーゴポリペプチドである。ある実施形態では、カーゴポリペプチドは、治療用タンパク質あるいはその断片または変異体である。ある実施形態では、カーゴポリペプチドは、抗原またはその断片もしくは変異体である。ある実施形態では、カーゴポリペプチドは、抗原受容体またはその断片もしくは変異体である。いくつかの実施形態では、カーゴポリペプチドは、標的ポリペプチドに結合する抗体、抗体ドメイン、リガンドまたは受容体である。いくつかの実施形態では、少なくとも1つのカーゴポリペプチドは輸送体ポリペプチドと融合される。ある実施形態では、少なくとも1つのカーゴポリペプチドが輸送体ポリペプチドのN末端に結合される。いくつかの実施形態では、少なくとも1つのカーゴポリペプチドが輸送体ポリペプチドのC末端に結合される。いくつかの実施形態では、少なくとも1つのカーゴポリペプチドは輸送体ポリペプチドと化学的に連結される。本明細書中に記載されるヘテロ多量体のいくつかの実施形態では、少なくとも1つのカーゴポリペプチドはGLP-1またはその断片もしくは変異体を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも1つのカーゴポリペプチドはグルカゴンまたはその断片もしくは変異体を含む。一実施形態では、少なくとも1つのカーゴポリペプチドはEGF-A様ドメインを含む。

【0023】

各ヘテロ多量体が少なくとも1つのカーゴポリペプチドおよび第一輸送体ポリペプチドを含む少なくとも1つの第一ポリペプチド構築物；ならびに少なくとも1つのカーゴポリペプチドおよび第二輸送体ポリペプチドを含む少なくとも1つの第二ポリペプチド構築物を含む、ヘテロ多量体が、本明細書中で提供される。ある実施形態では、ヘテロ多量体は多重特異性である。一実施形態では、ヘテロ多量体は二重特異性である。ヘテロ多量体のある実施形態では、輸送体ポリペプチドは同一タンパク質の誘導体である。ある実施形態では、輸送体ポリペプチドはアルブミンの誘導体である。本明細書中に記載されるヘテロ多量体のある実施形態では、輸送体ポリペプチドは配列番号1のヒト血清アルブミンに由来する。ある実施形態では、輸送体ポリペプチドはアネキシンの誘導体である。一実施形態では、輸送体ポリペプチドはアネキシンA2の誘導体である。いくつかの実施形態では、輸送体ポリペプチドはトランスフェリンの誘導体である。

10

【0024】

ある実施形態では、少なくとも1つのカーゴポリペプチドおよびヒト血清アルブミンの第一セグメントを含む第一輸送体ポリペプチドを含む少なくとも1つの第一ポリペプチド構築物；ならびに少なくとも1つのカーゴポリペプチドおよびヒト血清アルブミンの第二セグメントを含む第二輸送体ポリペプチドを含む第二ポリペプチド構築物を含むヘテロ多量体であって；前記輸送体ポリペプチドが自己集合してアルブミンまたはその類似体の擬似ネイティブ構造を形成するヘテロ多量体が提供される。ある実施形態では、ヒト血清アルブミンの第一および第二セグメントは、タンパク質の非重複領域由来である。ある実施形態では、ヒト血清アルブミンの第一および第二セグメントの配列間に重複が存在する。いくつかの実施形態では、重複は5%重複である。一実施形態では、重複は10%重複である。ある実施形態では、ヒト血清アルブミンの第一セグメントは配列番号2の配列を含み、かつヒト血清アルブミンの第二セグメントは配列番号3の配列を含む。ある実施形態では、ヒト血清アルブミンの第一セグメントは配列番号8の配列を含み、かつヒト血清アルブミンの第二セグメントは配列番号10の配列を含む。

20

【0025】

ある実施形態では、各ヘテロ多量体が少なくとも1つのカーゴポリペプチドおよび配列番号2の配列を含む第一輸送体ポリペプチドを含む少なくとも1つの第一ポリペプチド構築物；ならびに少なくとも1つのカーゴポリペプチドおよび配列番号3の配列を含む第二輸送体ポリペプチドを含む少なくとも1つの第二ポリペプチド構築物を含む、ヘテロ多量体が提供される。ある実施形態では、各ヘテロ多量体が、少なくとも1つのカーゴポリペプチドおよび配列番号8の配列を含む第一輸送体ポリペプチドを含む少なくとも1つの第一ポリペプチド構築物；ならびに少なくとも1つのカーゴポリペプチドおよび配列番号10の配列を含む第二輸送体ポリペプチドを含む少なくとも1つの第二ポリペプチド構築物を含む、ヘテロ多量体が提供される。本明細書中に記載されるヘテロ多量体のある実施形態では、少なくとも1つの輸送体ポリペプチドはアロアルブミンに由来する。ある実施形態では、両方の輸送体ポリペプチドがアロアルブミンに由来する。ある実施形態では、すべての輸送体ポリペプチドが同一アロアルブミンの誘導体である。いくつかの他の実施形態では、輸送体ポリペプチドは異なるアロアルブミンの誘導体である。いくつかの実施形態では、各輸送体ポリペプチドは表2から選択されるアロアルブミンをベースにしたアロアルブミン誘導体である。ある実施形態では、第一ポリペプチド構築物は2つのカーゴポリペプチドを含む。いくつかの実施形態では、第二ポリペプチド構築物は2つのカーゴポリペプチドを含む。いくつかの実施形態では、ポリペプチド構築物の少なくとも1つは突然変異を導入することにより改変される。ある実施形態では、導入される突然変異は、非突然変異化型の構築物と比較して、ポリペプチド構築物の機能性を改善する。ある実施形態では、導入される突然変異は、輸送体ポリペプチドの安定性、半減期およびヘテロ多量体形成のうちの1つ以上を改善する。

30

40

【0026】

(i) 第一輸送体ポリペプチド；および (i i) 少なくとも1つのカーゴポリペプチドを含む第一ポリペプチド構築物；ならびに (i i i) 第二輸送体ポリペプチド；および (i

50

v) 少なくとも1つのカーゴポリペプチドを含む第二ポリペプチド構築物を含むヘテロ多量体であって; 前記二輸送体ポリペプチドが、前記タンパク質のセグメント化によるタンパク質に由来し、各輸送体ポリペプチドが、前記タンパク質のセグメントと少なくとも90%同一性を有するアミノ酸配列を含み;かつ前記輸送体ポリペプチドが自己集合して前記タンパク質の擬似ネイティブ構造を形成する、ヘテロ多量体が提供される。

【0027】

ある実施形態では、本明細書中に記載されるヘテロ多量体は、輸送体ポリペプチドがタンパク質のセグメント化による前記タンパク質に由来し、各輸送体ポリペプチドが前記タンパク質のセグメントと少なくとも95%の同一性を有するアミノ酸配列を含むヘテロ多量体である。

10

【0028】

ある実施形態では、本明細書中に記載されるヘテロ多量体は、輸送体ポリペプチドがタンパク質のセグメント化による前記タンパク質に由来し、各輸送体ポリペプチドが前記タンパク質のセグメントと少なくとも99%の同一性を有するアミノ酸配列を含むヘテロ多量体である。

【0029】

ある実施形態では、ヘテロ多量体はヘテロ二量体である。いくつかの実施形態では、少なくとも1つの輸送体ポリペプチドは抗体に由来しない。例示的实施形態では、各輸送体ポリペプチドはアルブミン誘導体である。いくつかの実施形態では、前記第一および第二輸送体ポリペプチドのうちの少なくとも1つは、該システインが別の輸送体ポリペプチド上のシステイン残基とジスルフィド結合を形成するように、アミノ酸残基のシスチンへの少なくとも1つの突然変異を含む。ある実施形態では、該システインが別の輸送体ポリペプチド上のシステイン残基とジスルフィド結合を形成するように、前記第一および第二輸送体ポリペプチドは、アミノ酸残基のシスチンへの少なくとも1つの突然変異を含む。いくつかの実施形態では、各輸送体ポリペプチドがアルブミン誘導体であり、前記第一輸送体ポリペプチドが、A194C、L198C、W214C、A217C、L331CおよびA335Cから選択される少なくとも1つの突然変異を含む、ヘテロ多量体が提供される。いくつかの実施形態では、第二輸送体ポリペプチドは、L331C、A335C、V343C、L346C、A350C、V455C、およびN458Cから選択される少なくとも1つの突然変異を含むアルブミン誘導体である。

20

30

【0030】

いくつかの実施形態では、前記第一輸送体ポリペプチドが配列番号35を含む配列またはその類似体もしくは変異体を有し、および前記第二輸送体ポリペプチドが配列番号36を含む配列、またはその類似体もしくは変異体を有する、本明細書中に記載のヘテロ多量体が提供される。いくつかの実施形態では、前記第一輸送体ポリペプチドは配列番号37を含む配列またはその類似体もしくは変異体を有し、および前記第二輸送体ポリペプチドは配列番号38を含む配列またはその類似体もしくは変異体を有する。ある実施形態では、前記第一輸送体ポリペプチドは配列番号39を含む配列またはその類似体もしくは変異体を有し、および前記第二輸送体ポリペプチドは配列番号40を含む配列またはその類似体もしくは変異体を有する。例示的实施形態では、前記第一輸送体ポリペプチドは配列番号41を含む配列またはその類似体もしくは変異体を有し、および前記第二輸送体ポリペプチドは配列番号42を含む配列またはその類似体もしくは変異体を有する。ある実施形態では、前記第一輸送体ポリペプチドは配列番号43を含む配列またはその類似体もしくは変異体を有し、および前記第二輸送体ポリペプチドは配列番号44を含む配列またはその類似体もしくは変異体を有する。一実施形態では、前記第一輸送体ポリペプチドは配列番号45を含む配列またはその類似体もしくは変異体を有し、および前記第二輸送体ポリペプチドは配列番号46を含む配列またはその類似体もしくは変異体を有する。一実施形態では、前記第一輸送体ポリペプチドは配列番号47を含む配列またはその類似体もしくは変異体を有し、および前記第二輸送体ポリペプチドは配列番号48を含む配列またはその類似体もしくは変異体を有する。ある実施形態では、前記第一輸送体ポリペプチドは配

40

50

列番号49を含む配列またはその類似体もしくは変異体を有し、および前記第二輸送体ポリペプチドは配列番号50を含む配列またはその類似体もしくは変異体を有する。

【0031】

本明細書中に記載されるヘテロ多量体のある実施形態では、少なくとも1つのカーゴポリペプチドは標的抗原を結合し、および前記標的抗原は、IL-2Rのα鎖(CD25)、アミロイドベータ、抗EpCAM、抗CD3、CD16、CD20、CD22、CD23、CD3、CD4、CD52、CD80、CTLA-4、EGFR、EpCAM、RSVのFプロテイン、G250、糖タンパク質IIB/IIIR、HER2、HER2/neuR、HSP90、IgE抗体、IL-12、IL-23、IL-1b、IL-5、IL-6、RANKL、TNFアルファ、TNFR、VEGF-A、グルカゴン受容体、GLP受容体、およびLDL受容体のうちの少なくとも1つである。

10

【0032】

各ヘテロ多量体が少なくとも1つのカーゴポリペプチドおよび第一輸送体ポリペプチドを含む少なくとも1つの第一ポリペプチド構築物；ならびに少なくとも1つのカーゴポリペプチドおよび第二輸送体ポリペプチドを含む少なくとも1つの第二ポリペプチド構築物を含む、ヘテロ多量体が、本明細書中で提供される。ある実施形態では、少なくとも1つのカーゴポリペプチドは、表2に列挙されるタンパク質あるいはその断片、変異体または誘導体から選択される。ある実施形態では、少なくとも1つのカーゴポリペプチドは、表2に列挙される1つ以上のタンパク質に対するリガンド、受容体または抗体、あるいは前記リガンド、受容体または抗体の断片、変異体または誘導体から選択される。ある実施形態では、少なくとも1つのカーゴポリペプチドは、CD19、CD20、CD22、CD25、CD30、CD33、CD40、CD56、CD64、CD70、CD74、CD79、CD105、CD138、CD174、CD205、CD227、CD326、CD340、MUC16、GPNMB、PSMA、Crypt o、ED-B、TMEFF2、EphB2、EphA2、FAP、インテグリン、メソテリン、EGFR、TAG-72、GD2、CAIX、5T4からなる群から選択される細胞表面抗原を標的にする。ある実施形態では、各ヘテロ多量体が少なくとも1つのカーゴポリペプチドおよび第一輸送体ポリペプチドを含む少なくとも1つの第一ポリペプチド構築物；ならびに少なくとも1つのカーゴポリペプチドおよび第二輸送体ポリペプチドを含む少なくとも1つの第二ポリペプチド構築物を含む、ヘテロ多量体であって、少なくとも1つのカーゴポリペプチドが抗体またはその断片もしくは変異体であるヘテロ多量体が本明細書中で提供される。ある実施形態では、すべてのカーゴポリペプチドは抗体またはその断片もしくは変異体である。いくつかの実施形態では、カーゴポリペプチドは、表2に列挙されるタンパク質と結合する抗体である。いくつかの実施形態では、抗体断片は抗体FcまたはFabまたはFv領域を含む。いくつかの実施形態では、カーゴポリペプチドは、治療的関連標的と結合する非抗体タンパク質、例えばナノボディ、アフィボディ、マキシボディ、アドネクチン、ドメイン抗体、エピボディ、アンキリン反復タンパク質、アンチカリン、カムリドあるいはリガンドタンパク質またはポリペプチドである。いくつかの実施形態では、抗体またはその断片は、IgG、IgA、IgD、IgEおよびIgMからなる群から選択される免疫グロブリンに由来する。ある実施形態では、IgGは、IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3およびIgG4から選択される亜型である。ある実施形態では、抗体は多重特異性である。

20

30

40

【0033】

各ヘテロ多量体が少なくとも1つのカーゴポリペプチドおよび第一輸送体ポリペプチドを含む少なくとも1つの第一ポリペプチド構築物；ならびに少なくとも1つのカーゴポリペプチドおよび第二輸送体ポリペプチドを含む少なくとも1つの第二ポリペプチド構築物を含む、ヘテロ多量体であって、少なくとも1つのカーゴポリペプチドが治療用抗体であるヘテロ多量体が本明細書中で提供される。本明細書中に記載されるヘテロ多量体のいくつかの実施形態では、少なくとも1つのカーゴポリペプチドは、治療用抗体、あるいはその断片または変異体であり、抗体は、アバゴボマブ、アダリムマブ、アレムツズマブ、ア

50

ウログラブ、バピネウズマブ、バシリキシマブ、ベリムマブ、ベバシズマブ、ブリアキヌマブ、カナキヌマブ、カツマキソマブ、セルトリズマブ ペゴール、セルツキシマブ、ダクリズマブ、デノスマブ、エファリズマブ、ガリキシマブ、ゲムツズマブ オザガミシン、ゴリムマブ、イブリツモマブ チウキセタン、インフリキシマブ、イピィムマブ、ルミリキシマブ、メポリズマブ、モタビズマブ、ムロモナブ、ミコグラブ、ナタリズマブ、ニモツズマブ、オクレリズマブ、オフアツムマブ、オマリズマブ、パリビズマブ、パニツムマブ、ベルツズマブ、ラニズマブ、レスリズマブ、リツキシマブ、テブリズマブ、トクリズマブ、トシツモマブ、トラスツズマブ、プロキシニウム、レンカレックス、ウステキヌマブおよびザルツムマブから選択される。ある実施形態では、治療用抗体は、疾患関連標的抗原、例えば癌抗原、炎症性疾患抗原または代謝性疾患抗原に結合する。ある実施形態では、標的抗原は、細胞表面のタンパク質であってもよく、および細胞は、B細胞、T細胞、間質細胞、内皮細胞、血管細胞、骨髄細胞、造血細胞または癌腫細胞の群に属し得る。

10

【0034】

各ヘテロ多量体が少なくとも1つのカーゴ分子、断片を含む少なくとも1つの第一ポリペプチド構築物；ならびに少なくとも1つのカーゴ分子および第二輸送体ポリペプチドを含む少なくとも1つの第二ポリペプチド構築物を含む、ヘテロ多量体であって、少なくとも1つのカーゴポリペプチドが、酵素、酵素阻害薬、ホルモン、治療用ポリペプチド、抗原、放射性毒素および化学毒素、例えば、神経毒素、インターフェロン、サイトカイン融合毒素およびケモカイン融合毒素（これらに限定されない）、サイトカイン、抗体融合タンパク質またはその変異体もしくは断片であるヘテロ多量体が、本明細書中で提供される。本明細書中に記載されるヘテロ多量体のいくつかの実施形態では、少なくとも1つのカーゴポリペプチドは、GLP-1またはその断片もしくは変異体を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも1つのカーゴポリペプチドは、グルカゴンまたはその断片もしくは変異体を含む。一実施形態では、少なくとも1つのカーゴポリペプチドは、EGF-A様ドメインを含む。ある実施形態では、毒素は、免疫毒素、例えばデニロイキン ジフチトックス、ならびに抗CD22免疫毒素、例えばCAT-3888およびCAT-8015である。ある実施形態では、毒素はサポリンである。いくつかの実施形態では、毒素はマイトトキシシンである。いくつかの実施形態では、毒素はジフテリア毒素である。いくつかの実施形態では、毒素はA型ボツリヌス毒素である。いくつかの実施形態では、毒素はリシンまたはその断片である。いくつかの実施形態では、毒素は、RTXファミリーの毒素からの毒素である。

20

30

【0035】

各ヘテロ多量体が少なくとも1つのカーゴポリペプチドおよび第一輸送体ポリペプチドを含む少なくとも1つの第一ポリペプチド構築物；ならびに少なくとも1つのカーゴポリペプチドおよび第二輸送体ポリペプチドを含む少なくとも1つの第二ポリペプチド構築物を含む、ヘテロ多量体であって、カーゴポリペプチドが、化学的連結、ネイティブライゲーション、化学的ライゲーション、ジスルフィド結合、あるいは直接的融合またはリンカーを介した融合により輸送体ポリペプチドと結合されるヘテロ多量体が、本明細書中で提供される。ある実施形態では、カーゴ分子、例えばカーゴポリペプチドを輸送体ポリペプチドと結合するためのリンカーは、US5482858、US5258498およびUS5856456、US2009060721、US6492123、US4946778、US5869620、US7385032、US5073627、US5108910、US7977457、US5856456、US7138497、US5837846、US5990275、EP1088888（これらの記載内容は参照により本明細書中で援用される）に記載されたリンカーから選択される。

40

【0036】

本明細書中に記載されるヘテロ多量体をコードする核酸を含む宿主細胞が、本明細書中で提供される。ある実施形態では、第一ポリペプチド構築物をコードする核酸および第二ポリペプチド構築物をコードする核酸は、単一ベクター中に存在する。ある実施形態では

50

、第一ポリペプチド構築物をコードする核酸および第二ポリペプチド構築物をコードする核酸は、別々のベクター中に存在する。

【0037】

ヘテロ多量体の製造方法であって、本明細書中に記載されるヘテロ多量体をコードする核酸が発現されるよう、本明細書中に記載される宿主細胞を培養すること；および細胞培養物からヘテロ多量体を回収することを包含する方法が、本明細書中で提供される。いくつかの実施形態では、宿主細胞は原核生物細胞または真核生物細胞である。いくつかの実施形態では、宿主細胞は大腸菌である。ある実施形態では、宿主細胞は酵母細胞である。いくつかの実施形態では、酵母は出芽酵母である。いくつかの実施形態では、酵母はピキアである。ある実施形態では、酵母はピキア・パストリスである。いくつかの実施形態では、酵母はグリコシル化欠損性、および／またはプロテアーゼ欠損性である。いくつかの実施形態では、宿主細胞は細菌細胞である。いくつかの実施形態では、本明細書中に記載されるヘテロ多量体を発現する宿主細胞は、哺乳動物細胞である。ある実施形態では、哺乳動物細胞は、CHO細胞、BHK細胞、NSO細胞、COS細胞またはヒト細胞である。

10

【0038】

本明細書中に記載されるヘテロ多量体、ならびに薬学的に許容可能なアジュバントを含む薬学的組成物が提供される。疾患または障害に罹患している個体の処置方法であって、本明細書中に記載される処方物または薬学的組成物の有効量を個体に投与することを包含する方法も提供される。ある実施形態では、患者における癌の処置方法であって、本明細書中に記載されるヘテロ多量体の治療的有效量を患者に投与することを包含する方法が提供される。いくつかの実施形態では、患者における免疫障害の処置方法であって、本明細書中に記載されるヘテロ多量体の治療的有效量を患者に投与することを包含する方法が提供される。患者における感染性疾患の処置方法であって、本明細書中に記載されるヘテロ多量体の治療的有效量を患者に投与することを包含する方法も提供される。ある実施形態では、患者における心臓血管性疾患の処置方法であって、本明細書中に記載されるヘテロ多量体の治療的有效量を患者に投与することを包含する方法が提供される。ある実施形態では、患者における呼吸器障害の処置方法であって、本明細書中に記載されるヘテロ多量体の治療的有效量を患者に投与することを包含する方法が提供される。ある実施形態では、代謝障害の処置方法であって、本明細書中に記載されるヘテロ多量体の治療的有效量を患者に投与することを包含する方法が提供される。ある実施形態では、患者における先天性副腎過形成、ゴーシェ病、ハンター症候群、クラッペ病、異染性白質ジストロフィー、ニーマン・ピック病、フェニルケトン尿症（PKU）、ポルフィリン症、テイ・サックス病およびウィルソン病のうちの1つ以上の処置方法であって、本明細書中に記載されるヘテロ多量体の治療的有效量を患者に投与することを包含する方法が提供される。癌の処置方法であって、それを必要とする患者に、本明細書中に記載される薬学的組成物の治療的有效量を提供することを包含する方法が提供される。ある実施形態では、腫瘍の増殖を抑制する方法であって、当該腫瘍を、本明細書中に記載されるヘテロ多量体の有効量と接触させることを包含する方法が提供される。いくつかの実施形態では、腫瘍の萎縮方法であって、当該腫瘍を、本明細書中に記載されるヘテロ多量体の有効量と接触させることを包含する方法が提供される。

20

30

40

【0039】

個体における目的の生体マーカーの存在を検出するためのキットであって、（a）本明細書中に記載されるヘテロ多量体のある量であって、少なくとも1つのカーゴポリペプチドを含み、これにより前記カーゴポリペプチドが目的の生体マーカーと結合し得るヘテロ多量体であって、前記少なくとも1つのカーゴポリペプチドを含むヘテロ多量体；ならびに（b）使用説明書を含むキットが提供される。

【0040】

少なくとも2つのポリペプチド構築物を含むヘテロ多量体タンパク質であって、前記ポリペプチド構築物が自己集合してヘテロ多量体を形成するように、各ポリペプチド構築物

50

が少なくとも1つのカーゴポリペプチドおよびアルブミンベースのポリペプチドを含む、ヘテロ多量体タンパク質が本明細書中で提供される。

【0041】

ある実施形態では、カーゴポリペプチドは、アルブミンまたはアロアルブミンベースの輸送体ポリペプチドと融合される。いくつかの実施形態では、カーゴポリペプチドは、トランスフェリンベースの輸送体ポリペプチドと融合される。ある実施形態では、カーゴポリペプチドは、アネキシンベースの輸送体ポリペプチドと融合される。いくつかの実施形態では、融合は輸送体ポリペプチドのN末端である。ある実施形態では、融合は輸送体ポリペプチドのC末端である。いくつかの実施形態では、融合は架橋リンカーまたはスペーサー分子を含む。いくつかの実施形態では、カーゴポリペプチドは、輸送体ポリペプチドと化学的に連結される。ある実施形態では、カーゴポリペプチドは、化学的ライゲーションまたはジスルフィド結合により輸送体ポリペプチドと結合される。

10

【0042】

少なくとも2つのポリペプチド構築物を含むヘテロ多量体タンパク質であって、各ポリペプチド構築物が少なくとも1つのカーゴポリペプチドおよび輸送体ポリペプチドを含み、これにより前記輸送体ポリペプチドが自己集合してヘテロ多量体を形成するヘテロ多量体タンパク質が、本明細書中で提供される。いくつかの実施形態では、各輸送体ポリペプチドはアロアルブミンベースのポリペプチドであり、したがってアロアルブミンベースのポリペプチドが自己集合してヘテロ多量体を形成する。いくつかの実施形態では、各輸送体ポリペプチドはトランスフェリンベースのポリペプチドである。いくつかの実施形態では、各輸送体ポリペプチドはアネキシンベースのポリペプチドである。ある実施形態では、各単量体輸送体ポリペプチドは不安定であり少なくとも1つの他の輸送体ポリペプチドとヘテロ多量体を優先的に形成する。

20

【0043】

いくつかの実施形態では、本明細書中に記載されるヘテロ多量体はヘテロ二量体である。いくつかの実施形態では、カーゴポリペプチドは抗体、ホルモン、治療用ポリペプチド、抗原、化学毒素、放射性毒素、サイトカインまたはその変異体もしくは断片である。いくつかの実施形態では、1つのポリペプチド構築物のカーゴポリペプチドは、別のポリペプチド構築物のカーゴポリペプチドと相乗的に機能する。

【0044】

少なくとも2つのポリペプチド構築物を含むヘテロ多量体タンパク質であって、各ポリペプチド構築物が少なくとも1つのカーゴポリペプチドおよびアネキシンベースのポリペプチドを含み、これにより前記アネキシンベースのポリペプチドが自己集合して単量体アネキシンまたはその類似体の擬似ネイティブ構造を伴うヘテロ多量体を形成するヘテロ多量体が、本明細書中で提供される。いくつかの実施形態では、アネキシンはアネキシンA1である。いくつかの実施形態では、本明細書中に記載されるヘテロ多量体はヘテロ二量体である。いくつかの実施形態では、カーゴポリペプチドは、抗体、酵素、ホルモン、治療用ポリペプチド、抗原、化学毒素、放射性毒素、サイトカイン、受容体に対するリガンド、受容体またはその変異体もしくは断片である。いくつかの実施形態では、あるポリペプチド構築物のカーゴポリペプチドは、別のポリペプチド構築物のカーゴポリペプチドと相乗的に機能する。いくつかの実施形態では、カーゴポリペプチドは、別のポリペプチド構築物のカーゴポリペプチドに対するアゴニストまたはアンタゴニストであり得る。

30

40

【0045】

少なくとも2つの単量体融合タンパク質を含むヘテロ二量体タンパク質であって、各単量体融合タンパク質がアルブミン由来ポリペプチドと融合される少なくとも1つのカーゴポリペプチドを含み、これにより前記アルブミン由来ポリペプチドが自己集合して多機能性ヘテロ二量体を形成するヘテロ二量体タンパク質が、本明細書中で提供される。ある実施形態では、アルブミン由来ポリペプチドと融合される少なくとも1つのカーゴポリペプチドを含む第一単量体；およびアルブミン由来ポリペプチドと融合される少なくとも1つのカーゴポリペプチドを含む第二単量体を含むヘテロ二量体タンパク質が提供される。あ

50

る実施形態では、第一単量体の少なくとも1つのカーゴポリペプチドは、第二単量体の少なくとも1つのカーゴポリペプチドとは異なる。ある実施形態では、第一単量体の少なくとも1つのカーゴポリペプチドは、第二単量体の少なくとも1つのカーゴポリペプチドと同一である。

【0046】

ある実施形態では、少なくとも2つの単量体融合タンパク質を含むヘテロ多量体タンパク質であって、各単量体融合タンパク質がアロアルブミン由来ポリペプチドと融合される少なくとも1つのカーゴポリペプチドを含み、これにより前記アロアルブミン由来ポリペプチドが自己集合して多機能性ヘテロ多量体を形成するヘテロ多量体タンパク質が提供される。ある実施形態では、少なくとも2つの単量体融合タンパク質を含むヘテロ多量体タンパク質であって、各単量体融合タンパク質がトランスフェリン由来ポリペプチドと融合される少なくとも1つのカーゴポリペプチドを含み、これにより前記トランスフェリン由来ポリペプチドが自己集合してヘテロ多量体を形成するヘテロ多量体タンパク質が提供される。ある実施形態では、少なくとも2つの単量体融合タンパク質を含むヘテロ多量体タンパク質であって、各単量体融合タンパク質がアネキシン由来ポリペプチドと融合される少なくとも1つのカーゴポリペプチドを含み、これにより前記アネキシン由来ポリペプチドが自己集合してヘテロ多量体を形成するヘテロ多量体タンパク質が提供される。ある実施形態では、アネキシンはアネキシンA2である。

【0047】

ある実施形態では、アロアルブミン由来ポリペプチドと融合される少なくとも1つのカーゴポリペプチドを含む第一ポリペプチド構築物；およびアロアルブミン由来ポリペプチドと融合される少なくとも1つのカーゴポリペプチドを含む第二ポリペプチド構築物を含む、ヘテロ多量体タンパク質が提供される。ある実施形態では、第一ポリペプチド構築物の少なくとも1つのカーゴポリペプチドは、第二ポリペプチド構築物の少なくとも1つのカーゴポリペプチドとは異なる。ある実施形態では、第一ポリペプチド構築物の少なくとも1つのカーゴポリペプチドは、第二ポリペプチド構築物の少なくとも1つのカーゴポリペプチドと同一である。

【0048】

各々が輸送体ポリペプチドを含む少なくとも2つの単量体および前記輸送体ポリペプチドと結合される少なくとも1つのカーゴ分子を任意に含むヘテロ多量体であって、各輸送体ポリペプチドが全タンパク質のセグメント化により得られ、したがって前記輸送体ポリペプチドが自己集合して擬似ネイティブ全タンパク質を形成するヘテロ多量体が提供される。ある実施形態では、ヘテロ多量体は多重特異性である。ある実施形態では、輸送体ポリペプチドは抗体に由来しない。いくつかの実施形態では、各単量体は、一単量体またはホモ多量体と比較してヘテロ多量体を優先的に形成する。ヘテロ多量体の一実施形態では、少なくとも1つのカーゴ分子は、治療薬または生体分子である。いくつかの実施形態では、少なくとも1つのカーゴ分子は、ポリペプチド、DNA、RNAまたはRNAから選択される生体分子である。いくつかの実施形態では、各輸送体ポリペプチドはアルブミンまたはアロアルブミンの誘導体である。一実施形態では、各輸送体ポリペプチドはアネキシンの誘導体である。ある実施形態では、各輸送体ポリペプチドはトランスフェリンの誘導体である。

【0049】

ある実施形態では、本明細書中に記載されるアルブミンベースのおよび／またはアロアルブミンベースのヘテロ多量体タンパク質、および薬学的に許容可能な希釈剤または担体を含む薬学的処方物が提供される。ある実施形態では、本明細書中に記載されるトランスフェリンベースのヘテロ多量体タンパク質、および薬学的に許容可能な希釈剤または担体を含む薬学的処方物が提供される。ある実施形態では、本明細書中に記載されるアネキシンベースのヘテロ多量体タンパク質、および薬学的に許容可能な希釈剤または担体を含む薬学的処方物が提供される。ある実施形態では、本明細書中に記載されるアネキシン-A2ベースのヘテロ多量体タンパク質、および薬学的に許容可能な希釈剤または担体を含む

薬学的処方物が提供される。ある実施形態では、本明細書中に記載される処方物は、キットまたは容器の一部として提供される。ある実施形態では、キットまたは容器は、治療用タンパク質の保存期限の延長に関する使用説明書とともに包装される。いくつかの実施形態では、本明細書中に記載されるヘテロ多量体は、個体における疾患または疾患症候を処置し（たとえば改善し）、防止し、または診断する方法であって、個体に前記処方物を投与するステップを包含する方法に用いられる。

【0050】

任意の当該輸送タンパク質をベースにした既知数の連結部位を有する融合タンパク質足場を獲得する方法が、本明細書中で提供される。

【0051】

本明細書中に記載される単量体融合タンパク質をコードし発現するために本明細書中に記載される核酸分子を含有するよう修飾されたトランスジェニック生物体も、提供される。

【0052】

[本発明1001]

(i) 第一輸送体ポリペプチドを含む第一ポリペプチド構築物;および

(ii) 第二輸送体ポリペプチドを含む第二ポリペプチド構築物

を含むヘテロ多量体であって;

前記第一および第二輸送体ポリペプチドの各々がアルブミンポリペプチドのセグメントと少なくとも90%の同一性を有するアミノ酸配列を含み;かつ

セグメント化がセグメント化部位での0~3個のアミノ酸残基の欠失を生じるように、前記第一および第二輸送体ポリペプチドがセグメント化部位での前記アルブミンポリペプチドのセグメント化により得られ、

前記輸送体ポリペプチドが自己集合して単量体形態の前記アルブミンポリペプチドの擬似ネイティブ構造を形成するヘテロ多量体。

[本発明1002]

a) 前記セグメント化部位が、高度の溶媒接触表面積 (SASA) を有し、かつアルブミン構造の残りとの接触が限定されているアルブミンポリペプチドのループ上に存在し、

b) 前記セグメント化が輸送体ポリペプチド間に相補的界面を生じ、ここで界面は無極性であり、広大で且つ互いに噛み合う本発明1001のヘテロ多量体。

[本発明1003]

セグメント化が、セグメント化部位での0~2個のアミノ酸残基の欠失を生じる本発明1001または1002のヘテロ多量体。

[本発明1004]

セグメント化が、セグメント化部位での0または1個のアミノ酸残基の欠失を生じる本発明1001または1002のヘテロ多量体。

[本発明1005]

第一および第二輸送体ポリペプチドのうちの少なくとも1つが、リンカーをさらに含む本発明1001~1004のいずれかのヘテロ多量体。

[本発明1006]

リンカーが、GGGSリンカーである本発明1005のヘテロ多量体。

[本発明1007]

単量体形態の前記アルブミンポリペプチドの擬似ネイティブ構造が、65℃より高い融解温度を有する本発明1001~1006のいずれかのヘテロ多量体。

[本発明1008]

単量体形態の前記アルブミンポリペプチドの擬似ネイティブ構造が、70℃より高い融解温度を有する本発明1001~1006のいずれかのヘテロ多量体。

[本発明1009]

単量体形態の前記アルブミンポリペプチドの擬似ネイティブ構造が、75℃より高い融解

10

20

30

40

50

温度を有する本発明1001～1006のいずれかのヘテロ多量体。

[本発明1010]

少なくとも1つのジスルフィド結合が、第一および第二輸送体ポリペプチドからの残基全体を通して形成され、かつジスルフィド結合が前記アルブミンポリペプチドにおいても観察される本発明1001～1009のいずれかのヘテロ多量体。

[本発明1011]

前記アルブミンポリペプチドが、配列番号1の配列を有するヒト血清アルブミンまたはその類似体もしくは変異体である本発明1001～1010のいずれかのヘテロ多量体。

[本発明1012]

前記第一輸送体ポリペプチドが配列番号39を含む配列またはその類似体もしくは変異体を有し、かつ前記第二輸送体ポリペプチドが配列番号40を含む配列またはその類似体もしくは変異体を有する本発明1001のヘテロ多量体。

[本発明1013]

前記第一輸送体ポリペプチドが配列番号41を含む配列またはその類似体もしくは変異体を有し、かつ前記第二輸送体ポリペプチドが配列番号42を含む配列またはその類似体もしくは変異体を有する本発明1001のヘテロ多量体。

[本発明1014]

前記第一輸送体ポリペプチドが配列番号43を含む配列またはその類似体もしくは変異体を有し、かつ前記第二輸送体ポリペプチドが配列番号44を含む配列またはその類似体もしくは変異体を有する本発明1001のヘテロ多量体。

[本発明1015]

前記第一輸送体ポリペプチドが配列番号45を含む配列またはその類似体もしくは変異体を有し、かつ前記第二輸送体ポリペプチドが配列番号46を含む配列またはその類似体もしくは変異体を有する本発明1001のヘテロ多量体。

[本発明1016]

前記第一輸送体ポリペプチドが配列番号47を含む配列またはその類似体もしくは変異体を有し、かつ前記第二輸送体ポリペプチドが配列番号48を含む配列またはその類似体もしくは変異体を有する本発明1001のヘテロ多量体。

[本発明1017]

前記第一輸送体ポリペプチドが配列番号49を含む配列またはその類似体もしくは変異体を有し、かつ前記第二輸送体ポリペプチドが配列番号50を含む配列またはその類似体もしくは変異体を有する本発明1001のヘテロ多量体。

[本発明1018]

前記第一輸送体ポリペプチドが配列番号51を含む配列またはその類似体もしくは変異体を有し、かつ前記第二輸送体ポリペプチドが配列番号52を含む配列またはその類似体もしくは変異体を有する本発明1001のヘテロ多量体。

[本発明1019]

前記第一輸送体ポリペプチドが配列番号53を含む配列またはその類似体もしくは変異体を有し、かつ前記第二輸送体ポリペプチドが配列番号54を含む配列またはその類似体もしくは変異体を有する本発明1001のヘテロ多量体。

[本発明1020]

前記第一および第二輸送体ポリペプチドのうちの少なくとも1つが、アミノ酸残基のシステインまたはその類似体への少なくとも1つの突然変異を含み、これにより前記システインが他方の輸送体ポリペプチド上の対応するシステイン残基とジスルフィド結合を形成する本発明1001のヘテロ多量体。

[本発明1021]

前記第一および第二輸送体ポリペプチドが、アミノ酸残基のシステインへの少なくとも1つの突然変異を含み、これにより前記システインが別の輸送体ポリペプチド上のシステイン残基とジスルフィド結合を形成する本発明1020のヘテロ多量体。

[本発明1022]

10

20

30

40

50

前記第一輸送体ポリペプチドが、A194C、L198C、W214C、A217C、L331CおよびA335Cから選択される少なくとも1つの突然変異を含む本発明1021のヘテロ多量体。

[本発明1023]

前記第二輸送体ポリペプチドが、L331C、A335C、V343C、L346C、A350C、V455C、およびN458Cから選択される少なくとも1つの突然変異を含む本発明1021のヘテロ多量体。

[本発明1024]

(i) 第一輸送体ポリペプチドを含む第一ポリペプチド構築物;および

(i i) 第二輸送体ポリペプチドを含む第二ポリペプチド構築物

を含むヘテロ多量体であって;

前記第一および第二輸送体ポリペプチドの各々がアルブミンポリペプチドのセグメントと少なくとも90%の同一性を有するアミノ酸配列を含み;かつ

前記第一および第二輸送体ポリペプチドがセグメント化部位での前記アルブミンポリペプチドのセグメント化により得られ、かつ

前記輸送体ポリペプチドが自己集合して単量体形態の前記アルブミンポリペプチドの擬似ネイティブ構造を形成するように、前記第一および第二輸送体ポリペプチドの少なくとも1つがアミノ酸残基のシステインまたはその類似体への少なくとも1つの突然変異を含み、これにより前記システインが他方の輸送体ポリペプチドとジスルフィド結合を形成する

ヘテロ多量体。

[本発明1025]

セグメント化部位が、a) 高度の溶媒接触表面積 (SASA) を有し、かつアルブミン構造の残りとの接触が限定されているアルブミンポリペプチドのループ上に存在し、b) 輸送体ポリペプチド間に相補的界面を生じ、ここで界面は無極性であり、広大で且つ互いに噛み合う本発明1024のヘテロ多量体。

[本発明1026]

前記第一輸送体ポリペプチドが、A194C、L198C、W214C、A217C、L331CおよびA335Cから選択される少なくとも1つの突然変異を含む本発明1024または1025の単離ヘテロ多量体。

[本発明1027]

前記第二輸送体ポリペプチドが、L331C、A335C、V343C、L346C、A350C、V455C、およびN458Cから選択される少なくとも1つの突然変異を含む本発明1024または1025の単離ヘテロ多量体。

[本発明1028]

第一および第二輸送体ポリペプチドのうちの少なくとも1つが、リンカーをさらに含む本発明1024~1027のいずれかのヘテロ多量体。

[本発明1029]

リンカーが、GGGGsリンカーである本発明1028のヘテロ多量体。

[本発明1030]

前記アルブミンポリペプチドが、配列番号1の配列を有するヒト血清アルブミンまたはその類似体もしくは変異体である本発明1024~1029のいずれかのヘテロ多量体。

[本発明1031]

前記第一輸送体ポリペプチドが配列番号19を含む配列またはその類似体もしくは変異体を有し、かつ前記第二輸送体ポリペプチドが配列番号20を含む配列またはその類似体もしくは変異体を有する本発明1024のヘテロ多量体。

[本発明1032]

前記第一輸送体ポリペプチドが配列番号21を含む配列またはその類似体もしくは変異体を有し、かつ前記第二輸送体ポリペプチドが配列番号22を含む配列またはその類似体もしくは変異体を有する本発明1024のヘテロ多量体。

[本発明1033]

10

20

30

40

50

前記第一輸送体ポリペプチドが配列番号23を含む配列またはその類似体もしくは変異体を有し、かつ前記第二輸送体ポリペプチドが配列番号22を含む配列またはその類似体もしくは変異体を有する本発明1024のヘテロ多量体。

[本発明1034]

前記第一輸送体ポリペプチドが配列番号25を含む配列またはその類似体もしくは変異体を有し、かつ前記第二輸送体ポリペプチドが配列番号26を含む配列またはその類似体もしくは変異体を有する本発明1024のヘテロ多量体。

[本発明1035]

前記第一輸送体ポリペプチドが配列番号27を含む配列またはその類似体もしくは変異体を有し、かつ前記第二輸送体ポリペプチドが配列番号28を含む配列またはその類似体もしくは変異体を有する本発明1024のヘテロ多量体。

10

[本発明1036]

前記第一輸送体ポリペプチドが配列番号29を含む配列またはその類似体もしくは変異体を有し、かつ前記第二輸送体ポリペプチドが配列番号30を含む配列またはその類似体もしくは変異体を有する本発明1024のヘテロ多量体。

[本発明1037]

前記第一輸送体ポリペプチドが配列番号31を含む配列またはその類似体もしくは変異体を有し、かつ前記第二輸送体ポリペプチドが配列番号32を含む配列またはその類似体もしくは変異体を有する本発明1024のヘテロ多量体。

[本発明1038]

20

前記第一輸送体ポリペプチドが配列番号33を含む配列またはその類似体もしくは変異体を有し、かつ前記第二輸送体ポリペプチドが配列番号34を含む配列またはその類似体もしくは変異体を有する本発明1024のヘテロ多量体。

[本発明1039]

前記第一輸送体ポリペプチドが配列番号35を含む配列またはその類似体もしくは変異体を有し、かつ前記第二輸送体ポリペプチドが配列番号36を含む配列またはその類似体もしくは変異体を有する本発明1024のヘテロ多量体。

[本発明1040]

前記第一輸送体ポリペプチドが配列番号37を含む配列またはその類似体もしくは変異体を有し、かつ前記第二輸送体ポリペプチドが配列番号38を含む配列またはその類似体もしくは変異体を有する本発明1024のヘテロ多量体。

30

[本発明1041]

前記第一ポリペプチド構築物が、少なくとも1つの第一カーゴポリペプチドをさらに含む本発明1001～1040のいずれかのヘテロ多量体。

[本発明1042]

第一ポリペプチド構築物が、2つの第一カーゴポリペプチドをさらに含む本発明1041のヘテロ多量体。

[本発明1043]

少なくとも1つの第一カーゴポリペプチドが、抗原結合ポリペプチド構築物である本発明1041または1042のヘテロ多量体。

40

[本発明1044]

抗原結合ポリペプチド構築物が、C D3、C D19、C D20、H E R2、またはH E R3に結合する本発明1043のヘテロ多量体。

[本発明1045]

前記第二ポリペプチド構築物が、少なくとも1つの第二カーゴポリペプチドをさらに含む本発明1041～1044のいずれかのヘテロ多量体。

[本発明1046]

第二ポリペプチド構築物が、2つの第二カーゴポリペプチドをさらに含む本発明1045のヘテロ多量体。

[本発明1047]

50

少なくとも1つの第二カーゴポリペプチドが、抗原結合ポリペプチド構築物である本発明1045または1046のヘテロ多量体。

[本発明1048]

前記少なくとも1つの第二カーゴポリペプチドが、C D3、C D19、C D20、H E R2、またはH E R3に結合する抗原結合ポリペプチド構築物から選択される本発明1047のヘテロ多量体。

[本発明1049]

前記第一ポリペプチド構築物が少なくとも1つの第一カーゴポリペプチドをさらに含み、かつ前記第二ポリペプチド構築物が少なくとも1つの第二カーゴポリペプチドをさらに含む本発明1001～1048のいずれかのヘテロ多量体。

10

[本発明1050]

前記第一カーゴポリペプチドがC D3に結合する抗原結合ポリペプチド構築物であり、かつ前記第二カーゴポリペプチドがC D19またはC D20に結合する抗原結合ポリペプチド構築物である本発明1049のヘテロ多量体。

[本発明1051]

前記第一カーゴポリペプチドがH E R2に結合する抗原結合ポリペプチド構築物であり、かつ前記第二カーゴポリペプチドがH E R3に結合する抗原結合ポリペプチド構築物である本発明1050のヘテロ多量体。

[本発明1052]

前記少なくとも1つの第一カーゴポリペプチドが、前記第一輸送体ポリペプチドにリンカーで融合される本発明1041～1051のいずれかのヘテロ多量体。

20

[本発明1053]

前記少なくとも1つの第二カーゴポリペプチドが、前記第二輸送体ポリペプチドにリンカーで融合される本発明1041～1051のいずれかのヘテロ多量体。

[本発明1054]

(i) 第一輸送体ポリペプチド;および (i i) C D3、C D19、C D20、H E R2またはH E R3と結合する抗原結合ポリペプチド構築物である少なくとも1つの第一カーゴポリペプチドを含む第一ポリペプチド構築物、ならびに

(i i i) 第二輸送体ポリペプチド;および (i v) 少なくとも1つの第二カーゴポリペプチドを含む第二ポリペプチド構築物を含むヘテロ多量体であって、

30

前記第一および第二輸送体ポリペプチドの各々がアルブミンポリペプチドのセグメントと少なくとも90%の同一性を有するアミノ酸配列を含み;かつ

前記第一および第二輸送体ポリペプチドがセグメント化部位での前記アルブミンポリペプチドのセグメント化により得られ、

前記輸送体ポリペプチドが自己集合して単量体形態の前記アルブミンポリペプチドの擬似ネイティブ構造を形成するヘテロ多量体。

[本発明1055]

前記第一ポリペプチド構築物が、2つの第一カーゴポリペプチドを含む本発明1054のヘテロ多量体。

40

[本発明1056]

2つの第一カーゴポリペプチドが、C D3、H E R2、H E R3、またはC D19に結合する本発明1055のヘテロ多量体。

[本発明1057]

2つの第一カーゴポリペプチドが、互いに異なる本発明1055または1056のヘテロ多量体。

[本発明1058]

前記2つの第一カーゴポリペプチドのうち的一方がC D3に結合し他方がC D19に結合する本発明1057のヘテロ多量体。

50

[本発明1059]

前記2つの第一カーゴポリペプチドのうち的一方がH E R2に結合し他方がH E R3に結合する本発明1058のヘテロ多量体。

[本発明1060]

前記第二ポリペプチド構築物が、C D3、C D19、C D20、H E R2またはH E R3に結合する抗原結合ポリペプチド構築物である少なくとも1つの第二カーゴポリペプチドを含む本発明1054～1059のヘテロ多量体。

[本発明1061]

前記第二ポリペプチド構築物が、2つの第二カーゴポリペプチドを含む本発明1060のヘテロ多量体。

10

[本発明1062]

2つの第二カーゴポリペプチドが、C D3、H E R2、H E R3またはC D19に結合する本発明1061のヘテロ多量体。

[本発明1063]

2つの第二カーゴポリペプチドが、互いに異なる本発明1061のヘテロ多量体。

[本発明1064]

前記2つの第二カーゴポリペプチドのうち的一方がC D3に結合し他方がC D19に結合する本発明1063のヘテロ多量体。

[本発明1065]

前記2つの第二カーゴポリペプチドのうち的一方がH E R2に結合し他方がH E R3に結合する本発明1063のヘテロ多量体。

20

[本発明1066]

前記アルブミンポリペプチドが、配列番号1の配列を有するヒト血清アルブミンまたはその類似体もしくは変異体である本発明1054～1065のいずれかのヘテロ多量体。

[本発明1067]

前記少なくとも1つの第一カーゴポリペプチドが、前記第一輸送体ポリペプチドにリンカーで融合される本発明1054～1065のいずれかのヘテロ多量体。

[本発明1068]

前記少なくとも1つの第二カーゴポリペプチドが、前記第二輸送体ポリペプチドにリンカーで融合される本発明1054～1065のいずれかのヘテロ多量体。

30

[本発明1069]

リンカーが、G G G G s リンカーである本発明1068のヘテロ多量体。

[本発明1070]

前記ヘテロ多量体がF c R nに結合する本発明1001～1069のいずれかのヘテロ多量体。

[本発明1071]

少なくとも1つの輸送体ポリペプチドが、アローアルブミン誘導体である本発明1001～1069のいずれかのヘテロ多量体。

[本発明1072]

輸送体ポリペプチドが、同一型のアルブミンポリペプチドに由来する本発明1001、1024または1025のヘテロ多量体。

40

[本発明1073]

輸送体ポリペプチドが、異なる型のアルブミンポリペプチドに由来する本発明1001のヘテロ多量体。

[本発明1074]

第一ポリペプチド構築物が標的抗原に結合する少なくとも1つの第一カーゴポリペプチドをさらに含み、かつ第二ポリペプチド構築物が毒素部分である少なくとも1つの第二カーゴポリペプチドをさらに含む本発明1001～1040のいずれかのヘテロ多量体。

[本発明1075]

第一ポリペプチド構築物が標的抗原に結合する少なくとも1つの第一カーゴポリペプチドをさらに含み、かつ前記標的抗原がI L-2Rのα鎖(C D25)、アミロイドベータ

50

、抗E p C A M、抗C D 3、C D 16、C D 20、C D 22、C D 23、C D 3、C D 4、C D 52、C D 80、C T L A - 4、E G F R、E p C A M、R S VのFプロテイン、G 250、糖タンパク質I I B / I I I a R、H E R 2、H E R 3、I G F 1 R、E G F R、H S P 90、I g E抗体、I L - 12、I L - 23、I L - 1 b、I L - 5、I L - 6、R A N K L、T N Fアルファ、T N F R、T R A I L、V E G F - A、グルカゴン受容体、G L P受容体、およびL D L受容体のうちの少なくとも1つである本発明1001~1040のいずれかのヘテロ多量体。

[本発明1076]

少なくとも1つのカーゴポリペプチドが、酵素、ホルモン、治療用ポリペプチド、抗原、化学毒素、放射性毒素、サイトカインまたはその変異体もしくは断片である本発明1001~1040のいずれかのヘテロ多量体。

10

[本発明1077]

前記輸送体ポリペプチドが前記タンパク質のセグメント化によるタンパク質に由来し、各輸送体ポリペプチドが前記タンパク質のセグメントと少なくとも95%の同一性を有するアミノ酸配列を含む本発明1001~1076のいずれかのヘテロ多量体。

[本発明1078]

前記輸送体ポリペプチドが前記タンパク質のセグメント化によるタンパク質に由来し、各輸送体ポリペプチドが前記タンパク質のセグメントと少なくとも99%の同一性を有するアミノ酸配列を含む本発明1001~1076のいずれかのヘテロ多量体。

[本発明1079]

本発明1001~1075のいずれかのヘテロ多量体をコードする核酸を含む宿主細胞。

20

[本発明1080]

第一ポリペプチド構築物をコードする核酸および第二ポリペプチド構築物をコードする核酸が、単一ベクター中に存在する本発明1079の宿主細胞。

[本発明1081]

第一ポリペプチド構築物をコードする核酸および第二ポリペプチド構築物をコードする核酸が、別々のベクター中に存在する本発明1079の宿主細胞。

[本発明1082]

本発明1041~1078のヘテロ多量体およびアジュバントを含む薬学的組成物。

[本発明1083]

それを必要とする患者に本発明1082の薬学的組成物の有効量を提供することを包含する癌の処置方法。

30

[本発明1084]

本発明1041~1078のいずれかのヘテロ多量体の有効量と腫瘍を接触させることを包含する腫瘍の増殖の抑制方法。

[本発明1085]

本発明1041~1078のいずれかのヘテロ多量体の有効量と腫瘍を接触させることを包含する腫瘍の萎縮方法。

[本発明1086]

目的のタンパク質から自己会合ポリペプチドを設計する方法であって、少なくとも1つのセグメント化部位で前記タンパク質をセグメント化して少なくとも2つのポリペプチドセグメントを獲得し、これにより前記ポリペプチドセグメントが自己集合してヘテロ多量体を形成することを包含し、ここで前記ヘテロ多量体は前記タンパク質の擬似ネイティブ単量体構造を形成し、

40

a. 高度の溶媒接触表面積を有しかつ前記タンパク質の残りの構造との接触が限定されている目的のタンパク質の少なくとも1つのループを選択するステップ、および

b. 選択したループ当たり1つのセグメント化部位を導入し、少なくとも2つのポリペプチドセグメント間に相補的界面を生じるステップであり、ここで界面は無極性であり、広大で且つ互いに噛み合うステップを包含する方法。

[本発明1087]

50

ポリペプチドセグメント間に少なくとも1つのジスルフィド結合を導入することを包含する本発明1086の方法。

[本発明1088]

単量体タンパク質がアルブミンである本発明1086の方法。

[本発明1089]

ヘテロ多量体がポリペプチド間に共有結合を含まないようセグメント化が実施される本発明1086の方法。

[本発明1090]

ヘテロ多量体がポリペプチド間に少なくとも1つの共有結合を含むようセグメント化が実施される本発明1086の方法。

[本発明1091]

本発明1086の方法により設計されるヘテロ多量体。

[本発明1092]

本発明1086の方法により設計されるヘテロ多量体を含む治療用足場。

[本発明1093]

擬似ネイティブ単量体構造が、アルブミンに匹敵する熱安定性を有する本発明1024～1078のいずれかのヘテロ多量体。

[本発明1094]

熱安定性が、擬似ネイティブ単量体構造の融解温度（ T_m ）を測定することにより測定される本発明1093のヘテロ多量体。

[本発明1095]

擬似ネイティブ単量体の熱安定性が、アルブミンの熱安定性の約20℃以内である本発明1094のヘテロ多量体。

[本発明1096]

カーゴポリペプチドの活性が、輸送体ポリペプチドへの融合においてその非融合フォーマットに対し選択的に変更される本発明1041～1078のヘテロ多量体。

[本発明1097]

カーゴポリペプチドの活性が、輸送体ポリペプチドへの融合においてその非融合フォーマットに対し選択的に弱められる本発明1041～1078のヘテロ多量体。

[本発明1098]

カーゴポリペプチドの活性が、輸送体ポリペプチドへの融合においてその非融合フォーマットに対し選択的に2～100倍弱められる本発明1041～1078のヘテロ多量体。

[本発明1099]

セグメント化部位で導入されるCおよびN末端が、GGGGSペプチド配列に融合される本発明1001のヘテロ多量体。

[本発明1100]

GGGGSペプチド配列をセグメント化部位で導入されるCおよびN末端に融合するステップをさらに包含する本発明1086の方法。

本発明の他の態様および特徴は、本発明の具体的実施形態についての以下の説明を添付の図面とともに検討すれば、当業者には明らかになる。

【図面の簡単な説明】

【0053】

本発明の実施形態を例証する図面において、

【図1】 ヒト血清アルブミン（HSA）分子の構造を示す。二次構造の α ヘリックス部分を、棒として表された結合と一緒に模式的に示す。

【図2】 2つのアルブミンベースのポリペプチドの界面での埋没した溶媒接触表面積のプロットである。ABH1は左の構造により表され、一方、ABH2は右の構造により表される。

【図3】 別々に発現される2つのアルブミンベースのポリペプチドを示す。2つのポリペプチドは、それぞれ明灰色および暗灰色で示されている。各ポリペプチドは、機能性カー

10

20

30

40

50

ゴタンパク質のための2つの融合部位を含み、これらの部位は球として表されている。構造中のジスルフィド残基は棒として示されている。

【図4】本明細書中に記載される多重特異性ヘテロ多量体に基づく二重特異性およびその他の多機能性治療薬の模式図である。アルブミンベースの、またはアロアルブミンベースのポリペプチドを、A1およびA2で示す。多機能性ヘテロ多量体は、抗原結合モチーフ、サイトカインおよびその他の型のシグナル伝達分子、化学毒素、放射性毒素またはその他の機能的に関連する免疫複合体をA1およびA2上のNおよび／またはC末端と結合することにより得られ、これを記号□で表す。

【図5】ヘテロ二量体Fcドメイン由来の二重特異性抗体の模式図である。アルブミンまたはアロアルブミンベースのポリペプチドはFcのC末端と連結されてヘテロ二量体の形成を選択的に駆動する。

10

【図6】図6Bは、HSAベースの輸送体ポリペプチドの同時発現により形成される、全長HSAならびにヘテロ二量体足場であるアルブミンベースのヘテロ多量体-1 (ABH1) およびアルブミンベースのヘテロ多量体-2 (ABH2) の、ネイティブゲル電気泳動プロファイルを示す。図6Aは、ABH2、ABH1およびWT HSAの非還元型SDS-PAGEゲルプロファイルを示す。ABH1およびABH2の2つの断片ポリペプチドを、図の上部の比により示されるような異なるDNA比で同時発現させた。対照として、およびホモ二量体化を観察するために、断片AおよびBを独立して発現させた。図6Cは、WT-HSA (v225) およびABH2 (v221) のBlue Sepharose精製後の、初期、フロースルー、洗浄および最終溶出のネイティブゲルである。

20

【図7】示差走査熱量測定を用いて試験した野生型HSAならびにヘテロ二量体足場ABH1およびABH2の安定性を示す。

【図8】3000RUを超える平衡結合等温線3000nM FcRN 3倍希釈シリーズを示す。図8Bはアルブミンを示し、図8Aはヘテロ多量体足場ABH1を示す。

【図9】抗Her2/neuおよび抗CD16 scFv生物活性融合体を含む、多価アルブミンベースのヘテロ多量体の模式図である。

【図10】表8に記載したヘテロ多量体ABH2融合体の非還元型SDS-PAGE分析を含有する。ゲルは、すべての構築物が予測分子量を有する妥当な複合体を形成することを示している。

【図11】PDB構造 1MCXに基づくアネキシン分子の構造を示す。アネキシン分子を分割することにより得られる2つの単量体は、明灰色および暗灰色単位として色分けされている。カーゴタンパク質のための融合の部位は球として表されている。

30

【図12】アネキシンベースの輸送体ポリペプチド-1、およびアネキシンベースの輸送体ポリペプチド-2の界面での埋没した溶媒接触表面積のプロットを示す。

【図13】PDB構造 1H76に基づくトランスフェリン分子の構造を示す。トランスフェリン分子を分割することにより得られる2つの単量体は、明灰色および暗灰色単位として色分けされている。カーゴタンパク質のための融合の部位は球として表されている。

【図14】本明細書中に記載される2つのトランスフェリンベースの輸送体ポリペプチドの界面での埋没した溶媒接触表面積のプロットを示す。本明細書中で設計されるような残基位置330近くのスプリットトランスフェリンは、約1800Å²の埋没表面積を有するヘテロ二量体を形成する。

40

【図15-1】(図15A~D) 自己会合して擬似ネイティブ単量体アルブミンを形成するアルブミンベースの輸送体ポリペプチドを含むヘテロ多量体を示す。輸送体ポリペプチドの各対は、他とは異なる独自の部位でのアルブミンのセグメント化により得られる。

【図15-2】(図15E~H) 同上

【図15-3】(図15I~L) 同上

【図15-4】(図15M~P) 同上

【図16】それぞれ、ABH2およびABH1の構造を提供する。両図は、a) アルブミンベースのタンパク質を作成するためのWT-HSAにおける切断部位の位置、b) 新規のC'およびN'切断部位の位置ならびにc) 多数の後述の実施例で利用される、ABH1

50

およびABH2の両方を示す簡略化した円を包含する。

【図17】ABH2に結合され得る抗Her2 scFvの種々の1、2、3および4価立体配置を示す。対照は、ABH2足場、抗HER scFv、単腕Fcおよび2価Fcを包含した。さらに、Her2を発現するSKOV細胞に結合する種々のABH2構築物の能力が表内に K_D 値で示されている。

【図18A】図18Aは、4つの抗Her3×Her2負荷構築物(v1087、v1088、v1089およびv1090)の、MALME-3M細胞への結合曲線を示す。FITC標識化抗HSA抗体とともにFACSを用いて、細胞に対する親和性を評価した。下左のグラフは線形スケールでの濃度を示し、一方、下右は対数スケールである。

【図18B】図18Bは、前記4つの構築物の、SKOV-3細胞への結合曲線を示す。下左のグラフは線形スケールでの濃度を示し、一方、下右は対数スケールである。

【図19-1】(図19A~B)ヒト血清における4つの抗Her2(v519、v520、v518およびv517)装填ABH2の安定性を実証する。FITC標識化抗HSA抗体とともにFACSを用いて、SKOV-3細胞に対する結合親和性を評価した。

【図19-2】(図19C~D)同上

【図20A】v1087(MM-111)対照と比較した場合の、二重特異性抗Her2×Her3 ABH2(v1378)のFcRnに対する結合親和性を示す。グラフは、経時的にResp. Diff.として表される2つの化合物の表面プラズモン共鳴(SPR)曲線を表す。

【図20B】同上

【図21】3つの温度(37℃、室温および4℃)で5日間インキュベートされたABH2足場(v221)および一価抗Her2 ABH2(v517)の両方のネイティブゲルプロフィールを示す。

【図22A】図22Aは、Blue Sepharose精製後の、トータル、フロースルー、洗浄および溶出画分のネイティブゲルプロフィールを示す。

【図22B】図22Bは、ゲル濾過カラムに適用されたBlue Sepharose精製後のWT-HSAのクロマトグラムである。異なるピークは異なるタンパク質産物を表す。

【図22C】図22Cは、ゲル濾過カラムへの適用により分画された、AlbuPure精製後のWT-HSAのクロマトグラムである。

【図23A】AlbuPure精製およびゲル濾過後のWT-HSA(v225)の液体クロマトグラフィー分析のクロマトグラムである。

【図23B】図23B~23Eは、画分に分離されゲル濾過LCにより分析された、AlbuPure精製後の、それぞれAlbuCORE足場1(v225)、3(v1636)、6(v1638)および9(v1640)のクロマトグラムである。

【図23C】同上

【図23D】同上

【図23E】同上

【図24A】図24Aは、AlbuPure精製後のアルブミン足場(v221)のゲル濾過LC分析を表す。CHO細胞における一過性同時発現により発現産物をスケールアップした。

【図24B】図24Bは、同じ変異体の非還元型(-DTTで示される)および還元型(+DTTで示される)SDS-PAGEゲルプロフィールを示す。

【図25A】図25Aは、AlbuPure精製後のWT-HSAおよびAlbuCORE-Aタンパク質のトータル、フロースルー、洗浄および最終溶出画分のネイティブゲルプロフィールを表す。

【図25B-1】図25Bは、同じ2つのタンパク質のLC/MS分析を表す。

【図25B-2】同上

【図26A】図26Aは、ABH2における4つの末端間の空間的分離の程度を示す図である。

10

20

30

40

50

【図26B】図26Bは、正常抗体分子の可変領域間の空間的分離の程度を実証する比較図である。

【図26C】図26Cは、他の抗原結合のための異なる且つ可変的な末端間距離を有する4つのA1bucORE足場を示す。

【図27】A1bucORE足場1、3、6および9のDSC融解曲線を示す。各グラフにおいて、各アルブミンベースの足場の曲線および融点を、WT HSAの曲線および75℃の融点と比較する。

【図28A】図28Aは、WT-HSAまたは継ぎ合わせたアルブミン足場上の抗CD3×CD19二重特異性二価ヘテロ多量体を模式的に示したものである。

【図28B】図28Bは、追加の一価抗CD3ヘテロ多量体構築物ならびに一価および多価の両方の抗CD19ヘテロ多量体構築物を模式的に表す。

【図28C】図28Cは、各々が懸濁増殖ヒトCHO系で発現された後の、前記構築物の非還元型PAGEゲルを表す。

【図29】WT-HSAまたは継ぎ合わせたアルブミン足場における4つの抗CD3×CD19二重特異性二価ヘテロ多量体のKaおよびヒル勾配測定値を提供する。結合試験は、FACSを用いて分析した場合のJurkatまたはRaji細胞に結合する変異体の能力を評価した。

【図30A】図30Aは、BiTE様対照(v891)、抗CD3×CD19アルブミンベースのヘテロ多量体(v1092)および抗CD3×CD19 Het-Fcベースのヘテロ多量体(v873)のFACS細胞集団グラフを示す。RajiおよびJurkat細胞への結合を評価した。

【図30B-1】図30Bは、アルブミン対照(v221)と比較した場合の、3つの前記構築物の追加のFACSグラフを示す。

【図30B-2】同上

【図31】図31Aは、C02+アフィニティーを用いた精製の前、最中および後のv218発現産物のSDS-PAGEを示す。図31Bは、ゲル濾過による追加の精製後の同じ構築物のクロマトグラムである。

【図32】その三次元構造から導かれるヒト血清アルブミンにおける残基のサブセットによりなされる残基接触のプロット。

【図33】ヒト血清アルブミンにおける選択ホットスポット残基により達成される接触および相互作用の性質のプロット。

【図34】ヒト血清アルブミンにおけるホットスポット残基またはホットスポット残基のクラスター(パッチ)の構造表示。

【図35】導入システイン残基を含むいくつかのアルブミンベースのヘテロ多量体の発現を実証するゲルを示す。

【図36A】図36Aは、ヘテロ多量体変異体1635、1638、1639および1641の発現を示す非還元型ゲルを提供する；図36Bは、ヘテロ多量体変異体1634、1636、1637、1640、および221の発現を示す非還元型ゲルを提供する。CHO細胞を以下のDNA比でトランスフェクトした：比A=プラスミドA：プラスミドB 100%：0%；比D=プラスミドA：プラスミドB 66%：34%；比B=プラスミドA：プラスミドB 50%：50%；比H=プラスミドA：プラスミドB 34%：66%；および比F=プラスミドA：プラスミドB 0%/100%。

【図36B】同上

【発明を実施するための形態】

【0054】

詳細な説明

治療用タンパク質の領域において、二重特異性分子は、二元的標的特異性を示し、あるいは薬剤作用のために必要な時空間的機構を提供することにより、多数の機能的役割を同時に実施し得る。一態様において、二重特異性分子は、治療作用方式が腫瘍細胞のような標的に対してエフェクター細胞または分子を再標的化することを包含する場合、特に興味

10

20

30

40

50

深い [Muller D. and Kontermann R. E. (2010) *Bio drugs* 24, 89-98]。安定かつ均質な条件での好ましい薬物動態および機能的活性を有する二重特異性治療用タンパク質の開発は困難な課題である。多数のアプローチを用いて、多数の抗原結合ドメインから二重特異性単位を編成する試みがなされてきた。これらの技術は、ヘテロ多量体抗体 IgG 分子を用いること、Fos/Jun 対などのロイシンジッパータンパク質または抗体中の可変ドメインの軽鎖および重鎖の交互組織化から集合されるその他の足場を用いることを包含している。Kipriyanov と Le Gall は、種々の二重特異性構築物の設計を概説している [Kipriyanov S. M. & Le Gall F. (2004) *Curr Opin Drug Discov Dev* 7, 233-242]。突然変異が抗体の CH3 ドメインに導入されてヘテロ二量体を達成し、それゆえ 1 分子中に 2 つの独自の抗原結合部位を導入するヘテロ二量体抗体 IgG 分子の使用は、この構築物の天然免疫グロブリン様構造のために、非常に魅力的である。さらに、この抗体の Fc 部分はエンドサイトーシス・サルベージ経路を媒介する新生児 Fc 受容体 (FcRn) との相互作用に関与し、これは抗体分子の血清半減期が改善されたためであると考えられる [Roopenian D. & Akillesh S. (2007) *Nature Rev Immunol* 7, 715-725]。他方で、抗体ベースの二重特異性分子は、二重特異性抗体の Fc 部分を介して導入される共存エフェクター活性の結果としての強力なサイトカイン応答のため、臨床試験において問題があった [Weiner L. M. ; Alpaugh R. K. et al. (1996) *Cancer Immunol Immunother* 42, 141-150]。これは、二重特異性および免疫複合体分子の設計を手助けし得る新規の足場の必要性を強調している。

【0055】

ヒト血清アルブミン (HSA) タンパク質は、血液の最も豊富な構成成分であって、約 40 mg/ml の濃度で血清中の総タンパク質の 60 % 近くを占めている。アルブミンは、循環系における最長寿タンパク質の 1 つでもあり、半減期は約 19 日である。興味深いことに、抗体分解を防止する FcRn 分子に依存する同じエンドサイトーシス・サルベージ経路は、HSA 分子とも相互作用することが知られている [Chaudhary C. ; Mehnaz S. et al. (2003) *J Exp Med* 197, 315-322]。

【0056】

HSA (図 1 に示されている) は、非グリコシル化 585-残基単一ポリペプチドタンパク質であり、このタンパク質の三次元構造はカーターと共同研究者等により X 線結晶法を用いて最初に観察された [Carter, D. C. & Ho, J. X. (1994) *Adv Prot Chem* 45, 153-203 で概説]。HSA タンパク質は、遺伝子複製に帰因する 3 つの相同ドメイン: DI、DII、DIII からなり、これは他の種の血清アルブミンにも共通の特徴である [Gray J. E. & Doolittle R. F. (1992) *Protein Sci* 1, 289-302]。3 つのドメインの各々は、発現され、別々に特性化され、そして独立して安定であることが示されている [Dockal M., Carter D. C. & Ruker F. (1999) *J Biol Chem* 274, 29303-29310]。各ドメインは 10 のらせんセグメントで構成され、そしてらせん間の統合に基づき各ドメインはさらに、それぞれヘリックス 1-6 および 7-10 からなる 2 つのサブドメインに分類される。HSA は合計 17 のジスルフィド結合を有し、連結を形成するこれらのすべてのシステイン対は個々のドメイン内にある。概して、HSA は、多数のジスルフィド結合ならびに大部分のらせんフォールディングのため、非常に安定である。多数の種に渡るアルブミン分子の配列同一性は非常に大きく、ヒト、ウマ、ウシ、ラット等に由来するアルブミン cDNA の間では 70 % より大きい [Carter, D. C. & Ho, J. X. (1994) *Adv Prot Chem* 45, 153-203]。

【0057】

機能的プロテオミクスの領域におけるタンパク質－タンパク質相互作用を理解するためのセンサーとして、スプリットタンパク質対が用いられている。当該アプローチは、再構成して活性なネイティブ様タンパク質を形成し得る適切なセグメントをタンパク質から同定することを含む。新規のスプリットタンパク質を生成することは技術的に困難である。機能的に有用な方法でスプリットされるべきタンパク質に関して、セグメント化部位は、互いに会合される際に擬似ネイティブタンパク質へと効率的に再構成する2つのセグメントを産生しなければならない。さらに、製造収率および精製が経済的であるよう、構成成分タンパク質セグメントは、溶液中にとどまり相手セグメント（partner segments）と選択的に会合するため十分に可溶性であるべきである。単量体ネイティブタンパク質に類似する擬似ネイティブ構造を形成するために再結合するスプリットタンパク質セグメントを得ることは、非常に困難な課題である [Tafelmeyer P., Johnsson N. & Johnsson K. Chem & Biol 11, 681-689]。このようなスプリットタンパク質は、過去において、タンパク質治療薬の設計において、あるいはカーゴ送達ビヒクルとして、用いられたことはなかった。

10

【0058】

本発明は、（i）第一輸送体ポリペプチドを含む第一単量体；ならびに（ii）第二輸送体ポリペプチドを含む第二単量体を含むヘテロ多量体であって；前記第一および第二輸送体ポリペプチドの各々が、アルブミンポリペプチドのセグメントと少なくとも90%同一性を有するアミノ酸配列を含み；および前記第一および第二輸送体ポリペプチドが、セグメント化部位での前記アルブミンポリペプチドのセグメント化により得られ、前記輸送体ポリペプチドが自己集合して単量体形態の前記アルブミンポリペプチドの擬似ネイティブ構造を形成するヘテロ多量体を提供する。一実施形態では、セグメント化部位は、高度の溶媒接触表面積（solvent accessible surface area：SASA）を有し残りのアルブミン構造との接触が限定されているアルブミンポリペプチドのループ上に存在し、b）輸送体ポリペプチド間に相補的界面を生じる（ここで前記界面は無極性で、広大で、且つ互いに噛み合う）ように選択される。このようなヘテロ多量体は、野生型アルブミンの安定性に匹敵する安定性を示す。第一および第二単量体は、少なくとも1つのカーゴポリペプチドをさらに含み得る。前記の少なくとも1つのカーゴポリペプチドを含むヘテロ多量体は、疾患の処置のための治療薬として用いられ得る。

20

【0059】**定義**

本発明は、本明細書中に記載される特定のプロトコール、細胞株、構築物および試薬に限定されず、このようなものとして変化し得る、と理解されるべきである。本明細書中で用いられる用語は、特定の実施形態を記載するために過ぎず、本発明の範囲を限定するよう意図されず、これは、添付の特許請求の範囲によってのみ限定される、ということも理解されるべきである。

30

【0060】

本明細書中で用いる場合、そして添付の特許請求の範囲において、単数形「1つの（a）」、「1つの（an）」および「その（the）」は、そうでないことが明らかに示されない限り、複数の言及を含む。したがって、例えば「HSA」、「HA」、「アルブミン」、「ヒト血清アルブミン」および種々の大文字の、ハイフンでつないだ、そしてハイフンなしの形態に対する言及は、1つ以上のこのようなタンパク質への言及であり、当業者に既知のその変異体、誘導体、断片、等価物等を含む。

40

【0061】

別記しない限り、本明細書中で用いられる技術用語および科学用語はすべて、本発明が属する当該技術分野の当業者により一般に理解されるものと同じ意味を有する。本明細書中に記載されるものと類似の、または等価の任意の方法、装置および材料が本発明の実行または試験に用いられ得るが、好ましい方法、装置および材料をここに記載する。

【0062】

本明細書中で記述される出版物および特許はすべて、例えば、本明細書中に記載される

50

本発明とともに用いられ得る出版物中に記載される構築物および方法を記載し、開示する目的のために、それらの記載内容が参照により本明細書中で援用される。本明細書中で考察される出版物は、本出願の出願日前に、それらの開示のために提供されるだけである。本発明人等は、以前の発明に基づいて、または任意の他の理由のためにこのような開示に先行するよう授与されない、ということの承認として意図されるべきことは、本明細書中にはない。

【0063】

「ヘテロ多量体」または「ヘテロ多量体ポリペプチド」は、第一輸送体ポリペプチドを含む少なくとも1つの第一単量体および第二輸送体ポリペプチドを含む第二単量体を含む分子であって、第二ポリペプチドが少なくとも1つのアミノ酸残基により第一ポリペプチドとアミノ酸配列が異なる分子である。ヘテロ多量体は、第一および第二輸送体ポリペプチドにより形成される「ヘテロ二量体」を含み得る。ある実施形態では、ヘテロ多量体は、より高次の三次構造、例えば三量体および四量体（これらに限定されない）を形成し得る。いくつかの実施形態では、第一および第二輸送体ポリペプチドのほかに輸送体ポリペプチドが存在する。ある実施形態では、ヘテロ多量体を形成するための輸送体ポリペプチドの集合は、表面積の埋没により駆動される。いくつかの実施形態では、輸送体ポリペプチドは、ヘテロ多量体形成を優先することおよび／またはホモ多量体形成に不利であることによりヘテロ多量体形成を駆動する静電相互作用および／または塩橋相互作用によって、互いに作用する。いくつかの実施形態では、輸送体ポリペプチドは、ヘテロ多量体形成を優先することおよび／またはホモ多量体形成に不利であることにより、互いに作用する。ある実施形態では、輸送体ポリペプチドは共有結合形成により互いに作用する。ある実施形態では、共有結合は、天然に存在するかまたは導入されたシステイン間に形成されヘテロ多量体形成を駆動する。本明細書中に記載されるヘテロ多量体のある実施形態では、単量体間に共有結合は形成されない。いくつかの実施形態では、輸送体ポリペプチドは、ヘテロ多量体形成を優先することおよび／またはホモ多量体形成に不利であることによりヘテロ多量体形成を駆動するパッキング／サイズ相補性／*k n o b s - i n t o - h o l e s*／隆起－空洞型相互作用により、互いに作用する。いくつかの実施形態では、輸送体ポリペプチドは、ヘテロ多量体形成を優先することおよび／またはホモ多量体形成に不利であることによりヘテロ多量体形成を駆動するカチオン・パイ相互作用により、互いに作用する。ある実施形態では、個々の輸送体ポリペプチドは溶液中で単離された単量体として存在し得ない。ある実施形態では、ヘテロ多量体は、単量体と比較して、個々の輸送体ポリペプチドの好ましい状態である。

【0064】

「二重特異性の」という用語は、2つの異なる結合特異性を有する任意の作用物質、例えばヘテロ多量体、単量体、タンパク質、ペプチド、あるいはタンパク質またはペプチド複合体を含むよう意図される。例えば、いくつかの実施形態では、分子は、(a) 細胞表面標的分子および(b) エフェクター細胞の表面のFc受容体と結合するか、相互作用し得る。本明細書中に記載のヘテロ多量体のある実施形態では、異なる結合特異性を有する2つのカーゴ分子を同一輸送体ポリペプチドに取り付けることにより形成される少なくとも1つの単量体が二重特異性である。本明細書中に記載されるヘテロ多量体のある実施形態では、異なる特異性を有する少なくとも2つのカーゴ分子を輸送体ポリペプチドに取り付けることにより形成されるヘテロ多量体は、それ自体二重特異性である。「多重特異性分子」または「ヘテロ特異性分子」という用語は、2つより多い異なる結合特異性を有する任意の作用物質、例えばタンパク質、ペプチド、あるいはタンパク質またはペプチド複合体を含むよう意図される。例えば、分子は、(a) 細胞表面標的分子、例えば細胞表面抗原（これに限定されない）、(b) エフェクター細胞の表面のFc受容体、そして(c) 少なくとも1つのその他の構成成分、と結合するかまたは相互作用し得る。したがって、本明細書中に記載されるヘテロ多量体の実施形態は、二重特異性、三重特異性、四重特異性およびその他の多重特異性分子を含むが、これらに限定されない。ある実施形態では、これらの分子は、CD30などの細胞表面抗原に関するものであり、ならびにその他の

標的、例えばエフェクター細胞上のFc受容体に関する。

【0065】

別記しない限り、「多価の」という表現は、標的分子のための結合の少なくとも2つの部位を含むヘテロ多量体を意味するために、本明細書全体を通して用いられる。多価ヘテロ多量体は、所望の標的のための多数結合部位を有するよう設計される。ある実施形態では、結合部位は、輸送体ポリペプチドと結合される少なくとも1つのカーゴ分子上にある。ある実施形態では、少なくとも1つの結合部位は輸送体ポリペプチド上にある。「二価の」という表現は、2つの標的結合部位を含むヘテロ多量体を意味するために、本明細書全体を通して用いられる。二価ヘテロ多量体のある実施形態では、両結合部位は同一単量体上にある。「三価の」という表現は、3つの標的結合部位を含むヘテロ多量体を意味するために本明細書全体を通して用いられる。「四価の」という表現は、4つの標的結合部位を含むヘテロ多量体を意味するために本明細書全体を通して用いられる。

10

【0066】

「融合タンパク質」およびポリペプチドは、本来は別個のポリペプチドをコードする2つ以上の遺伝子を繋ぐことにより作成される。この融合遺伝子の翻訳は、元のポリペプチドの各々に由来する機能特性を有する単一ポリペプチドを生じる。本明細書中に記載されるヘテロ多量体の実施形態では、少なくとも1つの単量体は、輸送体ポリペプチドのNまたはC末端への少なくとも1つのカーゴポリペプチドの融合により形成される融合タンパク質を含み得る。

【0067】

20

「実質的に精製された」という用語は、その天然環境、すなわちネイティブ細胞、またはある実施形態では組換え的に産生されたヘテロ多量体の場合には宿主細胞、において見出されるような、普通はタンパク質を伴うかまたはタンパク質と相互作用する構成成分を実質的にまたは本質的に有し得ない本明細書中に記載されるヘテロ多量体、またはその変異体を指し、細胞物質を実質的に有さず約30%未満、約25%未満、約20%未満、約15%未満、約10%未満、約5%未満、約4%未満、約3%未満、約2%未満、または約1%未満（乾燥重量で）の夾雑タンパク質を有するタンパク質の調製物を含む本明細書中に記載されるヘテロ多量体、またはその変異体を指す。ヘテロ多量体またはその変異体が宿主細胞により組換え的に産生される場合、タンパク質は、ある実施形態では、細胞の乾燥重量の約30%、約25%、約20%、約15%、約10%、約5%、約4%、約3%、約2%、または約1%またはそれ未満で存在する。ヘテロ多量体またはその変異体が宿主細胞により組換え的に産生される場合、タンパク質は、ある実施形態では、細胞の乾燥重量の約5g/L、約4g/L、約3g/L、約2g/L、約1g/L、約750mg/L、約500mg/L、約250mg/L、約100mg/L、約50mg/L、約10mg/L、または約1mg/Lまたはそれ未満で培地中に存在する。ある実施形態では、本明細書中に記載される方法により産生される「実質的に精製された」ヘテロ多量体は、適切な方法、例えばSDS/PAGE分析、RP-HPLC、SECおよびキャピラリー電気泳動により測定して、少なくとも約30%、少なくとも約35%、少なくとも約40%、少なくとも約45%、少なくとも約50%、少なくとも約55%、少なくとも約60%、少なくとも約65%、少なくとも約70%の純度レベル、厳密には、少なくとも約75%、80%、85%の純度レベル、より厳密には、少なくとも約90%の純度レベル、少なくとも約95%の純度レベル、少なくとも約99%またはそれ以上の純度レベルを有する。

30

40

【0068】

「組換え宿主細胞」または「宿主細胞」は、挿入のために用いられる方法、例えば直接取り込み、形質導入、f-接合、または組換え宿主細胞を作成するために当該技術分野で既知のその他の方法とは関係なく、外来性ポリヌクレオチドを含む細胞を指す。外来性ポリヌクレオチドは、非組込みベクター、例えばプラスミドとして保持されてもよく、または、宿主ゲノム中に組み込まれ得る。

【0069】

50

本明細書中で用いる場合、「培地」または「培地（複数）」という用語は、任意の宿主細胞、例えば細菌宿主細胞、酵母宿主細胞、昆虫宿主細胞、植物宿主細胞、真核生物宿主細胞、哺乳動物宿主細胞、CHO細胞、原核生物宿主細胞、大腸菌またはシュードモナス宿主細胞、および細胞内容物を支持または含有し得る任意の培養媒質、溶液、固体、半固体または剛性支持体を含む。したがって、当該用語は、宿主細胞が増殖された培地、例えばタンパク質が分泌された培地、例えば増殖段階の前または後の培地を包含する。当該用語はまた、本明細書中に記載されるヘテロ多量体が細胞内で産生されかつ宿主細胞が溶解または崩壊されてヘテロ多量体を放出する場合のように、宿主細胞溶解物を含む緩衝液または試薬も包含する。

【0070】

「リフォールディング」は、本明細書中で用いる場合、ジスルフィド結合含有ポリペプチドを不適正にフォールディングされた状態または非フォールディング状態から、ジスルフィド結合に関してネイティブまたは適正にフォールディングされた立体配置へと変換する任意の過程、反応または方法を表す。

【0071】

「コフォールディング」は、本明細書中で用いる場合、具体的には、互いに相互作用する少なくとも2つの単量体ポリペプチドを用い、非フォールディングまたは不適正にフォールディングされたポリペプチドをネイティブな、適正にフォールディングされたポリペプチドへと変換させるリフォールディング過程、反応または方法を指す。

【0072】

本明細書中で用いる場合、「調整された血清半減期」という用語は、本明細書中に記載されるヘテロ多量体により含まれるカーゴポリペプチドの、そのネイティブ形態と比較した場合の、循環半減期における正のまたは負の変化を意味する。血清半減期は、ヘテロ多量体の投与後、いくつかの時点で血液試料を採取し、各試料中のその分子の濃度を決定することにより測定される。血清濃度と時間の相関は、血清半減期の算定を可能にする。増大された血清半減期は望ましくは少なくとも約2倍であるが、例えば十分な用量投与レジメンを可能にするか毒性作用を回避する場合は、より小さな増大が有用であり得る。いくつかの実施形態では、増大は、少なくとも約3倍、少なくとも約5倍、または少なくとも約10倍である。

【0073】

「調整された治療的半減期」という用語は、本明細書中で用いる場合、本明細書中に記載されるヘテロ多量体により含まれる治療的有効量のカーゴポリペプチドの、その非修飾化形態と比較した場合の、半減期における正のまたは負の変化を意味する。治療的半減期は、投与後のいくつかの時点で、分子の薬物動態および／または薬力学的特性を測定することにより測定される。増大された治療的半減期は望ましくは、特定の有益な用量投与レジメン、特定の有益な総用量を可能にし、あるいは望ましくない作用を回避する。いくつかの実施形態では、増大された治療的半減期は、効力増大、修飾された分子とその標的との結合の増大または減少、プロテアーゼなどの酵素による分子の分解の増大または減少、あるいは別のパラメーターまたは非修飾化分子の作用機序における増大または減少あるいは分子の受容体媒介性クリアランスの増大または減少に起因する。

【0074】

「単離された」という用語は、核酸またはタンパク質に適用される場合、核酸またはタンパク質が、天然状態でそれと会合する細胞構成成分のうちの少なくともいくつかを有さないことを意味し、あるいは核酸またはタンパク質がその *in vivo* または *in vitro* 産生の濃度より高いレベルに濃縮されていることを意味する。それは均質状態であり得る。単離された物質は、乾燥または半乾燥状態であってよく、あるいは溶液、例えば水溶液（これに限定されない）中に存在し得る。それは追加の薬学的に許容可能な担体および／または賦形剤を含む薬学的組成物の構成成分であり得る。純度または均質度は、典型的にはポリアクリルアミドゲル電気泳動または高速液体クロマトグラフィーなどの分析化学技法を用いて決定される。調製物中に存在する優勢種であるタンパク質は、実質的に

10

20

30

40

50

精製される。特に、単離された遺伝子は、遺伝子に隣接しおよび当該遺伝子以外のタンパク質をコードするオープンリーディングフレームから分離される。「精製された」という用語は、核酸またはタンパク質が電気泳動ゲルにおいて実質的に1つのバンドを生じることを意味する。特に、それは、核酸またはタンパク質が、少なくとも85%純粋、少なくとも90%純粋、少なくとも95%純粋、少なくとも99%またはそれ以上純粋であることを意味する。

【0075】

「核酸」という用語は、一本鎖または二本鎖形態のデオキシリボヌクレオチド、デオキシリボヌクレオシド、リボヌクレオシドまたはリボヌクレオチドならびにそのポリマーを指す。具体的に限定しない限り、当該用語は、参照核酸と類似の結合特性を有し天然ヌクレオチドと同様に代謝される天然ヌクレオチドの既知の類似体、を含有する核酸を包含する。具体的に限定しない限り、当該用語はまた、PNA（ペプチド核酸）、アンチセンス技術に用いられるDNAの類似体（ホスホロチオエート、ホスホロアミデート等）を含むオリゴヌクレオチド類似体も指す。別記しない限り、特定の核酸配列はまた、保存的に修飾されたそれらの変異体（例えば、縮重コドン置換（これに限定されない））および相補配列ならびに明白に示される配列も無条件に包含する。具体的には、縮重コドン置換は、1つ以上の選択（またはすべての）コドンの第三位置が混合塩基および／またはデオキシイノシン残基で置換された配列を生成することにより達成され得る（Batzner et al., Nucleic Acid Res. 19:5081 (1991); Ohtsuka et al., J. Biol. Chem. 260:2605-2608 (1985); Rossolini et al., Mol. Cell. Probes 8:91-98 (1994)）。

【0076】

「ポリペプチド」、「ペプチド」および「タンパク質」という用語は、アミノ酸残基のポリマーを指すために本明細書中で互換的に用いられる。すなわち、ポリペプチドに向けられる記述は、ペプチドの記述およびタンパク質の記述に等しく当てはまり、その逆も言える。当該用語は、天然アミノ酸ポリマー、ならびに1つ以上のアミノ酸残基が非天然コード化アミノ酸であるアミノ酸ポリマーに適用する。本明細書中で用いる場合、当該用語は、全長タンパク質を包む任意の長さのアミノ酸鎖を包含し、アミノ酸残基は共有ペプチド結合により連結される。

【0077】

「アミノ酸」という用語は、天然および非天然アミノ酸、ならびに天然アミノ酸と同様の方式で機能するアミノ酸類似体およびアミノ酸模倣物を指す。天然にコードされたアミノ酸は、20の一般的なアミノ酸（アラニン、アルギニン、アスパラギン、アスパラギン酸、システイン、グルタミン、グルタミン酸、グリシン、ヒスチジン、イソロイシン、ロイシン、リシン、メチオニン、フェニルアラニン、プロリン、セリン、トレオニン、トリプトファン、チロシンおよびバリン）、ならびにピロリシンおよびセレノシステインである。アミノ酸類似体は、天然アミノ酸と同一の基本的な化学構造を有する化合物を指し、すなわち、水素、カルボキシル基、アミノ基およびR基と結合される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などである。このような類似体は、修飾化R基（例えば、ノルロイシン）または修飾化ペプチド主鎖を有するが、天然アミノ酸と同一の基本的な化学構造を保持する。アミノ酸への言及は、例えば、天然タンパク質原性L-アミノ酸；D-アミノ酸、化学修飾化アミノ酸、例えばアミノ酸変異体および誘導體；天然非タンパク質原性アミノ酸、例えばβ-アラニン、オルニチン等；ならびにアミノ酸に特徴的であることが当該技術分野で既知の特性を有する化学合成化合物、を包含する。非天然アミノ酸の例としては、α-メチルアミノ酸（例えば、α-メチルアラニン）、D-アミノ酸、ヒスチジン様アミノ酸（例えば、2-アミノ-ヒスチジン、β-ヒドロキシ-ヒスチジン、ホモヒスチジン）、側鎖中に余分のメチレンを有するアミノ酸（「ホモ」アミノ酸）、ならびに側鎖中のカルボン酸官能基がスルホン酸基に置換されるアミノ酸（例えば、システイン酸）が挙げられるが

、これらに限定されない。合成非ネイティブアミノ酸、置換アミノ酸または1つ以上のD-アミノ酸を含む非天然アミノ酸を本発明のタンパク質中に組み入れることは、多数の異なる意味で有益であり得る。D-アミノ酸含有ペプチド等は、L-アミノ酸含有同等物と比較して、*in vitro*または*in vivo*での安定性増大を示す。したがって、D-アミノ酸を組み入れるペプチドなどの構築は、より大きな細胞内安定性が所望されるかまたは必要とされる場合、特に有用であり得る。さらに具体的には、D-ペプチド等は、内因性ペプチダーゼおよびプロテアーゼに抵抗性であり、それにより、分子の生物学的利用能改善、ならびに*in vivo*での寿命延長が望ましい場合そのような特性を提供する。さらに、D-ペプチド等は、Tヘルパー細胞に対する主要組織適合複合体クラスII制限提示のために効率的にプロセッシングされ得ず、したがって、生物体全体における体液性免疫応答を誘導しにくい。

10

【0078】

アミノ酸は、それらの一般的に既知の3文字記号により、またはIUPAC-IUB Biochemical Nomenclature Commissionに推奨される1文字記号により、本明細書中で言及され得る。同様にヌクレオチドは、一般に認められている1文字暗号により言及され得る。

【0079】

「保存的修飾変異体」は、アミノ酸および核酸配列の両方に当てはまる。特定の核酸配列に関して、「保存的修飾変異体」は、同一の、または本質的に同一のアミノ酸配列をコードする核酸を指し、あるいは核酸がアミノ酸配列をコードしない場合、本質的に同一の配列を指す。遺伝暗号の縮重のため、多数の機能的に同一の核酸が任意の指定タンパク質をコードする。例えば、コドンGCA、GCC、GCGおよびGCUはすべて、アミノ酸アラニンをコードする。したがって、アラニンがコドンにより特定されるすべての位置で、コドンは、コード化ポリペプチドを変更することなく表される対応コドンのいずれかに変更され得る。このような核酸変異は、「サイレント変異」であって、これは、保存的修飾変異の一種である。ポリペプチドをコードする本明細書中のすべての核酸配列はまた、核酸のすべての考え得るサイレント変異を表す。核酸における各コドン（ただし、AUGは、普通はメチオニンに関する唯一のコドンであり、TGGは、普通はトリプトファンに関する唯一のコドンである）は修飾されて、機能的に同一の分子を産生し得る、と当業者は理解する。したがって、ポリペプチドをコードする核酸の各サイレント変異は各記載配列に潜在する。

20

30

【0080】

アミノ酸配列に関しては、コード化配列中の単一アミノ酸または小部分のアミノ酸を変更、付加または欠失する核酸、ペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質配列に対する個々の置換、欠失または付加は、「保存的修飾変異体」であって、ここで変更によりアミノ酸の欠失、アミノ酸の付加、または化学的に類似のアミノ酸によるアミノ酸の置換を生じる、と当業者は理解する。機能的に類似のアミノ酸を提供する保存的置換表は、当業者に既知である。このような保存的修飾変異体は、本発明の多形変異体、種間相同体および対立遺伝子のほかに存在し、それらを排除しない。

【0081】

機能的に類似のアミノ酸を提供する保存的置換表は、当業者に既知である。以下の8群は、各々、互いに関して保存的置換であるアミノ酸を含有する：

- 1) アラニン (A)、グリシン (G)；
- 2) アスパラギン酸 (D)、グルタミン酸 (E)；
- 3) アスパラギン (N)、グルタミン (Q)；
- 4) アルギニン (R)、リシン (K)；
- 5) イソロイシン (I)、ロイシン (L)、メチオニン (M)、バリン (V)；
- 6) フェニルアラニン (F)、チロシン (Y)、トリプトファン (W)；
- 7) セリン (S)、トレオニン (T)；および
- 8) システイン (C)、メチオニン (M)

40

50

(例えば、Creighton, Proteins: Structures and Molecular Properties (W H Freeman & Co. ; 2nd edition (December 1993 参照))。

【0082】

「同一の」または「同一性」パーセントという用語は、2つ以上の核酸またはポリペプチド配列の状況では、同一である2つ以上の配列または亜配列を指す。配列が比較され、および比較ウィンドウ全体、または指定領域での最大対応のために整列される際に以下の配列比較アルゴリズム（または当業者に利用可能な他のアルゴリズム）のうちの1つを用いて、または手動整列および目視検査により測定されるように、配列は、それらが、同一であるアミノ酸残基またはヌクレオチドのパーセンテージ（すなわち、特定領域に亘って約50%同一性、約55%同一性、60%同一性、約65%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%または約95%同一性）を有すると、「実質的に同一」である。この定義はまた、試験配列の相補体も指す。同一性は、少なくとも約50アミノ酸または75~100アミノ酸またはヌクレオチド長である領域全体に、あるいは特定されない場合、ポリヌクレオチドまたはポリペプチドの全配列を通して存在し得る。本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、ヒト以外の種からのホモログを含み、本発明のポリヌクレオチド配列またはその断片を有する標識化プローブを用いる厳しいハイブリダイゼーション条件下でのライブラリーをスクリーニングするステップ、ならびに全長cDNAおよび前記ポリヌクレオチド配列を含有するゲノムクローンを単離するステップを包含する工程により獲得され得る。このようなハイブリダイゼーション技法は、当業者に周知である。

【0083】

配列比較のために、典型的には1つの配列が参照配列としての役割を果たし、これに対し試験配列が比較される。配列比較アルゴリズムを用いる場合、試験配列および参照配列はコンピューターに入力され、必要であればサブ配列配置が指定され、および配列アルゴリズムプログラムパラメーターが指定される。デフォルトプログラムパラメーターが用いられてもよく、あるいは他のパラメーターが設計され得る。次いで、配列比較アルゴリズムは、プログラムパラメーターに基づいて、参照配列と比較した試験配列に関する配列同一性パーセントを算定する。

【0084】

「比較ウィンドウ」は、本明細書中で用いる場合、20~600、通常は約50~約200、より通常は約100~約150からなる群から選択される連続位置の数のうちのいずれか1つのセグメントに対する言及を含み、ここで2つの配列が最適に整列された後にある配列が同数の連続位置の参照配列と比較され得る。比較のための配列の整列方法は当業者に既知である。比較のための配列の最適アラインメントは、例えば、Smith and Waterman (1970) Adv. Appl. Math. 2:482cの局所的相同アルゴリズムにより、Needleman and Wunsch (1970) J. Mol. Biol. 48:443の相同アラインメントアルゴリズムにより、Pearson and Lipman (1988) Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85:2444の類似性に関する検索により、これらのアルゴリズムのコンピューター処理履行により (Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis. におけるGAP、BESTFIT、FASTAおよびTFASTA)、あるいは手動アラインメントおよび目視検査により (例えば、Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology (1995 supplement) 参照)) 実行され得るが、これらに限定されない。

【0085】

配列同一性および配列類似性パーセントを決定するのに適したアルゴリズムの一例は、BLASTおよびBLAST 2.0アルゴリズムであり、これらは、それぞれ、Alt

schul et al. (1997) Nuc. Acids Res. 25:3389-3402およびAltschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410に記載されている。BLAST分析を実施するためのソフトウェアは、ワールド・ワイド・ウェブ上のncbi.nlm.nih.gov.で利用可能な国立バイオテクノロジー情報センターを通して公的に入手可能である。BLASTアルゴリズムパラメーター W、TおよびXは、アラインメントの感度および速度を決定する。BLASTNプログラム（ヌクレオチド配列に関する）は、デフォルトとして、ワード長（W） 11、期待値（E） 10、M=5、N=-4および両鎖の比較を用いる。アミノ酸配列に関しては、BLASTPプログラムは、デフォルトとして、ワード長 3および期待値（E） 10、およびBLOSUM62スコアリングマトリクス（Henikoff and Henikoff (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915参照）アラインメント（B） 50、期待値（E） 10、M=5、N=-4および両鎖の比較を用いる。BLASTアルゴリズムは、典型的には、「低複雑度」フィルターを遮断して実施される。

【0086】

BLASTアルゴリズムはまた、2つの配列間の類似性の統計学的分析も実施する（例えば、Karlin and Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5787参照）。BLASTアルゴリズムにより提供される類似性の一測定は、最小和確率（P（N））であり、これは2つのヌクレオチド配列またはアミノ酸配列間の一致が偶然起きる確率の指標を提供する。例えば、ある核酸は、参照核酸に対する試験核酸の比較における最小和確率が約0.2未満、または約0.01未満、または約0.001未満である場合、参照配列と類似しているとみなされる。

【0087】

「～と選択的に（または特異的に）ハイブリダイズする」という語句は、特定のヌクレオチド配列が複合混合物（例えば総細胞またはライブラリーDNAまたはRNA）中に存在する場合、厳しいハイブリダイゼーション条件下でそのヌクレオチド配列だけに分子が結合し、二重化し、またはハイブリダイズすることを指す。

【0088】

「厳しいハイブリダイゼーション条件」という語句は、当該技術分野で既知であるように、低イオン強度および高温の条件下での、DNA、RNAまたはその他の核酸、あるいはその組合せの配列のハイブリダイゼーションを指す。典型的には、厳しい条件下では、プローブは、核酸の複合混合物（例えば、総細胞またはライブラリーDNAまたはRNA）中のその標的配列とハイブリダイズするが、複合混合物中の他の配列とはハイブリダイズしない。厳しい条件は配列依存性であり、異なる環境では異なる。配列が長いほど、より高い温度で特異的にハイブリダイズする。核酸のハイブリダイゼーションに対する広範な指針は、Tijssen, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology—Hybridization with Nucleic Probes, “Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid assays” (1993)に見出される。

【0089】

本明細書中で用いる場合、「真核生物」という用語は、系統学的ドメインの真核生物に属する生物体、例えば動物（例えば、哺乳動物、昆虫、爬虫類、鳥类等（これらに限定されない））、絨毛虫類、植物（例えば、単子葉類、双子葉類、藻类等（これらに限定されない））、真菌、酵母、鞭毛虫類、微孢子虫類、原生動物等を指す。

【0090】

本明細書中で用いる場合、「原核生物」という用語は、原核生物体を指す。例えば、非真核生物体は、真正細菌（例えば、大腸菌、高度高熱菌、バシルス・ステアロサーモフィ

ルス、蛍光菌、緑膿菌、シュードモナス・プチダ等（これらに限定されない））系統学的ドメイン、または古細菌（例えば、メタン細菌（メタノコッカス・ヤナシイ）、メタン生成菌（メタノバクテリウム・サーモオートフィクム）、ハロバクテリウム属、例えばハロフェラックス・ヴォルカニイおよびハロバクテリウム種NRC-1、アーケオグロブス・フルギズス、ピロコッカス・フリオズス、ピロコッカス・ホリコシ、エウロピエム・ペルニックス等（これらに限定されない））系統学的ドメインに属し得る。

【0091】

「被験体」という用語は本明細書中で用いる場合、動物を指し、いくつかの実施形態では哺乳動物を指し、および他の実施形態ではヒトを指し、処置、観察または実験の対象である。動物は、伴侶動物（例えば、イヌ、ネコ等）、農場動物（例えば、ウシ、ヒツジ、ブタ、ウマ等）または実験室動物（例えば、ラット、マウス、モルモット等）であり得る。

10

【0092】

「有効量」という用語は、本明細書中で用いる場合、投与されているヘテロ多量体の量を指し、これは、処置されている疾患、症状または障害の徴候のうちの1つ以上をある程度まで軽減する。本明細書中に記載されるヘテロ多量体を含有する組成物は、予防的、増強的および／または治療的処置のために投与され得る。

【0093】

「増強する」または「増強すること」という用語は、所望の作用の効力または持続期間を増強するかまたは延長することを意味する。したがって、治療薬の作用を増強することに関しては、「増強する」という用語は、系に及ぼす他の治療薬の作用を、効力または持続時間において、増大するかまたは延長する能力を指す。「増強する有効量」は本明細書中で用いる場合、所望の系における別の治療薬の作用を増強するのに適切な量を指す。患者に用いる場合、この使用のために有効な量は、疾患、障害または症状の重症度および経過、以前の療法、患者の健康状態および薬剤に対する応答、ならびに処置医の判断によって決まる。

20

【0094】

「修飾された」という用語は、本明細書中で用いる場合、所定のポリペプチドに対してなされる任意の変化、例えばポリペプチドの長さ、アミノ酸配列、化学構造、ポリペプチドの同時翻訳修飾、または翻訳後修飾に対する変化を指す。「(修飾された)」形態という用語は、検討されているポリペプチドが任意に修飾されることを意味し、すなわち、検討中のポリペプチドは修飾されてもよくあるいは非修飾であってもよい。

30

【0095】

「翻訳後に修飾された」という用語は、天然または非天然アミノ酸の任意の修飾を指し、それがポリペプチド鎖中に組み入れられた後にそのようなアミノ酸に対して起こる。当該用語は、単なる例として、同時翻訳的 *in vivo* 修飾、同時翻訳的 *in vitro* 修飾（例えば、無細胞翻訳系における）、翻訳後 *in vivo* 修飾、および翻訳後 *in vitro* 修飾を包含する。

【0096】

「セグメント化」という用語は元のタンパク質配列の精確な内部継ぎ合わせを指し、これによりヘテロ多量体として優先的に会合して擬似ネイティブタンパク質構造を形成するタンパク質配列の「セグメント」を生じる。あるいは、セグメント化は、1つより多いアミノ酸残基の欠失を包含する。一実施形態では、欠失は1つのアミノ酸残基である。別の実施形態では、欠失は2つのアミノ酸残基である。別の実施形態では、欠失は3つのアミノ酸残基である。

40

【0097】

擬似ネイティブ単量体構造

単量体ネイティブタンパク質またはその構造に関連して、擬似ネイティブタンパク質および／または「擬似ネイティブ構造」または擬似ネイティブ単量体構造は、単量体ネイティブタンパク質のセグメント由来のポリペプチドのヘテロ多量体集合体であり、したがっ

50

て前記ヘテロ多量体集合体は単量体ネイティブタンパク質に匹敵する機能および構造特質を提示する。いくつかの実施形態では、セグメントは、他の分子実体も含むポリペプチド構築物の構成成分である。例えばX線結晶学により得られた一つの構造をタンパク質のネイティブ構造とみなしているが、タンパク質は天然には動的分子であり構造的立体配置の集合を示。擬似ネイティブ構造は、集合体における代替的な構造的立体配置のひとつに似ているとみなされ得る。異なる面では、相同タンパク質配列または共通の構造ファミリーに属するタンパク質は、同様の構造幾何学外形に折りたたまれる傾向がある。このファミリーに属する成員タンパク質は、互いに関して擬似ネイティブ構造を達成すると考えられる。タンパク質ファミリーにおける独特の配列のいくつかはまた、類似の機能的属性を示し、それゆえ互いに関して擬似ネイティブタンパク質として言及され得る。その各々が輸送体ポリペプチド構成成分を有する2つ以上のタンパク質構築物からなるここで記載されるヘテロ多量体の場合、輸送体ポリペプチドは集合して、輸送体ポリペプチドが由来するタンパク質のネイティブ単量体形態のタンパク質と類似の擬似ネイティブ構造を形成する。この場合の参照ネイティブタンパク質は各輸送体ポリペプチドが由来する単量体タンパク質であり、参照ネイティブ構造は輸送体ポリペプチドが由来するタンパク質の構造である。2つ以上の異なるポリペプチドが自己集合して、それ自体は単量体であるネイティブタンパク質に匹敵する構造的および機能的特質を有するヘテロ二量体を形成する場合を記載する。いくつかの実施形態では、集合ヘテロ多量体は、単量体ネイティブタンパク質の活性の少なくとも50%を有する。いくつかの実施形態では、集合ヘテロ多量体は、単量体ネイティブタンパク質の活性の少なくとも60%を有する。具体的実施形態では、集合ヘテロ多量体は、単量体ネイティブタンパク質の活性の少なくとも75%を有する。いくつかの実施形態では、集合ヘテロ多量体は、単量体ネイティブタンパク質の活性の少なくとも80%を有する。特定の実施形態では、集合ヘテロ多量体は、単量体ネイティブタンパク質の活性の少なくとも90%を有する。いくつかの実施形態では、集合ヘテロ多量体は、単量体ネイティブタンパク質の活性の少なくとも95%を有する。いくつかの実施形態では、集合ヘテロ多量体は、単量体ネイティブタンパク質の活性の少なくとも99%を有する。ある実施形態では、自己集合してネイティブアルブミン様構造特質および／またはFcRn、SPARCおよび／またはgp60結合などの機能特質を示すヘテロ多量体を形成するように、アルブミンまたはアロアルブミン由来の輸送体ポリペプチドを含むヘテロ多量体が提供される。ある実施形態では、輸送体ポリペプチドを含むヘテロ多量体であって、各輸送体ポリペプチドがネイティブ単量体タンパク質から得られるアミノ酸セグメントと少なくとも75%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、ヘテロ多量体が提供される。いくつかの実施形態では、輸送体ポリペプチドを含むヘテロ多量体であって、各輸送体ポリペプチドがネイティブ単量体タンパク質から得られるアミノ酸セグメントと少なくとも80%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、ヘテロ多量体が提供される。例示的実施形態では、輸送体ポリペプチドを含むヘテロ多量体であって、各輸送体ポリペプチドがネイティブ単量体タンパク質から得られるアミノ酸セグメントと少なくとも85%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、ヘテロ多量体が提供される。具体的実施形態では、輸送体ポリペプチドを含むヘテロ多量体であって、各輸送体ポリペプチドがネイティブ単量体タンパク質から得られるアミノ酸セグメントと少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、ヘテロ多量体が提供される。ある実施形態では、輸送体ポリペプチドを含むヘテロ多量体であって、各輸送体ポリペプチドがネイティブ単量体タンパク質から得られるアミノ酸セグメントと少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、ヘテロ多量体が提供される。いくつかの実施形態では、輸送体ポリペプチドを含むヘテロ多量体であって、各輸送体ポリペプチドがネイティブ単量体タンパク質から得られるアミノ酸セグメントと少なくとも99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、ヘテロ多量体が提供される。いくつかの実施形態では、ネイティブ単量体タンパク質は、哺乳動物アルブミンあるいはその誘導体または類似体である。ある実施形態では、ネイティブ単量体タンパク質はヒト血清アルブミンである。ある実施形態では、自己集合してネイティブトランスフェリン様構造および機能特質を示すヘテロ多量体を形成す

10

20

30

40

50

る、トランスフェリン由来のポリペプチドセグメントが提示される。ある実施形態では、自己集合してアネキシン様構造および機能特質を示すヘテロ多量体を形成する、アネキシン由来のポリペプチドセグメントが提示される。これらのヘテロ多量体は擬似ネイティブであると言及される。

【0098】

輸送体ポリペプチド

本明細書中で用いる場合、「輸送体ポリペプチド」または「輸送体ポリペプチド」または「輸送体ペプチド」または「輸送体」という用語は、前記輸送体ポリペプチドが溶液中で他のこのような輸送体ポリペプチドをとヘテロ多量体タンパク質を形成できるようなポリペプチドであって、前記ヘテロ多量体タンパク質が、少なくとも1つの輸送体ポリペプチドが由来する単量体タンパク質の擬似ネイティブ構造を有するような、ポリペプチドを指す。本明細書中に記載されるヘテロ多量体のある実施形態では、すべての輸送体ポリペプチドは同一アルブミンまたはアロアルブミンに由来する。ある他の実施形態では、ヘテロ多量体は、種々のアルブミンおよびアロアルブミンタンパク質由来の輸送体ポリペプチドにより形成される。本明細書中に記載されるヘテロ多量体のある実施形態では、輸送体ポリペプチドはトランスフェリンに由来する。本明細書中に記載されるヘテロ多量体のある実施形態では、すべての輸送体ポリペプチドはアネキシタンパク質に由来する。ある実施形態では、ヘテロ多量体は、同一アネキシタンパク質に由来する輸送体ポリペプチドにより形成される。いくつかの実施形態では、ヘテロ多量体は、異なるアネキシタンパク質に由来する輸送体ポリペプチドにより形成される。一実施形態では、ヘテロ多量体はアネキシンA2由来の輸送体ポリペプチドにより形成される。

【0099】

ある実施形態では、輸送体ポリペプチドは単量体全タンパク質のセグメントであって、この場合、前記セグメントはヘテロ多量体を形成するために集合し、したがって前記ヘテロ多量体はネイティブ単量体全タンパク質と類似の擬似ネイティブ構造を形成する。一実施形態では、輸送体ポリペプチドはベータ・バレルタンパク質からのセグメントである。ある実施形態では、集合してネイティブ単量体タンパク質と類似の擬似ネイティブ構造を形成する輸送体ポリペプチドを含むヘテロ多量体であって、各輸送体ポリペプチドがネイティブ単量体タンパク質のセグメントと少なくとも50%の同一性を有するアミノ酸配列を含む、ヘテロ多量体が提供される。ある実施形態では、集合してネイティブ単量体タンパク質と類似の擬似ネイティブ構造を形成する輸送体ポリペプチドを含むヘテロ多量体であって、各輸送体ポリペプチドがネイティブ単量体タンパク質のセグメントと少なくとも60%の同一性を有するアミノ酸配列を含む、ヘテロ多量体が提供される。ある実施形態では、集合してネイティブ単量体タンパク質と類似の擬似ネイティブ構造を形成する輸送体ポリペプチドを含むヘテロ多量体であって、各輸送体ポリペプチドがネイティブ単量体タンパク質のセグメントと少なくとも75%の同一性を有するアミノ酸配列を含む、ヘテロ多量体が提供される。ある実施形態では、集合してネイティブ単量体タンパク質と類似の擬似ネイティブ構造を形成する輸送体ポリペプチドを含むヘテロ多量体であって、各輸送体ポリペプチドがネイティブ単量体タンパク質のセグメントと少なくとも80%の同一性を有する、アミノ酸配列を含むヘテロ多量体が提供される。ある実施形態では、集合してネイティブ単量体タンパク質と類似の擬似ネイティブ構造を形成する輸送体ポリペプチドを含むヘテロ多量体であって、各輸送体ポリペプチドがネイティブ単量体タンパク質のセグメントと少なくとも90%の同一性を有するアミノ酸配列を含む、ヘテロ多量体が提供される。ある実施形態では、集合してネイティブ単量体タンパク質と類似の擬似ネイティブ構造を形成する輸送体ポリペプチドを含むヘテロ多量体であって、各輸送体ポリペプチドがネイティブ単量体タンパク質のセグメントと少なくとも95%の同一性を有するアミノ酸配列を含む、ヘテロ多量体が提供される。ある実施形態では、集合してネイティブ単量体タンパク質と類似の擬似ネイティブ構造を形成する輸送体ポリペプチドを含むヘテロ多量体であって、各輸送体ポリペプチドがネイティブ単量体タンパク質のセグメントと少なくとも99%の同一性を有するアミノ酸配列を含む、ヘテロ多量体が提供される。い

くつかの実施形態では、ネイティブ単量体タンパク質は β -プロペラタンパク質である。いくつかの実施形態では、ネイティブ単量体タンパク質は、ヘリックスバンドルタンパク質である。実施形態において、輸送体ポリペプチドは、例えば、亜鉛フィンガーモチーフ、ヘリックス・ターン・ヘリックスモチーフまたはベータ・ヘアピンモチーフを含むタンパク質（これらに限定されない）から生成される。いくつかの実施形態では、輸送体ポリペプチドは、構造的に安定でありかつ好ましい生物学的特性を有する非免疫原性タンパク質から得られるセグメントを含む。

【0100】

輸送体ポリペプチドは、セグメント化部位でのタンパク質のセグメント化によるタンパク質に由来する。セグメント化部位は、以下の2つの決定基準に基づいて設計される。

10

【0101】

第一に、セグメント化部位が、相対的SASAが高くかつ残りのタンパク質構造との接触が限定されているタンパク質内のループ上に存在するよう、セグメント化部位は選択される。一実施形態では、セグメント化部位は、柔軟で且つ接近可能であるループ中に存在する。別の実施形態では、セグメント化部位は、タンパク質コア安定性にあまり寄与せず、したがって無傷タンパク質構造と比べ集合擬似ネイティブタンパク質構造の安定性にあまり影響を与えないループ中に存在する。

【0102】

第二に、セグメント化部位により輸送体ポリペプチド間に相補的界面を生じる（この場合、前記界面は無極性で、広大で、且つ互いに噛み合う）よう、セグメント化部位は選択される。界面の無極性は界面における無極性アミノ酸の数に関連する。当該技術分野で既知であるように、アミノ酸は極性および無極性残基として大きく分類され得る。極性残基は溶媒環境中で水と好都合に相互作用するが、一方タンパク質中の無極性残基は水とはエネルギー的に有利に接触しない。この理由により、タンパク質中の無極性残基は他の無極性残基とクラスター化してそれらの局所的環境から水分子を排除する傾向があり、このことがエネルギー的に好ましい。無極性残基が関与するこのような相互作用は、疎水的接触としても言及される。

20

【0103】

界面での埋没した表面積は、分子の損失、または相互作用する2つのポリペプチドの非会合と会合状態との間の溶媒接触表面に由来する。一実施形態では、界面埋没面積は約6000 $\text{\AA}^2$ ~ 約2000 $\text{\AA}^2$ である。別の実施形態では、界面埋没面積は約4000 $\text{\AA}^2$ ~ 2000 $\text{\AA}^2$ である。別の実施形態では、界面埋没面積は約3000 $\text{\AA}^2$ ~ 2000 $\text{\AA}^2$ である。一実施形態では、界面埋没面積に対する無極性の寄与は、界面での正味埋没表面積の50%より大きい。

30

【0104】

界面およびその嵌合に関して、任意のタンパク質-タンパク質相互作用および複合体形成を駆動する重要な因子は、2つの接触タンパク質間に形成される界面での表面残基の接触である。会合形態での2つの接触タンパク質表面の物理化学的および構造的相補性は、好ましい且つ安定な複合体形成の顕著な特徴である。物理化学的相補性は好ましい相互作用により定義され、水素結合、電荷ベースの塩橋、種々の型の静電相互作用、相互作用するタンパク質表面に渡る疎水性およびファンデルワールス接触を含み得る。三次元レベルでのタンパク質表面は、表面領域を構成する種々のアミノ酸のサイズおよび配向における差異のために形成される隆起および空洞により決定される。好ましいタンパク質-タンパク質界面において、2つのタンパク質表面からの隆起および空洞は、嵌合して構造的相補性を生じる。相互作用タンパク質間の界面がより大きく、より広範であるほど、タンパク質-タンパク質接触はより安定する可能性がある。

40

【0105】

一実施形態では、2つの輸送体ポリペプチド間の界面は、ホットスポット残基、すなわち、良好に連結された相互作用のネットワークに関与する個々の残基または残基の群、が豊富である。相互作用は、タンパク質において観察される典型的な相互作用、例えば水素

50

結合、塩橋などの荷電残基相互作用、ファンデルワールス接触（強力な構造的相補性および疎水性残基クラスターを示す）を基礎にし得る。これは、界面安定性を最大にし、複合体が解離するのを防止する。

【0106】

一実施形態では、セグメント化部位はタンパク質中に存在する天然ジスルフィド結合を保持するために選択され、そこから2つのセグメントがセグメント化部分を越えて共有結合するように輸送体ポリペプチドが得られる。それは、セグメント化後に2つの得られたセグメントから自己集合するヘテロ多量体化擬似ネイティブタンパク質様構造の安定性をさらに増大することを意図する。この実施形態では、ここに記載されるジスルフィド判定基準、すなわちループ領域中のセグメント化部位に非常に近いジスルフィドを有すること、を満たす、タンパク質配列中のループ領域が選択される。2つの鎖を共有結合的に架橋する機能のほかに、このジスルフィドはまたループを開くための代用物としても役立ち得る。

10

【0107】

別の実施形態では、2つのセグメントを横断するジスルフィド結合は、2つの得られた各々のセグメント上の選択された位置で個々のアミノ酸にシステイン突然変異を導入することにより、改変される。

【0108】

別の実施形態では、2つのセグメントの界面でのアミノ酸を改変して界面でのホットスポットをさらに増大するかまたは改善しあるいは集合擬似ネイティブアルブミン構造における2つのセグメント間の構造的および物理化学的相補性を増強する。

20

【0109】

アルブミン

本明細書中で用いる場合、「アルブミン」は、集合的に、アルブミンの1つ以上の機能的活性（例えば、生物学的活性）を有するアルブミンタンパク質またはアミノ酸配列、あるいはアルブミンセグメントまたは変異体を指す。特に、「アルブミン」は、ヒトアルブミンまたはそのセグメント（例えば、EP 201239、EP 322094、WO 97/24445、WO 95/23857参照）、特に、図1に示したような成熟形態のヒトアルブミン、あるいは他の脊椎動物からのアルブミンまたはそのセグメント、あるいはこれらの分子の類似体または変異体、またはその断片を指す。ある実施形態では、アルブミンはアルブミンの切断化バージョンを指す。

30

【0110】

「擬似ネイティブアルブミン」という用語は、全アルブミンと同様の構造および／または機能を有するヘテロ多量体分子を指し、前記ヘテロ多量体分子は、全アルブミンの配列を基礎にして設計される2つ以上の単量体ポリペプチドの集合により形成される。ある実施形態では、本明細書の当該ポリペプチドは、ヘテロ多量体対として優先的に会合して擬似ネイティブタンパク質を形成する「セグメント」である。いくつかの実施形態では、擬似ネイティブタンパク質は擬似ネイティブアルブミンである。いくつかの実施形態では、擬似ネイティブアルブミンは全アルブミンの活性の90%を有する。いくつかの実施形態では、擬似ネイティブアルブミンは全アルブミンの活性の75%を有する。一実施形態では、擬似ネイティブアルブミンは全アルブミンの活性の50%を有する。いくつかの実施形態では、擬似ネイティブアルブミンは全アルブミンの活性の50~75%を有する。一実施形態では、擬似ネイティブアルブミンは全アルブミンの活性の80%を有する。いくつかの実施形態では、擬似ネイティブアルブミンは、分子モデリングにより測定して全アルブミンの構造の90%を有する。いくつかの実施形態では、擬似ネイティブアルブミンは、分子モデリングにより測定して、全アルブミンの構造の80%を有する。いくつかの実施形態では、擬似ネイティブアルブミンは、分子モデリングにより測定して、全アルブミンの構造の70%を有する。いくつかの実施形態では、擬似ネイティブアルブミンは、分子モデリングにより測定して、全

40

50

アルブミンの構造の50%～75%を有する。

【0111】

ヒト血清アルブミン(HSA)およびヒトアルブミン(HA)という用語は、本明細書中で互換的に用いられる。「アルブミンおよび血清アルブミン」という用語は、より広範であり、ヒト血清アルブミン(そしてその断片および変異体)、ならびに他の種からのアルブミン(そしてその断片および変異体)を包含する。

【0112】

ある実施形態では、本明細書中に記載されるヘテロ多量体の各アルブミンベースの単量体は、正常HAの変異体を基礎にしている。本発明のヘテロ多量体タンパク質の各カーゴポリペプチド部分も、本明細書中に記載されるような治療用タンパク質の変異体であり得る。「変異体」という用語は、保存的または非保存的な、挿入、欠失および置換を含み、この場合、このような変化は、アルブミンの膠質性、有用なリガンド結合および非免疫原性特性、または活性部位、あるいは治療用タンパク質の治療活性を付与する活性ドメインのうちの1つ以上を実質的に変更しない。ある実施形態では、変異体はまた、その一次配列における代替的な位置でアルブミンをセグメント化することにより得られる代替的なヘテロ多量体種も意味する。

【0113】

ある実施形態では、本明細書中に記載されるヘテロ多量体タンパク質は、ヒトアルブミンの天然多形変異体およびヒトアルブミンの断片、例えばEP 322094に開示される断片(すなわち、HA(Pn)、ここで、nは369～419である)を包含する。

【0114】

ある実施形態では、アルブミンは、任意の脊椎動物、とくに任意の哺乳動物、例えばヒト、ウシ、ヒツジ、ラット、マウス、ウサギ、ウマ、イヌまたはブタ(これらに限定されない)に由来する。ある実施形態では、アルブミンは、非哺乳動物アルブミン、例えば雌鶏およびサケ(これらに限定されない)に由来する。

【0115】

ヒトアルブミンの配列は、配列番号1として示されるものである：

MKWVTFISLLFLFSSAYS SRGVFR RDAHKSEVAHRFKD LG E
ENFKALVLIAFAQYLQQCP FEDHVKLVNEVTEFAKTCVAD
ESAENC DKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEP
ERNECF LQHKDDNP NLPRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLK
KYL YE IARRHPYFYAPELLFFAKRYKAAFTTECCQAADKAA
CLLPKLDEL RDEGKASSAKQRLK CASLQKFGERA FKA W AV
ARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLT KVHTECCHGDLLECADDD
RADLAKYICENQDSISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVEND
EMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYAR
RHPDYSVVLLRLAKTYET TLEKCCAAADPHECYAKVFDE
FKPLVEEPQNL IKQNC ELFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVP
QVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKKHPEAKRMPCAEDYLSVV
LNQLCVLHEKTPVSDRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDET
YVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHK
PKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDDKETCF AE E GK KLV
AASQAALGL。

【0116】

アロアルブミン

「アロアルブミン」は、アルブミンの遺伝的変異体である。ある実施形態では、アロアルブミンはヒトアロアルブミン(HAA)である。電気泳動移動度がアルブミンと異なるアロアルブミンは、臨床的電気泳動の過程で、または供血者調査において、集団遺伝学調査により同定されている。突然変異および移動のマーカーとして、アロアルブミンは、遺伝学者、生化学者および人類学者にとって興味深い、しかしこれらのアロアルブミンの

ほとんどが、疾患と関連付けられていない (Minchiotti et al. Human Mutations 29 (8), 1007-1016 (2008))。

表1： 配列番号1のHAと比較した場合の、種々のアロアルブミンに含まれる置換の一覧。熱安定性、半減期の情報およびその他のHAAは、Krogh-hansen et al. Biochim Biophys Acta 1747, 81-88 (2005)；およびWO2011051489（これらの記載内容は参照により本明細書中で援用される）で提供されている。

【表 1 - 1】

突然変異	熱安定性(C) (正=安定化 負=不安定化)	半減期に及ぼす作用 (変化%)
H3Y	N/A	N/A
H3Q	N/A	N/A
Q32 停止	N/A	N/A
E60K	N/A	N/A
D63N	6.07	N/A
L66P	N/A	N/A
E82K	2.03	N/A
R114G	N/A	N/A
R114 停止	N/A	N/A
E119K	N/A	N/A
V122E	0.57	N/A
H128R	N/A	N/A
Y140C	N/A	N/A
A175 停止	N/A	N/A
C177F	-1.59	N/A
R218H	N/A	N/A
R218P	N/A	N/A
K225Q*	-4.86	N/A
K240E	N/A	N/A
E244 停止	N/A	N/A
Q268R	N/A	N/A
D269G	3.67	N/A
K276N	4.87	N/A
K313N	-7.16	N/A
D314G	-0.38	N/A
D314V	N/A	N/A
N318K	N/A	N/A
A320T, & -1R	N/A	6.16
E321K	1.42	N/A
E333K	-2.56	N/A
E354K	N/A	N/A
E358K	N/A	N/A
K359K	-6.56	N/A
D365H	0.89	N/A
D365V	N/A	N/A
E368G	N/A	N/A
K372E	N/A	N/A
D375N	N/A	N/A

10

20

30

40

【表 1 - 2】

D375H	-0.09	N/A
E376K	N/A	N/A
E376Q	N/A	N/A
E382K	N/A	N/A
Q385 停止	N/A	N/A
Y401 停止	N/A	N/A
R410C	N/A	N/A
E479K	N/A	N/A
D494N	N/A	0.84
E501K	0.13	N/A
E505K	1.87	N/A
I513N	N/A	N/A
V533M	N/A	N/A
K536E	N/A	N/A
K541E	6.12	N/A
D550G	N/A	N/A
D550A	N/A	N/A
K560E	0.70	N/A
D563N	4.17	N/A
E565K	N/A	N/A
E570K	-6.53	N/A
K573E	2.08	2.7
K574N	N/A	N/A
L575 挿入 (TCCCKSSCLRLITSHLKASQPTMR IRERK)	-5.30	N/A
567 後のフレームシフト;582 で停止	N/A	-5.7 %
572 後のフレームシフト;578 で停止	N/A	-8.9 %

【0 1 1 7】

アネキシン

本明細書中で用いる場合、「アネキシン」は、真核生物体に見出される細胞タンパク質の一群を指す。アネキシンはリポコルチンとしても既知である。本明細書中で用いる場合、「アネキシン」は、任意のアネキシンタンパク質を指し、または特定のアネキシンタンパク質、例えば「アネキシンA1」、「アネキシンA2」および「アネキシンA5」を指し得る。アネキシンは、負に荷電したリン脂質（すなわち、膜壁）と結合するそれらのカルシウム依存性能力により特徴付けられる。アネキシンは、30～50kDaのサイズに限定される反復タンパク質足場により特徴付けられ、組織にかなり普遍的に分布する。アネキシンの基本構造は2つのドメイン：すなわち構造的に保存されるC末端「コア」領域と多様なN末端ドメイン、からなる。コア領域はCa²⁺依存的にリン脂質細胞膜と結合する。N末端領域は細胞質タンパク質と結合する。アネキシンは種々の細胞性および生理学的過程において重要であり、膜足場を提供する。C末端コアは4つのアネキシン反復からなる。アネキシンは、その固有の膜感知能力に影響を及ぼすその柔軟な反復様の性質により特徴付けられる。例えば、特定の生体膜に対する親和性は反復の数により制御され得る。特徴的なリン脂質感知を備えていることで、アネキシンは薬剤送達のために腸接合部を感知し／標的にするために有用であり得る。アネキシンの別の適用可能性は、腸の

密着接合部および密着帯領域（Z O - 1）をターゲッティングすることであり、これは、より大きいタンパク質治療薬の横断が特に困難で、薬剤吸収を著しく減損することが知られている。

【0118】

「擬似ネイティブアネキシン」という用語は、全アネキシンと類似の構造および／または機能を有するヘテロ多量体分子を指し、ここで前記ヘテロ多量体分子は、全アネキシンの配列をベースにして設計される2つ以上の単量体ポリペプチドの集合体により形成される。ある実施形態では、単量体ポリペプチドは、ヘテロ多量体対として優先的に会合して擬似ネイティブタンパク質を形成する「セグメント」である。いくつかの実施形態では、擬似アネキシンは全アネキシンの90%の活性を有する。いくつかの実施形態では、擬似アネキシンは全アネキシンの75%の活性を有する。一実施形態では、擬似アネキシンは全アネキシンの50%の活性を有する。いくつかの実施形態では、擬似アネキシンは全アネキシンの50～75%の活性を有する。一実施形態では、擬似アネキシンは全アネキシンの80%の活性を有する。いくつかの実施形態では、分子モデリングにより確定した場合、擬似アネキシンは全アネキシンの90%の構造を有する。いくつかの実施形態では、分子モデリングにより確定した場合、擬似アネキシンは全アネキシンの80%の構造を有する。いくつかの実施形態では、分子モデリングにより確定した場合、擬似アネキシンは全アネキシンの70%の構造を有する。いくつかの実施形態では、分子モデリングにより確定した場合、擬似アネキシンは全アネキシンの50%の構造を有する。いくつかの実施形態では、分子モデリングにより確定した場合、擬似アネキシンは全アネキシンの50～75%の構造を有する。

【0119】

ヒト野生型アネキシンA2の配列を以下に示す：

配列番号14：

GSAVSPYPPTFNPSSDVAALHKAIMVKGVD EATI IDILTKR
NNAQRQQIKAA YLQETGKPLDET LKKAL TGHLEEVLALL
KTPAQF DAD E LRAAMKGLGTDEDTLIEILASRTNKEIRD I
NRVYREELKRD LAKDITSDTSGDFRNALLSLAKGDRSEDF
GVNEDLADSDARALYEAGERRKGT DVNVFNTIL TTRSYPQ
LRRVFQKYTKYSKHDMNKVLDLELKGDI EKCLTAIVKCAT
SKPAFFAEKLHQAMKGVGTRHKALIRIMVSRSEIDMNDIK
AFYQKMYG I SLCQA ILDET KGDYEK I LVALCGGN

【0120】

トランスフェリン

トランスフェリンはすべての脊椎動物に存在する分子量約76KDaの単量体タンパク質であり、鉄結合および輸送タンパク質として機能する。組換えヒトトランスフェリンおよびその融合体は、幹細胞移植中にならびに炭疽菌により引き起こされる急性感染性疾患の処置において、サラセミア、無トランスフェリン血症、加齢性黄斑変性、2型糖尿病を含む種々の疾患の管理用に考えられているものである。トランスフェリンは消化管環境中で安定であり、多数の試験により無傷タンパク質—トランスフェリン複合体は経口的に送達されかつ生物活性を保持することを示している。

【0121】

「擬似トランスフェリン」という用語は、全トランスフェリンと類似の構造および／または機能を有するヘテロ多量体分子を指し、ここで前記ヘテロ多量体分子は、全トランスフェリンの配列をベースにして設計される2つ以上の単量体ポリペプチドの集合体により形成される。ある実施形態では、単量体ポリペプチドは、ヘテロ多量体対として優先的に会合して擬似ネイティブタンパク質を形成する「セグメント」である。いくつかの実施形態では、擬似トランスフェリンは全トランスフェリンの90%の活性を有する。いくつかの実施形態では、擬似トランスフェリンは全トランスフェリンの75%の活性を有する。一実施形態では、擬似トランスフェリンは全トランスフェリンの50%の活性を有する。

いくつかの実施形態では、擬似トランスフェリンは全トランスフェリンの50～75%の活性を有する。一実施形態では、擬似トランスフェリンは全トランスフェリンの80%の活性を有する。いくつかの実施形態では、分子モデリングにより確定した場合、擬似トランスフェリンは全トランスフェリンの90%の構造を有する。いくつかの実施形態では、分子モデリングにより確定した場合、擬似トランスフェリンは全トランスフェリンの80%の構造を有する。いくつかの実施形態では、分子モデリングにより確定した場合、擬似トランスフェリンは全トランスフェリンの70%の構造を有する。いくつかの実施形態では、分子モデリングにより確定した場合、擬似トランスフェリンは全トランスフェリンの50%の構造を有する。いくつかの実施形態では、分子モデリングにより確定した場合、擬似トランスフェリンは全トランスフェリンの50～75%の構造を有する。

10

【0122】

野生型ヒトトランスフェリンの配列を以下に示す：

配列番号19：

```
MRLAVGALLV CAVLGLCLAV PDKTVRWCAV SEHEATK
CQS FRDHMKSVIP SDGPSVACVK KASYLDCIRA IAA
NEADAVT LDAGLVYDAY LAPNNLKPVV AEFYGSKEDP
QTFYYAVAVV KKDSGFQMNQ LRGKKSCHTG LGRSAG
WNIP IGLLYCDLPE PRKPLEKAVA NFFSGSCAPC AD
GTDFFPQLC QLCPGCGCST LNQYFGYSGA FKCLKDGAG
D VAFVKHSTIF ENLANKADRD QYELLCLDNT RKPVD
EYKDC HLAQVPSHTV VARSMGGKED LIWELLNQAQ E
HFGKDKSKE FQLFSSPHGK DLLFKDSA HG FLKVPPRM
DA KMYLGYEYVT AIRNLRREGTC PEAPTDECKP VKWC
ALSHHE RLKCD EWSVN SVGKIECVSA ETTEDCIAKI
MNGEADAMSL DGGFVYIAGK CGLVPVLAEN YNKSDNC
EDT PEAGYFAVAV VKKSASDLTW DNLKGKKSCH TAV
GRTAGWN IPMGLLYNKI NHCRFDEFFS EGCAPGSKKD
SSLCKLCLMGS GLNLCEPNNK EGYGYTGAF RCLVEK
GDVA FVKHQTPVQN TGGKNPD PWA KNLNEKD YEL LC
LDGTRKPV E EYANCHLAR APNHAVVTRK DKEACVHKI
L RQQQH LFGSN VTDCSGNFCL FRSE TKDL LF RDDTV
CLAKL HDRNTYEKYL GEEYVKA VGN LRKCSTSSLL E
ACTFRRP
```

20

30

【0123】

カーゴ分子：

本明細書中に記載されるヘテロ多量体は、少なくとも1つのカーゴ分子、および少なくとも1つの輸送体ポリペプチドを含むポリペプチドを含み、前記カーゴ分子および輸送体ポリペプチドは、遺伝子融合または化学的連結を含むがこれらに限定されない方法により、互いに会合する。いくつかの実施形態では、カーゴポリペプチドは輸送体ポリペプチドのN末端またはC末端と融合される。いくつかの実施形態では、カーゴポリペプチドは輸送体ポリペプチドのN末端およびC末端の両方と融合される。いくつかの実施形態では、カーゴポリペプチドは、ヒトアルブミンをセグメント化することにより得られる輸送体ポリペプチドのシステイン37位置に結合される。ある実施形態では、少なくとも1つのカーゴ分子は治療薬である。ある作用物質において、カーゴ分子は毒素である。ある実施形態では、カーゴ分子は抗原、またはその類似体である。一実施形態では、カーゴ分子は天然生成物、類似体、またはそのプロドラッグである。ある実施形態では、カーゴ分子は、細胞毒素などの治療薬、例えば細胞増殖抑制剤または殺細胞剤、治療薬または放射性金属イオン、例えば²¹³Biなどの例えばアルファ線放出剤である。細胞毒素または細胞毒性薬としては、細胞に有害である任意の作用物質が挙げられる。例としては、パクリタキソール、サイトカラシンB、グラミシジンD、臭化エチジウム、エメチン、マイトマイシ

40

50

ン、エトポシド、テノポシド、ビンクリスチン、ビンブラスチン、コルヒチン、ドキソルビシン、ダウノルビシン、ジヒドロキシアントラシンジオン、ミトキサントロン、ミトラマイシン、アクチノマイシンD、1-デヒドロテストステロン、糖質コルチコイド、プロカイン、テトラカイン、リドカイン、プロプラノロールおよびピューロマイシンならびにその類似体または相同体が挙げられる。治療薬としては、抗代謝薬（例えば、メトトレキサート、6メルカプトプリン、6チオグアニン、シタラビン、5-フルオロウラシル・デカルバジン）、アルキル化剤（例えば、メクロレタミン、チオエパ・クロラムブシル、メルファラン、カルムスチン（BSNU）およびロムスチン（CCNU）、シクロホスファミド、ブスルファン、ジプロモマンニトール、ストレプトゾトシン、マイトマイシンCおよびシス-ジクロロジアミンプラチナ（II）（DDP）シスプラチン）、アントラサイクリン（例えば、ダウノルビシン（以前は、ダウノマイシン）およびドキソルビシン）、抗生物質（例えば、ダクチノマイシン（以前は、アクチノマイシン）、ブレオマイシン、ミトラマイシンおよびアントラマイシン（AMC））、ならびに抗有糸分裂薬（例えば、ビンクリスチンおよびビンブラスチン）が挙げられるが、これらに限定されない。

【0124】

ある実施形態では、カーゴ分子は生体分子である。一実施形態では、カーゴ分子は天然または合成核酸である。いくつかの実施形態では、少なくとも1つのカーゴ分子は、DNA、RNAおよび／またはRNAオリゴマーのうちの1つ以上である。ある実施形態では、本明細書中に記載されるヘテロ多量体は、少なくとも1つのカーゴポリペプチド、あるいはその断片または変異体、および少なくとも1つの輸送体ポリペプチドを含む単量体タンパク質を含み、前記カーゴポリペプチドおよび輸送体ポリペプチドは遺伝子融合または化学的連結（これらに限定されない）により互いに会合する。

【0125】

本明細書中で用いる場合、「カーゴポリペプチド」は、1つ以上の治療的および／または生物学的活性を有するタンパク質、ポリペプチド、抗体、ペプチドあるいはその断片または変異体を指す。本発明に包含されるカーゴポリペプチドとしては、タンパク質、ポリペプチド、ペプチド、抗体、治療的に適切な標的タンパク質に対する基質またはリガンドおよび生物製剤が挙げられるが、これらに限定されない（ペプチド、タンパク質およびポリペプチドという用語は、本明細書中で互換的に用いられる）。具体的には、「カーゴポリペプチド」という用語は抗体ならびにその断片および変異体を包含する。したがって、本明細書中に記載されるヘテロ多量体は、カーゴポリペプチドの少なくとも1つの断片または変異体、および／または抗体の少なくとも1つの断片または変異体を含有し得る。さらに、ある実施形態では、「カーゴポリペプチド」という用語は、カーゴポリペプチドの内在性または天然に生じる関連物を指す。

【0126】

非限定例として、「カーゴ生体分子」は、疾患、症状または障害を処置し、防止または改善するために有用であるタンパク質、DNAまたはRNA（これらに限定されない）などの生体分子である。非限定例として、「カーゴポリペプチド」は、特定の細胞型（正常な（例えば、リンパ球）または異常な（例えば、癌細胞））と特異的に結合し、したがって化合物（薬剤、例えば細胞毒性薬）をその細胞型へと特異的に標的させるために用いられるものであり得る。

【0127】

別の非限定例では、「カーゴ分子」は、生物学的活性、特に、疾患を処置、防止または改善するために有用である生物学的活性、を有する分子である。カーゴ分子、例えばカーゴポリペプチド、に保有され得る生物学的活性の非包括的一覧としては、免疫応答を増強すること、血管新生を促進すること、血管新生を抑制すること、造血機能を調節すること、神経成長を刺激すること、免疫応答を増強すること、免疫応答を抑制すること、または本明細書中に記載される生物学的活性のうちのいずれか1つ以上が挙げられる。

【0128】

本明細書中に記載されるヘテロ多量体タンパク質、例えば細胞表面および分泌タンパク

質、のカーゴポリペプチド部分に対応するカーゴポリペプチドは、しばしば1つ以上のオリゴ糖基の結合により修飾される。この修飾（グリコシル化として言及される）は、タンパク質の物理的特性に劇的に作用し、タンパク質の安定性、分泌および局在化に重要であり得る。グリコシル化は、ペプチド主鎖に沿った特定位置で起こる。通常2つの主要な型のグリコシル化が存在する：すなわち、O結合型オリゴ糖により特徴付けられるグリコシル化（セリンまたはトレオニン残基に結合される）；ならびにN結合型オリゴ糖により特徴付けられるグリコシル化（Asn-X-Ser/Thr配列中のアスパラギン残基に結合される（式中、Xはプロリン以外の任意のアミノ酸であり得る））である。N-アセチルノイラミン酸（シアル酸としても既知）は、通常は、N結合型およびB結合型オリゴ糖の両方の末端残基である。例えばタンパク質構造および細胞型などの変数は、異なるグリコシル化部位において鎖内の炭水化物の数および性質に影響を及ぼす。グリコシル化異性体もまた、所定の細胞型内の同一部位で一般的である。

10

【0129】

表2は、本明細書中に記載されるヘテロ多量体のカーゴポリペプチド部分に対応するカーゴポリペプチドの非包括的一覧を提供する。「カーゴポリペプチド」の欄は、カーゴポリペプチド分子を開示し、その後の括弧内に、カーゴポリペプチドあるいはその断片または変異体を含むか、またはそれからなる科学名および商標名を記す。一実施形態では、カーゴ分子は、「カーゴポリペプチド」欄に、またはZhu et al. (Nucleic Acids Res. 38 (1), D787-D791 (2009)) ; Wishart et al. (Nucleic Acids Res. 36, D901-D906 (2008)) ; Ahmed et al. (Nucleic Acids Res. 39, D960-D967 (2011)) (これらの記載内容は参照により本明細書中で援用される) に開示されたタンパク質、あるいは治療用標的分子のクラスに属するタンパク質と結合する分子である。

20

【0130】

「カーゴポリペプチド」は、本明細書中で用いる場合、個々のカーゴポリペプチド分子（CASおよびGenbank寄託番号から獲得可能なアミノ酸配列により限定される）を指し、またはこの欄に開示される所定のカーゴポリペプチド分子と関連したカーゴポリペプチドの全群、またはこの欄に開示されるポリペプチド分子と結合するカーゴポリペプチドを指し得る。

30

【表 2 - 1】

表2：ヘテロ多量体のカーゴポリペプチド部分に対応するカーゴポリペプチドの非包括的一覧

カーゴポリペプチド	生物学的活性	例示的活性検定	適応症
EPO (エリスロポエチン; エポエチン アルファ; エポエチン ベータ; 遺伝子活性化エリスロポエチン; Darb エポエチン- アルファ; NESP; エポジェン; プロクリット; エプレックス; エリポ; エソポオ; エポイムン; エポギン; ネオレコルモン; ヘモリンク; ダイネポ; アラネスブ)	赤血球生成の初期段階で骨髄幹細胞の細胞性分化を刺激する;最終的に分化中の細胞の増殖および赤血球への成熟を促進する;および循環赤血球のレベルを調整する。	赤白血病細胞株TF-1を用いた細胞増殖検定 (Kitamura et al. 1989 J. Cell. Physiol. 140: 323)	貧血;腎疾患における貧血;腫瘍学患者における貧血;出血障害;慢性腎不全;前透析患者における慢性腎不全;腎疾患;末期腎疾患;透析患者における末期腎疾患;化学療法;癌患者における化学療法;ジドブジン処置HIV患者における貧血;ジドブジン処置患者における貧血;HIV患者における貧血;未熟児における貧血;外科手術患者(術前および/または術後);貧血である外科手術患者(術前および/または術後);待機的手術を受けている外科手術患者(術前および/または術後);待機的非心臓手術を受けている外科手術患者(術前および/または術後);待機的非心臓非血管手術を受けている外科手術患者(術前および/または術後);待機的非血管手術を受けている外科手術患者(術前および/または術後);心臓および/または血管手術を受けている外科手術患者(術前および/または術後);再生不良性貧血;難治性貧血;炎症性腸疾患における貧血;炎症性腸疾患における難治性貧血;輸血回避;外科手術患者に関する輸血回避;待機的外科手術患者に関する輸血回避;待機整形外科手術患者に関する輸血回避;赤血球増加を望む患者
G-CSF (顆粒球コロニー刺激因子; グラニューロカイン; KRN 8601; フィルグラスチム; レノグラスチム; メオグラスチム; ナルトグラスチム; ノイボゲン; ノピア; グラン; グラノサイト; グラニューロカイン; ノイトロジン; ノイーアップ; ノイトロマックス)	顆粒球および単球-マクロファージに関する始原細胞の増殖および分化を刺激する。	ネズミNFS-60細胞の増殖 (Weinstein et al, Proc Natl Acad Sci USA 1986; 83, pp5010-4)	化学防護;化学療法に対する補助剤;炎症性障害;癌;白血病;骨髄性白血病;好中球減少症;原発性好中球減少症(例えば;コストマン症候群);続発性好中球減少症;好中球減少症の防止;HIV感染患者における好中球減少症の防止及び処置;化学療法に関連した好中球減少症の防止及び処置;好中球減少症に関連した感染;骨髄異形成;自己免疫障害;乾癬;造血性始原細胞の動員;創傷治癒;自己免疫疾患;移植;骨髄移植;急性骨髄性白血病;リンパ腫;非ホジキンリンパ腫;急性リンパ芽球性白血病;ホジキン病;骨髄回復促進;グリコーゲン蓄積症

10

20

30

【表 2 - 2】

カーゴポリペプチド	生物学的活性	例示的活性検定	適応症
GM-CSF (顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子; rhuGM-CSF; BI 61012; プロカイン; モルグラモスチム; サルグラモスチム; GM-CSF/IL 3 融合; ミロジスチム; ロイコトロピン; プロカイン; ロイコマックス; インテルベリン; ロイキン; エロイキン液; ピクシキン)	造血細胞分化、遺伝子発現、増殖および機能を調節する	コロニー刺激検定; Testa, N. G., et al., "Assays for hematopoietic growth factors." Balkwill FR (ed) Cytokines, A practical Approach, pp 229-44; IRL Press Oxford 1991.	骨髄障害; 骨髄移植; 化学防護; C型肝炎; HIV感染; 癌; 肺癌; 黒色腫; 悪性黒色腫; マイコバクテリウム・アビウムコンプレックス; 真菌症; 白血病; 骨髄性白血病; 感染症; 新生児感染症; 好中球減少症; 粘膜炎; 口腔粘膜炎; 前立腺癌; 幹細胞動員; ワクチンアジュバント; 潰瘍 (例えば、糖尿病性、静脈鬱血性または圧迫性潰瘍); 好中球減少症の防止; 急性骨髄性白血病; 造血始原細胞動員; リンパ腫; 非ホジキン リンパ腫; 急性リンパ芽球性白血病; ホジキン病; 骨髄性回復促進; 移植拒絶; 異種移植拒絶
ヒト成長ホルモン (ペグビソマント; ソマトレム; ソマトロピン; トロベルト; プロトロピン; バイオトロピン; フマトロープ; ニュートロピン; ニュートロピン AQ; ニュートロフィン; ノルジトロピン; ゲノロピン; サイゼン; セロスチム)	2つのGHR分子と結合し、受容体二量体化によるシグナル伝達を誘導する	Ba/F3-hGHR 増殖検定、血清ヒト成長ホルモンに関する新規の特異的バイオアッセイ. J Clin Endocrinol Metab 2000 Nov; 85(11): 4274-9 Plasma growth hormone (GH) immunoassay and tibial bioassay, Appl Physiol 2000 Dec; 89(6): 2174-8 Growth hormone (hGH) receptor mediated cell mediated proliferation, Growth Horm IGF Res 2000 Oct; 10(5): 248-55 International standard for growth hormone, Horm Res 1999; 51 Suppl 1: 7-12	末端肥大症; 成長不全; 成長ホルモン補充; 成長ホルモン欠乏; 小児性成長ホルモン欠乏; 成人性成長ホルモン欠乏; 特発性成長ホルモン欠乏; 成長遅延; プラダー・ウィリー症候群; 2歳以上の小児におけるプラダー・ウィリー症候群; 成長欠乏; 慢性腎不全に関連した成長不全; 骨粗鬆症; 閉経後骨粗鬆症; 骨減少症; 破骨細胞生成; 熱傷; 悪液質; 癌悪液質; 小人症; 代謝性障害; 肥満症; 腎不全; ターナー症候群; 繊維筋痛; 骨折処置; 虚弱、エイズ消耗症; 筋消耗症; 低身長; 診断薬; 女性不妊症; 脂肪異常栄養症
インスリン (ヒト インスリン; インスリン アスパルト; インスリン グラルギン; インスリン リスプロ; Lys-B28 Pro-B29; リスプロ; LY 275585; ジアルギニルインスリン; Des-B26- B30-インスリン-B25-アミド; インスリン デテミル; ラビ; ノボリン; ノボラピド; ヒューマリン; ノボミックス 30; ペロスリン; ノボログ; ランツス; イレチン; ヒューマログ; マクルリン; エクスプラ; インスマン; オラリン; オラルゲン; ヒューマハレ; ヒューマハリン)	グルコース取り込みを刺激し、グリコーゲン生成および脂質生成を促す	インスリン活性を、[3-H]-グルコース取り込み検定を用いて、in vitroで検定し得る. (J Biol Chem 1999 Oct 22; 274(43): 30864-30873).	高血糖症; 糖尿病; 尿崩症; 真性糖尿病; 1型糖尿病; 2型糖尿病; インスリン抵抗性; インスリン欠乏症; 高脂血症; 高ケトン血症; 非インスリン依存性真性糖尿病 (NIDDM); インスリン依存性真性糖尿病 (IDDM); 糖尿病関連症状、例えば肥満症、心疾患、高血糖症、感染症、網膜症、および/または潰瘍(これらに限定されない); 代謝性障害; 免疫障害; 肥満症; 血管障害; 体重抑制; 食欲抑制; X症候群

10

20

30

【表 2 - 3】

カーゴポリペプチド	生物学的活性	例示の活性検定	適応症
インターフェロン アルファ (インターフェロン アルファ-2b; 組換え体; インターフェロン アルファ-n1; インターフェロン アルファ-n3; Peg インターフェロン アルファ-2b; リバビリンおよびインターフェロン アルファ-2b; インターフェロン アルファコン-1; インターフェロン コンセンサス; YM 643; C1FN; インターフェロン アルファ コンセンサス; 組換え体 メチオニル コンセンサス インターフェロン; 組換え体 コンセンサス インターフェロン; CGP 35269; RO 253036; RO 258310; イントロン A; PEG- イントロン; OIF; オムニフェロン; PEG- オムニフェロン; ベルトナ; PEG- レベトロン; ロフェロン A; ウェルフェロン; アルファエロン N/LDO; レベトロン; アルテモール; ビトラフェロン PEG; ペガシス; ビラフェロン; ビラフォン; アンプリゲン; インフェルゲン; インフレックス; オラゲン)	一連の細胞応答、例えば抗ウイルス、抗増殖性、抗腫瘍および免疫調節活性を付与する; 2つの酵素: プロテインキナーゼおよびオリゴヌクレオチドシナーゼの産生を刺激する。	抗 ウィ ル ス 検 定 : Rubinstein S, Familletti PC, Pestka S. (1981) Convenient assay for interferons. J. Virol. 37(2): 755-8; 抗増殖検定: Gao Y, et al (1999) Sensitivity of an epstein-barr virus-positive tumor line, Daudi, to alpha interferon correlates with expression of a GC-rich viral transcript. Mol Cell Biol. 19(11): 7305-13.	ウィルス感染症; HIV感染; 肝炎; 慢性 B 型肝炎; 慢性 C 型肝炎; 慢性 D 型肝炎; 慢性 E 型肝炎; ヒトパピローマウィルス; 単純ヘルペスウィルス感染; 外部尖圭コンジローマ; HIV; HIV 感染症; 腫瘍学; 癌; 固形腫瘍; 黒色腫; 悪性黒色腫; 腎臓癌 (例えば、腎細胞癌); 肺癌 (例えば、非小細胞肺癌 または小細胞肺癌) 結腸癌; 乳癌; 肝臓癌; 前立腺癌; 膀胱癌; 胃癌; 肉腫; エイズ関連カポジ肉腫; リンパ腫; T 細胞リンパ腫; 皮膚 T 細胞リンパ腫; 非ホジキン リンパ腫; 脂肪肉腫; 神経膠腫; 未分化星状細胞腫; 子宮頸部形成異常; 白血病; 前白血病; 骨髄 障害; 骨障害; 毛様細胞性白血病; 慢性骨髄性白血病; 血液学的悪性腫瘍; 血液学的障害; 多発性骨髄腫; 細菌性感染症; 化学防護; 血小板減少症; 多発性硬化症; 肺繊維症; 加齢性黄斑変性; 黄斑変性; クロウン病; 神経学的障害; 関節炎; 関節リウマチ; 潰瘍性結腸炎; 骨粗鬆症; 骨減少症; 破骨細胞生成; 繊維筋痛; シェーグレン症候群; 慢性疲労症候群; 発熱; 出血性発熱; ウィルス性出血性発熱; 高血糖症; 糖尿病; 尿崩症; 真性糖尿病; 1型糖尿病; 2型糖尿病; インスリン抵抗性; インスリン欠乏症; 高脂血症; 高ケトン血症; 非インスリン依存性真性糖尿病 (NIDDM); インスリン依存性真性糖尿病 (IDDM); 糖尿病関連症状 例えば、肥満症、心疾患、高血糖症、感染症、網膜症、および/または潰瘍(これらに限定されない); 代謝性障害; 免疫 障害; 肥満症; 血管 障害; 体重抑制; 食欲抑制; X 症候群。
カルシトニン (サケ カルシトニン (サルカトニン); カルシトニン ヒト-サケ ハイブリッド; フォルカルトニン; フォルチカル; カルシトニン; カルシトニナ アルミラル; カルシトニナ フツパー; カルシマル; カルシナル; カロゲン; ミアカルシク; ミアカルシン; SB205614; マクリトニン; シバカルシン; シバカルシナ; シバカルシン; サルモカルシン; PowderJect カルシトニン) (CAS-21215-62-3)	血清中のカルシウムおよびリン酸塩のレベルを調節する; 血清カルシウムの低減を引き起こす(ヒト 上皮小体ホルモンの作用とは反対の作用)。	低カルシウム血症フラットバイオアッセイ、骨吸収検定およびピット検定、CT受容体結合検定、CAMP 刺激検定: J Bone Miner Res 1999 Aug; 14(8): 1425-31	骨障害; 骨折防止; 高カルシウム血症; 悪性高カルシウム血症; 骨粗鬆症; パジェット病; 骨減少症、破骨細胞生成; 骨溶解; 骨髄炎; 骨壊死; 歯周骨損失; 骨関節炎; 関節リウマチ; 骨化石症; 歯周性、溶解性または 転移性骨疾患; 破骨分化抑制; 骨 障害; 骨治癒および再生。

10

20

30

40

【表 2 - 4】

カーゴポリペプチド	生物学的活性	例示の活性検定	適応症
インターフェロン ベータ (インターフェロン ベータ-1a; インターフェロン ベータ-1b; インターフェロン-ベータ-セリン; SH 579; ZK 157046; BICDF; ベータ-2 IF; インターフェロン-ベータ-2; rhIL-6; SJ0031; DL 8234; フェロン; IFN ベータ; ベタセロン; アボネックス; レビフ; ベタフェロン; シゴシックス)	MHC 抗原発現、NK 細胞活性、ならびに単球における IFN γ 産生および IL12 産生を調整する。	抗ウイルス検定: Rubinstein S, Familletti PC, Pestka S. (1981) Convenient assay for interferon. J. Virol. 37(2): 755-8; ; 抗増殖検定: Gao Y, et al (1999) Sensitivity of an epstein-barr virus-positive tumor line, Daudi, to alpha interferon correlates with expression of a GC-rich viral transcript. Mol Cell Biol. 19(11): 7305-13.	多発性硬化症; 腫瘍学; 癌; 固形腫瘍; 黒色腫; 悪性 黒色腫; 腎臓癌 (例えば、腎細胞癌); 肺癌 (例えば、非小細胞 肺癌 または 小細胞 肺癌) 結腸癌; 乳癌; 肝臓癌; 前立腺癌; 膀胱癌; 胃癌; 肉腫; エイズ関連カポジ肉腫; リンパ腫; T 細胞リンパ腫; 皮膚 T 細胞リンパ腫; 非ホジキンリンパ腫; 脳腫瘍; 神経膠腫; 未分化星状細胞腫; 子宮頸部形成異常; 白血病; 前白血病; 骨髄 障害; 骨 障害; 毛様細胞性白血病; 慢性 骨髄性白血病; 血液学的悪性腫瘍; 血液学的障害; 多発性骨髄腫; 細菌性 感染症; 化学防護; 血小板減少症; ウイルス 感染症; HIV 感染; 肝炎; 慢性 肝炎; B 型肝炎; 慢性 B 型肝炎; C型肝炎; 慢性 C型肝炎; D型肝炎; 慢性 D型肝炎; ヒト パピローマウイルス; 単純ヘルペスウイルス感染; 外部尖圭コンジローマ; HIV; HIV 感染症; 肺繊維症; 加齢性黄斑変性; 黄斑変性; クローン病; 神経学的障害; 関節炎; 関節リウマチ; 潰瘍性結腸炎; 骨粗鬆症; 骨減少症; 破骨細胞生成; 繊維筋痛; シェーグレン 症候群; 慢性 疲労 症候群; 発熱; 出血性発熱; ウイルス性出血性発熱; 高血糖症; 糖尿病; 尿崩症; 真性糖尿病; 1型 糖尿病; 2型糖尿病; インスリン抵抗性; インスリン欠乏症; 高脂血症; 高ケトン血症; 非インスリン依存性 真性糖尿病 (NIDDM); インスリン依存性 真性糖尿病 (IDDM); 糖尿病関連症状、例えば肥満症、心疾患、高血糖症、感染症、網膜症、および/または潰瘍(これらに限定されない); 代謝性 障害; 免疫障害; 肥満症; 血管 障害; 体重抑圧; 食欲抑圧; X 症候群
成長ホルモン放出因子; 成長ホルモン放出ホルモン (酢酸セルモレリン; プラルモレリン; ソマトレリン; ソマトリベルリン; ゲレフ; ゲレル; グロリベリン)	脳下垂体前葉に作用して、成長ホルモンの産生および分泌を刺激し、腺に対する栄養作用を発揮する。	成長ホルモン放出ペプチド (GHRPs) は、脳下垂体前葉細胞における受容体および直接作用により、in vivo および in vitro で成長ホルモン (GH) を放出することが既知である。生物学的活性は成長ホルモン放出因子受容体を発現する細胞株で測定され得る (Mol Endocrinol 1992 Oct; 6(10): 1734-44, Molecular Endocrinology, Vol 7, 77-84).	末端肥大症; 成長不全; 成長ホルモン補充; 成長ホルモン欠乏; 小児性成長ホルモン欠乏; 成人性成長ホルモン欠乏; 特発性成長ホルモン欠乏; 成長遅延; プラダー・ウィリー 症候群; プラダー・ウィリー 症候群(2歳以上の小児); 成長欠乏; 慢性腎不全に関連した 成長不全; 骨粗鬆症; 骨減少症; 破骨細胞生成; 閉経後 骨粗鬆症; 熱傷; 悪液質; 癌 悪液質; 小人症; 代謝性 障害; 肥満症; 腎不全; ターナー 症候群; 繊維筋痛; 骨折処置; 虚弱, エイズ消耗症; 筋消耗症; 低身長; 診断薬; 女性不妊症; 脂肪異常栄養症。

10

20

30

40

【表 2 - 5】

カーゴポリペプチド	生物学的活性	例示的活性検定	適応症
IL-2 (アルデスロイキン; インターロイキン-2 融合毒素; T 細胞増殖因子; プロロイキン; イムナセ; セロイク; オンコリビン 2; マクロリン)	B および T 細胞の増殖を促進し、NK 細胞および CTL 細胞殺活性を増大する。	T 細胞増殖検定 “Biological activity of recombinant human interleukin-2 produced in Escherichia coli.” Science 223: 1412-1415, 1984. ナチュラルキラー (NK) 細胞および CTL 細胞傷害性検定 “Control of homeostasis of CD8+ memory T cells by opposing cytokines. Science 288: 675-678, 2000; CTL-2 proliferation: Gillis et al (1978) J. Immunol. 120, 2027	癌; 固形腫瘍; 転移性腎細胞癌; 転移性黒色腫; 悪性黒色腫; 黒色腫; 腎細胞癌; 腎臓癌; 肺癌 (例えば、非小細胞肺癌 または 小細胞肺癌); 結腸癌; 乳癌; 肝臓癌; 白血病; 前白血病; 血液学的悪性腫瘍; 血液学的障害; 急性骨髄性白血病; 黒色腫; 悪性黒色腫; 非ホジキンリンパ腫; 卵巣癌; 前立腺癌; 脳腫瘍; 神経膠腫; 未分化星状細胞腫; 肝炎; C型肝炎; リンパ腫; HIV 感染症 (エイズ); 炎症性腸障害; カボジ肉腫; 多発性硬化症; 関節炎; 関節リウマチ; 移植拒絶; 糖尿病; 1型 真性糖尿病; 2型糖尿病。
上皮小体ホルモン; パラチリン (PTH; オスタボリン; ALX1-11; hPTH 1-34; LY 333334; MN 10T; 上皮小体ホルモン (1-31); フォルテオ; パラサール)	カルシトニンと共に作用して、カルシウムおよびリン酸塩代謝を制御する; 血中カルシウムレベルを上げる; 骨細胞の活性を刺激する; 小腸から血液中への Ca ²⁺ /Pi の吸収を増強する; Ca ²⁺ の再吸収を促進し、腎臓尿管によりPiを抑制する。	Adenylyl cyclase stimulation in rat osteosarcoma cells, ovariectomized rat model of osteoporosis: IUBMB Life 2000 Feb; 49(2): 131-5	骨障害; 骨折防止; 高カルシウム血症; 悪性高カルシウム血症; 骨粗鬆症; バジエット病; 骨減少症; 破骨細胞生成; 骨溶解; 骨髄炎; 骨壊死; 歯周骨損失; 骨関節炎; 関節リウマチ; 骨化石症; 歯周性、溶解性または転移性骨疾患; 破骨分化抑制; 骨障害; 骨治療および再生。
レジスチン	II 型糖尿病におけるインスリン抵抗性を媒介する; インスリン刺激性グルコース取り込みを抑制する	II 型糖尿病に影響を及ぼすレジスチンの能力は、当該技術分野で既知の検定を用いて決定され得る: Pontoglio et al., J Clin Invest 1998 May 15; 101(10): 2215-22.	高血糖症; 糖尿病; 尿崩症; 真性糖尿病; 1型糖尿病; 2型糖尿病; インスリン抵抗性; インスリン欠乏症; 高脂血症; 高ケトン血症; 非インスリン依存性真性糖尿病 (NIDDM); インスリン依存性真性糖尿病 (IDDM); 糖尿病関連症状、例えば肥満症、心疾患、高血糖症、感染症、網膜症、および/または潰瘍(これらに限定されない); 代謝性障害; 免疫障害; 肥満症; 血管障害; 体重抑圧; 食欲抑圧; X 症候群。
TR6 (DcR3; デコイ受容体 3; FASTR)	Fas リガンドおよび AIM-2 (TL5, LIGHT) 媒介性アポトーシスを抑制する。	アネキシン染色、TUNEL 染色、カスパーゼレベルの測定により、細胞アポトーシスを測定し得る。細胞増殖の抑制もまた、例えば、ALOMAR Blue 染色により直接測定し得る。検定 refs: ヒト繊維肉腫における細胞傷害性検定 (Epsevik and Nissen-Meyer, 1986, J. Immunol. methods).	Fas リガンドおよび/または光誘導性アポトーシス障害: 肝炎; 肝不全 (例えば、劇症肝不全); 移植片対宿主病; 移植拒絶; 骨髄形成異常性症候群; 腎不全; インスリン依存性真性糖尿病; 関節リウマチ; 炎症性腸疾患; 自己免疫疾患; 毒性表皮壊死症; 多発性硬化症。
DeCAF (D- SLAM; BCM-様膜タンパク質; BLAME (B リン有リンパ球活性剤 マクロファージ 発現))x	B細胞の増殖および分化を抑制する; BLyS 活性を拮抗する。	DeCAF 活性は、当該技術分野で既知の検定、例えば国際公開番号 W00111046 の実施例 32~33 に記載されたものを用いて決定し得る。	B細胞 および/または T細胞 媒介性免疫障害; 免疫不全 (例えば、分類不能型免疫不全、選択的IgA欠乏症)

10

20

30

40

【表 2 - 6】

カーゴポリペプチド	生物学的活性	例示的活性検定	適応症
BLyS (B リンパ球刺激剤; ノイトロキシン アルファ; TL7; BAFF; TALL-1; THANK; 放射性標識化 BLyS)	B細胞の増殖、分化および生存を促進する; B細胞による免疫グロブリン産生を促進する	BLyS 活性は、当該技術分野で既知の検定、例えば同時刺激増殖 検定、ならびに Moore et al., 1999, Science, 285 (5425): 260-3 により開示されたその他の検定を用いて決定され得る。	B 細胞 および/または T 細胞媒介性免疫障害、特に低 B 細胞数または低血清免疫グロブリンに関連した免疫系障害; 免疫不全 (例えば、分類不能型免疫不全、選択的 IgA 欠乏症)。放射性標識型: リンパ腫、非ホジキンリンパ腫、慢性リンパ性白血病、多発性骨髄腫
抗-BLyS 一本鎖抗体 (scFvI116A01, scFvI050B11, scFvI006D08) 等。	BLyS 活性を作動または拮抗する。	BLyS アゴニストまたはアンタゴニスト活性は、当該技術分野で既知の検定、例えば、修正バージョンの同時刺激増殖検定 (Moore et al., 1999, Science, 285 (5425): 260-3 に開示) を用いて決定され得るが、この場合、BLyS は抗BLyS 抗体と混合されるかまたはそれとともに予備インキュベートされた後、応答体 B リンパ球に適用される。	B 細胞 および/または T 細胞 媒介性免疫 障害; 自己免疫障害、特に、自己抗体産生に関連した自己免疫疾患; 関節リウマチ、全身性紅斑性狼瘡; シェーグレン 症候群、自己分泌増殖因子としてBLySを発現する癌、例えばある種の慢性リンパ性 白血病。
MPIF-1 (骨髄始原細胞抑制因子; CK ベータ-8; ミノスチペン)	骨髄始原細胞を抑制する; および単球を活性化する。	MPIF-1 活性は、骨髄保護検定および走化性検定 (米国特許第 6,001,606 号に記載) を用いて測定され得る。	化学防護; 化学療法に対する補助剤; 炎症性障害; 癌; 白血病; 骨髄性白血病; 好中球減少症、原発性好中球減少症 (例えば、コストマン症候群); 続発性好中球減少症; 好中球減少症の防止; HIV感染者における好中球減少症の防止および処置; 化学療法に関連した好中球減少症の防止および処置; 好中球減少症に関連した感染症; 骨髄異形成; 自己免疫障害; 乾癬; 造血始原細胞の動員; 創傷治療; 自己免疫疾患; 移植; 骨髄 移植; 急性骨髄性白血病; リンパ腫、非ホジキンリンパ腫; 急性リンパ芽球性白血病; ホジキン病; 骨髄回復促進; グリコーゲン蓄積症。
KDI (ケラチノサイト 由来 インターフェロン; インターフェロン カッパ 前駆体)	骨髄増殖を抑制する; および抗ウイルス活性を示す。	KDI 活性は、抗ウイルスおよび細胞増殖 検定 (国際公開番号 WO0107608 の実施例 57 ~ 63 に記載) を用いて測定され得る。	多発性硬化症; 肝炎; 癌; ウィルス 感染症、HIV 感染、白血病。
TNFR2 (p75) (エンブレル)	TNF および TNF の両方に結合する; T 細胞 増殖 by TNF による T 細胞増殖を媒介する; 中等度 ~ 重度の活性関節リウマチ (RA) を有する患者における徴候および構造的損傷を低減する。	T 細胞増殖は、当該技術分野で既知の検定を用いて測定され得る。例えば "Lymphocytes: a practical approach" edited by: SL Rowland, AJ McMichael - chapter 6, pages 138-160 Oxford University Press (2000); および "Current Protocols on CD-ROM" section 3.12 proliferation Assays for T-cell Function John Wiley & Sons, Inc. (1999)。	自己免疫疾患; 関節リウマチ; 乾癬性関節炎; ステイル病; 強直性脊椎炎; 心血管管性疾患; 血管炎; ウェーゲナー肉芽腫症; アミロイドーシス; 全身性紅斑性狼瘡、インスリン依存性 真性糖尿病; 免疫不全 障害; 感染; 炎症; 炎症性腸疾患; クロウン病; 乾癬; エイズ; 移植拒絶; 移植片対宿主病。

10

20

30

40

【表 2 - 7】

カーゴポリペプチド	生物学的活性	例示的活性検定	適応症
ケラチノサイト 増殖因子 2 (レピフェルミン; KGF-2; 繊維芽細胞 増殖因子-10; FGF-10)	上皮細胞増殖を刺激する。	KGF-2 活性は、創傷治癒検定および上皮細胞増殖検定 (米国特許第 6,077,692 号に記載) を用いて測定され得る。	上皮細胞増殖を刺激する; 基底ケラチノサイトを刺激する; 創傷治癒; 毛包産生を刺激する; 皮膚創傷の治癒。創傷治癒; 眼組織創傷、歯組織創傷、口腔創傷、糖尿病性潰瘍、皮膚潰瘍、肘潰瘍、動脈潰瘍、静脈鬱血性潰瘍、熱暴露または化学薬品に起因する熱傷、またはその他の異常創傷治癒、尿毒、栄養異常、ビタミン不足のような症状、あるいはステロイド、放射線療法、あるいは抗腫瘍薬または抗代謝薬による全身性処置に伴う合併症; 皮膚損失後の皮膚再確立を促す; 創傷末に対する皮膚移植片の接着増大; 創傷からの再上皮化を刺激する; 皮膚強度を促進するため; 老化皮膚の外観を改善する; 肝細胞、肺、乳房、脾臓、胃、膀胱、小腸、大腸を増殖する; セボサイト、毛包、II型肺細胞、ムチン産生杯細胞、またはその他の上皮細胞、内皮細胞、ケラチノサイトまたは基底ケラチノサイト (およびそれらの始原細胞) (皮膚、肺、肝臓、膀胱、眼、唾液腺または消化管内に含有される); 放射線、化学療法処置に起因する、またはウイルス感染に起因する腸毒性の副作用を低減する; 細胞保護剤、特に小腸粘膜または膀胱の細胞保護剤; 粘膜炎 (口腔潰瘍); 皮膚の再生; 全および/または部分厚皮膚欠損、例えば熱傷、(例えば、毛包、汗腺および皮脂腺の再集約); 乾癬; 表皮剥離、水疱; 疱疹; 胃および/または十二指腸潰瘍; 痂皮を低減する; 炎症性腸疾患; クロウン病; 潰瘍性結腸炎; 腸毒; 肺損傷; 肺泡および/または気管支上皮の修復; 急性または慢性肺損傷; 気腫、ARDS; 吸入損傷; ヒアリン膜疾患; 乳児呼吸窮迫症候群; 未熟児における気管支肺異形成; 劇症肝不全; ウィルス性肝炎 および/または 毒性物質により引き起こされる肝硬変、肝臓損傷; 真性糖尿病; 炎症。
TR2 (および TR2sv1, TR2SV2; TNFRSF14; HVEM; ヘルペスウイルス エントリー・メディエーター; ATAR)	B 細胞増殖を抑制し、単純ヘルペスウイルス (HSV) 感染を媒介および抑制する。	同時刺激 B 細胞増殖検定および Ig 産生検定 (Moore et al., 1999, Science, 285(5425): 260-3.)。HSV-1 および HSV-2 感染性検定: 国際公開番号 WO 97/	ヘルペス; 免疫障害; 自己免疫疾患; 移植片対宿主病; 移植拒絶; 分類不能型免疫不全; 免疫不全症候群; 癌。

10

20

30

【表 2 - 8】

カーゴポリペプチド	生物学的活性	例示の活性検定	適応症
マクロファージ由来ケモカイン, MDC (Ck ベータ-13)	単球由来樹状細胞および IL-2 活性化ナチュラルキラー細胞に対する走化性。	04658 ケモカイン活性は、当該技術分野で既知の検定を用いて決定され得る: Methods in Molecular Biology, 2000, vol. 138: Chemokine Protocols. Edited by: A. E. I. Proudfoot, T. N. C. Wells, and C. A. Power. © Humana Press Inc., Totowa, NJ	炎症性疾患; 創傷治癒; 血管新生; エイズ感染。
HAGDG59 (腎臓短鎖デヒドロゲナーゼ)	樹状細胞における MIP1a 放出を活性化する。	樹状細胞検定は、当該技術分野で周知である。例えば、J. Immunol. 158: 2919-2925 (1997); J. Leukoc. Biol. 65: 822-828 (1999)。	免疫障害; 癌; ウィルス感染; 炎症; 敗血症; 関節炎; 喘息。
GnRH (ゴナドトロピン放出ホルモン)	脳下垂体前葉からの濾胞刺激ホルモンおよび黄体形成ホルモンの放出を促進する。	GnRH は、脳下垂体前葉ゴナドトロピン産生細胞における受容体に及ぼす直接作用により、in vivoで、濾胞刺激ホルモン(FSH) および/または黄体形成ホルモン(LH)の放出を引き起こすことが既知である。GnRH 活性は、GnRH補足の前後および後に、培養ゴナドトロピン産生細胞の培地中の FSH レベルを測定することにより決定され得る。例えば、Baker et al. Biol Reprod 2000 Sep; 63(3): 865-71.	不妊症; カルマン症候群またはその他の型の性腺刺激ホルモン性機能亢進 (思春期を自然に通過できない)。
テプロチド	アンギオテンシン変換酵素 (ACE) を抑制する。	ACE の抑制は、当該技術分野で既知の検定により決定され得る。例えば、Anzenbacherova et al., J. Pharma Biomed Anal 2001 Mar; 24(5-6): 1151-6.	高血圧症; 鬱血性心不全。
ヒト ケモカイン HCC-1 (ck ベータ-1; HMFBD)	炎症、アレルギー、組織拒絶、ウィルス感染および腫瘍生物学に関与; CD34+ 骨髄造血細胞の増殖を増強する。	ケモカイン活性は、当該技術分野で既知の検定を用いて決定され得る: Methods in Molecular Biology, 2000, vol. 138: Chemokine Protocols. Edited by: A. E. I. Proudfoot, T. N. C. Wells, and C. A. Power. © Humana Press Inc., Totowa, NJ	自己免疫障害; 免疫; 血管および炎症性障害; HIV; エイズ; 感染性疾患。
ACE2 阻害薬 (DX512)	アルドステロン産生、細胞脈平滑筋血管収縮、および心臓繊維芽細胞の増殖を誘導するアンギオテンシン II の産生を抑制する。血管新生を誘導する; アンギオテンシン I をアンギオテンシン 1~9 に変換する; また、des-Arg、ブラジキニンおよびニューロテンシンを切断する酵素。	アンギオテンシンの抑制は、当該技術分野で既知の検定を用いて決定され得る。例えば、ラット心臓繊維芽細胞を用いる増殖検定を in vitro で用いる (Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 1999 May; 359(5): 394-9 に記載)。	アンギオテンシン II および/またはアルドステロンレベル上昇(血管閉塞、心臓拍出量減損をもたらす得る) および/または高血圧症; 心臓血管性疾患に対する処置; 心不全; 糖尿病; II 型糖尿病; タンパク尿; 腎臓障害、鬱血性心不全。

10

20

30

40

【表 2 - 9】

カーゴポリペプチド	生物学的活性	例示的活性検定	適応症
TR1 (OCIF; 破骨細胞生成阻害因子; オステオプロテゲリン, OPG; 腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリー成員 11B 前駆体)	破骨細胞生成および骨吸収を抑制し、繊維芽細胞増殖を誘導する。	破骨細胞生成に関する同時培養検定、骨吸収検定(大腿長骨器官培養系を使用)、象牙質吸収検定、ならびに繊維芽細胞増殖検定は、Kwon et al., FASEB J. 12: 845-854 (1998)に各々記載されている。	骨粗鬆症; パジェット病; 骨減少症; 骨溶解; 骨髄炎; 骨壊死; 歯周骨損失; 骨関節炎; 関節リウマチ; 骨化石症; 歯周、溶解性または転移性骨疾患; 破骨分化抑制; 骨障害; 骨治癒および再生; 臓器石灰化; 血管石灰化。
ヒト ケモカイン Ck ベータ-7	活性化(CD3+)T 細胞および非活性化(CD14-)リンパ球ならびに (CD4+) および (CD8+) T リンパ球および (CD45RA+) T 細胞に対する走化性	ケモカイン活性は、当該技術分野で既知の検定を用いて決定され得る:Molecular Biology, 2000, vol. 138: Chemokine Protocols. Edited by: A. E. I. Proudfoot, T. N. C. Wells, and C. A. Power. © Humana Press Inc., Totowa, NJ	癌; 創傷治癒; 炎症性障害; 免疫調節障害; アテローム硬化症; 寄生物感染; 関節リウマチ; 喘息; 自己免疫障害。
CK ベータ 4 (HGBAN46; HE9DR66)	殺菌性白血球を引き付け、活性化する; CCR6 発現未熟樹状細胞および記憶/エフェクターT細胞を引き付ける; B 細胞 走化性; 骨髄始原細胞の増殖を抑制する; PBMC の走化性。	ケモカイン活性は、当該技術分野で既知の検定を用いて決定され得る:Molecular Biology, 2000, vol. 138: Chemokine Protocols. Edited by: A. E. I. Proudfoot, T. N. C. Wells, and C. A. Power. © Humana Press Inc., Totowa, NJ	癌; 固形腫瘍; 慢性感染; 自己免疫障害; 乾癬; 喘息; アレルギー; 造血; 創傷治癒; 骨髄不全; 珪肺病; サルコイドーシス; 好酸球増加症候群; 肺炎; 繊維性障害; アテローム硬化症; 歯周病; ウイルス性疾患; 肝炎。
レプチン	食欲調節、体重低減、ならびにインスリンおよびグルコースレベル低下により肥満症を制御する。	食物摂取の in vivo 調整、体重の低減、ならびにインスリンおよびグルコースレベルの低下 (ob/ob マウス)、ラジオイムノアッセイ (RIA) および細胞ベースの検定におけるレプチン受容体の活性化。Protein Expr Purif 1998 Dec; 14(3): 335-42	高血糖症; 糖尿病; 尿崩症; 真性糖尿病; 1型糖尿病; 2型糖尿病; インスリン抵抗性; インスリン欠乏症; 高脂血症; 高ケトン血症; 非インスリン依存性真性糖尿病 (NIDDM); インスリン依存性真性糖尿病 (IDDM); 糖尿病関連症状、例えば肥満症、心疾患、高血糖症、感染症、網膜症、および/または潰瘍(これらに限定されない); 代謝性障害; 免疫障害; 肥満症; 血管障害; 体重抑圧; 食欲抑圧; X症候群; 免疫学的障害; 免疫抑制。
IL-1 受容体 アンタゴニスト (アナキンラ; 可溶性インターロイキン-1 受容体; アイラップ; キネレット; アントリル)	標的T細胞を活性化せずに IL1 受容体に結合する; IL1-アルファおよび IL1-ベータの結合を抑制する; ならびに IL1-アルファおよび IL1-ベータの生物活性を中和する。	1) YT-NCI または C3H/HeJ 細胞におけるIL-1受容体に対するIL-1結合に関する競合 (Carter et al., Nature 344: 633-638, 1990); 2) IL-1誘導内皮細胞-白血球接着の抑制 (Carter et al., Nature 344: 633-638, 1990); 3) IL-1の抗増殖作用を非常に受けやすいヒト黒色腫細胞株である A375-C6 細胞に関する増殖検定 (Murai T et al., J. Biol. Chem. 276: 6797-6806, 2001)。	自己免疫疾患; 関節炎; 関節リウマチ; 喘息; 糖尿病; 真性糖尿病; GVHD; 炎症性 Bowel 障害; クロウン病; 眼性炎症; 乾癬; 敗血症性ショック; 移植拒絶; 炎症性障害; リウマチ性障害; 骨粗鬆症; 閉経後骨粗鬆症; 卒中。

10

20

30

40

【表 2 - 1 0】

カーゴポリペプチド	生物学的活性	例示的活性検定	適応症
TREM-1 (単球1上で発現されるトリガリング受容体 1)	好中球および単球の活性化を媒介する; 好中球および単球媒介性炎症応答を刺激する; TNF, IL-8 および MCP-1 の分泌を促進する; 好中球脱顆粒, Ca ²⁺ 動員, ならびに 細胞外シグナル関連キナーゼ 1 (ERK1), ERK2 およびホスホリパーゼ C-γ のチロシンリン酸化を誘導する。	サイトカインの分泌、ケモカイン、脱顆粒、および細胞表面活性化マーカーは、Bouchon et al, J Immunol 2000 May 15; 164(10): 4991-5 に記載される検定を用いて決定され得る。	炎症; 敗血症; 細菌性 感染; 自己免疫疾患; GVHD。
HCNA73	CD152 マーカートのT細胞活性化-発現を誘導する; 未熟単球由来樹状細胞からの TNF-α および MIP-1α 放出を刺激する; 樹状細胞の成熟を促進する。	FMAT は、T細胞表面マーカー (CD69, CD152, CD71, HLA- DR) およびT細胞サイトカイン産生(例えば、IFNγ 産生)を測定するために用いられ得る。J. of Biomol. Screen. 4: 193-204 (1999). その他のT細胞増殖 検定: "Lymphocytes: a practical approach" edited by: SL Rowland, AJ McMichael - Chapter 6, pages 138-160 Oxford University Press (2000); WO 01/21658 Examples 11-14, 16-17 and 33.	自己免疫障害; 消化管の炎症 ; 癌; 結腸癌; アレルギー; クローン病。
VEGF-2 (血管内皮細胞増殖因子-2; VEGF-C)	内皮細胞増殖を促進する。	VEGF 活性は、当該技術分野で既知の検定、例えば国際公開番号 WO0045835 に開示される検定を用いて決定され得る。	冠動脈疾患; 危機的 四肢虚血; 血管性疾患; 血管およびリンパ管の両方の内皮細胞の増殖。アンタゴニストが、抗血管新生剤として有用であり得る; 癌。
HCHNF25 (ジャンピング転位ブレイクポイント)	樹状細胞における MIP1α 放出を活性化する。	樹状細胞検定は、当該技術分野で周知である。例えば、J. Immunol. 158: 2919-2925 (1997); J. Leukoc. Biol. 65: 822-828 (1999).	免疫障害; 癌。
HLDOU18 (骨形態形成タンパク質 9 (BMP9); 成長分化因子-2 前駆体 (GDF-2 前駆体))	L6/GSK3 キナーゼ検定を活性化する。	GSK3 キナーゼ活性の活性化に関する検定は、当該技術分野で周知である。例えば、Biol. Chem. 379(8-9): 1101-1110. ; Biochem J. 1993 Nov 15; 296 (Pt 1): 15-9.	高血糖症; 糖尿病; 尿崩症; 真性糖尿病; 1型 糖尿病; 2型 糖尿病; インスリン抵抗性; インスリン欠乏症; 高脂血症; 高ケトン血症; 非インスリン依存性 真性糖尿病 (NIDDM); インスリン依存性 真性糖尿病 (IDDM); 糖尿病関連症状、例えば、肥満症、心疾患、高血糖症、感染症、網膜症、および/または 潰瘍(これらに限定されない); 代謝性 障害; 免疫 障害; 肥満症; 血管 障害; 体重抑圧; 食欲抑圧; X 症候群。

10

20

30

40

【表 2 - 1 1】

カーゴポリペプチド	生物学的活性	例示的活性検定	適応症
グルカゴン様ペプチド 1 (GLP1; インスリノトロピン)	インスリンの合成および放出を刺激する; インスリンに対する脂肪、筋肉および肝臓組織の感受性を増強する; グルコース取り込みを刺激する; 消化過程を遅らせる; 食欲を抑える; グルカゴンの分泌を遮断する。	GLP1 活性は、[3-H]-グルコース取り込み検定を用いて、in vitro で検定され得る (J Biol Chem 1999 Oct 22; 274(43): 30864-30873)。	高血糖症; 糖尿病; 尿崩症; 真性糖尿病; 1型 糖尿病; 2型 糖尿病; インスリン抵抗性; インスリン欠乏症; 高脂血症; 高ケトン血症; 非インスリン依存性 真性糖尿病 (NIDDM); インスリン依存性 真性糖尿病 (IDDM); 糖尿病関連症状、例えば 肥満症、心疾患、高血糖症、感染症、網膜症、および/または 潰瘍(これらに限定されない); 代謝性 障害; 免疫 障害; 肥満症; 血管 障害; 体重抑圧; 食欲抑圧; X 症候群。
エキセジン-4 (AC-2993)	インスリンの合成および放出を刺激する; インスリンに対する脂肪、筋肉および肝臓組織の感受性を増強する; グルコース取り込みを刺激する; 消化過程を遅らせる; 食欲を抑える; グルカゴンの分泌を遮断する。	エキセジン-4 活性は、[3-H]-グルコース取り込み検定を用いて、in vitro で検定され得る。 (J Biol Chem 1999 Oct 22; 274(43): 30864-30873)。	高血糖症; 糖尿病; 尿崩症; 真性糖尿病; 1型 糖尿病; 2型 糖尿病; インスリン抵抗性; インスリン欠乏症; 高脂血症; 高ケトン血症; 非インスリン依存性 真性糖尿病 (NIDDM); インスリン依存性 真性糖尿病 (IDDM); 糖尿病関連症状、例えば、肥満症、心疾患、高血糖症、感染症、網膜症、および/または 潰瘍(これらに限定されない); 代謝性 障害; 免疫 障害; 肥満症; 血管 障害; 体重抑圧; 食欲抑圧; X 症候群。
T20 (T20 HIV 阻害 ペプチド、DP178; DP178 HIV 阻害 ペプチド)	HIV gp41 膜貫通 タンパク質 エクトドメインの残基 643-678 からのペプチド(これは、その静止状態で gp41 と結合して、融合状態への形質転換を防止する)	Zhang et al., Sep. 26 2002, Sciencexpress (www.sciencexpress.org) に記載されたような、ウイルス抑制検定。	HIV; エイズ; SIV (サル免疫不全ウイルス) 感染。
T1249 (T1249 HIV 阻害 ペプチド; T1249 抗-HIV ペプチド)	第二世代 HIV 融合 阻害薬	Zhang et al., Sep. 26 2002, Sciencexpress (www.sciencexpress.org) に記載されたようなウイルス抑制検定。	HIV; エイズ; SIV (サル 免疫不全 ウィルス) 感染

10

20

30

【表 2 - 1 2】

カーゴポリペプチド	生物学的活性	例示の活性検定	適応症
インターフェロン ハイブリッド、具体的に選択されるのは: IFN アルファ A/D ハイブリッド (BgIII バージョン) IFN アルファ A/D ハイブリッド (PvuII バージョン) IFN アルファ A/F ハイブリッド IFN アルファ A/B ハイブリッド IFN ベータ 1/アルファ D ハイブリッド (IFN ベータ 1/アルファ-1 ハイブリッド) IFN アルファ/ベータ ハイブリッド	一連の細胞応答、例えば抗ウイルス、抗増殖性、抗腫瘍および免疫調節活性を付与する; 2つの酵素: プロテインキナーゼおよびオリゴヌクレオチルシナーゼの産生を刺激する。さらに、MHC 抗原発現、NK 細胞活性および IFN γ 産生、ならびに単球における IL12 産生を調整する。	抗ウイルス検定: Rubinstein S, Familletti PC, Pestka S. (1981) Convenient assay for interferon. J. Virol. 37(2): 755-8; 抗増殖検定: Gao Y, et al (1999) Sensitivity of an epstein-barr virus-positive tumor line, Daudi, to alpha interferon correlates with expression of a GC-rich viral transcript. Mol Cell Biol. 19(11): 7305-13.	ウイルス 感染症; HIV 感染; 肝炎; 慢性 肝炎; B 型肝炎; 慢性 B 型肝炎; C 型肝炎; 慢性 C 型肝炎; D 型肝炎; 慢性 D 型肝炎; ヒト パピローマウイルス; 単純ヘルペスウイルス感染; 外部尖圭コンジローマ; HIV; HIV 感染症; 腫瘍学; 癌; 固形腫瘍; 黒色腫; 悪性黒色腫; 腎臓癌 (例えば、腎細胞癌); 肺癌 (例えば、非小細胞肺癌 または 小細胞肺癌) 結腸癌; 乳癌; 肝臓癌; 前立腺癌; 膀胱癌; 胃癌; 肉腫; エイズ関連カポジ肉腫; リンパ腫; T 細胞 リンパ腫; 皮膚 T 細胞 リンパ腫; 非ホジキン リンパ腫; 脳腫瘍; 神経膠腫; 未分化星状細胞腫; 子宮頸部形成異常; 白血病; 前白血病; 骨髄 障害; 骨 障害; 毛様細胞性白血病; 慢性 骨髄性白血病; 血液学的悪性腫瘍; 血液学的障害; 多発性骨髄腫; 細菌性 感染症; 化学防護; 血小板減少症; 多発性硬化症; 肝臓線維症; 加齢性黄斑変性; 黄斑変性; クロウン病; 神経学的障害; 関節炎; 関節リウマチ; 潰瘍性結腸炎; 骨粗鬆症; 骨減少症; 破骨細胞生成; 繊維筋痛; シェーグレン 症候群; 慢性 疲労 症候群; 発熱; 出血性発熱; ウイルス性出血性発熱; 高血糖症; 糖尿病; 尿崩症; 真性糖尿病; 1 型 糖尿病; 2 型糖尿病; インスリン抵抗性; インスリン 欠乏症; 高脂血症; 高ケトン血症; 非インスリン 依存性 真性糖尿病 (NIDDM); インスリン依存性 真性糖尿病 (IDDM); 糖尿病関連症状、例えば、肥満症、心疾患、高血糖症、感染症、網膜症 および/または 潰瘍(これらに限定されない); 代謝性 障害; 免疫 障害; 肥満症; 血管 障害; 体重 抑圧; 食欲抑圧; X 症候群。
B-型 ナトリウム利尿ペプチド (BNP、脳性ナトリウム利尿ペプチド)	平滑筋弛緩および血管拡張、ナトリウム利尿を刺激する、およびレニン-アンギオテンシンおよびエンドセリンの抑圧。	アンギオテンシンの抑制は、当該技術分野で既知の検定を用いて確定され得る。例えば、ラット心臓繊維芽細胞を伴う増殖検定を in vitro で用いる (Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 1999 May; 359(5): 394-9 に記載)。血管拡張は、等圧動脈グラフ系における小腎動脈の筋原性応答を測定することにより、動物において測定され得る (Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 2002 Aug; 283(2): R349-R355 参照)。ナトリウム利尿は、尿中のナトリウムの量を測定することにより決定される。	鬱血性心不全; 心臓容積過負荷; 心代償不全; 心不全; 左心室機能不全; 呼吸困難

10

20

30

40

【表 2 - 1 3】

カーゴポリペプチド	生物学的活性	例示的活性検定	適応症
α-デフェンシン、例えばアルファ 1 デフェンシン、アルファ 2 デフェンシン、アルファ 3 デフェンシン (骨髄関連デフェンシン; DEFA1; 好中球特異性 デフェンシン; CAF)	HIV 複製の抑制; 細菌、真菌およびエンベロープウイルスに対して活性。	Zhang et al., Sep. 26 2002, Scienceexpress (www.scienceexpress.org) に記載されたような、ウイルス抑制検定。	HIV、エイズ; ARC。
ホスファトニン (マトリクス 細胞外ホスホ糖タンパク質; MEPE)	リン酸塩代謝の調節。	血中リン酸塩レベルは、当該技術分野で既知の方法、例えば低リン酸塩血症ラットバイオアッセイを用いて測定され得る。Zoolog Sci 1995 Oct; 12(5): 607-10.	過リン酸血症; 慢性腎不全における過リン酸血症; 低リン酸血症; 骨軟化症; くる病; X 染色体関連優性低リン酸血症性くる病/骨軟化症 (XLR); 常染色体優性低リン酸血症性くる病/骨軟化症 (ADHR); 腫瘍誘導性くる病/骨軟化症 (TIO)。
PIpal-12 (ペプツシン、PAR1 ベースのペプツシン)	プロテアーゼ活性化受容体 (PAR) シグナル伝達およびヒト血小板のトロンビン媒介性凝集の調節。	血小板凝集は、Nature Medicine 2002 Oct; 8(10): 1161-1165 に記載されたような、当該技術分野で既知の方法を用いて測定され得る。	全身性血小板活性化、血栓、心臓発作、卒中および/または凝血障害に対する防御。
P4pal-10 (ペプツシン、PAR4 ベースのペプツシン)	プロテアーゼ活性化受容体 (PAR) シグナル伝達およびヒト血小板のトロンビン媒介性凝集の調節。	血小板凝集は、Nature Medicine 2002 Oct; 8(10): 1161-1165 に記載されたような、当該技術分野で既知の方法を用いて測定され得る。	全身性血小板活性化、血栓、心臓発作、卒中および/または凝血障害に対する防御。
HRDFD27	T細胞の増殖 に関与する; TNF ガンマの産生。	T 細胞増殖は、当該技術分野で既知の方法を用いて測定され得る。例えば、"Lymphocytes: a practical approach" edited by: SL Rowland, AJ McMichael - chapter 6, pages 138-160 Oxford University Press (2000); および "Current Protocols on CD-ROM" section 3.12 増殖 Assays for T-cell Function John Wiley & Sons, Inc. (1999).	化学防護; 化学療法に対する補助剤; 炎症性障害; 癌; 白血病; 骨髄性白血病; 好中球減少症、原発性好中球減少症 (例えば、コストマン症候群); 続発性好中球減少症; 好中球減少症の防止; HIV感染患者における好中球減少症の防止および処置; 化学療法に関連した好中球減少症の防止および処置; 好中球減少症に関連した感染症; 骨髄異形成; 自己免疫障害; 乾癬; 造血始原細胞の動員; 創傷治癒; 自己免疫疾患; 移植; 骨髄移植; 急性骨髄性白血病; リンパ腫、非ホジキン リンパ腫; 急性 リンパ芽球性白血病; ホジキン病; 骨髄回復促進; グリコーゲン蓄積症

10

20

30

【表 2 - 1 4】

カーゴポリペプチド	生物学的活性	例示的活性検定	適応症
HWIGZ51 (CD59; 転移関連 GPI-接着タンパク質 相同体)	免疫応答を刺激し、単核球、好酸球および PMN 浸潤を誘導することにより炎症を誘導する; 乳癌、卵巣癌、白血病および黒色腫の増殖を抑制する; 結腸、肺、乳房および直腸腫瘍において過剰発現される; 脂肪細胞および骨格筋によるグルコースおよび/または FFA 取り込みを調節する; 軟骨細胞の再分化を誘導する	軟骨細胞分化に影響を及ぼす能力は、Bone (1995) Sep; 17(3): 279-86 に記載されたような当該技術分野で既知の方法を用いて測定され得る。	骨格性疾患および障害; 筋肉骨格性疾患および障害; 骨折および/または骨破壊; 骨粗鬆症 (閉経後、老人性または特発性若年性); 痛風 および/または 擬似痛風; パジエット病; 骨関節炎; 骨の腫瘍 および/または癌 (骨軟骨腫、良性軟骨腫、軟骨芽細胞腫、chondromyxoid 繊維腫、類骨腫、巨大細胞腫瘍、多発性骨髄腫、骨肉腫、繊維肉腫、悪性繊維性組織球腫、軟骨肉腫、ユーイング腫瘍、および/または 悪性リンパ腫); 骨および関節感染症 (骨髄炎および/または 感染性関節炎); シェルコー 関節; 踵棘突起; シーバー病; スポーツ損傷; 癌; 固形腫瘍; 黒色腫; 悪性黒色腫; 腎臓癌 (例えば、腎細胞癌); 肺癌 (例えば、非小細胞肺癌または小細胞肺癌) 結腸癌; 乳癌; 肝臓癌; 前立腺癌; 膀胱癌; 胃癌; 肉腫; エイズ関連カポジ肉腫; リンパ腫; T 細胞 リンパ腫; 皮膚 T 細胞 リンパ腫; 非ホジキンリンパ腫; 脳腫瘍; 神経膠腫; 未分化星状細胞腫; 子宮頸部形成異常; 白血病; 前白血病; 骨髄障害; 骨 障害; 毛様細胞性白血病; 慢性 骨髄性白血病; 血液学的悪性腫瘍; 血液学的障害; 多発性骨髄腫; 腎臓疾患および障害; シェーンライン・ヘンッホ紫斑病、ベルガー病、セリアック病、疱疹状皮膚炎、クローン病; 糖尿病; 尿崩症; 真性糖尿病; 1 型糖尿病; 2 型糖尿病; インスリン抵抗性; インスリン欠乏症; 高脂血症; 高ケトン血症; 非インスリン依存性 真性糖尿病 (NIDDM); インスリン依存性 真性糖尿病 (IDDM); 糖尿病関連症状、例えば、肥満症、心疾患、高血糖症、感染症、網膜症、および/または 潰瘍(これらに限定されない); 代謝性 障害; 免疫 障害; 肥満症; 血管障害; 体重抑圧; 食欲抑圧; X 症候群; 腎臓障害; 高インスリン血症; 低インスリン血症; 免疫学的 障害 (例えば、関節炎、喘息、免疫不全 性疾患、エイズ、関節リウマチ、肉芽腫性疾患、炎症性腸疾患、敗血症、ざ瘡、好中球減少症、好中球増加症、乾癬、過敏症、T 細胞 媒介性 細胞傷害、宿主対移植片病、自己免疫障害、脱髄、全身性紅斑性狼瘡、薬剤誘導性溶血性貧血、関節リウマチ、シェーグレン病、強皮症)

10

20

30

40

【表 2 - 1 5】

カーゴポリペプチド	生物学的活性	例示的活性検定	適応症
C17 (サイトカイン様タンパク質 C17)	脂肪細胞によるグルコースおよび/または FFA 取り込みを抑制する; 腎臓メサンギウム細胞の増殖を誘導する; サイトカイン産生および抗原提示の調節	腎臓メサンギウム細胞の増殖は、J. Investig. Med. (1998) Aug; 46(6): 297-302 に記載された技法を用いて検定され得る。	腎臓疾患および障害; シェーンライン・ヘンッホ紫斑病、ベルガー病、セリアック病、疱疹状皮膚炎、クローン病; 糖尿病; 尿毒症; 真性糖尿病; 1 型糖尿病; 2 型糖尿病; インスリン抵抗性; インスリン欠乏症; 高脂血症; 高ケトン血症; 非インスリン依存性真性糖尿病 (NIDDM); インスリン依存性真性糖尿病 (IDDM); 糖尿病関連症状、例えば、肥満症、心疾患、高血糖症、感染症、網膜症、および/または潰瘍(これらに限定されない); 代謝性障害; 免疫障害; 肥満症; 血管障害; 体重抑圧; 食欲抑圧; X 症候群; 腎臓障害; 高インスリン血症; 低インスリン血症; 造血障害; 免疫学的疾患および障害; 発達性疾患および障害; 肝臓疾患および障害; 癌 (特に白血病); 免疫学的障害 (例えば、関節炎、喘息、免疫不全性疾患、エイズ、関節リウマチ、肉芽腫性疾患、炎症性腸疾患、敗血症、さ瘡、好中球減少症、好中球増加症、乾癬、過敏症、T 細胞媒介性細胞傷害性、宿主対移植片病、自己免疫障害、脱髄、全身性紅斑性狼瘡、薬剤誘導性溶血性貧血、関節リウマチ、シェーグレン病、強皮症)
HDPBQ71	IFN ガンマの産生および分泌を調節する; 骨髄細胞および/または造血細胞の活性化	本発明のペプチド (例えば、本発明の抗体およびアゴニストまたはアンタゴニスト) の免疫調節活性を試験するために用いられるかまたは慣例的に修正され得るような検定としては、Miraglia et al., J Biomolecular Screening 4: 193-204 (1999); Rowland et al., "Lymphocytes: a practical approach" Chapter 6: 138-160 (2000); Gonzalez et al., J Clin Lab Anal 8(5): 225-233 (1995); Billiau et al., Ann NY Acad Sci 856: 22-32 (1998); Boehm et al., Annu Rev Immunol 15: 749-795 (1997), and Rheumatology (Oxford) 38(3): 214-20 (1999) に開示された検定が挙げられる。	血液障害および感染 (例えば、ウイルス性感染症、結核、慢性肉芽腫性疾患および悪性骨粗鬆症に関連した感染症); 自己免疫疾患 (例えば関節リウマチ、全身性紅斑性狼瘡、多発性硬化症); 免疫不全、T 細胞媒介性免疫応答を追加免疫すること、および T 細胞媒介性免疫応答を抑制すること; 炎症および炎症性障害; 特発性肺繊維症; 新生物性疾患 (例えば、白血病、リンパ腫、黒色腫); 新生物および癌、例えば、白血病、リンパ腫、黒色腫、および前立腺癌、乳癌、肺癌、結腸癌、膵臓癌、食道癌、胃癌、脳腫瘍、肝臓癌および泌尿器癌; 良性増殖不全障害 および前新生物性症状、例えば、過形成、化生および/または異形成; 貧血; 汎血球減少; 白血球減少症; 血小板減少症; ホジキン病; 急性リンパ性貧血 (ALL); 形質細胞腫; 多発性骨髄腫; パーキットリンパ腫; 関節炎; エイズ; 肉芽腫性疾患; 炎症性腸疾患; 敗血症; 好中球減少症; 好中球増加症; 乾癬; 移植臓器および組織に対する免疫反応の抑圧; 血友病; 凝固更新; 真性糖尿病; 心内膜炎; 髄膜炎; ライム病; 喘息; アレルギー

10

20

30

40

【表 2 - 1 6】

カーゴポリペプチド	生物学的活性	例示的活性検定	適応症
オスカル(破骨細胞関連受容体 アインフォーム-3)	破骨細胞分化の調節物質；生得性および適応性免疫応答の調節物質	破骨細胞分化を検出するための検定は、J. Exp. Med. (2002) Jan 21; 195(2): 201-9 に記載されている。	骨格性疾患および障害；筋肉骨格性疾患および障害；骨折および／または骨破壊；骨粗鬆症（閉経後、老人性または特発性若年性）；痛風 および／または 擬似痛風；パジェット病；骨関節炎；骨の腫瘍 および／または 癌（骨軟骨腫、良性軟骨腫、軟骨芽細胞腫、軟骨粘液 繊維腫、類骨骨腫、巨大細胞 腫瘍、多発性骨髄腫、骨肉腫、繊維肉腫、悪性繊維性組織球腫、軟骨肉腫、ユーイング腫瘍、および／または 悪性リンパ腫）；骨および関節感染症（骨髄炎および／または感染性関節炎）；シャルコー 関節；踵棘突起；シーバー病；スポーツ損傷
ツムスタチン(T5、T7 または T8 ペプチド；α3(IV)NC1)	血管新生を抑制する；腫瘍増殖を抑制する；タンパク質合成を抑制する	腫瘍細胞増殖検定は、J. Biol. Chem. (1997) 272: 20395-20401 に記載されている。タンパク質合成は、Science (2002) Jan 4; 295(5552): 140-3 に記載されたように測定され得る。	癌；固形腫瘍；黒色腫；悪性黒色腫；腎臓癌（例えば、腎細胞癌）；肺癌（例えば、非小細胞肺癌または小細胞肺癌）結腸癌；乳癌；肝臓癌；前立腺癌；膀胱癌；胃癌；肉腫；エイズ関連カポジ肉腫；リンパ腫；T 細胞リンパ腫；皮膚 T 細胞リンパ腫；非ホジキンリンパ腫；脳腫瘍；神経膠腫；未分化星状細胞腫；子宮頸部形成異常；白血病；前白血病；骨髄 障害；骨 障害；毛様細胞性白血病；慢性骨髄性白血病；血液学的悪性腫瘍；血液学的障害；多発性骨髄腫；血管新生
CNTF（毛様体神経栄養因子）	ミエリン形成を増強する；光受容体分解を低減する；カルシウム流を調節する	ミエリン形成の調節は、J. Neurosci. (2002) Nov. 1; 22(21): 9221-7 に記載されたように検定され得る。	神経学的および神経疾患および障害、特にミエリン鞘および脱髄に関連した疾患および 障害、例えば ALS、多発性硬化症、ハンチントン病；ニューロンおよび脊髄損傷；眼の障害、例えば網膜炎、網膜色素変性、盲目、色盲、黄斑変性。

10

20

30

【表 2 - 1 7】

カーゴポリペプチド	生物学的活性	例示の活性検定	適応症
ソマトスタチン(オクトレオチド; 酢酸オクトレオチド; サンドスタチン LAR(登録商標))	成長ホルモン、グルカゴンおよびインスリンを抑制する; GnRH に対する LRF 応答を抑制する; 内臓血流を減少する; セロトニン、ガストリン、血管活性腸ペプチド、セクレチン、モチリンおよび膵臓ポリペプチドの放出を抑制する。	ソマトスタチンによるヒトにおける成長ホルモン放出の抑制は、J. Clin. Endocrinol. Metab. (1973) Oct; 37(4): 632-4 に記載されたように測定され得る。ソマトスタチンによるインスリン分泌の抑制は、the Lancet (1973) Dec. 8; 2(7841): 1299-1301 に記載されたように測定され得る。	癌; 転移性 癌腫 腸重瘍; 血管作動性腸管ペプチド分泌腺腫; 下痢および紅潮; 前立腺癌および癌; 乳癌; 消化管障害 および癌; 内分泌系の癌; 頭部および首の傍神経節腫; 肝臓障害および癌; 鼻咽頭癌; 甲状腺障害および癌; 末端肥大症; カルチノイド症候群; 胆嚢障害、例えば、胆嚢収縮性疾患および異常胆汁分泌; 乾癬; 糖尿病; 尿崩症; 真性糖尿病; 1型糖尿病; 2型 糖尿病; インスリン抵抗性; インスリン欠乏症; 高脂血症; 高ケトン血症; 非インスリン依存性 真性糖尿病 (NIDDM); インスリン依存性 真性糖尿病 (IDDM); 糖尿病関連症状、例えば肥満症、心疾患、高血糖症、感染症、網膜症、および/または潰瘍(これらに限定されない); 代謝性障害; 免疫 障害; 肥満症; 血管 障害; 体重抑圧; 食欲抑圧; X 症候群; 腎臓 障害; 神経学的障害 および 疾患、例えばアルツハイマー病、パーキンソン病および痴呆; 神経精神学的障害、例えば、相対性運動障害; 関節リウマチ; 高血圧症; 頭蓋内高血圧症; 食道静脈瘤; グレーブス病; 発作; 癲癇; 胃炎; 血管新生;
IL-22 (IL22、インターロイキン-22; IL17D、IL27)	骨格筋細胞におけるグルコース取り込みを刺激する; 骨格筋インスリン感受性を増大する。	IL-22 活性は、[3-H]-グルコース取り込み検定を用いて in vitro で検定され得る。(J Biol Chem 1999 Oct 22; 274(43): 30864-30873).	高血糖症; 糖尿病; 尿崩症; 真性糖尿病; 1型 糖尿病; 2型 糖尿病; インスリン抵抗性; インスリン欠乏症; 高脂血症; 高ケトン血症; 非インスリン依存性 真性糖尿病 (NIDDM); インスリン依存性 真性糖尿病 (IDDM); 糖尿病関連症状、例えば肥満症、心疾患、高血糖症、感染症、網膜症、および/または潰瘍(これらに限定されない); 代謝性 障害; 免疫 障害; 肥満症; 血管 障害; 体重抑圧; 食欲抑圧; X 症候群。
HCE1P80	グルコース取り込みを刺激する; インスリン感受性を増大する	HCE1P80 活性は、[3-H]-グルコース取り込み検定を用いて in vitro に検定され得る。(J Biol Chem 1999 Oct 22; 274(43): 30864-30873).	高血糖症; 糖尿病; 尿崩症; 真性糖尿病; 1型 糖尿病; 2型 糖尿病; インスリン抵抗性; インスリン欠乏症; 高脂血症; 高ケトン血症; 非インスリン依存性 真性糖尿病 (NIDDM); インスリン依存性 真性糖尿病 (IDDM); 糖尿病関連症状、例えば肥満症、心疾患、高血糖症、感染症、網膜症、および/または潰瘍(これらに限定されない); 代謝性 障害; 免疫 障害; 肥満症; 血管 障害; 体重抑圧; 食欲抑圧; X 症候群。

10

20

30

40

【表 2 - 1 8】

カーゴポリペプチド	生物学的活性	例示の活性検定	適応症
HDRMI82	グルコース取り込みを刺激する; インスリン感受性を増大する。	HDRMI82 活性は、[3-H]-グルコース取り込み検定を用いて in vitro で検定され得る。(J Biol Chem 1999 Oct 22; 274(43): 30864-30873).	高血糖症; 糖尿病; 尿崩症; 真性糖尿病; 1型 糖尿病; 2型 糖尿病; インスリン抵抗性; インスリン欠乏症; 高脂血症; 高ケトン血症; 非インスリン依存性 真性糖尿病 (NIDDM); インスリン依存性 真性糖尿病 (IDDM); 糖尿病関連症状、例えば肥満症、心疾患、高血糖症、感染症、網膜症、および/または潰瘍(これらに限定されない); 代謝性 障害; 免疫 障害; 肥満症; 血管 障害; 体重抑圧; 食欲抑圧; X 症候群。
HDALV07 (アディポネクチン; ゼラチン結合 28k タンパク質 前駆体; アディポーズ最も豊富な遺伝子転写体; APM-1; GBP28; ACRP30; ADIPOQ)	インスリン作用を調整する	インスリン活性は、[3-H]-グルコース取り込み検定を用いて in vitro で測定され得る。(J Biol Chem 1999 Oct 22; 274(43): 30864-30873).	糖尿病; 尿崩症; 真性糖尿病; 1型 糖尿病; 2型 糖尿病; インスリン抵抗性; インスリン欠乏症; 高脂血症; 高ケトン血症; 非インスリン依存性 真性糖尿病 (NIDDM); インスリン依存性 真性糖尿病 (IDDM); 糖尿病関連症状、例えば肥満症、心疾患、高血糖症、感染症、網膜症、および/または潰瘍(これらに限定されない); 代謝性 障害; 免疫 障害; 肥満症; 血管 障害; 体重抑圧; 食欲抑圧; X 症候群; 高血糖症; 家族性併発性高脂血症; 代謝性 症候群; 炎症性障害; アテローム性障害
C ペプチド	インスリン調節に関与するインスリン 前駆体	C-ペプチド濃度は、PNAS (1970) Sep; 67(1): 148-55 に記載されたような当該技術分野で周知の検定を用いて測定され得る。	糖尿病; 尿崩症; 真性糖尿病; 1型 糖尿病; 2型 糖尿病; インスリン抵抗性; インスリン欠乏症; 高脂血症; 高ケトン血症; 非インスリン依存性 真性糖尿病 (NIDDM); インスリン依存性 真性糖尿病 (IDDM); 糖尿病関連症状、例えば肥満症、心疾患、高血糖症、感染症、網膜症、および/または潰瘍(これらに限定されない); 代謝性 障害; 免疫 障害; 肥満症; 血管 障害; 体重抑圧; 食欲抑圧; X 症候群; 高血糖症; 家族性併発性高脂血症; 代謝性 症候群
HCB068 (腸溶性アディポカイン; 脂肪 SID; プロリン濃化 酸性タンパク質)	食事条件に応答して脂肪細胞および脂肪組織の増殖/分化または代謝/生理学/病理学を制御する。	脂肪細胞における cAMP-媒介性転写の活性化は、当該技術分野で既知の方法を用いて検定され得る (Berger et al., Gene 66: 1-10 (1998); Cullen and Malm, Methods in Enzymol 216: 362-368 (1992); Henthorn et al., Proc Natl Acad Sci USA 85: 6342-6346 (1988); Reusch et al., Mol Cell Biol 20(3): 1008-1020 (2000); および Klemm et al., J Biol Chem 273: 917-923 (1998))。	肥満症の処置; 糖尿病の処置; 体重抑圧増加; 食欲抑圧。高血糖症; 糖尿病; 尿崩症; 真性糖尿病; 1型 糖尿病; 2型 糖尿病; インスリン抵抗性; インスリン欠乏症; 高脂血症; 高ケトン血症; 非インスリン依存性 真性糖尿病 (NIDDM); インスリン依存性 真性糖尿病 (IDDM); 糖尿病関連症状、例えば肥満症、心疾患、高血糖症、感染症、網膜症、および/または潰瘍(これらに限定されない); 代謝性 障害; 免疫 障害; 肥満症; 血管 障害; 体重抑圧; 食欲抑圧; X 症候群。抗体および/またはアンタゴニストに関するその他の適応症、例えば体重損失の処置; エイズ消耗症の処置; 食欲刺激剤; 悪液質の処置。

10

20

30

40

【表 2 - 1 9】

カーゴポリペプチド	生物学的活性	例示的活性検定	適応症
PYY (ペプチド YY)、例えば、PYY 3-36 (アミノ酸残基 31-64 の全長 PYY、アミノ酸残基 3-36 の成熟 PYY)	食欲を減少する;満腹を増大する;食物摂取を減少する。	食欲および食物摂取は、当該技術分野で既知の方法により測定され得る (Batterham et al. Nature 2002; 418: 650654)。	最も選択されるのは: 肥満症の処置; 糖尿病の処置; 体重増加抑圧; 食欲抑圧。高血糖症; 糖尿病; 尿崩症; 真性糖尿病; 1型 糖尿病; 2型 糖尿病; インスリン抵抗性; インスリン欠乏症; 高脂血症; 高ケトン血症; 非インスリン依存性 真性糖尿病 (NIDDM); インスリン依存性 真性糖尿病 (IDDM); 糖尿病関連症状、例えば肥満症、心疾患、高血糖症 感染症、網膜症、および/または潰瘍(これらに限定されない); 代謝性 障害; 免疫 障害; 肥満症; 血管 障害; 体重抑圧; 食欲抑圧; X 症候群。抗体、アンタゴニストに関するその他の適応症: 体重損失の処置; エイズ消耗症の処置; 食欲刺激剤; 悪液質の処置。
WNT10b	脂肪生成を抑制する。	WNT10b は、脂肪生成抑制検定を用いて測定され得る (Ross et al., Science 2000; 289(5481): 950-953)。	最も選択されるのは: 肥満症の処置; 体重増加抑圧; 食欲抑圧。その他の適応症: 高血糖症; 糖尿病; 尿崩症; 真性糖尿病; 1型 糖尿病; 2型 糖尿病; インスリン抵抗性; インスリン欠乏症; 高脂血症; 高ケトン血症; 非インスリン依存性 真性糖尿病 (NIDDM); インスリン依存性 真性糖尿病 (IDDM)。
WNT11	心臓発生を促進する。	WNT11 活性は、当該技術分野で既知の検定、例えば心臓発生検定を用いて測定され得る (Eisenberg et al., Dev Dyn 1999 Sep; 216(1): 45-58)。	心臓血管性障害; 鬱血性心不全; 心筋梗塞の処置。
ヘルスタチン	癌 増殖を抑制する。	ヘルスタチン活性は、当該技術分野で既知増殖検定を用いて測定され得る (Doherty et al., PNAS 1999; 96(19): 10869-10874)。	腫瘍学; 癌; 固形腫瘍; 黒色腫; 悪性黒色腫; 腎臓癌 (例えば、腎細胞癌); 肺癌 (例えば、非小細胞肺癌または小細胞肺癌); 結腸癌; 乳癌; 肝臓癌; 前立腺癌; 膀胱癌; 胃癌; 肉腫; エイズ関連カポジ肉腫; リンパ腫; T 細胞リンパ腫; 皮膚 T 細胞リンパ腫; 非ホジキンリンパ腫; 脳腫瘍; 神経膠腫; 未分化星状細胞腫; 子宮頸部形成異常; 白血病; 前白血病; 毛様細胞性白血病; 慢性 骨髄性白血病; 血液学的悪性腫瘍; 血液学的障害; 多発性骨髄腫。
アドレノメデュリン	血管拡張を刺激する;骨成長を促進する。	血管拡張は、当該技術分野で既知の検定を用いて測定され得る (Ashton et al. Pharmacology 2000; 61(2): 101-105。骨成長の促進は、当該技術分野で既知の検定、例えば、骨芽細胞増殖検定を用いて測定され得る (Cornish et al. Am J Physiol 1997 Dec; 273(6 Pt 1): E1113- 20)。	鬱血性心不全; 高血圧症; 心筋梗塞; 敗血症性ショック; 骨粗鬆症; 閉経後骨粗鬆症; 骨減少症の処置。

10

20

30

40

【表 2 - 2 0】

カーゴポリペプチド	生物学的活性	例示的活性検定	適応症
Nogo 受容体	軸索成長阻害薬 Nogo のための受容体。	軸索再生および成長の促進は、当該技術分野で既知の検定を用いて測定され得る (Fournier et al. Nature 2001; 409 (6818): 341-346)。	中枢神経系損傷; 脊髄損傷; 末梢神経損傷; 神経変性疾患; パーキンソン病; アルツハイマー病; ハンチントン病; 筋萎縮性側索硬化症; 進行性核上性麻痺; クロイツフェルト・ヤコブ病; 運動神経性疾患の処置。
CART (コカイン および アンフェタミン調節転写物)	食物摂取および貯蔵を抑制する; 脂質酸化を促進する。	食欲および食物摂取は、当該技術分野で既知の方法により測定され得る (Batterham et al. Nature 2002; 418: 650654)。	最も選択されるのは: 肥満症; 体重増加抑圧; 食欲抑圧。その他の適応症: 高血糖症; 糖尿病; 尿崩症; 真性糖尿病; 1型糖尿病; 2型糖尿病; インスリン抵抗性; インスリン欠乏症; 高脂血症; 高ケトン血症; 非インスリン依存性真性糖尿病 (NIDDM); インスリン依存性真性糖尿病 (IDDM) の処置。
RegIV (結腸特異的遺伝子; 結腸特異的タンパク質)	グルコース取り込みを刺激する; インスリン感受性を増大する。	RegIV 活性は、[3-H]-グルコース取り込み検定を用いて in vitro で検定され得る。 (J Biol Chem 1999 Oct 22; 274 (43): 30864-30873)。	高血糖症; 糖尿病; 尿崩症; 真性糖尿病; 1型糖尿病; 2型糖尿病; インスリン抵抗性; インスリン欠乏症; 高脂血症; 高ケトン血症; 非インスリン依存性真性糖尿病 (NIDDM); インスリン依存性真性糖尿病 (IDDM); 糖尿病関連症状、例えば肥満症、心疾患、高血糖症、感染症、網膜症、および/または潰瘍(これらに限定されない); 代謝性障害; 免疫障害; 肥満症; 血管障害; 体重抑圧; 食欲抑圧; X 症候群。
コシントロピン (コルトロシン) (CAS-16960-16-0)	合成コルチコトロピン; コルチゾールの放出を刺激する。	コシントロピンの活性は、血清コルチゾールレベルを測定することにより査定され得る (Frank et al. J. Am. Vet. Med. Assoc. 1998 212 (10): 1569-71)。	内分泌; アジソン病; クッシング症候群; 脳下垂体機能不全; 急性副腎発症
酢酸ペキシガナン (CAS-172820-23-4)	細菌膜を崩壊する。	酢酸ペキシガナン活性は、当該技術分野で既知の抗菌検定を用いて査定され得る (Zasloff et al., Antimicrobial Agents and Chemotherapy 1999, 43: 782-788)。	感染性疾患の処置; 細菌性感染症の処置。
プラムリンチド (アミリン) (CAS-151126-32-8)	胃が空になるのを遅くする; 食物摂取を減少する。	食欲および食物摂取は、当該技術分野で既知の方法により測定され得る (Batterham et al. Nature 2002; 418: 650654)。	肥満症の処置; 糖尿病の処置; 体重増加抑圧; 食欲抑圧; 内分泌障害の処置; 高血糖症; 糖尿病; 尿崩症; 真性糖尿病; 1型糖尿病; 2型糖尿病; インスリン抵抗性; インスリン欠乏症; 高脂血症; 高ケトン血症; 非インスリン依存性真性糖尿病 (NIDDM); インスリン依存性真性糖尿病 (IDDM); 糖尿病関連症状、例えば肥満症、心疾患、高血糖症、感染症、網膜症、および/または潰瘍(これらに限定されない); 代謝性障害; 免疫障害; 肥満症; 血管障害; 体重抑圧; 食欲抑圧; X 症候群。抗体、アンタゴニストに関するその他の適応症: 体重損失の処置; エイズ消耗症の処置; 食欲刺激剤; 悪液質の処置。

10

20

30

40

【表 2 - 2 1】

カーゴポリペプチド	生物学的活性	例示的活性検定	適応症
テリパラチド (CAS-52232-67-4)	カルシトニンと一緒に作用して、カルシウムおよびリン酸塩代謝を制御する；血中カルシウムレベルを上げる；骨細胞の活性を刺激する；小腸から血液中へのCa ²⁺ /Pi の吸収を増強する；Ca ²⁺ の再吸収を促進し、腎臓尿細管によりPiを抑制する。	ラット骨肉腫細胞におけるアデニリルシクラーゼ刺激(骨粗鬆症の卵巣摘出ラットモデル)：IUBMB Life 2000 Feb; 49(2)：131-5	骨 障害；骨折防止；高カルシウム血症；悪性 高カルシウム血症；骨粗鬆症；パジェット病；骨減少症、破骨細胞生成；骨溶解；骨髄炎；骨壊死；歯周骨損失；骨関節炎；関節リウマチ；骨化石症；歯周、溶解性、または転移性骨疾患；破骨分化抑制；骨障害；骨治癒および再生。
テルリプレシン (トリグリシリン・バソプレッシン) (CAS-14636-12-5)	バソプレッシンの類似体；血管収縮を誘導する。	テルリプレシン活性は、単離動脈環調製のような血管収縮の検定を用いて測定され得る (Landstrom et al., Hum Reprod 1999 Jan; 14(1)：151-5)。	静脈瘤性出血；肝硬変；門脈高血圧症；肝腎症候群；血液関連障害
ウラリチド (CAS-118812-69-4)	ナトリウム利尿、利尿および血管拡張を刺激する。	ウラリチド活性は、ラット腎細胞におけるcGMP蓄積を測定することにより評価され得る (Valentin et al., 高血圧症 1993 Apr; 21(4)：432-8)。	排泄障害；急性腎不全；喘息；鬱血性心不全；高血圧症；肺性高血圧症；心臓血管 障害
アプロチニン(トラシロール) (CAS-9087-70-1; CAS-11061-94-2; CAS-12407-79-3)	セリンプロテアーゼ阻害薬；全身性炎症性応答、繊維溶解およびトロンビン誘導性血小板凝集を弱める。	トロンビン誘導性血小板凝集の抑制は、当該技術分野で既知の方法を用いて測定され得る (Poullis et al., J Thorac Cardiovasc Surg 2000 Aug; 120(2)：370-8)。	繊維素溶解の抑制；外科手術中の血液損失の低減；炎症 および 免疫障害の処置。
アスパルトシン (CAS-4117-65-1; CAS-1402-89-7)	抗細菌	アスパルトシン活性は、当該技術分野で既知の抗菌検定を用いて評価され得る (Zasloff et al., Antimicrobial Agents and Chemotherapy 1999, 43: 782-788)。	感染性疾患の処置；細菌性感染症の処置。
カルシトニン (カルシマー) (CAS-21215-62-3)	血清中のカルシウムおよびリン酸塩のレベルを調節する；血清カルシウム(ヒト上皮小体ホルモンと反対作用)の低減を生じるヒト 上皮小体ホルモン。	低カルシウム血症ラットパイオアッセイ骨吸収検定およびpit 検定、CT 受容体結合検定、CAMP 刺激検定：J Bone Miner Res 1999 Aug; 14(8)：1425-31	筋肉骨格性；骨粗鬆症；パジェット病；高カルシウム血症；骨 障害；骨折防止；悪性 高カルシウム血症；骨減少症、破骨細胞生成；骨溶解；骨髄炎；骨壊死；歯周骨損失；骨関節炎；関節リウマチ；骨化石症；歯周、溶解性または転移性骨疾患；破骨分化抑制；骨 障害；骨 治癒および再生。
カルベリチド (HNP; 組換え体 ヒト 心房性ナトリウム利尿ペプチド) (CAS-89213-87-6)	ナトリウム利尿、利尿および血管拡張を刺激する。	カルベリチド活性は、多数の細胞株、例えば PC12 細胞および培養ヒト糸球体細胞におけるcGMP蓄積を測定することによりin vitro で評価され得る (Medvede et al., Life Sci 2001 Aug 31; 69(15)：1783-90; Green et al., J Am Soc Nephrol 1994 Oct; 5(4)：1091-8)。	心不全；心臓血管性障害；呼吸器障害；急性呼吸窮迫 症候群の処置。

10

20

30

40

【表 2 - 2 2】

カーゴポリペプチド	生物学的活性	例示的活性検定	適応症
デシルジン（組換え体ヒルジン；レバスク） (CAS-120993-53-5)	トロンビンを抑制する；血液凝固を抑制する。	デシルジン活性は、当該技術分野で既知の血液凝固検定、例えばin vitro血小板凝集検定を用いて評価され得る (Glusa, Haemostasis 1991; 21 Suppl 1: 116-20)。	血液凝固障害；血栓；血小板減少症；出血。
エモクタキン（インターロイキン 8） (CAS-142298-00-8)	炎症誘発性 サイトカイン		炎症、免疫障害、RSV 感染の処置。
フェリプレシン (CAS-56-59-7)	バソプレシンの誘導体；血管収縮を刺激する；局所的知覚麻痺を有度する。	フェリプレシン血管収縮活性は、単離小動脈環調製のような血管収縮の検定を用いて測定され得る (Landstrom et al., Hum Reprod 1999 Jan; 14(1): 151-5)。	疼痛の処置；局所麻酔を誘導するため。
グルカゴン (CAS-16941-32-5)	高血糖症を誘導する。	グルカゴン活性は、[3-H]-グルコース取り込み検定を用いてin vitroで評価され得る (J Biol Chem 1999 Oct 22; 274(43): 30864-30873)。	低血糖症；糖尿病；尿崩症；真性糖尿病；1型糖尿病；2型糖尿病；インスリン抵抗性；インスリン欠乏症；高脂血症；高ケトン血症；非インスリン依存性真性糖尿病 (NIDDM)；インスリン依存性真性糖尿病 (IDDM)；糖尿病関連症状、例えば肥満症、心疾患、高血糖症、感染症、網膜症、および／または潰瘍(これらに限定されない)；代謝性障害；免疫障害；肥満症；血管障害；体重抑圧；食欲抑圧；X症候群；内分泌障害。
ナグレスチペン (CAS-166089-33-4)			炎症；免疫
ペンチゲチド（ペンチド） (CAS-62087-72-3)			呼吸器；アレルギー；免疫
プロインスリン (CAS-67422-14-4)	グルコース取り込みを刺激し、グリコーゲン生成および脂質生成を促進する。	インスリン活性は、[3-H]-グルコース取り込み検定を用いてin vitroで検定され得る (J Biol Chem 1999 Oct 22; 274(43): 30864-30873)。	高血糖症；糖尿病；尿崩症；真性糖尿病；1型糖尿病；2型糖尿病；インスリン抵抗性；インスリン欠乏症；高脂血症；高ケトン血症；非インスリン依存性真性糖尿病 (NIDDM)；インスリン依存性真性糖尿病 (IDDM)；糖尿病関連症状、例えば肥満症、心疾患、高血糖症、感染症、網膜症、および／または潰瘍(これらに限定されない)；代謝性障害；免疫障害；肥満症；血管障害；体重抑圧；食欲抑圧；X症候群。

10

20

30

【表 2 - 2 3】

カーゴポリペプチド	生物学的活性	例示的活性検定	適応症
ベカプレルミン(レグラネクス; 組換え体 PDGF-BB) (CAS-165101- 51-9)	創傷治癒を促進する。	ベカプレルミン活性は、当該技術分野で既知の動物創傷治癒モデルを用いて評価され得る (Saba et al., Ann Plast Surg 2002 Jul; 49(1): 62-6)。	上皮細胞増殖を刺激する; 基底ケラチノサイトを刺激する; 創傷治癒を促進する; 持毛包産生を刺激する; 皮膚創傷の治癒。創傷治癒: 眼組織創傷、歯周組織創傷、口腔創傷、糖尿病性潰瘍、皮膚潰瘍、肘潰瘍、動脈潰瘍、静脈鬱血性潰瘍、熱暴露または化学物質に起因する熱傷、あるいはその他の異常創傷治癒 症状、例えば尿毒症、栄養失調、ビタミン欠乏、あるいはステロイド、放射線療法または抗新生物薬または抗代謝薬による全身性処置に関連した合併症; 皮膚損失後の皮膚再確立を促す; 創傷床に対する皮膚移植片の接着増大; 創傷床からの再上皮化を刺激する; 皮膚強度を促進するため; 老化皮膚の外観を改善する; 肝細胞、肺、乳房、膵臓、胃、膀胱、小腸、大腸を増殖する; セボサイト、毛包、II型肺細胞、ムチン産生杯細胞、またはその他の上皮細胞、内皮細胞、ケラチノサイトまたは 基底ケラチノサイト (およびそれらの始原細胞) (皮膚、肺、肝臓、膀胱、眼、唾液腺または消化管内に含有される); 放射線、化学療法処置に起因する、またはウイルス感染に起因する腸毒性の副作用を低減する; 細胞保護剤、特に小腸粘膜または膀胱の細胞保護剤; 粘膜炎 (口腔潰瘍); 皮膚の再生; 全および/または 部分厚皮膚欠損、例えば熱傷 (例えば、毛包、汗腺および皮脂腺の再集団); 乾癬; 表皮剥離、水疱; 疱疹; 胃および/または十二指腸潰瘍; 痂皮を低減する; 炎症性腸疾患; クロウン病; 潰瘍性結腸炎; 腸毒; 肺損傷; 肺胞および/または気管支上皮の修復; 急性 または 慢性肺損傷; 気腫、ARDS; 吸入損傷; ヒアリン膜疾患; 乳児呼吸窮迫症候群; 未熟児における気管支肺異形成; 劇症肝不全; ウィルス性肝炎 および/または 毒性物質により引き起こされる肝硬変、肝臓損傷; 真性糖尿病; 炎症 ; 癌、消化性障害。

10

20

30

【表 2 - 2 4】

カーゴポリペプチド	生物学的活性	例示的活性検定	適応症
グレリン (Genbank 寄託番号 AB029434)	脳下垂体前葉からの成長ホルモンの放出を刺激する。食欲を刺激し、脂肪燃焼を低減する。	食欲および食物摂取は、当該技術分野で既知の方法により測定され得る (Batterham et al. Nature 2002; 418: 650654)。	内分泌; 体重損失; 癌または神経性食欲不振に関連した体重損失; 食欲損失; 過剰食欲; 体重増加; 肥満症; 糖尿病; 末端肥大症; 成長不全; 成長ホルモン欠乏; 成長不全 および 成長遅延 ブラダー・ウィリー 症候群 (2歳以上の小児); 成長欠乏; 慢性腎不全に関連した成長不全; 閉経後骨粗鬆症; 熱傷; 悪液質; 癌悪液質; 小人症; 代謝性障害; 肥満症; 腎不全; ターナー症候群 小児性 および 成人性; 繊維筋痛; 骨折処置; 虚弱 エイズ消耗症
グレリン結合抗体、例えば抗体断片または優性阻害型のグレリン	グレリンに応答する成長ホルモン放出を抑制する; 食欲増大を抑制する。	食欲および食物摂取は、当該技術分野で既知の方法により測定され得る (Batterham et al. Nature 2002; 418: 650654)。	内分泌; 肥満症; 糖尿病; 体重増加; 過剰食欲; 食欲喪失; 体重損失。
受容体 NOG0-66 ペプチド断片 (Genbank 寄託番号 NP_008939 (アミノ酸 62-101))			神経変性障害; 脊髄損傷; ニューロン損傷; 脳外傷; 卒中; 多発性硬化症; 脱髄性障害; 神経活動および神経学的疾患; 神経細胞 (例えば、ニューロン、神経膠細胞および手腕細胞) 再生 および/または 成長
胃阻害 ポリペプチド (GIP)、例えば GIP 断片 (Genbank 寄託番号 NM_004123)	栄養取り込みおよび脂肪細胞中のトリグリセリド蓄積 (これは肥満症をもたらす) および インスリン抵抗性を増大する。	栄養摂取およびトリグリセリド蓄積は、Miyawaki et al., Nat. Medicine, 2002, Vol 8(7): 738-742 に記載された方法により測定され得る。	最も選択されるのは: 体重損失、エイズ消耗症、悪液質、および 食欲喪失。その他: 肥満症; 糖尿病; インスリン抵抗性; 体重増加; 過剰食欲。
胃阻害 ポリペプチド 抗体、または 抗体断片	優勢エネルギー源としての脂肪の使用増大; 脂肪細胞中の脂肪の蓄積減少。	エネルギー源としての脂肪利用は、Miyawaki et al., Nat. Medicine, 2002, Vol 8(7): 738-742 に記載されたように測定され得る。	肥満症; 糖尿病; インスリン抵抗性; 体重増加
胃阻害 ペプチド 受容体または受容体断片または変異体、例えば可溶性断片または変異体 (Genbank 寄託番号 NM_000164)	優勢エネルギー源としての脂肪の使用増大; 脂肪細胞中の脂肪の蓄積減少。	エネルギー源としての脂肪利用は、Miyawaki et al., Nat. Medicine, 2002, Vol 8(7): 738-742 に記載されたように測定され得る。	最も選択されるのは: 肥満症; 糖尿病; 体重増加; 過剰食欲; インスリン抵抗性。その他: 体重損失、エイズ消耗症、食欲損失。
POMC (プロオピオメラノコルチン)、例えば断片または変異体 (例えば、アルファメラノサイト刺激ホルモン、 α MSH、ガンマメラノサイト刺激ホルモン、 γ MSH、ベーターメラノサイト刺激ホルモン、 β MSH、アドレノコルチコトロピン、ACTH、ベーターエンドルフィン、メーエンケファリン) (Genbank 寄託番号 NM_000930)	POMC 由来断片の活性は、多様で且つ当該技術分野で周知である。例えば、Hadley et al., Ann NY Acad Sci 1999 Oct 20; 885: 1-21; Dore, Prog Clin Biol Res 1990; 342: 22-7; Blalock, Ann NY Acad Sci. 1999 Oct 20; 885: 161-72 参照。		選択されるのは: ストレスに対する抵抗性; 抗炎症活性; 鎮痛活性; 皮膚色素形成増大; タンパク質異化増大; 糖新生増大; 肥満症; 糖尿病。その他: タンパク質異化減少、皮膚色素形成減少、アジソン病、クッシング症候群
HP 467, HP228 (米国特許第 6, 350, 430 号)	米国特許第 6, 350, 430 号参照	米国特許第 6, 350, 430 号参照	ストレスに対する抵抗性; 抗炎症活性; 鎮痛活性; 皮膚色素形成増大; タンパク質異化増大; 糖新生増大。

10

20

30

40

【表 2 - 2 5】

カーゴポリペプチド	生物学的活性	例示的活性検定	適応症
NDP (米国特許第 6, 350, 430 号)	米国特許第 6, 350, 430 号参照	米国特許第 6, 350, 430 号参照	ストレスに対する抵抗性; 抗炎症活性; 鎮痛活性; 皮膚色素形成増大; タンパク質異化増大; 糖新生増大。
インターロイキン-21 (IL-21)	免疫調節物質; Th1 細胞におけるインターフェロンガンマ産生を抑制する	IL-21 活性は、Th1 細胞におけるインターフェロンガンマ産生を測定することにより評価され得る (Wurster et al., J Exp Med 2002 Oct 7; 196(7): 969-77)。	自己免疫障害; 炎症性障害; 乾癬の処置; 関節リウマチ; 炎症性腸疾患。
インターロイキン-4 (IL-4)	免疫調節物質; T 細胞の Th2 表現型への分化を促進する。	IL-4 活性は、in vitro での単細胞細胞の Th1/Th2 サイトカイン応答を測定することにより評価され得る (Waltz et al., Horm Metab Res 2002 Oct; 34(10): 561-9)。	乾癬の処置; 自己免疫障害; 関節リウマチ; 炎症性腸疾患; 炎症性障害。
破骨細胞阻害 レクチン (OCIL)	破骨細胞形成を抑制する。	破骨細胞抑制レクチン活性は、当該技術分野で既知の破骨細胞形成検定を用いて評価され得る (Zhou et al., J Biol Chem 2002 Dec 13; 277(50): 48808-15)。	骨障害の処置; 骨粗鬆症; 骨折防止; 高カルシウム血症; 悪性高カルシウム血症; パジエット病; 骨減少症、破骨細胞生成; 骨溶解; 骨髄炎; 骨壊死; 歯周骨損失; 骨関節炎; 関節リウマチ; 骨化石症; 歯周、溶解性または転移性骨疾患; 破骨分化抑制; 骨治療および再生。
PCSK9 阻害薬	PCSK9 と LDL 受容体との相互作用を抑制する。	さらに、冠動脈疾患に関して PCSK9 をターゲッティングすることによる LDL 低下。 (Cao et al. Endocrine, Metabolic & Immune Disorders-Drug Targets 2008, 8, 238-243)	冠動脈性心疾患の処置。

10

20

【0131】

一実施形態では、カーゴポリペプチドは抗原結合ポリペプチド構築物である。別の実施形態では、カーゴポリペプチドは、抗体、あるいはその断片または変異体である抗原結合ポリペプチド構築物である。一実施形態では、抗原結合ポリペプチド構築物は、抗体の Fab 断片、または scFv、あるいは単一ドメイン抗体またはその断片である。

30

【0132】

一実施形態では、カーゴポリペプチドは、CD3、CD19、CD20、HER、または HER3 と結合する抗原結合ポリペプチド構築物から選択される。抗原結合ポリペプチド構築物の適切な例は当該技術分野で既知であり、抗 CD3、抗 CD19、抗 HER2、および抗 HER3 抗体由来のものが挙げられる。

【0133】

機能的活性：

「機能的活性を有するポリペプチド」は、全長、プロタンパク質、および／または成熟型のカーゴポリペプチドに関連した 1 つ以上の既知の機能的活性を示し得るポリペプチドを指す。このような機能的活性としては、生物学的活性、抗原性 [抗ポリペプチド抗体と結合する (または結合に関してポリペプチドと競合する) 能力]、免疫原性 (本明細書中に記載される特定のポリペプチドと結合する能力)、本明細書中に記載されるポリペプチドと多量体を形成する能力、ならびにポリペプチドの受容体またはリガンドと結合する能力が挙げられるが、これらに限定されない。ある実施形態では、機能的活性は、相手タンパク質の発現および安定性を改善する能力を包含する。

40

【0134】

「生物学的活性を有するポリペプチド」は、用量依存性の有無にかかわらず、特定の生物学的検定で測定されるような、成熟形態を含む、本明細書中に記載される治療用タンパク質の活性と類似であるが必ずしも同一でない活性を示すポリペプチドを指す。用量依存

50

性が存在する場合、そのポリペプチドのものと同一である必要はないが、むしろ、本明細書中に記載されるポリペプチドと比較して、所定の活性において用量依存性と実質的に類似する（すなわち、候補ポリペプチドは、本明細書中に記載される、または表2に示されるポリペプチドに比して、より大きな活性を示すかまたは約25分の1以上であるか、または約10分の1以上であるか、または約3分の1以上である活性を示す）。

【0135】

ある実施形態では、本明細書中に記載されるヘテロ多量体は、カーゴ分子が輸送体ポリペプチドと連結されない場合、前記カーゴ分子と関連した少なくとも1つの生物学のおよび／または治療的活性を有する。ある実施形態では、本明細書中に記載されるヘテロ多量体は、カーゴポリペプチドが輸送体ポリペプチドと連結されない場合、前記カーゴポリペ

10

【0136】

本明細書中に記載されるヘテロ多量体は、当該技術分野で既知の検定ならびに本明細書中に記載される検定を用いてまたは日常的に変更して、機能的活性（例えば、生物学の活性）に関して検定され得る。さらに、当業者はアルブミンまたはアロアルブミンベースの単量体ポリペプチドのカーゴタンパク質部分に対応するタンパク質の断片を、表2の対応

20

【0137】

例えば、本明細書中に記載されるヘテロ多量体タンパク質が抗カーゴポリペプチド抗体および／または抗アルブミン抗体との結合に関してカーゴポリペプチドと結合するかまたは競合する能力に関して検定する一実施形態では、当該技術分野で既知の種々の免疫検定、例えば、ラジオイムノアッセイ、ELISA（酵素結合免疫吸着法）、「サンドイッチ」免疫検定、免疫放射線測定検定、ゲル拡散沈降反応、免疫核酸検定、*in situ*免

30

【0138】

結合相手（例えば、受容体またはリガンド）が本明細書中に記載されるヘテロ多量体により含まれるカーゴ分子に関して同定されるある実施形態では、本明細書中に記載されるヘテロ多量体によるその結合相手との結合は、例えば、当該技術分野で周知の手段により、例えば還元および非還元型ゲルクロマトグラフィー、タンパク質アフィニティークロマトグラフィー、およびアフィニティブロッティングにより検定される（一般的に、Phizicky et al., Microbiol. Rev. 59:94-123 (1995) 参照）。別の実施形態では、ヘテロ多量体のカーゴタンパク質部分に対応するポリペプチドの基質（単数または複数）と結合するヘテロ多量体タンパク質の生理学的関連物の能力は、当該技術分野で既知の技法を用いて慣例的に検定され得る。

40

【0139】

生物学的活性

50

ある実施形態では、本明細書中に記載されるヘテロ多量体は、1つ以上の生物学的活性に関して試験するための検定に用いられる。ヘテロ多量体が特定の検定で活性を示す場合、ヘテロ多量体の1つ以上の単量体により含まれる少なくとも1つのカーゴタンパク質は、その生物学的活性に関連した疾患に関与すると思われる。したがって、ヘテロ多量体は関連疾患の処置に有用である。

【0140】

ある実施形態では、疾患または障害の処置方法であって、このような処置、防止または改善が所望される患者に、本明細書中に記載されるヘテロ多量体を、疾患または障害を処置し、防止し、または改善するのに有効な量で投与することを包含する方法が提供される。

10

【0141】

細胞により産生される単量体アルブミンまたはアロアルブミンベースの融合タンパク質であって、前記タンパク質がポリヌクレオチドによりコードされ、前記単量体タンパク質が少なくとも1つのカーゴタンパク質、ならびにアルブミンまたはアロアルブミン由来のポリペプチドを含み、これにより前記単量体が溶液中でヘテロ多量体を形成する融合タンパク質が、本明細書中で提供される。ある実施形態では、ポリヌクレオチドを用いて細胞からコードされたタンパク質を発現する場合、その細胞の天然分泌およびプロセッシング段階は少なくとも1つのシグナル配列を欠くタンパク質を産生する。シグナル配列の具体的アミノ酸配列は、当該技術分野で周知である。

【0142】

20

ある実施形態では、本明細書中に記載されるヘテロ多量体は、内分泌系の疾患および／または障害の診断、予後、防止および／または処置に用いられる。いくつかの実施形態では、本明細書中に記載されるヘテロ多量体は、神経系の疾患および／または障害の診断、予後、防止および／または処置に用いられる。

【0143】

ある実施形態では、本明細書中に記載されるヘテロ多量体は、免疫系の疾患および／または障害の診断、予後、防止および／または処置に用いられる。ある実施形態では、本明細書中に記載されるヘテロ多量体は、呼吸器系の疾患および／または障害の診断、予後、防止および／または処置に用いられる。

【0144】

30

ある実施形態では、本明細書中に記載されるヘテロ多量体は、心臓血管系の疾患および／または障害の診断、予後、防止および／または処置に用いられる。いくつかの実施形態では、本明細書中に記載されるヘテロ多量体は、生殖器系の疾患および／または障害の診断、予後、防止および／または処置に用いられる。

【0145】

ある実施形態では、本明細書中に記載されるヘテロ多量体は、消化器系の疾患および／または障害の診断、予後、防止および／または処置に用いられる。ある実施形態では、本明細書中に記載されるヘテロ多量体は、血液に関連した疾患および／または障害の診断、予後、防止および／または処置に用いられる。

【0146】

40

ある実施形態では、本明細書中に記載されるヘテロ多量体は、少なくとも1つの目的の遺伝子が発現される少なくとも1つの組織（単数または複数）に関連した疾患および／または障害の診断および／または予後に用いられ、ここで本明細書中に記載されるヘテロ多量体は少なくとも1つの目的の遺伝子と結合するカーゴ分子を含む。

【0147】

いくつかの実施形態では、本明細書中に記載されるヘテロ多量体および／または本明細書中に記載されるヘテロ多量体を形成するために会合するアルブミン／アロアルブミンベースの単量体をコードするポリヌクレオチドが、プロホルモン活性化、神経伝達物質活性、細胞のシグナル伝達、細胞の増殖、細胞の分化および細胞の移動を含むがこれらに限定されない活性と関連する疾患および／または障害の診断、検出および／または処置に用い

50

られる。

【0148】

治療的使用：

一態様において、本明細書中に記載されるヘテロ多量体は抗体ベースの療法に向けられ、この療法は抗体、その断片または変異体であるカーゴポリペプチド（単数または複数）を含む本明細書中に記載されるヘテロ多量体を、開示された疾患、障害または症状のうちの1つ以上を処置するために患者に投与することを包含する。本明細書中に記載される治療用化合物としては、本明細書中に記載されるヘテロ多量体、本明細書中に記載されるヘテロ多量体をコードする核酸が挙げられるが、これらに限定されない。

【0149】

具体的一実施形態では、抗体ベースの療法であって、1つ以上の疾患、障害または症状、例えば、神経障害、免疫系障害、筋肉障害、生殖器障害、消化管障害、肺障害、心臓血管性障害、腎障害、増殖障害および／または癌性疾患および症状、および／または本明細書の他の箇所に記載されるような疾患、障害または症状（これらに限定されない）を処置するために、抗体の少なくとも断片または変異体を含む本明細書中に記載されるヘテロ多量体を患者に投与することを包含する療法が提供される。

【0150】

少なくとも抗体の断片または変異体を含む本発明のヘテロ多量体タンパク質が治療的に用いられる方法の概要は、身体で局所的にまたは全身的に結合すること、あるいは、例えば補体（CDC）またはエフェクター細胞（ADCC）に介在されるような、抗体の直接的細胞傷害性による方法を包含する。これらのアプローチのいくつかは、以下でさらに詳細に記載される。本明細書中で提供される教示により、過度の実験なしに、診断、モニタリングまたは治療目的のために本明細書中に記載されるヘテロ多量体を用いる方法を当業者は知り得る。

【0151】

少なくとも抗体の断片または変異体を含む本明細書中に記載されるヘテロ多量体は、単独で、または他の型の処置（例えば、放射線療法、化学療法、ホルモン療法、免疫療法および抗腫瘍薬）と組み合わせて投与され得る。一般的に、患者の種と同一種の種起源または種反応性（抗体の場合）の生成物の投与が好ましい。したがって、一実施形態では、ヒト抗体、断片、誘導体、類似体、または核酸が、治療または予防のためにヒト患者に投与される。

【0152】

遺伝子療法：

具体的一実施形態では、本明細書中に記載されるヘテロ多量体タンパク質をコードする配列を含む核酸は、遺伝子療法として、タンパク質の異所性発現および／または活性と関連する疾患または障害を処置し、抑制し、または防止するために投与される。遺伝子療法とは、発現されたまたは発現可能な核酸を被験体に投与することにより実施される療法を指す。本発明のこの実施形態では、核酸は、治療効果を媒介するそれらのコード化タンパク質を産生する。当該技術分野で利用可能な遺伝子療法のための方法のいずれかが用いられ得る。

【0153】

治療的または予防的活性の実証：

本明細書中に記載されるヘテロ多量体または薬学的組成物は、ヒトに用いる前に、所望の治療的または予防的活性に関して、*in vitro*で、次いで*in vivo*で試験される。例えば、化合物または薬学的組成物の治療的または予防的有用性を実証するための*in vitro*検定は、細胞株または患者組織試料に及ぼす化合物の作用を包含する。細胞株および／または組織試料に及ぼす化合物または組成物の作用は、当業者に既知の技法、例えばロゼット形成検定および細胞溶解検定を利用して確定され得る。本発明に従って、具体的な一化合物の投与が示されるか否かを決定するために用いられ得る*in vitro*検定は*in vitro*細胞培養検定を包含し、検定では患者組織試料が培養中で

10

20

30

40

50

増殖され、ヘテロ多量体に曝露されるか、またはそうでなければヘテロ多量体を投与され、かつ組織試料に及ぼすこのようなヘテロ多量体の作用が観察される。

【0154】

治療的／予防的投与および組成物：

有効量の本明細書中に記載されるヘテロ多量体または薬学的組成物の被験体への投与による処置、抑制および予防の方法が提供される。一実施形態では、ヘテロ多量体は、実質的に精製される（例えば、その作用を制限するかまたは望ましくない副作用を生じる物質を実質的に含まない）。ある実施形態では、被験体は、動物、例えばウシ、ブタ、ウマ、ニワトリ、ネコ、イヌ等（これらに限定されない）であり、ある実施形態では、哺乳動物、最も好ましくはヒトである。

10

【0155】

種々の送達系が既知であり本明細書中に記載されるヘテロ多量体処方物を投与するために用いることができ、例えばリポソーム、微小粒子、マイクロカプセル中の封入、化合物を発現し得る組換え体細胞、受容体媒介性エンドサイトーシス（例えば、Wu and Wu, J. Biol. Chem. 262: 4429-4432 (1987) 参照）、レトロウィルスまたはその他のベクターの一部としての核酸の構築等である。導入方法としては、皮膚内、筋肉内、腹腔内、静脈内、皮下、鼻内、硬膜外および口腔経路が挙げられるが、これらに限定されない。化合物または組成物は、任意の便利な経路により、例えば注入またはボーラス注射により、上皮または粘膜皮膚内張り（例えば、口腔粘膜、直腸および小腸粘膜等）を通した吸収により投与されてよく、また他の生物学的に活性な作用物質と一緒に投与され得る。投与は、全身的または局所的であり得る。さらに、ある実施形態では、任意の適切な経路により、例えば脳室内およびくも膜下腔内注射により、本明細書中に記載されるヘテロ多量体組成物を中枢神経系に導入することが望ましい；脳室内注射は、例えばOmmaya レザバーのようなレザバーに取り付けられる脳室内カテーテルにより容易になり得る。例えば、吸入器またはネブライザー、ならびにエアロゾル化剤を伴う処方物の使用により、肺内投与も用いられ得る。

20

【0156】

具体的一実施形態では、処置を必要とする区域に局所的に、本明細書中に記載されるヘテロ多量体または組成物を投与することが望ましい；これは、例えば外科手術中の局所注入、局所的適用（例えば術後に創傷用包帯とともに）、注射により、カテーテルにより、坐薬により、または移植片により（これらに限定されない）達成され得るが、前記移植片は、多孔性、非多孔性、またはゼラチン性物質であり、シリコン膜などの膜、または繊維を含む。好ましくは、本発明のタンパク質、例えば抗体を投与する場合、タンパク質が吸収しない物質を用いるよう注意しなければならない。

30

【0157】

別の実施形態では、ヘテロ多量体または組成物は、小胞、特にリポソームで送達され得る（Langer, Science 249: 1527-1533 (1990); Treat et al., in Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer, Lopez-Berestein and Fidler (eds.), Liss, New York, pp. 353-365 (1989); Lopez-Berestein, 同書, pp. 317-327 参照；一般的に同書参照）。

40

【0158】

さらに別の実施形態では、ヘテロ多量体または組成物は、制御放出系で送達され得る。一実施形態では、ポンプが用いられ得る（Langer, 上記；Sefton, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14: 201 (1987); Buchwald et al., Surgery 88: 507 (1980); Saudek et al., N. Engl. J. Med. 321: 574 (1989) 参照）。別の実施形態では、ポリマー物質が用いられ得る（Medical Applications of Controlled Release, Langer and Wise (eds.

50

), CRC Pres., Boca Raton, Fla. (1974); Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, Smolen and Ball (eds.), Wiley, New York (1984); Ranger and Pepas, J., Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. 23:61 (1983) 参照; Levy et al., Science 228:190 (1985); During et al., Ann. Neurol. 25:351 (1989); Howard et al., J. Neurosurg. 71:105 (1989) も参照)。さらに別の実施形態では、制御放出系が、治療標的、例えば脳の近位に配置され、したがって全身用量の一部を要するだけである (例えば、Goodson, in Medical Applications of Controlled Release, 上記、vol. 2, pp. 115-138 (1984) 参照)。

10

【0159】

その他の制御放出系は、Langer (Science 249:1527-1533 (1990)) による概説で考察されている。

【0160】

本明細書中に記載されるヘテロ多量体をコードする核酸を含む具体的一実施形態では、核酸は、それが細胞内に存在するよう適切な核酸発現ベクターの一部としてそれを構築することにより、そのコード化タンパク質の発現を促すために *in vivo* で投与でき、例えばレトロウィルスベクターの使用 (米国特許第4, 980, 286号参照) により、または直接注射により、または微小粒子衝撃の使用 (例えば、遺伝子銃; Biolistic, Dupont) により、あるいは脂質または細胞表面受容体またはトランスフェクト化剤で被覆することにより、あるいは核に進入することが既知であるホメオボックス様ペプチドと連結してそれを投与すること (例えば、Joliot et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:1864-1868 (1991) 参照) などにより投与され得る。または相同組換えにより、核酸は細胞内に導入されて発現のために宿主細胞DNA内に組み入れられ得る。

20

【0161】

薬学的組成物も提供される。このような組成物は、治療的有効量の化合物、ならびに薬学的に許容可能な担体を含む。具体的一実施形態では、「薬学的に許容可能な」という用語は、動物に、さらに特定のにはヒトに用いるために、連邦政府または州政府の規制行政庁により認可された、あるいは米国薬局方またはその他の一般的に認知されている薬局方に列挙された、ということの意味する。「担体」という用語は、それと一緒に治療薬が投与される希釈剤、アジュバント、賦形剤またはビヒクルを指す。このような薬学的担体は、滅菌液体、例えば水および油、例えば石油、動物、植物または合成起源のもの、例えば落花生油、ダイズ油、鉱油、ゴマ油等であり得る。薬学的組成物が静脈内投与される場合、水が好ましい担体である。生理食塩溶液および水性デキストロースおよびグリセロール溶液も、液体担体として、特に注射溶液用に用いられ得る。適切な薬学的賦形剤としては、デンプン、グルコース、ラクトース、スクロース、ゼラチン、モルト、コメ、小麦粉、チョーク、シリカゲル、ステアリン酸ナトリウム、グリセロールモノステアレート、タルク、塩化ナトリウム、乾燥スキムミルク、グリセロール、プロピレングリコール、水、エタノール等が挙げられる。組成物は、所望により、少量の湿潤剤または乳化剤、またはpH緩衝剤も含有し得る。これらの組成物は、溶液、懸濁液、乳濁液、錠剤、ピル、カプセル、粉末、徐放性処方物等の形態をとり得る。組成物は、伝統的結合剤および担体、例えばトリグリセリドを伴って、坐薬として処方され得る。経口処方物は、標準的担体、例えば薬学的等級のマニトール、ラクトース、デンプン、ステアリン酸マグネシウム、サッカリンナトリウム、セルロース、炭酸マグネシウム等を含み得る。適切な薬学的担体の例は、E. W. Martinによる“Remington's Pharmaceutical Sciences”に記載されている。このような組成物は、患者への適正投与のための形態を提供するために、治療的有効量の化合物 (好ましくは精製形態で) を適量の

30

40

50

担体と一緒に含有する。処方物は、投与方式に合わせるべきである。

【0162】

ある実施形態では、ヘテロ多量体を含む組成物は、ヒトへの静脈内投与のために適合される薬学的組成物として、慣例的手法に従って処方される。典型的には、静脈内投与のための組成物は、滅菌等張水性緩衝液中の溶液である。必要な場合、組成物は、可溶化剤および局所麻酔薬、例えばリグノカインも含み、注射部位での疼痛を楽にし得る。一般的に、成分は、別々にまたは単位剤形中に一緒に混合して供給され、例えば、凍結乾燥粉末または無水濃縮物としてアンプルまたはサッシェなどの密閉容器中で活性作用物質の量を示して供給される。組成物が注入により投与されるべきものである場合、それは滅菌薬学的等級水または生理食塩水を含有する注入ボトルを用いて分配され得る。組成物が注射により投与される場合、投与前に成分が混合され得るよう、注射用滅菌水または生理食塩水のアンプルが提供され得る。

10

【0163】

ある実施形態では、本明細書中に記載される組成物は、中性または塩形態として処方される。薬学的に許容可能な塩としては、陰イオンを有して生成されるもの、例えば塩酸、リン酸、酢酸、シュウ酸、酒石酸等に由来するもの、および陽イオンを有して生成されるもの、例えばナトリウム、カリウム、アンモニウム、カルシウム、水酸化鉄、イソプロピルアミン、トリエチルアミン、2-エチルアミノエタノール、ヒスチジン、プロカイン等に由来するものを包含する。

20

【0164】

治療用タンパク質の異所性発現および／または活性と関連した疾患または障害の処置、抑制および防止に有効である本明細書中に記載される組成物の量は、標準臨床技法により決定され得る。さらに、*in vitro* 検定は、最適投与量範囲を同定するのを手助けするために任意に用いられ得る。処方物中に用いられるべき精確な用量は、投与経路、ならびに疾患または障害の重篤度によっても決まり、かつ開業医の判断および各患者環境によって決定されるべきである。有効用量は、*in vitro* または動物モデル試験系から得られる用量-応答曲線から推定される。

【0165】

ヘテロ多量体タンパク質の組換えおよび合成的産生方法：

ある実施形態では、酵母、例えば細菌などの微生物、あるいはヒトまたは動物細胞株からの分泌により組換え分子として産生されるヘテロ多量体が提供される。実施形態では、ポリペプチドは宿主細胞から分泌される。

30

【0166】

実施形態は、本明細書中に記載されるヘテロ多量体タンパク質を発現するよう形質転換される細胞、例えば酵母細胞を包含する。形質転換宿主細胞それ自体に加えて、栄養培地中の、それらの細胞の培養物、好ましくはモノクローナル（クローン的に均質な）培養物、またはモノクローナル培養物由来の培養物が提供される。ポリペプチドが分泌される場合、培地は、細胞を伴って、あるいはそれらが濾過されまたは遠心分離されていた場合には細胞を伴わずに、ポリペプチドを含有する。多数の発現系が既知であり用いられ得るが、例としては、細菌（例えば、大腸菌および枯草菌）、酵母（例えば、出芽酵母、クルイベロミセス・ラクチスおよびメタノール酸化酵母）、糸状真菌（例えばアスペルギルス）、植物細胞、動物細胞および昆虫細胞が挙げられる。

40

【0167】

本明細書中に記載されるヘテロ多量体は、慣用的方法で、例えば宿主染色体中または遊離プラスミド上に挿入されるコード配列から産生される。酵母は、通常の方法のいずれか、例えば電気穿孔で、所望のタンパク質のためのコード配列で形質転換される。電気穿孔による酵母の形質転換方法は、Becker & Guarente (1990) Methods Enzymol. 194, 182に開示されている。

【0168】

うまく形質転換された細胞、すなわち本発明のDNA構築物を含有する細胞は、周知の

50

技法により同定され得る。例えば、発現構築物の導入に起因する細胞は、増殖されて、所望のポリペプチドを産生し得る。細胞は収穫され、溶解されて、Southern (1975) J. Mol. Biol. 98, 503またはBerent et al. (1985) Biotech. 3, 208により記載された方法と同様の方法を用いて、DNAの存在に関してそれらのDNA含有物が調べられる。または、上清中のタンパク質の存在が、抗体を用いて検出され得る。

【0169】

有用な酵母プラスミドベクターとしては、pRS403-406およびpRS413-416が挙げられ、一般的に、Stratagene Cloning Systems, La Jolla, Calif. 92037, USAから入手可能である。プラスミドpRS403、pRS404、pRS405およびpRS406は、酵母組込み型プラスミド(Yips)であって、酵母選択可能マーカーHIS3、7RP1、LEU2およびURA3を含む。プラスミドpRS413-416は、酵母セントロメア型プラスミド(Ycps)である。

【0170】

相補的付着末端を介してベクターにDNAを操作可能的に連結するために、種々の方法が開発されている。例えば、相補的ホモポリマー領域が、ベクターDNAに挿入されるべきDNAセグメントに付加され得る。ベクターおよびDNAセグメントは、次に、相補的ホモポリマー尾部間で水素結合により繋ぎ合わされて、組換えDNA分子を形成する。

【0171】

1つ以上の制限部位を含有する合成リンカーは、DNAセグメントをベクターに接合する代替的方法を提供する。エンドヌクレアーゼ制限消化により生成されるDNAセグメントは、バクテリオファージT4 DNAポリメラーゼまたは大腸菌DNAポリメラーゼ1で処理されるが、これらは、それらの3'5'-エキソヌクレオチド分解性活性で突出する一本鎖末端を除去し、それらの重合活性で凹んだ3'末端を充填する酵素である。

【0172】

したがって、これらの活性の組合せは、平滑末端DNAセグメントを生成する。次いで、平滑末端セグメントは、平滑末端DNA分子のライゲーションを触媒し得る酵素、例えばバクテリオファージT4 DNAリガーゼの存在下で、多余分モル量のリンカー分子とともにインキュベートされる。したがって、反応の生成物は、それらの末端にポリマーリンカー配列を保有するDNAセグメントである。これらのDNAセグメントは、次に、適切な制限酵素で切断されて、DNAセグメントの末端と適合性の末端を産生する酵素で切断されている発現ベクターにライゲーションされる。

【0173】

種々の制限エンドヌクレアーゼ部位を含有する合成リンカーは、多数の供給元、例えばInternational Biotechnologies Inc, New Haven, Conn., USAから市販されている。

【0174】

アルブミン融合タンパク質を発現するための宿主として本発明の実行において有用であると予想される酵母の例示的な属は、ピキア（以前はハンセヌラとして分類されていた）、サッカロミセス、クルイベロミセス、アスペルギルス、カンジダ、トルロプシス、トルラスポラ、シゾサッカロミセス、シテロミセス、パキシレン、ジゴサッカロミセス、デバロミセス、トリコデルマ、セファロスポリウム、フミコラ、ムコール、ニューロスポラ、ヤロウィア、メトシュニコヴィア、ロドスポリジウム、ロイコスポリジウム、ボトリオアスキス、スポリジオボルス、エンドマイコプシス等である。好ましい属は、サッカロミセス、シゾサッカロミセス、クルイベロミセス、ピキアおよびトルラスポラからなる群から選択される。サッカロミセス種の例は、S. セレピシエ、S. イタリクスおよびS. ロウキシイである。

【0175】

クルイベロミセス種の例は、K. フラギリス、K. ラクチスおよびK. マルキシアヌス

10

20

30

40

50

である。適切なトルラスポラ種は、*T. デルブルエッキイ*である。ピキア（ハンセヌラ）種の例は、*P. アングスタ*（以前は*H. ポリモルファ*）、*P. アノマラ*（以前は*H. アノマラ*）および*P. パストリス*である。*S. セレビスエ*の形質転換のための方法は、一般的に、*EP 251 744*、*EP 258 067*および*WO 90/01063*（これらはすべて、その記載内容が参照により本明細書中で援用される）に教示されている。

【0176】

サッカロミセスの好ましい例示的な種としては、*S. セレビスエ*、*S. イタリクス*、*S. ジアスタティクス*および*ジゴサッカロミセス・ロウキシイ*が挙げられる。*クルイペロミセス*の好ましい例示的な種としては、*K. フラギリス*および*K. ラクチス*が挙げられる。*ハンセヌラ*の好ましい例示的な種としては、*H. ポリモルファ*（今は、*ピキア・アングスタ*）、*H. アノマラ*（今は、*ピキア・アノマラ*）および*ピキア・カプスラタ*が挙げられる。*ピキア*の付加的な好ましい例示的な種としては、*P. パストリス*が挙げられる。*アスペルギルス*の好ましい例示的な種としては、*A. ニガー*および*A. ニヅランス*が挙げられる。*ヤロウィア*の好ましい例示的な種としては、*Y. リポリチカ*が挙げられる。多数の好ましい酵母種が、*ATCC*から入手可能である。例えば、以下の好ましい酵母種が*ATCC*から入手可能であり、*アルブミン融合タンパク質*の発現において有用である：*サッカロミセス・セレビスエ*、*ハンセン*、*テレオモルフ菌株BY4743 yap3*突然変異体（*ATCC*寄託番号4022731）；*サッカロミセス・セレビスエ* *ハンセン*、*テレオモルフ菌株BY4743 hsp150*突然変異体（*ATCC*寄託番号4021266）；*サッカロミセス・セレビスエ* *ハンセン*、*テレオモルフ菌株BY4743 pmt1*突然変異体（*ATCC*寄託番号4023792）；*サッカロミセス・セレビスエ* *ハンセン*、*テレオモルフ*（*ATCC*寄託番号20626；44773；44774；および62995）；*サッカロミセス・ジアスタティクス* *Andrews et Gilliland ex van der Walt*、*テレモルフ*（*ATCC*寄託番号62987）；*クルイペロミセス・ラクチス*（*Dombrowski*） *van der Walt*、*テレモルフ*（*ATCC*寄託番号76492）；*ピキア・アングスタ*（*Teunisson*等） *Kurtzman*、*テレモルフ*（*ハンセヌラ・ポリモルファ de Morais et Maia*、*テレモルフ*として寄託）（*ATCC*寄託番号26012）；*アスペルギルス・ニガー* *van Tieghem*、*アナモルフ*（*ATCC*寄託番号9029）；*アスペルギルス・ニガー* *van Tieghem*、*アナモルフ*（*ATCC*寄託番号16404）；*アスペルギルス・ニヅランス*（*Eidam*） *Winter*、*アナモルフ*（*ATCC*寄託番号48756）；および*ヤロウィア・リポリチカ*（*Wickerham*等） *van der Walt et von Arx*、*テレモルフ*（*ATCC*寄託番号201847）。

【0177】

*サッカロミセス・セレビスエ*に関する適切なプロモーターとしては、*PGKI*遺伝子、*GAL1*または*GAL10*遺伝子、*CYC1*、*PHO5*、*TRP1*、*ADH1*、*ADH2*に関連するもの、*グリセルアルデヒド-3-ホスフェートデヒドロゲナーゼ*、*ヘキソキナーゼ*、*ピルベートデカルボキシラーゼ*、*ホスホフルクトキナーゼ*、*トリオースホスフェートイソメラーゼ*、*ホスホグルコースイソメラーゼ*、*グルコキナーゼ*、*アルファー接合因子フェロモン*、*〔接合因子フェロモン〕*に関する遺伝子、*PRBI*プロモーター、*GUT2*プロモーター、*GPD1*プロモーター、および5'調節領域の部分と他のプロモーターの5'調節領域の部分との、または上流の活性化部位とのハイブリッドを包含するハイブリッドプロモーター（例えば、*EP-A-258 067*のプロモーター）が挙げられる。

【0178】

*シゾサッカロミセス・ポンベ*において用いるための便利な調節可能プロモーターは、*Maundrell*（1990） *J. Biol. Chem.* 265, 10857-10864により記載されたような*nmt*遺伝子からのチアミン抑制性プロモーター、ならびに*Hoffman & Winston*（1990） *Genetics* 124, 807-816により記載されたようなグルコース抑制性*jbp1*遺伝子プロモ

10

20

30

40

50

ーターである。

【0179】

外来遺伝子の発現のためにピキアを形質転換する方法は、例えば、C r e g g e t a l. (1993)、ならびに種々のP h i l l i p s 特許（例えば、米国特許第4, 857, 467号（この記載内容は参照により本明細書中で援用される））に教示されており、ピキア発現キットは、I n v i t r o g e n B V, L e e k, N e t h e r l a n d s および I n v i t r o g e n C o r p., S a n D i e g o, C a l i f から市販されている。適切なプロモーターとしては、A O X 1 および A O X 2 が挙げられる。G l e e s o n e t a l. (1986) J. Gen. Microbiol. 132, 3459-3465は、ハンセンラベクターおよび形質転換に関する情報を包含しており、適切なプロモーターはM O X 1 および F M D 1 である；一方、E P 361 991、F l e e r e t a l. (1991) および R h o n e - P o u l e n c R o r e r からのその他の出版物は、クルイベロミセス種における外来タンパク質を発現する方法を教示しており、適切なプロモーターはP G K I である。

10

【0180】

転写終結シグナルは、好ましくは、転写終結およびポリアデニル化のための適正なシグナルを含有する真核生物遺伝子の3'フランキンク配列である。適切な3'フランキンク配列は、例えば、用いられる発現制御配列と天然に連結された遺伝子の配列であり、すなわち、プロモーターに対応し得る。また、それらは、サッカロミセス・セレビスエA D H I 遺伝子の終結シグナルが好ましい場合には異なり得る。

20

【0181】

ある実施形態では、所望のヘテロ多量体タンパク質は最初、分泌リーダー配列を伴って発現され、分泌リーダー配列は選択される酵母において有効な任意のリーダーであり得る。サッカロミセス・セレビスエに有用なリーダーとしては、接合因子アルファポリペプチド(M F α - 1) 由来のものおよびE P - A - 387 319のハイブリッドリーダーが挙げられる。このようなリーダー（またはシグナル）が酵母により切断された後、成熟アルブミンが周囲培地中に放出される。さらに、このようなリーダーとしては、J P 62-096086 (911036516として特許付与) に開示されたサッカロミセス・セレビスエインベルターゼ(S U C 2)、酸性ホスファターゼ(P H O 5)、M F α - 1のプレ配列、0グルカナーゼ(B G L 2) およびキラー毒素；サッカロミセス・ジアスタティクスグルコアミラーゼI 1；サッカロミセス・カールスベルゲンシスα-ガラクトシダーゼ(M E L 1)；クルイベロミセス・ラクチスキラー毒素；およびカンジダ・グルコアミラーゼのものが挙げられる。

30

【0182】

本明細書中に記載されるヘテロ多量体タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含有するベクター、宿主細胞、ならびに合成および組換え技法によるヘテロ多量体タンパク質の産生が提供される。ベクターは、例えば、ファージ、プラスミド、ウィルスまたはレトロウィルスベクターであり得る。レトロウィルスベクターは、複製コンピテントまたは複製欠損性であり得る。後者の場合、ウィルス増殖は、一般的に、相補する宿主細胞でのみ起こる。

40

【0183】

ある実施形態では、本明細書中に記載されるヘテロ多量体タンパク質をコードするポリヌクレオチドは、宿主における増殖のために選択マーカーを含有するベクターと結合される。一般的に、プラスミドベクターは、沈殿物、例えばリン酸カルシウム沈殿物中に導入され、あるいは荷電脂質との複合体中に導入される。ベクターがウィルスである場合、それは、適切なパッケージング細胞株を用いてi n v i t r o でパッケージされ、次いで、宿主細胞中に形質導入され得る。

【0184】

ある実施形態では、ポリヌクレオチド挿入物は、適切なプロモーター、例えばファージラムダP L プロモーター、大腸菌l a c、t r p、p h o A およびr a c プロモーター、

50

SV40 初期および後期プロモーター、ならびにレトロウィルスLTRのプロモーター等に、操作可能的に連結される。その他の適切なプロモーターは、当業者に既知である。発現構築物はさらに、転写開始、終結のための部位を含み、かつ、転写領域中に翻訳のためのリボソーム結合部位を含有する。当該構築物により発現される転写体のコード部分は、好ましくは、翻訳されるべきポリペプチドの始めに翻訳開始コドン、そして最後に適切に配置される終結コドン(UAA、UGAまたはUAG)を包含する。

【0185】

上記のように、発現ベクターは、好ましくは少なくとも1つの選択可能マーカーを含む。このようなマーカーとしては、ジヒドロフォレートレダクターゼ、G418、グルタミンシンターゼ、あるいは真核生物培養に関するネオマイシン耐性、ならびに大腸菌およびその他の細菌において培養するためのテトラサイクリン、カナマイシンまたはアンピシリン耐性遺伝子が挙げられる。適切な宿主の代表例としては、細菌細胞、例えば大腸菌、ストレプトミセスおよびネズミチフス菌細胞；真菌細胞、例えば酵母細胞（例えば、サッカロミセス・セレビシエまたはピキア・パストリス(ATCC寄託番号201178)）；昆虫細胞、例えばショウジョウバエS2およびスポドプテラSf9細胞；動物細胞、例えばCHO、COS、NSO、293、およびBowes黒色腫細胞；ならびに植物細胞が挙げられるが、これらに限定されない。上記宿主細胞に関する適切な培地および培養条件は、当該技術分野で既知である。

【0186】

細菌において用いるために選択されるベクターとしては、pQE70、pQE60およびpQE-9(QIAGEN, Inc. から入手可能)；pBluescriptベクター、Phagescriptベクター、pNH8A、pNH16a、pNH18A；pNH46A(Stratagene Cloning Systems, Inc. から入手可能)；ならびにptrc99a、pKK223-3、pKK233-3、pDR540、pRIT5(Pharmacia Biotech, Inc. から入手可能)。好ましい真核生物ベクターは、pWLNEO、pSV2CAT、pOG44、pXT1およびpSG(Stratageneから入手可能)；ならびにpSVK3、pBPV、pMSGおよびpSVL(Pharmaciaから入手可能)。酵母系で用いるための好ましい発現ベクターとしては、pYES2、pYD1、pTEF1/Zeo、pYES2/GS、pPICZ、pGAPZ、pGAPZalpha、pPIC9、pPIC3.5、pHIL-D2、pHIL-S1、pPIC3.5K、pPIC9K、およびPAO815(すべて、Invitrogen, Carlsbad, CAから入手可能)が挙げられるが、これらに限定されない。その他の適切なベクターは、当業者には容易に明らかになる。

【0187】

一実施形態では、本明細書中に記載されるヘテロ多量体タンパク質をコードするポリヌクレオチドは、本発明のタンパク質の局在化を原核生物または真核生物細胞の特定区画に向ける、および／または原核生物あるいは真核生物細胞からの本発明のタンパク質の分泌を指図するシグナル配列と融合される。例えば、大腸菌では、タンパク質の発現をペリプラズム空間に向けたいと考え得る。細菌のペリプラズム空間にポリペプチドの発現を向けるために、ヘテロ多量体タンパク質が融合されるシグナル伝達配列またはタンパク質(またはその断片)の例としては、pelBシグナル配列、マルトース結合タンパク質(MBP)シグナル配列、MBP、ompAシグナル配列、ペリプラズム大腸菌熱不安定性エンテロトキシンB-サブユニットのシグナル配列、ならびにアルカリ性ホスファターゼのシグナル配列が挙げられるが、これらに限定されない。タンパク質の局在化を指図する融合タンパク質の構築のためのいくつかのベクターが市販されており、例としては、pMALシリーズのベクター(特に、pMAL-*rho*シリーズ)(New England

BioLabsから入手可能)が挙げられる。具体的実施形態では、本発明のポリヌクレオチドアルブミン融合タンパク質は、pelBペクテートリアーゼシグナル配列と融合されて、グラム陰性細菌におけるこのようなポリペプチドの発現および精製の効率を増大し得る。米国特許第5,576,195号および第5,846,818号(これらの記

10

20

30

40

50

載内容は参照により本明細書中で援用される) 参照のこと。

【0188】

哺乳動物細胞におけるその分泌を指図するためにヘテロ多量体タンパク質と融合されるシグナルペプチドの例としては、MPIF-1シグナル配列(例えば、GenBank 寄託番号AAB51134のアミノ酸1~21)、stanniocalcinシグナル配列(MLQNSAVLLLVISASA)、およびコンセンサスシグナル配列(MPTWAWWLFLVLLALWAPARG)が挙げられるが、これらに限定されない。パキューウィルス発現系とともに用いられ得る適切なシグナル配列は、gp67シグナル配列(例えば、GenBank 寄託番号AAA72759のアミノ酸1~19)である。

【0189】

選択可能マーカーとしてグルタミンシンターゼ(GS)またはDHFRを用いるベクターは、それぞれ、薬剤メチオニンスルホキシミンまたはメトトレキサートの存在下で増幅され得る。グルタミンシンターゼベースのベクターの利点は、グルタミンシンターゼ陰性である細胞株(例えば、ネズミ骨髄腫細胞株、NSO)の利用可能性である。グルタミンシンターゼ発現系は、内因性遺伝子の働きを防止するために付加的阻害薬を提供することにより、グルタミンシンターゼ発現細胞(例えば、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞)においても機能し得る。グルタミンシンターゼ発現系およびその構成成分は、PCT公告:WO87/04462;WO86/05807;WO89/10036;WO89/10404;およびWO91/06657(これらの記載内容は参照により本明細書中で援用される)に詳述されている。さらに、グルタミンシンターゼ発現ベクターは、Lonza Biologics, Inc. (Portsmouth, N. H.) から獲得され得る。ネズミ骨髄腫細胞におけるGS発現系を用いるモノクローナル抗体の発現および産生は、Bebbington et al., Bio/technology 10:169 (1992) ならびにBiblia and Robinson Bio technology 11:1 (1995) (これらの記載内容は参照により本明細書中で援用される)に記載されている。

【0190】

本明細書中に記載されるベクター構築物を含有する宿主細胞、ならびに付加的に、当該技術分野で既知の技法を用いて、1つ以上の非相同制御領域(例えば、プロモーターおよび/またはエンハンサー)と操作可能的に連携するヌクレオチド配列を含有する宿主細胞も提供される。宿主細胞は、高等真核生物細胞、例えば哺乳動物細胞(例えば、ヒト由来細胞)、または下等真核生物細胞、例えば酵母細胞であってよく、あるいは宿主細胞は原核生物細胞、例えば細菌細胞であり得る。挿入遺伝子配列の発現を調整するか、あるいは所望の特異的方式で遺伝子産物を修飾およびプロセッシングする宿主系統が、選択され得る。あるプロモーターからの発現は、ある誘導物質の存在下で増大され得る;したがって、遺伝子改変ポリペプチドの発現は、制御され得る。さらに、異なる宿主細胞は、タンパク質の翻訳および翻訳後プロセッシングおよび修飾(例えば、リン酸化、開裂)のための特質および特異的機構を有する。発現される外来タンパク質の所望の修飾およびプロセッシングを保証するために、適切な細胞株が選択され得る。

【0191】

宿主細胞中への本発明の核酸および核酸構築物の導入は、リン酸カルシウムトランスフェクション、DEAE-デキストラン媒介性トランスフェクション、陽イオン性脂質媒介性トランスフェクション、電気穿孔、形質導入、感染またはその他の方法により実行され得る。このような方法は、多数の標準的実験室マニュアル、例えばDavis et al., Basic Methods In Molecular Biology (1986)に記載されている。本発明のポリペプチドは、実際に、組換えベクターを欠く宿主細胞により発現され得る、ということが具体的に意図される。

【0192】

本明細書中に記載されるベクター構築物を含有する宿主細胞を包含するほかに、本発明は、内因性遺伝物質を欠失するかまたは置換するよう(例えば、カーゴポリペプチドに対

10

20

30

40

50

応するコード配列がカーゴポリペプチドに対応するヘテロ多量体タンパク質と置換される)、および/または遺伝物質を含むよう改変されている、脊椎動物起源の、特に哺乳動物起源の一次、二次および不死化宿主細胞も包含する。内因性ポリヌクレオチドと操作可能的に連携する遺伝物質は、内因性ポリヌクレオチドを活性化し、変更し、および/または増幅し得る。

【0193】

さらに、当該技術分野で既知の技法を用いて、非相同ポリヌクレオチド(例えば、アルブミンタンパク質をコードするポリヌクレオチド、あるいはその断片または変異体)および/または非相同制御領域(例えば、プロモーターおよび/またはエンハンサー)を、相同組換えにより、治療用タンパク質をコードする内因性ポリヌクレオチド配列と操作可能的に連携し得る(例えば、米国特許第5,641,670号(1997年6月24日発行);国際公開番号 WO 96/29411;国際公開番号 WO 94/12650;Koller et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:8932-8935(1989);および Zijlstra et al., Nature 342:435-438(1989)(これらの記載内容は各々、参照により本明細書中で援用される)参照)。

10

【0194】

本明細書中に記載されるヘテロ多量体タンパク質は、周知の方法、例えば硫酸アンモニウムまたはエタノール沈降、酸抽出、陰イオンまたは陽イオン交換クロマトグラフィー、ホスホセルロースクロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィー、疎水性電荷相互作用クロマトグラフィー、およびレクチンクロマトグラフィーにより、組換え細胞培養から回収され、精製され得る。最も好ましくは、高速液体クロマトグラフィー(「HPLC」)が、精製のために用いられる。

20

【0195】

ある実施形態では、本発明のヘテロ多量体タンパク質は、陰イオン交換クロマトグラフィー、例えばQ-セファロース、DEAEセファロース、ポロスHQ、ポロスDEAF、トヨパールQ、トヨパールQAE、トヨパールDEAE、リソース/ソースQおよびDEAE、フラクトゲルQおよびDEAEカラム上でのクロマトグラフィー(これらに限定されない)を用いて、精製される。

30

【0196】

具体的実施形態では、本明細書中に記載されるタンパク質は、陽イオン交換クロマトグラフィー、例えばSP-セファロース、CMセファロース、ポロスHS、ポロスCM、トヨパールSP、トヨパールCM、リソース/ソースSおよびCM、フラクトゲルSおよびCMカラム、ならびにそれらの等価物および匹敵物上でのクロマトグラフィー(これらに限定されない)を用いて、精製される。

【0197】

さらに、本明細書中に記載されるヘテロ多量体タンパク質は、当該技術分野で既知の技法を用いて化学的に合成され得る(例えば、Creighton, 1983, Proteins: Structures and Molecular Principles, W. H. Freeman & Co., N. YおよびHunkapiller et al., Nature, 310:105-111(1984)参照)。例えば、ポリペプチドの断片に対応するポリペプチドは、ペプチド合成機の使用により合成され得る。さらに、所望により、非古典的アミノ酸または化学的アミノ酸類似体が、ポリペプチド配列中に置換または付加として導入され得る。非古典的アミノ酸としては、一般のアミノ酸のD-異性体、2,4ジアミノ酪酸、アルファアミノイソ酪酸、4アミノ酪酸、Abu、2-アミノ酪酸、g-Abu、e-Ahx、6アミノヘキサン酸、Aib、2-アミノイソ酪酸、3-アミノプロピオン酸、オルニチン、ノルロイシン、ノルバリン、ヒドロキシプロリン、サルコシン、シトルリン、ホモシトルリン、システイン酸、t-ブチルグリシン、t-ブチルアラニン、フェニルグリシン、シクロヘキシルアラニン、β-アラニン、フ

40

50

ルオローアミノ酸、例えばβ-メチルアミノ酸、Cα-メチルアミノ酸、Nα-メチルアミノ酸などのデザイナーアミノ酸、およびアミノ酸類似体が概して挙げられるが、これらに限定されない。さらに、アミノ酸は、D（右旋性）またはL（左旋性）であり得る。

【0198】

例えば、グリコシル化、アセチル化、リン酸化、アミド化、既知の保護／遮断基による誘導体化、タンパク質分解的切断、抗体分子または他の細胞性リガンドとの連結等により、翻訳中または翻訳後に異なって修飾されたヘテロ多量体が提供される。任意の多数の化学的修飾が、既知の技法、例えば、臭化シアン、トリプシン、キモトリプシン、パパイイン、V8プロテアーゼ、NaBH₄による特異的化学切断；アセチル化、ホルミル化、酸化、還元；ツニカマイシンの存在下での代謝合成等（これらに限定されない）、により実行され得る。

10

【0199】

本明細書中に包含される付加的翻訳後修飾としては、例えば、N結合型またはO結合型炭水化物鎖、N末端またはC末端のプロセッシング、アミノ酸主鎖への化学部分の結合、N結合型またはO結合型炭水化物鎖の化学的修飾、ならびに原核生物宿主細胞発現の結果としてのN末端メチオニン残基の付加または欠失が挙げられる。ヘテロ多量体タンパク質は、検出可能な標識で、例えば酵素、蛍光、同位体または親和性標識で修飾されて、タンパク質の検出および単離を可能にする。

【0200】

適切な酵素標識の例としては、ホースラディッシュペルオキシダーゼ、アルカリ性ホスファターゼ、ベータガラクトシダーゼ、またはアセチルコリンエステラーゼが挙げられる；適切な補欠分子族複合体の例としては、ストレプトアビジンビオチンおよびアビジン／ビオチンが挙げられ；適切な蛍光物質の例としては、ウンベリフェロン、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、ジクロロトリアジニルアミンフルオレセイン、塩化ダンシルまたはフィコエリトリンが挙げられ；発光物質の例としては、ルミノールが挙げられ；生物発光物質の例としては、ルシフェラーゼ、ルシフェリンおよびエクオリンが挙げられ；そして適切な放射性物質の例としては、ヨウ素、炭素、イオウ、トリチウム、インジウム、テクネチウム、タリウム、ガリウム、パラジウム、モリブデン、キセノン、フッ素が挙げられる。

20

【0201】

具体的実施形態では、本明細書中に記載されるヘテロ多量体構築物は、放射性金属イオンと会合する大環状キレート剤に結合される。

30

【0202】

記述したように、本明細書中に記載されるヘテロ多量体は、天然過程、例えば翻訳後プロセッシングにより、または当該技術分野で周知の化学修飾技法により修飾される。ある実施形態では、同一型の修飾が、所定のポリペプチド中のいくつかの部位で、同一または種々の程度で存在し得る。ある実施形態では、本明細書中に記載されるヘテロ多量体からのポリペプチドは、例えばユビキチン化の結果として分枝され、およびいくつかの実施形態では、分枝を伴って、または伴わずに、環状である。環状分枝鎖および分枝鎖環状ポリペプチドは、翻訳後天然過程の結果であるか、あるいは合成方法により作成される。修飾としては、アセチル化、アシル化、ADP-リボシル化、アミド化、フラビンの共有結合、ヘム部分の共有結合、ヌクレオチドまたはヌクレオチド誘導体の共有結合、脂質または脂質誘導体の共有結合、ホスホチジルイノシトールの共有結合、架橋、環化、ジスルフィド結合形成、脱メチル化、共有結合的架橋の形成、システインの生成、ピログルタメートの生成、ホルミル化、ガンマカルボキシル化、グリコシル化、GPIアンカー形成、ヒドロキシル化、ヨウ素化、メチル化、ミリスチル化、酸化、ペギル化、タンパク質分解のプロセッシング、リン酸化、プレニル化、ラセミ化、セレノイル化、硫酸化、例えばアルギニル化などのタンパク質へのアミノ酸のトランスファーRNA媒介性付加、およびユビキチン化が挙げられる(例えば、PROTEINS—STRUCTURE AND MOLECULAR PROPERTIES, 2nd Ed., T. E. Creight

40

50

on, W. H. Freeman and Company, New York (1993); POST-TRANSLATIONAL COVALENT MODIFICATION OF PROTEINS, B. C. Johnson, Ed., Academic Press, New York, pgs. 1-12 (1983); Seifter et al., Meth. Enzymol. 182:626-646 (1990); Rattan et al., Ann. N. Y. Acad. Sci. 663:48-62 (1992) 参照)。

【0203】

ある実施形態では、ヘテロ多量体タンパク質は固体支持体と結合され、これは、本発明のアルブミン融合タンパク質により結合され、それと結合し、またはそれと会合するポリペプチドのイムノアッセイまたは精製のために特に有用である。このような固体支持体としては、硝子、セルロース、ポリアクリルアミド、ナイロン、ポリスチレン、ポリ塩化ビニルまたはポリプロピレンが挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0204】

ヘテロ多量体タンパク質が抗体のVHドメインのみを含む実施形態では、VH-アルブミン融合タンパク質およびVLタンパク質が翻訳後に（共有結合的または非共有結合的に）会合するよう、当該タンパク質を同一抗体のVLドメインと同時発現することが必要であり、および／または望ましい。

【0205】

ヘテロ多量体タンパク質が抗体のVLドメインのみを含む実施形態では、VL-アルブミン融合タンパク質およびVHタンパク質が翻訳後に（共有結合的または非共有結合的に）会合するよう、融合タンパク質を同一抗体のVHドメインと同時発現することが必要であり、および／または望ましい。

20

【0206】

ポリペプチドの溶解性、安定性および循環時間の増大、または免疫原性の低減などの付加的利点を提供し得るヘテロ多量体タンパク質の化学修飾誘導体も、本明細書中で提供される（米国特許第4, 179, 337号）。誘導体化のための化学的部分は、水溶性ポリマー、例えばポリエチレングリコール、エチレングリコール／プロピレングリコールコポリマー、カルボキシメチルセルロース、デキストラン、ポリビニルアルコール等から選択され得る。タンパク質は、分子内の無作為位置、または分子内の予定位置で修飾され、1、2、3またはそれ以上の結合した化学部分を含み得る。

30

【0207】

ポリマーは任意の分子量であってよく、および分枝鎖または非分枝鎖であり得る。ポリエチレングリコールに関しては、取扱いおよび製造を容易にするために、好ましい分子量は約1 kDa～約100 kDa（「約」という用語は、ポリエチレングリコールの調製において、いくつかの分子は提示された分子量より重く、いくつかの分子は軽いことを示す）である。所望の治療的プロファイル（例えば、所望される持続的放出の継続期間、もしあるならば生物学的活性に及ぼす作用、取扱いの容易さ、抗原性の程度または欠如ならびに治療用タンパク質または類似体に対するポリエチレングリコールのその他の既知の作用）によって、他の大きさも用いられ得る。例えば、ポリエチレングリコールは、平均分子量約200、500、1000、1500、2000、2500、3000、3500、4000、4500、5000、5500、6000、6500、7000、7500、8000、8500、9000、9500、10,000、10,500、11,000、11,500、12,000、12,500、13,000、13,500、14,000、14,500、15,000、105,500、16,000、16,500、17,000、17,500、18,000、18,500、19,000、19,500、20,000、25,000、30,000、35,000、40,000、45,000、50,000、55,000、60,000、65,000、70,000、75,000、80,000、85,000、90,000、95,000、または100,000 kDaを有し得る。

40

50

【0208】

本明細書中に記載されるヘテロ多量体タンパク質の存在および量は、当該技術分野で周知の免疫検定であるELISAを用いて決定され得る。本明細書中に記載されるヘテロ多量体を検出し／定量するために有用である一ELISAプロトコールは、抗ヒト血清アルブミン抗体でELISAプレートを被覆するステップ、非特異的結合を防止するためにプレートをブロックするステップ、ELISAプレートを洗浄するステップ、本明細書中に記載されるタンパク質を含有する溶液を付加する（1つ以上の異なる濃度で）ステップ、（本明細書中に記載されるような、またはそうでなければ当該技術分野で既知の）検出可能標識と結合された二次抗カーゴポリペプチド特異的抗体を付加するステップ、および二次抗体の存在を検出するステップを包含する。このプロトコールの代替的バージョンでは、ELISAプレートは、抗カーゴポリペプチド特異的抗体で被覆され標識化二次試薬は抗ヒトアルブミン特異的抗体であり得る。

10

【0209】

種々の出版物が本明細書中で引用されているが、その開示内容は参照により本明細書中で援用される。

【実施例】

【0210】

以下の実施例は、本発明の実行を例証するために示される。それらは、本発明の全範囲を制限または限定するよう意図されない。

【0211】

20

実施例1：タンパク質スプリット方法

特定のタンパク質－タンパク質会合は、相互作用する相手と、随伴する構造的および熱力学的変化との間の強力な表面相補性により駆動される。表面相補性は、好ましい静電的および疎水性相互作用の創生を支持する接触を形成する機会を提供する。静電的相互作用は、塩橋、水素結合および広範な分散相互作用の形成を含む。界面での溶媒排除および非極性原子群周囲の再組織化ならびにその会合エントロピー作用は、結合熱力学の疎水性構成成分において役割を果たす。互いの疎水的作用のために最適化された形状を有する残基は、接触（すなわち、タンパク質－タンパク質界面を安定化するために好ましいスタッキング、パイ－パイ、カチオン－パイ接触）を形成する。同様の熱力学的作用は、二次構造単位および三次ドメインの前組織化を含む多段階のタンパク質フォールディング過程を制御し、この後それらは会合して折りたたまれた四次構造状態のタンパク質を形成する。タンパク質フォールディングおよび結合の代替的機序は、最終的にタンパク質の四次構造状態を生じる連動したタンパク質フォールディングおよび結合過程を含む。複合体タンパク質の四次構造形成中に両過程が作用する局面が存在すると考えることは合理的である。いくつかのタンパク質－タンパク質会合の状況において、個々のタンパク質構成成分は同一媒質中で同時発現されるかまたは存在する必要がある、構成成分または単量体の各々は、その必須の相手との会合時にのみ、その最終構造状態へと安定にフォールディングする（図6）。本明細書中に記載されるように、スプリットタンパク質の生成は、自己集合してヘテロ多量体を一緒に形成することにより擬似ネイティブタンパク質構造を効率的に形成する少なくとも2つの輸送体ポリペプチドを産生する配列、二次構造およびフォールドからの情報を用いて、ネイティブタンパク質におけるセグメント化部位を認識することを含む。例えば、これらのスプリットタンパク質輸送体ポリペプチドは、同時発現されると選択的に自己集合して擬似ネイティブ状態を形成する。輸送体ポリペプチドのスプリットタンパク質相補対を生成すると同時に、試みはある意味で、非複合体状態では非機能性である一方で複合体として機能性を示す、多数の天然に起こる必須のタンパク質－タンパク質複合体を模倣することである。この戦略がうまくいけば、選択的に自己集合して互いにヘテロ多量体を形成するポリペプチドを生じ、生じたポリペプチドは個々の実体として可溶性であり、機能に関して環境中の他の構成成分のフォールディング、結合および活性を減損しない。互いを伴って再構成するポリペプチドの固有の性質は、それ自体では多量体の形成に効率的でないカーゴ分子からヘテロ多量体融合体を作成するという領域で適用でき

30

40

50

る。いくつかの実施形態では、スプリットタンパク質セグメントの機能的役割は、ヘテロ多量体化および輸送体ポリペプチドに融合される多数のカーゴ分子の空間的局在化を駆動する輸送体ポリペプチドとして作用することである。

【0212】

本発明のヒト血清アルブミン内のセグメント化部位を、以下の決定基準に基づいて設計した。(1)セグメント化部位は、相対的SASAが高くタンパク質の残りの部分との接触が限定されているループ上に存在すべきである。これは、タンパク質コアの安定性にそれほど寄与せず、したがってヒト血清アルブミンに対する集合化擬似ネイティブアルブミン構造の安定性に影響するとはあまり考えられない柔軟で且つ接近可能なループを見出す機会を最大限にするためであった。(2)界面はホットスポット残基に富んでいるべきである。ホットスポットとは、十分に連結された相互作用ネットワークに参与する個々の残基または残基の群を意味する。相互作用は、水素結合、塩橋などの荷電残基相互作用、ファンデルワールス接触(強力な構造的相補性および疎水性残基クラスターを示す)のような、タンパク質において観察される典型的な相互作用を基礎にし得る。それは、界面安定性を最大にして複合体が解離しないようにするためである。(3)界面は、できるだけ無極性で、広大で、且つ互いに噛み合うものである必要がある。この場合もやはり、それは、2つの鎖が恒久的複合体として存在してその個々の構成成分に解離しない機会を最大にするためである。(4)一実施形態では、2つの鎖が共有結合するように、セグメント化区分を越えてヒト血清アルブミン中に存在する天然のジスルフィド結合を保持することを目指す。それは、セグメント化後に2つの得られたセグメントから自己集合するヘテロ多量体化擬似ネイティブアルブミン様構造の安定性をさらに増大することを意図した。ここに記載されるジスルフィド判定基準を満たす、すなわちループ領域中のセグメント化部位に非常に近接したジスルフィドを有する、ヒト血清アルブミン構造/配列中のループ領域を見つける。2つの鎖を共有結合的に架橋することの明白な利点のほかに、このジスルフィドはまたセグメント化の際、開いているループの代用物としても役立つ。(5)一実施形態では、2つの得られたセグメントの各々の上の選定位置において個々のアミノ酸にシステインへの突然変異を導入することにより、2つのセグメントに渡るジスルフィド結合を改変する。(6)一実施形態では、界面でのホットスポットをさらに増大または改善するため、あるいは集合化擬似ネイティブアルブミン構造における2つのセグメント間の構造的および物理化学的相補性を増強するために、2つのセグメントの界面でアミノ酸を改変する。

【0213】

以下の表3は、AlbuCORE足場に関する界面パラメーターおよび会合自由エネルギーを示す。HSAに由来する第一および第二セグメントの集合に由来する擬似ネイティブ構造間の埋没界面面積は、当該技術分野で既知のアルゴリズムを用いる構造ベースのコンピューター処理を用いてコンピューター計算され得る(例えば、H. Edelsbrunner and P. Koehl. The weighted volume derivative of a space filling diagram. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 100, 2203-2208 (2003))。コンピューター処理面積は、極性および無極性表面積にさらに分類され得る。無極性表面積は、界面での埋没した疎水性アミノ酸側鎖の指標である。 $\Delta\Delta G_{assoc}$ は、2つのセグメント構造の会合状態と非会合状態との間のコンピューター処理自由エネルギー差を指す。理論的コンピューター処理自由エネルギーは、2つの接触しているセグメント表面間の水素結合およびその他の静電的相互作用、ファンデルワールス接触、脱溶媒和作用および表面相補性を説明する。会合の自由エネルギーをコンピューター処理する方法は、当該技術分野で既知である(例えば、Simonson T, Archontis G, Karplus M. Free energy simulations come of age: protein-ligand recognition. Acc Chem Res. (2002) 35, 430-7)。

【表 3】

表3：AlbuCORE足場に関する界面パラメーターおよび会合自由エネルギー

足場	界面埋没面積(Å ²)	炭素(無極性) 面積(Å ²)	炭素(無極性) 寄与(%)	$\Delta\Delta G_{\text{assoc}}$ (kcal/mol)
AlbuCORE_1A	2892.0	1963.2	67.88	-39.13
AlbuCORE_2A	2282.4	1508.2	66.08	-41.11
AlbuCORE_3	3395.6	2298.3	67.68	-52.69
AlbuCORE_4	5550.6	3690.8	66.49	-180.99
AlbuCORE_6	3278.3	2149.2	65.56	-55.57
AlbuCORE_7	3925.9	2541.2	64.73	-75.20
AlbuCORE_9	4227.0	2709.1	64.09	-122.49
AlbuCORE_13	2982.1	1978.7	66.35	-71.80

10

【0214】

20

図32は、三次元構造から導いたヒト血清アルブミンにおける残基のサブセットにより生じる残基接触のプロットを示す。残基接触は、特定距離範囲内で起こる、残基間のまたはある残基内の原子-原子相互作用により決定でき、ある種の物理化学的性質である。強力な残基接触を有する残基または残基の群は、ホットスポットとして認識され得る。このような残基接触分析はまた、ループ（または3Dタンパク質構造における非構造化二次構造領域）残基、例えば限定残基接触を作るもの、を決定するためにも用いられ得る。プロットはまた、残基についての溶媒接触表面積（SASA）も示し、これは、当該技術分野で既知のアルゴリズムを用いてコンピューター処理され得る（例えば、H. Edelsbrunner and P. Koehl. The weighted volume derivative of a space filling diagram. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 100, 2203-2208 (2003)）。

30

【0215】

図33は、ヒト血清アルブミンにおいて選択ホットスポット残基により達成される接触および相互作用の性質のプロットを示す。図34は、ヒト血清アルブミンにおけるホットスポット残基またはホットスポット残基のクラスター（パッチ）のグラフである。

表4. HSAにおける新規のセグメント化部位（AlbuCORE）およびセグメント化が導入されたループの性質。「ループ長」欄は、2つの最も近い二次構造要素を繋ぐループの長さ（アミノ酸残基で）を指し、および「sec str 距離」欄は、それらの同じ二次構造要素（この場合、すべて α -ヘリックス）のN末端およびC末端のC α 炭素間の距離を示す。界面S-Sは、得られたセグメント（輸送体ポリペプチド）の界面でのジスルフィド結合を示す。

40

【表 4】

足場	セグメント化/欠失	界面 S-S	ループ長	sec str 距離
A l b uCORE_1A	セグメント@(339-340)	316. CYS - 361. CYS	5 res	12.3 Å
A l b uCORE_2A	セグメント@(300-301)	なし	13 res	28.4 Å
A l b uCORE_3	セグメント@(364-365)	360. CYS - 369. CYS	3 res	7.2 Å
A l b uCORE_4	セグメント@(441-442)	437. CYS - 448. CYS	7 res	6.0 Å
A l b uCORE_6	欠失(84)	75. CYS - 91. CYS	12 res	12.2 Å
A l b uCORE_7	セグメント@(171-172)	168. CYS - 177. CYS	4 res	5.7 Å
A l b uCORE_9	セグメント@(281-282)	278. CYS - 289. CYS	2 res	9.1 Å
A l b uCORE_13	セグメント@(114-115)	なし	14 res	36.4 Å

10

【0216】

実施例 2：H A / アロアルブミンベースのヘテロ多量体タンパク質の調製

20

安定にフォールドし自己集合して元のタンパク質の擬似ネイティブ四次構造を形成する単量体ポリペプチド鎖を生じる、H S A 配列および構造に沿ったセグメント化部位を決定するための方法が示される。このような安定会合のための重要な要件の 1 つは、ポリペプチド鎖間の界面における表面相補性の大きな埋没面積の形成である。元のタンパク質のネイティブフォールドは、タンパク質内の領域の天然の相補性の指標を提供する。

【0217】

図 2 は、セグメント化点がタンパク質配列に沿って移動される際、H S A の擬似ネイティブ構造へと理想的にフォールドする 2 つのアルブミンベースのポリペプチドの界面で埋没される溶媒接触表面積を示す。分析は、スプリットセグメント化が 2 ～ 3 の例外を伴って残基 30 ～ 520 間のどこかに導入されると、疎水性界面を保持しつつ、2000 Å² 以上のオーダーの大きな表面積が埋没されことを示す。いくつかの実施形態では、コンピューターで計算された分子表面積が、溶媒接触表面積の代わりに用いられる。いくつかの実施形態では、埋没表面積は、2000 Å² ～ 6000 Å² の範囲である。より大きい埋没表面積が非共有結合 A B H 1 に関して観察された。さらに、分析はまた、いくつかのループ領域が相対的曝露された表面であることも明らかにした。アルブミンは、ネイティブタンパク質構造の安定性に寄与する例外的に多数のジスルフィド架橋を有する。残基 110、190、300、390 および 500 付近のタンパク質の区分は、2 つの輸送体ポリペプチドを横断するジスルフィド結合に関与する残基を分割しないセグメント化の部位を提供する。他の領域におけるセグメント化は、2 つの輸送体ポリペプチド対間に架橋ジスルフィド結合を有するヘテロ二量体を生じるであろう。図 3 は、H S A 配列中の残基 294 ～ 303 からのループの除去により得られる、1 つのこのような擬似ネイティブアルブミン構造のモデルを表示する。本明細書中で示される配列番号 2 および配列番号 3 の 2 つのアルブミンベースのポリペプチドに関する総埋没表面積は、約 2500 Å² である。これは、多数のタンパク質-タンパク質ヘテロ二量体およびホモ二量体共複合体構造で観察される平均範囲である 1910 ～ 3880 Å² 以内である [Bahadur R. P. & Zacharias M. (2008) Cell Mol Life Sci 65, 1059-1072]。このことは、2 つのポリペプチドのフォールディング経路が互いに十分に独立しているならば、この 2 つのポリペプチドが互いと選択的に会合する可能性が高いことを示唆する。

30

40

【0218】

50

本発明の一態様において、2つのポリペプチド（配列番号2および配列番号3により形成される対、または配列番号8および配列番号10により形成される輸送体対）を用いる安定な擬似ネイティブ構造の選択的形成は、適切な目的のカーゴタンパク質を輸送体ポリペプチドとして用いられるアルブミンベースのポリペプチドのN末端またはC末端と融合した後に、二重特異性またはその他の多機能性分子の形成を駆動するためにこれらのポリペプチドを用いる機会を与える。輸送体ポリペプチド対ヘテロ二量体を生じる多数の他の代替的セグメント化のパターンが設計され得る。融合されるカーゴタンパク質は、抗原結合ドメインまたはその他のペイロード、例えば化学毒素、放射性毒素またはサイトカインであり得る（図4に表示）。その結果生じるヘテロ二量体は、HSAに固有の好ましい多くの特性、例えば血清中の半減期および安定性、組織浸透性輸送特質および低免疫原性などを有する。伝統的なリンカー、例えば $(Gly_4Ser)_x$ がカーゴタンパク質と輸送体ポリペプチドとの融合のために用いられ得る。

10

【0219】

本発明の別の態様では、HSAベースの輸送体ポリペプチドの各々は、独立して、二重特異性Fc分子中の2つの重鎖のC末端と融合される（図5に表示）。2つの輸送体ポリペプチド（例えば、配列番号2および配列番号3）の強力かつ選択的対合はFcの選択的ヘテロ二量体化を駆動し、かつその安定性およびその他の有益な薬物動態特性にも寄与する。

【0220】

NM_000477.5, コンセンサスCDS (CCDS) ID 3555.1からの血清アルブミンプレタンパク質NP_000468.1 GI 4502027 mRNA配列

20

配列番号4：残基1～24 (EFATMAVMA PRTLVL LLSGALALTQTWAG) は、切断されるN末端輸出シグナル配列領域である。この配列は、天然シグナル配列と同一の役割を遂行するが哺乳動物およびCHO細胞株に対して最適化されている。

【0221】

配列番号1：gi | 4502027 | ref | NP_000468.1 | 血清アルブミンプレタンパク質 [ホモサピエンス] 括弧内は、切断されて血清アルブミンを生じるN末端輸送配列である。

(EFATMAVMA PRTLVL LLSGALALTQTWAG) DAHKSEVAH
RFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQQCP FEDHVKLVNEVTEF
AKTCVADESA ENCDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMAD
CCAKQEPERNECFLQHKDDNPNLPRLVRPEVDVMCTAFHD
NEETFLKKYLYE IARRHPYFYAPEL LFFAKRYKAAFTTECC
QAADKAACLLPKLDEL RDEGKASSAKQRLKCA SLQKFGER
AFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLT KVHTECCHGD
LLECADDDRADLAKY ICENQDS ISSKLKECCEKPLLEKSHC
IAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGM
FLY EYARRHPDY SVVLLRLAKTYETTTLEKCCAAADPHEC
YAKVFDEFKPLVEEPQNL IKQNC ELFEQLGEYKFQNALLV
RYTKKV P QVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKKHPEAKRMPCA
EDYLSVV LNQLCVLHEKTPVSDRVTKCTESLVNRRPCFS
ALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTAL
VELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKKADDDKETCF
AEEGKKLVAAASQAALGL

30

40

【0222】

配列番号5：ヒト血清アルブミンヌクレオチドCCDS配列 (1852 nt)
GAATTTCGCCACTATGGCTGTGATGGCCCCCTAGGACCCCTGG
TGCTGCTGCTGTCCGGAGCTCTGGCTCTGACTCAGACCTG
GGCTGGAGATGCACACAAGAGTGAGGTTGCTCATCGGTTT

50

AAAGATTTTGGGAGAGAGAAAATTTCAAAGCCTTGGTGTGTTGA
TTGCCCTTTGCTCAGTATCTTCAGCAGTGTCCATTTGAAGA
TCATGTATAAAATTAGTGAATGAAGTAACTGAATTTGCAAAA
ACATGTGTTGCTGATGAGTCAGCTGAAAATTGTGACAAAT
CACTTCATACCCCTTTTGGAGACAAAATTATGCACAGTTGCT
AACTCTTTCGTGAAACCTATGGTGAAAATGGCTGACTGCTGT
GCAAAACAAGAACCTGAGAGAAAATGAATGCTTCTTGC AAC
ACAAAGATGACAAACCCAAACCTCCCCCGATTGGTGAGACC
AGAGGTTGATGTGATGTGCACCTGCTTTTCATGACAAATGAA
GAGACATTTTTTGA AAAAATACTTATATGA AATTGCCAGAA
GACATCCTTACTTTTTATGCCCCCGGAACTCCTTTTTCTTTGC
TAAAAGGTATAAAGCTGCTTTTTACAGAAATGTTGCCAAGCT
GCTGATAAAGCTGCCCTGCCCTGTTGCCAAAGCTCGATGAAC
TTCGGGATGAAGGGAAGGCTTCGTCTGCCAAACAGAGACT
CAAGTGTTGCCAGTCTCCAA AAAATTTGGAGAAAGAGCTTTC
AAAGCATGGGCGAGTAGCTCGCCTGAGCCAGAGATTTCCCA
AAGCTGAGTTTTGCAGAAAGTTTTCCAAGTTAGTGACAGATCT
TACCAAAGTCCACACGGGAATGCTGCCATGGAGATCTGCTT
GAATGTGCTGATGACAGGGCGGACCTTGCCAAGTATATCT
GTGAAAATCAAGATTCTGATCTCCAGTAAACTGAAGGAATG
CTGTGAAAACCTCTGTTGGAAA AATCCCACTGCATTGCC
GAAGTGGA AAAATGATGAGATGCCCTGCTGACTTGCCCTTCAT
TAGCTGCTGATTTTTGTTGA AAGTAAGGATGTTTTGCA AAAA
CTATGCTGAGGCA AAGGATGTCTTCCCTGGGCATGTTTTTTG
TATGAATATGCAAGAAGGCATCCTGATTACTCTGTCTGCTGC
TGCTGCTGAGACTTGCCAAGACATATGA AACCACTCTAGA
GAAGTGCTGTGCCGCTGCAGATCCTCATGAATGCTATGCC
AAAGTGTTTCGATGAATTTAAACCTCTTGTGGAAGAGCCTC
AGAAATTTAATCA AACAAAATTTGTGAGCTTTTTTGAGCAGCT
TGGAGAGTACAAATTTCCAGAAATGCGCTATTAGTTCTGTTAC
ACCAAGAAAGTACCCCAAGTGTC AACCTCCAACCTCTTGTAG
AGGTCTCAAGAAACCTAGGAAAAGTGGGCAGCAAAATGTTG
TAAACATCCTGAAGCA AAAAAGAAATGCCCTGTGCAAGAGAC
TATCTATCCGTGGTCCCTGAACCAAGTTATGTGTGTTGCATG
AGAAAACGCCAGTAAGTGACAGAGTCA CCA AATGCTGCAC
AGAAATCCTTGGTG AACAGGCGACCATGCTTTTTCAGCTCTG
GAAGTCGATGA AACATACGTTCCCAAGAGTTTAAATGCTG
AAACATTTCACTTTC CATGCA GATATATGCACACTTTCTGA
GAAGGAGAGACAAATCAAGAAACAAACTGC ACTTGTTGAG
CTCGTGAAACACAAGCCCCAAGGCAACAAAAGAGCAACTGA
AAGCTGTTATGGATGATTTTCGCAGCTTTTGTAGAGAAAGTG
CTGCAAGGCTGACGATAAGGAGACCTGCTTTGCCGAGGAG
GGTAAAAAACTTGTGTGCTGCAAGTCAAGCTGCCCTTAGGCT
TATGA

10

20

30

40

【0223】

輸送体ポリペプチドとして有用なアルブミンベースのポリペプチドのタンパク質およびヌクレオチド配列は、以下のとおりである：

【0224】

アルブミンベースのヘテロ多量体1：

アルブミンベースの輸送体ポリペプチド1-Ver1：配列番号2：

50

DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQQCPFEDHV
KLVNEVTEFAKTCVADESAENC DKSLHTLFGDKLCTVATL
RETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPNLPRLVRPEV
DVMCTAFHDNEETFLLKKYLYE IARRHPYFYAPELLFFAKR
YKAAFTTECCQAADKAACLLPKLDEL RDEGKASSAKQRLKC
ASLQKFGERA FKA WAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLT K
VHTECCHGDLLECADDRADLAKY ICENQDSISSK LKECCE
KPLLEKSHCIAEV

【0225】

アルブミンベースの輸送体ポリペプチド1-Ver 1をコードするヌクレオチド配列
：配列番号6：

GATGCACACAAGAGTGAGGTTGCTCATCGGTTTAAAGATT
TGGGAGAGAAAGAAAATTTCAAAGCCTTG GTGTTGATTGCCTT
TGCTCAGTATCTTCAGCAGTGTC CATTTGAAGATCATGT A
AAATTAGTGAAATGAAGTAAC TGAATTTGCAAAAACATGTG
TTGCTGATGAGTCAGCTGAAAAT TGTGACAAATCACTTCA
TACCCCTTTTTTGGAGACAAAT TATGCACAGTTGCAACTCTT
CGTGAAACCTATGGTGAAATGGCTGACTGCTGTGCAAAAC
AAGAACCTGAGAGAAATGAATGCTTCTTGCAACACAAAGA
TGACAAACCCAAACCTCCCCCGATTGGTGAGACCAGAGGTT
GATGTGATGTGCACCTGCTTTT CATGACAAATGAAGAGACAT
TTTTTGAAAAAATACTTATATGAAATTGCCAGAAGACATCC
TTACTTTTTATGCCCCCGGAAC TCCTTTTCTTTGCTAAAAGG
TATAAAGCTGCTTTTTACAGAA TGTTGCCAAGCTGCTGATA
AAGCTGCTTGCTGTGGCCAAAGCTCGATGAAC TTCGGGA
TGAAAGGGAAGGCTTCGTCTGCCAAACAGAGACTCAAGTGT
GCCAGTCTCCAAAAATTTGGAGAAAGAGCTTTCAAAGCAT
GGGCAGTAGCTCGCCTGAGCCAGAGATTTCCCAAAGCTGA
GTTTTCAGAAAGTTTCCAAGTTAGTGACAGATCTTACCAA
GTCCACACGGAATGCTGCCATGGAGATCTGCTTGAAATGTG
CTGATGACAGGGCGGACCTTGCCAAAGTATATCTGTGAAAA
TCAAGATTCTGATCTCCAGTAAACTGAAGGAATGCTGTGAA
AAACCTCTGTGTTGGA AAAATCCCACTGCATTGCCGAAGTGT
GA

【0226】

アルブミンベースの輸送体ポリペプチド2-Ver 1：配列番号3：

SLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSV
VLLLRRLAKTYETTTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEE
PQNLIKQNC E LFEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTL
VEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVL
HEKTPVSDRVTKCTESLVNRRPCFSAL EVD ETYVPKEFN
AETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQ
LKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCF AE EGKKLVAAASQAAL
GL

【0227】

アルブミンベースの輸送体ポリペプチド2-Ver 1をコードするヌクレオチド配列：
配列番号7：

TCATTAGCTGCTGATTTTGTGTAAGGATGTTTGC A
AAAAC TATGCTGAGGCAAAGGATGTCTTCTG GGCATGTT
TTTGTATGAATATGCAAGAAGGCATCCTGATTACTCTGTC

GTGCTGCTGCTGAGACTTGCCAAAGACATATGAAACCACTC
TAGAGAAGTGCTGTGCCGCTGCAGATCCTCATGAATGCTA
TGCCAAAGTGTTTCGATGAATTTAAACCTCTTGTGGAAGAG
CCTCAGAAATTTAATCAAACAAAATTTGTGAGCTTTTTTGAGC
AGCTTTGGAGAGGTACAAATTTCCAGAATGCGCTATTAGTTTCG
TTACACCCAAGAAAGTACCCCAAGTGTCAACTCCAACCTCTT
GTAGAGGTTCTCAAGAAACCTAGGAAAAGTGGGCAGCAAAT
GTTGTAAACATCCTGAAGCAAAAAGAATGCCCTGTGTCAGA
AGACTATCTATCCGTGGTCCCTGAACCAGTTATGTGTGTGTG
CATGAGAAAACGCCAGTAAGTGAACAGAGTCAACCAAATGCT
GCACAGAAATCCTTGGTGAACAGGCGACCATGCTTTTTTCAGC
TCTGGAAGTCGATGAAACATACGTTCCCAAAGAGTTTAAAT
GCTGAAACATTTCACCTTCCATGCAGATATATGCACACTTT
CTGAGAAGGAGAGACAAATCAAGAAACAAACTGCACCTTGT
TGAGCTCGTGAAACACAAGCCCAAGGCAACAAAAGAGCAA
CTGAAAGCTGTTATGGATGATTTTCGCAGCTTTTGTAGAGA
AGTGCTGCAAGGCTGACGATAAGGAGACCTGCTTTTGCCGA
GGAGGGTAAAAAACTTGTGTGCTGCAAGTCAAGCTGCCTTA
GGCTTATGA

10

【0228】

20

アルブミンベースのヘテロ多量体2：

アルブミンベースの輸送体ポリペプチド1-Ver2：配列番号8：

DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFAQYLQQCPFEDHV
KLVNEVTEFAKTCVADESAENC DKSLHTLFGDKLCTVATL
RETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPNL PRLV RPEV
DVMCTAFHDNEETFLKKYLYE IARRHPYFYAPELLFFAKR
YKAAFTECCQAADKAACLLPKLDEL RDEGKASSAKQRLKC
ASLQKFGGERAFKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLT
KHTECHGDLLECADDRADLAKY ICENQDSISSKLKECCE
KPLLEKSHCI AEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYA
EAKDVFLGMFLYEYARA

30

【0229】

アルブミンベースの輸送体ポリペプチド1-Ver 2をコードするヌクレオチド配列：
配列番号9：

GATGCACACAAGAGTGAGGTTGCTCATCGGTTTAAAGATT
TGGGAGAAAGAAAAATTTCAAAGCCTTGGTGTTGATTGCCTT
TGCTCAGTATCTTCAGCAGTGTCATTTGAAGATCATGT
AAATTAGTGAATGAAGTAACCTGAATTTGCAAAAACATGT
TTGCTGATGAGTCAGCTGAAAAATTTGTGACAAATCACTTCA
TACCCCTTTTTTGGAGACAAATTTATGCACAGTTGCAACTCTT
CGTGAAACCTATGGTGAAATGGCTGACTGCTGTGCAAAAC
AAGAACCTGAGAGAAATGAATGCTTCTTGCACACAAAGA
TGACAAACCCAAACCTCCCCCGATTGGTGAGACCAGAGGTT
GATGTGATGTGCACTGCTTTTTTCATGACAAATGAAGAGACAT
TTTTTGAAAAAATACTTATATGAAATTTGCCAGAAGACATCC
TTACTTTTTATGCCCCGGAACCTCTTTTCTTTTGCTAAAAGG
TATAAAGCTGCTTTTTACAGAAATGTTTGCCAAGCTGCTGATA
AAGCTGCCCTGCCTGTTGCCAAAGCTCGATGAACCTTCGGGA
TGAAAGGGAAGGCTTCGTCTGCCAAACAGAGACTCAAGTG
GCCAGTCTCCAAAAATTTGGAGAAAGAGCTTTCAAAGCAT

40

50

GGGCAGTAGCTCGCCTGAGCCAGAGATTTCCCAAAGCTGA
GTTTGCAGAAAGTTTCCAAGTTAGTGACAGATCTTACCAA
GTCCACACGGGAATGCTGCCATGGAGATCTGCTTGAATGTG
CTGATGACAGGGCGGACCTTGCCAAAGTATATCTGTGAAAA
TCAAGATTTCGATCTCCAGTAAACTGAAGGAATGCTGTGAA
AAACCTCTGTGTTGGAAAAATCCCACTGCATTGCCGAAGTGG
AAAAATGATGAGATGCCCTGCTGACTTGCCCTTCATTAGCTGC
TGATTTTGTGTTGAAAGTAAGGATGTTTGCAAAAACTATGCT
GAGGCAAAGGATGTCTTCCCTGGGCAATGTTTTTGTATGAAT
ATGCAAGAGCATGA

10

【0230】

アルブミンベースの輸送体ポリペプチド2-Ver2：配列番号10：

SVVLLRLAKTYETTLKCCAAADPHCYAKVFDEFKPLV
EEPQNLIKQNCLEFELGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTP
TLVEVSRNLGKVGSKCKKHPEAKRMPCAE DYLSVV LNQLC
VLHEKTTPVSDRVTKCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKE
FNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATK
EQLKAVMDDFAAFVEKCKADDEKCTCFEEGKKLVAAASQA
ALGL

20

【0231】

アルブミンベースの輸送体ポリペプチド2-Ver2をコードするヌクレオチド配列：
配列番号11：

TCTGTCTGCTGCTGCTGAGACTTGCCAAAGACATATGAAA
CCACTCTAGAGAAGTGCTGTGCGCTGCAGATCCTCATGA
ATGCTATGCCAAAGTGTTTCGATGAATTTAAACCTCTTGTG
GAAGAGCCTCAGAAATTTAATCAAACAAAATTGTGAGCTTT
TTGAGCAGCTTGGAGAGTACAAATTTCCAGAAATGCGCTATT
AGTTCTGTTACACCAAGAAAGTACCCCAAGTGTCAACTCCA
ACTCTTGTAGAGGTCTCAAGAAACCTAGGAAAAGTGGGCA
GCAAAATGTTGTAAACATCCTGAAGCAAAAAGAATGCCCTG
TGCAGAAAGACTATCTATCCGTGGTCCCTGAACCAGTTATGT
GTGTTGCAATGAGAAAACGCCAGTAAGTGACAGAGTCACCA
AATGCTGTCACAGAAATCCTTGGTGAACAGGCGACCATGCTT
TTCAGCTCTGGAAGTCGATGAAACATACGTTCCCAAAGAG
TTTAATGCTGAAACATTCACCTTCCATGCAGATATATGCA
CACTTTCTGAGAAAGGAGAGACAAAATCAAGAAACAAACTGC
ACTTGTGTGAGCTCGTGAAACACAAGCCCAAGGCAACAAAA
GAGCAACTGAAAGCTGTTATGGATGATTTTCGCAGCTTTTGT
TAGAGAAAGTGCTGCAAGGCTGACGATAAGGAGACCTGCTT
TGCCGAGGAGGGTAAAAAACTTGTGTGCTGCAAGTCAAGCT
GCCTTAGGCTTATGA

30

40

【0232】

HAまたはHAAベースのヘテロ多量体の生成および発現

ヒト／哺乳動物発現に関して最適化されたコドンを用いて、遺伝子合成により、全長WT HAおよびHAベースの輸送体ポリペプチド単量体をコードする遺伝子を構築した。構築物は、シグナル配列EFATMAVMA PR TLVLLLSGALALTQTWAGの排除後に、既知の全長ヒト血清アルブミンプレタンパク質（GENEBANK：NP_000468.1）から設計した。最終遺伝子生成物を、哺乳動物発現ベクターpTT5（NRC-BRI, Canada）（Durocher et al）中にサブクローン化した。懸濁増殖ヒトCHO-3E7の一過性トランスフェクションによる高レベルおよ

50

びハイスループット組換えタンパク質産生を実施した。ここに記載される2つの足場の構築物境界に関しては、表3を参照されたい：アルブミンベースのヘテロ多量体1（ABH1）およびアルブミンベースのヘテロ多量体2（ABH2）。アルブミンベースのヘテロ多量体2は2つの輸送体ポリペプチド間に1つのジスルフィド結合を含み、一方アルブミンベースのヘテロ多量体1は完全に非共有結合的相互作用により形成される。図16Aおよび16Bは、それぞれ、ABH1およびABH2のタンパク質構造および記号的表現を示す。2つの図が示すように、両ABH構築物は2つの輸送体ポリペプチドAおよびB（表3に記載された配列）からなる。図6Aは、同時発現後の2つのヘテロ多量体構築物（ABH1およびABH2）のSDS-PAGE（非還元型）ゲル分析を提供する（異なるDNAトランスフェクション比が示されている）。WT全長HSAは対照として示される。予測通り、ABH2は非還元型SDS-PAGEでジスルフィド結合を保持し、MWはジスルフィド結合されていないABH1のほぼ2倍である。図6Aはまた、ABH2におけるヘテロ二量体の形成がDNAトランスフェクション比に依存し、1：1比でほとんどのヘテロ二量体生成物を産生することも実証している。最後に、6Aは、ABH2の断片Aは、単独の分子として発現される場合、よりホモ二量体を形成しやすくまた単量体のまま留まり易い（これは図6Bで観察された結果でもある）ことを実証する。図6Bは、同時発現（1：1DNAレベル）後の、2つのアルブミンベースのヘテロ多量体構築物（ABH1およびABH2）のネイティブゲル分析を提供する。WT全長HSAは対照として示される。ABH1およびABH2はともに、全長WT HSAに匹敵する予測された質量の複合体を形成する。さらに、発現時に、ABH1を形成する輸送体ポリペプチドもABH2を形成する輸送体ポリペプチドもホモ二量体化しない；むしろそれらは安定なヘテロ複合体を優先的に形成する（詳細に関しては、以下の表5参照）。

【表5】

表5：アルブミンベースのヘテロ多量体構築物

構築物	セグメント境界*	MW (kDa)
野生型HA	1:585 (配列番号 1)	64.3
ABH1 (AlbuCORE 2)	1:293 (配列番号 2)	32.2
	304:585 (配列番号 3)	30.9
ABH2 (AlbuCORE 1)	1:337 (配列番号 8)	37
	342:585 (配列番号 10)	26.7

【0233】

WT-HSAおよび2つのアルブミンベースのヘテロ多量体（ABH1およびABH2）を、0.1%w/vプルロニックおよび4mMグルタミンを補足したFreeStyle F17培地（Invitrogen）中の懸濁液中で増殖させたCHO-3E7細胞株中で発現させた。トランスフェクション当日の細胞密度は約 $1.5 \sim 2 \times 10^6$ 細胞/mlであるべきで生存度は97%より高くなければならない。5%pTTo-GFPプラスミド（トランスフェクション効率を決定するための緑色蛍光タンパク質、表4）、15%pTT22-AKTプラスミド、21%HSAプラスミド（各々10.63%）、68.37%のサケ精子DNAから作られたプラスミドDNAの混合物を用いて、特許出願WO 2009/137911に記載されたようにトランスフェクションを実行した。トランスフェクション後、次に、細胞を含有する振盪フラスコを、37℃で5%COを有する加湿インキュベーター中で120rpmに設定したオービタル振盪器上に置いた。トランスフェクションの24時間後、1%w/v TN1および0.5mM VPA（バルプロ酸）を培養に添加した。次に、培養物を、32℃に設定した5%CO2を有する加湿インキュベーター中に入れたオービタル振盪器（120rpm）上に移した。24～48時

間において、フローサイトメトリーで測定した場合、GFP陽性細胞が30～60%存在するはずである。細胞をトランスフェクション7日後に収穫し、4,000rpmで20分間遠心した。0.45μmフィルター(Millipore)を用いて、上清をフィルター滅菌した(清澄化)。上清を短期貯蔵のために4℃で、長期保存のために-80℃で保存した。精製前に、凍結上清を37℃で解凍し、真空中で5～10分間0.45μm膜フィルターを通して再濾過および脱気した。

【表6】

表6：WTおよびABH1構築物に関する発現の異なる段階での細胞生存度

HSA足場	トランスフェクション48時間後のGFP%	トランスフェクション48時間後の生存度%	トランスフェクション48時間後の生存度%
野生型HSA	67	94.6	72.3
ABH2	66.3	93.6	77.1

10

【0234】

ABH2、HSAおよびヘテロ多量体の精製

図6Aから観察されるように、1:1DNAトランスフェクション比の2つの輸送体ポリペプチドは、最も高いレベルのヘテロ二量体ABH2産物を生成した。この比の2つのポリペプチドを一過的に同時発現するCHO細胞を、上記のように培養した。その後のヘテロ二量体生成を以下のように実行した。野生型ヒトアルブミンをCHO細胞中にトランスフェクトしてABH2と同様に精製した。

20

【0235】

Blue Sepharoseマトリクス(GE Healthcare)を詰めた卓上型QIAGEN-tip 500カラムを用いて、自然流下方式により精製を実施した。Blue Sepharoseマトリクスを、20mlのPBS、pH7.2で平衡化した。試料を5ml/分の流量で充填し、その後20mlのPBSで洗浄した。1M NaClを追加した0.1M Na2HPO4、pH7.2でタンパク質を溶出して1ml画分中に収集した(合計20ml)。HSAを含有する画分(Bradfordタンパク質検定による)をプールし、1ml/mlの流量を用いてAKTA Express system(GE Healthcare)と連結されたHiLoad 16/60 Superdex 200 prep等級ゲル濾過カラム上に載せた。純度>85%のタンパク質を収集した；純粋試料を含有する画分をプールし、10000MWCOのカットオフ重量のAmicon Ultra膜を用いて遠心分離により濃縮した。図6Cは、いずれも精製の最終段階後のABH2ヘテロ多量体およびWT HSAのSDS-PAGE(非還元型)分析を示す。両構築物は、予測されたMWを示す。

30

【0236】

精製収率は約10mg/Lで、野生型全長HSAに匹敵した。この結果は、HEK細胞で実施されたV1087対照により生成された9mg/Lにも匹敵した。収率は、Blue Sepharoseおよびサイズ排除クロマトグラフィー後に測定されたナノドロップA280により決定した。

40

【0237】

示差走査熱量測定(DSC)を用いたアルブミンベースのヘテロ多量体の安定性測定

GEまたはMicroCal VP-毛細管計器を用いて、すべてのDSC実験を実行した。タンパク質をPBS(pH7.4)中に緩衝液交換して0.3～0.7mg/mLに希釈し0.137mLで試料セル中に充填し、1℃/分の走査速度にて20～100℃で測定した。Originソフトウェア(GE Healthcare)を用いてデータを解析して、PBS緩衝液バックグラウンドを差し引いた。結果として決定された融解温度に関しては、表7および図7を参照のこと。

【表 7】

表7：アルブミンベースのヘテロ多量体に関する融解温度

分子	測定質量 (Da)	理論的 MW (Da)	Tm° C
HAS 野生型	66620	66470	75
ABH2	66100	65880	63
ABH1	測定されず	測定されず	60

【0238】

表面プラズモン共鳴を用いたHSAおよびABH2のFcRn結合の評価
 図8A～Bで観察されるように、HSAおよびHSAベースのヘテロ多量体がSPR表面に固定化した際、FcRnに対する親和性は、全長WT HSAおよびABH2間で同等であるように見え、このことはアルブミンのFcRn結合機能性はアルブミンベースの輸送体ポリペプチドの自己集合により形成されるヘテロ多量体により保持されることを示している。以下の表8は、FcRn結合データを示す。括弧内の値は、標準偏差を指す。

10

【表 8】

表8：表面プラズモン共鳴を用いたHSAおよびABH2のFcRn結合の動的および平衡適合

	群別適合化Ka (1/Ms)	群別適合化Kd (1/s)	群別適合化KD (M)	
HSA	5.3E+04 (7E+03)	7.0E-02 (2.0E-02)	1.4E-06 (6.0E-07)	動的適合
ABH2	5.0E+04 (4E+03)	4.2E-02 (8.0E-03)	8.0E-07 (2.0E-07)	動的適合
HSA			9.0E-07 (1.0E-07)	平衡適合
ABH2			9.0E-07 (1.0E-07)	平衡適合

20

【0239】

実施例3：抗Her2/neuおよび抗CD16 scFv生物活性融合体を含む一価および四価を有するアルブミンベースのヘテロ多量体の生成および発現。

抗Her2 scFv (4D5) および/または抗CD16 scFv (NM3E) であるカーゴポリペプチドへ一方または両方の末端で融合される単一単量体輸送体ポリペプチド、配列番号8および配列番号10を発現することにより、多価ヘテロ多量体ABH2を生成した。4D5という用語は、本明細書中で用いる場合、4D5抗体のヒト化配列を指し、scFv分子フォーマットにおけるV1およびVhドメイン間にリンカー領域を伴うトラスツマブ抗体中の可変ドメインのアミノ酸配列に対応する。これらは輸送体ポリペプチド1を基礎にした8つのベース構築物単量体ならびに輸送体ポリペプチド2を基礎にした8つのベース構築物単量体の一式を形成する。これらのベース構築物の異なる組合せは同時発現時に組み合わされて、一価から四価までの範囲で、2つの輸送体ポリペプチドの4つの末端位置のいずれかで2つのカーゴポリペプチドのすべての組合せを提示するヘテロ多量体を形成する。

30

【0240】

図9に示したように、生物活性カーゴポリペプチドを、単量体のN末端に関してはGGSGリンカーを介して、および他の単量体におけるすべての他の末端に関してはより長い(GGS)4GGリンカーを介して、ヘテロ多量体輸送体ポリペプチドに融合した。

40

【0241】

表9は、4D5およびNM3Eカーゴポリペプチドを輸送体ポリペプチド1 (F1) または輸送体ポリペプチド2 (F2) のN末端またはC末端に融合することにより生成された16のベース構築物 (ベース構築物#1～ベース構築物#16) を示す。F1は配列番号8に対応し、およびF2は配列番号10に対応する。

【表 9】

表9

単一融合体				
#	融合体1	融合体2	融合体3	配列番号 (ヌクレオチド/アミノ酸):
1	NM3E2	F1		95/96
2	F1	NM3E2		97/98
3	NM3E2	F2		99/100
4	F2	NM3E2		101/102
5	4D5	F1		103/104
6	F1	4D5		105/106
7	4D5	F2		107/108
8	F2	4D5		109/110
二重融合体				
9	NM3E2	F1	NM3E2	111/112
10	NM3E2	F2	NM3E2	113/114
11	4D5	F1	4D5	115/116
12	4D5	F2	4D5	117/118
13	NM3E2	F1	4D5	119/120
14	4D5	F1	NM3E2	121/122
15	NM3E2	F2	4D5	123/124
16	4D5	F2	NM3E2	125/126

【0242】

多価構築物を、ヘテロ多量体ABH2を用いて実施例2に略記したように生成した。最終遺伝子生成物を、哺乳動物発現ベクターpTT5 (NRC-BRI, Canada) (Durocher et al) 中にサブクローン化した。懸濁増殖ヒトCHO-3E7の一過性トランスフェクションによる高レベルおよびハイスループット組換えタンパク質産生を実施した。これらの構築物の調製および発現に関する追加の詳細は、実施例11に見出される。

【0243】

発現タンパク質を有する細胞上清を1ml/mlの流量を用いて、Blue Sepharoseマトリクス (GE Healthcare) を詰めAKTA Express system (GE Healthcare) と連結されたQIAGEN-tip 500カラムに適用することにより、精製を実施した。カラムは、20mlのPBS、pH 7.2、300mM NaClからなる試料緩衝液で平衡化した。試料を5ml/分の流量で充填し、その後試料緩衝液で洗浄した。300mM~2000mMの範囲のNaCl勾配の適用により、タンパク質を溶出した。より高い塩濃度で溶出する画分が最も純粋であり、それをプールして濃縮し、その後1ml/mlの流量を用いて、AKTA Express system (GE Healthcare) と連結されたHiLoad 16/60 Superdex 200 prep等級ゲル濾過カラムに適用した。純度>85%のタンパク質を収集した；純粋試料を含有する画分をプールし、10000 MW COのカットオフ重量のAmicon Ultra膜を用いて遠心分離により濃縮した。図10A~10Bは、異なるカーゴポリペプチドと融合されたABH2ヘテロ多量体SDS-PAGE (非還元型) 分析を示す。輸送体ポリペプチドと比較したヘテロ多量体中のそれらのポリペプチドの位置を、以下の表10に略記する。全構築物が、予測された分子量を示した。

【表 10 - 1】

表10: 4D5およびNM3カーゴポリペプチドを、ABH2の輸送体ポリペプチド1または輸送体ポリペプチド2のNまたはC末端に融合することにより生成した一価、多価、および多重特異性構築物。

変異体	N 末端—輸送体ポリペプチド1 (配列番号8)	C 末端—輸送体ポリペプチド1 (配列番号8)	N 末端—輸送体ポリペプチド2 (配列番号10)	C 末端—輸送体ポリペプチド2 (配列番号10)	原子価	配列 (ポリペプチド)
513	NM3E				一価	配列番号 96 配列番号 10
514		NM3E			一価	配列番号 98 配列番号 10
515			NM3E		一価	配列番号 8 配列番号 100
516				NM3E	一価	配列番号 8 配列番号 102
517	4D5				一価	配列番号 104 配列番号 10
518		4D5			一価	配列番号 106 配列番号 10
519			4D5		一価	配列番号 8 配列番号 108
520				4D5	一価	配列番号 8 配列番号 110
521	NM3E		NM3E		二価	配列番号 96 配列番号 100
522	NM3E			NM3E	二価	配列番号 96 配列番号 102
523		NM3E	NM3E		二価	配列番号 98 配列番号 100
524		NM3E		NM3E	二価	配列番号 98 配列番号 102
525	4D5		4D5		二価	配列番号 104 配列番号 108
526	4D5			4D5	二価	配列番号 104 配列番号 110
527		4D5	4D5		二価	配列番号 106 配列番号 108
528		4D5		4D5	二価	配列番号 106+108/110
529	NM3E	NM3E			二価	配列番号 112 配列番号 10
530			NM3E	NM3E	二価	配列番号 8 配列番号 114
531	4D5	4D5			二価	配列番号 116 配列番号 10
532			4D5	4D5	二価	配列番号 8 配列番号 118
540	4D5	4D5		4D5	三価	配列番号 116 配列番号 110
542	4D5	4D5	4D5	4D5	四価	配列番号 116 配列番号 118

10

20

30

40

【表 10 - 2】

543	NM3E		4D5		二重特異性	配列番号96 配列番号108
544	NM3E			4D5	二重特異性	配列番号96 配列番号110
545		NM3E	4D5		二重特異性	配列番号98 配列番号108
546		NM3E		4D5	二重特異性	配列番号98 配列番号110
547	4D5		NM3E		二重特異性	配列番号104 配列番号100
548		4D5	NM3E		二重特異性	配列番号106 配列番号100
549	4D5			NM3E	二重特異性	配列番号104 配列番号102
550		4D5		NM3E	二重特異性	配列番号106 配列番号102
551	NM3E	4D5			二重特異性	配列番号120 配列番号10
552	4D5	NM3E			二重特異性	配列番号122 配列番号10
553			NM3E	4D5	二重特異性	配列番号8 配列番号124
554			4D5	NM3E	二重特異性	配列番号8 配列番号126
593	4D5			NM3E	二重特異性	配列番号128
594	NM3E			4D5	二重特異性	配列番号130

10

20

【0244】

単一抗CD16scFvに融合される一価ABH2のSPR結合

輸送体ポリペプチド 配列番号10（構築物v515）のN末端へ単一抗CD16scFvに融合された精製ヘテロ多量体 ABH2を、表面プラズモン共鳴（SPR）を用いる結合実験に用いた。可溶性CD16をCM5表面に共有的に固定化して、抗CD16scFvに融合されたABH2を捕捉し、結合反応速度を測定した。

30

【0245】

SPR補給品： GLMセンサーチップ、Biorad ProteOn アミンカップリングキット（EDC、sNHSおよびエタノールアミン）、ならびに10mM酢酸ナトリウム緩衝液は、Bio-Rad Laboratories（Canada）Ltd.（Mississauga, ON）から購入した。組換えHer-2タンパク質は、eBioscience（San Diego, CA）から購入した。HEPES緩衝液、EDTAおよびNaClは、Sigma-Aldrich（Oakville, ON）から購入した。10% Tween 20溶液は、Teknova（Hollister, CA）から購入した。

40

【0246】

SPRバイオセンサー検定： 表面プラズモン共鳴検定はすべて、BioRad ProteOn XPR36計器（Bio-Rad Laboratories（Canada）Ltd.（Mississauga, ON））を、HBSTランニング緩衝液（10mM HEPES、150mM NaCl、3.4mM EDTAおよび0.05% Tween 20、pH7.4）とともに25℃で用いて、実行した。分析物（水平）方向に30μL/分で300秒間注入された標準BioRad sNHS/EDC溶液の1:5希釈液により活性化されたGLMセンサーチップを用いて、CD16捕捉表面を生成した。活性化直後に、3000共鳴単位（RUs）が固定化されるまで、10mM NaOAc、pH4.5中のCD16の4.0μg/mL溶液を25μL/分の流量でリガンド（

50

垂直) 方向に注入した。残りの活性基を、分析物方向に $30 \mu\text{L}/\text{分}$ で 300 秒の 1M エタノールアミン注射によりクエンチし、これは模擬活性化インタースポットがブランク参照のために生じることも保証する。

【0247】

V515の 500nM の3倍希釈液シリーズを、ブランク(L5)と比較される 3000RU sのCD16aWT(L6)に対し注入した。流量 $50\mu\text{L}/\text{分}$ で 120 秒間、解離相 240 秒。標準ランニング緩衝液(DPBS/3.4mM EDTA/0.05% Tween20)および追加の 350mM NaClを含むランニング緩衝液で、注入を反復した。センサーグラムを整列し、緩衝液ブランク注入およびインタースポットを用いて二重参照して、その結果生じたセンサーグラムを、Protein Managerソフトウェア v3.0を用いて分析した。典型的には、平衡適合モデルを用いて結合等温線から K_D 値を測定した。解離速度の遅い高親和性相互作用に関して、局所的 R_{max} を用いて参照センサーグラムを1:1 Langmuir結合モデルに適合させることにより動的小および親和性値を追加で決定し、および親和性定数($K_D\text{M}$)を、結果として生じる速度定数($k_{\text{on}}\text{s}^{-1}/k_{\text{off}}\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)から得た。 K_D 値はすべて、3つの個々の実行からの平均および標準偏差として報告される。

【0248】

表11に示すように、単一抗CD16 scFvに融合されるABH2ヘテロ多量体は十分な活性を有し、良好な再現性および遊離の抗CD16 scFv(NM3E)と同様の K_D で、その標的に結合する。

【表11】

表11: 単一抗CD16 scFvに融合される一価ABH2に関するSPRデータ

	注入 #1				注入 #2					
	k_{on}	k_{off}	K_D		k_{on}	k_{off}	K_D		$K_D(\text{M})$ 平均	$K_D\text{SD}$
	1/Ms	1/s	M		1/Ms	1/s	M			
NM3E	5.37E+04	5.76E-03	1.07E-07		5.89E+04	6.03E-03	1.02E-07		1.05E-07	4.E-09
V515 Dec	6.11E+04	6.71E-03	1.10E-07							
V515 Jan	5.56E+04	7.30E-03	1.31E-07							

【0249】

実施例4 カーゴタンパク質(単数または複数)が1つ以上のEGF-A様ドメインを含むHAまたはHAAベースのヘテロ多量体の調製。

低密度リポタンパク質受容体(LDL-R)を特異的に結合し得る、PCSK9タンパク質中のEGF-Aドメインのペプチド配列またはEGF-Aドメインと相同の別のポリペプチド配列は、シーケンシングによりまたはGenBankのようなデータベースから得られる。EGF-A様ドメインを含むカーゴポリペプチドに関するcDNAは、種々の手段により、例えばcDNAライブラリーから、RT-PCRにより、ならびにPCRにより(これらに限定されない)、一連の重複する合成オリゴヌクレオチドプライマーを用いて、すべて標準方法を用いて単離される。ある例では、カーゴタンパク質は、安定性、標的結合特徴またはその他の生物物理学的または治療的関連特性を改善するよう改変される。ポリペプチドは、高コレステロール血症の処置における適用を伴うヘテロ多量体の作成において、カーゴタンパク質として用いられる。第一および第二の単量体融合ポリペプチド配列は、カーゴタンパク質配列を、HAまたはHAAベースの輸送体ポリペプチド、例えば配列番号2、配列番号3、配列番号8または配列番号10のN末端またはC末端に、直接的にまたは中間リンカーペプチドを用いて融合することにより得られる。この単量体融合タンパク質配列は逆翻訳されて発現ベクター中に導入されるその対応DNA配列となり、配列は特定の目的の細胞株での発現のために最適化される。第一および第二の単量体融合タンパク質はトランスフェクトされ、目的の細胞株で同時発現される。ある場合には、トランスフェクションは2つのベクターに関して1:1比である。いくつかの例では、その比は1.5:1、2:1、1:1.5、1:2等から選択される。

【0250】

実施例5 カーゴタンパク質（単数または複数）がGLP-1および／またはグルカゴンであるHAまたはHAAベースのヘテロ多量体タンパク質の調製。

GLP-1受容体の特異的に結合し得るかまたはGLP-1アゴニストとして作用し得るGLP-1のペプチド配列、またはこのペプチドと相同の別のポリペプチド配列は、シーケンシングによりまたはGenBankのようなデータベースから得られる。あるいは、グルカゴン受容体の特異的に結合し得るかまたはグルカゴン受容体アゴニストとして作用し得るグルカゴンのペプチド配列、またはこのペプチドと相同の別のポリペプチド配列は、シーケンシングによりまたはGenBankのようなデータベースから得られる。GLP-1またはグルカゴンを含む各カーゴポリペプチドに関するcDNAは、種々の手段により、例えばcDNAライブラリーから、RT-PCRにより、ならびにPCRにより（これらに限定されない）、一連の重複する合成オリゴヌクレオチドプライマーを用いて、すべて標準方法を用いて単離される。ある例では、これらのGLP-1またはグルカゴンベースのカーゴポリペプチドは、安定性、標的結合特徴またはその他の生物物理学的または治療的関連特性を改善するよう改変される。これらのGLP-1およびグルカゴンベースのポリペプチドは、2型糖尿病またはグルコース代謝に関連した別の疾患の処置における適用を伴うヘテロ多量体の作成において、1つ以上のカーゴ分子として用いられる。第一および第二の単量体融合ポリペプチド配列は、カーゴタンパク質配列を、HAまたはHAAベースの輸送体ポリペプチド、例えば配列番号2、配列番号3、配列番号8または配列番号10のN末端またはC末端に、直接的にまたは中間リンカーペプチドを用いて融合することにより得られる。融合タンパク質は、GLP-1またはグルカゴン様ポリペプチドに関して多重特異性であってよく、あるいはGLP-1およびグルカゴン様ポリペプチドの両方に関して二重特異性（共アゴニスト）であり得る。各単量体融合タンパク質配列は逆翻訳されて発現ベクター中に導入されるその対応DNA配列となり、配列は特定の目的の細胞株での発現のために最適化される。第一および第二の単量体融合タンパク質はトランスフェクトされ、目的の細胞株で同時発現される。ある場合には、トランスフェクションは2つのベクターに関して1:1比である。いくつかの例では、その比は1.5:1、2:1、1:1.5、1:2等から選択される。

【0251】

カーゴ分子GLP-1の配列

配列番号12: H A E G T F T S D V S S Y L E G Q A A K E F I A W L V K G R G

【0252】

カーゴ分子グルカゴンの配列

配列番号13: H S Q G T F T S D Y S K Y L D S R R A Q D F V Q W L M N T

【0253】

実施例6: 膜センシング多価足場としてのアネキシンタンパク質反復

アネキシンを広範な界面で分割して2つの輸送体ポリペプチドを含む多価ヘテロ多量体足場を生成する。アネキシンは346残基のタンパク質(PDB ID 1MCX)である。残基186および194間の領域で分割されたアネキシンをベースにした2つの輸送体ポリペプチドを含むヘテロ多量体を図11に示す。溶液中で同時発現されると、2つの輸送体ポリペプチド間の大きな界面面積はヘテロ二量体の自己集合をもたらす。2つの単位の自己集合は、アネキシンコアをベースにした輸送体ポリペプチドを伴う多価構築物の設計を可能にする。ブタおよびヒトの2つの構造が入手可能である。この2つの構造は、0.6Åのrmsdで重ねることができる。以下の区間の配列が、ヒトアネキシン配列から除去され得るDRSEDF（残基160～165）。切断化はいかなる二次構造要素も破壊せず、任意のプロリン残基を導入するかまたは除去することを包含しない。

【0254】

ヒトアネキシンWT配列

配列番号14:

G S A V S P Y P T F N P S S D V A A L H K A I M V K G V D E A T I I D I L T K R
N N A Q R Q Q I K A A Y L Q E T G K P L D E T L K K A L T G H L E E V V L A L L

KTPAQFDADELRAAMKGLGTDEDTLIEILASRTNKEIRDIN
 NRVYREELKRDLAKDITSDTSGDFRNALLSLAKGDRSEDF
 GVNEDLADSDARALYEAGERRKGTDVNVFNTILTTRSY PQ
 LRRVFQKYTKYSKHDMNKVLDLELKGDIEKCLTAIVKCAT
 SKPAFFAEKHLHQAMKGVGTRHKALIRIMVSRSEIDMNDIK
 AFYQKMYGISLCAILDETKGDYEKILVALCGGN

【0255】

アネキシンベースの輸送体ポリペプチド-1の配列

配列番号15:

SAVSPYPTFNPS SDVAALHKAIMVKGVDEATIIDILTKRN
 NAQRQQIKAAYLQETGKPLDETLKKALTGHL EEVVLALLK
 TPAQFDADELRAAMKGLGTDEDTLIEILASRTNKEIRDIN
 RVYREELKRDLAKDITSDTSGDFRNALLSLAKG

10

【0256】

アネキシンベースの輸送体ポリペプチド-2の配列

配列番号16:

GVNEDLADSDARALYEAGERRKGTDVNVFNTILTTRSY PQ
 LRRVFQKYTKYSKHDMNKVLDLELKGDIEKCLTAIVKCAT
 SKPAFFAEKHLHQAMKGVGTRHKALIRIMVSRSEIDMNDIK
 AFYQKMYGISLCAILDETKGDYEKILVALCGGN

20

【0257】

図12は、アネキシンベースの輸送体ポリペプチド-1 (ABT-1) およびアネキシンベースの輸送体ポリペプチド-2 (ABT-2) の界面での埋没した溶媒接触接表面積のプロットを示す。残基位置186近くで分割されたアネキシンは、約 $3200 \text{ \AA}^2$ の埋没表面積を有するヘテロ二量体を形成する。アネキシンをベースにしたABT-1およびABT-2などの輸送体ポリペプチドは、アルブミンベースの輸送体ポリペプチドに関して上記したものと同一の方法を用いて、カーゴ生体分子と結合するために用いられ得る。

【0258】

実施例7: 多価足場としてのトランスフェリン

トランスフェリンの多数の治療的に関連する特性に基づいて、このタンパク質は、自己集合性タンパク質およびそのスプリット構成成分部分の作成後、多価タンパク質融合薬剤の設計のための興味深い足場分子であることを示す。トランスフェリンの構造は、タンパク質データバンクで入手可能な結晶構造(1H76)に基づき図13に示されている[Hall D R et al., Acta Crystallogr D 2002, 58, 70-80]。トランスフェリン分子は、残基333および342間の短いペプチドリンカーにより接続される2つの構造的に類似した丸い部分、すなわちN末端およびC末端ローブからなる。

30

【0259】

ヘテロ二量体は、トランスフェリンタンパク質をベースにして設計され、前記ヘテロ二量体は、トランスフェリンの残基1~333を伴う第一輸送体ポリペプチド、および元のトランスフェリン配列の342からC-末端までの残基からなる第二輸送体ポリペプチドを含む。同時発現される場合、2つの輸送体ポリペプチドは独立してフォールドし、対合してその治療的関連特性を保持し得る擬似トランスフェリン足場を形成する。さらに、このようなトランスフェリン足場は、多価融合分子、例えばトランスフェリンをベースにした輸送体ポリペプチドとの多価GLP-1融合体、の産生を可能にする。これらの融合体は、アルブミンベースの輸送体ポリペプチドを伴うGLP-1-融合ポリペプチドと類似であり得る。

40

【0260】

図13はPDB構造 1H76をベースにしたトランスフェリン分子の構造を提供する。トランスフェリン分子を分割することにより得られる2つの単量体輸送体ポリペプチド

50

は、明灰色および暗灰色単位として色分けされている。カーゴ分子を融合する部位は、球として表されている。図14は、2つのトランスフェリンベースのポリペプチドの界面での埋没した溶媒接触表面積のプロットを示す。以下に示す2つの輸送体ポリペプチドのような残基位置330近くで分割されたトランスフェリンは、約1800 Å²の埋没表面積を有するヘテロ二量体を形成する。

【0261】

トランスフェリンベースの輸送体ポリペプチドー1の配列：

配列番号17：

```
MRLAVGALLV CAVLGLCLAV PDKTVRWCAV SEHEATK
CQS FRDHMKSVIP SDGPSVACVK KASYLDCIRA IAA
NEADAVT LDAGLVYDAY LAPNNLKPVV AEFYGSKEDP
QTFYYAVAVV KKDSGFQMNQ LRGKKSCHTG LGRSAG
WNIP IGLLYCDLPE PRKPLEKAVA NFFSGSCAPC AD
GTDFFPQLC QLCPGCGCST LNQYFGYSGA FKCLKDGAG
D VAFVKHSTIF ENLANKADRD QYELLCLDNT RKPVD
EYKDC HLAQVPSHTV VARSMGGKED LIWELLNQAQ E
HFGKDKSKE FQLFSSPHGK DLLFKDSA HG FLKVP PRM
DA KMYLGYEYVT AIRNLREG.
```

10

【0262】

トランスフェリンベースの輸送体ポリペプチドー2の配列：

配列番号18：

```
ECKPVKWCALSHHE RLKCDWESVN SVGKIECVSA ETT
EDCIAKI MNGEADAMSL DGGFVYIAGK CGLVPVLAEN
YNKSDNCEDT PEAGYFAVAV VKKSASDLTW DNLKGK
KSCH TAVGRTAGWN IPMGLLYNKI NHCRFDEFFS EG
CAPGSKKD SSLCKLCMGS GLNLCEPNK EGYGYTGAF
RCLVEKGDVA FVKHQTV PQN TGGKNPDPWA KNLNE
KDYEL LCLDGTRKPV EYANCHLAR APNHAVVTRK D
KEACVHKIL RQQQH LFGSN VTDCSGNFCL FRSE TKDL
LF RDDTVCLAKL HDRNTYEKYL GEEYVKAVGN LRKC
STSSLL EACTFRRP
```

20

30

【0263】

実施例8：ジスルフィド安定化されたHAまたはHAAベースのヘテロ多量体タンパク質の設計

アルブミンベースの輸送体ポリペプチドを設計したが、ここではアルブミンに対し、輸送体ポリペプチドの各々において特定位置がシステインに突然変異化されて2つの輸送体ポリペプチド間のジスルフィド結合の選択的形成を可能にし、擬似ネイティブアルブミン単量体構造を有する安定ヘテロ二量体を生じる。

【0264】

以下の因子を考慮に入れながら、システインの導入のための残基を選択した：

40

a. 2つの輸送体ポリペプチド間に共有結合を形成して、それによりヘテロ多量体およびその結果生じる擬似ネイティブ単量体形態の安定性を増大する。

b. ジスルフィド結合を形成するためには、特定のCA-CAおよびCB-CB境界内でなければならない。

c. 適合性の局所的環境（一般的に、部分的な溶媒露出領域におけるより短い疎水性側鎖が好ましい）は、存在している極性接触を妨げにくい。

【0265】

突然変異をQuickChangeにより実施し、そして上記の実施例1および2に提示したように発現および精製を実施した。

【0266】

50

以下の表 1 2 は、設計された導入システインを含む多数のアルブミンベースのヘテロ多量体を示す。A B H 3 ～ 8 は、A B H 2 デザインをベースに設計され、一方、A B H 9 ～ 1 2 は A B H 1 デザインに基づいた。

【表 1 2】

表 1 2 : 導入システインを含むアルブミンベースのヘテロ多量体

ヘテロ多量体	変異体 ID	輸送体ポリペプチド 1 (N末端アルブミンセグメントの最初～最後のアミノ酸を意味する)	輸送体ポリペプチド 2 (C末端アルブミンセグメントの最初～最後のアミノ酸を意味する)	輸送体ポリペプチド 1 中の新規の Cys	輸送体ポリペプチド 2 中の新規の CYS
ABH3	881	1-337 (配列番号 19)	342-585 (配列番号 20)	A217C	V343C
ABH4	882	1-337 (配列番号 21)	342-585 (配列番号 22)	L331C	A350C
ABH5	883	1-337 (配列番号 23)	342-585 (配列番号 24)	A217C	L346C
ABH6	884	1-337 (配列番号 25)	342-585 (配列番号 26)	W214C	V343C
ABH7	885	1-337 (配列番号 27)	342-585 (配列番号 28)	A335C	L346C
ABH8	886	1-337 (配列番号 29)	342-585 (配列番号 30)	L198C	V455C
ABH9	887	1-293 (配列番号 31)	304-585 (配列番号 32)	A217C	A335C
ABH10	888	1-293 (配列番号 33)	304-585 (配列番号 34)	A217C	L331C
ABH11	889	1-293 (配列番号 35)	304-585 (配列番号 36)	L198C	N458C
ABH12	890	1-293 (配列番号 37)	304-585 (配列番号 38)	A194C	V455C

10

【0 2 6 7】

20

変異体 A B H 3、A B H 4、A B H 5、A B H 6、A B H 7 および A B H 8 を、小規模の 2 m L C H O 培養中で、D N A 比 1 : 1 (断片 1 : 断片 2) で発現させた。発現のゲルを図 3 5 に示す。W T -アルブミン (v 2 2 5) も、先の変異体 A l b u C O R E 1 および A l b u C O R E 2 とともに、対照として発現させた。変異体 A B H 3、A B H 5 および A B H 7 は A B H 2 と同様に発現したが、一方、残りの変異体は発現がより低く、およびジスルフィドの無秩序な組み合わせの可能性 (非還元型 S D S P A G E における多数のバンドにより認識される) を示し、これはおそらく導入したシステイン突然変異と同時に天然ジスルフィド位置が存在するためであると思われる。発現の回復は、切断部位を変えることにより (実施例 9 参照)、または異なる D N A 比でトランスフェクトすることにより達成され得る。これらの構築物の末端にはリンカーは存在しなかった。A B H 9、A B H 1 0、A B H 1 1 および A B H 1 2 のような変異体におけるジスルフィド結合システイン突然変異の導入は、それらが元の界面に天然ジスルフィド結合位置を欠くため、この問題に対処すると予測される。

30

【0 2 6 8】

実施例 9 : 異なるセグメント化部位をベースにした H A または H A A ベースのヘテロ多量体タンパク質の設計

以下の表 1 3 は、図 1 5 A ～ 1 5 P に示されるようなおよび表 1 に列挙される種々の部位でアルブミンをセグメント化することにより設計される輸送体ポリペプチドを含む、本明細書中に記載されるようなヘテロ多量体構築物を提供する。実施例 8 に記載された先の構築物および前記のものとは異なり、実施例 9 における A l b u C O R E 構築物はすべて、断片 1 の C 末端および断片 2 の N 末端へ融合される G G G G S リンカーを用いて作成した。これは、以下の理由のために行なった : 1) 短いリンカーの存在は典型的な融合分子を再作成し、切断部位 (単数または複数) とリンカーの存在の適合性を理解することができる。2) リンカーの存在はまた、いくつかの露出した疎水性パッチを遮蔽することを含め、切断部位周囲の局所的環境を安定化するのに役立ち得る。3) リンカーの存在は、弾頭がその分子と融合される場合、その後の段階における変数の数を低減する。発現結果に関しては表 1 3 を参照されたい。発現は最初に小規模の C H O 培養にて、異なる組合せ比で実施された各 A l b u C O R E 変異体における 2 つの断片で試験した。図 3 5 A および B におけるゲルは、発現結果を示す。

40

【表 1 3】

表13：異なるアルブミンセグメントをベースにしたアルブミンベースのヘテロ多量体構築物。

ヘテロ多量体	ID	輸送体ポリペプチド1 (N末端アルブミンセグメントの最初～最後のアミノ酸を意味する)	輸送体ポリペプチド2 (C末端アルブミンセグメントの最初～最後のアミノ酸を意味する)
ABH13	AlbuCORE_1A	1-339 (配列番号 39)	340-585 (配列番号 40)
ABH14	AlbuCORE_2A	1-300 (配列番号 41)	301-585 (配列番号 42)
ABH15	AlbuCORE_3	1-364 (配列番号 43)	365-585 (配列番号 44)
ABH16	AlbuCORE_4	1-441 (配列番号 45)	442-585 (配列番号 46)
ABH17	AlbuCORE_6	1-83 (配列番号 47)	85-585 (配列番号 48)
ABH18	AlbuCORE_7	1-171 (配列番号 49)	172-585 (配列番号 50)
ABH19	AlbuCORE_9	1-281 (配列番号 51)	282-585 (配列番号 52)
ABH20	AlbuCORE_13	1-114 (配列番号 53)	115-585 (配列番号 54)

10

【0 2 6 9】

選択した変異体の発現を実施例2に記載されたとおりに実施し、一方、精製は実施例17に記載されるように実行した。用いたリンカー、ジスルフィド架橋、および発現結果のまとめに関するこれらの分子の特質を表14に示す。

【表 1 4 - 1】

表 1 4 : 表 1 3 に列挙した変異体の発現の結果

配列 番号 (ポリ ペプ チド)	変異 体	足場	スプリット／欠 失	断片1:断片2	断片1分 子量	断片2分 子量	界面 S-S [Al buCO REを形 成する 2つの 断片間 のジス ルフィド 結合]	最適 DNA 比 (断 片1: 断片 2)	発現(Alb uCORE _1 およ びクロ ン化WT HSA と比 較). バンド強 度に基づ いたおよ その概算 (ソフトウ ェアにより 評価)。	リンカー
39+40	1634	AlbuCO RE_1A	nick(339-340)	1-339:340-585	39. 03 kDa	28. 10 kDa	316. CYS - 361. CYS	1:1	密接に関 連するAl buCOR E_1 より ~30% 良好。単 一断片は 1:0 およ び0:1 DNA 比で 依然とし て目視可 能。過剰 な場合、 多量体化 の明白な 徴候な し。	断片 1:GGGS(新 規C 末端) 断片 2:GGGS (新規N 末 端)
41+42	1635	AlbuCO RE_2A	nick(300-301)	1-300:301-585	34. 53 kDa	32. 59 kDa	N/A	1:1、 1:0 およ び 0:1 のみ 試験 した。	発現は、 AlbuCO RE_1 より ~30% 良好であ るが複合 体の評価 のためには ネイテ ィブゲル を要す る。	断片 1:GGGS(新 規C 末端) 断片 2:GGGS (新規N 末 端)

10

20

30

40

【表 1 4 - 2】

43+44	1636	AlbuCO RE_3	nick(364-365)	1-364:365-585	41.78 kDa	25.35 kDa	360. CYS - 369. CYS	1:2	~ 30-50% 良好。断 片1は、 過剰であ ると、多量 体化する 傾向有り (DNA比は 最適化さ れていな い)	断片 1:GGGS(新 規C末端) 断片2: GGGS(新 規N末端)
45+46	1637	AlbuCO RE_4	nick(441-442)	1-441:442-585	50.65 kDa	16.48 kDa	437. CYS - 448. CYS	1:2	~ 30-50% 良好。断 片1は、D NA比が 最適化さ れない と、過剰 多量体化 の徴候な し。	断片1: GGGS(新 規C末端) 断片2: GGGS(新 規N末端)
47+48	1638	AlbuCO RE_6	Δ(84)	1-83:85-585	9.68 kDa	57.29 kDa	75. CYS - 91. CYS	1:1、 1:0 およ び 0:1 のみ テス トし た。	かすかな 二量体バ ンドが存 在、1:1が 良いよう に見える。 断片2は、 0:1 DNA 比で発現さ れると、多 量体化する 傾向。1:1 では、無 秩序な組 み合わせ または多 量体化の 明らかな 徴候なし。	断片1: GGGS(新 規C末端) 断片2: GGGS(新 規N末端)
49+50	1639	AlbuCO RE_7	nick(171-172)	1-171:172-585	20.18 kDa	46.95 kDa	168. CYS - 177. CYS	弱い 発現	50 %また はそれよ り低い。	断片1: GGGS(新 規C末端) 断片2: GGGS(新 規N末端)

10

20

30

40

【表 1 4 - 3】

51+52	1640	AlbuCO RE_9	nick(281-282)	1-281:282-585	32.43 kDa	34.70 kDa	278. CYS - 289. CYS	2:1	~ 30-50% 良好。断 片1は、 過剰であ ると、多量 体化する 傾向有り (DNA比は 最適化さ れていな い)。結果 は、0:1レ ーンに関 しては不 明。	断片1: GGGS (新 規C末端) 断片2: GGGS (新 規N末端)
53+54	1641	AlbuCO RE_13	nick(114-115)	1-114:115-585	13.31 kDa	53.82 kDa	N/A	弱い 発現	50 %また はそれよ り低い。	断片1: GGGS (新 規C末端) 断片2: GGGS (新 規N末端)
This is ABH2	221	AlbuCO RE_1 (CONTROL)	nick(338-341)	1-337:342-585	38.48kDa	27.51kDa	316. CYS - 361. CYS		断片1 お よび断片 2の弱い 発現が 1:0 およ び0:1で 依然とし て目視可 能。単一 の断片は 凝集(お そらくは ジスルフ イドの無 秩序な組 み合わせ のため) の徴候を 示す。確 認のため の還元型 SDS-PAGE 待ち。	断片1: GGGS (新 規C末端) 断片2: GGGS (新 規N末端)

【0270】

実施例 10：多重カーゴタンパク質

本明細書中に記載されるヘテロ多量体タンパク質（例えば、輸送体アルブミンセグメントまたはその変異体に融合されるカーゴポリペプチド（あるいはその断片または変異体）を含有する）は、さらに他のタンパク質に融合されて「多重融合タンパク質」を生成し得る。これらの多重融合タンパク質は種々の用途のために用いられ得る。例えば、本明細書中に記載されるタンパク質とHis-tag IgGドメインおよびマルトース結合タンパク質との融合は精製を容易にする（例えば、EP A 394, 827; Traune

10

20

30

40

50

cker et al., Nature 331: 84-86 (1988) 参照)。ポリペプチドへ融合される各局在化シグナルは、特定の細胞内局在へとタンパク質を標的化し得る。さらに、本明細書中に記載されるタンパク質への付加的タンパク質配列融合は、ヘテロ多量体の溶解性および／または安定性をさらに増大し得る。上記のヘテロ多量体タンパク質は、当該技術分野で既知の技法を用いて、またはそれを慣例的に修正して、および／またはポリペプチドと IgG 分子との融合を略記する以下のプロトコールを修正することにより、作製され得る。

【0271】

簡単に述べると、以下に記載される配列の 5' および 3' 末端に及ぶプライマーを用いて、IgG 分子のヒト Fc 部分を PCR 増幅し得る。これらのプライマーまた、発現ベクター、好ましくは哺乳動物または酵母発現ベクターへのクローニングを容易にする便利な制限酵素部位も有するはずである。

【0272】

例えば、pC4 (ATCC 寄託番号 209646) が用いられる場合、ヒト Fc 部分は、BamHI クローニング部位にライゲーションされ得る。3' BamHI 部位は破壊されるべきことに留意すべきである。次に、ヒト Fc 部分を含有するベクターを BamHI で再制限酵素処理し、ベクターを線状化して、本明細書中に記載されるヘテロ多量体をコードするポリヌクレオチド (当該技術分野で既知の技法を用いて生成および単離) を、この BamHI 部位にライゲーションする。本発明の融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドは停止コドンに伴わずにクローン化されることに留意されたい；さもなければ融合タンパク質を含有する Fc は産生されない。

【0273】

本明細書中に記載されるヘテロ多量体タンパク質を産生するために天然シグナル配列を用いる場合、pC4 は第二のシグナルペプチドを必要としない。または、天然シグナル配列が用いられない場合、ベクターは異種シグナル配列を含むよう修飾され得る (例えば、国際公告 WO 96/34891 参照)。

【0274】

実施例 11. 抗 Her2、一重特異性、一価～四価カーゴ装填アルブミンベースのポリペプチド；抗 Her2 × Her3 二重特異性、二価カーゴ装填アルブミンベースのポリペプチド；および種々の対照の調製。

多数の異なるカーゴ装填アルブミンベースの輸送体ポリペプチドを、本実施例に記載するように調製した。実施例 3 の表 8 に記載した抗 HER2 scFvs を、以下のように調製した。簡単に述べると、ここに記載される方法に従って、ABH2 に抗 Her2 scFvs を、種々のシスおよびトランス立体配置で装填した。最終一重特異性ポリペプチドは、一価～四価の範囲であった。構成成分ポリペプチドのアミノ酸および核酸配列の詳細も、表 8 に示されている。同様にして、ABH2 も、抗 Her2 および抗 Her3 scFvs を、シスおよびトランスの両立体配置で装填されて、二重特異性、二価分子を産生した。種々の実施例で利用される対照として、V1087、単一 scFvs、単腕 Fc および二価 Fc も産生された。

【0275】

抗 Her2 4D5 scFv を装填した ABH2。ABH2 装填抗 Her2 の異なる考え得る立体配置を図 17 に模式的に示す。この図が示すように、scFv が ABH2 の断片 A または B のいずれかの N 末端または C 末端へ結合されることに依存する、多数のシスおよびトランス変異を調製した。短い GGS リンカーを ABH2 断片 1 の天然 N 末端に設計し、長い (GGS)₄ GG リンカーを ABH2 断片 1 の C 末端ならびに ABH2 断片 2 の N 末端および C 末端に設計した。最終遺伝子生成物を、哺乳動物発現ベクター pTT5 (NRC-BRI, Canada) (Durocher et al) 中にサブクローン化した。懸濁増殖ヒト CHO-3E7 の一過性トランスフェクションによる高レベルおよびハイスループット組換えタンパク質産生を実施した。発現タンパク質を有する細胞上清を 1 ml/ml の流量を用いて、AKTA Express system (GE

10

20

30

40

50

Healthcare)と連結された、Blue Sepharoseマトリクス(GE Healthcare)を詰めたQIAGEN-tip 500カラムに適用することにより、精製を実施した。カラムは、20mlのPBS、pH7.2、300mM NaClからなる試料緩衝液で平衡化した。試料を5ml/分の流量で充填し、その後試料緩衝液で洗浄した。300mM~2000mMの範囲のNaCl勾配の適用により、タンパク質を溶出した。より高い塩濃度で溶出する画分が最も純粋であり、それをプールして濃縮し、その後1ml/mlの流量を用いて、AKTA Express system(GE Healthcare)と連結されたHiLoad 16/60 Superdex 200 prep等級ゲル濾過カラムに適用した。純度>85%のタンパク質を収集した；純粋試料を含有する画分をプールし、10000 MWCOのカットオフ重量のAmicon Ultra膜を用いて遠心分離により濃縮した。図10A~10Bは、異なるカーゴポリペプチドと融合されたABH2ヘテロ多量体SDS-PAGE(非還元型)分析を示す。輸送体ポリペプチドと比較したヘテロ多量体中のそれらのポリペプチドの位置を、以下の表8に、そして図17に略記する。全構築物が、予測された分子量を示した。

10

【0276】

1つの抗Her2 4D5 scFv融合体へ融合される一価ABH2は、表8に記載したような変異体517、518、519、520により例示される。2つまたは3つの抗Her2 4D5 scFv融合体へ融合される二価および三価ABH2は、表8に記載したような変異体525、526、527、528、531、532、540により例示される。これらの変異体はすべて、以下の段落に記載されるように、2つのアルブミン断片の同時発現により産生された。最後に、四価融合タンパク質を形成する4つすべての考え得る末端へ結合する抗Her2 scFvsを、変異体542として言及した。

20

【0277】

抗Her2×抗Her3 scFvsを装填したABH2(変異体1377、1378および1090)。

抗HER2および抗HR3へ融合されるアルブミンベースのヘテロ多量体の異なるバージョンを調製した。用いた抗HER2および抗HER3弾頭はMM-111と同一受容体を標的にするが、主な差異は、抗HER2弾頭で、これはMM-111に用いられる非中和B1D2弾頭または中和4D5弾頭であった。

30

【0278】

AlbuCORE_1(ABH2)断片1を、GGGSリンカーを介してN末端で抗HER3へ融合させて、抗HER2(4D5)へ融合された断片2と、断片2のN末端(変異体1378を生じる、トランスで弾頭を有する)あるいは断片2のC末端に(変異体v1377を生じる、シスで弾頭を有する)置かれた(GGSG)4GGリンカーを介して複合体を形成させた。GGGSリンカーを介してそのN末端で抗HER3と融合される断片1ならびにGGGSリンカーを介してそのC末端で抗HER2と融合される断片2を組み合わせることににより、第三の型のAlbuCORE_1(ABH2)分子を形成した(変異体番号 1090)。この分子はシスで弾頭を有し、MM-111とほとんど同一である。MM-111ポリペプチドとABH2ベースのポリペプチドとの間の主な差異は、1)MM-111ポリペプチドに用いられるリンカーはより疎水性であり、一方ABH2ベースのポリペプチドに用いられるリンカーはポリ(GLY)(S)であったこと、および2)ABH2ベースのポリペプチドは、元々Merriamackにより導入されたC34S/N504Q突然変異を欠いている、ということである。

40

【0279】

MM-111および誘導體(変異体1087、1088、および1089)

MM-111分子は、修飾化ヒト血清アルブミンタンパク質の、それぞれC末端およびN末端に連結される2つのscFvs、抗Her2(B1D2)および抗Her3(H3)、の単一ポリペプチド融合タンパク質であり、Merriamackにより産生される。その結果生じる分子は二重特異性および二価である。対照として、MM-111分子の変

50

異体が構築され、ここで抗H e r 3 (H 3) 弾頭は短いA A S リンカーによりアルブミンのN末端に融合させ、一方、抗H e r 2 (B 1 D 2) はA A A L リンカーを介してC末端へ融合させてベンチマーク対照変異体1 0 8 7を作成した。この対照変異体は、それらのM M - 1 1 1 分子においてM e r r i m a c k により元々導入されたC 3 4 S / N 5 0 4 Q 突然変異を欠く。追加のM M - 1 1 1 関連分子を構築した：1) N末端で抗H e r 3 (H 3) 弾頭へのみ融合されるアルブミン (v 1 0 8 8)、および2) C末端へ融合される抗H e r 2 (B 1 D 2) (v 1 0 8 9)。これらのいずれの場合も、用いたリンカーは、M M - 1 1 1 と同一であった。分子はすべて、C H O 細胞中で1 : 1 比で発現させて、多量体4 D 5 融合体に関して記載したように精製した。

【0280】

10

単一抗H e r 2 s c F v

遊離の抗H e r 2 ヒト s c F v (v 2 1 8) を1 LのC H O 3 E 7 細胞中で発現させた (v 2 1 8)。 (H i s) 6 タグを、T E V プロテアーゼ部位を含有する切断可能なリンカーを介して、C末端へ融合させた。フラクトゲル系と連結された金属 (C o 2 +) アフィニティー (カラム容積=1 m L)、その後S u p e r d e x 2 0 0 サイズ排除クロマトグラフィーにより、タンパク質を精製した。精製後の収量は、3. 6 m g の4 D 5 s c F v (C o 2 +アフィニティー後) および1. 3 8 m g (サイズ排除後) であった。

【0281】

図3 1 Aは、C o 2 +アフィニティー後のv 2 1 8の精製を示すS D S - P A G Eである。洗浄後、カラム溶出および脱塩した発現産物が提示されている。図3 1 Bは、サイズ排除カラムを通した二次精製後の変異体のクロマトグラフィープロファイルである。

20

【0282】

対照F c分子 (8 7 8、6 2 8 および6 3 0) :

単一抗H e r 2 (4 D 5) ヒト s c F v を、F c 断片へ融合させて、一価の、一重特異性抗体生成物を産生した。ヘテロ二量体F cの形成を保証するために、h e t e r o d r i v e r 突然変異をF c 鎖中に含めた。

【0283】

v 8 7 8 :

O A 4 - s c F v - B 1 D 2、一価抗H e r 2 抗体であり、H e r 2 結合ドメインは鎖A上のs c F vであり、およびF c領域は突然変異L 3 5 1 Y__F 4 0 5 A__Y 4 0 7 V (鎖A) およびT 3 6 6 L__K 3 9 2 M__T 3 9 4 W (鎖B) を有するヘテロ二量体である。

30

【0284】

V 6 2 8 :

二価抗H e r 2 抗体であり、両H e r 2 結合ドメインはs c F vフォーマットであり、およびF c領域は突然変異L 3 5 1 Y__S 4 0 0 E__F 4 0 5 A__Y 4 0 7 V (鎖A) およびT 3 6 6 I__N 3 9 0 R__K 3 9 2 M__T 3 9 4 W (鎖B) を有するヘテロ二量体である。

【0285】

V 6 3 0 :

40

一価抗H e r 2 抗体であり、H e r 2 結合ドメインはs c F vであり、およびF c領域は突然変異L 3 5 1 Y__S 4 0 0 E__F 4 0 5 A__Y 4 0 7 V (鎖A) およびT 3 6 6 I__N 3 9 0 R__K 3 9 2 M__T 3 9 4 W (鎖B) を有するヘテロ二量体である。

【0286】

表1 5は、この節で記載される変異体に関するポリペプチド配列の一覧を提供する。

表1 5 :

【表 15】

表 15 :

変異体	ポリペプチド A 配列番号 (nt/aa)	ポリペプチド B 配列番号 (nt/aa)
1377	161/162	163/164
1378	165/166	167/168
1090	169/170	171/172
1087	155/156	
1088	157/158	
1089	159/160	
218	93/94	
878	145/146	
628	151/152	149/150
630	153/154	149/150
1092	137/138	139/140
1093	141/142	143/144
1094	133/134	
1095	135/136	

10

【0287】

20

実施例 12. 多価立体配置で抗 Her2 4D5 scFv に融合される ABH2 による SKOV 細胞への結合。

Her2⁺ 細胞に対する ABH2 抗 Her2 融合タンパク質の親和性を、この実施例で調べた。種々の scFv 結合立体配置を図 17 に提示する。ABH2 (AlbuCORE (商標)) 単独、抗 Her2 scFv 単独、一価単腕 Fc 分子および二価二腕 Fc 分子を、対照として利用した。これらを図 17 の「対照」パネルにまとめる。実施例 2 に従って ABH2 タンパク質を構築し、実施例 11 に従って融合タンパク質を作成した。

【0288】

FACS 結合評価

Her2 を発現する SKOV 細胞に対する種々の抗 Her2 ABH2 構築物および対照の結合親和性を、FACS により評価した。検出は抗 HSA ポリクローナル (FITC 標識化) を用いて実施した。測定された K_D はすべて、見かけの値である。

30

【0289】

FACS プロトコールによる全細胞結合：

細胞が一旦十分な生存度に到達すると (すなわち、 2×10^6 細胞/ml 細胞 (>80% 生存度))、培地を T75 培養フラスコから吸引し冷 PBS で洗浄し、これをその後吸引した。フラスコ当たり 3 mL の解離緩衝液を添加し、細胞を計数した。次に、懸濁液を 1050 rpm で 5 分間遠心分離して、細胞を RPMI 培地 (5% FBS @ 1×10^5 細胞/100 μ l を含有) 中に再懸濁した。100 μ l の細胞懸濁液をエッペンドルフチューブに添加し、その後 10 μ l / チューブの一次抗体 (ヤギ抗ヒト HSA) を添加した。次に細胞を 4℃ で 2 時間、回転支持体上でインキュベートした。次に、チューブを室温で 2 分間 2000 rpm で遠心分離した。培地を吸引し、ペレットを 500 μ l RPMI 培地 (5% FBS 含有) で洗浄して、再び遠心分離した。二次抗体 (Alexa Fluor 488 コンジュゲート抗ヤギ IgG) を添加して、最終濃度を 2 μ g / 試料とした。ペレットを 100 μ l 溶液中に再懸濁し、回転支持体上で 4℃ で 1 時間インキュベートして、2000 rpm で 2 分間、遠心分離した。次に細胞を 500 μ l RPMI 培地 (5% FBS 含有) で洗浄して、再遠心分離し、フローサイトメトリー分析のために 500 μ l / ペレット中に再懸濁した。

40

【0290】

各構築物に関する K_D 値を、図 17 の代表的な表示の下に提示する。測定された K_D は

50

すべて、見かけの値であり、値は分子当たり試験した6つの濃度（3 μ Mまで）の平均を表す。図で実証されているように、原子価が増大すると結合親和性が増大する傾向があり、これは見かけの K_D 値の減少により示されている。一般的に、いずれかの断片ポリペプチドのN末端へ結合される抗Her2 scFvは、C末端に結合されるものより、Her2に対しより大きい親和性を示す。いくつかの実施形態では、特定位置での融合において有効な親和性を低減する多重特異性多価種のこの特性は、いくつかの融合相手種の親和性および活性を弱めるために用いられ得る。

【0291】

実施例13. 抗Her2および抗Her3 scFvへ融合されるABH2の二重特異性結合。

抗Her2および抗Her3 scFvsをシス立体配置で装填されたABH2の、MALME-3M細胞に対する結合親和性を評価し、v1087対照と比較した。融合タンパク質および対照はいずれも実施例11に従って構築した。

【0292】

二重特異性結合のFACS分析

例示的アルブミンベースのヘテロ多量体変異体1090（抗Her2×抗Her3 ABH2）の、MALME-3MおよびSKOV細胞に対する結合親和性を、実施例12に記載したように、FITC標識化抗HSA抗体とFACSを用いて評価した。実施例11に記載したように、v1090は、BLD2/H3融合体、Merrimackリンカー長、および低疎水性リンカー・ポリGLY（S）を含む。

【0293】

図18Aは、SKOV細胞での、対照1087と比較した変異体1088、1089および1090の結合を示す。図18Bは、MALME-3M細胞での、対照1087と比較した変異体1088、1089および1090の結合を示す。以下の表16は、両細胞型におけるこれらの変異体の結合の特性に関するデータを提供する。表16における単位はすべて、別記しない限りnMである。

【0294】

MALME-3M細胞に対する1087および1090の結合は、それぞれ5～55 nMおよび200～10,000 nMであった。SKOV細胞に対する1087および1090の結合は、それぞれ10 nMおよび9.4 nMであった。

【表16】

表16：SKOVおよびMALME-3M細胞における変異体の結合データ。

変異体	天然N末端での 弾頭(位置1)	天然C末端での 弾頭(位置2)	Kd (MALME 20120529)	Bmax (MALME 20120529)	Kd (SKOV 20120603)	ヒル勾配 (MALME 20120529)	Bmax (MALME 20120603)
1087 (MM-111)	HER3	HER2	12 μ M	1469	10.69	0.97	6583
1088 (非スプリット HSA)	HER3	--	0.8 μ M	74	5 μ M	1.0	
1089 (非スプリット HSA)	--	HER2	60 μ M	1149	1.8	1.8	1572
1090 (AlbuCORE)	HER3	HER2	0.2 μ M	323	9.4	0.7	2658

【0295】

実施例14. 抗Her2へ融合されたABH2の血清安定性。

ヒト血清中における抗Her2を装填されたABH2の安定性を、リンカーの潜在的タンパク質分解的切断を評価するために実施した。5つの変異体を試験した：v517、v518、v519、およびv520。

【0296】

ヒト血清インキュベーションおよびその後のFACS分析。

上記の抗Her2 ABH2融合タンパク質を、SKOV細胞に対する結合に関して試験し、次に予め凍結させたヒト血清中で、 $100\mu\text{g}/\text{ml}$ (Sigma #H4522) で、室温で24時間インキュベートした後、SKOV細胞の同ストックに対する結合に関して再試験した。検出は、ヤギFITC標識ポリクローナル抗HSA抗体を用いて実施した。SKOV-3細胞に対する融合タンパク質の結合親和性をFACSを用いて評価し、対照として予備インキュベーションタンパク質を用いた。図19A～Dは、試験した変異体の予備インキュベーション前および後インキュベーション後の試料の結合曲線を示す。

【0297】

10

図19A～Dに示されるように、全ての融合体は安定であり血清インキュベーション後に標的抗原へ結合可能のように見えた。

【0298】

実施例15. 抗Her2および抗Her3 scFvへ融合されるABH2のFcRn結合。

抗Her2および抗Her3 scFvをトランス立体配置で装填されたABH2の親和性を、FcRnに対する結合に関して評価し、野生型HSAおよび1087対照の両方と比較した。

【0299】

この実験に関しては、ベンチマーク対照v1087およびAlbuCORE HER2/HER3融合体のうちの1つ(v1378)を用いた。図20Aは、v1378融合体のトランス立体配置を示す。

20

【0300】

FcRn結合。

ヒトFcRn (hFcRn) をSPR表面に固定化し、精製抗Her3×Her2 ABH2 (v1378) およびv1087をpH6.0でフローオーバーさせた。方法は実施例2と同じであるが、但し、検定の方向性は逆であった。

【0301】

図20Aおよび20Bは、それぞれ抗Her2×Her3 ABH2およびV1087の異なる結合曲線を示す。抗Her2×Her3 ABH2は $0.97\mu\text{M}$ のKDでhFcRnを結合し、一方V1087分子は $2.76\mu\text{M}$ のKDでhFcRnを結合した。図から、融合ABH2およびv1087はともに、FcRn結合親和性において野生型HSAに匹敵することがわかる (Kd = 1.4mM 、pH5.5、Chaudhury, C et al. Biochemistry 2006 45, 4983-4990に記載)。

30

【0302】

実施例16. ABH2および一価抗Her2 ABH2の卓上安定性。

ABH2足場および一価ABH2抗Her2融合タンパク質(v517)の両方の卓上安定性を、3つの異なる温度で5日間に亘って評価した。

【0303】

40

卓上安定性

各分子からの試料を9つの試験管に分け、各々は $\sim 10\text{mg}$ のタンパク質を含有した。 10mg のタンパク質に対応する初期量の材料を、 $1\text{mg}/\text{mL}$ でPBS中に入れ、 37°C (水浴)、室温(RT)または 4°C (冷蔵庫)でインキュベートした；タンパク質安定性を、5日間に亘って評価した。各時点でアリコートを抽出し、クーマシーブルーローディング緩衝液と1:1に混合し、その後冷凍した。最終の時間ステップ後、すべてのアリコートを解凍して、ネイティブゲルならびに還元型および非還元型SDS-PAGE上に載せた。

【0304】

図21は、1、3および5日目の、ABH2足場および抗Her2 ABH2融合体の

50

ネイティブゲルである。図が実証するように、A B H 2 足場および抗H e r 2 A B H 2 はともに、5日間の期間中ずっと安定であった。融合タンパク質に関して見られる二重のバンドは、ジスルフィドの2つの異なる還元状態を表すと思われる。還元剤の存在下では、2つのバンドは実際1つに縮約する。

【0305】

実施例17. A l b u P u r e（登録商標）法を用いた精製最適化

溶出において何らかの量の残留夾雑物をもたらす高濃度の塩溶出を要する、実施例2に記載したB l u e S e p h a r o s e精製に代わるものとして、A l b u P u r e（登録商標）ベースのアフィニティー精製法を用いたバッチおよび直接方式のいずれにおいてもB l u e S e p h a r o s eマトリクスに対する結合の試験は最適化手順を含み、異なる溶出プロトコルを異なるpHおよび温度とともに試験した。最終的にアルブミンおよびアルブミン融合体の精製に対して仕立てた特殊樹脂（すなわち、A l b u P u r e（登録商標））を試験した。異なる塩の存在下での結合およびpH勾配または競合界面活性剤を用いる溶出を含む、異なる結合および溶出条件を、A l b u P u r e（登録商標）を用いて試験した。

【0306】

野生型H S Aの精製：B l u e S e p h a r o s eとA l b u P u r e（登録商標）の比較

実施例2に記載した方法に従って、野生型H S Aに関してB l u e S e p h a r o s e精製を実施した。図22Aは、B l u e S e p h a r o s e精製中に得られたトータル画分、フロースルー画分、洗浄および溶出画分の非還元型S D S - P A G Eゲルプロフィールである。図22Bは、ゲル濾過（S E C）後のB l u e S e p h a r o s e溶出画分のL C分析を表す。クロマトグラムの多数のピークから分かるように、精製後でさえ顕著なタンパク質およびイオン夾雑物が存在した。

【0307】

A l b u P u r e（登録商標）精製を野生型H S Aに関して以下のように実施した。野生型H S Aを含有する細胞上清をP B S中で可溶化した。予備充填A l b u P u r e（登録商標）カラム（カラム容積：1 mL）を、50 mM酢酸ナトリウム、pH 5.3中で平衡化した。上清を充填後、カラムを、50 mM酢酸ナトリウムを含有するがpHが増大する（すなわち1回目はpH 6；2回目はpH 7）溶液で2回洗浄した。酢酸アンモニウム、pH 8.0で最終洗浄を実施した。次いで50 mM酢酸アンモニウム、pH 7.0を含有し10 mMオクタン酸ナトリウムを追加した溶液を用いて、目的のタンパク質を溶出した。A l b u P u r e（登録商標）法は、B l u e S e p h a r o s e法に匹敵する量のタンパク質を得るために1ステップを要しただけであった。500 mLの初期C H O培養からのタンパク質収量を以下の表17に示す。

【表17】

表17：精製後のタンパク質収量

変異体 ID	Blue Sepharose 精製 (SEC 前)	Blue Sepharose 精製 (SEC 後)	AlbuCORE (オクタノエート溶出)	初期細胞培養	注解
V221 (裸のHSA)	8.6 mg	2.79 mg	10.34 mg	500 mL	
V519	3.3 mg	1.8 mg	8.16 mg	500 mL	HER2 融合体。弾頭はタンパク質分解的に切断されたように見える。
V520	4 mg	0.93 mg	4.3 mg	500 mL	HER2 融合体。弾頭はタンパク質分解的に切断されたように見える。

【0308】

図22Cは、ゲル濾過（SEC）後のAlbuPureアフィニティーカラム溶出画分のLC分析を表す。図22Bおよび22Cの比較は、AlbuPure法が、Blue Sepharoseからよりもずっと純度が高くより低量の高分子量凝集タンパク質を含む最終溶液を生じることを実証する。

【0309】

改変AlbuCOREの精製：AlbuPure（登録商標）を用いた野生型HSAおよび改変AlbuCOREの比較

表11に記載したAlbuCORE-1A、3、6および9の2つの断片ペプチドを、別個のベクターを用いてCHO細胞中で一過的に同時発現した。異なるAlbuCORE分子を構成する2つの断片の発現のための最適DNA比（断片1：断片2）は、AlbuCORE-1=1：1；AlbuCORE-3=1：2；AlbuCORE-6=1：1；AlbuCORE-9=2：1であった。全発現が一過性であり、先のAlbuCORE分子と同様に実施した。野生型HSAもCHO細胞中で一過的に発現させた。融合タンパク質の発現収率は、WT-HSA（約50～70mg/L）の75%以内であった。AlbuPure精製後にA280により材料の量を測定した。

【0310】

同時発現後、上記のAlbuPure（登録商標）プロトコルを用いてAlbuCORE足場を精製した。純度を評価するために、AlbuPure（登録商標）アフィニティーカラムからの溶出物をゲル濾過系（SEC）に通し、LCを用いてフロースルーを分析した。野生型HSAに関し同じことを実施した。図23Aは野生型HSAのクロマトグラムを表し、一方図23B、23C、23Dおよび23Eは、それぞれAlbuCORE 1、3、6および9のクロマトグラムを表す。これらの図が実証するように、AlbuPure（登録商標）精製収率は、野生型および改変AlbuCORE間で同様の結果である。500mLの初期CHO培養からの、AlbuPure（登録商標）精製後の精製タンパク質のmgに換算した収量は、AlbuCORE-1=16mg；AlbuCORE-3=25mg；AlbuCORE-6=27；AlbuCORE-9=25mgであると測定された。

【0311】

AlbuCORE-1のスケールアップ発現および精製

断片A：Bを1：1の比でpTT5ベクターを用いて、AlbuCORE-1をCHO細胞中で一過的に同時発現した（実施例2参照）。AlbuCORE-1のCHO細胞での精製収量は約10mg/Lであり、これは同量の出発材料から算定すると、v1087のCHO細胞での収量9mg/Lに匹敵する。

【0312】

上記のAlbuPureプロトコルを用いてAlbuCORE-1を精製した。アフィニティーカラム溶出液をゲル濾過-LC分析系に適用した。図24AはAlbuPure精製のクロマトグラムを表す。主ピークは目的のタンパク質を表す。

【0313】

精製試料もまた、図24Bに示した還元型および非還元型SDS-PAGEにより分析した。図が実証するように、非還元条件では、重要な溶出成分は全AlbuCORE-1タンパク質であり；還元条件では、AlbuCORE-1タンパク質は前述のように2つの断片に分離する。重要なことに、特に図22Aと比較した場合、夾雑物がほとんどない。

【0314】

AlbuCORE-1およびWT HSAのSDS-PAGEおよびLC/MS分析

野生型HSAおよびAlbuCORE-1精製のトータル、フロースルー、洗浄および溶出物を収集し、非還元型SDS-PAGEにより分析した。図25Aに示したように、前記ゲルプロファイルの表示は、AlbuPure工程後に夾雑物がほとんどなく（図25Aおよび図22Aを比較）およびホモ二量体形成もないことを実証する。

【0315】

次に、LC/MSを用いて精製タンパク質を分析した。高流動エレクトロスプレー界面を介してLTQ-Orbitrap XLハイブリッド質量分光分析計(ThermoFisher Scientific)と連結されたAgilent 1100 HPLC系を用いて、LC-MSによりタンパク質試料を分析した。試料(2.5 µg)を2.1 × 10 mm Poros R2カラム(Applied Biosystems)上に注入し、2 mL/分の20~90% ACN勾配、0.1% FAを用いて、3分間に亘って溶出した。流れをカラム後に分割してエレクトロスプレー界面中に100 µL/分で向かわせた。カラムおよび溶媒を80℃に加熱してタンパク質ピーク形状を改良した。LTQ-Orbitrap XLをThermoFisher ScientificのLTQ正イオンESI校正溶液(カフェイン、MRF AおよびUltramark 1621)を用いて校正し、25 µg/µLのBSA溶液を用いて調整した。コーン電圧(ソース断片化設定)は40 V、FT分解能は7,500および走査範囲はm/z 400~4,000であった。ThermoFisherのPromassソフトウェアを用いてタンパク質スペクトルをデコンボリューションした(入力範囲:m/z 2500~3050;出力質量範囲:100,000~160,000 Da;ピーク幅:1.5;マージ幅:0.5;ベースライン除去:0.5(低))。ヘテロおよびホモ二量体抗体種の豊富さを、得られた分子量プロファイルから直接決定した。一定の抗体混合物を用いて応答の直線性を確認した。検出限界は約2%であった。図25Bは、精製されたAlbuCORE-1およびWT-HSAのスペクトログラムを提供する。AlbuCORE-1に関するスペクトログラムが実証するように、ホモ二量体形成(例えば、A:AまたはB:B)は認められない。理論的分子量からの変動は、イオン結合、種々雑多なリガンド、または糖化のためであり得る。

【0316】

実施例18. アルブミンベースのポリペプチドの末端の空間的組織化

アルブミンベースのポリペプチドは、カーゴ分子の送達のための抗体に対する代替的足場を提供する。図26Aおよび26B間の差異が実証するように、改変したアルブミンベースのポリペプチドは、4つの末端間の空間的距離がより大きく変化するので、通常の抗体と比較より大きい程度の位置的自由度を有する。利用可能な結晶構造のうちの1つへとAlbuCORE分子をモデル化した後、距離を測定した:PDB ID=4EMX。さらに、4つの末端は異なる平面角度にも配向される。

【0317】

最後に、異なるセグメント化部位、結合ドメインおよび/またはリンカーを選択することにより、末端間の距離および角度はさらに調整され得る。図26Cは、多価結合様式における抗原結合最適化のための末端間距離を変えるために利用可能な、代替的AlbuCORE足場を示す。

【0318】

実施例19. DSCにより測定されるような追加のアルブミンベースのポリペプチドの安定性

追加のAlbuCOREポリペプチドの安定性および融点を決定するために、DSC実験をAlbuCORE-3、6および9、ならびに対照WT-アルブミンおよびAlbuCORE-1に関して実施した。DSC実験は実施例2に記述したように実施した。図27は、WT-HSAと比較した4つの足場の融解曲線を示す。図が示すように、足場3、6および9は、野生型が示す75℃と非常によく似た融点を保有する。さらに、AlbuCORE-6は、76℃で、野生型HSAより熱的に安定であることが判明した。追加のDSC実験を、AlbuCORE 1Aおよび4に関して実施した。AlbuCORE 1AのTmは66℃で、AlbuCORE-4のTmは70℃であった。AlbuCORE-1Aは、AlbuCORE 1(ABH1)における2つの断片間のギャップを1残基のみまで狭め、GGGGSリンカーを非天然のN末端およびC末端の両方に付加する。同じことがAlbuCORE 2(ABH2)およびAlbuCORE-2Aに当てはまる。

【0319】

実施例20：抗CD3×CD19ヘテロ多量体構築物の調製。

以下のように抗CD3および抗CD19 scFvsをいくつかの異なる抗体プラットフォームへ結合した。アルブミンベースのポリペプチドプラットフォームはAlbuCORE-1であり；対照はWT-HSA、Azymetric足場(v873)および抗CD3×CD19 BiTE対照v891を包含した。

【0320】

抗CD19×抗CD3 scFvsを装填されたABH2(1092、1093、1094および1095)：

抗CD19および抗CD3 scFvsに関する配列は、現在臨床試験中でありかつ安定性および産生に関して十分に実証され試験されている2つの分子から選択した。抗CD19および抗CD3 scFvは、BiTE分子 プリナツモマブから直接採用した。抗CD3 scFvはBiTEで用いられたものと一致するVH-VL配向で選択した。ベンチマーク分子はBiTEであった。抗CD弾頭を断片1の天然のN末端に、および抗CD19を断片2のC末端に結合することにより、AlbuCORE_1(ABH2)CD3/CD19融合体を作成した(v1092)。弾頭が逆である第二分子を作成した(すなわち、断片1の天然のN末端に抗CD19弾頭、および断片2のC末端に抗CD3。v1093)。用いたリンカーは、多価HER2 AlbuCORE実験のために用いたものと同一であり：断片1のN末端にGGGS、および断片2のC末端に(GGSG)₄GG。多価HER2に関して発現および精製を前記のように実施した。それらの天然の末端に2つの異なる融合体を収容するように分子1093および1094を設計した。scFv融合体を、N末端でのGGSLリンカーおよびC末端でのGGSGリンカーを介して、アルブミン分子と連結させた。リンカーの長さは、異なる配列型を有するにもかかわらず、MM-111分子に用いられるものを示す。これらの分子の模式図を図29に示す。

【0321】

カーゴポリペプチドの相対位置が変えられた、ABH2をベースにした追加の一価および多価CD19ヘテロ多量体ならびに一価CD3ヘテロ多量体を、図28Bに示したこれらのヘテロ多量体の模式図を用いて設計した。これらのヘテロ多量体は、抗CD19 scFv(CD19)および/または抗CD3 scFv(CD3)であるカーゴポリペプチドに一方または両方の末端で融合された、その単一単量体輸送体ポリペプチド 配列番号8および配列番号10を発現することにより、生成した。これらのベース構築物の異なる組合せを同時発現時に組み合わせて、2つの輸送体ポリペプチドの4つの末端位置のいずれかで2つのカーゴポリペプチドの全組合せを表示する、一価から四価までの範囲のヘテロ多量体を形成した。表18は、(輸送体ポリペプチド1(F1)または輸送体ポリペプチド2(F2)のN末端またはC末端へ融合することにより生成されたベース構築物を示す。F1：配列番号8に対応し、F2は配列番号10に対応する。

表18：CD3およびCD19一価および多価構築物に関するベース構築物

【表 18】

表 18 : CD3 および CD19 一価および多価構築物に関するベース構築物

単一融合体				
#	融合体 1	融合体 2	融合体 3	ポリペプチド配列番号
1	CD3	F1		137/138
2	F1	CD3		119/120
3	F1	CD3 (短いリンカー)		181/182
4	CD3	F2		179/180
5	CD3 (短いリンカー)	F2		177/178
6	F2	CD3		141/142
7	CD19	F1		143/144
8	F1	CD19		183/184
9	F1	CD19 (短いリンカー)		189/190
10	CD19	F2		187/188
11	CD19 (短いリンカー)	F2		185/186
12	F2	CD19		139/140
二重融合体				
13	CD19	F1	CD19	191/192
14	CD19	F1	CD19 (短いリンカー)	193/194
15	CD19	F2	CD19	195/196
16	CD19 (より短いリンカー)	F2	CD19	197/198
17	CD3	HSA	CD19	133/134
18	CD19	HSA	CD3	135/136

【0322】

図 28B に示したように、1 つの単量体の N 末端に関しては GGS リンカーを、そして他の単量体におけるすべての他の末端に関してはより長い (GGS)₄ GG リンカーを介して、生物活性カーゴポリペプチドをヘテロ多量体輸送体ポリペプチドへ融合した。さらにそれらの非天然末端（すなわち、断片 1 の C' および断片 2 の N'）でより短いリンカー、(GGS)₄ GG の代わりに配列 GGS GGS G で形成される、を用いて各融合タンパク質の一バージョンを作成した。

【0323】

調製されたヘテロ多量体のまとめを表 19 に示す。

10

20

30

【表 19-1】

表 19 : CD3 および CD19 カージポリペプチドを ABH2 の輸送体ポリペプチド 1 または輸送体ポリペプチド 2 の N または C 末端へ融合することにより生成された一価、多価および多重特異性構築物。

変異体	N 末端-輸送体 ポリペプチド 1 (配列番号 8)	C 末端-輸送体 ポリペプチド 1 (配列番号 8)	N 末端-輸送体 ポリペプチド 2 (配列番号 10)	C 末端-輸送体 ポリペプチド 2 (配列番号 10)	原子価	配列 (ポリペプチド)
1096	CD3				一価	配列番号 138 配列番号 10
1097		CD3			一価	配列番号 120 配列番号 10
1101 (より短いリンカー)		CD3			一価	配列番号 182 配列番号 10
1098			CD3		一価	配列番号 8 配列番号 180
1100 (より短いリンカー)			CD3		一価	配列番号 8 配列番号 178
1099				CD3	一価	配列番号 8 配列番号 142
1102	CD19				一価	配列番号 144 配列番号 10
1103		CD19			一価	配列番号 184 配列番号 10
1107		CD19			一価	配列番号 190 配列番号 10
1104			CD19		一価	配列番号 8 配列番号 188
1106			CD19		一価	配列番号 8 配列番号 186
1105				CD19	一価	配列番号 8 配列番号 140
1108	CD19			CD19	二価	配列番号 144 配列番号 140
1109	CD19	CD19		CD19	三価	配列番号 192 配列番号 140
1110	CD19	CD19	CD19	CD19	四価	配列番号 192 配列番号 196
1111 (非天然末端でのより短いリンカー)	CD19	CD19		CD19	三価	配列番号 194 配列番号 140

10

20

30

40

【表 19-2】

1112 (非天然 末端での より短い ンカー)	CD19	CD19	CD19	CD19	四価	配列番号 194 配列番号 198
1092	CD3			CD19	二重特 異性	配列番号 138 配列番号 140
1093	CD19			CD3	二重特 異性	配列番号 144 配列番号 142

10

【0324】

ヘテロ多量体ABH2を用いて実施例2に略記したように多価構築物を生成した。最終遺伝子生成物を哺乳動物発現ベクターpTT5 (NRC-BRI, Canada) (Durocher et al) 中にサブクローン化した。懸濁増殖ヒトCHO-3E7の一過性トランスフェクションによる高レベルおよびハイスループット組換えタンパク質産生を、実施例2に記載したように実施した。

【0325】

発現結果を図28Cに示す。一価のCD3およびCD19融合体は同様のレベルで発現する。一価のCD3およびCD19の発現はHER2融合体で観察されたものと同一パターン (MWに関して) を有し、これは非還元型ゲル上の移動の変動は弾頭型とは独立していることを示す。

20

【0326】

実施例21：抗CD3×CD19装填アルブミンベースのポリペプチドがB細胞およびT細胞に結合する能力。

CD3⁺およびCD19⁺細胞に対する抗CD3×CD19装填AlbuCORE-1 (v1092および1093) の能力を、FACSを用いて評価し、同じ抗CD3 scFvsが装填されたWT-HSA (1094および1095) と比較した。AlbuCORE-1構築物を、B細胞およびT細胞に関するAzymetric (商標) およびBIT EMT-103に対して、追加で以下のように試験した。当該方法を、実施例13に記載したように、しかしMALME-3M細胞およびSKOV細胞で実行した。

30

【0327】

結果を図29に示すが、これは、JurkatおよびRaji細胞における試験変異体に関するK_D およびヒル勾配データを示している。

【0328】

実施例22：抗CD3×CD19装填アルブミンベースのポリペプチドがB細胞およびT細胞に結合する能力

変異体1092、および1093がB細胞およびT細胞を架橋する能力を、以下のように測定した。

【0329】

40

FACSによる全細胞架橋

RPMI中に懸濁された 1×10^6 細胞/mlを、 $0.3 \mu\text{M}$ の適切なCellTrace 標識で標識して混合し、水浴中で 37°C で25分間インキュベートした。ペレットを2mlのL10+GS1+NaN₃中に再懸濁して、最終濃度を 5×10^6 細胞/mlとした。フローサイトメトリーにより細胞懸濁液を分析して (1/5希釈)、適切な細胞標識化およびレーザー設定を確認した。フローチェックおよびフローセットFluorespheresを用いて、計器標準化、光学的アラインメントおよび流体力学を確認した。

【0330】

フローサイトメトリー確認後、および架橋前に、各細胞株を所望の比率で 1×10^6 細胞/mlの最終濃度にて一緒に混合した。

50

【0331】

T：T架橋をJurkat-バイオレット+Jurkat-FarRedで評価し、B：BをRAJI-バイオレット+RAJI-FarRedで評価し、およびT：B架橋をJurkat-バイオレット+RAJI-FarRedで評価した。

【0332】

室温にて抗体変異体をL10+GS1+NaN3で2倍に希釈し、その後細胞に添加し、静かに混合しながら30分間インキュベートした。

【0333】

30分間のインキュベーション後、2μlのヨウ化プロピジウムを添加し静かに混合して、フローサイトメトリーにより直ちに分析した。

10

【0334】

架橋%を、バイオレットおよびFarRedで同時に標識された事象のパーセンテージとして算定した。

【0335】

図30Aは、v1092、二重特異性CD3／CD19抗体(v873)およびBiTE様対照v891がJurkat CD3 T細胞(下右)とRaji CD19 B細胞(上左)を架橋する能力をFACSにより比較する。架橋されたT-B細胞は上右に出現する。この結果は、v1092は0.3nMという低い濃度でJurkat T細胞およびRaji B細胞を特異的に架橋でき、架橋の程度はBiTE(総細胞の21%)およびヘテロ二量体Fcを有する二重特異性CD3／CD19抗体(25%)と同程度(総細胞の31%)であることを実証している。

20

【0336】

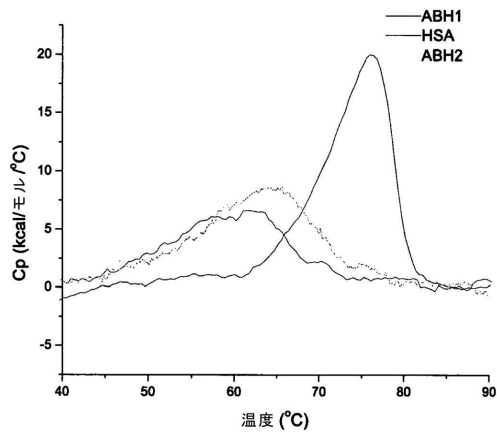
図30Bは、v1092の能力を、対照 v891、v873およびv221と比較する。この図は、v1092が、v891(BiTE)と同様の程度に、Jurkat T細胞とRaji B細胞を架橋し得ることを示す。

【0337】

本明細書中で記述される出版物、特許および特許出願はすべて、各々の個々の出版物、特許または特許出願が、具体的に且つ独立して、本明細書中で参照により援用されるような程度に、本明細書中で参照により援用される。

【図 7】

図 7



【図 8】

図 8 A

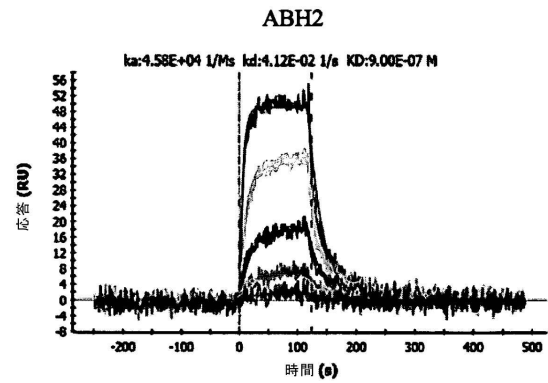
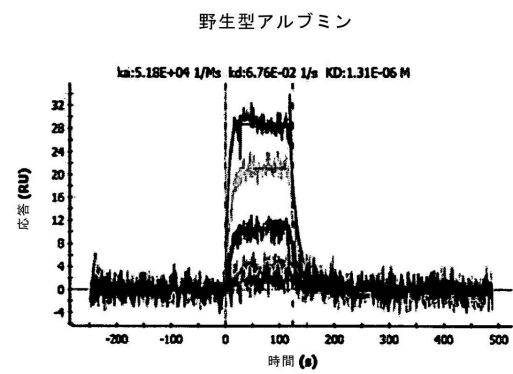
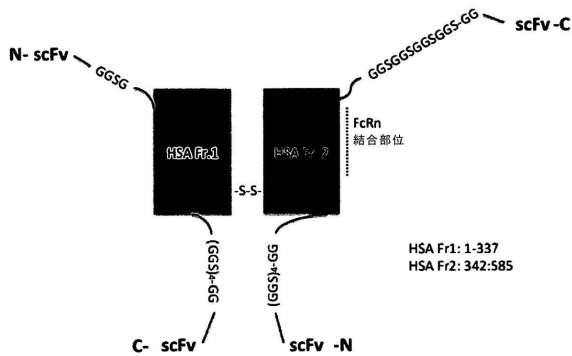


図 8 B

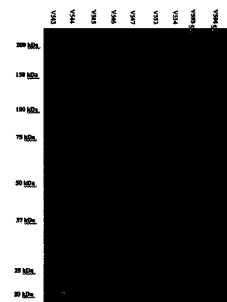


【図 9】



【図 10 B】

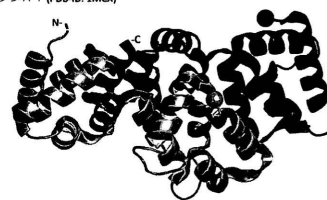
Figure 10B



【図 11】

図 11

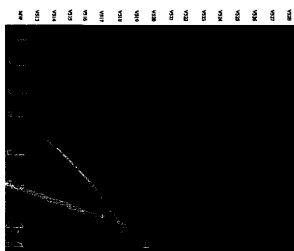
アネキシン A 1 (PDB-ID: 1MCK)



アネキシンの輸送体ポリペプチド 1: 残基 41 ~ 186 (灰色)
アネキシンの輸送体ポリペプチド 2: 残基 194 ~ 344 (黒色)

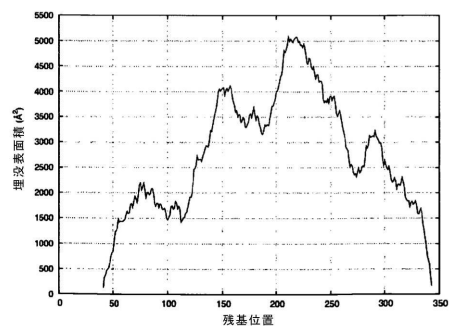
【図 10 A】

Figure 10A



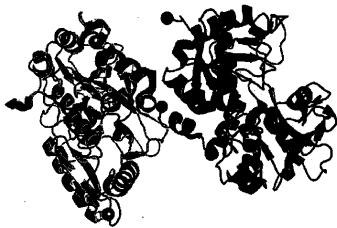
【図 1 2】

図 1 2

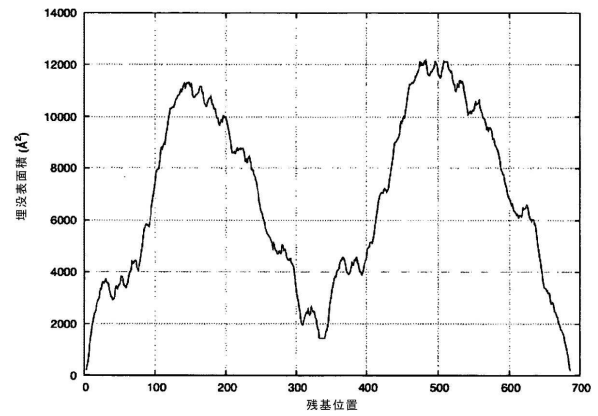


【図 1 3】

Figure 13



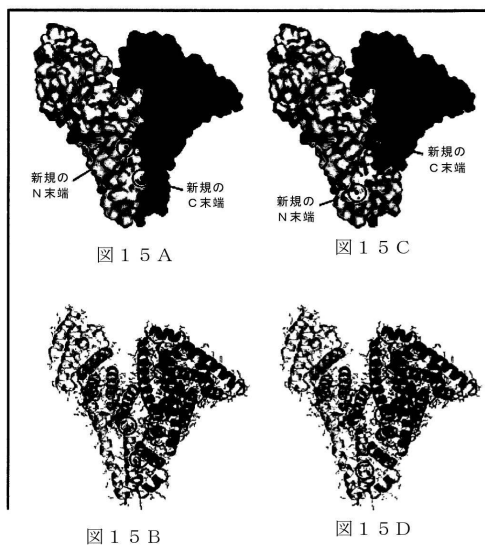
【図 1 4】



【図 1 5 - 1】

AlbuCORE_1

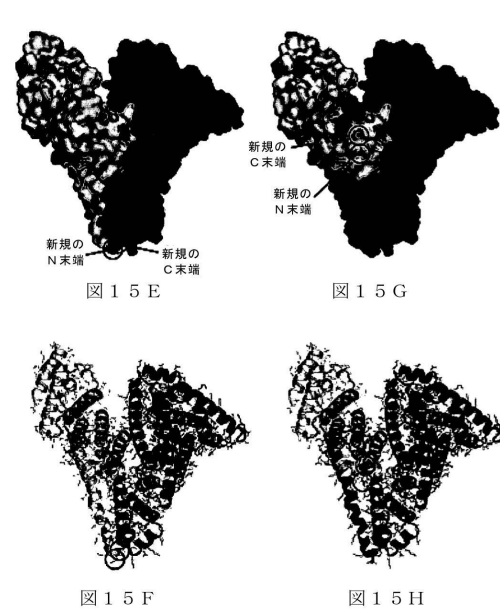
AlbuCORE_2



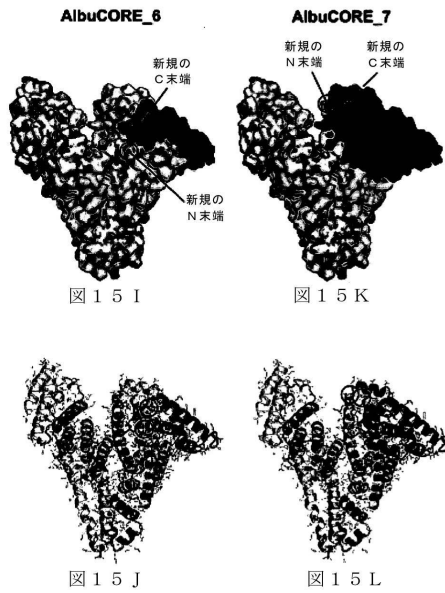
【図 1 5 - 2】

AlbuCORE_3

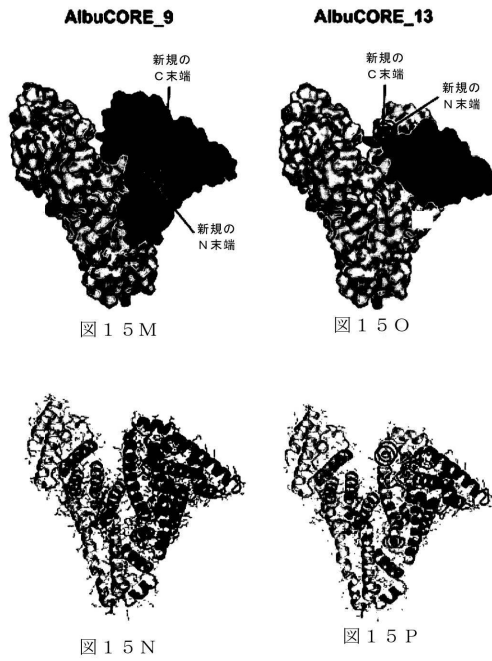
AlbuCORE_4



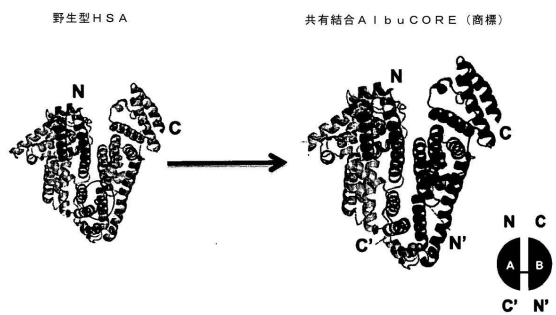
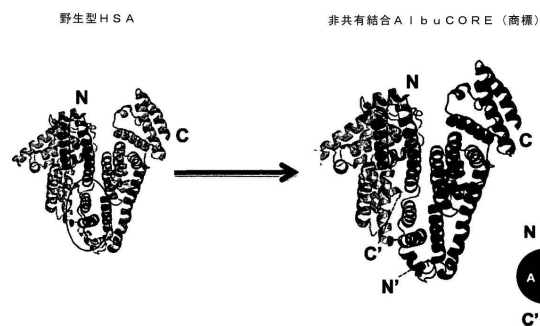
【図 15-3】



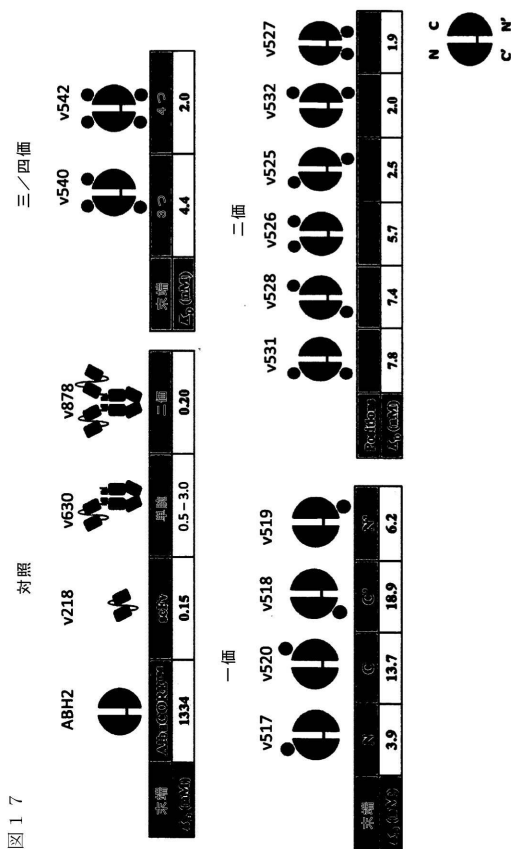
【図 15-4】



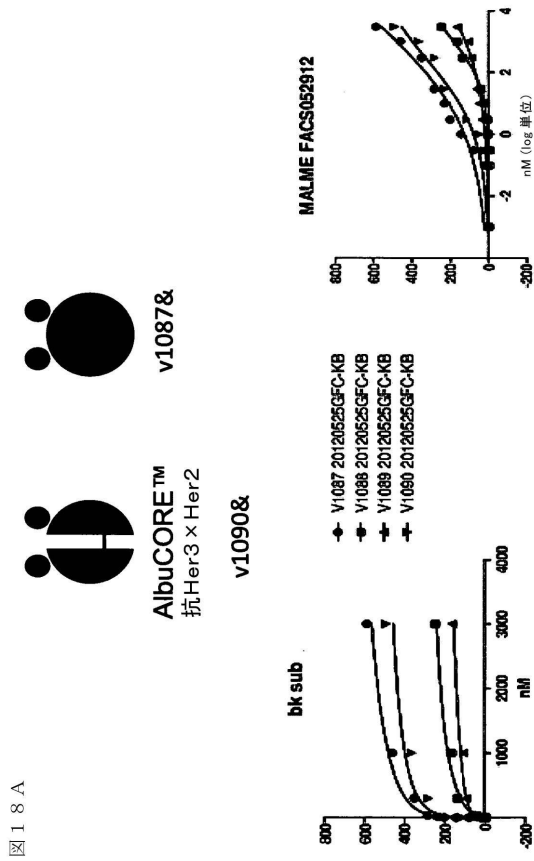
【図 16】

図 16 A
ABH2図 16 B
ABH1

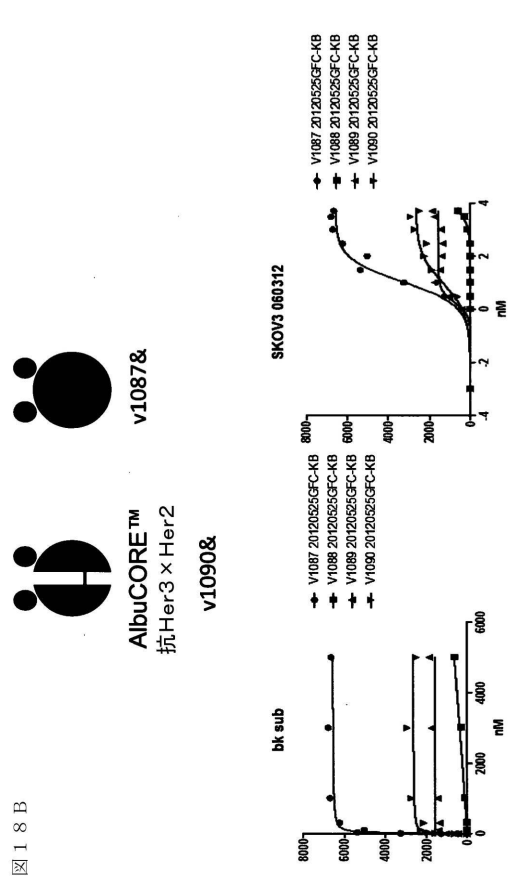
【図 17】



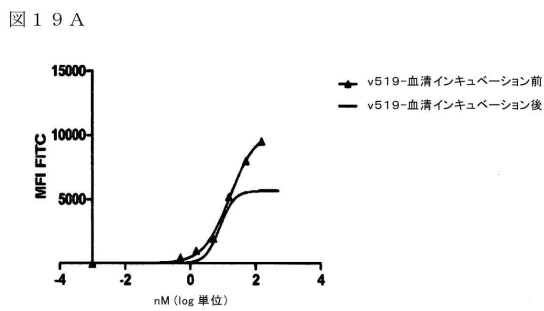
【図 18 A】



【図 18 B】



【図 19 - 1】



【図 19 - 2】

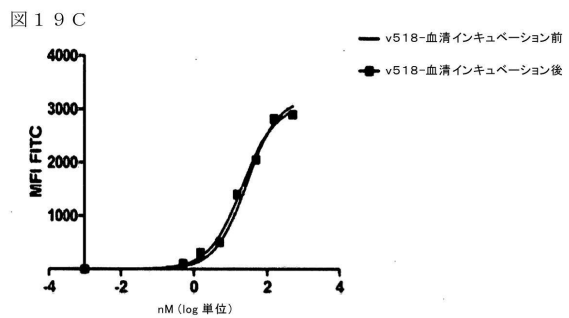


図 19 B

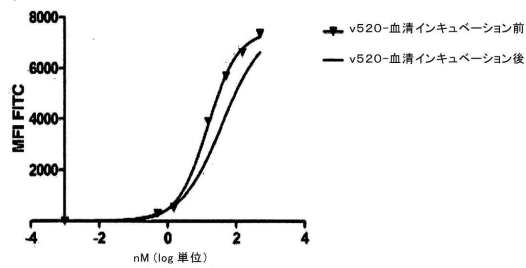
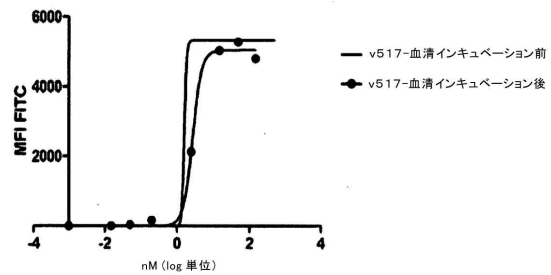
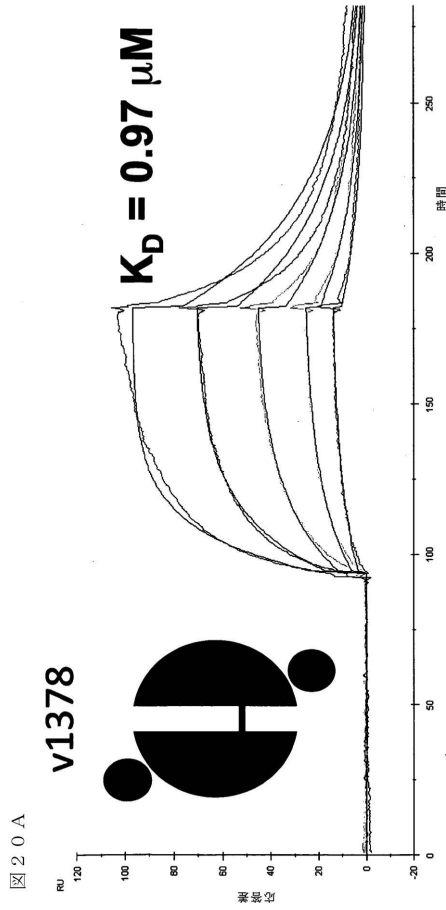


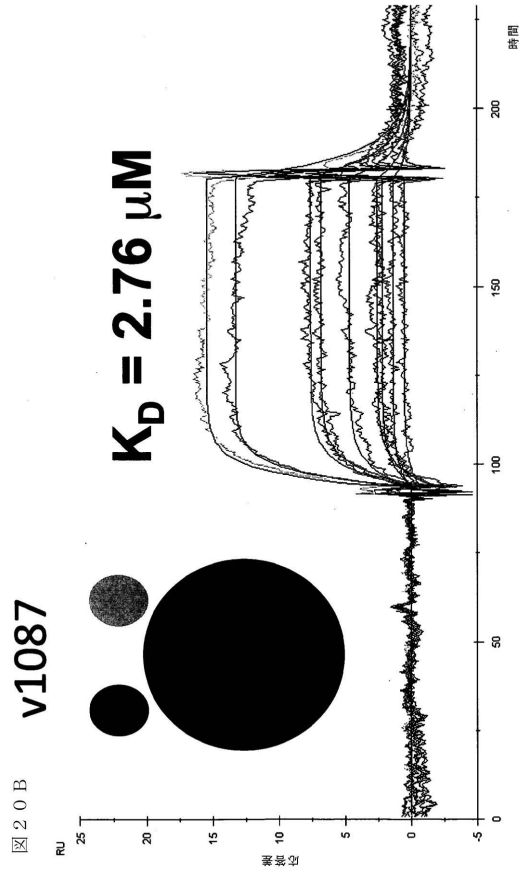
図 19 D



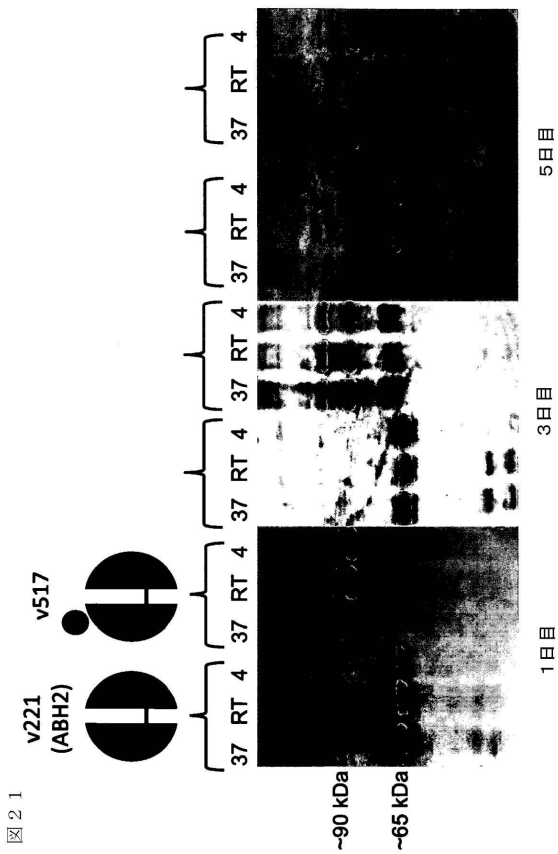
【図 20 A】



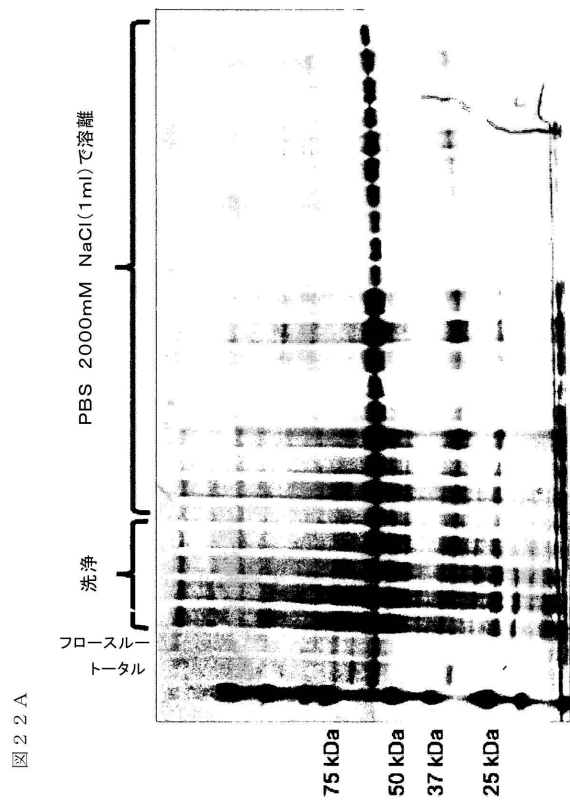
【図 20 B】



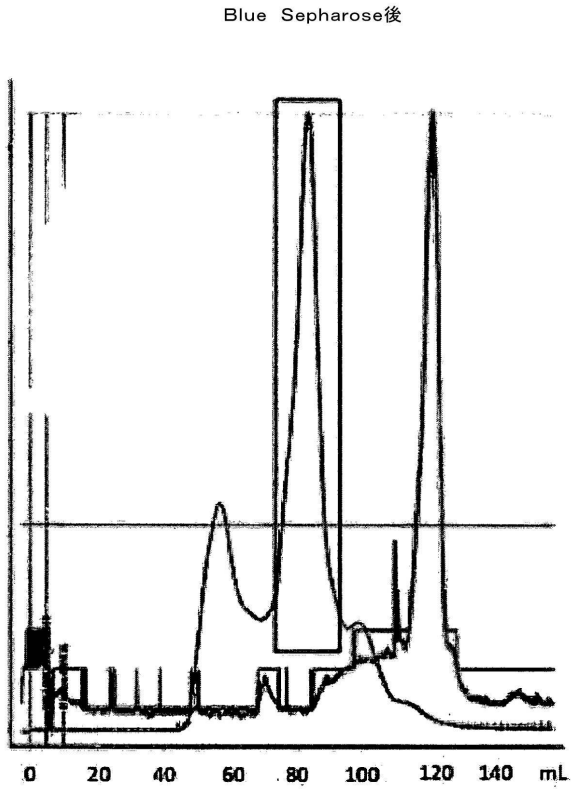
【図 21】



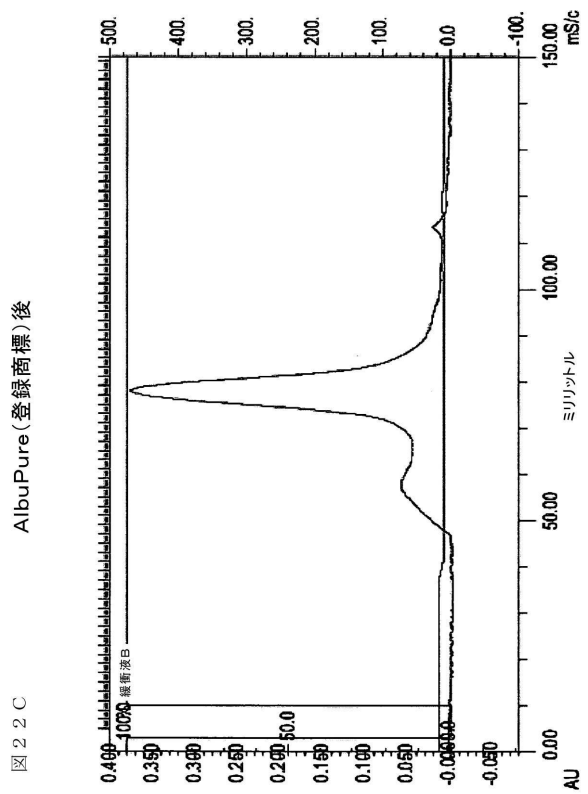
【図 22 A】



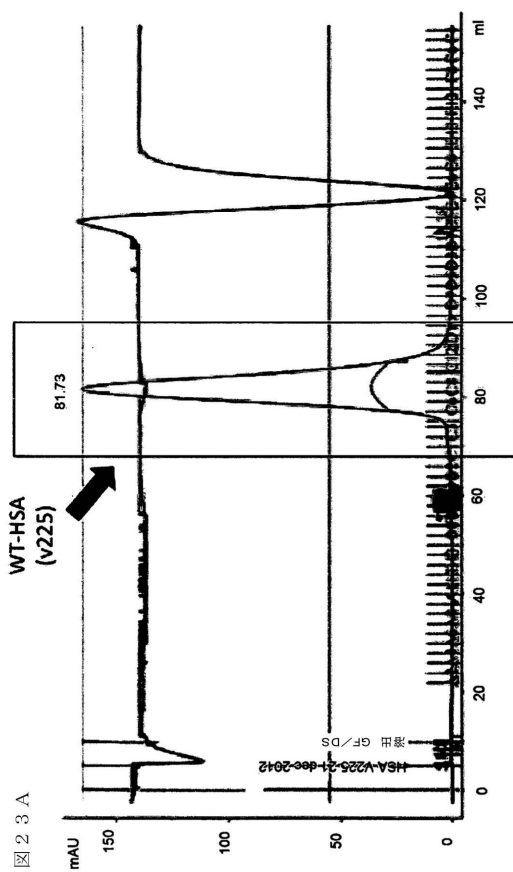
【図 2 2 B】



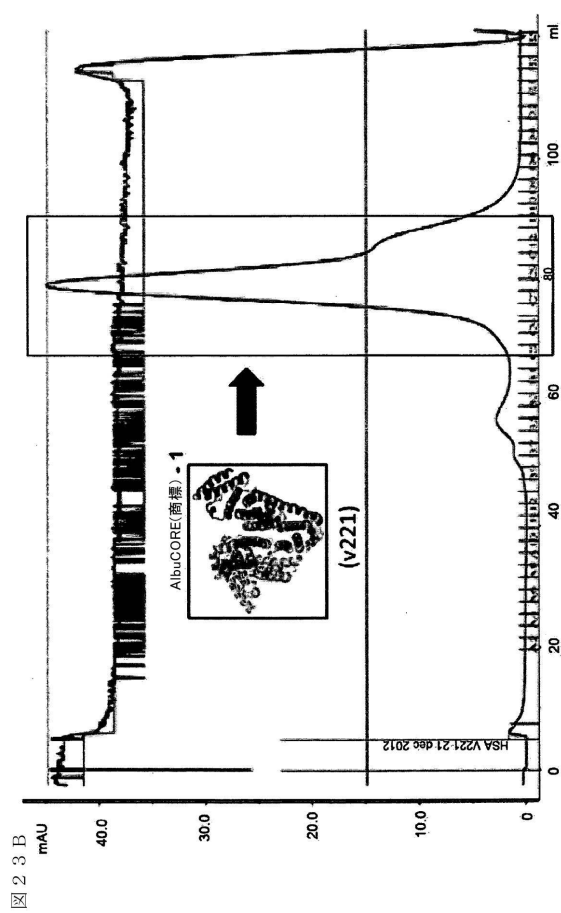
【図 2 2 C】



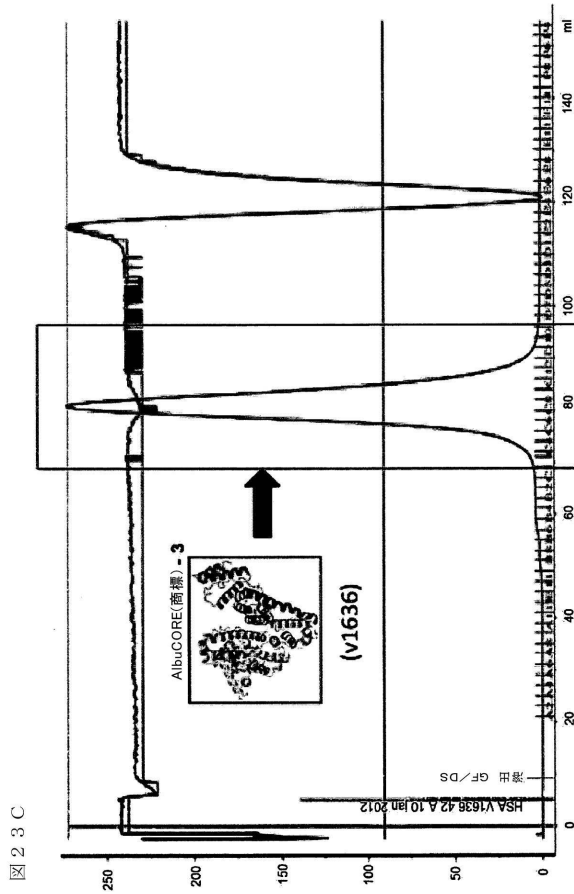
【図 2 3 A】



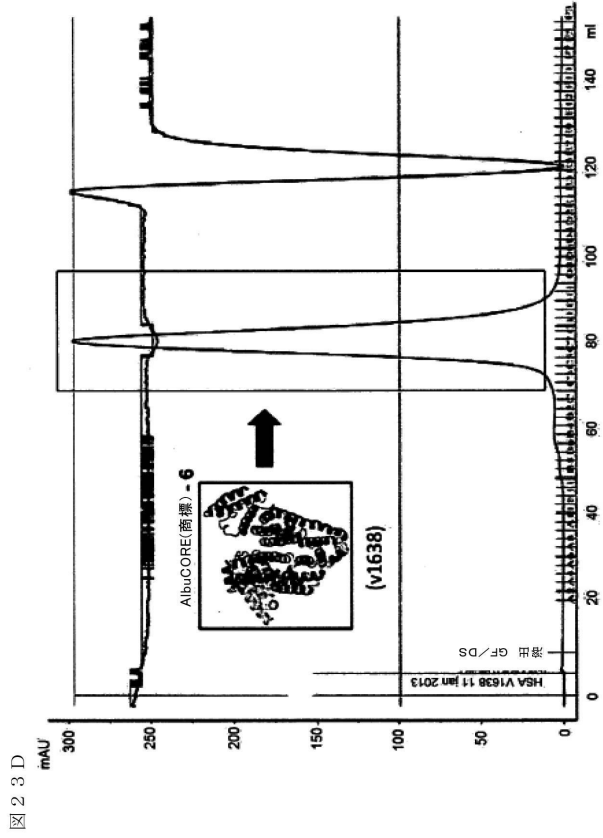
【図 2 3 B】



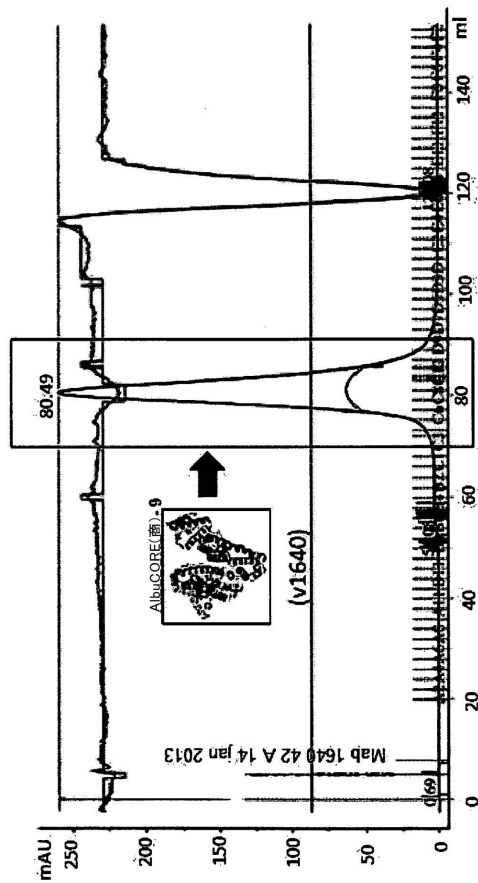
【図 2 3 C】



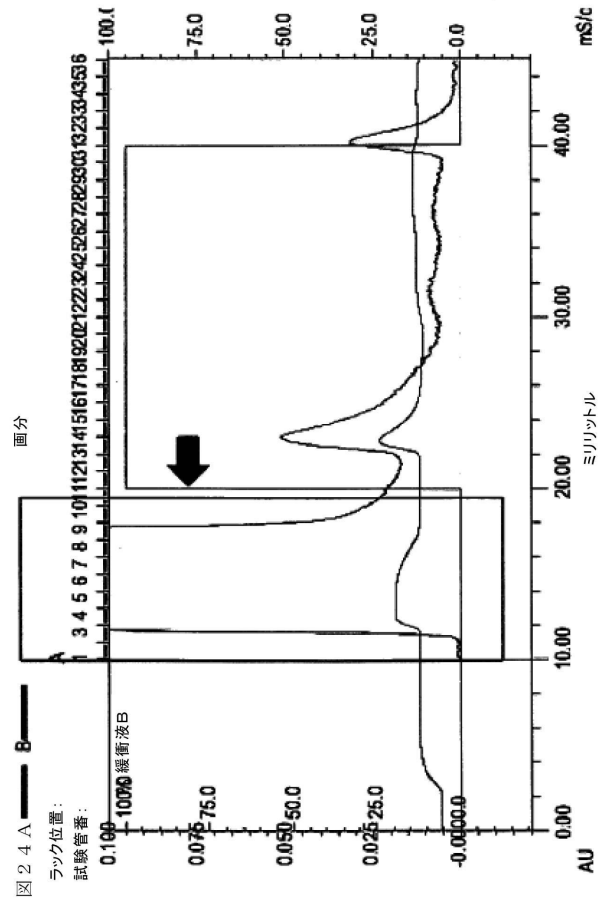
【図 2 3 D】



【図 2 3 E】

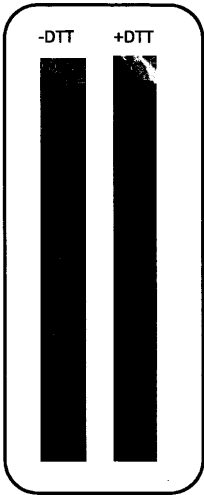


【図 2 4 A】



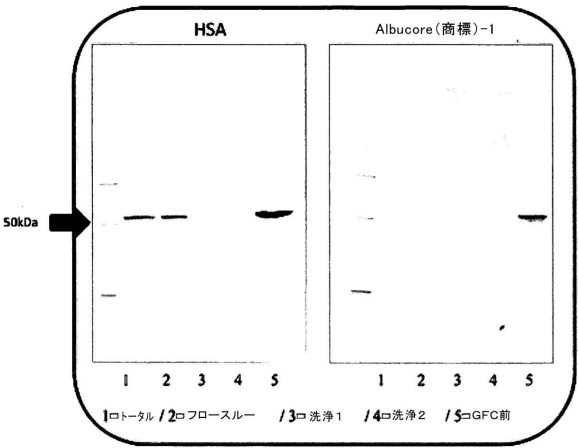
【図 2 4 B】

Figure 24B

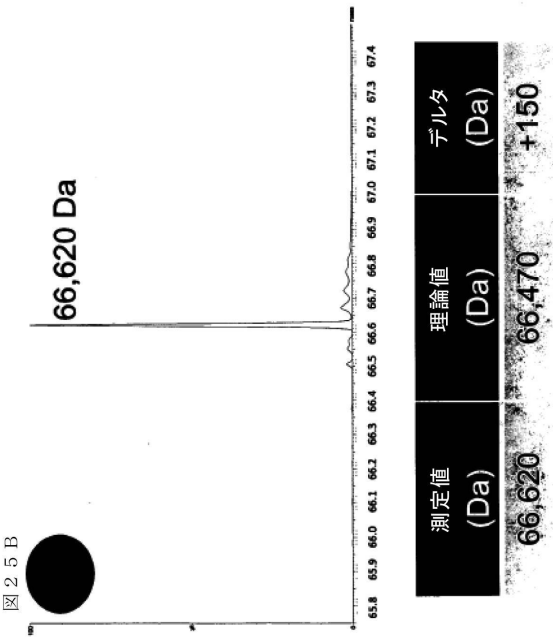


【図 2 5 A】

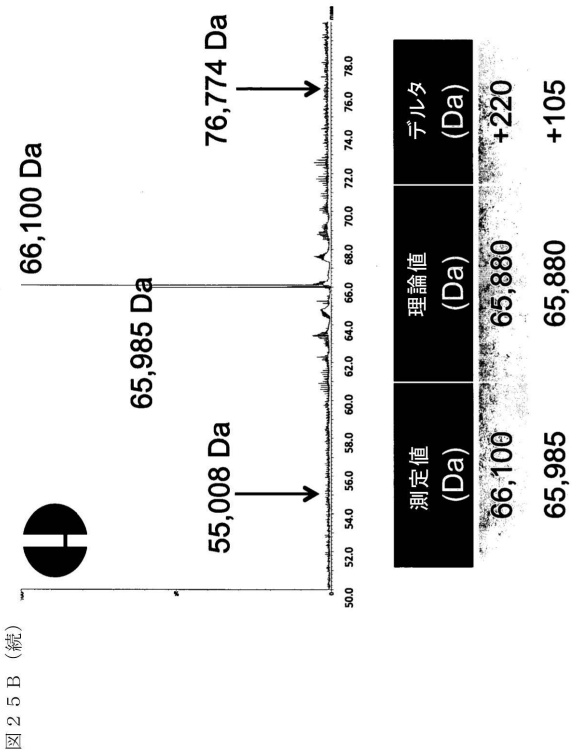
図 2 5 A



【図 2 5 B - 1】

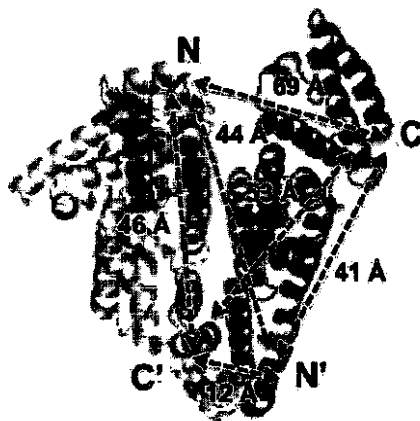


【図 2 5 B - 2】



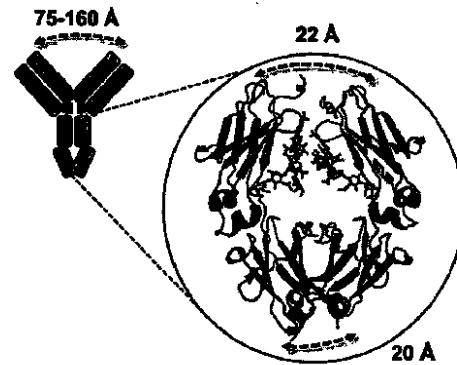
【図 26 A】

Figure 26A



【図 26 B】

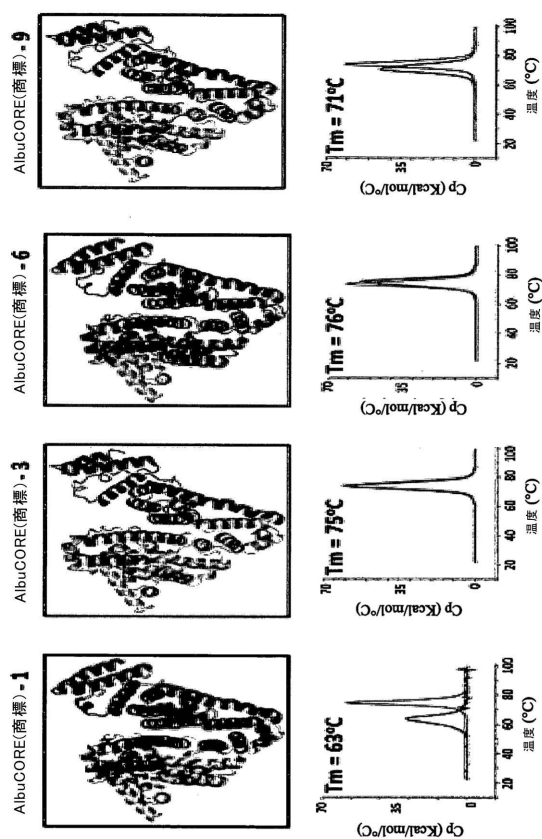
Figure 26B



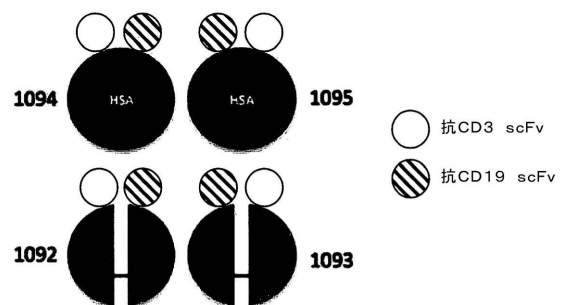
【図 26 C】



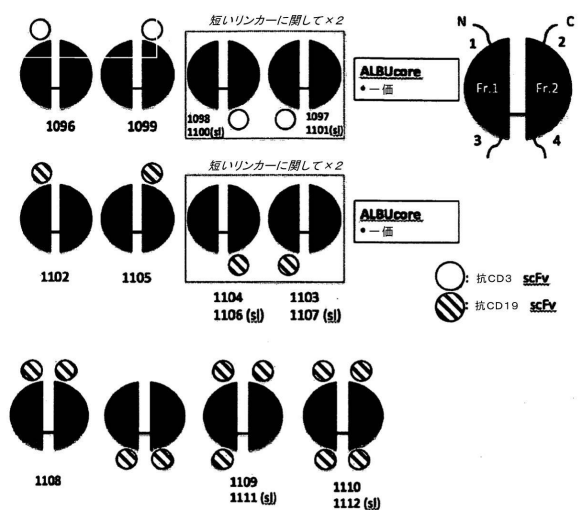
【図 27】



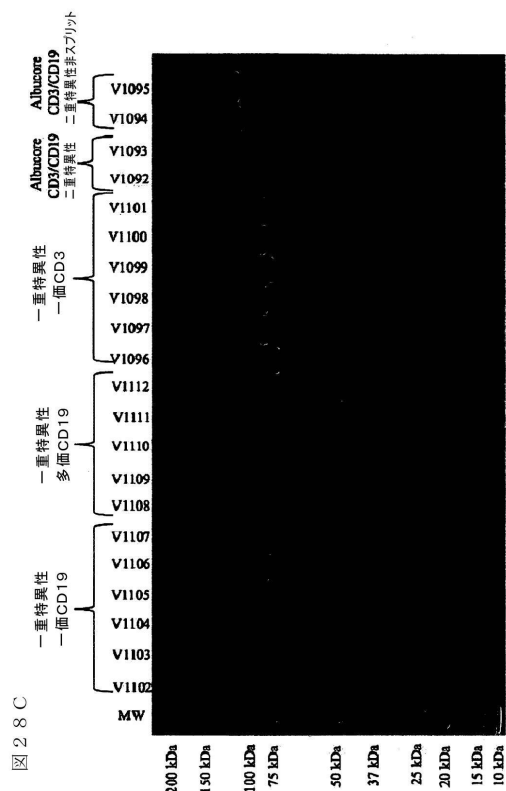
【図 28 A】



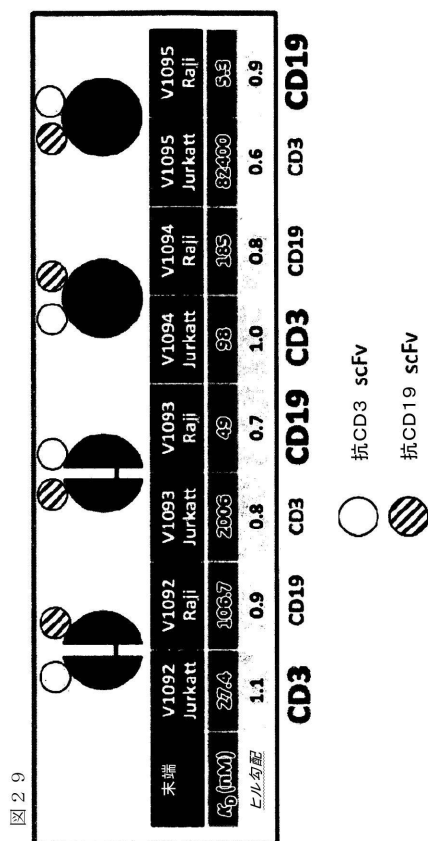
【図 28 B】



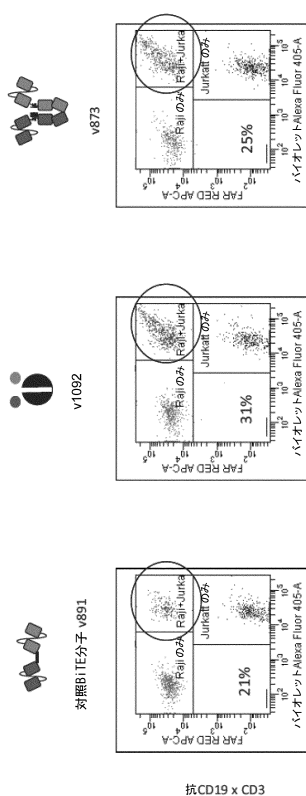
【図 2 8 C】



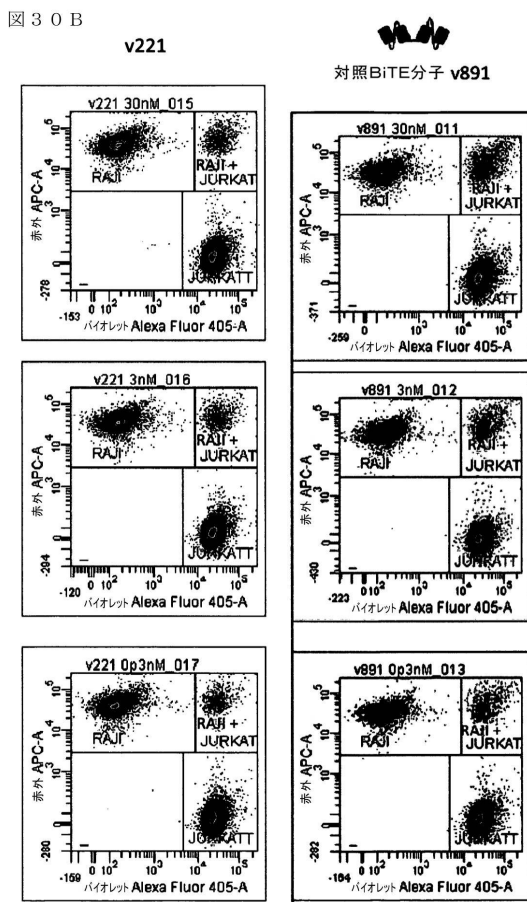
【図 29】



【図 30 A】

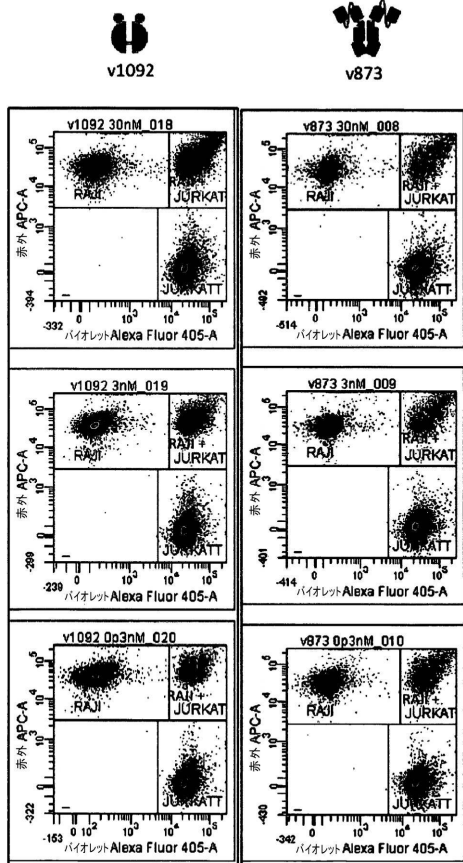


【図 3 0 B - 1】



【図 3 0 B - 2】

図 3 0 B (続)



【図 3 1】

图 3-1-A

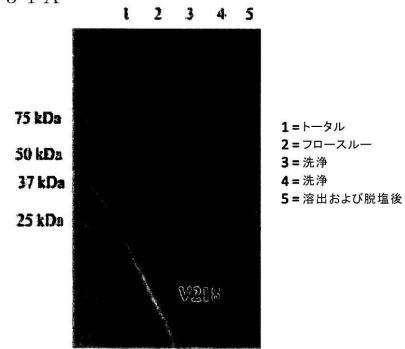
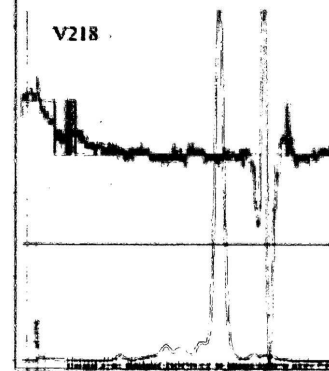
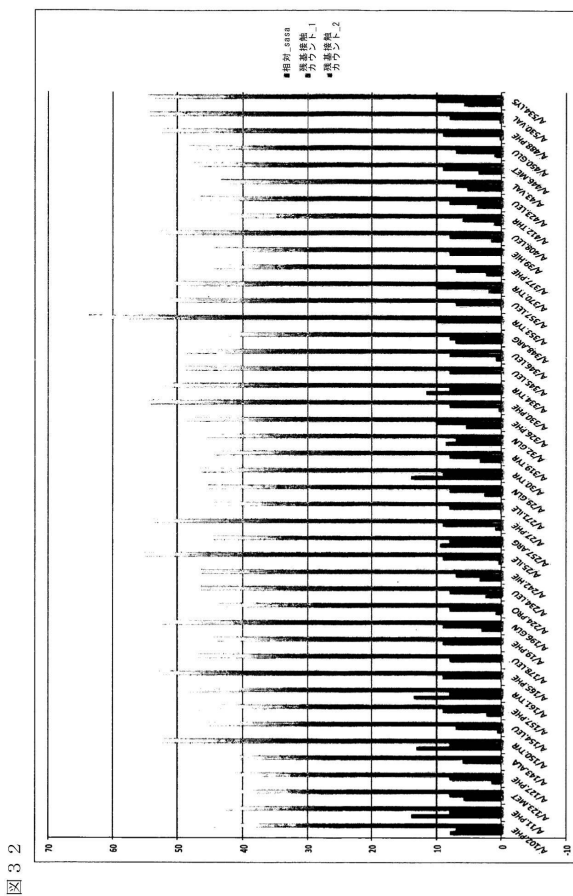


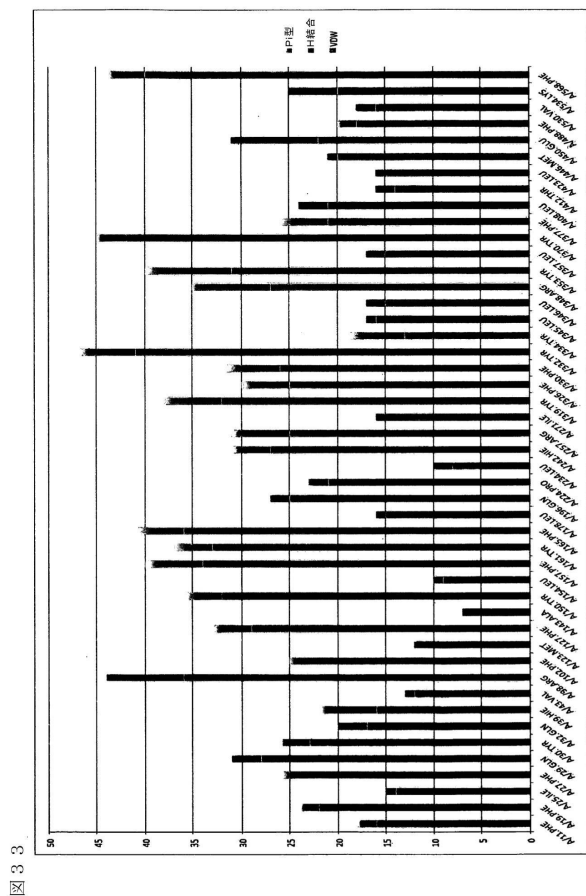
图 3-1-B



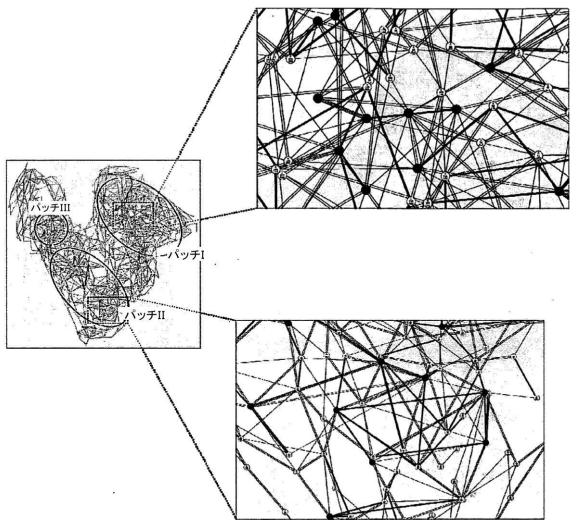
【図 3 2】



【图 3 3】

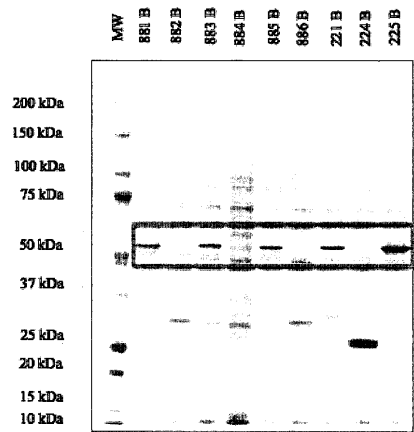


【図 3 4】

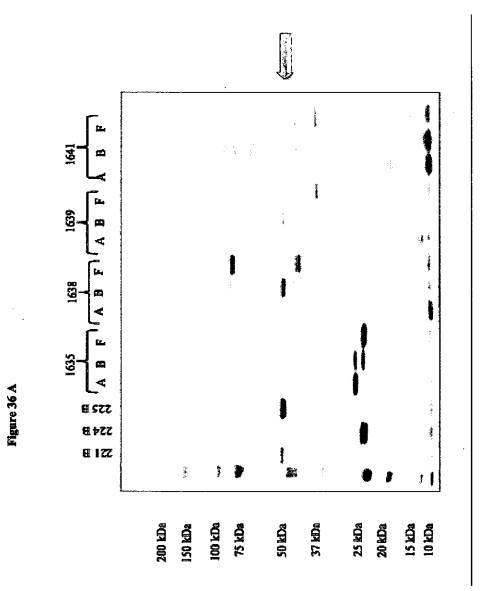


【図 3 5】

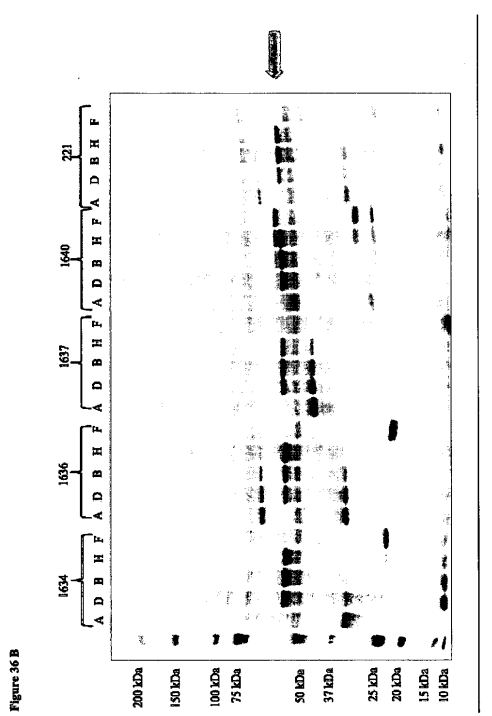
Figure 35



【図 3 6 A】



【図 3 6 B】



【配列表】

0006498601000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
C 1 2 N 15/14 (2006.01)		C 1 2 N 15/14	
C 1 2 N 15/13 (2006.01)		C 1 2 N 15/13	
C 1 2 N 15/62 (2006.01)		C 1 2 N 15/62	Z
A 6 1 P 35/00 (2006.01)		A 6 1 P 35/00	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)		A 6 1 K 39/395	E
A 6 1 K 38/38 (2006.01)		A 6 1 K 39/395	T
A 6 1 K 38/43 (2006.01)		A 6 1 K 38/38	
A 6 1 K 38/22 (2006.01)		A 6 1 K 38/43	
		A 6 1 K 38/22	

(31)優先権主張番号 61/671,640

(32)優先日 平成24年7月13日(2012.7.13)

(33)優先権主張国 米国(US)

(31)優先権主張番号 61/845,945

(32)優先日 平成25年7月12日(2013.7.12)

(33)優先権主張国 米国(US)

(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 100114340

弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100114889

弁理士 五十嵐 義弘

(74)代理人 100121072

弁理士 川本 和弥

(72)発明者 ディキシット、スルジット、ビーマラオ

カナダ国、ブリティッシュ コロンビア、リッチモンド、11651 キングフィッシャー ドライブ 51

(72)発明者 ダンジェロ、イゴール エドモンド パオロ

カナダ国、ブリティッシュ コロンビア、ポート ムーディ、オールダー ドライブ 15

(72)発明者 サンチェス、マリオ

カナダ国、ブリティッシュ コロンビア、ヴァンクーヴァー、ダブリュ、セブンス アヴェニュー 3157

(72)発明者 ング、ゴードン イウ コン

カナダ国、ブリティッシュ コロンビア、ヴァンクーヴァー、ウエスト シクスティーフォース アヴェニュー 1535

審査官 市島 洋介

(56)参考文献 特表2011-525476 (JP, A)

特表2001-523971 (JP, A)

特表平07-501698 (JP, A)

特許第6101638 (JP, B2)

Chem. Biol., 2004年, Vol.11, pp.681-689

生物工程, 2011年, Vol.89, No.7, pp.398-400

“Zymeworks Announces the Formation of its Therapeutics Advisory Team, and Appointment of VP, Preclinical R&D to Advance its Strategic Therapeutics Initiative”, [online], 2012.1.5, [2017.5.24 検索], インターネット<URL: <https://www.zymeworks.com/news/zymeworks-announces-formation-its-therapeutics-advisory-team-and-appointment-vp-preclinical-rd>>

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C07K 1/00-19/00

CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN)

UniProt/GeneSeq