(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7699539号
(P7699539)

(45)発行日　令和7年6月27日(2025.6.27)

(24)登録日　令和7年6月19日(2025.6.19)

(51)国際特許分類

Ｃ１２Ｎ　15/12　(2006.01)	Ｃ１２Ｎ	15/12	ＺＮＡ	
Ｃ０７Ｋ　14/46　(2006.01)	Ｃ０７Ｋ	14/46		
Ｃ１２Ｐ　21/02　(2006.01)	Ｃ１２Ｐ	21/02	Ｃ	
Ｃ０７Ｋ　19/00　(2006.01)	Ｃ０７Ｋ	19/00		
Ｃ１２Ｎ　15/63　(2006.01)	Ｃ１２Ｎ	15/63	Ｚ	

ＦＩ

請求項の数　16　（全36頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2021-518942(P2021-518942)
(86)(22)出願日　令和1年10月6日(2019.10.6)
(65)公表番号　特表2022-501063(P2022-501063A)
(43)公表日　令和4年1月6日(2022.1.6)
(86)国際出願番号　PCT/EP2019/076986
(87)国際公開番号　WO2020/074402
(87)国際公開日　令和2年4月16日(2020.4.16)
審査請求日　令和4年9月29日(2022.9.29)
(31)優先権主張番号　18306324.7
(32)優先日　平成30年10月7日(2018.10.7)
(33)優先権主張国・地域又は機関
欧州特許庁(EP)
前置審査

(73)特許権者　515292543
アフィロジック
フランス共和国　４４３００　ナント　リュド　ラ　レニエール　２４　パルク　クラブデュ　パレイ
(74)代理人　100102978
弁理士　清水　初志
(74)代理人　100205707
弁理士　小寺　秀紀
(74)代理人　100160923
弁理士　山口　裕孝
(74)代理人　100119507
弁理士　刑部　俊
(74)代理人　100142929
弁理士　井上　隆一

最終頁に続く

(54)【発明の名称】　多量体タンパク質の形成を阻害するバインダー

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

Sac7dファミリーのタンパク質のバリアントを含むポリペプチドであって、
該バリアントが多量体タンパク質のサブユニットに結合し、かつ該サブユニットタンパク質がその天然状態で完全に形成された該多量体タンパク質に関与している場合は該タンパク質の該サブユニットに結合せず、
(i) ポリペプチドが配列SEQ ID NO:16を含み、該多量体タンパク質がTNF-αである、または
(ii) ポリペプチドが配列SEQ ID NO:19またはSEQ ID NO:20を含み、該多量体タンパク質がRANKLである、
ポリペプチド。

【請求項２】

前記多量体タンパク質のサブユニットに結合する前記Sac7dファミリーのタンパク質のバリアントが、別のタンパク質またはポリペプチドに連結または融合されている、請求項1記載のポリペプチド。

【請求項３】

前記別のタンパク質またはポリペプチドが、前記Sac7dファミリーのタンパク質の別のバリアントを含む、請求項2記載のポリペプチド。

【請求項４】

前記別のタンパク質またはポリペプチドが、抗体である、請求項2記載のポリペプチド。

【請求項５】
前記抗体が、IL17、TNF-αまたはHer2/neuに結合する、請求項4記載のポリペプチド。
【請求項６】
有機分子にコンジュゲートしている、請求項1～5のいずれか一項記載のポリペプチド。
【請求項７】
請求項1～5のいずれか一項記載のポリペプチドをコードするDNA配列を含む、遺伝子構築物。
【請求項８】
請求項7記載の遺伝子構築物を含む、ベクター。
【請求項９】
請求項7記載の遺伝子構築物をそのゲノム内に含む、宿主細胞。
【請求項１０】
以下からなる工程を含む、請求項1～5のいずれか一項記載のポリペプチドを製造する方法：
a. 細胞培養物を培養する工程であって、細胞が請求項7記載の遺伝子構築物により形質転換されている、工程、および
b. 該ポリペプチドを回収する工程。
【請求項１１】
請求項1～6のいずれか一項記載のポリペプチドを含む医薬。
【請求項１２】
関節リウマチ、乾癬性関節炎、強直性脊椎炎、クローン病、潰瘍性大腸炎、慢性乾癬、化膿性汗腺炎、若年性特発性関節炎、ベーチェット病または尋常性乾癬の治療のための、請求項1～6のいずれか一項記載のポリペプチドを含む医薬であって、該ポリペプチドが配列SEQ ID NO:16を含み、TNF-αの単量体に結合するが、三量体化したTNF-αには結合しない、医薬。
【請求項１３】
化学療法またはCAR-T細胞による治療と組み合わせて使用される、がんの治療のための、請求項1～6のいずれか一項記載のポリペプチドを含む医薬であって、該ポリペプチドが配列SEQ ID NO:16を含み、TNF-αの単量体に結合するが、三量体化したTNF-αには結合しない、医薬。
【請求項１４】
骨喪失、例えば骨粗しょう症（PMO）に罹患した閉経後の患者、またはがん、特に乳癌および前立腺癌の患者における、骨喪失の予防のための、請求項1～6のいずれか一項記載のポリペプチドであって配列SEQ ID NO:19またはSEQ ID NO:20を含むポリペプチドを含む医薬であって、該ポリペプチドが、RANKLの単量体に結合するが、三量体化したRANKLには結合しない、医薬。
【請求項１５】
サンプル中の多量体タンパク質のサブユニットの存在を検出するまたは該サブユニットを定量する方法であって、
a. 該サンプルを、該サブユニットに結合する請求項1～6のいずれか一項記載のバリアントに、そのような結合が可能な条件下で暴露する工程、
b. 該バリアントを回収する、および／または該サブユニットを検出するもしくは該サブユニットの量を測定する工程、
を含み、
(i) 該多量体タンパク質がTNF-αであり、該バリアントが配列SEQ ID NO:16を含む、または
(ii) 該多量体タンパク質がRANKLであり、該バリアントが配列SEQ ID NO:19またはSEQ ID NO:20を含む、
方法。

【請求項１６】
サンプル中の多量体タンパク質のサブユニットを精製する方法であって、
a. 該サンプルを、該サブユニットに結合する請求項1～6のいずれか一項記載のバリアントに、そのような結合が可能な条件下で暴露する工程、
b. 該サブユニットに結合したバリアントを回収する工程、
c. 該バリアントから該サブユニットを溶出させる工程、
を含み、
(i) 該多量体タンパク質がTNF-αであり、該バリアントが配列SEQ ID NO:16を含む、または
(ii) 該多量体タンパク質がRANKLであり、該バリアントが配列SEQ ID NO:19またはSEQ ID NO:20を含む、
方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、分子生物学の分野におけるものであり、特に、多量体タンパク質複合体の形成を阻害する能力を有する新規分子およびコンジュゲートの開発に関する。
【背景技術】
【０００２】
緒言
生物学的特性を有するいくつかのタンパク質は、多量体タンパク質、すなわち、サブユニットと呼ばれる複数のポリペプチド鎖により形成されるポリペプチドとして活性であり得る。多量体タンパク質またはポリペプチドは、同じサブユニットから（ホモ多量体）または異なるサブユニットから（ヘテロ多量体）形成され得る。したがって、ヘテロ多量体ポリペプチドは、2つまたはそれ以上の異なるポリペプチド鎖を含むタンパク質を表し、ホモ多量体ポリペプチドは、すべて同一である2つまたはそれ以上のポリペプチド鎖を含むタンパク質を表す。
【０００３】
一般に、インビボにおいて、単量体サブユニットと可溶性形態の多量体タンパク質の間は平衡状態にあり、単量体サブユニットは多量体タンパク質を形成するよう集合し、多量体タンパク質は多量体形態を解体および解放している。これらの異なる種間の比は、多量体形態を相対的に高い濃度にシフトさせる濃度ベースの平衡により支配されている。そのような平衡により、恒常性を維持するよう、多量体であり活性な可溶性形態の濃度を調節することができる。
【０００４】
多量体タンパク質の、特に細胞膜に挿入され安定化されたそれらの膜結合形態に対してそれらの可溶性形態の生物学的活性を減少させるための、1つの戦略は、生物学的に活性な多量体タンパク質の形成を回避することまたはその平衡を単量体（または多量体・不活性）サブユニット側にシフトさせることである。これは、サブユニットの集合をブロックすることにより、例えば多量体の集合の部位を立体的にブロックすることにより、行われ得る。
【０００５】
したがって、多量体タンパク質の単量体部分に結合し、多量体の形成を阻害する、または単量体・多量体種の平衡を動かす分子を開発することに関心が持たれている。
【０００６】
出願人は、特に特定のスクリーニング法により取得することができる、OBフォールドドメインのバリアントに基づき、多量体タンパク質のサブユニットに結合し、多量体複合体の形成を阻害することができる新規の人工タンパク質を作製することによって、そのような分子を製造することを提案した。
【０００７】

EP1930342（特許文献1）は、Sac7dのバリアントを含むライブラリおよびそのようなライブラリをスクリーニングする方法を開示している。PulDに結合するSac7dバリアントが開示されている。図12の説明に示されているように、そのようなバリアントは、膜から単離されたタンパク質に結合することから、その天然の多量体状態のタンパク質に結合するようである。EP19300342は、したがって、多量体タンパク質のサブユニットに結合するが、当該サブユニットタンパク質がその天然状態で完全に形成された多量体タンパク質に関与している場合は当該タンパク質のサブユニットに（すなわち、多量体タンパク質に）結合しない、バリアントを開示していない。

【０００８】

WO2017161096（特許文献2）は、抗体模倣体であるターゲティング部分と活性剤とのコンジュゲートである分子を開示している。そのような抗体模倣体は、Sac7dのバリアントであると言及されており、この文献はまた、標的がSac7dスーパーファミリーのメンバーであり得ることを示している。しかし、この文献は、そのようなバリアントを開示しておらず、またあるタンパク質のサブユニットに結合し、天然の多量体化されたタンパク質には結合しないバリアントを具体的に発見することが可能であるという事実も開示していない。さらに、抗体模倣体は活性剤を標的に向かわせることを意図しているという事実からみて、この文献は、完全に形成された標的（すなわち、多量体分子）に結合するバリアントを想定していることが明らかである。

【０００９】

DiasおよびRoqie（Biotechnol Bioeng. 2017 Mar; 114(3); 481-491（非特許文献1））は、精製のための親和性試薬としてのタンパク質スキャホールドを開示しているが、OBフォールドタンパク質、特に、生物学的に活性な多量体タンパク質の形成を、そのような多量体またはサブ多量体の形成に関与するエピトープでサブユニットタンパク質に結合し、それにより生物学的に活性な多量体の形成を妨げることによって阻害するSac7dファミリーのタンパク質のバリアントの使用の可能性に言及していない。

【００１０】

Dienheltら（PLoS One. 2010 May 19;5(5):e10728（非特許文献2））は、1回の発見工程で標的タンパク質に対する高親和性リガンドを決定する方法の例として、AKT1に特異的に結合する高親和性シンボディ（synbody）を開示している。この文献は、多量体のサブユニットのみに結合しタンパク質の多量体化を妨げるそのようなリガンドの能力に関してはいかなる言及もしていない。

【００１１】

Beharら（J Chromatogr A. 2016 Apr 8;1441:44-51（非特許文献3））は、親和性カラムにおけるSac7dバリアントの能力を開示している。この文献は、そのようなバリアントがタンパク質の多量体化を妨げるよう設計され得ることおよびそれらがサブユニットに結合することができるが完全に多量体化されたタンパク質には結合することができないことを教示または示唆していない。

【００１２】

まとめると、これらの文献はいずれも、多量体に関与していない場合に多量体タンパク質のサブユニットに結合することができるが、多量体タンパク質に関与している場合にはそのようなサブユニットに結合することができないスキャホールドを取得することが可能であることを開示または示唆していない。

【先行技術文献】

【特許文献】

【００１３】

【文献】EP1930342

【文献】WO2017161096

【非特許文献】

【００１４】

【文献】Biotechnol Bioeng. 2017 Mar; 114(3); 481-491

【文献】PLoS One. 2010 May 19;5(5):e10728
【文献】J Chromatogr A. 2016 Apr 8;1441:44-51
【発明の概要】
【００１５】
本発明は、生物学的に活性な多量体タンパク質の形成を、そのような多量体またはサブ多量体の形成に関与するエピトープでサブユニットタンパク質に結合し、それにより生物学的に活性な多量体の形成を妨げることによって阻害する、OBフォールドタンパク質、特にSac7dファミリーのタンパク質のバリアントに関する。
【００１６】
本発明はまた、そのようなSac7dファミリーのタンパク質のバリアントを含むポリペプチドを包含する。
【００１７】
このバリアントは、Sac7dファミリーのタンパク質の結合部位に4～22個の変異アミノ酸を含み、多量体タンパク質のサブユニットに結合するが、当該サブユニットタンパク質がその天然状態で完全に形成された多量体タンパク質に関与している場合は当該タンパク質のサブユニットに結合しないことに注目されたい。
【００１８】
本明細書は、以下に、Sac7dタンパク質およびファミリーを開示しているが、この教示は、WO2007139397に開示されるような他のOBフォールドドメインにも適用可能であることに留意されたい。本発明はまた、ウイルスアダプタータンパク質v-Crkにおける保存された配列として最初に報告され、かつPFAMデータベースにおいてPF00018の下で報告されている、約60アミノ酸残基の小タンパク質ドメインであるSH3ドメインにも適用可能である。SH3ドメインは、2つの密に充填された逆平行のβシートとして配置された5個または6個のβ鎖からなる特徴的なβバレルフォールドを有する。そのリンカー領域は、短ヘリックスを含み得る。OBフォールドおよびSH3ドメインは相同性を共有しており、これらのドメインの配列および構造の知識に照らして、OBフォールドまたはSH3ドメインのいずれにおいても、Sac7dについて以下で開示されているアミノ酸がどのアミノ酸に対応するかを決定することができることに留意されたい。
【００１９】
特定の態様において、多量体タンパク質は、TNF-αスーパーファミリーの一員、より詳細にはTNF-α、RANKLまたはTRAIL（TNFSF10）である。
【００２０】
特定の態様において、該バリアントはポリペプチド内に存在し、したがって、生物学的関心対象となる他のタンパク質にアミン結合により共有結合される。
【００２１】
特定の態様において、該バリアントは、何らかの機能を示す有機分子にコンジュゲートしている。
【００２２】
本発明はまた、治療、診断または精製用途におけるこれらのバリアントに関する。本発明はまた、このバリアントを含む組成物、特に経口または局所（皮膚）組成物に関する。
【００２３】
本発明はまた、多量体タンパク質の形成に関与するサブユニットの面（多量体においてタンパク質・タンパク質相互作用に関与する面）に結合するそのようなバリアントを同定することができる方法に関する。
【００２４】
本発明にしたがい、Sac7dファミリーのタンパク質のバリアントを含むポリペプチドであって、当該バリアントが、Sac7dファミリーのタンパク質の結合部位に4～22個の変異アミノ酸を含み、多量体タンパク質のサブユニットに結合するが、当該サブユニットタンパク質がその天然状態で完全に形成された多量体タンパク質に関与している場合は当該タンパク質のサブユニットに結合しない、ポリペプチドを得ることが可能である。Sac7dの

配列は：
MVKVKFKYKGEEKEVDTSKIKKVWRVGKMVSFTYDDNGKTGRGAVSEKDAPKEL
LDMLARAEREKK (SEQ ID NO: 1)

であることを留意されたい。
【００２５】
Sac7dバリアントの変異アミノ酸がSac7dのV2、K3、K5、K7、Y8、K9、G10、E11、K13、E14、T17、K21、K22、W24、V26、G27、K28、M29、S31、T33、Y34、D35、D36、N37、G38、K39、T40、G41、R42、A44、S46、E47、K48、D49、A50およびP51からなる群より選択される上記ポリペプチドを得ることが可能である。
【００２６】
Sac7dバリアントがSac7dのK7、Y8、K9、E11、K21、K22、W24、V26、M29、S31、T33、D35、T40、G41、R42、A44およびS46からなる群より選択される4～17個の変異アミノ酸を含む上記ポリペプチドを得ることが可能である。
【００２７】
好ましい態様において、多量体タンパク質は、腫瘍壊死因子スーパーファミリーの一員であり、好ましくはTNF-α、RANKLまたはTRAILである。
【００２８】
好ましい態様において、ポリペプチドは、配列
MVKVKFXXXGXEKEVDTSKIXXVXRXGKXVHFWYXDNGKIXKGXVXEKDAPKELL
DMLARAEREK (SEQ ID NO: 17)
MVKVKFXXXGXEKEVDTSKIXHVMRXGKXVHFWYEDNGKIXKGXVXEKDAPKEL
LDMLARAEREK (SEQ ID NO: 18)
または
MVKVKFVMFGKEKEVDTSKIVHVMRQGKLVHFWYEDNGKIDKGFVPEKDAPKEL
LDMLARAEREK (SEQ ID NO:16)

を含む。
【００２９】
該ポリペプチドはまた、V7、M8、F9、K11、V21、H22、M24、Q26、L29、E35、D41、F44およびP46からなる群より、より好ましくは、V7、M8、F9、K11、V21、Q26、L29、E35、D41、F44およびP46からなる群より選択される1～13個、好ましくは1～11個、より好ましくは1～10個、より好ましくは1～8個、より好ましくは1～6個、より好ましくは1～5個、より好ましくは1～4個、より好ましくは1～3個、より好ましくは2個、より好ましくは1個のアミノ酸が別のアミノ酸で置換されている、配列SEQ ID NO:16を含み得る。
【００３０】
別の態様において、ポリペプチドは、配列
VKVKFRSDGEEKEVDTSKILLVARQGKIVMFGYDDNGKPGIGLVWEKDDPKELLD
MLARAERGK (SEQ ID NO: 19),
または
VKVKFRSDGEEKEVDTSKILLVARQGKIVMFGYDDNGKPGIGLVWEKDDPKELLD
MLARAEREK (SEQ ID NO: 20)

を含む。
【００３１】

いくつかの態様において、該ポリペプチドは、多量体タンパク質のサブユニットに結合するSac7dファミリーのタンパク質のバリアントが別のタンパク質またはポリペプチド、特にSac7dファミリーのタンパク質の別のバリアントまたは抗体、特にIL17、TNF-αもしくはHer2/neuに結合する抗体に連結または融合される。

【００３２】

別の態様において、該ポリペプチドは、有機分子にコンジュゲートしている。

【００３３】

それはまた、上記ポリペプチドをコードするDNA配列を含む遺伝子構築物、そのような遺伝子構築物を含むベクターおよびそのような遺伝子構築物をそのゲノム内に含む宿主細胞を取得することも可能にする。

【００３４】

細胞培養物を培養する工程であって、細胞が遺伝子構築物により形質転換されている工程、およびポリペプチドを回収する工程、を含む、ポリペプチドを製造する方法を実施することも可能である。

【００３５】

多量体タンパク質の単量体に結合するタンパク質を取得および同定する方法もまた利用可能である。

【００３６】

当業者はまた、開示されるポリペプチドを、多量体タンパク質の多量体化の阻害に使用するためまたは以下に示される疾患を治療するための医薬、開示されるポリペプチドとして用いることができる。

【００３７】

本発明はまた、関節リウマチ、乾癬性関節炎、強直性脊椎炎、クローン病、潰瘍性大腸炎、慢性乾癬、化膿性汗腺炎、若年性特発性関節炎、ベーチェット病または尋常性乾癬の治療に使用するための、TNF-αの単量体に結合するが、三量体化したTNF-αには結合しない、本明細書に開示されるポリペプチドに関する。

【００３８】

本発明はまた、化学療法またはCAR-T細胞による治療と組み合わせてがんの治療に使用するための、TNF-αの単量体に結合するが、三量体化したTNF-αには結合しない、本明細書に開示されるポリペプチドに関する。

【００３９】

本発明はまた、骨喪失（例えば、骨粗しょう症（PMO）に罹患した閉経後の患者、またはがん（特に乳癌および前立腺癌）の患者における骨喪失）の予防に使用するための、RANKLの単量体に結合するが、三量体化したRANKLには結合しない、本明細書に開示されるポリペプチドに関する。

【００４０】

本発明はまた、それを必要とする患者を治療する方法であって、治療量（治療活性を提供する量）の本明細書に開示されるポリペプチドを投与する工程を含み、該ポリペプチドはTNF-αの単量体に結合するが、三量体化したTNF-αには結合せず、該患者は関節リウマチ、乾癬性関節炎、強直性脊椎炎、クローン病、潰瘍性大腸炎、慢性乾癬、化膿性汗腺炎、若年性特発性関節炎、ベーチェット病または尋常性乾癬を有する方法に関する。

【００４１】

本発明はまた、それを必要とする患者を治療する方法であって、治療量（治療活性を提供する量）の本明細書に開示されるポリペプチドを投与する工程を含み、該ポリペプチドはTNF-αの単量体に結合するが、三量体化したTNF-αには結合せず、該患者は化学療法によりまたはCAR-T細胞を用いてがんを治療されている方法に関する。

【００４２】

本発明はまた、それを必要とする患者において骨喪失を予防するまたは骨喪失を治療する方法であって、治療量（治療活性を提供する量）の本明細書に開示されるポリペプチドを投与する工程を含み、該ポリペプチドはRANKLの単量体に結合するが、三量体化したR

ANKLには結合せず、該患者は、骨粗しょう症（PMO）に罹患した閉経後の患者またはがん（特に乳癌および前立腺癌）の患者であり、骨喪失がそのようながんの副作用である方法に関する。

【００４３】

サンプル中の多量体タンパク質のサブユニットの存在を検出するまたは該サブユニットを定量する方法であって、

a. 該サンプルを、該サブユニットに結合するバリアントに、そのような結合が可能な条件下で暴露する工程、

b. 該バリアントを回収する、および／または該サブユニットを検出するもしくは該サブユニットの量を測定する工程、

を含む方法も想定されている。

【００４４】

サンプル中の多量体タンパク質のサブユニットを精製する方法であって、

a. 該サンプルを、該サブユニットに結合する本明細書に開示されるバリアントに、そのような結合が可能な条件下で暴露する工程、

b. 該サブユニットに結合したバリアントを回収する工程、

c. 該バリアントから該サブユニットを溶出させる工程、

を含む方法も想定されている。

[本発明1001]

Sac7dファミリーのタンパク質のバリアントを含むポリペプチドであって、該バリアントが、該Sac7dファミリーのタンパク質の結合部位に4～22個の変異アミノ酸を含み、多量体タンパク質のサブユニットに結合し、かつ該サブユニットタンパク質がその天然状態で完全に形成された該多量体タンパク質に関与している場合は該タンパク質の該サブユニットに結合しない、ポリペプチド。

[本発明1002]

前記Sac7dバリアントの変異アミノ酸が、Sac7dのV2、K3、K5、K7、Y8、K9、G10、E11、K13、E14、T17、K21、K22、W24、V26、G27、K28、M29、S31、T33、Y34、D35、D36、N37、G38、K39、T40、G41、R42、A44、S46、E47、K48、D49、A50およびP51からなる群より選択される、本発明1001のポリペプチド。

[本発明1003]

前記Sac7dバリアントが、Sac7dのK7、Y8、K9、E11、K21、K22、W24、V26、M29、S31、T33、D35、T40、G41、R42、A44およびS46からなる群より選択される4～17個の変異アミノ酸を含む、本発明1001または1002のポリペプチド。

[本発明1004]

前記多量体タンパク質が、腫瘍壊死因子スーパーファミリーの一員であり、好ましくはTNF-α、RANKLおよびTRAILからなる群より選択される、本発明1001～1003のいずれかのポリペプチド。

[本発明1005]

配列SEQ ID NO:17またはSEQ ID NO:18を含む、本発明1001～1004のいずれかのポリペプチド。

[本発明1006]

配列SEQ ID NO:16を含む、本発明1001～1005のいずれかのポリペプチド。

[本発明1007]

V7、M8、F9、K11、V21、H22、M24、Q26、L29、E35、D41、F44およびP46からなる群より選択される1～8個のアミノ酸が別のアミノ酸で置換されている配列SEQ ID NO:16を含む、本発明1001～1005のいずれかのポリペプチド。

[本発明1008]

配列SEQ ID NO:19またはSEQ ID NO:20を含む、本発明1001～1004のいずれかのポリペプチド。

[本発明1009]

前記多量体タンパク質のサブユニットに結合する前記Sac7dファミリーのタンパク質のバリアントが、別のタンパク質またはポリペプチドに連結または融合されている、本発明1001～1008のいずれかのポリペプチド。

[本発明1010]

前記別のタンパク質またはポリペプチドが、前記Sac7dファミリーのタンパク質の別のバリアントを含む、本発明1009のポリペプチド。

[本発明1011]

前記別のタンパク質またはポリペプチドが、抗体であり、好ましくはIL17、TNF-αまたはHer2/neuに結合する、本発明1009のポリペプチド。

[本発明1012]

有機分子にコンジュゲートしている、本発明1001～1011のいずれかのポリペプチド。

[本発明1013]

本発明1001～1011のいずれかのポリペプチドをコードするDNA配列を含む、遺伝子構築物。

[本発明1014]

本発明1013の遺伝子構築物を含む、ベクター。

[本発明1015]

本発明1013の遺伝子構築物をそのゲノム内に含む、宿主細胞。

[本発明1016]

以下からなる工程を含む、本発明1001～1011のいずれかのポリペプチドを製造する方法：

a. 細胞培養物を培養する工程であって、細胞が本発明1013の遺伝子構築物により形質転換されている、工程、および

b. 該ポリペプチドを回収する工程。

[本発明1017]

以下の工程を含む、多量体タンパク質の単量体に結合するタンパク質を取得する方法：

a. Sac7dファミリーのタンパク質のバリアントのコンビナトリアルライブラリを提供する工程であって、その天然リガンドに対するOBフォールドタンパク質の結合界面の4～22残基が無作為化されており、該OBフォールドタンパク質が、スルホロブス・アシドカルダリウス（Sulfolobus acidocaldarius）由来のSac7dもしくはSac7e、またはスルホロブス・ソルファタリカス（Sulfolobus solfataricus）由来のSso7d、またはスルホロブス・トコダイイ（Sulfolobus tokodaii）由来のDBP 7、またはスルホロブス・シバタエ（Sulfolobus shibatae）由来のSsh7b、またはスルホロブス・シバタエ由来のSsh7a、またはスルホロブス・ソルファタリカス由来のp7ssであり、該バリアントにおいて無作為化されている残基が、Sac7dのV2、K3、K5、K7、Y8、K9、G10、E14、T17、K21、K22、W24、V26、G27、K28、M29、S31、T33、D35、D36、N37、G38、K39、T40、G41、R42、A44、S46、E47、K48、D49、A50およびP51に対応する残基から選択される、工程、

b. 該バリアントを発現させる工程、

c. 多量体化が抑止されるよう固体支持体にコンジュゲートしている該多量体タンパク質に該バリアントを提示する工程、

d. 該面に結合するバリアントを選択する工程、

e. 選択された該バリアントのサブライブラリを得る工程、

f. 任意で、工程（b）～（e）を1～3回繰り返す工程、

g. 該サブライブラリのバリアントを選択する工程であって、該バリアントが、Sac7dタンパク質の出発タンパク質の天然リガンドに対する結合界面において変異している5～20残基を含み、多量体化に関与する該多量体タンパク質の該面に結合して該多量体タンパク質の多量体化を阻害する、工程。

[本発明1018]

固体リガンドへの前記多量体タンパク質のコンジュゲーションが、

a. 該多量体タンパク質にリガンドをグラフト／コンジュゲートさせる工程、
b. グラフト／コンジュゲートさせた該タンパク質を、該リガンドを介して固体表面に固定化する工程、
c. 未結合の多量体タンパク質を除去するために該表面を洗浄する工程、
を含む、本発明1017の方法。
[本発明1019]
医薬としての、本発明1001～1012のいずれかのポリペプチド。
[本発明1020]
関節リウマチ、乾癬性関節炎、強直性脊椎炎、クローン病、潰瘍性大腸炎、慢性乾癬、化膿性汗腺炎、若年性特発性関節炎、ベーチェット病または尋常性乾癬の治療に使用するための、本発明1001～1012のいずれかのポリペプチドであって、TNF-αの単量体に結合するが、三量体化したTNF-αには結合しない、ポリペプチド。
[本発明1021]
化学療法またはCAR-T細胞による治療と組み合わせてがんの治療に使用するための、本発明1001～1012のいずれかのポリペプチドであって、TNF-αの単量体に結合するが、三量体化したTNF-αには結合しない、ポリペプチド。
[本発明1022]
骨喪失、例えば骨粗しょう症（PMO）に罹患した閉経後の患者、またはがん、特に乳癌および前立腺癌の患者における、骨喪失の予防に使用するための、本発明1001～1004および1008～1012のいずれかのポリペプチドであって、RANKLの単量体に結合するが、三量体化したRANKLには結合しない、ポリペプチド。
[本発明1023]
多量体タンパク質の多量体化の阻害に使用するための、本発明1001～1012のいずれかのポリペプチド。
[本発明1024]
サンプル中の多量体タンパク質のサブユニットの存在を検出するまたは該サブユニットを定量する方法であって、
a. 該サンプルを、該サブユニットに結合する本発明1001～1012のいずれかのバリアントに、そのような結合が可能な条件下で暴露する工程、
b. 該バリアントを回収する、および／または該サブユニットを検出するもしくは該サブユニットの量を測定する工程、
を含む、方法。
[本発明1025]
サンプル中の多量体タンパク質のサブユニットを精製する方法であって、
a. 該サンプルを、該サブユニットに結合する本発明1001～1012のいずれかのバリアントに、そのような結合が可能な条件下で暴露する工程、
b. 該サブユニットに結合したバリアントを回収する工程、
c. 該バリアントから該サブユニットを溶出させる工程、
を含む、方法。
【発明を実施するための形態】
【００４５】
発明の詳細な説明
Sac7dタンパク質ファミリー
Sac7dファミリーは、Sac7dタンパク質に関連することにより定義され、好極限性細菌から単離される7kDa DNA結合タンパク質のファミリーに対応する。それは、本明細書で、本発明との関係で好ましく使用されるOBフォールドドメインの代表的な種として開示されている。SH3ドメインはOBフォールドドメインとの相同性を共有しているので、Sac7dに関する教示は、SH3スキャホールドにも適用可能である。
【００４６】
これらのタンパク質およびこのファミリーは、特に、WO2008/068637に記載されて

いる。したがって、本発明との関係で、タンパク質は、配列SEQ ID NO:1～SEQ ID NO:14の1つを有するとき、またはコンセンサス配列である配列SEQ ID NO:15（SEQ ID NO:1～SEQ ID NO:9およびSEQ ID NO:12～SEQ ID NO:14から得られる、このコンセンサス配列において、ダッシュ－はアミノ酸がないことを示し、タンパク質のすべてが同じサイズを有するのではない）に対応する配列を有するとき、Sac7dファミリーに属する。このSac7dファミリーは、特に、スルホロブス・アシドカルダリウス（Sulfolobus acidocaldarius）由来のSac7dまたはSac7eタンパク質、スルホロブス・ソルファタリカス（Sulfolobus solfataricus）由来のSso7dタンパク質、スルホロブス・トコダイイ（Sulfolobus tokodaii）由来のSto7タンパク質とも呼ばれるDBP 7、スルホロブス・シバタエ（Sulfolobus shibatae）由来のSsh7bタンパク質、スルホロブス・シバタエ由来のSsh7aタンパク質、メタロスファエラ・セデュラ（Metallosphaera sedula）由来のMse7、メタロスファエラ・クプリナ（Metallosphaera cuprina）由来のMcu7、アシディアヌス・ホスピタリス（Acidianus hospitalis）由来のAho7aまたはAho7bまたはAho7c、スルホロブス・アイランディカス（Sulfolobus islandicus）由来のSis7aまたはSis7b、およびスルホロブス・ソルファタリカス由来のp7ssタンパク質を含む。Sac7dファミリーのタンパク質の配列の広範囲の類似性に鑑みて、Sac7dの特定のアミノ酸に対応するSac7d以外の別のタンパク質のアミノ酸を同定することが直接的に可能であり、かつ容易である。特に、当業者はまた、そのようなタンパク質が重ね合わせ可能であることを（図面に）示し、（明細書中で）説明しているWO2008/068637の教示を使用することができる。

【００４７】

（野生型タンパク質に対する）バリアント内の変異残基の数は、好ましくは4～25個、またはより具体的には4～22個であることに留意されたい。本発明は、野生型OBフォールドタンパク質（またはドメイン）と比較して好ましくは少なくとも4個、より好ましくは少なくとも5個、より好ましくは少なくとも6個、より好ましくは少なくとも7または8個、さらにより好ましくは少なくとも10個であるが、通常25個未満、より好ましくは22個未満、さらにより好ましくは20個未満または15もしくは14個未満の置換アミノ酸を有するバリアントを用いて実施され得る。すべてかつ任意の範囲（例えば、5～20個または7～25個等）が本発明において考慮されることに留意されたい。特に好ましい範囲は、4～17個ならびに6～17個、4～14個および6～14個である。

【００４８】

野生型OBフォールドドメインに対してOBフォールドドメインの結合部位内で7、8、9、10、11、12、13または14個のアミノ酸が変異される場合が好ましい。これらの変異は、Sac7d（SEQ ID NO:1）のV2、K3、K5、K7、Y8、K9、G10、E11、K13、E14、T17、K21、K22、W24、V26、G27、K28、M29、S31、T33、Y34、D36、N37、G38、K39、T40、R42、A44、S46、E47、K48、D49、A50およびP51に対応するアミノ酸に導入される。

【００４９】

特定の態様において、変異アミノ酸の数は、7～14個（上下限値を含む）である。

【００５０】

1つの特定の態様において、これらのバリアントはまた、上記のようなアミノ酸挿入を含み得る。

【００５１】

示されているように、Sac7dファミリーのタンパク質は、スルホロブス・アシドカルダリウス由来のSac7dまたはSac7e、スルホロブス・ソルファタリカス由来のSso7d、スルホロブス・トコダイイ由来のSto7とも呼ばれるDBP 7、スルホロブス・シバタエ由来のSsh7b、スルホロブス・シバタエ由来のSsh7a、メタロスファエラ・セデュラ由来のMse7、メタロスファエラ・クプリナ由来のMcu7、アシディアヌス・ホスピタリス由来のAho7aまたはAho7bまたはAho7c、スルホロブス・アイランディカス由来のSis7aまたはSis7b、およびスルホロブス・ソルファタリカス由来のp7ssである。Sac7d、Sso7d、Sac7e、Ssh7b、Ssh7a、DBP 7、Sis7a（3つの対立遺伝子）、Mse7、Mcu7、Aho7a、Aho7b

およびAho7cタンパク質は、それぞれ、SEQ ID NO:1～SEQ ID NO:14により表される。

【００５２】

Sac7dファミリーのタンパク質のバリアントは、ナノフィチン（nanofitin）と呼ばれ得る。したがって本発明は好ましくは、SEQ ID NO:1～SEQ ID NO:14により表されるタンパク質のバリアント、または配列SEQ ID NO:15を有するタンパク質、特にSac7dのバリアントにより実施され得る。

【００５３】

好ましい態様において、変異アミノ酸は、V2、K3、K5、K7、Y8、K9、G10、E11、K13、E14、T17、K21、K22、W24、V26、G27、K28、M29、S31、T33、Y34、D35、D36、N37、G38、K39、T40、G41、R42、A44、S46、E47、K48、D49、A50およびP51からなる群より選択される（SEQ ID NO:1および図1のアラインメントに対して参照はがなされている）。バリアントは、これらのアミノ酸の中から選択される変異アミノ酸（好ましくは、上記のように7～12個）を含むべきであり、また他の領域に（すなわち、Sac7dの他の残基の中から選択される）他の変異アミノ酸（好ましくは、0～5個）を含み得ることに留意されたい。上記のように、A59、R60、A61、E62、R63、E64および／またはK66が欠失され得る。

【００５４】

好ましい態様において、変異アミノ酸は、K7、Y8、K9、E11、K21、K22、W24、V26、M29、S31、T33、D35、T40、G41、R42、A44およびS46からなる群より選択される。

【００５５】

本明細書に開示されるバリアントは、WO2008/068637に記載される方法（特にリボソームディスプレイを用いる、コンビナトリアルライブラリの様々なラウンド数の濃縮）により得ることができる。

【００５６】

したがってOBフォールドドメインのバリアントは、好ましくは、そのタンパク質の結合部位に5～20個（好ましくは7～14個）の変異アミノ酸を含む、Sac7dファミリーのタンパク質のバリアント（Sac7dバリアント）である。好ましくは、Sac7dバリアントの変異アミノ酸は、（SEQ ID NO:1および図1のアラインメントを参照して）V2、K3、K5、K7、Y8、K9、G10、E11、K13、E14、T17、K21、K22、W24、V26、G27、K28、M29、S31、T33、Y34、D35、D36、N37、G38、K39、T40、G41、R42、A44、S46、E47、K48、D49、A50およびP51からなる群より選択される。好ましくは、Sac7dバリアントは、K7、Y8、K9、E11、K21、K22、W24、V26、M29、S31、T33、D35、T40、G41、R42、A44およびS46からなる群より選択される4～17個の変異アミノ酸を含む。

【００５７】

WO 2008/068637に記載される方法の利点は、特定の数のアミノ酸が「無作為化された」、すなわち、無作為のアミノ酸で置換された複数のバリアントを含むまたは発現するコンビナトリアルライブラリをスクリーニングすることによってOBフォールドタンパク質のバリアントを得ることが可能である点である。これらのライブラリのスクリーニングは、そのコンビナトリアルライブラリを生成する元となった野生型タンパク質の天然リガンドと異なる関心対象の標的に、通常強い親和性で（出願WO 2008/068637は、実際、1ナノモルオーダーの親和性を記載している）、特異的に結合するこれらのタンパク質のバリアントを同定することを可能にする。以下には、その多量体の形成を妨げるよう多量体タンパク質のサブユニットに結合するバリアントを同定する具体的方法が記載されている。

【００５８】

<u>Sac7dタンパク質の結合部位</u>

OBフォールドタンパク質は、当技術分野において公知である。それらは、特に、上記文献に、およびArcus（Curr Opin Struct Biol. 2002 Dec; 12(6): 794-801）にも記載されている。OBフォールドは、5つのβシートを有する円筒形の形態にある。ほとんどの

OBフォールドタンパク質は、オリゴ糖、オリゴヌクレオチド、タンパク質、金属イオンまたは触媒基質であり得るそれらの天然リガンドの同じ結合界面を使用する。この結合界面は、主としてβシート内に位置する残基を含む。ループ内に位置する特定の残基もまた、OBフォールドタンパク質とその天然リガンドの結合に関与し得る。したがって、出願WO 2007/139397およびWO 2008/068637ならびにArcus文献（2002, 前記）は、それらの天然リガンドへの結合のためのOBフォールドタンパク質ドメインを記載している。

【００５９】

特に、文献WO 2008/068637は、OBフォールドタンパク質の結合ドメインを同定する方法を細かく記載している。ウェブサイトWU-Blast2（http://www.ebi.ac.uk/blast2/index.html）（Lopez et al., 2003, Nucleic Acids Res 31, 3795-3798）、T-COFFEE（http://www.ch.embnet.org/software/TCoffee.html）（Notredame et al., 2000, J Mol Biol 302, 205-217）およびDALI lite（http://www.ebi.ac.uk/DaliLite/）（Holm and Park, 2000, Bioinformatics 16, 566-567）を用いてOBフォールドドメインを有するタンパク質の様々な配列および3D構造を重ね合わせすることにより、その結合ドメイン、特に修飾することができるアミノ酸の位置を同定することが可能である。参照としてSac7dの配列（SEQ ID NO:1）を用いると、これらは、残基V2、K3、K5、K7、Y8、K9、G10、E11、K13、E14、T17、K21、K22、W24、V26、G27、K28、M29、S31、T33、Y34、D35、D36、N37、G38、K39、T40、G41、R42、A44、S46、E47、K48、D49、A50およびP51である。

【００６０】

他のOBフォールドタンパク質の結合ドメインは、WO 2008/068637に記載されるようにして同定され得る。この出願は、DALIウェブサイト（http://www.ebi.ac.uk/dali/interactive.html）（Holm and Sander, 1998, Nucleic Acids Res 26, 316-319）を用いて、OBフォールドタンパク質またはドメイン（この出願では、Sac7dを含む10個のドメインが使用された）の3D構造の重ね合わせを行うことが可能であることを示している。したがって、任意のOBフォールドタンパク質（または任意のOBフォールドドメイン）について、その結合部位に関与し、上記のSac7dアミノ酸に対応するアミノ酸を同定することが容易である。そのため、これらのタンパク質の1つにおいて変異させることができるアミノ酸を提供することは、任意の他のOBフォールドドメインにおいて対応するアミノ酸を同定することを可能にする。

【００６１】

OBフォールドスキャホールドから一部のアミノ酸を欠失させることも可能である。ここでもSac7d配列を参照として用いると、欠失させることができる残基は、A59、R60、A61、E62、R63、E64および／またはK66である。

【００６２】

WO 2008/068637の教示はまた、任意でOBフォールドタンパク質、特にSac7dファミリーのタンパク質のループにアミノ酸が挿入され得ること；特に、1～15個のアミノ酸残基の挿入が（WO 2008/068637の図1bおよび2において定義される）ループ3において、例えばSac7dの残基25～30の領域において、好ましくは残基27～28の間で行われ得ること、1～15アミノ酸残基の挿入が（WO 2008/068637の図1bおよび2において定義される）ループ4において、例えば、Sac7dの残基35～40の領域において、好ましくは残基37～38の間で行われ得ること、および1～20個の残基の挿入が（WO 2008/068637の図1bおよび2において定義される）ループ1において、例えばSac7dの残基7～12の領域において、好ましくは残基9～10の間で行われ得ることを示している。

【００６３】

特にSac7dタンパク質の、OBフォールドの変異体の取得

WO 2007/139397は、その天然リガンドへの該タンパク質の結合のためのこのドメインに変異を導入することによってOBドメインが修飾されたOBフォールドタンパク質のライブラリの使用を記載している。特におよび本明細書で上記されているように、修飾されたOBフォールドドメインは、a）天然に存在するOBフォールドドメインと比較して、OB

フォールドドメイン結合面のβ鎖に少なくとも1つの修飾アミノ酸残基、またはb）OBフォールドドメイン結合面のβ鎖に少なくとも1つの修飾アミノ酸残基およびOBフォールドドメインループ領域の鎖に少なくとも1つの修飾アミノ酸残基、またはc）OBフォールドドメインループ領域の鎖に少なくとも1つの修飾アミノ酸残基を含む。一般に、修飾されたOBフォールドドメインは、天然に存在するOBフォールドドメインと比較して変化した結合特性を示す。

【００６４】

WO2008/068637は、関心対象の標的に対する親和性を有するリガンドを得るためのSac7dタンパク質に基づくライブラリの使用を記載している。WO2008/068637に記載される方法は、この野生型OBフォールドタンパク質の結合部位の特定のアミノ酸において変異を示す、野生型タンパク質のバリアントを生成する特定の無作為変異の存在を除いてすべてが同一の配列を有する、複数のDNA分子を含むコンビナトリアルライブラリの作製を含む。特に、WO2008/068637において、野生型OBフォールドタンパク質は、Sac7dタンパク質であり、その中に多様性を生じさせるために変異が、特にK7、Y8、K9、E11、K21、K22、W24、V26、M29、S31、T33、D35、T40、G41、R42、A44およびS46から選択されるアミノ酸または他のアミノ酸、例えばV26、G27、K28、M29、S31、R42、A44、S46、E47およびK48において導入されている。これらのアミノ酸は、SEQ ID NO:1によって表されるSac7d配列に基づく。

【００６５】

WO 2012/150314は、Sac7dファミリーの1つのタンパク質の変異を同じファミリーの別のタンパク質に移すことができることを示している。この移動性により、Sac7dファミリーの別のタンパク質の変異体を、そのファミリーの1つのタンパク質の変異体から出発して作製することができる。第1の変異体は、特に、WO 2008/068637のプロセスを実施することによって得られたものであり得る。そのため、特にWO 2012/150314の教示および図1を用いて、Sac7dファミリーの任意のタンパク質の変異体を、そのようなファミリーの任意の他のタンパク質の変異体から出発して取得することが可能である。例として、Sac7dの変異体の場合、当業者は、図1の配列アラインメントを用いて、Sac7d変異体の変異アミノ酸を別のタンパク質のスキャホールドに導入することのみを必要とする。

【００６６】

特定の標的（特に、標的がタンパク質またはペプチドである場合）に対してそのような変異体を得ることが可能であることは、すでに示されている。当業者は、免疫グロブリン（Behar et al., Protein Engineering, Design & Selection vol. 26 no. 4 pp. 267-275, 2013）または他のタンパク質（WO WO 2008/068637）に結合するバリアントを参照することができる。Geraら（J Mol Biol. 2011 Jun 17; 409(4):601-16）はまた、Sso7dから出発してそのようなタンパク質を取得する可能性を示した。Gochaら（Scientific Reports 7, Article number: 12021 (2017)）もまた、Sso7d由来の変異体を得る能力を報告した。

【００６７】

<u>OBフォールドまたはSH3ドメインの例</u>

本発明にしたがい使用され得るOBフォールドタンパク質の非限定的な例は、Sac7d、Sso7d、SEBのN末端ドメイン（Papageorgiou et al., 1998）、志賀様毒素IIeのA鎖（PDB 2bosa）、ヒト好中球活性化ペプチド2（NAP-2、PDB 1tvxA）、アゾトバクター・ビネランディイ（Azotobacter vinelandii）のモリブデン結合タンパク質（modg）（PDB 1h9j）、SPE-CのN末端ドメイン（Roussel et al., 1997）、大腸菌（E.coli）志賀様毒素のB5サブユニット（Kitov et al., 2000）、Cdc13（Mitton-Fry et al., 2002）、ヒトYボックスタンパク質YB-1の低温ショックDNA結合ドメイン（Kloks et al., 2002）、大腸菌無機ピロホスファターゼEPPase（Samygina et al., 2001）、または（Arcus, 2002）による文献の表3に列挙される任意のタンパク質、例えば、1krs（リジル-tRNAシンセターゼLysS、大腸菌）、1c0aA（Asp-tRNAシンセターゼ、大腸菌）、1b8aA（Asp-tRNAシンセターゼ、P.コダカラエンシス（P. kodakaraensis））、1lylA（リジル-tR

NAシンセターゼLysU、大腸菌）、1quqA（複製タンパク質A、32kDaサブユニット、ヒト）、1quqB（複製タンパク質A、14kDaサブユニット、ヒト）、1jmcA（複製タンパク質A、70kDaサブユニット（RPA70）フラグメント、ヒト）、1otc（テロメア末端結合タンパク質、O.ノヴァ（O. nova））3ullA（ミトコンドリアssDNA結合タンパク質、ヒト）、1prtF（百日咳毒素S5サブユニット、B.パーツシス（B. pertussis））、1bcpD（百日咳毒素S5サブユニット（ATP結合）、B.パーツシス）、3chbD（コレラ毒素、V.コレラエ（V. cholerae））、1tiiD（熱感受性毒素、大腸菌）、2bosA（ベロ毒素-1/志賀毒素、B-ペンタマー、大腸菌）、1br9（TIMP-2、ヒト）、1an8（スーパー抗原SPE-C、S,ピオゲネス（S. pyogenes））、3seb（スーパー抗原SPE、S.オーレウス（S. aureus））、1aw7A（毒素ショック症候群毒素、S.オーレウス）、1jmc（主要低温ショックタンパク質、大腸菌）、1bkb（翻訳開始因子5a、P.エアロフィラム（P. aerophylum））、1sro（PNPaseのS1 RNA結合ドメイン、大腸菌）、1d7qA（翻訳開始因子1、elF1a、ヒト）、1ah9（翻訳開始因子1、IF1、大腸菌）、1b9mA（Mo依存性転写調節因子ModE、大腸菌）、1ckmA（RNAグアニリルトランスフェラーゼ、コレラウイルス、PBCV-1）、1a0i（ATP依存性DNAリガーゼ、バクテリオファージT7）、1snc（ブドウ球菌ヌクレアーゼ、S.オーレウス）、1hjp（DNAヘリカーゼRuvAサブユニット、N末端ドメイン、大腸菌）、1pfsA（遺伝子Vタンパク質、シュードモナスバクテリオファージpf3）、1gvp（遺伝子Vタンパク質、繊維状バクテリオファージ（f1、M13））、1gpc（遺伝子32タンパク質（gp32）コア、バクテリオファージT4）、1wgjA（無機ピロホスファターゼ、S.セレビシエ（S. cerevisiae））および2prd（無機ピロホスファターゼ、T.サーモフィルス（T. thermophilus））である。

【００６８】

SH3ドメインを有するタンパク質の網羅的でない例は、シグナル伝達アダプタータンパク質、CDC24、Cdc25、PI3キナーゼ、ホスホリパーゼ、Ras GTPase活性化タンパク質、Vavプロトオンコジーン、GRB2、p54 S6キナーゼ2（S6K2）、SH3D21、C10orf76（潜在的に）、STAC3、一部のミオシン、SHANK1、2、3、ARHGAP12、C8orf46、TANGO1、インテグラーゼ、接着斑キナーゼ（FAK、PTK2）、プロリンリッチチロシンキナーゼ（Pyk2、CADTK、PTK2beta）またはTRIP10（cip4）である。

【００６９】

<u>多量体タンパク質</u>

サブユニットは、他のタンパク質分子（他のサブユニット）と集合（assemble）（または「共集合」（coassemble））して多量体または多量体タンパク質と呼ばれるタンパク質複合体を形成する単一のタンパク質分子であることを留意されたい。

【００７０】

好ましい多量体タンパク質の中から、当業者は、TNFスーパーファミリーのタンパク質を参照することができる。腫瘍壊死因子（TNF）スーパーファミリーは、TNF相同ドメインを含み三量体を形成するII型膜貫通タンパク質のタンパク質スーパーファミリーである。

【００７１】

このスーパーファミリーのメンバーは、細胞外タンパク質分解切断によって細胞膜から放出され、サイトカイン（例えば、炎症に関与するTNF-α）として機能し得る。

【００７２】

これらのタンパク質は、主に免疫細胞によって発現され、免疫反応および炎症の調節だけでなく、増殖、分化、アポトーシスおよび胚発生を含む様々な細胞機能を調節する。

【００７３】

このスーパーファミリーは、19のメンバー（リンホトキシンα、腫瘍壊死因子、リンホトキシンβ、OX40リガンド、CD40リガンド、Fasリガンド、CD27リガンド、CD30リガンド、CD137リガンド、TNF関連アポトーシス誘導リガンド、核因子カッパBリガンド受容体活性化因子（RANKL）、TNF関連アポトーシス弱誘導因子、増殖誘導リガンド、B細胞活性化因子、LIGHT、血管内皮成長阻害因子、TNFスーパーファミリーメンバー18およびエクトジスプラシンA）を含む。

【００７４】
これらのタンパク質は、29のメンバーを含むTNF受容体スーパーファミリーのメンバーである受容体に結合する。
【００７５】
TNFスーパーファミリーのタンパク質の中で、特に言及がなされるものは、
- 腫瘍壊死因子受容体1（1A）、腫瘍壊死因子受容体2（1B）またはリンホトキシンβ受容体に結合する、TNF-α
- RANK、オステオプロテゲリンまたはTWEAK受容体に結合する、RANKL
- TNFRSF10Bと相互作用する、TRAIL（TNFSF10）
である。
【００７６】
腫瘍壊死因子（TNF、腫瘍壊死因子α、TNFα、カケキシンまたはカケクチン）は、全身性炎症に関与する細胞シグナルタンパク質（サイトカイン）であり、急性期反応を構成するサイトカインの1つである。それは主として活性化されたマクロファージによって産生されるが、多くの他の細胞型、例えばCD4+リンパ球、NK細胞、好中球、肥満細胞、好酸球および神経細胞によっても産生され得る。TNF産生の調節不調は、アルツハイマー病［6］、がん［7］、大鬱［8］、乾癬［9］および炎症性腸疾患（IBD）を含む様々なヒト疾患に関連付けられている。
【００７７】
TNFに対するいくつかの抗体が、様々な疾患を治療するために開発されている。
- アダリムマブは、関節リウマチ、乾癬性関節炎、強直性脊椎炎、クローン病、潰瘍性大腸炎、慢性乾癬、化膿性汗腺炎および若年性特発性関節炎を治療するために使用される。
- セルトリズマブペゴル（CDP870）は、クローン病、関節リウマチ、乾癬性関節炎および強直性脊椎炎の治療に使用される。
- インフリキシマブは、クローン病、潰瘍性大腸炎、乾癬、乾癬性関節炎、強直性脊椎炎および関節リウマチの治療に使用される。それはまた、ベーチェット病および他の状態にも使用される。インフリキシマブは、消化系が該薬物を分解するために、静脈内注入により投与され、経口的に投与することができないことに留意されたい。
- ゴリムマブは、関節リウマチ、乾癬性関節炎、強直性脊椎炎および潰瘍性大腸炎の治療に使用され、皮下注射または静脈内注射により使用される。
- エタネルセプトは、関節リウマチ、若年性関節リウマチおよび乾癬性関節炎、尋常性乾癬および強直性脊椎炎を治療するために使用される。
【００７８】
TNFは、特に、ケモカインを含む、IL-1、IL-6、GM-CSFおよびIL-10を含む、他のサイトカインの放出を促進することによって、接着分子を増加させることによって、血管の成長を許容することによって、および組織破壊性の酵素を放出させることによって、作用する。それはまた、T細胞を活性化させる。
【００７９】
TNFはまた、がんにおいても、その腫瘍付近で炎症性微小環境を促進し、それによって治療（化学療法、CAR-T細胞・・・）の効果を制限することによって、役割を果たし得る。
【００８０】
そのため、機能的なTNF三量体の形成を阻害する能力を有する（特に、Sac7dファミリー由来の）OBフォールドタンパク質のバリアントは、上記抗体と同じ用途で、および同じ疾患を治療するために使用され得る。さらに、そのようなバリアントは、患者に対して経口的または局所的に投与（皮膚に適用）され得、これらは抗体においては利用可能でない投与様式であるので、それらを使用することが有利である。
【００８１】
別の利点は、その膜結合形態よりも可溶性のTNFαの活性を選択的に中和する能力による、強化された長期的安全性プロフィールである。膜結合TNFのブロックは、実際、（i）

そのブロッキング因子に対する免疫応答（Deora et al., MABS. 2017; 9(4):680-695）および（ii）望ましくない副作用、例えば多発性硬化症を誘導するおそれがある。

【００８２】

核因子カッパBリガンド受容体活性化因子（RANKL）は、受容体RANKに対するリガンドであるオステオプロテゲリン（OPG）の結合パートナーである、アポトーシス調節遺伝子であり、Id4、Id2およびサイクリンD1のタンパク質レベルを調整することによって細胞増殖を制御する。それは、乳癌または前立腺癌の骨転移の形成に関与すると考えられている。RANKLの過剰産生はまた、様々な変性性骨疾患、例えば、関節リウマチおよび乾癬性関節炎に関連付けられている。デノスマブは、骨粗しょう症（PMO）に罹患した閉経後の患者を治療するために使用され、かつ乳癌および前立腺癌におけるがん治療により誘導される骨喪失を減少させるためにも使用されるRANKLに対する抗体である。それはまた、骨合併症の進展を防ぐために多発性骨髄腫においても使用され得る。

【００８３】

そのため、機能的なRANKL三量体の形成を阻害する能力を有する（特に、Sac7dファミリー由来の）OBフォールドタンパク質のバリアントは、同じ用途で、および同じ疾患または合併症を治療または予防するために使用され得る。

【００８４】

TNF関連アポトーシス誘導リガンド（TRAIL）は、アポトーシスと呼ばれる細胞死のプロセスを誘導するリガンドとして機能するタンパク質である。TRAILおよびその受容体は、様々な抗がん療法の標的として使用されている。TRAILはまた、様々な肺疾患、特に肺動脈高血圧における病原または保護因子であることが示されている。最近、TNFSF10の中和がアルツハイマー病のマウスモデルにおける機能的帰結を改善することが示された（Cantarella et al., Brain. 2015 Jan; 138(1): 203-216）。そのため、機能的なTRAIL三量体の形成を阻害する能力を有する（特に、Sac7dファミリー由来の）OBフォールドタンパク質のバリアントは、アルツハイマー病の治療のために、該疾患を治療するためまたはそのさらなる進行を予防するために使用され得る。

【００８５】

<u>Sac7dバリアントをスクリーニングする方法</u>

本発明はまた、多量体タンパク質の単量体に結合するタンパク質を取得する方法であって、

a. Sac7ファミリーのタンパク質のバリアントのコンビナトリアルライブラリを提供する工程であって、その天然リガンドに対するOBフォールドタンパク質の結合界面の5～22残基が無作為化されており、該OBフォールドタンパク質が、スルホロブス・アシドカルダリウス由来のSac7dもしくはSac7e、またはスルホロブス・ソルファタリカス由来のSso7d、またはスルホロブス・トコダイイ由来のDBP 7、またはスルホロブス・シバタエ由来のSsh7b、またはスルホロブス・シバタエ由来のSsh7a、またはスルホロブス・ソルファタリカス由来のp7ssであり、該バリアントにおいて無作為化されている残基が、Sac7dのV2、K3、K5、K7、Y8、K9、G10、E14、T17、K21、K22、W24、V26、G27、K28、M29、S31、T33、D35、D36、N37、G38、K39、T40、G41、R42、A44、S46、E47、K48、D49、A50およびP51に対応する残基の中から選択される、工程、

b. （特に、リボソーム、酵母ディスプレイによって）該バリアントを発現させる工程、

c. 多量体化が抑止されるよう固体支持体にコンジュゲートしている多量体タンパク質に該バリアントを提示する工程であって、多量体タンパク質の多量体化に関与する面が提示され、結合に利用される工程、

d. 該面に結合するバリアントを選択する工程、

e. 選択されたバリアントのサブライブラリを得る工程、

f. 任意で、工程（b）～（e）を１～3回繰り返す工程、

g. サブライブラリのバリアントを選択する工程であって、該バリアントが、Sac7dタンパク質の出発タンパク質の天然リガンドに対する結合界面において変異している5～25残基を含み、多量体化に関与する該多量体タンパク質の該面に結合して該多量体タンパク質

の多量体化を阻害する、工程、
を含む方法を提供する。
【００８６】
したがって、この方法は、バリアントのライブラリから、そのサブユニットに結合し生物学的に機能的な多量体の形成を阻害するまたは遅らせるバリアントを同定することを可能にする。
【００８７】
バリアントは、多量体（ホモ多量体であろうがヘテロ多量体であろうが）タンパク質の多量体化を阻害する。実際には、タンパク質・タンパク質結合は動的プロセスであり、2つのポリペプチドはある時点では結合し別の時点では分離しているものであることを留意されたい。安定な多量体を得る上での主要な課題は、2つのタンパク質の（一方から他方に対する）親和性であり、これは特に、これらのタンパク質の結合の期間を制御するであろう。本願において、遊離の単量体と多量体タンパク質に結合した単量体の間の平衡をシフトさせる場合、そのバリアントは、多量体の形成を阻害すると言われる。これは、未結合の単量体形態に対する、そのバリアントと他の単量体の間の競合によって行われる。遊離の未結合単量体がバリアントに結合すると、形成される多量体が減少し、したがって平衡がシフトする。本明細書に開示されるバリアントの作用は、したがって、他の天然パートナーへの結合が妨げられ、それによって機能的な多量体タンパク質の形成が制限されるよう、エピトープにおいてそのような単量体に結合する、多量体タンパク質の未結合の遊離単量体部分に対する競合パートナーであると理解される。
【００８８】
工程a）は、OBフォールドまたはSH3タンパク質のバリアント、特にSac7dファミリーのタンパク質のバリアントのライブラリを提供することからなる。ライブラリ内のこれらのバリアントは、結合部位に位置する特定数のアミノ酸において無作為に変異される。先行技術（特に、WO2007139397およびWO 2008/068637）は、どのようにすればこれらのタンパク質の結合部位を決定することができるかを詳細に説明している。特に、当業者は、Sac7dスキャホールドに OBフォールドまたはSH3スキャホールドを重ね合わせ、上で示されたものに対応するアミノ酸を使用することができる。
【００８９】
工程b）は、バリアントの発現からなる。そのような発現は、当技術分野における任意の方法、例えば、細菌、酵母またはリボソームディスプレイによって行われる。リボソームディスプレイが特に適している。2つの特許出願文献は、この工程を実施するのに必要なすべての手引きを提供する。
【００９０】
工程c）において、発現されたバリアントは、固体支持体にコンジュゲートしている多量体タンパク質のサブユニットに提示される。そのようなコンジュゲーションは、多量体タンパク質の多量体化（多量体内のタンパク質・タンパク質結合）に関与するサブユニットの面が提示され、したがってバリアントによる結合に利用可能となる（すなわち、そのタンパク質が多量体形態にない）ように、タンパク質の多量体化が抑止される条件で行われている。
【００９１】
工程d）およびe）にしたがい、工程c）で提示されたタンパク質に結合するバリアントが選択され、それによって選択されたバリアントを含むサブライブラリが提供される。そのような選択工程は、当技術分野で公知であり、ライブラリ内のバインダーを同定するプロセスにおいて古典的である。
【００９２】
工程b）～e）は、特に、（とりわけ、改善された親和性を有するバインダーを得るために）結合のストリンジェンシーを増加させることによって、サブライブラリの集中性（すなわち、一連のサブライブラリにおけるバリアントの数の制限）を向上させるよう、通常1～3回、繰り返され得る。これにより、最終的に、バインダーの質が向上し、そして最終

的に、非常に特異的かつ親和的なバインダーを選択することが可能になる（工程g）。
【００９３】
タンパク質の多量体化に関与する面に結合するバリアントを得るという目的を達成するために、工程c、すなわち、そのような面がライブラリのバリアントに提示されることを確実にすること、が重要である。
【００９４】
これは、以下の工程：
a. 多量体タンパク質にリガンドをグラフト／コンジュゲートさせる工程、
b. グラフト／コンジュゲートさせたタンパク質を、該リガンドを介して固体表面に固定化する工程、
c. 未結合の多量体タンパク質を除去するために表面を洗浄する工程、
にしたがって多量体タンパク質を固体リガンドにコンジュゲートさせることによって達成され得る。
【００９５】
そのようなaにおいてグラフトされるリガンドは、タンパク質のコンジュゲーションのために容易に使用され得るビオチンであり得る。リガンドがタンパク質の多量体形態にコンジュゲートされるという事実は、それが多量体の多量体化および安定化に関与するサブユニットの面に結合されないことを確実にすることができる。
【００９６】
グラフト／コンジュゲートされたタンパク質の固体表面（特に、ビーズ）への固定化は、リガンドを介して行われる。（特に、固体表面においてストレプトアビジンまたはニュートラアビジンを用いる）ビオチン／アビジン結合が、そのような工程bに特に適している。
【００９７】
最後に、未結合の多量体タンパク質を除去するためおよびタンパク質を「脱多量体化」するため、すなわち、多量体に関与しているが表面に結合していないサブユニットを除去するために、固体表面が洗浄される。これにより、表面上に、リガンドを介して結合した「孤独な」サブユニットのみが残留するであろう。そのようなサブユニットは、ライブラリのバリアントの標的として、多量体化に関与する面を「提示する」。
【００９８】
多量体タンパク質の多量体化に関与する面は、多量体の結晶化により決定され得ることをに留意されたい。あるいは、または補足的に、部位特異的変異誘発、その後の架橋実験（例えば、SDS-PAGEまたはサイズ排除）が、多量体のタンパク質・タンパク質相互作用および形成に関与するアミノ酸の決定を可能にする。
【００９９】
上記の方法を用いる場合、多量体は、最初に、固体表面に結合され得る。異なる洗浄を行うことにより、最終的に、多量体に関与しており固体表面に結合してないサブユニットが放出され、それによって、多量体におけるタンパク質・タンパク質相互作用に関与する面が提示される。
【０１００】
多量体化が阻害されることを確認するため、当業者は、当技術分野で公知の方法を使用することができ：単離されたバリアントおよび単量体の共インキュベーションの後、当業者は、サイズ排除またはSDS-PAGEによって阻害が阻害されたことを確認することができる。これらの方法は、当技術分野において公知である。
【０１０１】
さらに、多量体タンパク質に関与する任意の単量体に対するバリアントを得ることが可能であると考えられる。実際、多量体においてタンパク質・タンパク質相互作用に関与する面は、タンパク質・タンパク質相互作用に関して一定のトロピズム（tropism）を示すよう進化するものであり、したがってOBフォールドドメインのバリアントとの相互作用を生じ得るであろう。したがって、この面が、ディスプレイに提示されるバリアントに結合

するという競争力のある優位性があると考えられる。
【０１０２】
同定されたバリアントの生成
同定されたバリアントの配列は、当技術分野で公知の任意の分子遺伝子法により任意の適切なベクターにおいてクローン化され得る。
【０１０３】
上記のバリアントを含むポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含むこれらの組み換えDNA構築物は、ベクター、例えばプラスミド、ファージミド、ファージまたはウイルスベクターと組み合わせて使用される。
【０１０４】
これらの組み換え酸分子は、Sambrook et al., 1989（Sambrook J, Fritschi EF and Maniatis T (1989) Molecular cloning: a laboratorymanual, Cold Spring Harbor Press, New York）に記載される技術により生成され得る。あるいは、DNA配列は、例えば合成装置を用いて、化学的に合成され得る。
【０１０５】
本発明の組み換え構築物は、RNAを発現することができ、したがって上記遺伝子配列からタンパク質を生成することができる発現ベクターを含む。ベクターは、したがって、本明細書に開示される遺伝子配列のオープンリーディングフレーム（ORF）に機能的に連結された適切なプロモーターを含む調節配列をさらに含み得る。ベクターはさらに、選択マーカー配列、例えば抗生物質耐性遺伝子を含み得る。細菌が発現宿主として使用される場合、コード配列の効率的な翻訳のために、特定の開始および細菌分泌シグナルも必要とされ得る。
【０１０６】
分子の生成
細胞は、上記バリアントを含むポリペプチドをコードする配列を含むベクターでトランスフェクトまたは形質転換される。
【０１０７】
細胞は、タンパク質が発現され好ましくは分泌される条件で培養される。細胞の培養条件は、組み換え抗体の産生において一般的に使用されており当技術分野で公知となっている条件である。そのような当技術分野で公知の条件はまた、必要に応じて当業者により最適化され得る。KunertおよびReinhart（Appl Microbiol Biotechnol. 2016; 100: 3451-3461）は、そのような方法をまとめており、それに関する十分な参考資料を提供する。
【０１０８】
当業者は、細菌、ファージ（Shukra et al., Eur J Microbiol Immunol (Bp). 2014; 4(2): 91-98）または真核生物の生産システムを使用することができる。
【０１０９】
当業者は、適当な翻訳後修飾、例えばグリコシル化を得るために、真核生物細胞を使用することを好む場合がある。
【０１１０】
特に、当業者は、CHO（チャイニーズハムスター卵巣）細胞、PER.C6細胞（ヒト細胞株、Pau et al., Vaccine. 2001 21;19(17-19):2716-21）、HEK293b細胞（ヒト胚性腎臓細胞293）、NS0細胞（非分泌性マウス骨髄腫由来細胞株）またはEB66細胞（アヒル細胞株Valneva, Lyons, France）を使用することができる。
【０１１１】
上記バリアントを含むポリペプチドをコードするDNA構築物の少なくとも1つを含む宿主細胞もまた、本開示により提供される。宿主細胞は、発現ベクターが利用可能な任意の細胞であり得る。上記のように、それは、高等真核生物宿主細胞、例えば哺乳類細胞、下等真核生物宿主細胞、例えば酵母細胞、または原核生物細胞、例えば細菌細胞であり得る。
【０１１２】

宿主細胞への組み換え構築物の導入は、当技術分野で公知の任意の方法（例えば、リン酸カルシウムトランスフェクション、リポフェクション、DEAE、デキストラン媒介トランスフェクション、エレクトロポレーションまたはファージ感染）によって行われる。ベクターは、宿主細胞のゲノム内に挿入され得る、またはゲノム外ベクター（例えば、細菌人工染色体もしくは酵母人工染色体）として維持され得る。細胞のゲノム内に導入される場合、そのような導入は、当技術分野で公知の方法（相同組み換え等）を用いて無作為化またはターゲティングされ得る。

【０１１３】

細菌宿主および発現

細菌における利用に関して有用な発現ベクターは、機能的プロモーターを有する機能性リーディングフェーズに組み換えDNA配列を適切な翻訳開始および終結シグナルと共に挿入することによって構築される。ベクターは、ベクターの管理を確実にするために、および望ましい場合、宿主内での増幅を提供するために、1つまたは複数の表現型選択マーカーおよび複製起点を含み得る。

【０１１４】

形質転換に適した原核生物宿主は、大腸菌、バチルス・サブチリス（Bacillus subtilis）、サルモネラ・ティフィムリウム（Salmonella typhimurium）およびシュードモナス、ストレプトマイセスおよびスタフィロコッカス属の様々な種を含む。

【０１１５】

真核生物宿主および発現

真核生物宿主細胞の例は、脊椎動物細胞、昆虫細胞および酵母細胞を含む。特に、当業者は、上記の細胞を使用することができる。

【０１１６】

形質転換またはトランスフェクトされた細胞は、当技術分野で公知の方法にしたがい培養され、ポリペプチドは、（それが分泌されるかどうかに依存して）細胞内または細胞外画分から回収される。

【０１１７】

分子の単離

生成された組み換え多特異性タンパク質は、細胞内または細胞外画分から、そのタンパク質の物理的または化学的特性を用いる任意の様々な公知の分離方法により分離および精製され得る。

【０１１８】

特に、当業者は、沈降、限外ろ過、様々なタイプの液体クロマトグラフィー、例えば分子ふるいクロマトグラフィー（ゲルろ過）、吸着クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィーおよび親和性クロマトグラフィー、透析およびそれらの組み合わせ等の方法を使用することができる。

【０１１９】

一般に、公知であり組み換えポリペプチドを精製するために使用される任意の方法が、本明細書に開示される分子の精製に適する。

【０１２０】

組み換え配列内にタグ（例えば、ポリヒスチジンタグ）が導入される場合、当業者は、このタグを使用して分子を精製することができる。しかし、分子を精製するために親和性を使用することが好ましい。

【０１２１】

特に、本明細書で生成される分子が特定の標的に結合するという事実を使用することができ、かつそのような分子を単離するために任意の親和性方法（親和性カラム、FACS、ビーズ）を使用することができる。

【０１２２】

本明細書に開示される分子の1つの特定の利点は、それらが活性であるためにグリコシル化されることを必要とせず、したがって任意のタイプの細胞において産生され得、真核

生物細胞である必要がないことである。それらは特に、細菌細胞においても十分に産生される。

【０１２３】

バリアントの修飾

特に上記の方法によって単離される、標的の多量体形態の形成を変化させる能力を有するバリアントは、当技術分野で公知の任意の方法により修飾され得る。

【０１２４】

バリアントを含むポリペプチドの調製

一方は本明細書に開示されるバリアント、他方は関心対象のタンパク質またはペプチドの2つのコード配列を含むDNA配列を調製することが可能である。得られる発現されたタンパク質は、したがって、両方のタンパク質を含むポリペプチドであろう。ベクターは、発現されるポリペプチドにおいて2つのタンパク質の間に位置するリンカーをコードする配列を含むように構築され得る。

【０１２５】

そのため、本発明はまた、（好ましくは上記のようにアミン結合を通じて）別のタンパク質またはポリペプチドに連結される、多量体タンパク質のサブユニットに結合する（好ましくはSac7dファミリーの）OBフォールドタンパク質のタンパク質のバリアントを含むポリペプチドを包含する。

【０１２６】

特定の態様において、他のタンパク質またはポリペプチドは、Sac7dファミリーのタンパク質の別のバリアントを含む。

【０１２７】

別の態様において、他のタンパク質またはポリペプチドは、抗体である。この態様において、OBフォールドドメインのバリアントは、免疫グロブリン単量体の重鎖または軽鎖の少なくとも1つに、好ましくはその軽鎖または重鎖のN末端またはC末端において融合される。別の態様において、バリアントは、重鎖または軽鎖の両方に融合され得る。

【０１２８】

そのような化合物を得るために、当業者は、

a. その3’末端で、（場合によりリンカーをコードする配列と共に）OBフォールドタンパク質のバリアントをコードする配列に融合された抗体の重鎖をコードする配列、

b. その5’末端で、（場合によりリンカーをコードする配列と共に）OBフォールドタンパク質のバリアントをコードする配列に融合された抗体の重鎖をコードする配列、

c. その3’末端で、（場合によりリンカーをコードする配列と共に）OBフォールドタンパク質のバリアントをコードする配列に融合された抗体の軽鎖をコードする配列、

d. その5’末端で、（場合によりリンカーをコードする配列と共に）OBフォールドタンパク質のバリアントをコードする配列に融合された抗体の軽鎖をコードする配列、

からなる群より選択されるDNA配列を含む遺伝子構築物を使用することができる。

【０１２９】

この融合は、抗体鎖（重鎖および／または軽鎖）のN末端および／またはC末端で行われ得る。特に小さなOBフォールドドメイン（約70アミノ酸）、例えばSac7dファミリー由来のタンパク質を使用する場合、抗体領域および修飾されたOBフォールドドメインからなるさらなる結合領域を有する抗体の構造（2つの重鎖と対になった2つの軽鎖、および対になってひとつになったそのような二量体）を有する分子を得ることが可能であることに注目されたい。

【０１３０】

特定の態様において、本明細書に開示されるタンパク質の抗体部分は、IgG分子である。

【０１３１】

別の態様において、本明細書に開示されるタンパク質の抗体部分は、IgA分子である。

【０１３２】

別の態様において、本明細書に開示されるタンパク質の抗体部分は、IgM分子である。

【０１３３】
別の態様において、本明細書に開示されるタンパク質の抗体部分は、IgD分子である。
【０１３４】
別の態様において、本明細書に開示されるタンパク質の抗体部分は、IgE
分子である。
【０１３５】
抗体は、ヒト抗体、げっ歯類抗体（例えば、マウス抗体またはラット抗体）、ネコ抗体、イヌ抗体、ニワトリ抗体、ヤギ抗体、ラクダ類抗体（例えば、ラクダ抗体、ラマ抗体、アルパカ抗体もしくはナノボディ）、サメ抗体または任意の他の種由来の抗体であり得る。それは、キメラまたはヒト化抗体であり得る。Wikipediaに記載されるように、ヒト化抗体は、自然界でヒトにおいて産生される抗体バリアントに対するそれらの類似性を増大させるようそのタンパク質配列が修飾された非ヒト種由来の抗体である。キメラ抗体は、異なる種由来の配列を含む。
【０１３６】
本明細書に開示される分子の一部である抗体が（約400～500アミノ酸、通常およそ450アミノ酸の）2つの同一の重鎖および2つの同一の軽鎖を含む抗体である場合が好ましい。そのため、抗体は、同一のFab可変領域を含む。この抗体は、したがって、抗体の両方の部分（軽鎖および重鎖の組み合わせ）が抗原の同じエピトープに結合する単特異性抗体である。
【０１３７】
しかし、抗体は、異なる重鎖および／または軽鎖を示し得る。特に、いくつかの態様において、抗体は、二特異性抗体である。「抗体」という用語は、したがって、上記のような同一の重鎖および軽鎖を有する「古典的抗体」だけでなく、2つ以上の特異性を有する改変抗体も包含する。
【０１３８】
特定の態様において、抗体は、1つの抗体由来の1つの重鎖および軽鎖ならびに別の抗体由来の別の重鎖および軽鎖を示す。
【０１３９】
抗体は：
細胞表面受容体：インスリン受容体、低密度リポタンパク質受容体関連タンパク質1、トランスフェリン受容体、上皮成長因子受容体、上皮成長因子受容体バリアントIII、血管内皮成長因子受容体1、血管内皮成長因子受容体2、Her2、Her3、Her4、PMSA、IGF-1R、GITR、RAGE、CD28、
細胞表面タンパク質：メソテリン、EpCam、CD19、CD20、CD38、CD3、TIM-3、CEA、cMet、ICAM1、ICAM3、MadCam、a4b7、CD7、CD4、CD138、
血管新生因子および成長因子：VEGF、アンジオポエチン2、HGF、PDGF、EGF、GM-CSF、HB-EGF、TGF、
免疫チェックポイント阻害因子または活性化因子：PD-1、PD-L1、CTLA4、CD28、B7-1、B7-2、ICOS、ICOSL、B7-H3、B7-H4、LAG3、KIR、4-1BB、OX40、CD27、CD40L、TIM3、A2aR、
循環タンパク質：TNFa、IL23、IL12、IL33、IL4、IL13、IL5、IL6、IL4、IFNg、IL17、RANKL、Bace1、αシヌクレイン、Tau、アミロイド、
からなる群より選択される標的に結合し得る。
【０１４０】
特に、抗体がIL17または特にがんに関与する細胞表面受容体を標的とする場合が想定される。
【０１４１】
したがって、
- TNF-αに結合する上記バリアントおよびIL17に結合する抗体（例えば、参照抗体セクキヌマブ）を含むポリペプチド、

- TNF-αに結合する上記バリアントおよびHer2/neuに結合する抗体（Her2/neuに結合する参照抗体はトラスツズマブおよびペルツズマブである）を含むポリペプチド、
- RANKLに結合する上記バリアントおよびTNF-αに結合する抗体（TNF-αに結合する参照抗体はインフリキシマブ、アダリムマブ、セルトリズマブペゴル、オゾラリズマブおよびゴリムマブである）を含むポリペプチド、
が特に想定される。

【０１４２】

あるいは、ポリペプチドは、上記バリアントおよび生物学的に活性な分子、例えば、エリスロポエチン、インターフェロンまたはエタネルセプトを含み得る。

【０１４３】

別の態様において、OBフォールドドメインのバリアント（特に、Sac7dファミリーのタンパク質のバリアント）は、有機分子にコンジュゲートされる。これは、当技術分野で公知の任意の方法により行われ得る。特に、当業者は、タンパク質に分子を化学的に連結することができる。分子として、当業者は、細胞傷害性化合物（例えば、広域）、血管新生阻害剤、細胞周期進行阻害剤、PBK/m-TOR/AKT経路阻害剤、MAPKシグナル伝達経路阻害剤、キナーゼ阻害剤、タンパク質シャペロン阻害剤、HDAC阻害剤、PARP阻害剤、Wnt/Hedgehogシグナル伝達経路阻害剤、RNAポリメラーゼ阻害剤およびプロテアソーム阻害剤を含む抗増殖剤（細胞傷害性および細胞増殖抑制剤）を参照することができる。当業者はまた、抗炎症分子を使用することができる。

【０１４４】

特に、DNA結合またはアルキル化薬、例えば、アントラサイクリン（ドキソルビシン、エピルビシン、イダルビシン、ダウノルビシン）およびそのアナログ、アルキル化剤、例えば、カリケアマイシン、ダクチノマイシン、ミトロマイシン、ピロロベンゾジアゼピン等を参照することができる。当業者はまた、細胞周期進行阻害剤、例えば、CDK阻害剤、Rho-キナーゼ阻害剤、チェックポイントキナーゼ阻害剤、オーロラキナーゼ阻害剤、PLK阻害剤およびKSP阻害剤を参照することができる。当業者はまた、サリドマイドならびにその誘導体レナリドマイドおよびポマリドマイドを参照することができる。炎症障害を治療するために、当業者はまた、バリアントを含むポリペプチドにコンジュゲートさせる分子として、シクロオキシゲナーゼ-2阻害剤、5-リポキシゲナーゼ阻害剤、ケルセチンおよび／またはレスベラトロールを使用することができる。

【０１４５】

<u>バリアントの使用</u>

バリアントは、特に治療法において使用され得る。

【０１４６】

特に、TNFαを標的とするバリアントは、タンパク質の単量体または二量体形態を標的とし、特に、炎症疾患（例えば、過敏性腸疾患（IBD）、関節リウマチ（RA）、乾癬等）の治療のためにまたは上記疾患の治療のために使用され得る。

【０１４７】

RANKLを標的とするバリアントは、その単量体または二量体形態を標的とし、特に炎症疾患（例えば、上記疾患）もしくは骨疾患（例えば、骨粗しょう症）の治療のため、または上記疾患の治療のために使用され得る。

【０１４８】

TRAILタンパク質を標的とするバリアントは、その単量体または二量体形態を標的とし、アルツハイマー病の治療のためまたは上記疾患の治療のために使用され得る。

【０１４９】

したがって本発明は、それを必要とする患者への治療量のOBフォールドのバリアント（特に、Sac7dファミリーのタンパク質のバリアント）の投与を含む、上記疾患の治療方法に関する。

【０１５０】

「治療量」または「有効量」という用語は、本明細書で使用される場合、有益または望

ましい結果、例えば臨床的結果をもたらすのに十分な量であり、「有効量」は、それが適用される状況に依存する。有効量は、副作用または有害作用を最小限に抑えつつ治療的改善を提供する量である。

【０１５１】

当業者は、当技術分野の任意の方法によってバリアントを投与することができる。

【０１５２】

特に、当業者は、バリアントを注射することができる。別の態様において、当業者は、WO 2014/173899に開示されるようにバリアントを局所的に（患者の皮膚に対してまたは眼に対してのいずれかで）適用することができる。別の態様において、当業者は、WO 2016/062874に開示されるようにバリアントを経口的に投与することができる。

【０１５３】

バリアントまたはバリアントを含むポリペプチドはまた、診断法において使用され得る。

【０１５４】

したがって本発明は、サンプル中の多量体タンパク質のサブユニットの存在を検出するまたはサブユニットを定量する方法であって、

a. 該サンプルを、該サブユニットに結合するが、完全に形成された多量体タンパク質には結合しない開示されるバリアントに、そのような結合が可能な条件下で暴露する工程、

b. 該バリアントを回収する、および／または該サブユニットを検出する、該サブユニットの量を測定する、もしくは該サブユニットを定量［ELISA、蛍光、カラム］する工程、

を含む方法に関する。

【０１５５】

b）の回収は、様々な洗浄または当技術分野で一般的な方法によって行われ得る。検出または定量は、任意の方法、例えば、ELISAまたは当技術分野の他の方法によって行われ得る。

【０１５６】

本発明はまた、サンプル中の多量体タンパク質のサブユニットを精製する方法であって、

a. 該サンプルを、該サブユニットに結合するが、完全に形成された多量体タンパク質には結合しない開示されるバリアントに、そのような結合が可能な条件下で暴露する工程、

b. 該サブユニットに結合したバリアントを回収する工程、

c. 該バリアントから該サブユニットを溶出させる工程、

を含む方法を包含する。

【０１５７】

工程cは、特に、緩衝液の組成（塩濃度、界面活性剤、カオトロピック剤の増加／減少）またはpH（増加／減少）を変化させることによって行われ得る。

【０１５８】

これらの方法において、（例えば、この別のタンパク質に対する親和性を有するカラムにおいて）サブユニットに結合したバリアントを回収するために使用することができる別のタンパク質に融合されたバリアントを含むポリペプチドを使用することが望まれ得る。

【図面の簡単な説明】

【０１５９】

【図１】Sac7dファミリーのタンパク質のアラインメント。

【図２】TNF受容体I（TNFRI）、TNF受容体II（TNFRII）、アダリムマブ（ADA)およびインフリキシマブ（IFX）の存在下での、TNF-α（TNFa）に対するN11の結合曲線の表示。

【図３】ヒトTNFa（hTNFa）、マウスTNFa（mTNFa）の存在下または標的なしの下でのN11の結合を示すOD450nm。

【図４】ヒトTNFaの存在下でのN11のバリアントの結合を示すOD450nm。

【図５】TNFa変異体の概略図。E146AおよびY115AはADAエピトープの一部である。

【図６】ヒトTNFaの変異体（Y151A、Y115A、E146AおよびR32A）の存在下でのN11の結合を示すOD450nm。

【図７】TNFaの野生型（TNF WT）と比較するTNFαのY151A変異体の機能性の分析。
【図８】N11とTNFaの二量体または単量体の複合体の存在を示すSDS-PAGE（矢印）。
【図９】TNFaの単量体、二量体および三量体形態の間の遷移、ならびに作製された変異体のタイプの概略図。S95C/G148C変異体は、その三量体形態で固定され、Y119AおよびY119R変異体は、自己集合するそれらの能力が損なわれている。
【図１０】野生型（WT）および変異型TNFaについてのTNFaの種の数（単量体、二量体、三量体）の図示。
【図１１】L929アッセイにおけるWTおよび変異型TNFaの生物学的機能性
【図１２】Y119変異体、野生型（WT）もしくは標的なし（A)または他のTNFa変異体、野生型（WT）もしくは標的なし（B）に対するN11の結合を示すOD450nm。
【図１３】様々な分子：N11、TNFaに結合するSac7dのN9バリアント、N9mut42A（TNFに対する結合を抑止する変異を有するN9バリアント）およびSac7dの無関係のバリアント（Irr NF）と共インキュベートされたTNFaの投与から6時間後のマウスにおけるIL6の血液測定。
【実施例】
【０１６０】
実施例1．TNFまたはRANKリガンドに対するNFの生成
Sac7dの配列（SEQ ID NO: 1）の17の位置に無作為変異を含むライブラリを用いてスクリーニングを行った。
【０１６１】
変異位置は、K7、Y8、K9、E11、K21、K22、W24、V26、M29、S31、T33、D35、T40、G41、R42、A44およびS46であった。
【０１６２】
標的は、TNF-αおよびRANKLであった。
【０１６３】
三量体可溶性形態の標的をビオチニル化し、ビオチン／アビジン結合を通じて固体ビーズに付加した。ついで、三量体を解離させるためにそれらを十分に洗浄した。
【０１６４】
WO 2008/068637に本質的に開示されるスクリーニングを、ライブラリのバリアントのリボソームディスプレイ発現および結合させた標的に対する暴露によって行った。
【０１６５】
クローンの選択および同定のために、ビオチニル化hTNFa（R&D Systems）およびmTNFa（R&D Systems）を使用した。ビオチニル化は、氷上で1時間、標的タンパク質の50μM溶液をPBS（Sigma-Aldrich）中5倍モル過剰のスルホスクシンイミジル-6-(ビオチンアミド)ヘキサノエート（スルホ-NHS-LC-LC-ビオチン、Pierce）とインキュベートすることによって行った。ビオチニル化されたタンパク質を、20 mM Tris-HCl、150 mM NaCl pH 7.4（TBS）中で平衡化されたPierce製のタンパク質脱塩スピンカラムを用いて緩衝液交換した。ビオチニル化度は、HABAアッセイ（Sigma）を用いて、タンパク質分子あたり約0.5～5分子のビオチンと決定された。Sac7dタンパク質における上記の位置の無作為変異誘発に対応するライブラリの生成については、以前（特に、Mouratou et al., Methods Mol Biol. 2012;805:315-31; Mouratou et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 2007 Nov 13;104(46):17983-8; WO 2008/068637）に記載されている。
【０１６６】
PCR増幅されたライブラリを転写し、本質的に以前に記載されたようにして（Mouratou et al., 2007および2012, 前記, Binz et al., Nat Biotechnol 2004, 22:575-582）選択を4℃で行った。最初の2ラウンドの選択では、TBS150（50 mM Tris HCl、pH 7.4、150 mM NaCl）中のストレプトアビジン（66 nM、100μl/ウェル；Sigma-Aldrich）またはニュートラアビジン（66 nM、100μl/ウェル；Thermo Scientific）を交互に、4℃での一晩のインキュベーションによってMaxisorpプレート（Nunc）上に固定化した。ついでこのウェルを、4℃で1時間、300μlのTBS150中0.5% BSA（Sigma-Al

drich）でブロックした。0.5% BSAを含むTBS150中のビオチニル化hTNFa（100μl、0.1μM）を、4℃で1時間結合させた。リボソームディスプレイのラウンドの前に、ウェルを洗浄緩衝液WBT（50 mM Tris酢酸、pH 7.5、150 mM NaCl、50 mM Mg(CH3COO-)2、0.05% Tween 20）で十分に洗浄した。ラウンド3および4は、標的をストレプトアビジンまたはニュートラアビジンコートされた磁気ビーズに交互に提示したことを除いて同様に行った。

【０１６７】

リボソームディスプレイのラウンドは、ストレプトアビジン（またはニュートラアビジン）でコートした物体上での1時間の事前パニング工程および標的タンパク質に対する1時間の結合工程からなるものとした。洗浄、RNA精製および逆転写の後、DNAプールをRT-PCRにより増幅した。

【０１６８】

各標的について複数のバリアントを得、それらが他のアッセイにおいて標的に結合することを示すようさらに特徴づけた。

【０１６９】

標的に対する結合を検証する1つのアッセイは、Hisタグを有するよう生成されたバリアントを用いて行う。

【０１７０】

ブロッキング工程を室温で1時間行うことを除いて上記のようにして、ビオチニル化抗原を、ストレプトアビジンでコートされたプレートに固定化する。陽性クローンの同定のために、室温で1時間、100μlの大腸菌粗抽出物を、固定化された抗原を有するまたは有さないウェルに適用する。その結合は、バリアントのRGSHis6タグを検出する抗RGSHis抗体HRPコンジュゲート（Qiagen）および検出緩衝液（0.05 Mクエン酸、0.05%過酸化水素）中1 mg/mlのo-フェニレンジアミン基質（OPD）の溶液を用いて可視化する。450 nmでの吸光度を、ELISAプレートリーダーを用いて測定する。精製されたタンパク質を使用することを除いて同じ様式で定量ELISAを行う。

【０１７１】

N11と呼ばれるTNF-αに結合する特定のバリアントの特徴づけは、以下の実施例においてより詳細に開示されている。

【０１７２】

F10と呼ばれるRANKLに結合するバリアントの特徴づけも、以下に記載される。

【０１７３】

<u>実施例2．特定のバリアント（N11）のさらなる特徴づけ</u>

<u>実施例2.1．TNF受容体および既知のバインダーとの競合</u>

N11の結合と競合するTNF-αに対する他のバインダーの能力を評価した。

【０１７４】

簡潔に説明すると、他のバインダー（TNF受容体I（TNFRI）、TNF受容体II（TNFRII）または2つのモノクローナル抗体アダリムマブ（ADA）およびインフリキシマブ（IFX））を、N11および可溶性TNFと共インキュベートした。

【０１７５】

図2に示されるように、N11の結合は、TNFRI、TNFRIIおよびアダリムマブにより中和されるが、N11の結合は、インフリキシマブにより中和されない。

【０１７６】

<u>実施例2.2．ヒトおよびマウスTNFの間の交差結合</u>

N11-ヒトTNFa（hTNFa）相互作用のEC100を、hTNFaで官能化されたプレートおよび範囲濃度のN11を用いてELISAにより決定した。

【０１７７】

また、hTNFaおよびmTNFa（マウスTNFa）に対するN11の交差反応性を、単一濃度（EC100）でELISAによりモニタリングした。プレートを、hTNFaおよびmTNFaで官能化した。観察されたシグナルの特異性を強調するために、TNFaで官能化していないウェルを

陰性対照として使用した。

【０１７８】

N11がヒトおよびマウスTNFの間で交差反応することが示された（図3）。

【０１７９】

実施例2.3．重要な残基のスキャン

どの残基が観察された結合を担っているのかを決定するため、Sac7d（SEQ ID NO:1）配列と相違するN11（SEQ ID NO:16）の各残基を、アラニンで置き換えた（アラニンスキャン）。

【０１８０】

ついで、得られたタンパク質のTNFaへの暴露を行い、ELISAにより結合を測定した（hTNFaで官能化されたプレートおよび範囲濃度のN11のバリアントを用いたEC100の測定）。

【０１８１】

結合の消失がある場合、これは、その残基が該サブユニットへの結合にとって非常に重要であることを示している。

【０１８２】

図4に示されるように、残基31、33、40および42が非常に重要であることが示された。

【０１８３】

残基22および24もまた、それらの変異はその親和性を本質的に減少させるものであるが、重要である。

【０１８４】

他の変異残基の修飾は、本質的に結合に影響しない。したがって、配列SEQ ID NO:17（N11の非常に重要なアミノ酸31、33、40、42を含む）およびSEQ ID NO:18（N11の非常に重要なアミノ酸31、33、40、42ならびに残基22および24を含む）が、TNFaへの結合を維持する最小配列のようである。

【０１８５】

結論

上記の情報

- ヒトおよびマウスTNFaに結合する
- ADA、TNFRI、TNFRIIと競合するがIFXとは競合しない
- 重要なアミノ酸の性質

を、インシリコモデリングに使用し、N11がTNFの三量体化コアに結合する可能性が高いことが示された（どちらも該コアに結合する2つのモデルを得た）。このことはさらに、部位特異的変異誘発によりTNFαの変異体を改変することによって実験的に示された（実施例3）。

【０１８６】

さらに、N11がTNFスーパーファミリーの他のメンバーに結合しないことが示された。

【０１８７】

実施例3．TNF変異体の設計およびさらなる特徴づけ

TNFαの4つの点変異体：

- TNFバリアントR32A
- TNFバリアントE146A
- TNFバリアントY115A
- TNFバリアントY151A

を作製した（図5）。

【０１８８】

TNFαバリアントでコーティングされたプレートに対するN11の結合を検査した（図6）。変異体Y151Aについては、本質的に結合が抑止されることが示された。

【０１８９】

しかし、Y151変異体は依然として機能的であることが示された（図7）。これは、L929アッセイによって行った。このことは、変異体Y151Aが十分に折り畳まれている可能性が高いことおよびその残基がN11により認識されるエピトープに関与していることを示している。

【０１９０】

結論

N11結合は、Y151A変異により有意に影響される。

Y151A変異は、完全に機能的であることが示された。

残基Y151は、N11のエピトープに関与する。

残基Y151は、TNFα三量体のコア内に埋め込まれているようである。

これは、TNFα三量体化のブロックに基づき相互作用様式を示すさらなる議論である。

【０１９１】

実施例4．さらなる結合分析 - 三量体の形成の阻害

架橋実験を行った。

【０１９２】

図8は、バンドがN11と単量体の複合体に起因するものであり得ることおよび架橋後にTNFaの二量体がSDS-PAGEゲル上で観察されたこと、他方、N11とTNFaの三量体の間の相互作用の証拠は確認されなかったことを示している。TNFaを室温で24時間N11と共にインキュベートしたとき、1つのナノフィチンと複合体化したTNFaの単量体および1つのナノフィチンと複合体化したTNFaの二量体に起因するものであり得る、より低分子量の複合体がさらに観察された。

【０１９３】

TNFをN11と経時的に共インキュベートした同様の架橋実験において、TNFa三量体および二量体の比率はインキュベート時間の増加とともに低下するのに対して、N11と複合体化したTNFa単量体および二量体の比率はインキュベート時間の増加と共に増加したことが観察された。

【０１９４】

この架橋実験において観察されたのと同様に、より低分子量の種は、TNFaをN11と共にインキュベートした後に現れた。

【０１９５】

実施例5．三量体形成の阻害

上記データは、N11がTNFaの単量体および二量体の両方に結合するが、その三量体には結合しないという仮説を強く支持している。

【０１９６】

この知見を補強するために、TNFaの変異体を作製した（図9）。

a）TNFaの安定化された三量体を生成する変異体

三量体の安定化は、二重変異S95C/G148Cを通じたジスルフィド架橋の形成によって達成される。

b）三量体化を妨げる変異体

119位は、TNFαの三量体化に重要である。この119位における変異は、三量体形成を妨げる。

【０１９７】

Y119変異体において、WT TNFαと比較して低い比率の三量体が観察された（図10）。

【０１９８】

TNFa変異体の機能を検証した（図11）。

【０１９９】

安定化された三量体は、L929アッセイにおいて機能性を維持していた（変異体S95C/G148C）。

【０２００】

変異体Y119は、L929アッセイにおいて機能性でなかった。この観察は、この位置での

変異が三量体化を変化させること、およびTNFαの活性形態が三量体であることから予測された。L929アッセイは、Y119における変異が各TNFα変異体の正確な折り畳みを損なわせないことを確認することに関係しないため、Y119変異体の機能性を検証するための他の試験を行った。インフリキシマブを用いた結合アッセイは、WTおよびY119 TNFαバリアントに対して同様のインフリキシマブ（IFX）の結合が観察されたことを示した。Y119変異体はIFXに対する結合に関して依然として機能性であることから、これにより、このタンパク質が十分に折り畳まれていることが示された。

【０２０１】

N11は、三量体に結合しないが、その低オリゴマー状態にあるTNFαには依然として十分に結合することができることが示された（図12）。安定化されたTNFa三量体に対する結合の欠如は、架橋実験でなされた観察と十分に相関している。

【０２０２】

TNFaに対するN11の結合はまた、Y119変異体では、Octet RED96においてモニタリングすることができたが、WT TNFaでは観察できなかった（示さず）。

【０２０３】

結論

架橋実験は、N11がTNFαの単量体および二量体の両方に結合するが、三量体には結合しないことを示した。N11のエピトープは、TNFα三量体のコア内に埋もれている残基を含む。N11は、TNFαの安定化された三量体に結合することができない。N11の結合は、TNFαがその低オリゴマー状態で存在するときに促進される。

【０２０４】

実施例6. インビボ実験

N11によるTNFaの中和を、インビボ環境で実証した。

【０２０５】

24時間事前インキュベートしたTNFaおよびN11の混合物をマウスにi.v.投与し、6時間後に血液中のIL6（TNFaに応答して産生されるサイトカイン）の測定を行った。

【０２０６】

さらなる対照を使用した：実施例1で単離された別の（より低い効果を示す）バリアントであるN9、N9mut42A（TNFへの結合を抑止する変異を有するN9バリアント）および無関係なSac7dのバリアント（Irr NF）。

【０２０７】

図13は、N11およびN9の両方がインビボでIL6の産生を抑止し、それによってインビボでのTNFaの活性を阻害することができることを示している。

【０２０８】

他のインビボ実験は、急性大腸炎のマウスモデルにおいて経口的に使用された様々なバリアントの有効性を示した。

【０２０９】

実施例7. 特定のバリアント（F10）の特徴づけ

実施例7.1. Sac7dバリアントの結合

F10と呼ばれるRANKLに結合するバリアントも特徴づけた。そのようなバリアントの配列は、SEQ ID NO:19によって示される。さらに、F3と呼ばれる別のバリアント（配列示さず）も特徴づけた。

【０２１０】

バリアントF3およびF10は両方とも、RANKLおよびTNFスーパーファミリーの他のメンバー（TNF-α、CD40リガンドおよびTRAIL）に結合することが示された。

【０２１１】

これらのSac7dバリアントがTNFスーパーファミリーの様々なメンバーに結合するという事実からみて、そのエピトープは、すべてのタンパク質において相同な領域、すなわち三量体化界面に位置していなければならない。そのため、このバリアントは、三量体に関与していない場合、そのような界面が利用可能であるときに単量体に結合することができ

、そしてひとたび三量体化が達成されると、そのタンパク質に結合することができない。
【０２１２】
生体層干渉法を用いて、F3およびF10のエピトープが異なることが示された。
【０２１３】
実施例7.2．ヒトおよびマウスTNFの間の交差結合
ヒトおよびマウスRANKLの間の交差結合を、実施例2.2に開示されるのと同様のプロトコルを用いて決定した。
【０２１４】
F3およびF10の両方がヒトおよびマウスRANKLの間で交差反応することが示された。
【０２１５】
実施例7.3．インビトロ実験
CD14+単球を、RANKLの存在下、MCSF（マクロファージコロニー刺激因子）も含む完全培地中で培養した。
【０２１６】
そのような条件は、この細胞から破骨細胞への分化を誘発する。
【０２１７】
RANKLに対するモノクローナル抗体IK 22.5（１μg/ml）の存在は、この細胞の分化を抑止した。
【０２１８】
様々な濃度のSac7dバリアントF3およびF10を試験し、分化の抑止が25 nMという低濃度で得られる（約50％抑止）ことが示された。
【０２１９】
実施例7.4．インビボ実験
卵巣摘出マウス（メスc57bl6マウス、8週齢）を、骨喪失のモデルとして使用した。手術からの回復および7日間の順応の後、マウスを無作為に処置グループおよび対照グループ（グループあたりn=8）に分割した。インビボで半減期を延長するペプチドと共にF10バリアントを含むポリペプチドを、10 mg/kgの腹腔内注射により毎日投与した。非卵巣摘出マウスを健常対照として含めた。実験期間の間、動物の体重をモニタリングした。6週間の処置後、マウスをイソフルランで麻酔し、頸部損傷により安楽死させた。後脚および椎骨を収集し、さらなる分析まで4％ホルマリン中、4℃で保管した。毒性スクリーニングのために、内臓を収集し、4％ホルマリン中で固定し、パラフィン包埋した。
【０２２０】
組織の分析は、そのようなF10バリアントの投与が、非処置マウスと比較して、骨梁（骨容積／総容積比および骨表面）を保護することを示している。
【０２２１】
抗RANKLバリアントは、したがって、インビボで骨喪失から保護する活性を示す。
【０２２２】
本明細書に開示されるデータは、本明細書に提供されるスクリーニング方法により、その三量体化部位においてTNFスーパーファミリーのタンパク質のサブユニットに結合し、多量体化を妨げることができるSac7dタンパク質のバリアントを得ることが可能となることを示している。これらのバリアントは、完全に多量体化した天然タンパク質には結合しない。
【０２２３】
インビボ実験は、該バリアントが、（おそらく、しかしこの学説により拘束されるものではないが）遊離状態のまたは多量体化したタンパク質中のサブユニットの間の平衡を変位させることによって、多量体化したタンパク質の作用を阻害することができることを示している。上記実施例は特定のタンパク質を例示するにとどまるが、異なるライブラリまたはさらなるスクリーニング工程を用いて他のバリアントを得ることもできる。上記実施例は、特定の臨床状態を例示するにとどまるが、報告された結果は、該バリアントが様々な臨床状態に関与するタンパク質と相互作用すること、したがって、これらのバリアント

が、そのようなタンパク質が関与するそのような疾患において有用であることを示している。実施例はTNFスーパーファミリーのタンパク質を例示するにとどまるが、このスクリーニング試験は、他の多量体タンパク質に関与するサブユニットを用いて実施することができ、（遊離形態のサブユニットに結合し、多量体化形態に結合しない）TNFタンパク質に関して本明細書で報告された結果は、該教示をこれらの他の多量体タンパク質において繰り返すことによって達成され得る。

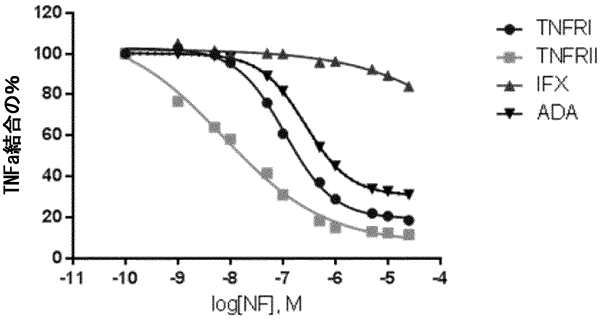
【図面】

【図１】

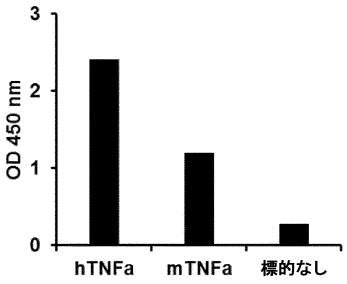
```
A4YEA2_Mse7                  MATKIKFKYKGQDLEVDISKVKKVWKVGKMVSFTYDDN-GKTGRGAVSEK
DBP7_スルホロブス・トコダイイ  MVT-VKFKYKGEEKEVDISKIKKVWRVGKMISFTYDDN-GKTGRGAVSEK
F4FYY6_Mcu7                  MATKIKFKYKGQDLEVDISKVKKVWKVGKMVSFTYDDN-GKTGRGAVSEK
SSo7d_スルホロブス・ソルファタリカス  MAT-VKFKYKGEEKEVDISKIKKVWRVGKMISFTYDEGGGKTGRGAVSEK
Sac7d_スルホロブス・アシドカルダリウス  MVK-VKFKYKGEEKEVDTSKIKKVWRVGKMVSFTYDDN-GKTGRGAVSEK
Sac7e_スルホロブス・アシドカルダリウス  MAK-VRFKYKGEEKEVDTSKIKKVWRVGKMVSFTYDDN-GKTGRGAVSEK
Sis7a_スルホロブス・アイランディカス  MVT-VKFKYKGEEKQVDTSKIKKVWRVGKMISFTYDEGGGKTGRGAVSEK
Sis7a_スルホロブス・アイランディカス_1  MTT-VKFKYKGEEKQVDTSKIKKVWRVGKMISFTYDEGGGKTGRGAVSEK
Sis7a_スルホロブス・アイランディカス_2  MTT-VKFKYKGEEKQVDISKIKKVWRVGKMISFTYDEGGGKTGRGAVSEK
Ssh7a_スルホロブス・シバタエ  MAT-VKFKYKGEEKQVDISKIKKVWRVGKMISFTYDEGGGKTGRGAVSEK
Ssh7b_スルホロブス・シバタエ  MVT-VKFKYKGEEKEVDTSKIKKVWRVGKMISFTYDEGGGKTGRGAVSEK
f4b8x5_Aho7c                 MATKVKFKYKGEEKEVDISKIKKVWRVGKMISFTYDDN-GKTGRGAVSEK
f4b991_Aho7a                 MTT-VKFKYKGEEKEVDISKIKKVWRVGKMISFTYDDN-GKTGRGAVSEK
f4b9i5_Aho7b                 MATKVKFKYKGEEKEVDISKIKKVWRVGKMISFTYDDN-GKTGRGAVSEK
q96x56_Sto7                  MVT-VKFKYKGEEKEVDISKIKKVWRVGKMISFTYDDN-GKTGRGAVSEK
                             *.. ::*****:: :** **:****:****:*****:. **********

A4YEA2_Mse7                  DAPKELLNMIG-----KK
DBP7_スルホロブス・トコダイイ  DAPKELLQMLEK--SGKK
F4FYY6_Mcu7                  DAPKELLSMIG-----KK
SSo7d_スルホロブス・ソルファタリカス  DAPKELLQMLEK---QKK
Sac7d_スルホロブス・アシドカルダリウス  DAPKELLDMLARAEREKK
Sac7e_スルホロブス・アシドカルダリウス  DAPKELMDMLARA-EKKK
Sis7a_スルホロブス・アイランディカス  DAPKELLQMLEK---QKK
Sis7a_スルホロブス・アイランディカス_1  DAPKELLQMLEK---QKK
Sis7a_スルホロブス・アイランディカス_2  DAPKELLQMLEK---QKK
Ssh7a_スルホロブス・シバタエ  DAPKELLQMLEK---QKK
Ssh7b_スルホロブス・シバタエ  DAPKELLQMLEK---QKK
f4b8x5_Aho7c                 DAPKELLEKL-------K
f4b991_Aho7a                 DAPKELLEKLE-----KK
f4b9i5_Aho7b                 DAPKELLDKLE-----KK
q96x56_Sto7                  DAPKELLQMLEK--SGKK
                             *******:. :       *
```

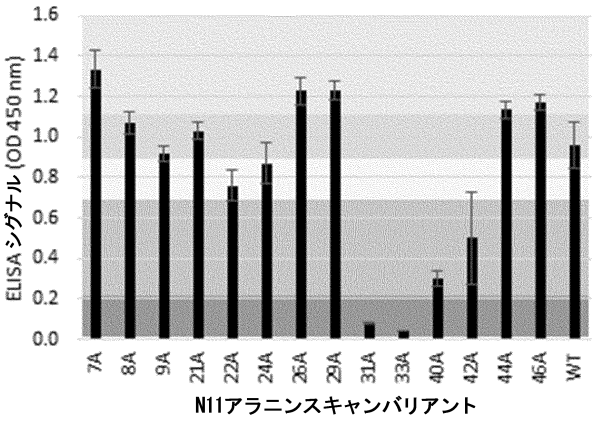
【図２】



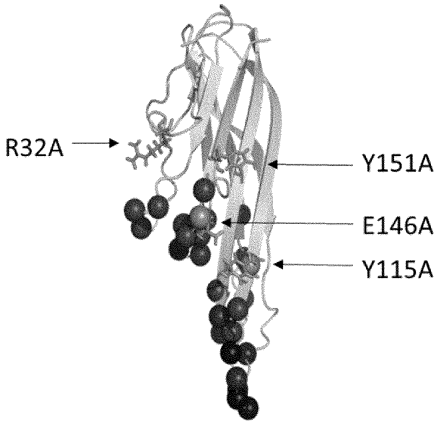
【図３】



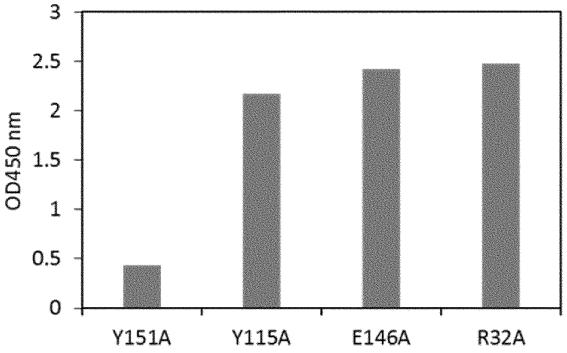
【図４】



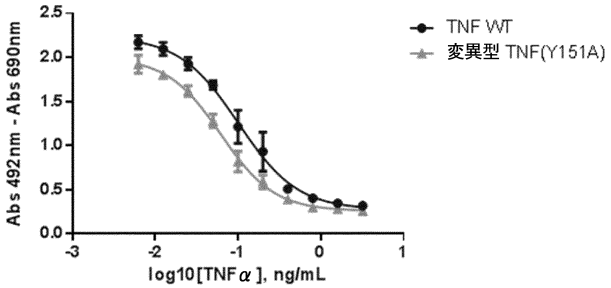
【図５】


R32A
Y151A
E146A
Y115A

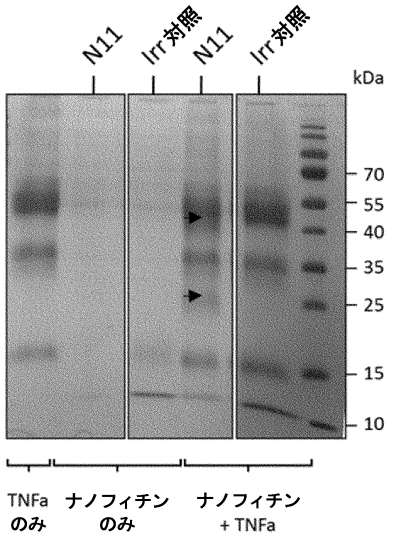
【図６】


OD450 nm
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
Y151A
Y115A
E146A
R32A

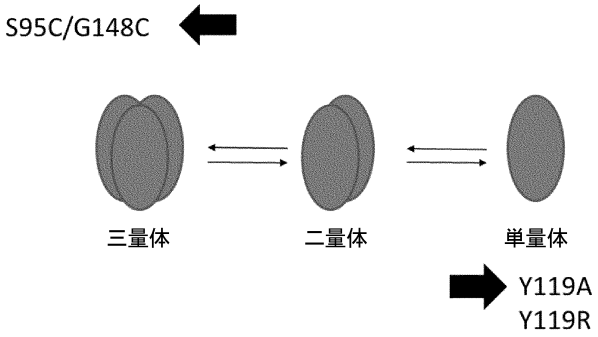
【図７】


Abs 492nm - Abs 690nm
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
-3
-2
-1
0
1
log10[TNFα], ng/mL
TNF WT
変異型 TNF(Y151A)

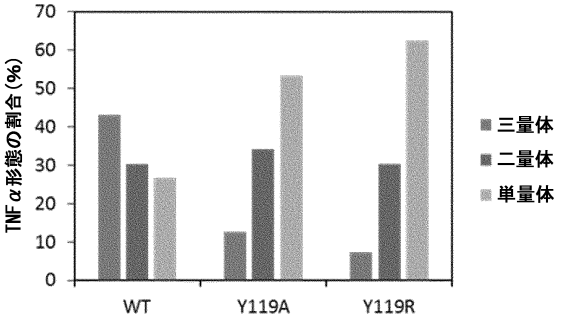
【図８】


N11
Irr対照
N11
Irr対照
kDa
70
55
40
35
25
15
10
TNFa のみ
ナノフィチン のみ
ナノフィチン + TNFa

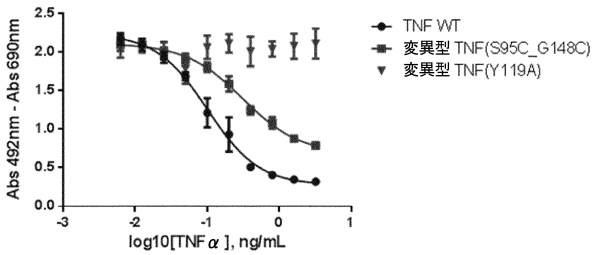
【図９】



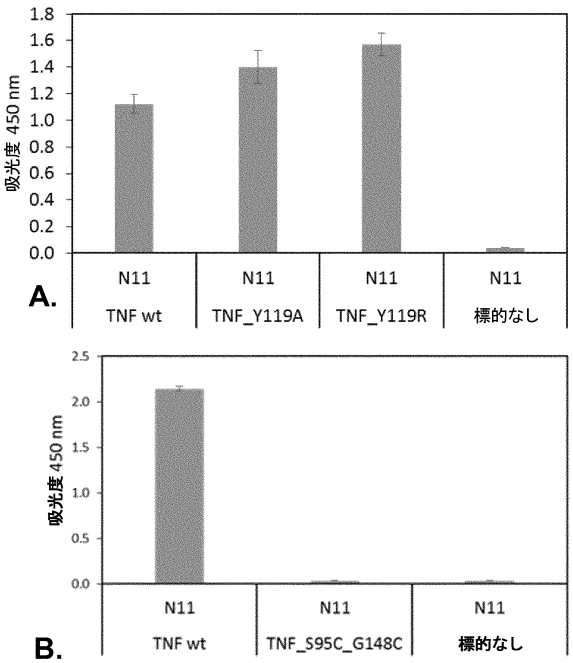
【図１０】



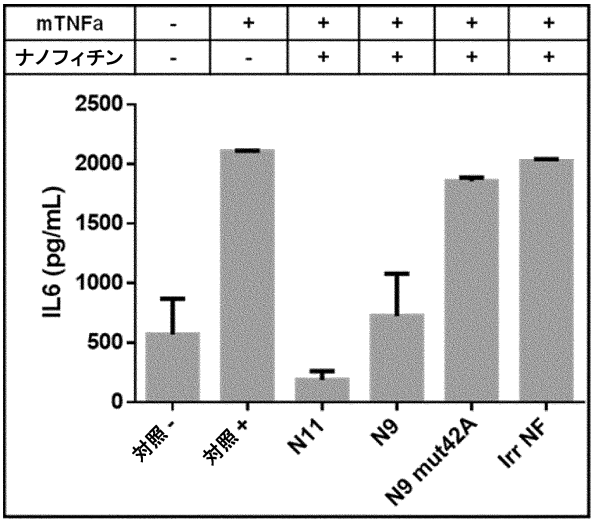
【図１１】



【図１２】



【図１３】



【配列表】

0007699539000001.app

フロントページの続き

(51)国際特許分類		FI		
C12N 1/15 (2006.01)		C12N	1/15	
C12N 1/19 (2006.01)		C12N	1/19	
C12N 1/21 (2006.01)		C12N	1/21	
C12N 5/10 (2006.01)		C12N	5/10	
A61K 38/16 (2006.01)		A61K	38/16	
A61P 29/00 (2006.01)		A61P	29/00	101
A61P 19/02 (2006.01)		A61P	19/02	
A61P 17/06 (2006.01)		A61P	17/06	
A61P 1/00 (2006.01)		A61P	1/00	
A61P 17/00 (2006.01)		A61P	17/00	
A61P 9/00 (2006.01)		A61P	9/00	
C07K 16/24 (2006.01)		C07K	16/24	

(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 100121072
弁理士 川本 和弥
(72)発明者 キッテン オリビエ
フランス共和国 ４４２００ ナント リュ ラ ノウェ ブラス ドゥ フェール ２１ バイオ ウエスト アフィロジック内
(72)発明者 シニエ マシュー
フランス共和国 ４４２００ ナント リュ ラ ノウェ ブラス ドゥ フェール ２１ バイオ ウエスト アフィロジック内
(72)発明者 ユエ シモン
フランス共和国 ４４２００ ナント リュ ラ ノウェ ブラス ドゥ フェール ２１ バイオ ウエスト アフィロジック内
(72)発明者 シュヴレル アンヌ
フランス共和国 ４４２００ ナント リュ ラ ノウェ ブラス ドゥ フェール ２１ バイオ ウエスト アフィロジック内

審査官 福澤 洋光

(56)参考文献 特表２０１０－５１１６９１（ＪＰ，Ａ）
国際公開第２０１７／１６１０９６（WO，Ａ１）
Biotechnology and Bioengineering，Vol.114, No.3，pp.481-491
PLoS ONE，2010年，Vol.5, No.5, e10728，pp.1-10

(58)調査した分野 (Int.Cl.，ＤＢ名)
Ｃ１２Ｎ １／００－１５／９０
Ｃ０７Ｋ １／００－１９／００
Ｃ１２Ｐ １／００－４１／００
ＣＡｐｌｕｓ／ＭＥＤＬＩＮＥ／ＥＭＢＡＳＥ／ＢＩＯＳＩＳ（ＳＴＮ）
ＪＳＴＰｌｕｓ／ＪＭＥＤＰｌｕｓ／ＪＳＴ７５８０（ＪＤｒｅａｍＩＩＩ）
ＵｎｉＰｒｏｔ／ＧｅｎｅＳｅｑ
ＰｕｂＭｅｄ