

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6884708号
(P6884708)

(45) 発行日 令和3年6月9日 (2021. 6. 9)

(24) 登録日 令和3年5月14日 (2021. 5. 14)

(51) Int. Cl.	F I
C 1 2 N 15/12 (2006. 01)	C 1 2 N 15/12 Z N A
C O 7 K 14/47 (2006. 01)	C O 7 K 14/47
C O 7 K 19/00 (2006. 01)	C O 7 K 19/00
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

請求項の数 29 (全 56 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2017-557299 (P2017-557299)	(73) 特許権者	509029645
(86) (22) 出願日	平成28年5月4日 (2016. 5. 4)		ビエリス ファーマシューティカルズ ゲー ーエムペーハー
(65) 公表番号	特表2018-515084 (P2018-515084A)		ドイツ連邦共和国 8 5 3 5 4 フライジ ンダーヴァイエンステファン リゼーマイ トネルーストラッセ 3 0
(43) 公表日	平成30年6月14日 (2018. 6. 14)	(74) 代理人	100102978
(86) 国際出願番号	PCT/EP2016/059959		弁理士 清水 初志
(87) 国際公開番号	W02016/177762	(74) 代理人	100102118
(87) 国際公開日	平成28年11月10日 (2016. 11. 10)		弁理士 春名 雅夫
審査請求日	平成31年4月24日 (2019. 4. 24)	(74) 代理人	100160923
(31) 優先権主張番号	15166184.0		弁理士 山口 裕孝
(32) 優先日	平成27年5月4日 (2015. 5. 4)	(74) 代理人	100119507
(33) 優先権主張国・地域又は機関	欧州特許庁 (EP)		弁理士 刑部 俊
前置審査			

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 C D 1 3 7 に特異的なタンパク質

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

KDが約300nM以下である親和性でCD137に結合する能力を有するリボカリムテインであって、

(i) 該ムテインが、SEQ ID NO:5~11からなる群より選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつ該ムテインが、成熟ヒト涙液リボカリンの直鎖ポリペプチド配列 (SEQ ID NO:1) と比較して、以下の変異アミノ酸の組のうちの1組を含む:

(a)Arg 26	Glu, Glu 27	Gly, Phe 28	Cys, Pro 29	Arg, Glu 30	Pro, Me
t 31	Trp, Leu 33	Ile, Glu 34	Phe, Leu 56	Ala, Ser 58	Asp, Arg 60
	Pro, Cys 61	Ala, Cys 101	Ser, Glu 104	Val, Leu 105	Cys, His 106
	Asp, Lys 108	Ser, Arg 111	Pro, Lys 114	Trp, およびCys 153	Ser;
(b)Ala 5	Thr, Arg 26	Glu, Glu 27	Gly, Phe 28	Cys, Pro 29	Arg, Glu
30	Pro, Met 31	Trp, Leu 33	Ile, Glu 34	Phe, Leu 56	Ala, Ser 58
	Asp, Arg 60	Pro, Cys 61	Ala, Lys 65	Arg, Val 85	Asp, Cys 101
S	er, Glu 104	Val, Leu 105	Cys, His 106	Asp, Lys 108	Ser, Arg 111
P	ro, Lys 114	Trp, Lys 121	Glu, Ala 133	Thr, および Cys 153	Ser;
(c)Arg 26	Glu, Glu 27	Gly, Phe 28	Cys, Pro 29	Arg, Glu 30	Pro, Me
t 31	Trp, Leu 33	Ile, Glu 34	Phe, Leu 56	Ala, Ser 58	Asp, Arg 60
	Pro, Cys 61	Ala, Lys 65	Asn, Lys 94	Arg, Cys 101	Ser, Glu 104

10

20

Val, Leu 105	Cys, His 106	Asp, Lys 108	Ser, Arg 111	Pro, Lys 114	
Trp, Lys 121	Glu, Ala 133	ThrおよびCys 153	Ser;		
(d)Ala 5	Val, Arg 26	Glu, Glu 27	Gly, Phe 28	Cys, Pro 29	Arg, Glu 30
Pro, Met 31	Trp, Leu 33	Ile, Glu 34	Phe, Leu 56	Ala, Ser 58	
Asp, Arg 60	Pro, Cys 61	Ala, Lys 65	Arg, Lys 94	Glu, Cys 101	Ser, Glu 104
Val, Leu 105	Cys, His 106	Asp, Lys 108	Ser, Arg 111	Pro, Lys 114	Trp, Lys 121
Glu, Ala 133	ThrおよびCys 153	Ser;			
(e)Arg 26	Glu, Glu 27	Gly, Phe 28	Cys, Pro 29	Arg, Glu 30	Pro, Met 31
Trp, Leu 33	Ile, Glu 34	Phe, Thr 42	Ser, Leu 56	Ala, Ser 58	
Asp, Arg 60	Pro, Cys 61	Ala, Cys 101	Ser, Glu 104	Val, Leu 105	Cys, His 106
Asp, Lys 108	Ser, Arg 111	Pro, Lys 114	Trp, Ser 150	IleおよびCys 153	Ser;
(f)Arg 26	Glu, Glu 27	Gly, Phe 28	Cys, Pro 29	Arg, Glu 30	Pro, Met 31
Trp, Leu 33	Ile, Glu 34	Phe, Lys 52	Glu, Leu 56	Ala, Ser 58	
Asp, Arg 60	Pro, Cys 61	Ala, Thr 71	Ala, Cys 101	Ser, Glu 104	Val, Leu 105
Cys, His 106	Asp, Lys 108	Ser, Arg 111	Pro, Lys 114	Trp, Ser 150	IleおよびCys 153
Ser;	または				
(g)Ala 5	Thr, Arg 26	Glu, Glu 27	Gly, Phe 28	Cys, Pro 29	Arg, Glu 30
Pro, Met 31	Trp, Leu 33	Ile, Glu 34	Phe, Gly 46	Asp, Leu 56	Ala, Ser 58
Asp, Arg 60	Pro, Cys 61	Ala, Thr 71	Ala, Cys 101	Ser, Glu 104	Val, Leu 105
Cys, His 106	Asp, Lys 108	Ser, Arg 111	Pro, Lys 114	Trp, Ser 150	IleおよびCys 153
Ser、または					
(ii)該ムテインが、SEQ ID NO:12~20からなる群より選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも90%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつ該ムテインのアミノ酸配列が、成熟hNGALの直鎖ポリペプチド配列 (SEQ ID NO:2) と比較して、以下の変異アミノ酸の組のうちの1組を含む:					
(a)Gln 28	His, Leu 36	Gln, Ala 40	Ile, Ile 41	Lys, Gln 49	Asn, Tyr 52
Met, Ser 68	Gly, Leu 70	Thr, Arg 72	Asp, Lys 73	Asp, Asp 77	Thr, Trp 79
Ala, Arg 81	Ser, Cys 87	Ser, Asn 96	Lys, Tyr 100	Phe, Leu 103	His, Tyr 106
Ser, Lys 125	Phe, Ser 127	Phe, Tyr 132	GluおよびLys 134	Tyr;	
(b)Gln 28	His, Leu 36	Gln, Ala 40	Ile, Ile 41	Arg, Gln 49	Ile, Tyr 52
Met, Asn 65	Asp, Ser 68	Met, Leu 70	Lys, Arg 72	Asp, Lys 73	Asp, Asp 77
Met, Trp 79	Asp, Arg 81	Trp, Cys 87	Ser, Asn 96	Lys, Tyr 100	Phe, Leu 103
His, Tyr 106	Ser, Lys 125	Phe, Ser 127	Phe, Tyr 132	GluおよびLys 134	Tyr;
(c)Gln 28	His, Leu 36	Gln, Ala 40	Ile, Ile 41	Arg, Gln 49	Asn, Tyr 52
Met, Asn 65	Asp, Ser 68	Ala, Leu 70	Ala, Arg 72	Asp, Lys 73	Asp, Asp 77
Thr, Trp 79	Asp, Arg 81	Trp, Cys 87	Ser, Asn 96	Lys, Tyr 100	Phe, Leu 103
His, Tyr 106	Ser, Lys 125	Phe, Ser 127	Phe, Tyr 132	GluおよびLys 134	Tyr;
(d)Gln 28	His, Leu 36	Gln, Ala 40	Ile, Ile 41	Lys, Gln 49	Asn, Tyr 52
Met, Asn 65	Asp, Ser 68	Ala, Leu 70	Ala, Arg 72	Asp, Lys 73	Asp, Asp 77
Thr, Trp 79	Asp, Arg 81	Trp, Cys 87	Ser, Asn 96	Lys, Tyr 100	Phe, Leu 103
His, Tyr 106	Ser, Lys 125	Phe, Ser 127	Phe, Tyr 132	GluおよびLys 134	Tyr;
(e)Gln 28	His, Leu 36	Gln, Ala 40	Ile, Ile 41	Lys, Gln 49	Ser, Tyr 52
Met, Asn 65	Asp, Ser 68	Gly, Leu 70	Ser, Arg 72	Asp, Lys 73	Asp, Asp 77
Thr, Trp 79	Ala, Arg 81	Met, Cys 87	Ser, Asn 96	Lys, Tyr 100	Phe, Leu 103
His, Tyr 106	Ser, Lys 125	Phe, Ser 127	Phe, Tyr 132	GluおよびLys 134	Tyr;

10

20

30

40

50

s, Tyr 100 Phe, Leu 103 His, Tyr 106 Ser, Lys 125 Phe, Ser 127 Ph
e, Tyr 132 GluおよびLys 134 Tyr;
(f)Gln 28 His, Leu 36 Gln, Ala 40 Ile, Ile 41 Lys, Gln 49 Val, Ty
r 52 Met, Asn 65 Asp, Ser 68 Gly, Leu 70 Thr, Arg 72 Asp, Lys 73
Asp, Asp 77 Arg, Trp 79 Asp, Arg 81 Ser, Cys 87 Ser, Leu 94 Ph
e, Asn 96 Lys, Tyr 100 Phe, Leu 103 His, Tyr 106 Ser, Lys 125 Phe
, Ser 127 Phe, Tyr 132 GluおよびLys 134 Tyr;
(g)Gln 28 His, Leu 36 Gln, Ala 40 Ile, Ile 41 Arg, Gln 49 His, Ty
r 52 Met, Asn 65 Asp, Ser 68 Gly, Leu 70 Thr, Arg 72 Asp, Lys 73
Asp, Asp 77 Thr, Trp 79 Ala, Arg 81 Ser, Cys 87 Ser, Asn 96 Ly
s, Tyr 100 Phe, Leu 103 His, Tyr 106 Ser, Lys 125 Phe, Ser 127 Ph
e, Tyr 132 GluおよびLys 134 Tyr;
(h)Gln 28 His, Leu 36 Gln, Ala 40 Ile, Ile 41 Lys, Gln 49 Asn, Ty
r 52 Met, Asn 65 Asp, Ser 68 Gly, Leu 70 Thr, Arg 72 Asp, Lys 73
Asp, Asp 77 Thr, Trp 79 Ala, Arg 81 Ser, Phe 83 Leu, Cys 87 Se
r, Leu 94 Phe, Asn 96 Lys, Tyr 100 Phe, Leu 103 His, Tyr 106 Ser,
Lys 125 Phe, Ser 127 Phe, Tyr 132 GluおよびLys 134 Tyr; もしくは
(i)Gln 28 His, Leu 36 Gln, Ala 40 Ile, Ile 41 Arg, Gln 49 Ser, Ty
r 52 Met, Asn 65 Asp, Ser 68 Ala, Leu 70 Thr, Arg 72 Asp, Lys 73
Asp, Asp 77 Asn, Trp 79 Ala, Arg 81 Ser, Cys 87 Ser, Asn 96 Ly
s, Tyr 100 Phe, Leu 103 His, Tyr 106 Ser, Lys 125 Phe, Ser 127 Ph
e, Tyr 132 GluおよびLys 134 Tyr、
リポカリンムテイン。

【請求項 2】

ムテインが、成熟ヒト涙液リポカリンの直鎖ポリペプチド配列 (SEQ ID NO:1) と比較して、以下の変異アミノ酸の組のうちの1組を含む、請求項1記載のムテイン:

(a)Arg 26 Glu, Glu 27 Gly, Phe 28 Cys, Pro 29 Arg, Glu 30 Pro, Me
t 31 Trp, Leu 33 Ile, Glu 34 Phe, Leu 56 Ala, Ser 58 Asp, Arg 60
Pro, Cys 61 Ala, Cys 101 Ser, Glu 104 Val, Leu 105 Cys, His 106
Asp, Lys 108 Ser, Arg 111 Pro, Lys 114 Trp, およびCys 153 Ser;
(b)Ala 5 Thr, Arg 26 Glu, Glu 27 Gly, Phe 28 Cys, Pro 29 Arg, Glu
30 Pro, Met 31 Trp, Leu 33 Ile, Glu 34 Phe, Leu 56 Ala, Ser 58
Asp, Arg 60 Pro, Cys 61 Ala, Lys 65 Arg, Val 85 Asp, Cys 101 S
er, Glu 104 Val, Leu 105 Cys, His 106 Asp, Lys 108 Ser, Arg 111 P
ro, Lys 114 Trp, Lys 121 Glu, Ala 133 Thr, および Cys 153 Ser;
(c)Arg 26 Glu, Glu 27 Gly, Phe 28 Cys, Pro 29 Arg, Glu 30 Pro, Me
t 31 Trp, Leu 33 Ile, Glu 34 Phe, Leu 56 Ala, Ser 58 Asp, Arg 60
Pro, Cys 61 Ala, Lys 65 Asn, Lys 94 Arg, Cys 101 Ser, Glu 104
Val, Leu 105 Cys, His 106 Asp, Lys 108 Ser, Arg 111 Pro, Lys 114
Trp, Lys 121 Glu, Ala 133 ThrおよびCys 153 Ser;
(d)Ala 5 Val, Arg 26 Glu, Glu 27 Gly, Phe 28 Cys, Pro 29 Arg, Glu
30 Pro, Met 31 Trp, Leu 33 Ile, Glu 34 Phe, Leu 56 Ala, Ser 58
Asp, Arg 60 Pro, Cys 61 Ala, Lys 65 Arg, Lys 94 Glu, Cys 101 S
er, Glu 104 Val, Leu 105 Cys, His 106 Asp, Lys 108 Ser, Arg 111 P
ro, Lys 114 Trp, Lys 121 Glu, Ala 133 ThrおよびCys 153 Ser;
(e)Arg 26 Glu, Glu 27 Gly, Phe 28 Cys, Pro 29 Arg, Glu 30 Pro, Me
t 31 Trp, Leu 33 Ile, Glu 34 Phe, Thr 42 Ser, Leu 56 Ala, Ser 58
Asp, Arg 60 Pro, Cys 61 Ala, Cys 101 Ser, Glu 104 Val, Leu 105
Cys, His 106 Asp, Lys 108 Ser, Arg 111 Pro, Lys 114 Trp, Ser 150
IleおよびCys 153 Ser;

10

20

30

40

50

(f) Arg 26 Glu, Glu 27 Gly, Phe 28 Cys, Pro 29 Arg, Glu 30 Pro, Met 31 Trp, Leu 33 Ile, Glu 34 Phe, Lys 52 Glu, Leu 56 Ala, Ser 58 Asp, Arg 60 Pro, Cys 61 Ala, Thr 71 Ala, Cys 101 Ser, Glu 104 Val, Leu 105 Cys, His 106 Asp, Lys 108 Ser, Arg 111 Pro, Lys 114 Trp, Ala 133 Thr, Arg 148 Ser, Ser 150 Ile, および Cys 153 Ser; または (g) Ala 5 Thr, Arg 26 Glu, Glu 27 Gly, Phe 28 Cys, Pro 29 Arg, Glu 30 Pro, Met 31 Trp, Leu 33 Ile, Glu 34 Phe, Gly 46 Asp, Leu 56 Ala, Ser 58 Asp, Arg 60 Pro, Cys 61 Ala, Thr 71 Ala, Cys 101 Ser, Glu 104 Val, Leu 105 Cys, His 106 Asp, Lys 108 Ser, Arg 111 Pro, Lys 114 Trp, Ser 150 Ile および Cys 153 Ser。

10

【請求項 3】

CD137へのCD137Lの結合を妨害する能力を有する、請求項2記載のムテイン。

【請求項 4】

SEQ ID NO:5～11からなる群より選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項2または3記載のムテイン。

【請求項 5】

SEQ ID NO:5～11からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、請求項2～4のいずれか一項記載のムテイン。

【請求項 6】

ムテインのアミノ酸配列が、成熟hNGALの直鎖ポリペプチド配列 (SEQ ID NO:2) と比較して、以下の変異アミノ酸の組のうちの1組を含む、請求項1記載のムテイン:

20

(a) Gln 28 His, Leu 36 Gln, Ala 40 Ile, Ile 41 Lys, Gln 49 Asn, Tyr 52 Met, Ser 68 Gly, Leu 70 Thr, Arg 72 Asp, Lys 73 Asp, Asp 77 Thr, Trp 79 Ala, Arg 81 Ser, Cys 87 Ser, Asn 96 Lys, Tyr 100 Phe, Leu 103 His, Tyr 106 Ser, Lys 125 Phe, Ser 127 Phe, Tyr 132 Glu および Lys 134 Tyr;

(b) Gln 28 His, Leu 36 Gln, Ala 40 Ile, Ile 41 Arg, Gln 49 Ile, Tyr 52 Met, Asn 65 Asp, Ser 68 Met, Leu 70 Lys, Arg 72 Asp, Lys 73 Asp, Asp 77 Met, Trp 79 Asp, Arg 81 Trp, Cys 87 Ser, Asn 96 Lys, Tyr 100 Phe, Leu 103 His, Tyr 106 Ser, Lys 125 Phe, Ser 127 Phe, Tyr 132 Glu および Lys 134 Tyr;

30

(c) Gln 28 His, Leu 36 Gln, Ala 40 Ile, Ile 41 Arg, Gln 49 Asn, Tyr 52 Met, Asn 65 Asp, Ser 68 Ala, Leu 70 Ala, Arg 72 Asp, Lys 73 Asp, Asp 77 Thr, Trp 79 Asp, Arg 81 Trp, Cys 87 Ser, Asn 96 Lys, Tyr 100 Phe, Leu 103 His, Tyr 106 Ser, Lys 125 Phe, Ser 127 Phe, Tyr 132 Glu および Lys 134 Tyr;

(d) Gln 28 His, Leu 36 Gln, Ala 40 Ile, Ile 41 Lys, Gln 49 Asn, Tyr 52 Met, Asn 65 Asp, Ser 68 Ala, Leu 70 Ala, Arg 72 Asp, Lys 73 Asp, Asp 77 Thr, Trp 79 Asp, Arg 81 Trp, Cys 87 Ser, Asn 96 Lys, Tyr 100 Phe, Leu 103 His, Tyr 106 Ser, Lys 125 Phe, Ser 127 Phe, Tyr 132 Glu および Lys 134 Tyr;

40

(e) Gln 28 His, Leu 36 Gln, Ala 40 Ile, Ile 41 Lys, Gln 49 Ser, Tyr 52 Met, Asn 65 Asp, Ser 68 Gly, Leu 70 Ser, Arg 72 Asp, Lys 73 Asp, Asp 77 Thr, Trp 79 Ala, Arg 81 Met, Cys 87 Ser, Asn 96 Lys, Tyr 100 Phe, Leu 103 His, Tyr 106 Ser, Lys 125 Phe, Ser 127 Phe, Tyr 132 Glu および Lys 134 Tyr;

(f) Gln 28 His, Leu 36 Gln, Ala 40 Ile, Ile 41 Lys, Gln 49 Val, Tyr 52 Met, Asn 65 Asp, Ser 68 Gly, Leu 70 Thr, Arg 72 Asp, Lys 73 Asp, Asp 77 Arg, Trp 79 Asp, Arg 81 Ser, Cys 87 Ser, Leu 94 Phe, Asn 96 Lys, Tyr 100 Phe, Leu 103 His, Tyr 106 Ser, Lys 125 Phe

50

, Ser 127 Phe, Tyr 132 GluおよびLys 134 Tyr;
 (g)Gln 28 His, Leu 36 Gln, Ala 40 Ile, Ile 41 Arg, Gln 49 His, Tyr 52 Met, Asn 65 Asp, Ser 68 Gly, Leu 70 Thr, Arg 72 Asp, Lys 73 Asp, Asp 77 Thr, Trp 79 Ala, Arg 81 Ser, Cys 87 Ser, Asn 96 Lys, Tyr 100 Phe, Leu 103 His, Tyr 106 Ser, Lys 125 Phe, Ser 127 Phe, Tyr 132 GluおよびLys 134 Tyr;

(h)Gln 28 His, Leu 36 Gln, Ala 40 Ile, Ile 41 Lys, Gln 49 Asn, Tyr 52 Met, Asn 65 Asp, Ser 68 Gly, Leu 70 Thr, Arg 72 Asp, Lys 73 Asp, Asp 77 Thr, Trp 79 Ala, Arg 81 Ser, Phe 83 Leu, Cys 87 Ser, Leu 94 Phe, Asn 96 Lys, Tyr 100 Phe, Leu 103 His, Tyr 106 Ser, Lys 125 Phe, Ser 127 Phe, Tyr 132 GluおよびLys 134 Tyr; または

(i)Gln 28 His, Leu 36 Gln, Ala 40 Ile, Ile 41 Arg, Gln 49 Ser, Tyr 52 Met, Asn 65 Asp, Ser 68 Ala, Leu 70 Thr, Arg 72 Asp, Lys 73 Asp, Asp 77 Asn, Trp 79 Ala, Arg 81 Ser, Cys 87 Ser, Asn 96 Lys, Tyr 100 Phe, Leu 103 His, Tyr 106 Ser, Lys 125 Phe, Ser 127 Phe, Tyr 132 GluおよびLys 134 Tyr。

【請求項 7】

ムテインのアミノ酸配列が、成熟hNGALの直鎖ポリペプチド配列 (SEQ ID NO:2) と比較して、以下の変異アミノ酸の組を含む、請求項1記載のムテイン:

Gln 28 His, Leu 36 Gln, Ala 40 Ile, Ile 41 Lys, Gln 49 Asn, Tyr 52 Met, Ser 68 Gly, Leu 70 Thr, Arg 72 Asp, Lys 73 Asp, Asp 77 Thr, Trp 79 Ala, Arg 81 Ser, Cys 87 Ser, Asn 96 Lys, Tyr 100 Phe, Leu 103 His, Tyr 106 Ser, Lys 125 Phe, Ser 127 Phe, Tyr 132 Glu, およびLys 134 Tyr。

【請求項 8】

ムテインのアミノ酸配列が、成熟hNGALの直鎖ポリペプチド配列 (SEQ ID NO:2) と比較して、以下の変異アミノ酸の組を含む、請求項1記載のムテイン:

Gln 28 His, Leu 36 Gln, Ala 40 Ile, Ile 41 Arg, Gln 49 Ile, Tyr 52 Met, Asn 65 Asp, Ser 68 Met, Leu 70 Lys, Arg 72 Asp, Lys 73 Asp, Asp 77 Met, Trp 79 Asp, Arg 81 Trp, Cys 87 Ser, Asn 96 Lys, Tyr 100 Phe, Leu 103 His, Tyr 106 Ser, Lys 125 Phe, Ser 127 Phe, Tyr 132 Glu, およびLys 134 Tyr。

【請求項 9】

ムテインのアミノ酸配列が、成熟hNGALの直鎖ポリペプチド配列 (SEQ ID NO:2) と比較して、以下の変異アミノ酸の組を含む、請求項1記載のムテイン:

Gln 28 His, Leu 36 Gln, Ala 40 Ile, Ile 41 Arg, Gln 49 Asn, Tyr 52 Met, Asn 65 Asp, Ser 68 Ala, Leu 70 Ala, Arg 72 Asp, Lys 73 Asp, Asp 77 Thr, Trp 79 Asp, Arg 81 Trp, Cys 87 Ser, Asn 96 Lys, Tyr 100 Phe, Leu 103 His, Tyr 106 Ser, Lys 125 Phe, Ser 127 Phe, Tyr 132 Glu, およびLys 134 Tyr。

【請求項 10】

ムテインのアミノ酸配列が、成熟hNGALの直鎖ポリペプチド配列 (SEQ ID NO:2) と比較して、以下の変異アミノ酸の組を含む、請求項1記載のムテイン:

Gln 28 His, Leu 36 Gln, Ala 40 Ile, Ile 41 Lys, Gln 49 Asn, Tyr 52 Met, Asn 65 Asp, Ser 68 Ala, Leu 70 Ala, Arg 72 Asp, Lys 73 Asp, Asp 77 Thr, Trp 79 Asp, Arg 81 Trp, Cys 87 Ser, Asn 96 Lys, Tyr 100 Phe, Leu 103 His, Tyr 106 Ser, Lys 125 Phe, Ser 127 Phe, Tyr 132 Glu, およびLys 134 Tyr。

【請求項 11】

CD137へのCD137Lの結合を妨害しない、請求項6～10のいずれか一項記載のムテイン。

10

20

30

40

50

【請求項 1 2】

SEQ ID NO:12～20からなる群より選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項6記載のムテイン。

【請求項 1 3】

SEQ ID NO:12～20からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、請求項1記載のムテイン。

【請求項 1 4】

SEQ ID NO:12のアミノ酸配列を含む、請求項1記載のムテイン。

【請求項 1 5】

SEQ ID NO:13のアミノ酸配列を含む、請求項1記載のムテイン。

10

【請求項 1 6】

SEQ ID NO:14のアミノ酸配列を含む、請求項1記載のムテイン。

【請求項 1 7】

SEQ ID NO:15のアミノ酸配列を含む、請求項1記載のムテイン。

【請求項 1 8】

有機分子、酵素標識、放射性標識、着色標識、蛍光標識、発色標識、発光標識、ハプテン、ジゴキシゲニン、ピオチン、細胞分裂阻害剤、毒素、金属錯体、金属、およびコロイド金からなる群より選択される化合物にコンジュゲートされている、請求項1～17のいずれか一項記載のムテイン。

【請求項 1 9】

20

N末および/またはC末において、タンパク質またはタンパク質ドメインもしくはペプチドである融合パートナーに融合されている、請求項1～17のいずれか一項記載のムテイン。

【請求項 2 0】

ポリアルキレングリコール分子、ポリエチレングリコール(PEG)分子、ヒドロキシエチルデンプン、免疫グロブリンのFc部分、免疫グロブリンのCH3ドメイン、免疫グロブリンのCH4ドメイン、アルブミン結合ペプチド、およびアルブミン結合タンパク質からなる群より選択されるムテインの血清中半減期を延ばす化合物にコンジュゲートされている、請求項1～17のいずれか一項記載のムテイン。

【請求項 2 1】

30

請求項1～20のいずれか一項記載のムテインをコードするヌクレオチド配列を含む核酸分子。

【請求項 2 2】

請求項21記載の核酸分子を含有する宿主細胞。

【請求項 2 3】

ムテインをコードする核酸から出発して遺伝子工学の方法を使ってムテインが生産される、請求項1～20のいずれか一項記載のムテインを生産する方法。

【請求項 2 4】

CD137の結合に使用するための、請求項1～20のいずれか一項記載のリボカリンムテイン。

40

【請求項 2 5】

CD137の下流シグナリング経路活性化に使用するための、請求項1～20のいずれか一項記載のリボカリンムテイン。

【請求項 2 6】

Tリンパ球増殖の誘発に使用するための、請求項1～20のいずれか一項記載のリボカリンムテイン。

【請求項 2 7】

CD137へのCD137Lの結合妨害に使用するための、請求項2～5のいずれか一項記載のリボカリンムテイン。

【請求項 2 8】

50

炎症誘発性サイトカインおよびケモカインの生産の低減に使用するための、請求項2~5のいずれか一項記載のリポカリンムテイン。

【請求項 2 9】

請求項1~20のいずれか一項記載のリポカリンムテインを含む、薬学的組成物。

【発明の詳細な説明】

【背景技術】

【0001】

I. 背景

CD137は、腫瘍壊死因子受容体 (TNFR) スーパーファミリー分子であり、その活性は、免疫が介在する多くの自己免疫疾患および炎症性疾患に関与しうる。これはがん免疫治療のターゲットでもある。

【0002】

CD137シグナリングは、抗原に対する免疫応答の維持および拡大にとっても、メモリーT細胞の生成にとっても、始原的であることが示されている。CD137が、細胞の増殖、生存およびサイトカイン生産の強化を助長することは、数多くのマウスおよびヒトT細胞研究が示している (Croft, 2009, Nat Rev Immunol 9:271-285 (非特許文献1))。いくつかのCD137アゴニストmAbは共刺激分子発現を増加させ、細胞溶解性Tリンパ球応答を著しく強化し、さまざまなモデルにおいて抗腫瘍効力をもたらし、研究によって示されている。CD137アゴニストmAbは予防および治療の場におけるその効力が証明されている。さらに、CD137単独治療および併用治療の腫瘍モデルは、長続きする抗腫瘍性防御T細胞メモリー応答を樹立している (Lynch, 2008, Immunol Rev. 22:277-286 (非特許文献2))。CD137アゴニストは、当技術分野において認識されているさまざまな自己免疫モデルにおいて、自己免疫反応を阻害することも示されている (Vinay, 2006, J Mol Med 84:726-736 (非特許文献3))。CD137のこの二重の活性は、免疫寛容を破る免疫治療アプローチに付随しうる自己免疫副作用を弱めつつ、抗腫瘍活性を与える可能性をもたらす。

【0003】

それゆえに、免疫応答の調節におけるCD137の役割に基づいて、ヒトCD137に結合し、CD137が媒介する応答を増加させ、それによって、がん、感染性疾患、および自己免疫疾患のようなさまざまな疾患および状態を処置または防止するための治療薬になりうる化合物が長く必要とされてきたが、そのニーズはまだ満たされていない。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0004】

【非特許文献1】 Croft, 2009, Nat Rev Immunol 9:271-285

【非特許文献2】 Lynch, 2008, Immunol Rev. 22:277-286

【非特許文献3】 Vinay, 2006, J Mol Med 84:726-736

【発明の概要】

【0005】

したがって、リポカリンから誘導されるムテインであるそのような化合物を提供することが、本発明の目的である。さまざまなリポカリンのムテインは、急速に拡大しつつある一群の治療薬であり、高度に洗練された人為的操作によって、野生型リポカリンの天然リガンドとは異なるターゲットに対して高い親和性および特異性を呈するように構築することができる (例えばWO 99/16873、WO 00/75308、WO 03/029463、WO 03/029471およびWO 05/19256を参照されたい)。

【0006】

II. 定義

以下の一覧では、本明細書の全体を通して使用される用語、語句、および略号を定義する。本明細書に列挙して定義する用語はいずれも、すべての文法形式を包含するものとする。

【0007】

10

20

30

40

50

別段の明記がある場合を除き、本明細書において「CD137」とは、ヒトCD137を意味する。CD137は、「4-1BB」または「腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリーメンバー9 (TNFRSF9)」または「ILA (induced by lymphocyte activation)」としても公知である。ヒトCD137とは、UniProt Q07011によって規定される完全長タンパク質、そのフラグメント、またはその変異体を意味する。

【0008】

本明細書において「検出可能な親和性」とは、一般に少なくとも約 10^{-5} M以下の親和性定数で、選択されたターゲットに結合する能力を意味する。これより低い親和性は、一般に、ELISAなどの一般的な方法ではもはや測定することができず、それゆえに、あまり重要ではない。

10

【0009】

本明細書において、選択されたターゲット（この場合はCD137）に対する、本開示のタンパク質（例えばリポカリンのムテイン）またはその融合ポリペプチドの「結合親和性」は、当業者に公知の数多くの方法によって測定することができる（そしてそれによってムテイン-リガンド複合体のKD値が決定される）。そのような方法には、蛍光滴定、競合ELISA、等温滴定熱量測定（ITC）などの熱量測定法、および表面プラズモン共鳴（Biacore）などがあるが、それらに限定されるわけではない。そのような方法は当技術分野において確立されており、その例を以下にも詳述する。

【0010】

また、それぞれの結合物質とそのリガンドとの間の複合体形成は、それぞれの結合パートナーの濃度、競合物質の存在、使用する緩衝系のpHおよびイオン強度、ならびに解離定数 K_D の決定に使用される実験方法（例えば蛍光滴定、競合ELISAまたは表面プラズモン共鳴であるが、これらはほんのいくつかの例にすぎない）、さらには実験データの評価に使用される数学的アルゴリズムなどといった、多種多様な因子の影響を受けることに注意されたい。

20

【0011】

それゆえに、所与のリガンドに対する特定リポカリンムテインの親和性を決定するために使用される方法および実験装置に依存して、 K_D 値（それぞれの結合物質とそのターゲット/リガンドとの間に形成される複合体の解離定数）が一定の実験範囲内で変動しうるとは、当業者にとっては明らかである。これは、例えばその K_D 値が表面プラズモン共鳴（Biacore）で決定されたか、競合ELISAで決定されたか、または「直接ELISA」で決定されたかなどに依存して、測定される K_D 値にはわずかな偏差、または許容誤差範囲が存在しうることを意味する。

30

【0012】

本明細書にいう「ムテイン」、「変異 (mutated)」実体 (entity)（タンパク質であるか核酸であるかを問わない）、または「突然変異体 (mutant)」とは、天然（野生型）の核酸またはタンパク質「リファレンス」スキャフォールドと比較した、1つまたは複数のヌクレオチドまたはアミノ酸の交換、欠失、または挿入を指す。この用語は、本明細書に記載するムテインおよび変異体 (variant) のフラグメントも包含する。本発明のリポカリンムテイン、そのフラグメントまたは変異体は、好ましくは、本明細書に記載するよう

40

【0013】

本開示のムテインに関連して本明細書において使用する用語「フラグメント」は、N末および/またはC末が短縮された、すなわち少なくとも1つのN末および/またはC末アミノ酸を欠く、完全長成熟ヒト涙液リポカリンから誘導されるタンパク質またはペプチドに関する。そのようなフラグメントは、成熟リポカリンの一次配列のうちの少なくとも10個またはそれ以上、例えば20個もしくは30個またはそれ以上の連続アミノ酸を含むことができ、通常は、成熟リポカリンのイムノアッセイで検出可能である。一般に、本開示のリポカリンムテインの、または本開示による組み合わせの、または本明細書に記載する融合タンパク質の、対応タンパク質リガンドであるCD137に関連して本明細書において使用する用語

50

「フラグメント」は、N末および/またはC末が短縮されたタンパク質またはペプチドリガンドであって、本開示のムテインによって認識されかつ/または結合されるという完全長リガンドの能力を保っているものに関する。

【0014】

本明細書において使用する用語「突然変異誘発」は、成熟リボカリンの所与の配列位置に本来存在するアミノ酸を、それぞれの天然ポリペプチド配列中のその特定位置には存在しない少なくとも1つのアミノ酸で置換することができるように、実験条件が選ばれることを意味する。「突然変異誘発」という用語は、1つまたは複数のアミノ酸の欠失または挿入による配列セグメントの長さの（付加的）修飾も包含する。したがって、例えば、選ばれた配列位置にある1つのアミノ酸が、一続きになった3つのランダム突然変異で置き換えられて、野生型タンパク質のそれぞれのセグメントの長さと比較して2つのアミノ酸残基が挿入されたことになるのは、本開示の範囲内である。そのような挿入または欠失は、本開示において突然変異誘発の対象となりうるペプチドセグメントのいずれにおいても、互いに独立して導入されうる。本開示の例示的一態様では、数個の突然変異の挿入が、選ばれたリボカリンスキャフォールドのループAB中に導入されうる（国際特許出願WO 2005/019256参照。この特許出願は参照によりその全体が本明細書に組み入れられる）。

10

【0015】

「ランダム突然変異誘発」という用語は、前もって決定された単一アミノ酸（突然変異）が一定の配列位置に存在するのではなくて、突然変異誘発中に所定の配列位置に少なくとも2種類のアミノ酸が一定の確率で組み込まれうることを意味する。

20

【0016】

「同一性」とは、配列間の類似性または関係性を測る配列の一特性である。本開示において使用する「配列同一性」または「同一性」という用語は、本開示のポリペプチドの配列を問題の配列と（相同）アラインメントした後の、それら2つの配列のうちの長い方の残基数を基準とした、ペアごとの同一残基のパーセンテージを意味する。配列同一性は、同一アミノ酸残基の数を残基の総数で割り、その結果に100を掛けることによって測られる。

【0017】

「相同性」という用語は、本明細書では、その通常の意味で使用され、本開示のポリペプチド（例えば本開示の任意のリボカリンムテイン）の直鎖アミノ酸配列において等価な位置にある同一アミノ酸ならびに保存的置換とみなされるアミノ酸（例えばアスパラギン酸残基によるグルタミン酸残基の交換）を包含する。

30

【0018】

配列相同性または配列同一性のパーセンテージは、ここでは、例えばプログラムBLASTP、バージョンblastp 2.2.5（2002年11月16日；Altschul, S. F. et al. (1997) Nucl. Acids Res. 25, 3389-3402参照）を使って決定することができる。この態様において、相同性のパーセンテージは、プロペプチド配列を含む全ポリペプチド配列のアラインメントに基づき（行列：BLOSUM 62；ギャップコスト：11.1；カットオフ値は 10^{-3} に設定）、好ましくは野生型タンパク質スキャフォールドを、ペアワイズ比較におけるリファレンスとして使用する。これは、アラインメントのためにプログラムが選択したアミノ酸の総数で割った、BLASTPプログラム出力に結果として示される「ポジティブ（positive）」（相同アミノ酸）の数のパーセンテージとして計算される。

40

【0019】

具体的には、野生型リボカリンとは異なるリボカリン（ムテイン）のアミノ酸配列のアミノ酸残基が、野生型リボカリンのアミノ酸中の一定の位置に対応するかどうかを決定するために、当業者は、例えば手作業によるアラインメント、またはBLAST2.0（Basic Local Alignment Search Toolの略）もしくはClustalWなどのコンピュータプログラム、または配列アラインメントを作成するのに適した他の任意の適切なプログラムを使ったアラインメントなど、当技術分野において周知の手段および方法を使用することができる。したがって、野生型リボカリンが「対象配列」または「リファレンス配列」として役立ちうる

50

のに対して、本明細書に記載する野生型リポカリンとは異なるリポカリンのアミノ酸配列は「クエリー配列」になる。「リファレンス配列」および「野生型配列」という用語は、本明細書では相互可換的に使用される。好ましい野生型リポカリンをSEQ ID NO:1 (Tlc) またはSEQ ID NO:2 (NGAL) にそれぞれ示す。本発明のリポカリンムテインがそれぞれTlcに基づくかNGALに基づくかに応じて、対応野生型リポカリンをリファレンス配列または野生型配列として使用しうる。

【0020】

「ギャップ」とは、アミノ酸の付加または欠失の結果であるアラインメント中の空白をいう。したがって、厳密に同じ配列である2つのコピーは100%の同一性を有するが、それほど高度には保存されていない、欠失、付加、または置き換えを有する配列は、それより程度の低い配列同一性を有しうる。標準的なパラメータを使って配列同一性を決定するために、例えばBlast (Altschul, et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25, 3389-3402)、Blast2 (Altschul, et al. (1990) J. Mol. Biol. 215, 403-410)、およびSmith-Waterman (Smith, et al. (1981) J. Mol. Biol. 147, 195-197) など、いくつかのコンピュータプログラムが利用可能であることは、当業者にはわかるであろう。

【0021】

本開示において使用する用語「変異体」は、置換、欠失、挿入または化学修飾などによるアミノ酸配列の修飾を含む、タンパク質またはペプチドの誘導体に関する。そのような修飾は、いくつかの態様では、タンパク質またはペプチドの機能性を低減しない。そのような変異体には、1つまたは複数のアミノ酸が各々のD-立体異性体で置き換えられているか、20種類の天然アミノ酸以外のアミノ酸、例えばオルニチン、ヒドロキシプロリン、シトルリン、ホモセリン、ヒドロキシリジン、ノルバリンなどで置き換えられている、タンパク質が包含される。しかし、そのような置換は保存的であってもよく、すなわちアミノ酸残基は、化学的に類似するアミノ酸残基で置き換えられる。保存的置換の例は、以下のグループのメンバー間での置き換えである: 1) アラニン、セリン、およびスレオニン; 2) アスパラギン酸およびグルタミン酸; 3) アスパラギンおよびグルタミン; 4) アルギニンおよびリジン; 5) イソロイシン、ロイシン、メチオニン、およびバリン; ならびに 6) フェニルアラニン、チロシン、およびトリプトファン。本開示のリポカリンムテインの、または本開示による組み合わせの、または本明細書に記載する融合タンパク質の、対応タンパク質リガンドであるCD137に関連して本明細書において使用する用語「変異体」は、それぞれ野生型CD137タンパク質、例えば本明細書に記載するとおりSwissProtに登録されたCD137リファレンスタンパク質と比較して、1つまたは複数の、例えば1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、40、50、60、70、80個またはそれ以上の、アミノ酸の置換、欠失および/または挿入を有する、それぞれ、CD137またはそのフラグメントに関する。CD137変異体は、それぞれ、好ましくは、野生型ヒトCD137、例えば本明細書に記載するとおりSwissProtに登録されたCD137リファレンスタンパク質に対して、少なくとも50%、60%、70%、80%、85%、90%または95%のアミノ酸同一性を有する。

【0022】

「ネイティブ配列」リポカリンとは、自然から得られる対応ポリペプチドと同じアミノ酸配列を有するリポカリンを意味する。したがってネイティブ配列リポカリンは、任意の生物からの、特に哺乳動物からの、それぞれの天然リポカリンのアミノ酸配列を有することができる。そのようなネイティブ配列ポリペプチドは、自然から単離するか、組換え手段または合成手段によって生産することができる。「ネイティブ配列」ポリペプチドという用語は、リポカリンの天然切断型または天然分泌型、リポカリンの天然変異体型、例えば選択的スプライス型または天然対立遺伝子変異体を、特に包含する。ポリペプチド「変異体」とは、ネイティブ配列ポリペプチドに対して少なくとも約50%、60%、70%、80%または少なくとも約85%のアミノ酸配列同一性を有する、生物学的に活性なポリペプチドを意味する。そのような変異体には、例えば、ポリペプチドのN末またはC末において1つまたは複数のアミノ酸残基が付加されまたは欠失しているポリペプチドが含まれる。一般

に変異体は、ネイティブ配列ポリペプチドに対して、少なくとも約70%の、例えば少なくとも約80%、例えば少なくとも約85%の、アミノ酸配列同一性、例えば少なくとも約90%のアミノ酸配列同一性、または少なくとも約95%のアミノ酸配列同一性を有する。具体例として、本開示の涙液リポカリン (Tlc) ムテインでは、タンパク質の生物学的機能に影響を及ぼすことなく、N末の最初の4アミノ酸残基 (His-His-Leu-Leu) およびC末の最後の2アミノ酸残基 (Ser-Asp) を欠失させることができる。例えばSEQ ID NO:5~11。加えて、別の具体例として、本開示のリポカリン2 (NGAL) ムテインでは、タンパク質の生物学的機能に影響を及ぼすことなく、一定のアミノ酸残基を、例えばSEQ ID NO:16については (Lys-Asp-Pro、位置46~48) を、欠失させることができる。

【0023】

本開示において使用する場合、「位置」という用語は、本明細書に示すアミノ酸配列内でのアミノ酸の位置、または本明細書に示す核酸配列内でのヌクレオチドの位置を意味する。1つまたは複数のリポカリンムテインのアミノ酸配列位置との関連で本明細書において使用される「対応する」または「対応」という用語を理解するために、対応位置は、先行するヌクレオチド/アミノ酸の数だけでは決定されない。したがって、本開示によれば、置換されうる所与のアミノ酸の位置は、(突然変異体または野生型) リポカリン中の他のどこかにあるアミノ酸の欠失または付加ゆえに、変動しうる。同様に、本開示によれば、置換されうる所与のヌクレオチドの位置も、ムテインまたは野生型リポカリン5'-非翻訳領域 (UTR)、例えばプロモーターおよび/または他の任意の制御配列もしくは制御遺伝子 (エクソンおよびイントロンを含む) 中の他のどこかにある欠失または追加ヌクレオチドゆえに、変動しうる。

【0024】

このように、本開示による対応位置に関して、ヌクレオチド/アミノ酸の位置は、類似の隣接ヌクレオチド/アミノ酸とは、表示される数字の点で異なりうるが、交換、欠失または付加されうる該隣接ヌクレオチド/アミノ酸も、当該1つまたは複数の対応位置によって含まれると理解されることが好ましい。

【0025】

加えて、本開示によるリファレンススキャフォールドに基づくリポカリンムテイン中の対応位置については、リポカリン間の高度に保存された全体的フォールディングパターンに照らして当業者には理解されたとおり、ヌクレオチド/アミノ酸の位置は、たとえそれらが表示される数字の点で異なっていたとしても、(突然変異体または野生型) リポカリン中の他のどこかにある位置と、構造的に対応していると理解されることが好ましい。

【0026】

「アルブミン」という用語は、ヒト血清アルブミンまたはウシ血清アルブミンまたはラット血清アルブミンなど、すべての哺乳動物アルブミンを包含する。

【0027】

非天然ターゲットに関して本明細書において使用する用語「有機分子」または「小有機分子」は、少なくとも2つの炭素原子を含むが、回転可能な炭素結合の数は好ましくは7または12を越えず、100~2000ダルトン、好ましくは100~1000ダルトンの範囲の分子量を有し、1つまたは2つの金属原子を含んでもよい有機分子を表す。

【0028】

本明細書において使用する「検出する」、「検出」、「検出可能な」または「検出すること」という単語は、定量的レベルおよび定性的レベルの両方で、ならびにそれらの組み合わせで、理解される。したがってこれは、関心対象の分子の定量的、半定量的および定性的測定を包含する。

【0029】

「対象」は脊椎動物、好ましくは哺乳動物、より好ましくはヒトである。「哺乳動物」という用語は、本明細書では、哺乳動物に分類される任意の動物を指すために使用され、ヒト、家畜および農用動物、ならびに動物園動物、スポーツ動物、またはペット動物、例えばヒツジ、イヌ、ウマ、ネコ、ウシ、ラット、ブタ、サル、例えばカニクイザルなどを

10

20

30

40

50

含むが、ここでは具体例をいくつか挙げただけで、これらに限定されるわけではない。好ましくは、本明細書における哺乳動物はヒトである。

【0030】

「有効量」とは、有益な結果または所望の結果を達成するのに十分な量である。有効量は1回または複数回の投与で投与することができる。

【0031】

「試料」は、任意の対象から採取された生物学的試料と定義される。生物学的試料には、血液、血清、尿、糞便、精液、または組織が含まれるが、それらに限定されるわけではない。

[本発明1001]

KDが約300nM以下である親和性でCD137に結合する能力を有するリボカリンムテイン。

10

[本発明1002]

成熟ヒト涙液リボカリンの直鎖ポリペプチド配列 (SEQ ID NO:1) の配列位置5、26~31、33~34、42、46、52、56、58、60~61、65、71、85、94、101、104~106、108、111、114、121、133、148、150および153に少なくとも1つの変異アミノ酸残基を含む、本発明1001のムテイン。

[本発明1003]

ムテインのアミノ酸配列が、成熟ヒト涙液リボカリンの直鎖ポリペプチド配列 (SEQ ID NO:1) と比較して以下の変異アミノ酸残基のうちの少なくとも1つを含む、本発明1002のムテイン：
Ala 5 →

20

ValまたはThr; Arg 26 → Glu; Glu 27 → Gly; Phe 28 → Cys; Pro 29 → Arg; Glu 30 → Pro; Met 31 → Trp; Leu 33 → Ile; Glu 34 → Phe; Thr 42 → Ser; Gly 46 → Asp; Lys 52 → Glu; Leu 56 → Ala; Ser 58 → Asp; Arg 60 → Pro; Cys 61 → Ala; Lys 65 → ArgまたはAsn; Thr 71 → Ala; Val 85 → Asp; Lys 94 → ArgまたはGlu; Cys 101 → Ser; Glu 104 → Val; Leu 105 → Cys; His 106 → Asp; Lys 108 → Ser; Arg 111 → Pro; Lys 114 → Trp; Lys 121 → Glu; Ala 133 → Thr; Arg 148 → Ser; Ser 150 → IleおよびCys 153 → Ser

30

[本発明1004]

本質的に実施例4に記載するように表面プラズモン共鳴 (SPR) 分析によって測定した場合に、KDが約270nM以下である親和性でCD137に結合する、本発明1002または1003のいずれかのムテイン。

[本発明1005]

本質的に実施例6に記載するようにFACS分析によって測定した場合に、約250nM以下のEC50値でCD137に結合する、本発明1002または1003のいずれかのムテイン。

[本発明1006]

ムテインのアミノ酸配列が以下の組のアミノ酸置換のうちの1組を含む、本発明1002~1005のいずれかのムテイン：

40

(a) Arg 26 → Glu; Glu 27 → Gly; Phe 28 → Cys; Pro 29 → Arg; Glu 30 → Pro; Met 31 → Trp; Leu 33 → Ile; Glu 34 → Phe; Leu 56 → Ala; Ser 58 → Asp; Arg 60 → Pro; Cys 61 → Ala; Cys 101 → Ser; Glu 104 → Val; Leu 105 → Cys; His 106 → Asp; Lys 108 → Ser; Arg 111 → Pro; Lys 114 → Trp; Cys 153 → Ser;

(b) Ala 5 → Thr; Arg 26 → Glu; Glu 27 → Gly; Phe 28 → Cys; Pro 29 → Arg; Glu 30 → Pro; Met 31 → Trp; Leu 33 → Ile; Glu 34 → Phe; Leu 56 → Ala; Ser 58 → Asp; Arg 60 → Pro; Cys 61 → Ala; Lys 65 → Arg; Val 85 → Asp; Cys 101 → Ser; Glu 104 → Val; Leu 105 → Cys; His 106 → Asp; Lys 108 → Ser; Arg 111 → Pro; Lys 114 → Trp; Lys 121 → Glu; Ala 133 → Thr; Cys 153 → Ser; 157 → Pro;

10

(c) Arg 26 → Glu; Glu 27 → Gly; Phe 28 → Cys; Pro 29 → Arg; Glu 30 → Pro; Met 31 → Trp; Leu 33 → Ile; Glu 34 → Phe; Leu 56 → Ala; Ser 58 → Asp; Arg 60 → Pro; Cys 61 → Ala; Lys 65 → Asn; Lys 94 → Arg; Cys 101 → Ser; Glu 104 → Val; Leu 105 → Cys; His 106 → Asp; Lys 108 → Ser; Arg 111 → Pro; Lys 114 → Trp; Lys 121 → Glu; Ala 133 → Thr; Cys 153 → Ser;

(d) Ala 5 → Val; Arg 26 → Glu; Glu 27 → Gly; Phe 28 → Cys; Pro 29 → Arg; Glu 30 → Pro; Met 31 → Trp; Leu 33 → Ile; Glu 34 → Phe; Leu 56 → Ala; Ser 58 → Asp; Arg 60 → Pro; Cys 61 → Ala; Lys 65 → Arg; Lys 94 → Glu; Cys 101 → Ser; Glu 104 → Val; Leu 105 → Cys; His 106 → Asp; Lys 108 → Ser; Arg 111 → Pro; Lys 114 → Trp; Lys 121 → Glu; Ala 133 → Thr; Cys 153 → Ser; 157 → Pro;

20

(e) Arg 26 → Glu; Glu 27 → Gly; Phe 28 → Cys; Pro 29 → Arg; Glu 30 → Pro; Met 31 → Trp; Leu 33 → Ile; Glu 34 → Phe; Thr 42 → Ser; Leu 56 → Ala; Ser 58 → Asp; Arg 60 → Pro; Cys 61 → Ala; Cys 101 → Ser; Glu 104 → Val; Leu 105 → Cys; His 106 → Asp; Lys 108 → Ser; Arg 111 → Pro; Lys 114 → Trp; Ser 150 → Ile; Cys 153 → Ser; 157 → Pro;

30

(f) Arg 26 → Glu; Glu 27 → Gly; Phe 28 → Cys; Pro 29 → Arg; Glu 30 → Pro; Met 31 → Trp; Leu 33 → Ile; Glu 34 → Phe; Lys 52 → Glu; Leu 56 → Ala; Ser 58 → Asp; Arg 60 → Pro; Cys 61 → Ala; Thr 71 → Ala; Cys 101 → Ser; Glu 104 → Val; Leu 105 → Cys; His 106 → Asp; Lys 108 → Ser; Arg 111 → Pro; Lys 114 → Trp; Ala 133 → Thr; Arg 148 → Ser; Ser 150 → Ile; Cys 153 → Ser; 157 → Pro;または

(g) Ala 5 → Thr; Arg 26 → Glu; Glu 27 → Gly; Phe 28 → Cys; Pro 29 → Arg; Glu 30 → Pro; Met 31 → Trp; Leu 33 → Ile; Glu 34 → Phe; Gly 46 → Asp; Leu 56 → Ala; Ser 58 → Asp; Arg 60 → Pro; Cys 61 → Ala; Thr 71 → Ala; Cys 101 → Ser; Glu 104 → Val; Leu 105 → Cys; His 106 → Asp; Lys 108 → Ser; Arg 111 → Pro; Lys 114 → Trp; Ser 150 → Ile; Cys 153 → Ser; 157 → Pro

40

。

[本発明1007]

本質的に実施例5に記載するように表面プラズモン共鳴（SPR）アッセイにおいて測定した場合に、CD137へのCD137Lの結合を妨害する能力を有する、本発明1002または1003のいずれかのムテイン。

[本発明1008]

50

SEQ ID NO:5～11からなる群またはそれらのフラグメントもしくは変異体からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、本発明1002～1005のいずれかのムテイン。

[本発明1009]

SEQ ID NO:5～11からなる群より選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも85%の配列同一性を有する、本発明1002～1005のいずれかのリボカリンムテイン。

[本発明1010]

成熟hNGALの直鎖ポリペプチド配列 (SEQ ID NO:2) の配列位置28、36、40～41、49、52、65、68、70、72～73、77、79、81、83、87、94、96、100、103、106、125、127、132および134に少なくとも1つの変異アミノ酸残基を含む、本発明1001のムテイン。

[本発明1011]

ムテインのアミノ酸配列が、成熟ヒト涙液リボカリンの直鎖ポリペプチド配列 (SEQ ID NO:2) と比較して、以下の変異アミノ酸残基のうちの少なくとも1つを含む、本発明1010のムテイン：

Gln 28 →

His; Leu 36 → Gln; Ala 40 → Ile; Ile 41 → ArgまたはLys; Gln 49 → Val, Ile, His, SerまたはAsn; Tyr 52 → Met; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Met, AlaまたはGly; Leu 70 → Ala, Lys, SerまたはThr; Arg 72 → Asp; Lys 73 → Asp; Asp 77 → Met, Arg, ThrまたはAsn; Trp 79 → AlaまたはAsp; Arg 81 → Met, TrpまたはSer; Phe 83 → Leu; Cys 87 → Ser; Leu 94 → Phe; Asn 96 → Lys; Tyr 100 → Phe; Leu 103 → His; Tyr 106 → Ser; Lys 125 → Phe; Ser 127 → Phe; Tyr 132 → Glu および Lys 134 → Tyr

。

[本発明1012]

本質的に実施例4に記載するように表面プラズモン共鳴 (SPR) 分析によって測定した場合に、KDが約150nM以下である親和性でCD137に結合する、本発明1010または1011のいずれかのムテイン。

[本発明1013]

本質的に実施例6に記載するようにFACS分析によって測定した場合に、約18nM以下のEC50値でCD137に結合する、本発明1010または1011のいずれかのムテイン。

[本発明1014]

本質的に実施例7に記載するように機能的T細胞活性化アッセイにおいて測定した場合に、SEQ ID NO:4の陰性対照と比較して、より高いIL-2濃度を誘導する能力を有する、本発明1010または1011のいずれかのムテイン。

[本発明1015]

本質的に実施例8に記載するように機能的T細胞活性化アッセイにおいて測定した場合に、SEQ ID NO:4の陰性対照と比較して、より高いIL-2濃度をもたらさない、本発明1010または1011のいずれかのムテイン。

[本発明1016]

本質的に実施例9に記載するように機能的T細胞活性化アッセイにおいて測定した場合に、SEQ ID NO:4の陰性対照と比較して、より高いIL-2およびIFN- γ 増殖を誘発する能力を有する、本発明1010または1011のいずれかのムテイン。

[本発明1017]

ムテインのアミノ酸配列が、以下の組のアミノ酸置換のうちの1組を含む、本発明1010～1016のいずれかのムテイン：

10

20

30

40

(a) Gln 28 → His; Leu 36 → Gln; Ala 40 → Ile; Ile 41 → Lys; Gln 49 → Asn; Tyr 52 → Met; Ser 68 → Gly; Leu 70 → Thr; Arg 72 → Asp; Lys 73 → Asp; Asp 77 → Thr; Trp 79 → Ala; Arg 81 → Ser; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Lys; Tyr 100 → Phe; Leu 103 → His; Tyr 106 → Ser; Lys 125 → Phe; Ser 127 → Phe; Tyr 132 → Glu; Lys 134 → Tyr;

(b) Gln 28 → His; Leu 36 → Gln; Ala 40 → Ile; Ile 41 → Arg; Gln 49 → Ile; Tyr 52 → Met; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Met; Leu 70 → Lys; Arg 72 → Asp; Lys 73 → Asp; Asp 77 → Met; Trp 79 → Asp; Arg 81 → Trp; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Lys; Tyr 100 → Phe; Leu 103 → His; Tyr 106 → Ser; Lys 125 → Phe; Ser 127 → Phe; Tyr 132 → Glu; Lys 134 → Tyr;

(c) Gln 28 → His; Leu 36 → Gln; Ala 40 → Ile; Ile 41 → Arg; Gln 49 → Asn; Tyr 52 → Met; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Ala; Leu 70 → Ala; Arg 72 → Asp; Lys 73 → Asp; Asp 77 → Thr; Trp 79 → Asp; Arg 81 → Trp; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Lys; Tyr 100 → Phe; Leu 103 → His; Tyr 106 → Ser; Lys 125 → Phe; Ser 127 → Phe; Tyr 132 → Glu; Lys 134 → Tyr;

(d) Gln 28 → His; Leu 36 → Gln; Ala 40 → Ile; Ile 41 → Lys; Gln 49 → Asn; Tyr 52 → Met; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Ala; Leu 70 → Ala; Arg 72 → Asp; Lys 73 → Asp; Asp 77 → Thr; Trp 79 → Asp; Arg 81 → Trp; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Lys; Tyr 100 → Phe; Leu 103 → His; Tyr 106 → Ser; Lys 125 → Phe; Ser 127 → Phe; Tyr 132 → Glu; Lys 134 → Tyr;

10

(e) Gln 28 → His; Leu 36 → Gln; Ala 40 → Ile; Ile 41 → Lys; Gln 49 → Ser; Tyr 52 → Met; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Gly; Leu 70 → Ser; Arg 72 → Asp; Lys 73 → Asp; Asp 77 → Thr; Trp 79 → Ala; Arg 81 → Met; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Lys; Tyr 100 → Phe; Leu 103 → His; Tyr 106 → Ser; Lys 125 → Phe; Ser 127 → Phe; Tyr 132 → Glu; Lys 134 → Tyr;

20

(f) Gln 28 → His; Leu 36 → Gln; Ala 40 → Ile; Ile 41 → Lys; Gln 49 → Val; Tyr 52 → Met; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Gly; Leu 70 → Thr; Arg 72 → Asp; Lys 73 → Asp; Asp 77 → Arg; Trp 79 → Asp; Arg 81 → Ser; Cys 87 → Ser; Leu 94 → Phe; Asn 96 → Lys; Tyr 100 → Phe; Leu 103 → His; Tyr 106 → Ser; Lys 125 → Phe; Ser 127 → Phe; Tyr 132 → Glu; Lys 134 → Tyr;

(g) Gln 28 → His; Leu 36 → Gln; Ala 40 → Ile; Ile 41 → Arg; Gln 49 → His; Tyr 52 → Met; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Gly; Leu 70 → Thr; Arg 72 → Asp; Lys 73 → Asp; Asp 77 → Thr; Trp 79 → Ala; Arg 81 → Ser; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Lys; Tyr 100 → Phe; Leu 103 → His; Tyr 106 → Ser; Lys 125 → Phe; Ser 127 → Phe; Tyr 132 → Glu; Lys 134 → Tyr;

30

(h) Gln 28 → His; Leu 36 → Gln; Ala 40 → Ile; Ile 41 → Lys; Gln 49 → Asn; Tyr 52 → Met; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Gly; Leu 70 → Thr; Arg 72 → Asp; Lys 73 → Asp; Asp 77 → Thr; Trp 79 → Ala; Arg 81 → Ser; Phe 83 → Leu; Cys 87 → Ser; Leu 94 → Phe; Asn 96 → Lys; Tyr 100 → Phe; Leu 103 → His; Tyr 106 → Ser; Lys 125 → Phe; Ser 127 → Phe; Tyr 132 → Glu; Lys 134 → Tyr;または

(i) Gln 28 → His; Leu 36 → Gln; Ala 40 → Ile; Ile 41 → Arg; Gln 49 → Ser; Tyr 52 → Met; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Ala; Leu 70 → Thr; Arg 72 → Asp; Lys 73 → Asp; Asp 77 → Asn; Trp 79 → Ala; Arg 81 → Ser; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Lys; Tyr 100 → Phe; Leu 103 → His; Tyr 106 → Ser; Lys 125 → Phe; Ser 127 → Phe; Tyr 132 → Glu; Lys 134 → Tyr

40

°
[本発明1018]

本質的に実施例5に記載するように表面プラズモン共鳴（SPR）アッセイにおいて測定した場合に、CD137へのCD137Lの結合を妨害しない、本発明1010または1011のいずれかのム

50

テイン。

[本発明1019]

SEQ ID NO:12～20からなる群またはそれらのフラグメントもしくは変異体からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、本発明1010～1016のいずれかのムテイン。

[本発明1020]

SEQ ID NO:12～20からなる群より選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも85%の配列同一性を有する、本発明1010～1016のいずれかのリポカリンムテイン。

[本発明1021]

有機分子、酵素標識、放射性標識、着色標識、蛍光標識、発色標識、発光標識、ハプテン、ジゴキシゲニン、ビオチン、細胞分裂阻害剤、毒素、金属錯体、金属、およびコロイド金からなる群より選択される化合物にコンジュゲートされている、本発明1001～1020のいずれかのリポカリンムテイン。

10

[本発明1022]

N末および/またはC末において、タンパク質またはタンパク質ドメインもしくはペプチドである融合パートナーに融合されている、本発明1001～1020のいずれかのリポカリンムテイン。

[本発明1023]

ムテインの血清中半減期を延ばす化合物にコンジュゲートされている、本発明1001～1020のいずれかのリポカリンムテイン。

[本発明1024]

20

血清中半減期を延ばす化合物が、ポリアルキレングリコール分子、ヒドロエチルデンプン(hydroethylstarch)、免疫グロブリンのFc部分、免疫グロブリンのCH3ドメイン、免疫グロブリンのCH4ドメイン、アルブミン結合ペプチド、およびアルブミン結合タンパク質からなる群より選択される、本発明1001～1020のいずれかのリポカリンムテイン。

[本発明1025]

ポリアルキレングリコールがポリエチレン(PEG)またはその活性化誘導体である、本発明1024のリポカリンムテイン。

[本発明1026]

本発明1001～1025のいずれかのムテインをコードするヌクレオチド配列を含む核酸分子。

30

[本発明1027]

本発明1026の核酸分子を含有する宿主細胞。

[本発明1028]

ムテインをコードする核酸から出発して遺伝子工学の方法を使ってムテインが生産される、本発明1001～1025のいずれかのムテインを生産する方法。

[本発明1029]

本発明1001～1025のいずれかの1つもしくは複数のリポカリンムテインまたはそのようなムテインを含む1つもしくは複数の組成物を適用する工程を含む、CD37の結合方法。

[本発明1030]

本発明1001～1025のいずれかの1つもしくは複数のリポカリンムテインまたはそのようなムテインを含む1つもしくは複数の組成物を適用する工程を含む、CD137の下流シグナリング経路を活性化する方法。

40

[本発明1031]

本発明1001～1025のいずれかの1つもしくは複数のリポカリンムテインまたはそのようなムテインを含む1つもしくは複数の組成物を適用する工程を含む、Tリンパ球増殖を誘発する方法。

[本発明1032]

本発明1007の1つもしくは複数のリポカリンムテインまたはそのようなムテインを含む1つもしくは複数の組成物を適用する工程を含む、CD137へのCD137Lの結合を妨害する方法。

50

[本発明1033]

本発明1007の1つもしくは複数のリポカリンムテインまたはそのようなムテインを含む1つもしくは複数の組成物を適用する工程を含む、炎症誘発性サイトカインおよびケモカインの生産を低減する方法。

【図面の簡単な説明】**【0032】****III. 図面の説明**

【図1】さまざまな代表的リポカリンムテイン（SEQ ID NOをグラフ中に示す）と、ターゲットとしてのヒトCD137（Fc融合物）との相互作用に関する、表面プラズモン共鳴（SPR）によるオン速度およびオフ速度の典型的測定である。抗ヒトIgG-Fc抗体によってターゲットを固定化し、抗ヒトIgG-Fc抗体は標準的なアミンカップリング化学を使ってセンサーチップに固定化した。リポカリンムテインを可溶性分析物として使用して、さまざまな濃度で、チップ表面を横切るように流した。試験したすべてのムテインで、ヒトターゲットであるヒトCD137-Fc融合タンパク質（huCD137-Fc）に対する明確なSPR結合シグナルがあり、一方、SEQ ID NO:3およびSEQ ID NO:4の陰性対照は、結合を呈さない。すべてのSEQ ID NOについて、図示したデータの当てはめ（1:1結合モデル）から得られる解離定数を、表1に掲載する。

【図2】SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:12およびSEQ ID NO:13のムテインが、CD137へのCD137リガンド（CD137L）の結合を妨害するかどうかを調べるために計画されたSPRに基づく実験の代表例である。これは、SPRセンサーチップ上でCD137とCD137Lとの複合体を生成させ、試験したリポカリンムテインがこの複合体に結合することができるか否かをチェックすることによって、調べられる。リファレンスとして、CD137をCD137Lの非存在下でリポカリンムテインと共にインキュベートする。図には、センサーグラムの中の関連する区間だけを掲載する。huCD137-Fc単独へのそれぞれのリポカリンムテインの結合に関するSPRトレースに、実線の軸を持つ矢印をつける。CD137Lで飽和させたhuCD137-Fcへのそれぞれのリポカリンムテインの結合に関するSPRトレースに、破線の軸を持つ矢印をつける。図2（A）は、SEQ ID NO:5が、CD137Lの存在下ではhuCD137-Fcに結合できないことを示している。図2（B）および図2（C）は、SEQ ID NO:12およびSEQ ID NO:13が、CD137Lの非存在下でも存在下でも、極めてよく似た応答でhuCD137-Fcに結合することを示しており、これは、これら2つのリポカリンムテインとCD137Lとの間には結合に関する競合がないことを示す。

【図3】哺乳動物細胞上に発現したヒトCD137への代表的リポカリンムテイン（SEQ ID NOをグラフ中に示す）の特異的結合を評価するために実行された蛍光活性化細胞選別（FACS）研究の代表例を表す。モックトランスフェクト細胞を陰性対照とした。

【図4】プラスチック製ディッシュ上にコーティングした場合にクラスター化とそれに伴うCD137シグナリングの下流シグナリングとを誘発することによってT細胞を共刺激する、一組の代表的CD137結合性リポカリンムテイン（SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14およびSEQ ID NO:15）の能力を評価するために実行された、T細胞活性化アッセイの結果を図示している。加えて、それぞれの結合物質がクラスター化の非存在下でアゴニスト活性を呈するかどうかを調べるために、可溶性リポカリンムテインとのインキュベーションによるT細胞の活性化も試験した。図4（A）では、リポカリンムテインを抗ヒトCD3抗体と一緒にプラスチック製ディッシュ上にコーティングし、次にその被覆表面上、可溶性抗ヒトCD28の存在下で、精製T細胞をインキュベートした。図4（B）では、抗ヒトCD3抗体をプラスチック製ディッシュ上にコーティングし、次にその被覆表面上、可溶性抗ヒトCD28および溶解状態にあるリポカリンムテインの存在下で、精製T細胞をインキュベートした。どちらの場合も、上清インターロイキン2（IL-2）レベルを読み出し情報とした。陰性対照としてSEQ ID NO:4を使用した。図4（A）の実験において、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14およびSEQ ID NO:15のリポカリンムテインでは、SEQ ID NO:4の陰性対照と比較して、T細胞活性化ゆえに、上清中のIL-2濃度が明らかに増加している。図4（B）での、溶解状態にあるリポカリンムテインを利用する実験については、試験したリポカリンムテインのいずれについて

も、陰性対照SEQ ID NO:4と比較して、上清中のIL-2濃度に有意な増加がない。図4(A)および図4(B)は、全体として、試験したリポカリンムテインが、所望の挙動を呈することを示している。すなわち、プラスチック被覆抗CD137μテインによるT細胞表面上でのCD137のクラスター化は所望のT細胞共刺激につながり、一方、溶解状態にあるそれぞれのμテインは、実施例4および図3に示すとおり、CD137に結合するものの、いかなるT細胞共刺激も誘発しない。

【図5】SEQ ID NO:13のCD137結合性リポカリンムテインを試験分子として利用したT細胞活性化実験の結果である。SEQ ID NO:4を陰性対照として使用した。実験は、付加的な最適未満の抗CD3および抗CD28によるT細胞刺激を利用して行い、読み出し情報を、図5(A)では、4時間BrdUパルスを使った3日間のインキュベーション後のT細胞の継続的増殖、図5(C)では上清IL-2濃度、そして図5(E)では上清IFN-gレベルとした。あるいは、最適未満の抗CD3濃度だけを利用し、読み出し情報を、図5(B)では継続的増殖、図5(D)では上清IL-2濃度、そして図5(F)では上清IFN-gレベルとした。この実験は、抗CD3/抗CD28刺激を利用した場合と抗CD3刺激だけを利用した場合との両方で、増殖、IL-2およびIFN-ガンマレベルのSEQ ID NO:13用量依存的増加を証明している。

【発明を実施するための形態】

【0033】

IV. 開示の詳細な説明

本明細書にいう「リポカリン」は、複数（好ましくは4つ）のループにより一端においてペアワイズに接続されることで結合ポケットを規定している複数（好ましくは8つ）のストランドを含む円柱状の プリーツシート超二次構造領域を有する、重量が約18~20 kDaの単量体型タンパク質と定義される。サイズ、形状、および化学的特徴が異なるターゲットを収容する能力をそれぞれが有するリポカリンファミリーメンバー間に、さまざまな異なる結合様式を生じさせるのは、他の点では剛直なりポカリンスキャフォールドにおけるループの多様性である（例えばFlower, D.R. (1996)、前掲、Flower, D.R. et al. (2000)、前掲、またはSkerra, A. (2000) Biochim. Biophys. Acta 1482, 337-350に概説されている）。事実、リポカリンタンパク質ファミリーは、広範なりガンドに結合するように自然に進化しており、それらが共有する全体的配列保存のレベルは異常に低い（多くの場合、配列同一性は20%未満である）にもかかわらず、高度に保存された全体的フォールディングパターンを保っている。さまざまなリポカリンにおける位置間の対応は当業者には周知である。例えば米国特許第7,250,297号を参照されたい。

【0034】

上記のとおり、リポカリンは、その超二次構造、すなわち4つのループにより一端においてペアワイズに接続されることで結合ポケットを規定している8つの ストランドを含む円柱状の プリーツシート超二次構造領域によって規定されるポリペプチドである。本開示は、本明細書において具体的に開示するリポカリンムテインに限定されない。この点に関して、本開示は、4つのループにより一端においてペアワイズに接続されることで結合ポケットを規定している8つの ストランドを含む円柱状の プリーツシート超二次構造領域を有するリポカリンムテインであって、前記4つのループのうちの少なくとも3つのそれぞれの少なくとも1つのアミノ酸が変異しており、CD137に検出可能な親和性で結合するのに有効であるリポカリンムテインに関する。

【0035】

一特定態様において、本明細書に開示するリポカリンムテインは、リポカリン-1、涙液プレアルブミンまたはフォン・エブネル腺タンパク質とも呼ばれるヒト涙液リポカリン（TLPCまたはTlc）のμテインである。本明細書において使用する用語「ヒト涙液リポカリン」または「Tlc」または「リポカリン-1」は、SWISS-PROT/UniProtデータバンクアクセス番号P31025（アイソフォーム1）の成熟ヒト涙液リポカリンを指す。SWISS-PROT/UniProtデータバンクアクセス番号P31025に示されるアミノ酸配列は、好ましい「リファレンス配列」として使用することができ、より好ましくは、SEQ ID NO:1に示すアミノ酸配列がリファレンス配列として使用される。

【0036】

別の一定態様において、本明細書に開示するリボカリンムテインは、ヒトリボカリン2のムテインである。本明細書において使用する用語「ヒトリボカリン2」または「ヒトLcn2」または「ヒトNGAL」は、SWISS-PROT/UniProtデータベースアクセス番号P80188の成熟ヒト好中球ゼラチナーゼ関連リボカリン(NGAL)を指す。本開示のヒトリボカリン2ムテインを、本明細書では、「hNGALムテイン」と呼ぶ場合もある。SWISS-PROT/UniProtデータベースアクセス番号P80188に示されるアミノ酸配列は、好ましい「リファレンス配列」として使用することができ、より好ましくは、SEQ ID NO:2に示すアミノ酸配列がリファレンス配列として使用される。

【0037】

いくつかの態様において、CD137に検出可能な親和性で結合するリボカリンムテインは、ネイティブシステイン残基の、別のアミノ酸、例えばセリン残基による、アミノ酸置換を、少なくとも1つは含みうる。他のいくつかの態様において、CD137に検出可能な親和性で結合するリボカリンムテインは、野生型リボカリンの1つまたは複数のアミノ酸を置換する1つまたは複数の非ネイティブシステイン残基を含みうる。さらなる一定態様において、本開示によるリボカリンムテインは、システイン残基によるネイティブアミノ酸のアミノ酸置換を少なくとも2つは含み、それによって1つまたは複数のシステイン架橋を形成している。いくつかの態様において、該システイン架橋は少なくとも2つのループ領域を接続しうる。これらの領域の定義は、本明細書では、Flower (Flower, 1996、前掲、Flower, et al., 2000、前掲) およびBreustedt et al. (2005、前掲) に従って使用される。関連態様において、本開示は、CD137に結合することによってCD137の下流シグナリング経路を活性化する能力を有する1つまたは複数のリボカリンムテインを教示する。

【0038】

CD137に向けられた、またはCD137に特異的な、本開示のタンパク質は、明確なタンパク質スキュフォールドに基づく多くの特異的結合タンパク質ムテインを包含する。交換され、欠失し、または挿入されるヌクレオチドまたはアミノ酸のそれぞれの数は、好ましくは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19もしくは20個またはそれ以上、例えば25、30、35、40、45または50個であり、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、または11個は好ましく、9、10または11個はさらに好ましい。ただし、本開示のリボカリンムテインは、依然として、CD137に結合する能力を有することが好ましい。

【0039】

一局面において、本開示は、CD137に少なくとも検出可能な親和性で結合するさまざまなリボカリンムテインを包含する。この意味で、CD137は、リファレンス野生型リボカリンの非天然リガンドであるとみなすことができ、ここで「非天然リガンド」とは、生理的条件下で野生型リボカリンに結合しない化合物を指す。野生型リボカリンを一定の配列位置における1つまたは複数の突然変異で工学的に操作することにより、本発明者らは、非天然リガンドであるCD137に対する高い親和性および高い特異性が可能であることを証明した。いくつかの態様では、野生型リボカリン上の一定の配列位置をコードする1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11もしくは12個またはさらにそれ以上のヌクレオチドトリプレットにおいて、ヌクレオチドトリプレットの部分集合でこれらの位置における置換を行うことによって、ランダム突然変異誘発を実行しうる。

【0040】

さらに、本開示のリボカリンムテインは、リファレンスリボカリンの直鎖ポリペプチド配列の一定の配列位置に対応する配列位置のうちの任意の1つまたは複数に、例えば少なくとも任意の1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11または12個に、変異アミノ酸残基を有しうる。

【0041】

本開示のタンパク質は、変異アミノ酸配列位置以外では、「親」タンパク質スキュフォールド(リボカリンなど)の野生型(天然)アミノ酸配列を含みうる。いくつかの態様において、本開示によるリボカリンムテインは、1つまたは複数の配列位置に1つまたは複数

のアミノ酸突然変異も、そのような突然変異が当該ムテインの結合活性およびフォールディングを、少なくとも本質的には、阻止することも、妨害することもないのであれば、保持しうる。そのような突然変異は、確立された標準的方法 (Sambrook, J. et al. (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, ニューヨーク州コールドスプリングハーバー) を使って、DNAレベルで非常に容易に実現することができる。アミノ酸配列改変の具体例は、挿入または欠失およびアミノ酸置換である。そのような置換は保存的でありうる。すなわち、アミノ酸残基は、特性が、とりわけ極性およびサイズに関して、化学的に類似しているアミノ酸残基で置き換えられる。保存的置換の例は、以下のグループのメンバー間での置き換えである: 1) アラニン、セリン、およびスレオニン; 2) アスパラギン酸およびグルタミン酸; 3) アスパラギンおよびグルタミン; 4) アルギニンおよびリジン; 5) イソロイシン、ロイシン、メチオニン、およびバリン; ならびに 6) フェニルアラニン、チロシン、およびトリプトファン。他方、アミノ酸配列中に非保存的改変を導入することも可能である。加えて、単一のアミノ酸残基を置き換える代わりに、ヒト涙液リボカリンの一次構造のうちの1つまたは複数の連続アミノ酸を挿入または欠失させることも、それらの欠失または挿入が安定なフォールディングされた/機能的ムテイン (例えばN末およびC末が切断されたTlcムテイン) をもたらし限りにおいて、可能である。そのようなムテインでは、例えば、ポリペプチドのN末またはC末において、1つまたは複数のアミノ酸残基を付加し、または欠失させる。一般にそのようなムテインは、成熟ヒト涙液リボカリンのアミノ酸配列に対して、およそ少なくとも70%、例えば少なくとも約80%、例えば少なくとも約85%のアミノ酸配列同一性を有しうる。一具体例として、本開示は、成熟ヒト涙液リボカリンの配列のN末の最初の4アミノ酸残基 (His-His-Leu-Leu; 位置1~4) および/または成熟ヒト涙液リボカリンの直鎖ポリペプチド配列のC末の最後の2アミノ酸残基 (Ser-Asp; 位置157~158) を欠失させた、上に定義したTlcムテイン (SEQ ID NO:5~11) も包含する。加えて、別の一具体例として、本開示は、成熟ヒトトリボカリン2 (hNGAL) の直鎖ポリペプチド配列のアミノ酸残基 (Lys-Asp-Pro; 位置46~48) を欠失させた、上に定義したNGALムテイン (SEQ ID NO:16) も包含する。

【0042】

本明細書において開示するリボカリンムテインのアミノ酸配列は、他のリボカリンとの配列同一性と比較した場合に、リファレンスリボカリンに対して高い配列同一性を有する。この一般的状況において、本開示のリボカリンムテインのアミノ酸配列は、リファレンスリボカリンのアミノ酸配列に、少なくとも実質的に類似している。ただし、ギャップ (以下に定義する) が、アミノ酸の付加または欠失の結果としてアラインメント中に存在する可能性はある。リファレンスリボカリンの配列に実質的に類似する本開示のリボカリンムテインのそれぞれの配列は、いくつかの態様では、リファレンスリボカリンの配列に対して、少なくとも70%の同一性または配列相同性、少なくとも75%の同一性または配列相同性、少なくとも80%の同一性または配列相同性、少なくとも82%の同一性または配列相同性、少なくとも85%の同一性または配列相同性、少なくとも87%の同一性または配列相同性、または少なくとも90%の同一性もしくは配列相同性、例えば少なくとも95%の同一性または配列相同性を有する。ただし、改変された位置または配列は保たれており、1つまたは複数のギャップが可能である。

【0043】

本明細書において、本開示のリボカリンムテインは、それが、あるターゲット (例えばCD137) と1つまたは複数のリファレンスターゲットとを区別することができるのであれば、当該ターゲットに「特異的に結合」する。結合特異性は絶対的特性ではなく相対的特性だからである。「特異的結合」は、例えばウェスタンブロット、ELISA試験、RIA試験、ECL試験、IRMA試験、FACS、IHCおよびペプチドスキャンに従って決定することができる。

【0044】

一態様において、本開示のリボカリンムテインは、そのN末および/またはそのC末において、ムテインの血清中半減期を延ばすタンパク質ドメインである融合パートナーに融合

される。さらなる特定態様において、前記タンパク質ドメインは、免疫グロブリンのFc部分、免疫グロブリンのCH3ドメイン、免疫グロブリンのCH4ドメイン、アルブミン結合ペプチド、またはアルブミン結合タンパク質である。

【0045】

別の一態様において、本開示のリボカリンムテインは、ムテインの血清中半減期を延ばす化合物にコンジュゲートされる。より好ましくは、ムテインは、ポリアルキレングリコール分子、ヒドロエチルデンプン(hydroethylstarch)、免疫グロブリンのFc部分、免疫グロブリンのCH3ドメイン、免疫グロブリンのCH4ドメイン、アルブミン結合ペプチド、およびアルブミン結合タンパク質からなる群より選択される化合物にコンジュゲートされる。

10

【0046】

さらに別の一態様において、本開示は、本明細書において開示するリボカリンムテインをコードするヌクレオチド配列を含む核酸分子に係る。本開示は該核酸分子を含有する宿主細胞を包含する。

【0047】

A. CD137に特異的なリボカリンムテイン

一局面において、本開示は、CD137に結合するヒトリボカリンムテイン、およびその有用な応用を提供する。本開示は、本明細書に記載するCD137結合タンパク質を作製する方法、ならびにそのようなタンパク質を含む組成物も提供する。本開示のCD137結合タンパク質およびその組成物は、試料中のCD137を検出する方法において、または対象におけるCD137の結合方法において、使用されうる。本開示が提供する用途に付随するこれらの特徴を有するそのようなヒトリボカリンムテインが、以前に記載されたことはなかった。

20

【0048】

1. CD137に特異的な例示的リボカリンムテイン

本開示の一態様は、例えば本質的に実施例4に記載するように表面プラズモン共鳴(SPR)分析によって決定した場合に、KDで測って約300nM、100nM、75nM、50nM、25nM、10nMまたはそれ未満の、例えば2nMの親和性で、CD137に結合する能力を有するリボカリンムテインに関する。

【0049】

別の一態様において、本リボカリンムテインは、例えば本質的に実施例6に記載するようにFACS分析によって決定した場合に、約250nM以下、約100nM以下、約50nM以下、約18nM以下のEC50値で、CD137に結合する能力を有する。

30

【0050】

本開示の別の一態様は、CD137に結合することによって、CD137の下流シグナリング経路を活性化する能力を有するリボカリンムテインを提供する。

【0051】

いくつかの態様において、本開示のリボカリンムテインは、例えば本質的に実施例7に記載するように機能的T細胞活性化アッセイにおいて測定した場合に、SEQ ID NO:4の陰性対照と比較して、より高いIL-2濃度を誘導する能力を有する。

【0052】

他のいくつかの態様において、本開示のリボカリンムテインは、例えば本質的に実施例8に記載するように機能的T細胞活性化アッセイにおいて測定した場合に、SEQ ID NO:4の陰性対照と比較して、より高いIL-2濃度をもたらさない。

40

【0053】

いくつかの態様において、本開示のリボカリンムテインは、例えば本質的に実施例9に記載するように機能的T細胞活性化アッセイにおいて測定した場合に、SEQ ID NO:4の陰性対照と比較して、より高いIL-2およびIFN- γ 増殖を誘発する能力を有する。

【0054】

一局面において、本開示は、CD137結合性ヒト涙液リボカリンムテインを提供する。

【0055】

50

この点に関して、本開示は、KDで測って約300nM以下、さらには約100nM以下の親和性で、CD137に結合する能力を有する1つまたは複数のTlcmテインを提供する。

【0056】

いくつかの態様において、そのようなTlcmテインは、成熟ヒト涙液リポカリンの直鎖ポリペプチド配列 (SEQ ID NO:1) の位置5、26~31、33~34、42、46、52、56、58、60~61、65、71、85、94、101、104~106、108、111、114、121、133、148、150および153に対応する1つまたは複数の位置に、変異アミノ酸残基を含む。

【0057】

いくつかの特定態様において、そのようなTlcmテインは、成熟ヒト涙液リポカリンの直鎖ポリペプチド配列の位置26~34、55~58、60~61、65、104~106および108に対応する1つまたは複数の位置に、変異アミノ酸残基を含有しうる。

10

【0058】

さらなる特定態様において、そのようなTlcmテインは、成熟ヒト涙液リポカリンの直鎖ポリペプチド配列の位置101、111、114および153に対応する1つまたは複数の位置に、変異アミノ酸残基をさらに含みうる。

【0059】

別の特定態様において、Tlcは、成熟ヒト涙液リポカリンの直鎖ポリペプチド配列の位置5、26~31、33~34、42、46、52、56、58、60~61、65、71、85、94、101、104~106、108、111、114、121、133、148、150および153に対応する1つまたは複数の位置に変異アミノ酸残基を含有しうる。

20

【0060】

いくつかのさらなる態様において、Tlcmテインは、成熟ヒト涙液リポカリンの直鎖ポリペプチド配列の配列位置5、26~31、33~34、42、46、52、56、58、60~61、65、71、85、94、101、104~106、108、111、114、121、133、148、150および153に対応する1つまたは複数の配列位置に、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26個、またはさらにそれ以上の変異アミノ酸残基を含むことができ、ここで該ポリペプチドは、CD137、特にヒトCD137に結合する。

【0061】

いくつかのさらなる態様において、本開示は、成熟ヒト涙液リポカリンの直鎖ポリペプチド配列との比較において、配列位置26~34、55~58、60~61、65、104~106、および108に、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12個、またはさらにそれ以上の変異アミノ酸残基を含むTlcmテインであり、かつCD137、特にヒトCD137に結合する、ポリペプチドに関する。

30

【0062】

いくつかの態様において、本開示によるリポカリンムテインは、ネイティブシステイン残基の、例えばセリン残基によるアミノ酸置換を、少なくとも1つは含みうる。いくつかの態様において、本開示によるTlcmテインは、位置61および/または153にあるネイティブシステイン残基の、セリン残基などの別のアミノ酸によるアミノ酸置換を含む。これとの関連において、システイン残基61および153によって形成される野生型涙液リポカリンの構造ジスルフィド結合 (Breustedt, et al., 2005、前掲参照) の (それぞれのナイーブ核酸ライブラリーのレベルでの) 除去が、安定にフォールディングされるだけでなく、所与の非天然リガンドに高い親和性で結合することもできる涙液リポカリンムテインを与えることがわかっていることに注目されたい。いくつかの特定態様において、本開示によるTlcmテインは、アミノ酸置換Cys61 Ala、Phe、Lys、Arg、Thr、Asn、Gly、Gln、Asp、Asn、Leu、Tyr、Met、Ser、ProまたはTrp、およびCys153 SerまたはAlaを含む。そのような置換は、Cys61とCys153とを連結する天然ジスルフィド架橋の形成を防止するのに有用であり、よってムテインの取り扱いを容易にすることが判明している。ただし、CD137に結合し、かつCys61とCys153との間に形成されたジスルフィド架橋を有する涙液リポカリンムテインも、本発明の一部である。

40

50

【 0 0 6 3 】

いくつかの態様では、構造ジスルフィド結合の排除により、本開示のムテインへの非天然人工ジスルフィド結合の（自発的）生成または計画的導入が可能になり、それによってムテインの安定性が増加するという、さらなる利点が得られうる。例えば、いくつかの態様では、位置61、101および153にあるシステインコドンの2つまたは3つすべてが、別のアミノ酸のコドンで置き換えられる。さらに、いくつかの態様において、本開示によるTlcムテインは、位置101にあるネイティブシステイン残基の、セリン残基またはヒスチジン残基によるアミノ酸置換を含む。

【 0 0 6 4 】

いくつかの態様において、本開示によるムテインは、成熟ヒト涙液リボカリンのアミノ酸配列に関して位置28または105に、システイン残基によるネイティブアミノ酸のアミノ酸置換を含む。

10

【 0 0 6 5 】

さらに、いくつかの態様において、本開示によるムテインは、位置111にあるネイティブアルギニン残基の、プロリン残基によるアミノ酸置換を含む。さらに、いくつかの態様において、本開示によるムテインは、位置114にあるネイティブリジン残基の、トリプトファン残基またはグルタミン酸によるアミノ酸置換を含む。

【 0 0 6 6 】

いくつかの態様において、本発明によるCD137結合性Tlcムテインは、成熟ヒト涙液リボカリンの直鎖ポリペプチド配列（SEQ ID NO:1）の位置5、26～31、33～34、42、46、52、56、58、60～61、65、71、85、94、101、104～106、108、111、114、121、133、148、150および153に対応する1つまたは複数の位置に、以下の変異アミノ酸残基のうちの1つまたは複数を含む：

20

Ala 5 → ValまたはThr; Arg 26 → Glu;

Glu 27 → Gly; Phe 28 → Cys; Pro 29 → Arg; Glu 30 → Pro; Met 31 → Trp; Leu 33 → Ile; Glu

34 → Phe; Thr 42 → Ser; Gly 46 → Asp; Lys 52 → Glu; Leu 56 → Ala; Ser 58 → Asp; Arg 60

→ Pro; Cys 61 → Ala; Lys 65 → ArgまたはAsn; Thr 71 → Ala; Val 85 → Asp; Lys 94 → Argまたは

Glu; Cys 101 → Ser; Glu 104 → Val; Leu 105 → Cys; His 106 → Asp; Lys 108 → Ser; Arg

111 → Pro; Lys 114 → Trp; Lys 121 → Glu; Ala 133 → Thr; Arg 148 → Ser; Ser 150 → Ile

30

およびCys 153 → Ser

。いくつかの態様において、本開示によるTlcムテインは、成熟ヒト涙液リボカリンのこれらの配列位置における変異アミノ酸残基を、2つまたはそれ以上、例えば3、4、5、6、7、8、9、10、11、12個、さらにそれ以上、例えば13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26個、またはすべて含む。

【 0 0 6 7 】

いくつかのさらなる態様において、CD137に結合するTlcムテインは、成熟ヒト涙液リボカリンの直鎖ポリペプチド配列と比較して、以下の組のアミノ酸置換のうちの1組を含む：

1. Arg 26 → Glu; Glu 27 → Gly; Phe 28 → Cys; Pro 29 → Arg; Glu 30 → Pro; Met 31 → Trp; Leu 33 → Ile; Glu 34 → Phe; Leu 56 → Ala; Ser 58 → Asp; Arg 60 → Pro; Cys 61 → Ala; Cys 101 → Ser; Glu 104 → Val; Leu 105 → Cys; His 106 → Asp; Lys 108 → Ser; Arg 111 → Pro; Lys 114 → Trp; Cys 153 → Ser;

2. Ala 5 → Thr; Arg 26 → Glu; Glu 27 → Gly; Phe 28 → Cys; Pro 29 → Arg; Glu 30 → Pro; Met 31 → Trp; Leu 33 → Ile; Glu 34 → Phe; Leu 56 → Ala; Ser 58 → Asp; Arg 60 → Pro; Cys 61 → Ala; Lys 65 → Arg; Val 85 → Asp; Cys 101 → Ser; Glu 104 → Val; Leu 105 → Cys; His 106 → Asp; Lys 108 → Ser; Arg 111 → Pro; Lys 114 → Trp; Lys 121 → Glu; Ala 133 → Thr; Cys 153 → Ser; 157 → Pro;

10

3. Arg 26 → Glu; Glu 27 → Gly; Phe 28 → Cys; Pro 29 → Arg; Glu 30 → Pro; Met 31 → Trp; Leu 33 → Ile; Glu 34 → Phe; Leu 56 → Ala; Ser 58 → Asp; Arg 60 → Pro; Cys 61 → Ala; Lys 65 → Asn; Lys 94 → Arg; Cys 101 → Ser; Glu 104 → Val; Leu 105 → Cys; His 106 → Asp; Lys 108 → Ser; Arg 111 → Pro; Lys 114 → Trp; Lys 121 → Glu; Ala 133 → Thr; Cys 153 → Ser;

4. Ala 5 → Val; Arg 26 → Glu; Glu 27 → Gly; Phe 28 → Cys; Pro 29 → Arg; Glu 30 → Pro; Met 31 → Trp; Leu 33 → Ile; Glu 34 → Phe; Leu 56 → Ala; Ser 58 → Asp; Arg 60 → Pro; Cys 61 → Ala; Lys 65 → Arg; Lys 94 → Glu; Cys 101 → Ser; Glu 104 → Val; Leu 105 → Cys; His 106 → Asp; Lys 108 → Ser; Arg 111 → Pro; Lys 114 → Trp; Lys 121 → Glu; Ala 133 → Thr; Cys 153 → Ser; 157 → Pro;

20

5. Arg 26 → Glu; Glu 27 → Gly; Phe 28 → Cys; Pro 29 → Arg; Glu 30 → Pro; Met 31 → Trp; Leu 33 → Ile; Glu 34 → Phe; Thr 42 → Ser; Leu 56 → Ala; Ser 58 → Asp; Arg 60 → Pro; Cys 61 → Ala; Cys 101 → Ser; Glu 104 → Val; Leu 105 → Cys; His 106 → Asp; Lys 108 → Ser; Arg 111 → Pro; Lys 114 → Trp; Ser 150 → Ile; Cys 153 → Ser; 157 → Pro;

30

6. Arg 26 → Glu; Glu 27 → Gly; Phe 28 → Cys; Pro 29 → Arg; Glu 30 → Pro; Met 31 → Trp; Leu 33 → Ile; Glu 34 → Phe; Lys 52 → Glu; Leu 56 → Ala; Ser 58 → Asp; Arg 60 → Pro; Cys 61 → Ala; Thr 71 → Ala; Cys 101 → Ser; Glu 104 → Val; Leu 105 → Cys; His 106 → Asp; Lys 108 → Ser; Arg 111 → Pro; Lys 114 → Trp; Ala 133 → Thr; Arg 148 → Ser; Ser 150 → Ile; Cys 153 → Ser; 157 → Pro; または

7. Ala 5 → Thr; Arg 26 → Glu; Glu 27 → Gly; Phe 28 → Cys; Pro 29 → Arg; Glu 30 → Pro; Met 31 → Trp; Leu 33 → Ile; Glu 34 → Phe; Gly 46 → Asp; Leu 56 → Ala; Ser 58 → Asp; Arg 60 → Pro; Cys 61 → Ala; Thr 71 → Ala; Cys 101 → Ser; Glu 104 → Val; Leu 105 → Cys; His 106 → Asp; Lys 108 → Ser; Arg 111 → Pro; Lys 114 → Trp; Ser 150 → Ile; Cys 153 → Ser; 157 → Pro

40

。

【 0 0 6 8 】

残りの領域、すなわち配列位置5、26～31、33～34、42、46、52、56、58、60～61、65、71、85、94、101、104～106、108、111、114、121、133、148、150および153とは異なる

50

る領域において、本開示のTlcムテインは、変異アミノ酸配列位置以外では、野生型（天然）アミノ酸配列を含みうる。

【0069】

さらなる態様において、本開示によるTlcムテインは、成熟ヒト涙液リポカリンの配列（SEQ ID NO:1）に対して、少なくとも70%の配列同一性または少なくとも70%の配列相同性を有する。具体例としてSEQ ID NO:7のムテインは、成熟ヒト涙液リポカリンのアミノ酸配列に対して、約81%のアミノ酸配列同一性または配列相同性を有する。

【0070】

さらなる特定態様において、本開示のTlcムテインは、SEQ ID NO:5～11のいずれか1つに示すアミノ酸配列、またはそのフラグメントもしくは変異体を含む。

10

【0071】

さらなる特定態様において、本開示のTlcムテインは、SEQ ID NO:5～11からなる群より選択されるアミノ酸配列に対して、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%またはそれ以上の配列同一性を有する。

【0072】

本開示は、SEQ ID NO:5～11からなる群より選択されるアミノ酸配列を有するTlcムテインの構造ホモログであって、該Tlcムテインとの関係において約60%超、好ましくは65%超、70%超、75%超、80%超、85%超、90%超、92%超、最も好ましくは95%超のアミノ酸配列相同性または配列同一性を有する構造ホモログも包含する。

【0073】

20

本開示によるTlcムテインは、天然型のヒト涙液リポカリンの突然変異誘発を使って得ることができる。突然変異誘発のいくつかの態様において、置換（すなわち置き換え）は保存的置換である。しかしながら、リポカリンムテインがCD137に結合するその能力を保持しており、かつ/または、それが、成熟ヒト涙液リポカリンのアミノ酸配列（SWISS-PROT データバンクアクセス番号P31025）に対する少なくとも60%、例えば少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%またはそれ以上の配列同一性であるという点においてその時置換される配列に対して配列同一性を有する限り、非保存的置換、または下記の例示的置換からの1つまたは複数を含む、任意の置換が想定される。

【0074】

30

いくつかのさらなる態様において、本開示のhNGALムテインは、例えば本質的に実施例5に記載するように表面プラズモン共鳴（SPR）アッセイにおいて測定した場合に、CD137へのCD137Lの結合を妨害する能力を有する。

【0075】

いくつかの特定態様において、本開示は、KDで測って約200nM以下の親和性でCD137に結合するリポカリンムテインであって、SEQ ID NO:5のアミノ酸配列に対して少なくとも90%またはそれ以上、例えば95%の同一性を有するリポカリンムテインを提供する。

【0076】

別の一局面において、本開示は、CD137に向けられた、またはCD137に特異的な、新規特異的結合性ヒトリポカリン2（ヒトLcn2またはhNGAL）ムテインに関する。

40

【0077】

この点に関して、本開示は、KDで測って200nM以下、約140nM以下、約50nM以下、さらには約10nM以下の親和性で、CD137に結合する能力を有する1つまたは複数のhNGALムテインを提供する。より好ましくは、hNGALムテインは、KDで測って約5nM以下の親和性を有することができる。

【0078】

いくつかの態様において、本開示のhNGALムテインは、成熟hNGALの直鎖ポリペプチド配列（SEQ ID NO:2）の位置28、36、40～41、49、52、65、68、70、72～73、77、79、81、83、87、94、96、100、103、106、125、127、132および134に対応する1つまたは複数の位置に、置換を含む。

50

【 0 0 7 9 】

特定の態様において、本開示のリポカリンムテインは、成熟hNGALの直鎖ポリペプチド配列（SWISS-PROTデータベースアクセッション番号P80188；SEQ ID NO:2）の配列位置28、36、40～41、49、52、65、68、70、72～73、77、79、81、83、87、94、96、100、103、106、125、127、132および134に対応する配列位置に、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21個、またはさらにそれ以上の置換を含む。好ましくは、本開示は、成熟ヒトNGALの直鎖ポリペプチド配列の位置36、87および/または96に対応する位置における1つまたは複数の置換に加えて、成熟hNGALの直鎖ポリペプチド配列の位置28、40～41、49、52、65、68、70、72～73、77、79、81、83、94、100、103、106、125、127、132および134に対応する1つまたは複数の位置に置換を含む、リポカリンムテインに関する想定される。

10

【 0 0 8 0 】

いくつかのさらなる態様において、本開示は、成熟hNGALの直鎖ポリペプチド配列（SWISS-PROTデータベースアクセッション番号P80188；SEQ ID NO:2）との比較において、配列位置28、36、40～41、49、52、65、68、70、72～73、77、79、81、87、96、100、103、106、125、127、132および134に、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21個、またはさらにそれ以上の変異アミノ酸残基を含むhNGALムテインであって、CD137、特にヒトCD137に結合する、ポリペプチドに関する。

【 0 0 8 1 】

いくつかの態様において、本開示のCD137結合性hNGALムテインは、成熟hNGALの直鎖ポリペプチド配列（SEQ ID NO:2）の配列位置28、36、40～41、49、52、65、68、70、72～73、77、79、81、83、87、94、96、100、103、106、125、127、132および134のうちの任意の1つまたは複数に、以下の変異アミノ酸残基のうちの1つまたは複数を含む：
Gln 28 → His; Leu 36 → Gln; Ala 40 → Ile; Ile 41 → ArgまたはLys; Gln 49 → Val, Ile, His, SerまたはAsn; Tyr 52 → Met; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Met, AlaまたはGly; Leu 70 → Ala, Lys, SerまたはThr; Arg 72 → Asp; Lys 73 → Asp; Asp 77 → Met, Arg, ThrまたはAsn; Trp 79 → AlaまたはAsp; Arg 81 → Met, TrpまたはSer; Phe 83 → Leu; Cys 87 → Ser; Leu 94 → Phe; Asn 96 → Lys; Tyr 100 → Phe; Leu 103 → His; Tyr 106 → Ser; Lys 125 → Phe; Ser 127 → Phe; Tyr 132 → Glu および Lys 134 → Tyr

20

30

。

【 0 0 8 2 】

いくつかの態様において、本開示のhNGALムテインは、成熟hNGALのこれらの配列位置における変異アミノ酸残基を、2つ以上、例えば3、4、5、6、7、8、9、10、11、12個、またはさらにそれ以上、例えば13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24個、またはすべて含む。

【 0 0 8 3 】

いくつかのさらなる態様において、CD137に結合する本開示のhNGALムテインは、成熟hNGALの直鎖ポリペプチド配列との比較において、以下のアミノ酸の置き換えを含む。

40

- (a) Gln 28 → His; Leu 36 → Gln; Ala 40 → Ile; Ile 41 → Lys; Gln 49 → Asn; Tyr 52 → Met; Ser 68 → Gly; Leu 70 → Thr; Arg 72 → Asp; Lys 73 → Asp; Asp 77 → Thr; Trp 79 → Ala; Arg 81 → Ser; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Lys; Tyr 100 → Phe; Leu 103 → His; Tyr 106 → Ser; Lys 125 → Phe; Ser 127 → Phe; Tyr 132 → Glu; Lys 134 → Tyr;
- (b) Gln 28 → His; Leu 36 → Gln; Ala 40 → Ile; Ile 41 → Arg; Gln 49 → Ile; Tyr 52 → Met; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Met; Leu 70 → Lys; Arg 72 → Asp; Lys 73 → Asp; Asp 77 → Met; Trp 79 → Asp; Arg 81 → Trp; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Lys; Tyr 100 → Phe; Leu 103 → His; Tyr 106 → Ser; Lys 125 → Phe; Ser 127 → Phe; Tyr 132 → Glu; Lys 134 → Tyr; 10
- (c) Gln 28 → His; Leu 36 → Gln; Ala 40 → Ile; Ile 41 → Arg; Gln 49 → Asn; Tyr 52 → Met; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Ala; Leu 70 → Ala; Arg 72 → Asp; Lys 73 → Asp; Asp 77 → Thr; Trp 79 → Asp; Arg 81 → Trp; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Lys; Tyr 100 → Phe; Leu 103 → His; Tyr 106 → Ser; Lys 125 → Phe; Ser 127 → Phe; Tyr 132 → Glu; Lys 134 → Tyr;
- (d) Gln 28 → His; Leu 36 → Gln; Ala 40 → Ile; Ile 41 → Lys; Gln 49 → Asn; Tyr 52 → Met; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Ala; Leu 70 → Ala; Arg 72 → Asp; Lys 73 → Asp; Asp 77 → Thr; Trp 79 → Asp; Arg 81 → Trp; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Lys; Tyr 100 → Phe; Leu 103 → His; Tyr 106 → Ser; Lys 125 → Phe; Ser 127 → Phe; Tyr 132 → Glu; Lys 134 → Tyr; 20
- (e) Gln 28 → His; Leu 36 → Gln; Ala 40 → Ile; Ile 41 → Lys; Gln 49 → Ser; Tyr 52 → Met; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Gly; Leu 70 → Ser; Arg 72 → Asp; Lys 73 → Asp; Asp 77 → Thr; Trp 79 → Ala; Arg 81 → Met; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Lys; Tyr 100 → Phe; Leu 103 → His; Tyr 106 → Ser; Lys 125 → Phe; Ser 127 → Phe; Tyr 132 → Glu; Lys 134 → Tyr; 30

(f) Gln 28 → His; Leu 36 → Gln; Ala 40 → Ile; Ile 41 → Lys; Gln 49 → Val; Tyr 52 → Met; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Gly; Leu 70 → Thr; Arg 72 → Asp; Lys 73 → Asp; Asp 77 → Arg; Trp 79 → Asp; Arg 81 → Ser; Cys 87 → Ser; Leu 94 → Phe; Asn 96 → Lys; Tyr 100 → Phe; Leu 103 → His; Tyr 106 → Ser; Lys 125 → Phe; Ser 127 → Phe; Tyr 132 → Glu; Lys 134 → Tyr;

(g) Gln 28 → His; Leu 36 → Gln; Ala 40 → Ile; Ile 41 → Arg; Gln 49 → His; Tyr 52 → Met; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Gly; Leu 70 → Thr; Arg 72 → Asp; Lys 73 → Asp; Asp 77 → Thr; Trp 79 → Ala; Arg 81 → Ser; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Lys; Tyr 100 → Phe; Leu 103 → His; Tyr 106 → Ser; Lys 125 → Phe; Ser 127 → Phe; Tyr 132 → Glu; Lys 134 → Tyr;

10

(h) Gln 28 → His; Leu 36 → Gln; Ala 40 → Ile; Ile 41 → Lys; Gln 49 → Asn; Tyr 52 → Met; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Gly; Leu 70 → Thr; Arg 72 → Asp; Lys 73 → Asp; Asp 77 → Thr; Trp 79 → Ala; Arg 81 → Ser; Phe 83 → Leu; Cys 87 → Ser; Leu 94 → Phe; Asn 96 → Lys; Tyr 100 → Phe; Leu 103 → His; Tyr 106 → Ser; Lys 125 → Phe; Ser 127 → Phe; Tyr 132 → Glu; Lys 134 → Tyr;または

20

(i) Gln 28 → His; Leu 36 → Gln; Ala 40 → Ile; Ile 41 → Arg; Gln 49 → Ser; Tyr 52 → Met; Asn 65 → Asp; Ser 68 → Ala; Leu 70 → Thr; Arg 72 → Asp; Lys 73 → Asp; Asp 77 → Asn; Trp 79 → Ala; Arg 81 → Ser; Cys 87 → Ser; Asn 96 → Lys; Tyr 100 → Phe; Leu 103 → His; Tyr 106 → Ser; Lys 125 → Phe; Ser 127 → Phe; Tyr 132 → Glu; Lys 134 → Tyr

【 0 0 8 4 】

残りの領域、すなわち配列位置28、36、40～41、49、52、65、68、70、72～73、77、79、81、83、87、94、96、100、103、106、125、127、132および134とは異なる領域において、本開示のhNGALムテインは、変異アミノ酸配列位置以外では、野生型（天然）アミノ酸配列を含みうる。

30

【 0 0 8 5 】

別の一態様において、hNGALムテインは、成熟ヒトリポカリン2のアミノ酸配列（SWISS-PROTデータベースアクセス番号P80188）に対して、少なくとも70%、またはさらに高い配列同一性を有する。具体例として、SEQ ID NO:17のムテインは、成熟hNGALアミノ酸配列に対して、およそ86.5%のアミノ酸配列同一性または配列相同性を有する。

【 0 0 8 6 】

さらなる特定態様において、本開示によるリポカリンムテインは、SEQ ID NO:12～20からなる群より選択されるアミノ酸配列、またはそのフラグメントもしくは変異体を含む。

【 0 0 8 7 】

40

本開示のCD137結合性hNGALムテインのアミノ酸配列は、SEQ ID NO:12～20からなる群より選択される配列に対して、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも82%、少なくとも85%、少なくとも87%、少なくとも90%の同一性、例えば少なくとも95%の同一性など、高い配列同一性を有しうる。

【 0 0 8 8 】

本開示は、SEQ ID NO:12～20からなる群より選択されるアミノ酸配列を有するhNGALムテインの構造ホモログであって、該hNGALムテインとの関係において、約60%超、好ましくは65%超、70%超、75%超、80%超、85%超、90%超、92%超、最も好ましくは95%超のアミノ酸配列相同性または配列同一性を有する構造ホモログも包含する。

【 0 0 8 9 】

50

本開示のhNGALムテインは、天然型のヒトリボカリン2の突然変異誘発を使って得ることができる。突然変異誘発のいくつかの態様において、置換（すなわち置き換え）は保存的置換である。しかしながら、リボカリンムテインがCD137に結合するその能力を保っており、かつ/または、それが、成熟ヒトリボカリン2のアミノ酸配列（SWISS-PROTデータベースクアクセス番号P80188）に対する少なくとも60%、例えば少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%またはそれ以上の同一性であるという点においてその時置換される配列に対して同一性を有する限り、非保存的置換、または下記の例示的置換からの1つまたは複数を含む、任意の置換が想定される。

【0090】

いくつかのさらなる態様において、本開示のTlcムテインは、例えば本質的に実施例5に記載するように表面プラズモン共鳴（SPR）アッセイで測定した場合に、CD137へのCD137Lの結合を妨害しない。

【0091】

いくつかの特定態様において、本開示は、KDで測って約5nM以下の親和性でCD137に結合するリボカリンムテインであって、SEQ ID NO:13のアミノ酸配列に対して少なくとも90%またはそれ以上、例えば95%の同一性を有するリボカリンムテインを提供する。

【0092】

2. CD137に特異的なリボカリンムテインの応用

CD137は、T細胞受容体（TCR）活性化時に誘導されるT細胞共刺激受容体である（Nam et al., Curr. Cancer Drug Targets, 5:357-363 (2005); Watts et al., Annu. Rev. Immunol., 23:23-68 (2005)）。CD137は、活性化CD4+およびCD8+ T細胞におけるその発現に加えて、CD4+CD25+制御性T細胞、ナチュラルキラー（NK）およびNK-T細胞、単球、好中球、および樹状細胞でも発現する。その天然リガンドであるCD137Lは、B細胞、単球/マクロファージ、および樹状細胞を含む抗原提示細胞での記載がある（Watts et al., Annu. Rev. Immunol., 23:23-68 (2005)）。CD137は、そのリガンドと相互作用すると、増加したTCR誘発性T細胞増殖、サイトカイン生産、機能的成熟、および長期間にわたるCD8+ T細胞生存をもたらす（Nam et al., Curr. Cancer Drug Targets, 5:357-363 (2005), Watts et al., Annu. Rev. Immunol., 23:23-68 (2005)）。

【0093】

CD137/CD137L相互作用は、免疫応答のさまざまな局面に関与する。これは、T細胞における活性化誘導細胞死を阻害するのに重要であると思われるが（Hurtado et al., J. Immunol. 158:2600, 1997）、好中球では他のサイトカインの抗アポトーシス効果を抑止する（Heinisch et al., Eur. J. Immunol. 30:3441, 2001）。このようにCD137は免疫機能ホメオスタシスに役割を果たすと考えられ（Ebata et al., Eur. J. Immunol. 31:1210, 2001）、がんまたは炎症性応答の処置においてターゲットとすることができるターゲット共刺激系でありうる（Blazar et al., J. Immunol. 166:174, 2001; Takahashi et al., Immunol. Lett. 76:183, 2001; Kim and Broxmeyer, J. Hematother. Stem Cell Res. 10:441, 2001; Kim et al., Cancer Res. 61:2031, 2001）。

【0094】

それゆえに、本開示のCD137結合性リボカリンムテインには、医学において、数多くの可能な応用が存在する。さらなる一局面において、本開示は、試料中のCD137を検出するための、本明細書に開示するCD137結合性リボカリンムテインの使用、およびそれぞれの診断方法に関する。

【0095】

本開示は、CD137との複合体形成のための、ここに記載する1つまたは複数のCD137結合性リボカリンムテインの使用にも関係する。

【0096】

それゆえに、本開示の別の一局面において、本開示のリボカリンムテインは、CD137の検出に使用される。そのような使用は、1つまたは複数のムテインを、適切な条件下で、CD137を含有すると疑われる試料と接触させ、それによってムテインとCD137との間の複合

10

20

30

40

50

体の形成を可能にする工程、および適切なシグナルによって複合体を検出する工程を含むうる。

【0097】

上で説明したように、検出可能なシグナルは、標識によって引き起こされるか、結合、すなわち複合体形成そのものによる物理的特性の変化によって引き起こされうる。一例は表面プラズモン共鳴であり、その値は、結合パートナー同士（そのうちの一方は、金箔などの表面に固定化されている）の結合中に変化する。

【0098】

本明細書において開示するCD137結合性リポカリンムテインは、CD137の分離にも使用しうる。そのような使用は、1つまたは複数のムテインを、適切な条件下で、CD137を含有すると思われる試料と接触させ、それによって、ムテインとCD137との間の複合体の形成を可能にする工程、および複合体を試料から分離する工程を含むうる。

10

【0099】

CD137の検出およびCD137の分離のための、本開示のムテインの使用では、ムテインおよび/もしくはCD137、またはそれらのドメインもしくはフラグメントを、適切な固相上に固定化しうる。

【0100】

さらに別の一局面において、本開示は、本開示によるCD137結合性リポカリンムテインを含む診断キットまたは分析キットを特徴とする。

【0101】

20

さらに別の一局面において、本開示では、診断におけるそれらの使用に加えて、本開示のムテインと薬学的に許容される賦形剤とを含む薬学的組成物も考えられる。

【0102】

さらにまた、本開示は、抗がん作用物質および/または免疫調節物質として使用するための、CD137に結合するヒトリポカリンムテインを提供する。したがって、CD137に結合するそのような本開示のリポカリンムテインは、がん、感染性疾患、および自己免疫疾患などのヒト疾患を処置または防止する方法において使用されることが想定される。したがって、がん、感染性疾患、および自己免疫疾患などのヒト疾患を処置または防止する必要がある対象において該ヒト疾患を処置または防止する方法であって、治療有効量の、CD137に結合する本発明のリポカリンムテインを、対象に投与する工程を含む方法も提供される。

30

【0103】

T細胞において、CD137媒介性シグナリングは、TRAFファミリーメンバーの動員、ならびにASK-1、MKK、MAPK3/MAPK4、p38、およびJNK/SAPKを含むいくつかのキナーゼの活性化につながる。次に、キナーゼの活性化に続いて、ATF-2、Jun、およびNF- κ Bを含むいくつかの転写因子の活性化および核移行が起こる。CD137媒介性シグナリングは、最適未満のTCR誘発性増殖を増強することに加えて、T細胞、特にCD8⁺T細胞を、活性化誘導細胞死（ACD）から保護する。

【0104】

本開示は、CD137の結合、T細胞の共刺激、および/またはCD137への結合によるCD137の下流シグナリング経路の活性化（IL-2分泌の強化およびインターフェロンIFN- γ の生産を含む）のための、本開示のCD137結合性リポカリンムテインの使用、またはそのようなリポカリンムテインを含む組成物の使用を包含する。

40

【0105】

本開示は、CD137の結合方法またはT細胞を共刺激する方法であって、1つまたは複数の、本開示のCD137結合性リポカリンムテイン、またはそのようなリポカリンムテインを含む1つまたは複数の組成物を適用する工程を含む方法も特徴とする。

【0106】

さらにまた本開示は、IL-2分泌の強化およびインターフェロンIFN- γ の生産を含むCD137の下流シグナリング経路を活性化する方法であって、1つまたは複数の、本開示のCD137

50

結合性リボカリンムテイン、またはそのようなりボカリンムテインを含む1つまたは複数の組成物を適用する工程を含む方法に関係する。

【0107】

本開示では、Tリンパ球増殖を誘発する方法であって、1つまたは複数の、本開示のCD137結合性リボカリンムテイン、またはそのようなりボカリンムテインを含む1つまたは複数の組成物を適用する工程を含む方法も考えられる。

【0108】

さらにまた、CD137/CD137L相互作用の非存在は、一定の自己免疫疾患の発症を防止する (Seo et al., 2003, 2004)。CD137/CD137L相互作用は、詳しく特徴づけられた抗原提示細胞-T細胞相互作用に加えて、造血細胞と非造血細胞のネットワークにも関与する。CD137Lによるシグナリングは、骨髄性細胞の分化およびそれらの細胞活動に決定的な役割を果たすことから、CD137Lシグナルは炎症をトリガーし持続させることが示唆される [Immune Network 2009;9(3):84-89]。

【0109】

本開示は、CD137へのCD137Lの結合および/または天然のCD137Lシグナリングを妨害するための、CD137Lと競合してCD137に結合する能力を有する本開示のCD137結合性リボカリンムテインの使用、またはそのようなりボカリンムテインを含む組成物の使用を包含する。

【0110】

本開示は、CD137へのCD137Lの結合を妨害する方法であって、1つまたは複数の本開示のCD137競合結合性リボカリンムテイン、またはそのようなりボカリンムテインを含む1つまたは複数の組成物を適用する工程を含む方法も特徴とする。

【0111】

さらにまた、本開示は、CD137Lの天然シグナリングを妨害する方法であって、1つまたは複数の本開示のCD137競合結合性リボカリンムテイン、またはそのようなりボカリンムテインを含む1つまたは複数の組成物を適用する工程を含む方法に関係する。

【0112】

本開示では、炎症誘発性サイトカインおよびケモカインの生産を低減する方法であって、1つまたは複数の本開示のCD137競合結合性リボカリンムテイン、またはそのようなりボカリンムテインを含む1つまたは複数の組成物を適用する工程を含む方法も考えられる。

【0113】

B. 本開示のリボカリンムテイン

リボカリンは、リガンドに結合するように自然に進化したタンパク質結合分子である。リボカリンは、脊椎動物、昆虫、植物および細菌を含む多くの生物に見いだされる。リボカリンタンパク質ファミリーのメンバー (Pervaiz, S., & Brew, K. (1987) FASEB J. 1, 209-214) は、典型的には、小さな分泌タンパク質であり、単一のポリペプチド鎖を有する。それらは一連の異なる分子認識特性、すなわち、さまざまな、主として疎水性の分子 (レチノイド、脂肪酸、コレステロール、プロスタグランジン、ピリベルジン、フェロモン、味物質、およびにおい物質など) に結合するそれらの能力、特異的細胞表面受容体へのそれらの結合、およびそれらの高分子複合体形成によって特徴づけられる。リボカリンは以前は主に輸送タンパク質として分類されていたが、リボカリンはさまざまな生理学的機能を果たすことが、現在では明らかになっている。それらには、レチノール輸送、嗅覚、フェロモンシグナリング、およびプロスタグランジンの合成における役割が含まれる。リボカリンは、免疫応答の制御および細胞ホメオスタシスの媒介にも関係づけられている (例えば Flower, D.R. (1996) Biochem. J. 318, 1-14 および Flower, D.R. et al. (2000) Biochim. Biophys. Acta 1482, 9-24 に概説されている)。

【0114】

リボカリンが共有する全体的配列保存のレベルは異常に低く、多くの場合、配列同一性は20%未満である。それとは著しく対照的に、それらの全体的フォールディングパターンは高度に保存されている。リボカリン構造の中心的部分は、一周して閉じることで途切れ

10

20

30

40

50

なく水素結合した バレルを形成する単一の8ストランド逆平行 シートからなる。この バレルは中心に空洞を形成する。バレルの一端は、その底を横切るN末ペプチドセグメントおよび ストランドを接続する3つのペプチドループによって、立体的にブロックされている。 バレルの他端は溶媒に向かって開いており、4つのフレキシブルなペプチドループによって形成されるターゲット結合部位を包含する。サイズ、形状、および化学的特徴が異なるターゲットを収容する能力をそれぞれが有するさまざまな結合様式を生じさせるのは、他の点では剛直なりポカリンスキヤフォールドにおけるループのこの多様性である（例えばFlower, D.R. (1996)、前掲、Flower, D.R. et al. (2000)、前掲、またはSkerra, A. (2000) Biochim. Biophys. Acta 1482, 337-350に概説されている）。

【0115】

本開示によるリポカリンムテインは、任意の選ばれたリポカリンのムテインであってよい。ムテインに変換して使用することができる適切なりポカリン（「タンパク質『リファレンス』スキヤフォールド」または単に「スキヤフォールド」と呼ぶ場合もある）の例には、涙液リポカリン（リポカリン-1、フォン・エブネル腺タンパク質）、レチノール結合タンパク質、好中球リポカリン型プロスタグランジンDシンターゼ、 α -ラクトグロブリン、ビリリン結合タンパク質（BBP）、アポリポタンパク質D（APO D）、好中球ゼラチナーゼ関連リポカリン（NGAL）、涙液リポカリン（Tlc）、 α 2-ミクログロブリン関連タンパク質（A2m）、24p3/ウテロカリン（24p3）、フォン・エブネル腺タンパク質1（VEGP1）、フォン・エブネル腺タンパク質2（VEGP2）、および主要アレルゲンCan f1前駆体（ALL-1）などがあるが、それらに限定されるわけではない。関連態様では、リポカリンムテインが、ヒト好中球ゼラチナーゼ関連リポカリン（NGAL）、ヒト涙液リポカリン（Tlc）、ヒトアポリポタンパク質D（APO D）およびオオモンシロチョウ（*Pieris brassicae*）のビリリン結合タンパク質からなる群より選択される。

【0116】

CD137に結合する本開示のリポカリンムテインに関連して本明細書において使用する場合、「に特異的」という用語は、当該リポカリンムテインが、CD137に向けられていること、CD137に結合すること、またはCD137と反応することを、それぞれ包含する。したがって、向けられていること、結合すること、または反応することは、それぞれ当該リポカリンムテインがCD137に特異的に結合することを包含する。この文脈において「特異的に」という用語は、当該リポカリンムテインが、本明細書に記載するようにCD137タンパク質とは反応するが、他のタンパク質とは本質的に反応しないことを意味する。「他のタンパク質」という用語は、それぞれ、本明細書に開示するリポカリンが向けられているCD137と近縁または相同であるタンパク質を含む任意の非CD137タンパク質を包含する。しかし、ヒト以外の種、例えば「対象」の定義に関連して記載した種からのCD137タンパク質、フラグメントおよび/または変異体が、用語「他のタンパク質」によって除外されることはない。「本質的に結合しない」という用語は、本開示のリポカリンムテインが他のタンパク質に結合しないこと、すなわち30%未満、好ましくは20%未満、より好ましくは10%未満、特に好ましくは9、8、7、6または5%未満の交差反応性を示すことを意味する。リポカリンが本明細書において上に定義したように特異的に反応するかどうかは容易に、なにかんずく、本開示のリポカリンムテインのCD137との反応と、該リポカリンの他のタンパク質との反応とを比較することによって、試験することができる。「特異的結合」は、例えばウェスタンブロット、ELISA試験、RIA試験、ECL試験、IRMA試験、FACS、IHCおよびペプチドスキャンに従って決定することもできる。

【0117】

本開示によるリポカリンムテインのアミノ酸配列は、他のリポカリンとの配列同一性と比較すると、それぞれのリポカリンに対して高い配列同一性を有する（上記も参照されたい）。この一般的状況において、本発明による組み合わせのリポカリンムテインのアミノ酸配列は、対応するリポカリン（野生型リポカリンまたはリファレンスリポカリン）のアミノ酸配列に、少なくとも実質的に類似している。1つまたは複数のアミノ酸態様において、対応するリポカリンの配列に実質的に類似している本開示による組み合わせのリポカ

10

20

30

40

50

リンムテインのそれぞれの配列は、野生型（またはリファレンス）リポカリン、対応するリポカリンの配列に対して少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも82%、少なくとも85%、少なくとも87%、少なくとも90%の同一性、例えば少なくとも95%の同一性を有する。この点に関して、もちろん、本開示のリポカリンムテインは、比較すると、CD137に結合する能力を当該リポカリンムテインに与える本明細書に記載の置換を、それぞれ含有しうる。典型的には、リポカリンのムテインは、ネイティブ配列リポカリンと比較して、リポカリンのリガンド結合部位の開放端にある4つのループ（上記参照）中のアミノ酸の突然変異を、1つまたは複数含む。上で説明したとおり、これらの領域は、所望のターゲットに対するリポカリンムテインの結合特異性を決定するのに不可欠である。具体例として、涙液リポカリン、NGALリポカリン、またはそれらのホモログのポリペプチドから誘導されるムテインは、N末領域中および/または天然のリポカリン結合ポケットとは反対の位置にある　パレル構造の端部に配置された3つのペプチドループBC、DE、およびFG中の任意の配列位置に、1つ、2つ、3つ、4つまたはそれ以上の変異アミノ酸残基を有しうる。さらなる具体例として、涙液リポカリンまたはそのホモログのポリペプチドから誘導されるムテインは、涙液リポカリンの野生型配列と比較して、　パレル構造の端部に配置されたペプチドループDE中に変異アミノ酸残基を有さなくてもよい。

10

【0118】

本開示によるリポカリンムテインは、そのようなりポカリンムテインがそれぞれCD137に結合する能力を有するという条件の下で、対応するネイティブリポカリンと比較して、1つまたは複数の置換、例えば2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19個、またはさらに20個の置換を含む。例えば、リポカリンムテインは、例えば本明細書に開示する涙液リポカリン、NGALリポカリン、または他の任意のリポカリンの野生型配列を有する野生型リポカリンの特異な位置に対応する位置（すなわち対応位置）に、置換を有することができる。いくつかの態様において、本開示による組み合わせのリポカリンムテインは、アルギニン残基によるネイティブアミノ酸のアミノ酸置換を、少なくとも2つ、例えば2、3、4、5個、またはさらにそれ以上含む。したがって、本明細書に記載するタンパク質「リファレンス」スキャフォールドの核酸は、それぞれCD137に結合する能力を有するリポカリンムテインを生成させることを目的とする突然変異誘発の対象である。

20

30

【0119】

また、本開示のリポカリンムテインは、リポカリンムテインの生物学的活性（それぞれ、そのターゲット、例えばCD137への結合）に影響を及ぼすことなく、そのN末またはC末に、好ましくはC末に、SEQ ID NO:23などの異種アミノ酸配列、例えばStrep IIタグを含むことができる。

【0120】

同様に、本開示のリポカリンムテインは、それぞれの野生型リポカリンと比較して、そのN末端の1、2、3、4個、もしくはそれ以上のアミノ酸、および/またはそのC末端の1、2個、もしくはそれ以上のアミノ酸を欠いてもよい。例えばSEQ ID NO:5～11および16。

【0121】

40

具体的には、野生型リポカリンとは異なるリポカリンムテインのアミノ酸配列のアミノ酸残基が、野生型リポカリンのアミノ酸配列中の一定の位置に対応するかどうかを決定するために、当業者は、例えば手作業によるアラインメント、またはBLAST2.0（Basic Local Alignment Search Toolの略）もしくはClustalWなどのコンピュータプログラムや配列アラインメントを作成するのに適した他の任意の適切なプログラムを使ったアラインメントなど、当技術分野において周知の手段および方法を使用することができる。したがって、野生型リポカリンが「対象配列」または「リファレンス配列」として役立ちうるのに対して、本明細書に記載する野生型リポカリンとは異なるリポカリンのアミノ酸配列は「クエリー配列」になる。「リファレンス配列」および「野生型配列」という用語は、本明細書では相互可換的に使用される。

50

【 0 1 2 2 】

いくつかの態様において、置換（すなわち置き換え）は保存的置換である。しかしながら、リボカリウムテインがCD137に結合するその能力を保っており、かつ/または、それが、「元の」配列と少なくとも60%、例えば少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%またはそれ以上同一であるという点においてその時置換される配列に対して同一性を有する限り、非保存的置換、または以下に列挙する例示的置換からの1つまたは複数を含む、任意の置換が想定される。

【 0 1 2 3 】

保存的置換は、一般に、変異させるアミノ酸別に列挙し、それぞれの後に、保存的であると解釈することができる1つまたは複数の置き換えを記した以下の置換：

Ala → Gly, Ser, Val; Arg → Lys; Asn → Gln, His; Asp →

Glu; Cys → Ser; Gln → Asn; Glu → Asp; Gly → Ala; His → Arg, Asn, Gln; Ile → Leu, Val;

Leu → Ile, Val; Lys → Arg, Gln, Glu; Met → Leu, Tyr, Ile; Phe → Met, Leu, Tyr; Ser → Thr;

Thr → Ser; Trp → Tyr; Tyr → Trp, Phe; Val → Ile, Leu

である。他の置換も許容され、それらは実験的に決定することができるか、または他の公知の保存的もしくは非保存的置換に一致しうる。さらなる指針として、以下の8つのグループは、それぞれが、典型的には互いに保存的置換を規定すると解釈することができるアミノ酸を含んでいる：

a. アラニン (Ala)、グリシン (Gly)；

b. アスパラギン酸 (Asp)、グルタミン酸 (Glu)；

c. アスパラギン (Asn)、グルタミン (Gln)；

d. アルギニン (Arg)、リジン (Lys)；

e. イソロイシン (Ile)、ロイシン (Leu)、メチオニン (Met)、バリン (Val)；

f. フェニルアラニン (Phe)、チロシン (Tyr)、トリプトファン (Trp)；

g. セリン (Ser)、スレオニン (Thr)、および

h. システイン (Cys)、メチオニン (Met)。

【 0 1 2 4 】

そのような置換が生物学的活性の変化をもたらすのであれば、例えば以下のような、またはアミノ酸クラスに関してさらに後述するような、より実質的な変化を導入して、その生成物を所望の特徴についてスクリーニングしてもよい。そのようなより実質的な変化の例は、

Ala → Leu, Ile; Arg → Gln;

Asn → Asp, Lys, Arg, His; Asp → Asn; Cys → Ala; Gln → Glu; Glu → Gln; His → Lys; Ile →

Met, Ala, Phe; Leu → Ala, Met, ノルロイシン; Lys → Asn; Met → Phe; Phe → Val, Ile, Ala; Trp

→ Phe; Tyr → Thr, Ser; Val → Met, Phe, Ala

である。

【 0 1 2 5 】

リボカリンの生物学的特性の実質的修飾は、(a) 置換領域中のポリペプチド主鎖の、例えばシートまたはらせんコンフォメーションなどの構造、(b) ターゲット部位における分子の電荷もしくは疎水性、または(c) 側鎖の嵩高さ、を維持するその効果が、著しく異なる置換を選択することによって実現される。天然残基は、共通する側鎖の特性に基づいてグループ分けすることができる：(1) 疎水性：ノルロイシン、メチオニン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン；(2) 中性親水性：システイン、セリン、スレオニン；(3) 酸性：アスパラギン酸、グルタミン酸；(4) 塩基性：アスパラギン、グルタミン、ヒスチジン、リジン、アルギニン；(5) 鎖配向に影響を及ぼす残基：グリシン、プロリン；および(6) 芳香族：トリプトファン、チロシン、フェニルアラニン。

【 0 1 2 6 】

非保存的置換ではこれらのクラスのうちの1つのメンバーを別のクラスに交換することになるであろう。それぞれのリボカリンの適正なコンフォメーションの維持に関与しない任意のシステイン残基も、分子の酸化安定性を改良し、異常な架橋を防止するために、一般的にはセリンで置換しうる。逆に、リボカリンには、その安定性を改良するために、システイン結合を加えてもよい。

【0127】

突然変異は、上で考察した挿入を含めていずれも、確立された標準的方法を使って、核酸レベルで、例えばDNAレベルで、極めて容易に実現することができる。アミノ酸配列の改変の具体例は、挿入または欠失、ならびにアミノ酸置換である。そのような置換は保存的でありうる。すなわち、アミノ酸残基は、特性が、とりわけ極性およびサイズに関して、化学的に類似する特性を持つアミノ酸残基で置き換えられる。保存的置換の例は、以下のグループのメンバー間での置き換えである：1) アラニン、セリン、およびスレオニン；2) アスパラギン酸およびグルタミン酸；3) アスパラギンおよびグルタミン；4) アルギニンおよびリジン；5) イソロイシン、ロイシン、メチオニン、およびバリン；ならびに6) フェニルアラニン、チロシン、およびトリプトファン。他方、アミノ酸配列中に非保存的改変を導入することも可能である。加えて、単一のアミノ酸残基を置き換える代わりに、涙液リボカリンの一次構造のうちの1つまたは複数の連続アミノ酸を挿入または欠失させることも、それらの欠失または挿入が安定なフォールディングされた/機能的ムテインをもたらす限りにおいて、可能である。

【0128】

アミノ酸配列の修飾には、一定の制限酵素のための切断部位を組み入れることによって変異リボカリン遺伝子またはそのパーツのサブクローニングを簡単にするための、単一アミノ酸位置の指定突然変異誘発が含まれる。加えて、CD137などの所与のターゲットに対するリボカリンムテインの親和性をさらに改良するために、これらの突然変異を組み入れることもできる。さらにまた、必要であれば、フォールディング安定性、血清中安定性、タンパク質耐性または水溶性を改良するため、または凝集傾向を低減するためなど、ムテインの一定の特徴を調節するために、突然変異を導入することができる。例えばジスルフィド架橋形成を防止するために天然のシステイン残基を他のアミノ酸に変異させることができる。例えば、ポリエチレングリコール (PEG)、ヒドロキシエチルデンプン (HES)、ビオチン、ペプチドまたはタンパク質などの他の化合物へのコンジュゲーションのために、または非天然のジスルフィド連結を形成させるために、新しい反応性基を導入する目的で、計画的に他のアミノ酸配列位置をシステインに変異させることも可能である。生成したチオール部分は、例えばそれぞれのリボカリンムテインの血清中半減期を増加させる目的で、ムテインをPEG化またはHES化するために使用しうる。Tlcムテインのアミノ酸配列中にシステイン残基を導入するためのそのような突然変異の例示的選択肢には、置換Thr40 Cys、Glu73 Cys、Arg90 Cys、Asp95 Cys、およびGlu131 Cysが含まれる。アミノ酸位置40、73、90、95および/または131のいずれかの側部に生成したチオール部分は、例えばそれぞれのTlcムテインの血清中半減期を増加させる目的で、ムテインをPEG化またはHES化するために使用しうる。

【0129】

例えば、ポリエチレングリコール (PEG)、ヒドロキシエチルデンプン (HES)、ビオチン、ペプチドまたはタンパク質などの他の化合物へのコンジュゲーションのために、または非天然のジスルフィド連結を形成させるために、新しい反応性基を導入する目的で、他のアミノ酸配列位置をシステインに変異させることも可能である。

【0130】

いくつかの態様において、上記部分の1つを本開示のリボカリンムテインにコンジュゲートするのであれば、アミノ酸側鎖へのコンジュゲーションが有利である。適切なアミノ酸側鎖は、ヒトリボカリンのアミノ酸配列中に天然に存在するか、突然変異誘発によって導入することができる。適切な結合部位を突然変異誘発によって導入する場合、選択肢の1つは、適当な位置にあるアミノ酸のシステイン残基による置き換えである。例えばその

ような突然変異には、ヒト涙液リボカリンの野生型配列におけるThr40 Cys、Glu73 Cys、Arg90 Cys、Asp95 CysまたはGlu131 Cys置換のうちの少なくとも1つが含まれる。これらの位置のいずれかに新しく作出されたシステイン残基は、次に、ムテインの血清中半減期を延ばす部分、例えばPEGまたはその活性化誘導体にムテインをコンジュゲートするために、利用することができる。

【0131】

ヒトリボカリン2のムテインに関して、ヒトリボカリン2ムテインを含むリボカリンのアミノ酸配列中にシステイン残基を導入するためのそのような突然変異の例示的選択肢には、ヒトNGALの野生型配列の配列位置14、21、60、84、88、116、141、145、143、146または158に対応する配列位置のうちの少なくとも1つにおけるシステイン(Cys)残基の導入が含まれる。本開示のヒトリボカリン2ムテインが、SWISS-PROT/UniProtデータベースアクセッション番号P80188の配列と比較して、システインが別のアミノ酸残基で置き換えられた配列を有するいくつかの態様では、対応するシステインを配列中に再導入しうる。具体例として、そのような場合には、SWISS-PROTアクセッション番号P80188の配列中に元々存在するシステインに復帰させることによって、アミノ酸位置87のシステイン残基を導入することができる。アミノ酸位置14、21、60、84、88、116、141、145、143、146および/または158のいずれかの側部に生成したチオール部分は、それぞれのヒトリボカリン2ムテインの血清中半減期を増加させる目的で、ムテインをPEG化またはHES化するために使用しうる。

【0132】

別の一態様では、上記化合物の1つを本開示のリボカリンムテインにコンジュゲートするために適切なアミノ酸側鎖を提供する目的で、人工アミノ酸を突然変異誘発によって導入することができる。一般に、そのような人工アミノ酸は、より高い反応性を持ち、よって所望の化合物へのコンジュゲーションを容易にするように設計される。人工tRNAによって導入されうるそのような人工アミノ酸の一例は、パラアセチルフェニルアラニンである。

【0133】

本明細書に開示するムテインのいくつかの応用には、それらを融合タンパク質の形態で使用することが有利でありうる。いくつかの態様において、本開示のリボカリンムテインは、そのN末またはそのC末でタンパク質、タンパク質ドメインまたはペプチド、例えばシグナル配列および/またはアフィニティータグに融合される。

【0134】

Strep-tag (登録商標) またはStrep-tag II (Schmidt, T.G.M. et al. (1996) J. Mol. Biol. 255, 753-766)、mycタグ、FLAGタグ、His₆タグまたはHAタグなどのアフィニティータグ、またはグルタチオン-S-トランスフェラーゼなどのタンパク質も、組換えタンパク質の容易な検出および/または精製を可能にし、これらは適切な融合パートナーのさらなる例である。最後に、発色性または蛍光性を持つタンパク質、例えば緑色蛍光タンパク質(GFP)または黄色蛍光タンパク質(YFP)も、本開示のリボカリンムテインにとって適切な融合パートナーである。

【0135】

一般に、本開示のリボカリンムテインは、化学的、物理的、光学的、または酵素的反応において検出可能な化合物またはシグナルを直接的または間接的に生成する任意の適当な化学物質または酵素で、標識することが可能である。物理的反応の、そして同時に光学的反応/マーカーの、一例は、照射時の蛍光の放射、または放射性標識を使った場合のX線の放射である。アルカリホスファターゼ、セイヨウワサビペルオキシダーゼおよび β -ガラクトシダーゼは、発色性反応生成物の形成を触媒する酵素標識(同時に光学的標識)の例である。一般に、抗体によく使用される標識は(もっぱら免疫グロブリンのFc部分中の糖部分と共に使用するものを除けば)すべて、本発明のリボカリンムテインへのコンジュゲーションにも使用することができる。本発明のリボカリンムテインは、任意の適切な治療活性作用物質と、そのような作用物質を所与の細胞、組織または器官に標的送達するため

に、または細胞の選択的ターゲティング、例えば周囲の正常細胞に影響を及ぼすことのない腫瘍細胞の選択的ターゲティングのために、コンジュゲートすることもできる。そのような治療活性作用物質の例には、放射性核種、毒素、小有機分子および治療ペプチド（例えば細胞表面受容体のアゴニスト/アンタゴニストとして作用するペプチド、または所与の細胞ターゲット上のタンパク質結合部位に関して競合するペプチド）が包含される。ただし、本開示のリボカリウムテインは、治療上活性な核酸、例えばアンチセンス核酸分子、低分子干渉RNA、マイクロRNAまたはリボザイムなどとコンジュゲートすることもできる。そのようなコンジュゲートは当技術分野において周知の方法によって生産することができる。

【0136】

上記のように、本開示のリボカリウムテインは、いくつかの態様において、ムテインの血清中半減期を延ばす部分にコンジュゲートされうる（これについては、そのようなコンジュゲーション戦略がCTLA-4に対する結合親和性を有するヒト好中球ゼラチナーゼ関連リボカリウムのムテインに関して記述されているPCT公開WO 2006/56464も参照されたい）。血清中半減期を延ばす部分は、ポリアルキレングリコール分子、ヒドロキシエチルデンプン、脂肪酸分子、例えばパルミチン酸（Vajo & Duckworth 2000, Pharmacol. Rev. 52, 1-9）、免疫グロブリンのFc部分、免疫グロブリンのCH3ドメイン、免疫グロブリンのCH4ドメイン、アルブミン結合ペプチド、またはアルブミン結合タンパク質、トランスフェリンでありうるが、これらはほんの一例にすぎない。アルブミン結合タンパク質は、細菌のアルブミン結合タンパク質、抗体、ドメイン抗体を含む抗体フラグメント（例えば米国特許第6,696,245号参照）、またはアルブミンに対する結合活性を持つリボカリウムテインでありうる。したがって、本開示のリボカリウムテインの半減期を延ばすための適切なコンジュゲーションパートナーには、アルブミン結合タンパク質、例えば細菌のアルブミン結合ドメイン、例えば連鎖球菌プロテインGのもの（Koenig, T., & Skerra, A. (1998) J. Immunol. Methods 218, 73-83）が包含される。コンジュゲーションパートナーとして使用することができるアルブミン結合ペプチドの他の例は、例えば、米国特許出願第2003/0069395号またはDennisら（Dennis, M.S., Zhang, M., Meng, Y.G., Kadkhodayan, M., Kirchhofer, D., Combs, D. & Damico, L.A. (2002) J Biol Chem 277, 35035-35043）に記載されている、Cys-Xaa₁-Xaa₂-Xaa₃-Xaa₄-Cysコンセンサス配列を有するものであり、ここで、Xaa₁はAsp、Asn、Ser、Thr、またはTrpであり、Xaa₂はAsn、Gln、His、Ile、Leu、またはLysであり、Xaa₃はAla、Asp、Phe、Trp、またはTyrであり、Xaa₄はAsp、Gly、Leu、Phe、Ser、またはThrである。

【0137】

別の態様では、アルブミンそのもの（Osborn, B.L. et al., 2002, J. Pharmacol. Exp. Ther. 303, 540-548）またはアルブミンの生物学的活性フラグメントを、本開示のリボカリウムテインのコンジュゲーションパートナーとして使用することができる。「アルブミン」という用語は、すべての哺乳動物アルブミン、例えばヒト血清アルブミンまたはウシ血清アルブミンまたはラットアルブミンを包含する。アルブミンまたはそのフラグメントは、米国特許第5,728,553号または欧州特許出願EP 0 330 451およびEP 0 361 991に記載されているように組換え生産することができる。Novozymes Delta Ltd.（英国ノッティンガム）の組換えヒトアルブミン（Recombunin（登録商標））を、ムテインの半減期を延ばすために、本開示のリボカリウムテインにコンジュゲートまたは融合することができる。

【0138】

アルブミン結合タンパク質が抗体フラグメントである場合、それはドメイン抗体でありうる。ドメイン抗体（dAb）は、最適な安全性および効力製品プロファイルを作出するために、生物物理学的特性およびインビボ半減期の正確なコントロールが可能になるように操作される。ドメイン抗体は例えばDomantis Ltd.（英国ケンブリッジおよび米国マサチューセッツ州）から市販されている。

【0139】

本開示のリボカリンムテインの血清中半減期を延ばすための部分としてトランスフェリンを使用する場合は、ムテインを非グリコシル化トランスフェリンのN末、C末またはその両方に遺伝子融合することができる。非グリコシル化トランスフェリンは14～17日の半減期を有し、トランスフェリン融合タンパク質も同様に延長された半減期を有するであろう。トランスフェリン担体は、高いバイオアベイラビリティ、体内分布および循環安定性も提供する。この技術は、BioRexis (BioRexis Pharmaceutical Corporation、米国ペンシルバニア州) から市販されている。タンパク質安定剤/半減期延長パートナーとして使用するための組換えヒトトランスフェリン (DeltaFerrin (商標)) も、Novozymes Delt Ltd. (英国ノッティンガム) から市販されている。

【0140】

10

本開示のリボカリンムテインの血清中半減期を延ばす目的で免疫グロブリンのFc部分を使用する場合は、Syntonix Pharmaceuticals, Inc (米国マサチューセッツ州) から市販されているSynFusion (商標) 技術を使用しうる。このFc融合物技術の使用は、より長時間作用する生物製剤の作出を可能にし、例えば、薬物動態、溶解度、および生産効率を改良するために抗体のFc領域に連結された2コピーのムテインからなりうる。

【0141】

本開示のリボカリンムテインの半減期を延ばすためのさらにもう一つの代替策は、ムテインのN末またはC末に、長い構造不定のフレキシブルなグリシンリッチ配列 (例えば約20～80個の連続するグリシン残基を持つポリグリシン) を融合することである。例えばWO2007/038619に開示されているこのアプローチは、「rPEG」(組換えPEG) とも呼ばれている。

20

【0142】

ポリアルキレングリコールをコンジュゲーションパートナーとして使用する場合、ポリアルキレングリコールは、置換、無置換、直鎖または分岐鎖であることができる。活性化ポリアルキレン誘導体であることもできる。適切な化合物の例は、インターフェロンとの関係においてWO 99/64016、米国特許第6,177,074号または米国特許第6,403,564号に記載されているポリエチレングリコール (PEG) 分子、または他のタンパク質、例えばPEG修飾アスパラギナーゼ、PEG-アデノシンデアミナーゼ (PEG-ADA) またはPEG-スーパーオキシドジスムターゼに関して記載されているポリエチレングリコール (PEG) 分子である (例えば、Fuertges et al. (1990) "The Clinical Efficacy of Poly (Ethylene Glycol) -Modified Proteins" J. Control. Release 11, 139-148参照)。ポリエチレングリコールのようなポリマーの分子量は、例えば約10,000、約20,000、約30,000または約40,000ダルトンの分子量を持つポリエチレングリコールなど、約300～約70,000ダルトンの範囲に及びうる。さらに、例えば米国特許第6,500,930号または同第6,620,413号に記載されているように、糖質オリゴマーおよび糖質ポリマー、例えばデンプンまたはヒドロキシエチルデンプン (HES) を、血清中半減期を延ばす目的で、本開示のムテインにコンジュゲートすることができる。

30

【0143】

加えて、本明細書において開示するリボカリンムテインは、本開示のリボカリンムテインに、酵素活性または他の分子に対する結合親和性などの新しい特徴を付与しうる部分に融合しうる。適切な融合パートナーの例は、アルカリホスファターゼ、セイヨウワサビペルオキシダーゼ、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ、プロテインGのアルブミン結合ドメイン、プロテインA、抗体フラグメント、オリゴマー化ドメインまたは毒素である。

40

【0144】

特に、結果として生じる融合タンパク質の両方の「構成要素」が所与の治療ターゲットと一緒に作用するように、本明細書において開示するリボカリンムテインを、独立した酵素活性部位と融合することが可能であるだろう。リボカリンムテインの結合ドメインを疾患原因ターゲットに結合することで、酵素ドメインがターゲットの生物学的機能を無効にすることを可能にする。

【0145】

50

本開示は、本開示のリボカリウムテインをコードするヌクレオチド配列を含む核酸分子（DNAおよびRNA）にも関係する。遺伝コードの縮重は、同じアミノ酸を指定する別のコドンによる一定のコドンの置換を可能にするので、本開示は、リボカリウムテインをコードする本明細書記載の具体的核酸分子に限定されず、機能的ムテインをコードするヌクレオチド配列を含むすべての核酸分子を包含する。この点に関して、本開示は、SEQ ID NO:24～39に示す、いくつかの本開示のリボカリウムテインをコードするヌクレオチド配列を提供する。

【0146】

本開示の一態様において、本方法は、核酸分子を、ヒトNGALの直鎖ポリペプチド配列（SEQ ID NO:2）の配列位置28、36、40～41、49、52、65、68、70、72～73、77、79、81、83、87、94、96、100、103、106、125、127、132および134に対応する配列位置のうちの少なくとも1つまたはさらにそれ以上をコードするヌクレオチドトリプレットにおける突然変異誘発に供する工程を含む。

10

【0147】

本開示による方法の別の態様では、ヒト涙液リボカリウムをコードする核酸分子をまず、ヒト涙液リボカリウムの直鎖ポリペプチド配列（SEQ ID NO:1）のアミノ酸配列位置5、26～31、33～34、42、46、52、56、58、60～61、65、71、85、94、101、104～106、108、111、114、121、133、148、150および153のうちの1つまたは複数における突然変異誘発に供する。次に、ヒト涙液リボカリウムをコードする核酸分子を、成熟ヒト涙液リボカリウムの直鎖ポリペプチド配列のアミノ酸配列位置101、111、114および153のうちの1つまたは複数における突然変異誘発にも供する。

20

【0148】

本開示は、表示した実験的突然変異誘発の配列位置以外に追加の突然変異を含む、本開示のリボカリウムテインをコードする核酸分子も包含する。そのような突然変異は許容されることが多く、例えばそれらがムテインのフォールディング効率、血清中安定性、熱安定性またはリガンド結合親和性の改良に寄与するのであれば、有利であると判明する場合さえある。

【0149】

本願において開示する核酸分子は、この核酸分子の発現を可能にするための1つ（または複数の）制御配列に「機能的に連結され」うる。

30

【0150】

DNAなどの核酸分子は、それが、転写制御および/または翻訳制御に関する情報を含有する配列要素を含み、そのような配列がポリペプチドをコードするヌクレオチド配列に「機能的に連結され」ているのであれば、「核酸分子を発現する能力を有する」または「ヌクレオチド配列の発現を可能にする」能力を有するという。機能的連結とは、制御配列要素と発現すべき配列とが遺伝子発現を可能にするような形で接続されている連結である。遺伝子発現に必要な制御領域の正確な性質は種間で変動しうるが、一般にこれらの領域はプロモーターを含み、原核生物の場合、それは、プロモーターそのもの、すなわち転写の開始を指示するDNA要素と、RNAに転写されたときに翻訳開始のシグナルを出すことになるDNA要素との両方を含有する。そのようなプロモーター領域は通常、転写および翻訳の開始に参与する5'非コード配列、例えば原核生物における-35/-10ボックスおよびシャイン・ダルフノ配列、または真核生物におけるTATAボックス、CAAT配列、および5'キャッピング要素を含む。これらの領域は、エンハンサー要素またはリプレッサー要素、ならびにネイティブポリペプチドを宿主細胞の特定コンパートメントに導くための、翻訳されるシグナル配列およびリーダー配列も含むことができる。

40

【0151】

加えて、3'非コード配列は、転写終結、ポリアデニル化などに関与する制御要素を含有しうる。ただし、これらの終結配列が特定の宿主細胞において十分に機能しない場合には、それらをその細胞において機能的なシグナルで置換しうる。

【0152】

50

それゆえに、本開示の核酸分子は、プロモーター配列などの制御配列を含むことができる。いくつかの態様において、本開示の核酸分子はプロモーター配列および転写終結配列を含む。適切な原核生物プロモーターには、例えばtetプロモーター、lacUV5プロモーターまたはT7プロモーターなどがある。真核細胞における発現に有用なプロモーターの例は、SV40プロモーターまたはCMVプロモーターである。

【0153】

本開示の核酸分子は、ベクター、または他の任意の種類のクローニング媒体、例えばプラスミド、ファージミド、ファージ、バキュロウイルス、コスミド、もしくは人工染色体の一部であることもできる。

【0154】

一態様では、核酸分子がファージミドに含まれる。ファージミドベクターとは、関心対象のcDNAに融合された、M13またはf1などの溶原性ファージの遺伝子間領域またはそれらの機能的部分をコードするベクターを表す。そのようなファージミドベクターと適当なヘルパーファージ（例えばM13K07、VCS-M13またはR408）とによる細菌宿主細胞の重感染後に、インタクトなファージ粒子が生産され、それによって、コードされている異種cDNAを、ファージ表面にディスプレイされたその対応ポリペプチドに物理的にカップリングすることが可能になる（例えばLowman, H.B. (1997) Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 26, 401-424、またはRodi, D.J., and Makowski, L. (1999) Curr. Opin. Biotechnol. 10, 87-93参照）。

【0155】

そのようなクローニング媒体は、上述の制御配列および本明細書に記載のリポカリンムテインをコードする核酸配列の他にも、発現に使用される宿主細胞に適合する種に由来する複製配列およびコントロール配列、ならびに形質転換細胞またはトランスフェクト細胞に選択可能な表現型を付与する選択マーカーを含むことができる。当技術分野では数多くの適切なクローニングベクターが公知であり、市販されている。

【0156】

本明細書に記載するリポカリンムテインをコードするDNA分子、そして特に、そのようなムテインのコード配列を含有するクローニングベクターは、当該遺伝子を発現させる能力を有する宿主細胞中に形質転換することができる。形質転換は標準的技法を使って行うことができる。したがって本開示は、本明細書に開示する核酸分子を含有する宿主細胞にも向けられる。

【0157】

形質転換細胞は、本開示の融合タンパク質をコードするヌクレオチド配列の発現に適した条件下で培養される。適切な宿主細胞は、原核細胞、例えば大腸菌（*Escherichia coli*）（*E. coli*）もしくは枯草菌（*Bacillus subtilis*）、または真核細胞、例えばサッカロミセス・セレビシエ（*Saccharomyces cerevisiae*）、ピキア・パストリス（*Pichia pastoris*）、SF9またはHigh5昆虫細胞、不死化哺乳動物細胞株（例えばHeLa細胞またはCHO細胞）または初代哺乳動物細胞であることができる。

【0158】

本開示は、本明細書に記載するリポカリンムテインの生産方法であって、ムテイン、ムテインのフラグメント、またはムテインと別のポリペプチド（例えば別のリポカリンムテイン）との融合タンパク質が、ムテインをコードする核酸から出発して、遺伝子工学的方法を使って生産される方法にも関係する。本方法は、インビボで実行することができ、リポカリンムテインを、例えば細菌宿主細胞または真核宿主細胞中で生産し、次に、その宿主生物またはその培養物から単離することができる。タンパク質をインビトロで、例えばインビトロ翻訳系を使って生産することも可能である。

【0159】

リポカリンムテインをインビボで生産する場合は、そのようなムテインをコードする核酸を、組換えDNA技術（上で既に概説したもの）を使って、適切な細菌宿主細胞または真核宿主細胞中に導入する。この目的には、まず、確立された標準的方法を使って、本明細

10

20

30

40

50

書に記載するリポカリウムテインをコードする核酸分子を含むクローニングベクターで宿主細胞を形質転換する。次に、異種DNAの発現を許し、したがって対応ポリペプチドの合成を許す条件下で、宿主細胞を培養する。次に、ポリペプチドを細胞から、または培養培地から、回収する。

【0160】

いくつかの態様において、本開示において開示するDNAなどの核酸分子は、本開示の融合タンパク質の発現が可能になるように、本開示の別の核酸分子に「機能的に連結され」うる。この点に関して、作動的連結とは、第1核酸分子の配列要素と、第2核酸分子の配列要素とが、単一ポリペプチドとしての融合タンパク質の発現を可能にするような形で、接続される連結である。

10

【0161】

加えて、いくつかの態様において、Cys76とCys175との間の天然ジスルフィド結合は、本開示のNGALムテインでは除去しうる。いくつかの態様では、本開示のTlcムテインの場合も、Cys61とCys153との間の天然ジスルフィド結合を除去しうる。したがって、そのようなムテインは、還元性の酸化還元環境を有する細胞コンパートメント、例えばグラム陰性菌の細胞質中で、生産することができる。

【0162】

本開示のリポカリウムテインが分子内ジスルフィド結合を含む場合は、適当なシグナル配列を使って、酸化性の酸化還元環境を有する細胞コンパートメントに新生ポリペプチドを向かわせることが好ましいであろう。そのような酸化性環境は、大腸菌などのグラム陰性菌のペリプラズムによって、またはグラム陽性菌の細胞外環境において、または真核細胞の小胞体 (endoplasmatic reticulum) の内腔において提供されうるものであり、通常は構造的ジスルフィド結合の形成に有利である。

20

【0163】

ただし、宿主細胞の、好ましくは大腸菌の、サイトゾルにおいて本開示のムテインを生産することも可能である。その場合は、ポリペプチドを可溶性の折りたたまれた状態で直接的に得るか、封入体の形態で回収した後、インビトロで復元させることができる。さらなる選択肢は、酸化性の細胞内環境を有し、それゆえに、サイトゾルにおけるジスルフィド結合の形成を許しうる、特別な宿主株の使用である (Venturi et al. (2002) J. Mol. Biol. 315, 1-8)。

30

【0164】

しかし、本明細書に記載するリポカリウムテインは、必ずしも、遺伝子工学だけを使って作製または生産されとは限らない。むしろ、そのようなムテインは、メリフィールド固相ポリペプチド合成などの化学合成によって得るか、インビトロでの転写および翻訳によって得ることもできる。例えば、分子モデリングを使って有望な突然変異を同定した後、求めている (設計した) ポリペプチドをインビトロで合成し、CD137に対する結合活性を調べることが可能である。タンパク質の固相および/または液相合成法は当技術分野において周知である (例えばBruckdorfer, T. et al. (2004) Curr. Pharm. Biotechnol. 5, 29-43参照)。

【0165】

別の態様では、当業者に公知の確立された方法を使用するインビトロ転写/翻訳によって、本開示のリポカリウムテインを生産しうる。

40

【0166】

本開示によって考慮されているがそのタンパク質配列または核酸配列が本明細書において明示的には開示されていないリポカリウムテインを調製するのに役立つ方法は、当業者には理解されるであろう。概要として、アミノ酸配列のそのような修飾には、例えば、一定の制限酵素のための切断部位を組み入れることによって変異リポカリウム遺伝子またはそのパーツのサブクローニングを簡単にするための、単一アミノ酸位置の指定突然変異誘発が含まれる。加えて、リポカリウムテインのそのターゲット (例えばそれぞれCD137) に対する親和性をさらに改良するために、これらの突然変異を組み入れることもできる。さ

50

らにまた、必要であれば、フォールディング安定性、血清中安定性、タンパク質耐性または水溶性を改良するため、または凝集傾向を低減するためなど、ムテインの一定の特徴を調節するために、突然変異を導入することができる。例えばジスルフィド架橋形成を防止するために、天然のシステイン残基を別のアミノ酸に変異させうる。

【0167】

本明細書において開示するリポカリンムテインおよびその誘導体は、抗体またはそのフラグメントと同様に、多くの分野において使用することができる。例えばリポカリンムテインは、酵素、抗体、放射性物質、または化学的活性もしくは明確な結合特徴を有する他の任意の基で標識するために使用することができる。そうすることにより、各々のターゲットまたはそのコンジュゲートもしくは融合タンパク質を検出し、またはそれらと接触させることができる。加えて、本開示のリポカリンムテインは、確立された分析方法（例えばELISAまたはウェスタンブロット）によって、または顕微鏡法もしくはイムノセンソリックス（immunosensorics）によって、化学構造を検出するためにも役立つ。この点に関して、検出シグナルは、適切なムテインコンジュゲートまたは融合タンパク質の使用によって直接的に生成させるか、抗体を介して結合したムテインの免疫化学的検出によって間接的に生成させることができる。

【0168】

この開示のさらなる目的、利点、および特徴は、限定を意図しない以下の実施例および添付するその図面を検討すれば、当業者には明白になるであろう。したがって、例示的態様および随意の特徴によって本開示を具体的に開示するが、当業者は、本明細書に開示する、そこに体现されている開示の変更態様および変形態様を採用することができ、そのような変更態様および変形態様はこの開示の範囲内にあるとみなされることを理解すべきである。

【実施例】

【0169】

V. 実施例

実施例1: CD137に特異的に結合するムテインの選択および最適化

本願において開示する代表的なCD137特異的リポカリンムテインは、ヒトNGALおよびヒトTLcに基づくナイーブ突然変異体ライブラリーから選択された。CD137結合性ムテインを得るために異なる戦略および異なるターゲットを使用した。利用した組換えターゲットは、ヒトからのCD137の全細胞外ドメインの市販Fc融合物（huCD137-Fc、R&D Systems 838-4 B）およびいずれもヒトFcフラグメントへの融合物として作製されたヒトCD137の個々のサブドメインである。代替的非Fc融合物ターゲットとして、本発明者らはHisタグ付きヒトCD137細胞外ドメイン（Invitrogen、10041-H08H-250）を使用した。あるいは、ヒトCD137の全cDNAをトランスフェクトしたCHO細胞を用いる細胞ベースのパニングを使用した。タンパク質ベースおよび細胞ベースのパニングは標準的手法を使って行った。選択後に得られたクローンを、実施例2に記載するスクリーニング工程に付した。

【0170】

実施例2: ハイスループットELISAスクリーニングを使ったCD137に特異的に結合するムテインの同定

C末Strep-tag（SEQ ID NO:23、実施例3参照）に融合された個々のリポカリンムテインを使って、2×YT/Amp培地に接種し、定常期まで終夜（14～18時間）成長させた。次に、定常期培養物から50 μLの2×YT/Ampに接種し、37 °Cで3時間インキュベートした後、OD₅₉₅が0.6～0.8に達するまで22 °Cに移行した。1.2 μg/ml アンヒドロテトラサイクリンを補足した2×YT/Ampを10 μL添加することによって、ムテインの生産を誘発した。培養物を翌日まで22 °Cでインキュベートした。PBS/T中の5%（w/v）BSA 40 μLを添加し、25 °Cで1時間インキュベートした時点で、培養物はスクリーニングアッセイに使用する準備が整った。

【0171】

ヒトCD137への単離されたムテインの結合は、該当種のhuCD137-Fc（PBS中の5 μg/ml）をマイクロタイタープレートに4 °Cで一晩コーティングすることによって試験した。2%BS

10

20

30

40

50

Aを含有するPBSTでプレートをブロッキングした後、BSAでブロッキングした培養物20 μ Lをマイクロタイタープレートに加え、25℃で1時間インキュベートした。結合したムテインを、セイヨウワサビペルオキシダーゼにコンジュゲートされた抗StrepTag抗体で検出した（1時間のインキュベーション；IBA、ゲッチング）。定量的ために、20 μ LのQuantaBlu蛍光原性ペルオキシダーゼ基質を加え、結果として生じた蛍光を励起波長330nmおよび蛍光波長420nmで決定した。

【0172】

温度耐性が増大しているムテインを選択するために、BSAでブロッキングした培養物を60℃で1時間インキュベートし、次に室温まで冷ましてから、それらを、先のパラグラフで述べたようにBSAでブロッキングしたCD137被覆マイクロプレートに加えた。次に、先のパラグラフで述べたようにムテインを処理し、細菌発現、精製、およびさらなる特徴づけのために選択した。

【0173】

実施例3: ムテインの発現

発現後にStreptactinアフィニティークロマトグラフィーおよび分取用サイズ排除クロマトグラフィーを使ってムテインを精製するために、SAまたはPSAリンカーとStrep-tag（登録商標）II、WSHPQFEK（SEQ ID NO: 23）とを含むC末タグSAWSHPQFEK（SEQ ID NO: 21）またはPSAWSHPQFEK（SEQ ID NO: 22）

を持つユニークなムテインを、2YT-Amp培地中、大腸菌で発現させた。最後に、Mustang Eカラムを利用するエンドトキシン枯渇工程に、リボカリウムテインを付した。次に、精製されたリボカリウムテインを、以下のすべての実施例において詳述するように特徴づけた。

【0174】

実施例4: 表面プラズモン共鳴（SPR）によって決定したヒトCD137-Fc融合タンパク質に結合するムテインの親和性

表面プラズモン共鳴（SPR）を使って、本明細書において開示する代表的なリボカリウムテインの結合速度および親和性を測定した。

【0175】

ヒトCD137-Fc融合タンパク質（huCD137-Fc）への代表的ムテインの結合のSPR分析は、Biacore T200計器（GE Healthcare）において、HBS-EP+（1×；BR-1006-69；GE Healthcare）をランニング緩衝液として、37℃で行った。

【0176】

タンパク質測定の前に、コンディショニングのために、再生を3サイクル行った。誘導体化されたチップ表面の再生は、3M $MgCl_2$ を60秒適用した後に、10mMグリシン、pH1.7を180秒適用することによって達成された。後続の工程におけるhuCD137-Fcの固定化には抗ヒトIgG-Fc抗体を利用し、これはヒト抗体捕捉キットから採用した（GE Healthcare、BR-1008-39）。これを、標準的なアミンカップリング化学およびキットに含まれている固定化緩衝液（10mM酢酸ナトリウム、pH 5.0）を使ってCM5センサーチップ上に固定化した結果、約13000レゾナンスユニット（RU）のリガンド密度を得た。リファレンスチャンネルは相応に処理した。

【0177】

濃度0.5 μ g/mLのhuCD137-Fcを、この表面上に、HBS-EP+緩衝液中、10 μ L/分の流速で、180秒、捕捉した。リファレンスチャンネルにはターゲットタンパク質を適用しなかった。次に、リボカリウムテインを、HBS-EP+緩衝液中の適当な希釈系列として、30 μ L/分の流速で適用した。誘導体化されたチップ表面の再生は上述のように達成した。データはBiacore T200評価ソフトウェア（V2.0）で評価した。二重参照を使用し、生データの当てはめには1:1結合モデルを使用した。

【0178】

図1は、試験したリボカリウムテインについて決定されたSPRトレースと当てはめ曲線を示し、グラフには対応するSEQ ID NOが掲載されている。huCD137-Fcへの結合に関するデ

10

20

30

40

50

ータが図示されている。ヒトターゲットには明白なSPR結合シグナルがあり、一方、陰性対照であるSEQ ID NO:3およびSEQ ID NO:4は結合を呈さない。このデータの当てはめから得られる親和性を下記表1に掲載する。

【 0 1 7 9 】

【表 1】

SEQ ID AA	KD huCD137 [nM]	
SEQ ID NO: 5	162	
SEQ ID NO: 6	112	
SEQ ID NO: 7	110	
SEQ ID NO: 8	151	10
SEQ ID NO: 9	209	
SEQ ID NO: 10	112	
SEQ ID NO: 11	269	
SEQ ID NO: 12	36	
SEQ ID NO: 13	2	
SEQ ID NO: 14	9	
SEQ ID NO: 15	23	
SEQ ID NO: 16	30	
SEQ ID NO: 17	50	
SEQ ID NO: 18	77	20
SEQ ID NO: 19	98	
SEQ ID NO: 20	138	
SEQ ID NO: 3 (対照)	結合なし	
SEQ ID NO: 4 (対照)	結合なし	

【 0 1 8 0 】

実施例5: ヒトCD137-Fc融合タンパク質への結合におけるヒトCD137Lとムテインとの間の競合を決定するための表面プラズモン共鳴 (SPR) アッセイ

CD137に結合する本願記載のリポカリンムテインについては、一般に、2つの結合様式が可能である。第1の場合は、ムテインの結合部位がCD137へのヒトCD137リガンド (CD137L) の結合部位とオーバーラップする。そのようなリポカリンムテインがCD137に結合する場合、これは、CD137へのCD137Lの結合を妨害し、それに伴って、天然CD137Lシグナリングの妨害をもたらす (「競合結合」)。第2の場合は、ムテインの結合部位がCD137Lの結合部位とオーバーラップせず、そのようなリポカリンムテインは、CD137L結合および天然のCD137Lシグナリングを妨害することなく、CD137に結合することができる (「非競合結合」)。

【 0 1 8 1 】

CD137の、そのリガンドによるクラスター化は、CD137の下流シグナリング経路を活性化する。T細胞の場合、CD137活性化は、増殖および炎症誘発性サイトカインの生産などといった、T細胞の活性化物質応答の共刺激につながる。

【 0 1 8 2 】

CD137のクラスター化を誘発するもう一つの方法は、固定化CD137結合作用物質を使用することである。競合CD137結合物質と非競合CD137結合物質は、プレート上にコーティング (例えばプラスチック製培養ディッシュ上にコーティングして、そのディッシュ中でT細胞をインキュベート) した場合に、どちらもCD137のクラスター化を達成し、それによって下流シグナリングを活性化する。

【 0 1 8 3 】

それゆえに、一方では、上述のように適用した場合に、競合CD137結合物質と非競合CD137結合物質はどちらも、CD137の下流シグナリング経路を活性化することができる。

【 0 1 8 4 】

他方、競合CD137結合物質は、天然のCD137/CD137L相互作用を阻害し、それによって、C

10

20

30

40

50

D137陽性細胞がCD137L発現細胞、例えば抗原提示細胞と出会うことによって誘発される天然のシグナリングを抑制するために使用することができる。そのような作用様式は、不適当に強い炎症反応または自己免疫反応を抑制することが望まれる場合に望ましい。

【0185】

本願が競合型ムテインと非競合型ムテインの両方を提供することを証明するために、本発明者らは表面プラズモン共鳴（SPR）実験を使用した。本発明者らはそれを使って、ヒトCD137-Fc融合タンパク質（huCD137-Fc）への結合における、CD137Lと、本明細書において開示する3つの代表的リボカリウムテインとの間の競合を調べた。このアッセイでは、リボカリウムテインが予め形成されたCD137とCD137Lとの複合体に結合できるか否かを調べる。仮にこれが当てはまらなるとすれば、それは、CD137上のリボカリウムテイン結合性エピトープが、CD137上のCD137L結合性エピトープとオーバーラップすることの証拠になる。それゆえに、それぞれのムテインはCD137/CD137L相互作用に関して競合的にCD137に結合する。CD137Lとリボカリウムテインがどちらも同時に結合できるのであれば、その結合は、CD137/CD137L相互作用に関して非競合的である。

【0186】

競合アッセイは、Biacore T200計器（GE Healthcare）において、HBS-EP+（1×；BR-1006-69；GE Healthcare）をランニング緩衝液として、37℃で行った。ビオチンCAPtureキット（GE Healthcare）を使って、チップ表面上にビオチン化huCD137-Fcを固定化した。CD137-Fcタンパク質は、標準的なNHS化学を使ってビオチン化した。無希釈のビオチンCAPture試薬（ss-DNAオリゴとコンジュゲートされたストレプトアビジン）を、前もって固定化しておいた相補的ss-DNAオリゴを持つセンサーチップCAP上に捕捉した。その後、2 µg/mLのビオチン化CD137-Fcタンパク質を、5 µL/分の流速で、300秒適用した。チップ表面の再生は、250mM NaOH中の6M Guanidinium-HClを10 µL/分の流速で120秒適用することによって達成した。

【0187】

最初の2回の測定サイクルでは、実験条件下でCD137LがCD137にうまく結合することを確認すると共に、試験したリボカリウムテインの、リガンド非存在下での個々の結合について、リファレンスレベルを得た。以下に詳述するように、第3サイクルでは、CD137をCD137Lで飽和させてから、リボカリウムテインを加えた。

【0188】

ヒトCD137リガンド-Fc（R&D Systems 2295-4L-025/CF）リガンドを、固定化CD137-Fcタンパク質に、濃度500nM、流速30 µL/分で、30秒適用した。再生後に、リボカリウムテインを濃度5 µM、流速30 µL/分で、30秒適用した。最後に、さらに1回の再生サイクル後に、ヒトCD137リガンド-Fcを、固定化CD137-Fcタンパク質に、500nMの濃度で30秒適用してから、ムテインを5 µMの濃度で30秒適用し、ここでは、流速をどちらも30 µL/分とした。チップ表面の再生は、250mM NaOH中の6M Guanidinium-HClを10 µL/分の流速で120秒適用することによって達成した。結果として得られたセンサーグラムを視覚的に分析して、結合したCD137リガンド-Fcが、ムテインと固定化CD137-Fcタンパク質との相互作用に影響を及ぼすかどうかを決定した。サイクルのセンサーグラムはCD137リガンド-Fc相互作用であり、またはムテインを対照として単独で適用した。

【0189】

その結果得られたセンサーグラムの関連セグメントの代表例を、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:12およびSEQ ID NO:13のムテインについて、図2に掲載する。huCD137-Fc単独へのそれぞれのリボカリウムテインの結合に関するSPRトレースに、実線の軸を持つ矢印をつける。CD137Lで飽和させたhuCD137-Fcへのそれぞれのリボカリウムテインの結合に関するSPRトレースに、破線の軸を持つ矢印をつける。このデータは、例えばSEQ ID NO:5のムテインがCD137Lの存在下ではhuCD137-Fcに結合できないことを示している（図2A）。対照的に、SEQ ID NO:12のムテインとSEQ ID NO:13のムテインはどちらも、CD137Lの存在下でも非存在下でもよく似た応答でhuCD137-Fcに結合し、リボカリウムテインとCD137Lとの間に結合に関する競合がないことを示している。このデータを表2に要約する。

【 0 1 9 0 】

【表 2】

SEQ ID AA	結合様式
SEQ ID NO: 5	競合
SEQ ID NO: 12	非競合
SEQ ID NO: 13	非競合

【 0 1 9 1 】

実施例6: ヒトCD137を発現する細胞に結合するリボカリンムテインのFACS分析

ヒトCD137が安定にトランスフェクトされたチャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞（CHO-huCD137）へのリボカリンムテインおよび陰性対照の特異的結合を評価するために、本発明者らはFACS研究を使用した。細胞株は、Flp-Inシステム（Invitrogen）を製造者の説明書に従って使用することによって作製した。モックトランスフェクトFlp-In CHO細胞を陰性対照とした。

10

【 0 1 9 2 】

トランスフェクトCHO細胞は、10% ウシ胎児血清（FCS、Biochrom）と500 μ g/ml ハイグロマイシンB（Roth）とを補足したハムF12培地（Invitrogen）中で維持した。細胞は、製造者の説明に従って標準条件下（37℃、5%CO₂雰囲気）、細胞培養フラスコ中で培養した。継代培養またはFACS実験のために接着細胞を解離させるには、Accutase（PAA）を製造者の説明書に従って使用した。

20

【 0 1 9 3 】

実験を行うために、CD137陽性および陰性Flp-In CHO細胞をリボカリンムテインと共にインキュベートし、結合したムテインを抗リボカリン一次抗体および蛍光標識二次抗体を使って標識し、それらを以下に説明するようにFACS分析によって検出した。

【 0 1 9 4 】

5% ウシ胎児血清（PBS-FCS）を含有する氷冷PBS中で1ウェルあたり 1×10^5 細胞を1時間プレインキュベートした。次に、典型的には10 μ M ~ 1nMの範囲にあるリボカリンムテインおよび陰性対照の希釈系列を細胞に加え、氷上でインキュベーションを1時間続けた。細胞を300gでの遠心分離を使って氷冷PBS中で2回洗浄し、次にウサギ抗リボカリン一次抗体（Pieris,（ポリクローナルウサギ抗hNGALおよびウサギ抗hTLC; Pieris）と共に氷上で30分インキュベートした。細胞を氷冷PBSで2回洗浄し、PBS-FCSに再懸濁し、蛍光色素Alexa 488で標識された二次抗ウサギ抗体（Life Technologies）と共に氷上で30分インキュベートした。次に細胞を洗浄し、Guava easyCyte HTフローサイトメーターを使って分析した。典型的には、非生存細胞を排除するためにゲートを設定し、5,000イベントを記録した。数値結果を蛍光強度の幾何平均として表現する。

30

【 0 1 9 5 】

試験したすべてのクローンについてFACSヒストグラムを図3に掲載する。それぞれのプロットに、それぞれのリボカリンムテインのSEQ ID NOが示されている。SPRデータ（図1、表1）と一致して、すべてのムテインが、細胞上に発現したCD137に明白な結合を示す。このデータの当てはめから得られるEC₅₀を下記表2に掲載する。

40

【 0 1 9 6 】

【表 2】

SEQ ID AA	EC50 CHO::hCD137 [nM]
SEQ ID NO: 6	61.1
SEQ ID NO: 7	67.6
SEQ ID NO: 8	234.6
SEQ ID NO: 9	113.3
SEQ ID NO: 11	53
SEQ ID NO: 13	4.3
SEQ ID NO: 14	4.5
SEQ ID NO: 15	7.8
SEQ ID NO: 17	17.9
SEQ ID NO: 18	13.7
SEQ ID NO: 20	18
SEQ ID NO: 3 (対照)	結合なし
SEQ ID NO: 4 (対照)	結合なし

10

【0197】

実施例7:被覆リボカリンムテインを使った機能的T細胞活性化アッセイ

本発明者らはT細胞活性化アッセイを使って、一組の代表的CD137結合性リボカリンムテインの、T細胞応答を共刺激する能力を評価した。試験したムテイン（SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、およびSEQ ID NO:15）は、実施例4において、2nMから>23nMまでの範囲のSPR 20
親和性にまたがる（表1参照）。実施例5で述べたように、CD137のクラスター化を誘発するにはいくつかの方法があり、この実験では固定化CD137結合作用物質を適用した。リボカリンムテインを抗ヒトCD3抗体（ムロノマブ（Muronomab）、Janssen-Cilag）と一緒にプラスチック製ディッシュにコーティングし、次にその被覆表面上で、精製T細胞を可溶性抗ヒトCD28抗体（クローン28.2; eBioscience）の存在下でインキュベートした。CD137共刺激による共刺激を受けうるT細胞に閾値未満の刺激を与えるために、抗CD3抗体および抗CD28抗体を使用した。読み出し情報として、本発明者らは上清インターロイキン2（IL-2）レベルを測定した。IL-2生産の増加はT細胞活性化の特徴の一つであり、抗CD137抗体での共刺激によるIL-2レベルの増加は文献に記載されている（Fisher T. S. et al., Cancer Immunol Immunother (2012) 61:1721-1733）。陰性対照として、SEQ ID NO:4を利用した。以下に、この実験を詳細に説明する。 30

【0198】

ポリスクロース密度勾配（BiochromのBiocoll 1.077g/mL）による遠心分離をBiochromのプロトコールに従って行うことにより、健常ボランティアドナーのヒト末梢血単核球（PBMC）をバフィーコートから単離した。結果として得られたPBMCから、Pan T細胞精製キット（Miltenyi Biotec GmbH）と製造者のプロトコールとを使って、Tリンパ球を単離した。精製されたT細胞を90%FCSおよび10%DMSOからなる緩衝液に再懸濁し、液体窒素を使って直ちに凍結し、さらなる使用まで液体窒素中で保存した。アッセイのために、T細胞を16時間融解し、10%FCSおよび1%ペニシリン-ストレプトマイシン（Life Technologies）を補足した培養培地（RPMI 1640、Life Technologies）中で培養した。 40

【0199】

以下の手順を実験条件ごとに三連で行った。0.5 μg/mLの抗CD3抗体と25 μg/mLのウサギ抗リボカリン抗体（ポリクローナルウサギ抗hNGAL、Pieris）との混合物200 μLを使って、平底組織培養プレート（4）で終夜コーティングした。前述のウサギ抗リボカリン抗体は、親和性捕捉によるリボカリンムテインの固定化が可能になるように使用した。翌日、ウェルをPBSで2回洗浄し、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14およびSEQ ID NO:15のCD137結合性リボカリンムテイン50 μL（濃度はいずれも25 μg/mL）を、プレコートプレート上に37で1時間、捕捉した。SEQ ID NO:4を同様に使用して、陰性対照とした。再びPBSで2回洗浄した後、2 μg/mLのhCD28抗体を補足した培養培地中のT細胞懸濁液100 μL（5×10⁴個のT細胞に相当）を各ウェルに加えた。プレートをガス透過性シール（4titude）で覆い、 50

湿潤5%CO₂雰囲気下、37℃で3日間インキュベートした。次に、上清中のIL-2を評価した。

【0200】

プールした細胞培養上清中のヒトIL-2レベルは、R&D SystemsのIL-2 DuoSetキットを使って定量した。第1工程では、PBSに希釈した1μg/mLの「ヒトIL-2捕捉抗体」(R&D System)を使って、384ウェルプレート室温で2時間、コーティングした。次に、Biotek EL405 select CW洗浄機(Biotek)を使って、ウェルを80μLのPBS-T(0.05%Tween20を含有するPBS)で5回洗浄した。1%カゼイン(w/w)を追加して含有するPBS-T中で1時間ブロッキングを行った後、プールした上清および培養培地に希釈したIL-2標準の濃度系列を、384ウェルプレート中、4℃で終夜、インキュベートした。捕捉されたIL-2の検出および定量を可能にするために、100ng/mLビオチン化ヤギ抗ヒトIL-2-Bio検出抗体(R&D System)と1μg/mL Sulfotag標識ストレプトアビジン(Mesoscale Discovery)との混合物を、0.5%カゼインを含有するPBS-Tに入れて加え、室温で1時間インキュベートした。洗浄後に、25μLの読み取り緩衝液を各ウェルに加え、Mesoscale Discoveryリーダーを使ってすべてのウェルの電気化学ルミネセンス(ECL)シグナルを読み取った。分析および定量はMesoscale Discoveryソフトウェアを使って行った。

10

【0201】

その結果得られたデータを図4Aにプロットする。SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14およびSEQ ID NO:15のリボカリンムテインについては、T細胞活性化により、上清中のIL-2濃度が、SEQ ID NO:4の陰性対照と比較して、明らかに増加している。この実験は、試験したムテインがいずれも、プラスチック製培養ディッシュにコーティングした場合には、T細胞応答を共刺激できることを示している。

20

【0202】

実施例8:溶解状態にあるリボカリンムテインを用いる機能的T細胞活性化アッセイ

代表的リボカリンムテインがクラスター化なしで単に結合するだけでもCD137を活性化できるかどうかを試験するために、実施例7のアッセイを、実施例5と同様の方法で、ただし捕捉されたりボカリンムテインではなく可溶性リボカリンムテインを使用することによって実行した。このアッセイでは、平底組織培養プレートを上述のように、ただし抗CD3抗体だけを使ってコーティングした。T細胞添加工程(2μg/mL hCD28を含む)後まではプレートを上述のように処理し、次に、溶解状態にある濃度25μg/mLのリボカリンムテイン50μLを添加した。

30

【0203】

その結果得られたデータを図4Bにプロットする。試験したリボカリンムテインのいずれについても、SEQ ID NO:4の陰性対照と比較して、T細胞活性化ゆえに上清のIL-2濃度が有意に増加することはない。この実験は、溶解状態にある単量体型リボカリンムテインが、すべてのCD137受容体を飽和させるのに十分な濃度において、T細胞を共刺激しないことを示している。

【0204】

実施例9:被覆リボカリンムテインを使った機能的T細胞活性化アッセイ

SEQ ID NO:13のムテインが持つT細胞応答共刺激能力をさらに詳細に調べるために、本発明者らは実施例7と同様のT細胞活性化アッセイを使用した。本発明者らは、読み出し情報として、3日間のインキュベーション後のT細胞増殖の継続を、4時間BrdUパルスを使って評価し、上清のIL-2レベルおよびインターフェロンガンマ(IFN-γ)レベルを測定した。増殖およびIL-2生産に加えて、IFN-γ生産の増加もT細胞活性化のさらなる特徴であり、抗CD137抗体での共刺激によるIFN-γレベルの増加は文献に記載がある(Jure-Kunkel, M.らの米国特許第7288638号)。

40

【0205】

陰性対照として、野生型様リボカリンムテインSEQ ID NO:4を利用した。この実験は、いくつかの局面では、実施例8で述べた実験と同一の方法で実行した。以下に、この実験の詳細を述べる。

50

【0206】

ポリスクロース密度勾配 (BiochromのBiocoll 1.077g/mL) による遠心分離をBiochromのプロトコールに従って行うことにより、健常ボランティアドナーのヒト末梢血単核球 (PBMC) をバフィーコートから単離した。結果として得られたPBMCから、Pan T細胞精製キット (Miltenyi Biotec GmbH) と製造者のプロトコールとを使って、Tリンパ球を単離した。精製されたT細胞を90%FCSおよび10%DMSOからなる緩衝液に再懸濁し、液体窒素を使って直ちに凍結し、さらなる使用まで液体窒素中で保存した。アッセイのために、T細胞を16時間融解し、10%FCSおよび1%ペニシリン-ストレプトマイシン (Life Technologies) を補足した培養培地 (RPMI 1640、Life Technologies) 中で培養した。

【0207】

以下の手順を実験条件ごとに三連で行った。5 μ g/mLの抗CD3抗体と25 μ g/mLのウサギ抗リボカリン-スキャフォールド抗体 (ポリクローナルウサギ抗hNGAL、Pieris) との混合物200 μ Lを使って、平底組織培養プレートを、4 $^{\circ}$ Cで終夜コーティングした。前述のウサギ抗リボカリン抗体は、親和性捕捉によるSEQ ID NO:13の固定化が可能になるように使用した。陰性対照として、抗CD3抗体の代わりにIgG1アイソタイプ対照を5 μ g/mLで25 μ g/mLウサギ抗リボカリン-スキャフォールド抗体と一緒にコーティングした。翌日、ウェルをPBSで2回洗浄し、7段階で50 μ g/mL ~ 0.8 μ g/mLの範囲にわたるSEQ ID NO:13の希釈系列50 μ Lを、プレコートプレート上に37 $^{\circ}$ Cで1時間、捕捉した。陰性対照として、SEQ ID NO:4を3つの濃度 (50 μ g/mL、25 μ g/mL、12.5 μ g/mL) で捕捉した。さらにもう一つの陰性対照として、IgG1アイソタイプおよび抗hNGAL捕捉抗体でコーティングされたウェルに、SEQ ID NO:13を50 μ g/mLで捕捉させた (上記参照)。再びPBSで2回洗浄した後、培養培地中のT細胞懸濁液100 μ L (5 \times 10⁴個のT細胞に相当) を各ウェルに加えた。これを濃度2 μ g/mLのhCD28抗体の存在下または非存在下で行った。プレートをガス透過性シール (4titude) で覆い、湿潤5%CO2雰囲気下、37 $^{\circ}$ Cで3日間インキュベートした。次に、上清中のIL-2濃度およびIFN- γ 濃度ならびに細胞増殖を評価した。

【0208】

T細胞増殖を定量するために、BrdU取り込みに基づく化学発光細胞増殖ELISAキット (Roche) を、製造者の説明書に従って使用した。簡単に述べると、3日目に、10 μ LのBrdU標識溶液を各ウェルに加え、湿潤5%CO2雰囲気下、37 $^{\circ}$ Cでさらに4時間、増殖を進行させた。プレートを300gで10分遠心分離し、三連試料の上清は、後に行うIL-2およびIFN- γ 定量のためにプールして、直ちに-20 $^{\circ}$ Cで保存した。次にプレートを60 $^{\circ}$ Cで1時間、乾燥した。200 μ Lの「FixDenat」溶液を各ウェルに加え、そのプレートを室温で30分、インキュベートした。取り込まれたBRDUを、ペルオキシダーゼ標識抗BrdU抗体で、室温における2時間のインキュベーションによって標識した。PheraStar FSリーダーにおいて化学発光性のペルオキシダーゼ触媒反応を定量することにより、BrdUレベルを評価した。

【0209】

プールした細胞培養上清中のヒトIL-2およびIFN- γ のレベルは、R&D SystemsのIL-2 DuoSetキットおよびIFN- γ DuoSetキットを使って定量した。どちらのサイトカインについても同様の手順を実行する。以下ではIL-2についてのみ、手順を説明する。第1工程では、PBSに希釈した1 μ g/mLの「ヒトIL-2捕捉抗体」 (R&D System) を使って、384ウェルプレートを室温で2時間、コーティングした。次に、Biotek EL405 select CW洗浄機 (Biotek) を使って、ウェルを80 μ LのPBS-T (0.05%Tween20を含有するPBS) で5回洗浄した。1%カゼイン (w/w) を追加して含有するPBS-T中で1時間ブロッキングを行った後、プールした上清および培養培地に希釈したIL-2標準の濃度系列を、384ウェルプレート中、4 $^{\circ}$ Cで終夜、インキュベートした。捕捉されたIL-2の検出および定量のために、100ng/mLビオチン化ヤギ抗hIL-2-Bio検出抗体 (R&D System) と1 μ g/mL Sulfoltag標識ストレプトアビジン (MesoScale Discovery) との混合物を、0.5%カゼインを含有するPBS-Tに入れて加え、室温で1時間インキュベートした。洗浄後に、25 μ Lの読み取り緩衝液を各ウェルに加え、MesoScale Discoveryリーダーを使って各ウェルの電気化学ルミネセンス (ECL) シグナルを読み取った。分析および定量はMesoScale Discoveryソフトウェアを使って行った。

【0210】

この実験の結果を図5に図示する。抗CD3抗体と抗CD28抗体の両方を使った実験に関する増殖、上清中のIL-2およびIFN- γ の読み出し情報を、それぞれ図5A、図5Cおよび図5Eに掲載する。抗CD3抗体だけを使って行った実験に関する同じ読み出し情報を、図5B、図5Dおよび図5Fに掲載する。

【0211】

抗CD3抗体および抗CD28抗体による刺激を使用した実験では、増殖速度の明白な用量依存的増加があり（図5A）、それはSEQ ID NO:4の陰性対照より最大で14倍高い。抗CD3 mAb非存在下での増殖（「IgG1」と記したカラム）は無視できるほどわずかである。IL-2生産については（図5C）、明白な用量依存的増加があって、それは、6.25 μ g/mLのSEQ ID NO:13コーティング濃度で最大応答に達して横ばい状態になり、それを上回る濃度では、常に、陰性対照と比較して約6倍までのレベルを保つ。IFN- γ 生産についても（図5E）、パターンはよく似ており、最大IFN-gレベルは陰性対照と比較して2.5倍の値に達する。

【0212】

抗CD3 mAb単独での刺激を使用する実験でも、増殖速度に明白な用量依存的増加が認められ（図5A）、それはSEQ ID NO:4の陰性対照より最大で4倍高い。6.25 μ g/mLのSEQ ID NO:13コーティング濃度で最大応答のようであり、それは陰性対照と比較して15倍の値に達する。これより高い濃度でも低い濃度でも、応答はかなり少ない。IFN- γ 生産については、用量依存的増加があって、それは、6.25 μ g/mLのSEQ ID NO:13コーティング濃度で最大応答に達して横ばい状態になり、それより高い濃度では、常に、陰性対照と比較して約2.5倍までのレベルを保つ。

【0213】

総合すると、この実施例9に示す実験は、CD28刺激の存在下でも非存在下でも、増殖、IL-2生産およびIFN- γ 生産に関して、SEQ ID NO:13のムテインによるT細胞応答の有意な共刺激を明白に証明している。

【0214】

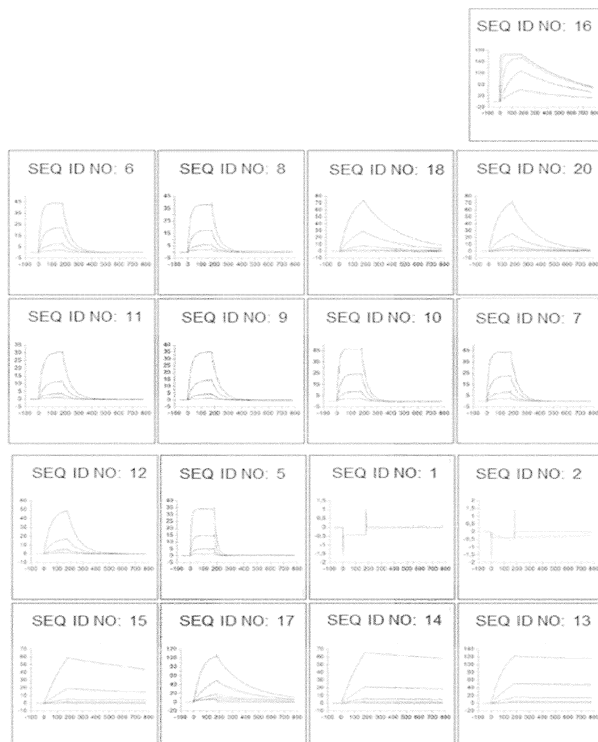
本明細書に例示的に記載した態様は、本明細書において具体的に開示しない任意の1つまたは複数の要素、1つまたは複数の限定が存在しなくても、適切に実施しうる。したがって例えば「含む（comprising）」、「包含する（including）」、「含有する（containing）」などの用語は、拡大的、非限定的に解釈されるべきである。加えて、本明細書において使用する用語および表現は、説明のために使用されているのであって、限定のために使用されているのではなく、そのような用語および表現の使用には、示され記載された特徴またはその部分のいずれの等価物も排除しようという意図はなく、さまざまな変更態様が本願発明の範囲内で可能であると認識される。したがって、本態様を好ましい態様および随意の特徴によって具体的に開示したが、当業者はその変更態様および変形態様を採ることができ、そのような変更態様および変形態様は本発明の範囲内にあるとみなされると理解すべきである。本明細書において記載した特許、特許出願、教科書および査読付き刊行物は、参照によりその全体が本明細書に組み入れられる。さらにまた、参照により本明細書に組み入れられた参考文献における用語の定義または用法が、本明細書に掲載した当該用語の定義と一致しないか相反する場合は、本明細書に掲載した当該用語の定義が適用され、参考文献における当該用語の定義は適用されない。一般的開示に含まれる狭い種概念および下位類概念群のそれぞれも、本発明の一部を形成する。これには、削除された事項が本明細書に具体的に陳述されているかどうかに関わらず、類概念から任意の内容を除去するただし書きまたは消極的限定の付いた本発明の一般的記述が包含される。加えて、特徴がマーカッシュ群で記載される場合、それによって本開示がそのマーカッシュ群の任意の個々の要素または任意の要素の部分群についても記載されることは、当業者にはわかるであろう。さらなる態様は、以下の特許請求の範囲から明らかになるであろう。

【0215】

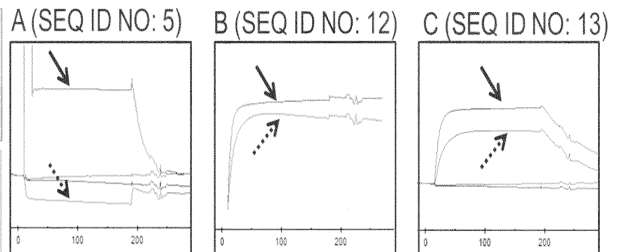
等価物：当業者は、本明細書に記載した本発明の具体的態様に対する多くの等価物を認識するか、せいぜい日常的な実験を使って確かめることができるであろう。そのような等

価物は、以下の特許請求の範囲によって包含されるものとする。この明細書において言及した刊行物、特許および特許出願はすべて、あたかも個々の刊行物、特許または特許出願が参照により本明細書に組み込まれることを具体的かつ個別に示されたかのように、それと同程度に、参照により本明細書に組み入れられる。

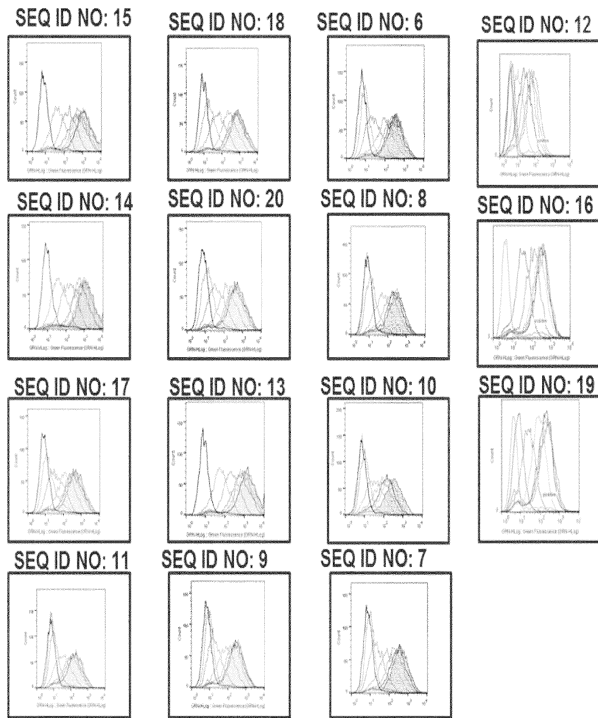
【図 1】



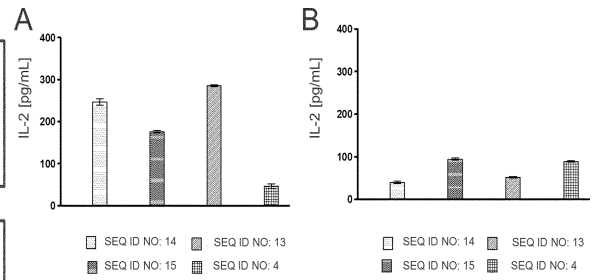
【図 2】



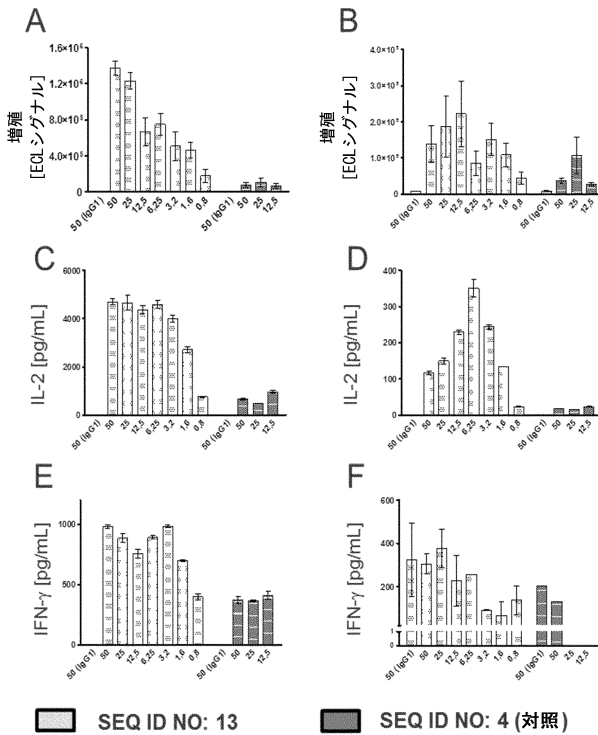
【図 3】



【図 4】



【図 5】



【配列表】

0006884708000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I
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
A 6 1 K	38/17 (2006.01)	A 6 1 K 38/17
A 6 1 P	29/00 (2006.01)	A 6 1 P 29/00
A 6 1 P	37/04 (2006.01)	A 6 1 P 37/04
A 6 1 P	37/06 (2006.01)	A 6 1 P 37/06

(74)代理人 100142929
弁理士 井上 隆一

(74)代理人 100148699
弁理士 佐藤 利光

(74)代理人 100128048
弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506
弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100205707
弁理士 小寺 秀紀

(74)代理人 100114340
弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100121072
弁理士 川本 和弥

(72)発明者 ヒンナー マーロン
ドイツ連邦共和国 8 1 2 4 7 ミュンヘン オイゲン パプストシュトラッセ 9

(72)発明者 ローテ クリスティーヌ
ドイツ連邦共和国 8 5 2 2 1 ダッハウ ハインリッヒ - ニコラウス - シュトラッセ 2 6

(72)発明者 オルヴィル シェーン
ドイツ連邦共和国 8 5 3 5 4 フライジンク アム ヴァルトラント 2 3 エー

(72)発明者 アレアシュドルファー アンドレア
ドイツ連邦共和国 8 5 2 8 3 ヴォルンツァッハ モザルトシュトラッセ 2 0 エー

(72)発明者 ベル アイバ ラシダ シハム
ドイツ連邦共和国 8 0 4 6 9 ミュンヘン エアハルトシュトラッセ 1 5

審査官 水野 浩之

(56)参考文献 国際公開第 2 0 0 5 / 0 1 9 2 5 6 (W O , A 1)
国際公開第 2 0 0 3 / 0 2 9 4 6 3 (W O , A 1)
特表 2 0 1 8 - 5 1 5 0 8 5 (J P , A)
Immunological Reviews , 2 0 0 8 年 , Vol.222 , p.277-286

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

C 0 7 K
C 1 2 N
C 1 2 P
A 6 1 K
A 6 1 P
C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)

UniProt / GeneSeq