

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2020-500150
(P2020-500150A)

(43) 公表日 令和2年1月9日(2020.1.9)

| (51) Int.Cl. | F I | テーマコード (参考) |
|----------------------|----------------|-------------|
| C07K 14/00 (2006.01) | C07K 14/00 ZNA | 4C076 |
| C07K 19/00 (2006.01) | C07K 19/00 | 4H045 |
| C07K 7/08 (2006.01) | C07K 7/08 | |
| A61K 47/42 (2017.01) | A61K 47/42 | |
| A61K 47/64 (2017.01) | A61K 47/64 | |

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 32 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2019-515805 (P2019-515805)
 (86) (22) 出願日 平成29年9月22日 (2017. 9. 22)
 (85) 翻訳文提出日 令和1年5月20日 (2019. 5. 20)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2017/052887
 (87) 国際公開番号 W02018/057847
 (87) 国際公開日 平成30年3月29日 (2018. 3. 29)
 (31) 優先権主張番号 62/399, 123
 (32) 優先日 平成28年9月23日 (2016. 9. 23)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 米国 (US)

(71) 出願人 507189666
 デューク ユニバーシティ
 アメリカ合衆国 ノースカロライナ州 2
 7705, ダラム, アーウィン ロード
 2812 스위트 306
 (74) 代理人 100094569
 弁理士 田中 伸一郎
 (74) 代理人 100103610
 弁理士 ▲吉▼田 和彦
 (74) 代理人 100109070
 弁理士 須田 洋之
 (74) 代理人 100119013
 弁理士 山崎 一夫
 (74) 代理人 100123777
 弁理士 市川 さつき

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 下限臨界溶液温度挙動を有する非反復かつ非構造的ポリペプチド

(57) 【要約】

ここでは、識別可能な反復モチーフを欠く非構造的ポリペプチドを描写する。ここでは、少なくとも1つの非構造的ポリペプチド及び少なくとも1つの結合ポリペプチドを包含する融合タンパク質もまた、描写する。さらに、疾患の治療を、それを必要とする対象において行う方法を描写する。方法は、対象に有効量の融合タンパク質を投与する工程を包含し得る。

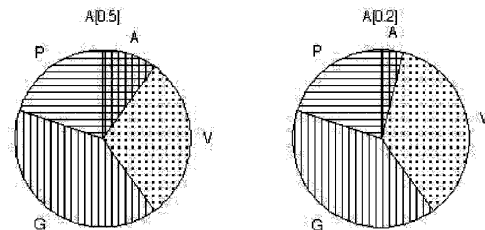


FIG. 1

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

認識可能な反復モチーフを有しない非構造的ポリペプチドであって、前記ポリペプチドが、下限臨界溶液温度（LCST）よりも低い温度では可溶性であるか、上限臨界溶液温度（UCST）よりも高い温度では可溶性であるか、又はそれらの組み合わせであり、前記 LCST 及び UCST が、それぞれ独立して約 0 から約 100 である、ポリペプチド。

【請求項 2】

前記 LCST 及び UCST が、それぞれ独立して約 25 から約 37 である、請求項 1 に記載の非構造的ポリペプチド。

10

【請求項 3】

前記非構造的ポリペプチドが、少なくとも 50 アミノ酸の配列を含み、前記アミノ酸の少なくとも 10% が、プロリン（P）であり、及び前記アミノ酸の少なくとも 20% が、グリシン（G）である、請求項 1 に記載の非構造的ポリペプチド。

【請求項 4】

前記非構造的ポリペプチドが、配列を含み、前記アミノ酸の少なくとも 40% がバリン（V）、アラニン（A）、ロイシン（L）、リシン（K）、スレオニン（T）、イソロイシン（I）、チロシン（Y）、セリン（S）、及びフェニルアラニン（F）からなる群から選択される、請求項 1 に記載の非構造的ポリペプチド。

20

【請求項 5】

言語的複雑性スコアが 15 よりも大きい、請求項 1 に記載の非構造的ポリペプチド。

【請求項 6】

前記非構造的ポリペプチドが、配列番号 7 ~ 18 のいずれかの 50 アミノ酸サブ配列を含む、請求項 1 に記載の非構造的ポリペプチド。

【請求項 7】

前記非構造的ポリペプチドが、3つの連続した同一アミノ酸を含有しない配列を含み、いずれの 5 ~ 10 アミノ酸サブ配列も、前記非構造的ポリペプチド中に、一度よりも多くは出現せず、及び

前記非構造的ポリペプチドが、プロリン（P）から開始及び終了するサブ配列を含む場合、前記サブ配列が、少なくとも1つのグリシン（G）をさらに含む、請求項 1 に記載の非構造的ポリペプチド。

30

【請求項 8】

前記非構造的ポリペプチドが、少なくとも 50 アミノ酸の配列を含み、前記アミノ酸の少なくとも 10% が、プロリン（P）であり、前記アミノ酸の少なくとも 20% が、グリシン（G）であり、前記アミノ酸の少なくとも 40% が、バリン（V）、アラニン（A）、ロイシン（L）、リシン（K）、スレオニン（T）、イソロイシン（I）、チロシン（Y）、セリン（S）、及びフェニルアラニン（F）からなる群から選択され、前記配列が、3つの連続した同一アミノ酸を含有せず、

40

いずれの 5 ~ 10 アミノ酸サブ配列も、前記非構造的ポリペプチド中に、一度よりも多くは出現せず、及び前記非構造的ポリペプチドが、プロリン（P）から開始及び終了するサブ配列を含む場合、前記サブ配列が、少なくとも1つのグリシン（G）をさらに含む、請求項 1 に記載の非構造的ポリペプチド。

【請求項 9】

配列番号 7 ~ 18 から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載の非構造的ポリペプチド。

【請求項 10】

少なくとも1つの結合ポリペプチド及び少なくとも1つの請求項 1 ~ 9 のいずれか一項

50

に記載の非構造的ポリペプチドを含む、融合タンパク質。

【請求項 1 1】

前記融合タンパク質が、複数の非構造的ポリペプチドを含む、請求項 1 0 に記載の融合タンパク質。

【請求項 1 2】

前記融合タンパク質が、複数の結合ポリペプチドを含む、請求項 1 0 又は 1 1 に記載の融合タンパク質。

【請求項 1 3】

少なくとも 2 つの近接した結合ポリペプチドの間に配置されるリンカーをさらに含む、請求項 1 2 に記載の融合タンパク質。

10

【請求項 1 4】

少なくとも 2 つの近接した非構造的ポリペプチドの間に配置されるリンカーをさらに含む、請求項 1 2 に記載の融合タンパク質。

【請求項 1 5】

前記リンカーが、少なくとも 1 つのグリシン及び少なくとも 1 つのセリンを含む、請求項 1 3 又は 1 4 に記載の融合タンパク質。

【請求項 1 6】

前記リンカーが、配列番号 2 1 ((G l y 4 S e r)₃) からなるアミノ酸配列を含む、請求項 1 5 に記載の融合タンパク質。

【請求項 1 7】

前記リンカーが、配列番号 2 2 (P Q P Q P K P Q P K P E P E P Q P Q G) からなるアミノ酸配列を含む、請求項 1 3 又は 1 4 に記載の融合タンパク質。

20

【請求項 1 8】

複数の結合ポリペプチドが、オリゴマーを形成する、請求項 1 2 ~ 1 7 のいずれか一項に記載の融合タンパク質。

【請求項 1 9】

前記結合ポリペプチドが、標的に結合し、前記融合タンパク質が、1 つよりも多い標的に結合する、請求項 1 0 ~ 1 8 のいずれか一項に記載の融合タンパク質。

【請求項 2 0】

前記結合ポリペプチドが、プロテイン A を含む、請求項 1 0 ~ 1 9 のいずれか一項に記載の融合タンパク質。

30

【請求項 2 1】

少なくとも 1 つの非構造的ポリペプチドが、熱応答性ポリペプチドを含む、請求項 1 0 ~ 2 0 のいずれか一項に記載の融合タンパク質。

【請求項 2 2】

前記少なくとも 1 つの結合ポリペプチドと前記少なくとも 1 つの非構造的ポリペプチドとの間に配置される、少なくとも 1 つのリンカーをさらに含む、請求項 1 0 ~ 2 1 のいずれか一項に記載の融合タンパク質。

【請求項 2 3】

前記融合タンパク質が、前記少なくとも 1 つの結合ポリペプチドと前記少なくとも 1 つの非構造的ポリペプチドとの間に配置される、複数のリンカーを含む、請求項 2 2 に記載の融合タンパク質。

40

【請求項 2 4】

前記少なくとも 1 つの結合ポリペプチドが、前記少なくとも 1 つの非構造的ポリペプチドの N 末端に配置される、請求項 1 0 ~ 2 3 のいずれか一項に記載の融合タンパク質。

【請求項 2 5】

前記少なくとも 1 つの結合ポリペプチドが、前記少なくとも 1 つの非構造的ポリペプチドの C 末端に配置される、請求項 1 0 ~ 2 3 のいずれか一項に記載の融合タンパク質。

【請求項 2 6】

疾患の治療を、それを必要とする対象において行う方法であって、有効量の請求項 1 0

50

～ 25 のいずれか一項に記載の融合タンパク質を前記対象に投与する工程を含む方法。

【請求項 27】

前記融合タンパク質が、放出制御製剤の形で投与される、請求項 26 に記載の方法。

【請求項 28】

前記融合タンパク質が、対象への投与時にデボ剤を形成する、請求項 26 に記載の方法

。

【請求項 29】

前記融合タンパク質が、前記対象に、静脈内、動脈内、又は腹腔内投与される、請求項 26 ～ 28 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 30】

前記疾患が、癌を含む、請求項 26 ～ 29 のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 31】

前記融合タンパク質が、腫瘍組織内に投与される、請求項 30 に記載の方法。

【請求項 32】

前記疾患が、前記少なくとも 1 つの結合ポリペプチドの標的と関連する疾患である、請求項 26 ～ 31 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 33】

対象における疾患を診断する方法であって、

対象からの試料と請求項 10 ～ 25 のいずれか一項に記載の融合タンパク質とを接触させる工程；及び

20

前記融合タンパク質の前記標的への結合を検出して、前記試料中の標的の存在を判定する工程であって、前記試料中の前記標的の存在が、前記対象における前記疾患を示す工程、

を含む方法。

【請求項 34】

前記疾患が、癌、代謝疾患、自己免疫疾患、心血管疾患、及び整形外科的障害から選択される、請求項 33 に記載の方法。

【請求項 35】

試料中の標的の存在を判定する方法であって、

前記試料と請求項 10 ～ 25 のいずれか一項に記載の融合タンパク質とを、前記融合タンパク質と前記試料中の前記標的との間で複合体が形成されることを可能にする条件下において、接触させる工程；及び

30

前記複合体の存在を検出する工程であって、前記複合体の存在が前記試料中の前記標的を示す工程、

を含む方法。

【請求項 36】

前記試料は対象から得られ、及び前記方法が、疾患を診断するか、予後予測するか、又は前記対象の治療の効力を評価する工程をさらに含む、請求項 35 に記載の方法。

【請求項 37】

前記方法が、前記対象の治療の効力を評価する工程をさらに含む場合、必要に応じて前記対象の治療を改変して効力を改善する工程をさらに含む、請求項 36 に記載の方法。

40

【請求項 38】

疾患についての治療の有効性の判定を、それを必要とする対象において行う方法であって、

前記対象からの試料と請求項 10 ～ 25 のいずれか一項に記載の融合タンパク質とを、前記融合タンパク質と前記試料中の標的との間で複合体が形成されることを可能にする条件下において、接触させる工程；

前記試料中の複合体のレベルを判定する工程であって、前記複合体のレベルは前記試料中の前記標的のレベルを示す工程；及び

前記試料中の前記標的のレベルを前記標的の対照レベルと比較する工程であって、前記

50

標的のレベルが前記対照レベルと異なる場合に、前記治療が前記疾患の治療において有効である又は有効でない判定する工程、
を含む方法。

【請求項 39】

対象における疾患を診断する方法であって、
前記対象からの試料と請求項 10 ~ 25 のいずれか一項に記載の融合タンパク質とを接触させる工程；

前記試料中の標的のレベルを判定する工程；及び

前記試料中の前記標的のレベルを前記対照レベルと比較する工程であって、前記標的のレベルが前記対照レベルと異なることが、前記対象における疾患を示す工程、
を含む方法。

10

【請求項 40】

前記対照レベルが、前記対象が治療を開始した期間よりも前又はその期間中の時点の、前記対象における前記レベルに対応し、及び前記試料が、より遅い時点で前記対象から採取される、請求項 38 又は 39 に記載の方法。

【請求項 41】

前記試料が、前記対象の治療中の期間の時点で前記対象から採取され、及び前記対照レベルが、無疾患レベル又は前記対象が治療を開始した期間よりも前の時点における前記レベルに対応する、請求項 38 又は 39 に記載の方法。

【請求項 42】

前記方法が、前記治療が前記疾患の治療において有効でない判定された場合に、前記治療を改変するか、又は前記対象に異なる治療を施与することをさらに含む、請求項 38 及び 40 ~ 42 のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 43】

前記融合タンパク質が、レポーターにより標識される、請求項 26 ~ 42 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 44】

前記疾患が、癌、代謝疾患、自己免疫疾患、心血管疾患、及び整形外科的障害から選択される、請求項 26 ~ 43 のいずれか一項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

30

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、参照により全体として本明細書に組み込まれる、2016年9月23日に出願された米国仮特許出願第62/399,123号明細書に対する優先権を主張する。

【0002】

連邦政府による資金提供を受けた研究に関する記述

本発明は、国立衛生研究所 (National Institutes of Health) により授与された助成金 GM061232 のもとで政府支援を受けて作成された。政府は、本発明における一定の権利を有する。

40

【背景技術】

【0003】

タンパク質は、臨床的な標的に対する特異性及び選択性のために操作された場合、有用な治療薬となり得る。それらの複雑性、多能性、耐性、及び多様性によって、しばしば低分子医薬の優れた代替となり、かつ長い半減期、特異性、及び選択性によって、治療専門家にとって魅力的となり得る。タンパク質操作は、タンパク質又は関心のある受容体を標的とした有力な治療法の発展を可能にするとはいえ、身体はそのようなタンパク質療法を無効にする多くの機構を有する。それゆえに、信頼性があり、かつ広く適応可能なタンパク質送達溶液が必要とされている。

【発明の概要】

50

【課題を解決するための手段】

【0004】

一態様では、認識可能な反復モチーフを有しない非構造的ポリペプチドであって、ポリペプチドが、下限臨界溶液温度(LCST)よりも低い温度では可溶性であるか、上限臨界溶液温度(UCST)よりも高い温度では可溶性であるか、又はそれらの組み合わせであり、LCST及びUCSTが、それぞれ独立して約0 から約100 である、ポリペプチドを開示する。

【0005】

他の態様では、少なくとも1つの結合ポリペプチド及び少なくとも1つの開示される非構造的ポリペプチドを含む融合タンパク質を開示する。

10

【0006】

他の態様では、疾患の治療を、それを必要とする対象において行う方法であって、有効量の開示される融合タンパク質を対象に投与する工程を含む方法を開示する。

【0007】

他の態様では、対象における疾患を診断する方法であって、対象からの試料と開示される融合タンパク質とを接触させる工程；及び融合タンパク質の標的への結合を検出して、試料中の標的の存在を判定する工程であって、試料中の標的の存在が、対象における疾患を示す工程、を含む方法を開示する。

【0008】

他の態様では、試料中の標的の存在を判定する方法であって、試料と開示される融合タンパク質とを、融合タンパク質と試料中の標的との間で複合体が形成されることを可能にする条件下において、接触させる工程；及び複合体の存在を検出する工程であって、複合体の存在が試料中の標的を示す工程、を含む方法を開示する。

20

【0009】

他の態様では、疾患についての治療の有効性の判定を、それを必要とする対象において行う方法であって、対象からの試料と開示される融合タンパク質とを、融合タンパク質と試料中の標的との間で複合体が形成されることを可能にする条件下において、接触させる工程；試料中の複合体のレベルを判定する工程であって、複合体のレベルは試料中の標的のレベルを示す工程；及び試料中の標的のレベルを標的の対照レベルと比較する工程であって、標的のレベルが対照レベルと異なる場合に、治療が疾患の治療において有効である又は有効でないと判定する工程、を含む方法を開示する。

30

【0010】

他の態様では、対象における疾患を診断する方法であって、対象からの試料と開示される融合タンパク質とを接触させる工程；試料中の標的のレベルを判定する工程；及び試料中の標的のレベルを標的の対照レベルと比較する工程であって、標的のレベルが対照レベルと異なることが、対象の疾患を示す工程、を含む方法を開示する。

【図面の簡単な説明】

【0011】

【図1】図1は、A[0.5]及びA[0.2]配列(配列番号1及び配列番号2)のアミノ酸組成物を示す図である。同様に、図は、それぞれ、配列番号4、6、8、及び10並びに配列番号3、5、7、及び9のポリペプチドのアミノ酸組成物もまた示す。

40

【図2】図2は、代表的な非反復かつ非構造的ポリペプチド(配列番号11~18)のアミノ酸組成物を示す図である。各非反復かつ非構造的ポリペプチドは、240アミノ酸を含む。各アミノ酸配列は、おおよそ1/6のプロリン(P)残基、おおよそ1/3のグリシン(G)残基、かつおおよそ1/2のX残基を含み、Xはバリン(V)、アラニン(A)、ロイシン(L)、リシン(K)、スレオニン(T)、イソロイシン(I)、チロシン(Y)、セリン(S)、及びフェニルアラニン(F)からなる群から選択された1以上のアミノ酸である。Xに選択された各アミノ酸は、互いに同一頻度で存在し得る(配列番号11~18)。

【図3】図3(A)~(B)は、反復ポリペプチド(配列番号3~6)及び代表的な非反

50

復ポリペプチド（配列番号7～10）の転移温度の特徴づけを示すグラフである。図3（A）は、200アミノ酸を含む、反復ポリペプチド及び代表的な非反復ポリペプチドを示すグラフである。図3（B）は、400アミノ酸を含む、反復ポリペプチド及び代表的な非反復ポリペプチドを示すグラフである。

【図4】図4（A）～（B）は、代表的な非反復かつ非構造的ポリペプチド（配列番号11～18）の転移温度の特徴づけを示すグラフである。図4（A）は、25 μ MのPBS中の、代表的な非反復かつ非構造的ポリペプチドの、転移温度の特徴づけを示すグラフである。図4（B）は、様々な尿素濃度のPBS中の、代表的な非反復かつ非構造的ポリペプチドの転移温度の特徴づけを示すグラフである。

【発明を実施するための形態】

【0012】

エラスチン様ポリペプチド（ELPs）は、反復ポリペプチドである。「ELP」は、ペントペプチド反復配列（VPGXG）_nを含むポリペプチドであり、ここで、Xはプロリンを除く任意のアミノ酸であり、かつnは1以上の整数である（配列番号23）。ELPは下限臨界溶液温度（LCST）挙動を有するとして調査され、かつ、みなされてきた。ELPは、例えば、GAGVPGVGVPG（配列番号1）又はGVGVPGVGVPGAGVPGVGVPGVGVPG（配列番号2）、ここではそれぞれA[0.5]及びA[0.2]と言及する（McDaniel, J. R. et al. (2013) *Biomacromolecules* を参照されたい、ここで、その開示は参照により全体としてここに組み込まれる）、の反復サブ配列を包含し得る。例えば、A[0.2] rep-200（配列番号3、（GVGVPGVGVPGAGVPGVGVPGVGVPG）₈）は、8回繰り返し、全長で200アミノ酸に達するA[0.2]サブ配列を包含する。A[0.5]-rep200（配列番号4、（GAGVPGVGVPG）₂₀）は、20回繰り返し、全長で200アミノ酸に達するA[0.5]サブ配列を包含する。A[0.2] rep-400（配列番号5、（GVGVPGVGVPGAGVPGVGVPGVGVPGVGVPG）₁₆）は、16回繰り返し、全長で400アミノ酸に達するA[0.2]サブ配列を包含する。A[0.5]-rep400（配列番号6、（GAGVPGVGVPG）₄₀）は、40回繰り返し、全長で400アミノ酸に達するA[0.5]サブ配列を包含する。これらの配列のアミノ酸構成を、図1に描写する。

【0013】

ここで開示するのは、ELPの必須ペントペプチド配列を欠くにもかかわらず、意外にも依然としてLCST挙動を有する、非反復かつ非構造的のポリペプチドである。したがって、開示される非構造的ポリペプチドは二次構造を欠き（CDによる）、かつ熱応答性であり、すべての非構造的ポリペプチドは、ポリペプチド中に識別可能な反復配列を有しない。

【0014】

1. 定義

別途定義されない限り、ここで使用されるすべての技術及び科学用語は、当技術分野における当業者により一般に理解される意味と同一の意味を有する。矛盾する場合、定義を含め本文献が優先する。好ましい方法及び材料を以下に記載するが、ここに記載のものと類似の又は均等な方法及び材料を本発明の実施又は試験で使用することができる。ここで言及されるすべての刊行物、特許出願、特許及び他の参照文献は、参照により全体として組み込まれる。ここに開示の材料、方法、及び実施例は、説明目的に過ぎず、限定を意図するものではない。

【0015】

ここで使用される用語「含む（comprise(s)）」、「包含する（include(s)）」、「有している（having）」、「有する（has）」、「することができる（can）」、「含有する（contain(s)）」、及びそれらの変形語は、追加の作用又は構造の可能性を除外しない制約のない（open-ended）移行句、用語、又は語を意図するものである。単数形「1つの（a）」、「1つの（an）」、

10

20

30

40

50

及び「その (t h e) 」は、文脈が別途明確に示さない限り、複数の参照対象を包含する。本開示はまた、明示的に記載されているか否かにかかわらず、ここに提示される実施形態又は要素を「含む (c o m p r i s i n g) 」及び「からなる (c o n s i s t i n g o f) 」及び「本質的になる (c o n s i s t i n g e s s e n t i a l l y o f) 」他の実施形態を企図する。

【 0 0 1 6 】

ここでの数値範囲の列挙は、別途ここで示さない限り、単にその範囲に収まる各々の分離した数値を個々に指すための簡略表記法として機能することを意図するに過ぎず、各々の分離した数値は、ここに列挙されているかのように本明細書に組み込まれる。例えば、濃度範囲が 1 % ~ 5 0 % であると記載したとき、例えば 2 % から 4 0 % 、 1 0 % から 3 0 % 、又は 1 % から 3 % などの値を本明細書で明確に列挙することを意図している。これらは明確に意図することの例示に過ぎず、また列挙される、最小値と最大値との間の数値及びこれらを含む数値のすべての組み合わせは、本出願において明確に言及されたものとみなされる。

10

【 0 0 1 7 】

量とともに使用される修飾語句「約」は、言及された値を包括し、及び文脈によって規定される (例えば、それは少なくとも、特定の量の測定と関連する誤差の程度を含む) 。修飾語句「約」は、また、二つの終点の絶対的な値によって定義される範囲を開示するものとみなされる。例えば、「約 2 から約 4 」という表現は、「 2 から 4 」という範囲をも開示する。用語「約」は、示された数字のプラス側又はマイナス側 1 0 % を指し得る。例えば、「約 1 0 % 」は、 9 % から 1 1 % の範囲を示すことができ、「約 1 」は、 0 . 9 ~ 1 . 1 を示すことができる。「約」のほかの意味は、例えば四捨五入など、文脈から明らかであり、例えば、「約 1 」は 0 . 5 から 1 . 4 をも意味し得る。

20

【 0 0 1 8 】

ここで用いられるように、用語「親和性」は、結合ポリペプチドの標的 (即ち、結合相手) に対する結合力を指す。

【 0 0 1 9 】

ここで用いられるように、用語「作動薬」は、受容体に結合し、かつ当該受容体を活性化して、生物学的反応を生じさせる存在を指す。「拮抗薬」は、作動薬の作用又はシグナル伝達を、阻害又は抑制する。「逆作動薬」は、作動薬の働きと反対の働きを引き起こす。作動薬、拮抗薬、及び逆作動薬の活性は、インビトロ (i n v i t r o) 、インサイチュ (i n s i t u) 、インビボ (i n v i v o) 、又はこれらの組み合わせによって判定し得る。

30

【 0 0 2 0 】

ここで用いられるように、用語「バイオマーカー」は、疾患又は病態の同定及び / 又は分類において有用な、変動濃度で対象中に存在する天然に生じる生物学的分子を指す。バイオマーカーとしては、疾患についての指標若しくはマーカーとして使用される遺伝子、タンパク質、ポリヌクレオチド、核酸、リボ核酸、ポリペプチド、又は他の生物学的分子を包含し得る。一部の実施形態において、バイオマーカーは、疾患マーカーを含む。例えば、バイオマーカーは、疾患を有する対象中で、アップレギュレーション又はダウンレギュレーションされる遺伝子であり得る。別の例として、バイオマーカーは、疾患を有し、又は疾患を発症するリスクを有する対象中でレベルが増加又は減少するポリペプチドであり得る。一部の実施形態においては、バイオマーカーは、小分子を含む。一部の実施形態においては、バイオマーカーは、ポリペプチドを含む。

40

【 0 0 2 1 】

ここで用いられるように、用語「対照」、「参照レベル」、及び「参照」は、互換的に使用される。参照レベルは、計測結果の評価対象となるベンチマークとして用いられる、所定の値又は範囲であり得る。ここで用いられる「対照群」は、対照対象の群を指す。所定レベルは、対照群からのカットオフ値であり得る。所定レベルは、対照群からの平均値であり得る。カットオフ値 (又は所定のカットオフ値) は、適応インデックスモデル (A

50

daptive Index Model) (AIM) 法により決定することができる。カットオフ値(又は所定のカットオフ値)は、患者群の生物学的試料から受信者動作特性(ROC)分析により決定することができる。生物学的技術において一般に公知であるROCは、ある条件を別の条件から区別するための、例えば、CRCを有する患者の同定におけるそれぞれのマーカーの性能を決定するための、試験の能力の決定法である。ROC分析の記載は、P. J. Heagerty et al. (Biometrics 2000, 56, 337-44)に提供され、その開示は参照により全体としてここに組み込まれる。あるいは、カットオフ値は、患者群の生物学的試料の四分位分析により決定することができる。例えば、カットオフ値は、25~75パーセントイル範囲の任意の値、好ましくは、25パーセントイル、50パーセントイル又は75パーセントイル、及びより好ましくは、75パーセントイルのいずれかの値に対応する値を選択することにより決定することができる。このような統計分析は、当技術分野における任意の方法を使用して実施することができ、かつ多数の市販のソフトウェアパッケージ(例えば、Analyse-it Software Ltd., Leeds, UK; Stata Corp LP, College Station, TX; SAS Institute Inc., Cary, NC.からのもの)を介して実行することができる。標的又はタンパク質活性についての、健常又は正常の、レベル又は範囲は、標準的技法に従って定義することができる。

10

【0022】

ここで用いられるように、用語「発現ベクター」は、当技術分野で公知のプラスミド、ウイルス又は別の媒体を示し、これらは、所望のタンパク質をコードするための核酸配列を挿入又は導入することができる

20

【0023】

ここで用いられるように、用語「宿主細胞」は、核酸構築物又は発現ベクターによる形質転換、形質移入、形質導入、コンジュゲーションなどを受けやすい細胞である。宿主細胞は、植物、細菌、酵母、真菌、昆虫、動物などに由来し得る。一部の実施形態において、宿主細胞は、大腸菌(*Escherichia coli*)を包含する。

【0024】

ここで用いられるように、用語「レポーター」、「レポーター群」、「標識」、及び「検出可能標識」は、ここでは互換的に用いられる。レポーターは、検出可能なシグナルを生成し得る。標識は、肉眼又は機器による手段により検出可能なシグナルを産生し得る。レポーター群の、シグナル伝達の物理的性質(例えば、蛍光、電気化学、核磁気共鳴(NMR)、及び電子常磁性共鳴(EPR))及び化学的性質が異なる種々のレポーター群を使用することができる。種々のレポーターとしては、色原体、蛍光化合物、化学発光化合物、放射性化合物などのようなシグナル産生物質が含有される。一部の実施形態においては、レポーターは、放射標識を含む。レポーターは、光を産生する部分、例えばアクリジニウム化合物、及び蛍光を産生する部分、例えばフルオレセインを包含し得る。一部の実施形態においては、レポーターからのシグナルは、蛍光シグナルである。レポーターは、フルオロフォアを含み得る。フルオロフォアの例としては、限定されるものではないが、アクリロダン(6-アクリロイル-2-ジメチルアミノナフタレン)、バダン(6-プロモ-アセチル-2-ジメチルアミノ-ナフタレン)、ローダミン、ナフタレン、ダンシルアジリジン(danzyl aziridine)、4-[N-[(2-ヨードアセトキシ)エチル]-N-メチルアミノ]-7-ニトロベンズ-2-オキサ-1,3-ジアゾールエステル(IANBDE)、4-[N-[(2-ヨードアセトキシ)エチル]-N-メチルアミノ-7-ニトロベンズ-2-オキサ-1,3-ジアゾール(IANBDA)、フルオレセイン、ジピロメテンホウ素ジフルオリド(BODIPY)、4-ニトロベンゾ[c][1,2,5]オキサジアゾール(NBD)、Alexa蛍光色素、及びそれらの誘導体が挙げられる。フルオレセイン誘導体としては、例えば、5-フルオレセイン、6-カルボキシフルオレセイン、3'-6-カルボキシフルオレセイン、5(6)-カルボキシフルオレセイン、6-ヘキサクロロフルオレセイン、6-テトラクロロフルオレセイン、

30

40

50

フルオレセイン、及びイソチオシアネートを包含し得る。

【0025】

ここで用いられるように、用語「試料」又は「試験試料」は、標的の存在及び/又はレベルを、検出又は判定すべき任意の試料を意味し得る。試料は、液体、溶液、エマルジョン、又は懸濁液を包含し得る。試料は、医学的試料を包含し得る。試料としては、任意の生物学的体液又は組織、例えば、血液、全血、血漿及び血清のような血液の分画、筋肉、間質液、汗、唾液、尿、涙液、滑液、骨髄、脳脊髄液、鼻汁、痰、羊水、気管支肺胞洗浄液、胃洗浄液、嘔吐物、糞便物質、肺組織、末梢血単核細胞、全白血球、リンパ節細胞、脾細胞、扁桃腺細胞、癌細胞、腫瘍細胞、胆汁、消化液、皮膚、又はそれらの組み合わせを包含し得る。一部の実施形態においては、試料は、アリコートを含む。他の実施形態において、試料は、生体液を含む。試料は、当該技術分野で公知の任意の手段により得ることができる。試料は、患者から得られたままで直接使用することができ、又は例えば濾過、蒸留、抽出、濃縮、遠心分離、妨害成分の不活性化、試薬の添加などにより前処理して、ここで検討されるとおり、又はそうでなければ当該技術分野で公知のとおり、何らかの様式で試料の特徴を改変することができる。

10

【0026】

ここで用いられるように、用語「対象」は、本明細書に描写する融合タンパク質を所望するか又はそれを必要とする哺乳動物を意味し得る。対象は、人間又は非ヒト動物であり得る。対象は、哺乳動物であり得る。対象は、霊長類又は非霊長類であり得る。哺乳動物は、ヒトのような霊長類；例えば、イヌ、ネコ、ウマ、ウシ、ブタ、マウス、ラット、ラクダ、ラマ、ヤギ、ウサギ、ヒツジ、ハムスター、及びモルモットのような非霊長類、；又は、例えば、サル、チンパンジー、ゴリラ、オランウータン、及びテナガザルのような非ヒト霊長類であり得る。対象は、任意の年齢又は発育段階のもの、例えば、成人、青年、又は幼児などであり得る。

20

【0027】

ここで用いられるように、用語「転移」又は「相転移」は、熱応答性ポリペプチドの凝集を指す。相転移は、LCST又は逆転移温度 T_i と呼ばれる特定の温度で、急激にかつ可逆的に生じる。転移温度(LCST又は T_i)未満では、熱応答性ポリペプチドは、高度に可溶性である。転移温度を超えて加熱した場合、熱応答性ポリペプチドは疎水的に崩壊及び凝集し、別個のゲル様相を形成し得る。相転移挙動は、ポリペプチドの放出を制御及び/又は遅らせるために、対象の組織内で薬剤デポを形成するために用いられ得る。「逆転移サイクリング」は、熱応答性ポリペプチドのためのタンパク質精製法である。タンパク質精製法は、可溶相及び不溶相を介して溶液をサイクルさせ、それにより汚染物質を取り除き、かつクロマトグラフィーの必要性を排除するための、熱応答性ポリペプチドの可逆的相転移挙動の使用を含み得る。

30

【0028】

ここで用いられるように、用語「サブ配列」は、他の連続したアミノ酸配列の中に存在する、連続したアミノ酸配列を指す。サブ配列は、少なくとも2つのアミノ酸を包含する。一部の実施形態においては、サブ配列は、長さが2から50、2から20、2から15、又は2から10の連続的なアミノ酸である。一部の実施形態においては、サブ配列は、3、4、5、6、7、8、9、又は10の連続的なアミノ酸を包含する。

40

【0029】

ここで用いられるように、用語「実質的に同一」は、第1及び第2のアミノ酸配列が、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、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、又は1100アミノ酸領域にわたって、少なくとも60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、又は99%が同一であることを意味し得る。

【0030】

50

ここで用いられるように、用語「治療」又は「治療すること」は、疾患からの対象の保護を指す場合、その疾患を予防、抑制、抑止、改善、又は完全に排除することを意味する。疾患の予防は、本発明の組成物を対象に疾患発症前に投与することを含む。疾患の抑制は、本開示の組成物を、対象に、疾患誘導後であるがその臨床的所見前に投与することを含む。疾患の抑止又は改善は、本開示の組成物を、対象に、疾患の臨床的所見後に投与することを含む。

【0031】

ここで用いられるように、用語「結合価」は、潜在的な結合ユニット又は結合部位を指す。用語「多価の」は、複合的な潜在的結合ユニットを指す。用語「多量体の」及び「多価の」は、本明細書において互換的に用いられる。

10

【0032】

ここで用いられるように、用語「バリエーション」は、ポリヌクレオチドに関して、(i) 参照ヌクレオチド配列の一部又は断片；(ii) 参照ヌクレオチド配列又はその一部の相補鎖；(iii) 参照ヌクレオチド配列又はその相補鎖と実質的に同一のポリヌクレオチド；又は(iv) ストリンジェントな条件下で参照ポリヌクレオチド、その相補鎖、又はそれと実質的に同一な配列にハイブリダイズするポリヌクレオチドを意味する。

【0033】

「バリエーション」は、さらに、アミノ酸の挿入、欠失、又は保存的置換によりアミノ酸配列が異なるが、少なくとも1つの生物学的活性を保持するペプチド又はポリペプチドとして定義することができる。「生物学的活性」の代表例は、特異的抗体若しくはポリペプチドにより結合される能力、又は免疫応答を促進する能力を含む。バリエーションは、実質的に同一な配列を意味し得る。バリエーションは、その機能的断片を意味し得る。バリエーションは、ポリペプチドの多重コピーをも意味し得る。多重コピーは、タンデムであっても、リンカーによって離隔されていてもよい。バリエーションは、少なくとも1つの生物学的活性を保持するアミノ酸配列を有する参照ポリペプチドと、実質的に同一のアミノ酸配列を有するポリペプチドをも意味し得る。アミノ酸の保存的置換、即ち、アミノ酸を類似する特性（例えば、親水性、荷電領域の程度及び分布）を有する異なるアミノ酸に置き換えることは、典型的には、マイナーチェンジを伴うとして、当技術分野で認識されている。このようなマイナーチェンジは、部分的には、アミノ酸のハイドロパシー指数 (hydrophobic index) を考慮することにより同定することができる。Kyte et al., J. Mol. Biol. 1982, 157, 105-132を参照されたい。アミノ酸のハイドロパシー指数は、その疎水性及び電荷の考慮に基づく。類似のハイドロパシー指数のアミノ酸が置換され得、タンパク質機能を依然として保持することは、当技術分野で公知である。一態様において、 ± 2 のハイドロパシー指数 (hydrophobic indices) を有するアミノ酸が置換されている。アミノ酸の疎水性を利用して、生物学的機能を保持するポリペプチドをもたらす置換を明らかにすることも可能である。ポリペプチドという面において、アミノ酸の親水性を考慮することにより、当該ポリペプチドの最大局所平均親水性（参照によりここに完全に取込まれる米国特許第4,554,101号に考察される、抗原性及び免疫原性と十分に相関することが報告された有用な尺度）の計算が可能となる。類似する親水性値を有するアミノ酸の置換は、当技術分野で理解されている生物学的活性、例えば、免疫原性を保持するポリペプチドをもたらし得る。置換は、互いに ± 2 内の親水性値を有するアミノ酸により実施することができる。アミノ酸の疎水性指数 (hydrophobicity index) 及び親水性値の両方が、当該アミノ酸の特定の側鎖により影響を受ける。その観察と一致して、生物学的機能と対応するアミノ酸置換は、疎水性、親水性、電荷、サイズ及び他の特性により明らかにされるとおり、アミノ酸、及び特にそれらのアミノ酸の側鎖の相対的類似性に依存することが理解される。

20

30

40

【0034】

バリエーションは、全遺伝子配列又はその断片の全長にわたって実質的に同一であるポリヌクレオチド配列であり得る。ポリヌクレオチド配列は、遺伝子配列又はその断片の全長に

50

わたって、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%が同一であり得る。バリエーションは、アミノ酸配列又はその断片の全長にわたって実質的に同一であるアミノ酸配列であり得る。アミノ酸配列は、アミノ酸配列又はその断片の全長にわたって、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%が同一であり得る。

【0035】

2. 非構造的ポリペプチド

ここでは、非構造的ポリペプチドを開示する。非構造的ポリペプチドは、CDにより観察されるような二次構造を欠き、識別可能な反復配列を欠く、任意の適切なポリペプチドを含み得る。さらに、非構造的ポリペプチドは、一定の濃度において、LCSTよりも低く、及び/又はUCSTよりも高いと可溶性であり、それによって、「熱応答性ポリペプチド」と言及され得るような相転移特性がポリペプチドに付与される。LCSTは、これよりも低いとポリペプチドが混和性となる温度である。UCSTは、これよりも高いとポリペプチドが混和性となる温度である。LCSTは、UCSTから分離し、かつ別個の温度である。一部の実施形態においては、非構造的ポリペプチドは、UCST挙動のみを有し得る。一部の実施形態においては、非構造的ポリペプチドは、LCST挙動のみを有し得る。一部の実施形態においては、非構造的ポリペプチドは、UCST挙動及びLCST挙動の両方を有し得る。このような実施形態においては、UCSTはLCSTよりも高い。非構造的ポリペプチドは、約0 から約100、例えば約10 から約50、又は約20 から約42 であるLCSTを有し得る。非構造的ポリペプチドは、約0 から約100、例えば約10 から約50、又は約20 から約42 であるUCSTを有し得る。一部の実施形態においては、非構造的ポリペプチドは、室温(約25)と体温(約37)との間の転移温度(LCST及び/又はUCST)を有し得る。非構造的ポリペプチドは、当該非構造的ポリペプチドを対象に投与するときの濃度において、体温よりも低いか、又は体温よりも高い、LCST及び/又はUCSTを有し得る。熱応答性非構造的ポリペプチドは、様々な温度及び濃度で相転移し得る。熱応答性非構造的ポリペプチドは、それが結合又は共役する第2のポリペプチドの効能に影響を与えない可能性がある。さらに、熱応答性非構造的ポリペプチドは、任意の、所望の転移温度、分子量、及びフォーマットに適合させることが可能である。

【0036】

非構造的ポリペプチドは、様々な量及び種類のアミノ酸を包含し得る。例えば、非構造的ポリペプチドは、少なくとも50アミノ酸の配列であって、アミノ酸の少なくとも10%がプロリン(P)であり、かつアミノ酸の少なくとも20%がグリシン(G)である、配列を包含し得る。一部の実施形態においては、非構造的ポリペプチドは、配列であって、アミノ酸の少なくとも40%が、バリン(V)、アラニン(A)、ロイシン(L)、リシン(K)、スレオニン(T)、イソロイシン(I)、チロシン(Y)、セリン(S)、及びフェニルアラニン(F)からなる群から選択された配列を包含し得る。一部の実施形態においては、非構造的ポリペプチドは、3つの連続した同一のアミノ酸を含有しない配列であって、いずれの5~10アミノ酸サブ配列も、非構造的ポリペプチドに一度よりも多くは出現せず、かつ非構造的ポリペプチドがプロリン(P)から開始及び終了するサブ配列を含む場合には、当該サブ配列がさらに少なくとも1つのグリシン(G)を包含する、配列を包含し得る。

【0037】

一部の実施形態においては、非構造的ポリペプチドは、少なくとも50アミノ酸の配列であって、アミノ酸の少なくとも10%がプロリン(P)であり；アミノ酸の少なくとも20%がグリシン(G)であり；アミノ酸の少なくとも40%が、バリン(V)、アラニン(A)、ロイシン(L)、リシン(K)、スレオニン(T)、イソロイシン(I)、チロシン(Y)、セリン(S)、及びフェニルアラニン(F)からなる群から選択され；当

10

20

30

40

50

該配列は3つの連続した同一のアミノ酸を含まず；いずれの5～10アミノ酸サブ配列も、非構造的ポリペプチドに一度よりも多くは出現せず；及び非構造的ポリペプチドがプロリン（P）から開始及び終了するサブ配列を含む場合には、当該サブ配列がさらに少なくとも1つのグリシン（G）を含む、配列を包含し得る。

【0038】

コンピューターアルゴリズム（後述の実施例において考察する）によって同定された、いずれかの非反復配列の短いサブ配列は、熱応答性挙動を維持し得る。50アミノ酸ほどのサブ配列を含む非構造的ポリペプチドは、アルゴリズムの必要条件を満たし得るとともに、上記配列規則と同一の規則に束縛されるために、全長配列に似た組成物は十分に非反復となる。これまでの研究で、天然変性（*intrinsic disorder*）は、50アミノ酸未満の長さの非構造的ポリペプチドにコードされ得ることが示されてきた（*Radivojac et al. (2007) Biophys J.* を参照されたい、ここで、その開示は参照により全体としてここに組み込まれる）。さらに、50アミノ酸ほどのELPは、熱応答性LCST挙動を示し得るとともに、0から100の範囲の転移温度が測定されている（*Aladini et al. (2016) J Pept Sci.* を参照されたい、ここで、その開示は参照により全体としてここに組み込まれる）。したがって、一部の実施形態においては、非構造的ポリペプチドは、配列番号7～18のいずれかの50アミノ酸のサブ配列を含み得る。

10

【0039】

上述したように、非構造的ポリペプチドは、アミノ酸の識別可能な反復配列を欠く可能性がある。非構造的ポリペプチドの、過度な繰り返しによる冗長性は、言語的複雑性（*linguistic complexity*）スコアにより特徴づけられ得る。言語的複雑性スコアは、同一のアルファベット及びウィンドウ長から考えられる特有サブ配列の総数で割った、与えられた配列中の特有サブ配列の総数によって、定義される（*Troynskaya et al. (2002) Bioinformatics* を参照されたい、ここで、その開示は参照により全体としてここに組み込まれる）。言語的複雑性スコアのさらなる詳細は、下記の実施例1に見いだされ得る。非構造的ポリペプチドは、15よりも大きいか、16よりも大きいか、17よりも大きいか、18よりも大きいか、19よりも大きいか、又は20よりも大きい言語的複雑性スコアを有し得る。

20

【0040】

一部の実施形態においては、非構造的ポリペプチドは、配列番号7～18からなる群から選択されたアミノ酸配列を含み得る。

30

【0041】

3. 融合タンパク質

ここでは、少なくとも1つの上述した非構造的ポリペプチドを包含し得る融合タンパク質もまた、開示する。融合タンパク質は、少なくとも1つの結合ポリペプチド及び少なくとも1つのリンカーを、さらに包含し得る。

【0042】

一部の実施形態においては、融合タンパク質は、1つよりも多い結合ポリペプチドを包含し得る。融合タンパク質は、少なくとも1の、少なくとも2の、少なくとも3の、少なくとも4の、少なくとも5の、少なくとも6の、少なくとも7の、少なくとも8の、少なくとも9の、少なくとも10の、少なくとも11の、少なくとも12の、少なくとも13の、少なくとも14の、少なくとも15の、少なくとも16の、少なくとも17の、少なくとも18の、少なくとも19の、又は少なくとも20の結合ポリペプチドを包含し得る。融合タンパク質は、30未満の、25未満の、又は20未満の結合ポリペプチドを包含し得る。融合タンパク質は、1から30の、例えば1から20、又は1から10の結合ポリペプチドを包含し得る。このような実施形態においては、結合ポリペプチドは、互いに同一又は異なるものであり得る。一部の実施形態においては、融合タンパク質は、互いにタンデムに配置された1つ以上の結合ポリペプチドを包含し得る。一部の実施形態においては、融合タンパク質は、2から6の結合ポリペプチドを含有し得る。例えば、融合タン

40

50

パク質は、2つの結合ポリペプチド、3つの結合ポリペプチド、4つの結合ポリペプチド、5つの結合ポリペプチド、又は6つの結合ポリペプチドを包含し得る。

【0043】

一部の実施形態においては、融合タンパク質は、1つ以上の非構造的ポリペプチドを包含し得る。融合タンパク質は、少なくとも1の、少なくとも2の、少なくとも3の、少なくとも4の、少なくとも5の、少なくとも6の、少なくとも7の、少なくとも8の、少なくとも9の、少なくとも10の、少なくとも11の、少なくとも12の、少なくとも13の、少なくとも14の、少なくとも15の、少なくとも16の、少なくとも17の、少なくとも18の、少なくとも19の、又は少なくとも20の非構造的ポリペプチドを包含し得る。融合タンパク質は、30未満の、25未満の、又は20未満の非構造的ポリペプチドを包含し得る。融合タンパク質は、1から30の、例えば1から20、又は1から10の非構造的ポリペプチドを包含し得る。このような実施形態においては、非構造的ポリペプチドは、互いに同一又は異なるものであり得る。一部の実施形態においては、融合タンパク質は、互いにタンデムに配置された1つ以上の非構造的ポリペプチドを包含し得る。

10

【0044】

一部の実施形態においては、融合タンパク質は、モジュールリニアポリペプチド(modular linear polypeptide)として配列し得る。例えば、モジュールリニアポリペプチドは、次の構造のうちいずれかに配列し得る：[結合ポリペプチド]_m-[リンカー]_k-[非構造的ポリペプチド]；[非構造的ポリペプチド]-[リンカー]_k-[結合ポリペプチド]_m；[結合ポリペプチド]_m-[リンカー]_k-[非構造的ポリペプチド]-[結合ポリペプチド]_m-[リンカー]_k-[非構造的ポリペプチド]；又は[非構造的ポリペプチド]-[結合ポリペプチド]_m-[リンカー]_k-[非構造的ポリペプチド]-[結合ポリペプチド]_m、ここで、k及びmはそれぞれ独立した1以上の整数である。一部の実施形態においては、mは20以下の整数であり得る。一部の実施形態においては、mは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、又は20と等しい整数であり得る。一部の実施形態においては、kは、10以下の整数であり得る。一部の実施形態においては、kは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、又は10と等しい整数であり得る。一部の実施形態においては、少なくとも1つの結合ポリペプチドは、少なくとも1つの非構造的ポリペプチドのN末端に配置し得る。一部の実施形態においては、少なくとも1つの結合ポリペプチドは、少なくとも1つの非構造的ポリペプチドのC末端に配置し得る。

20

30

【0045】

一部の実施形態においては、1以上の熱応答性ポリペプチドを含む融合タンパク質は、室温(約25)と体温(約37)との間の転移温度を有し得る。熱応答性の非構造的ポリペプチドは、当該融合タンパク質を対象に投与するときの濃度において、体温よりも低い又は体温よりも高い、LCST又はUCSTを有し得る。

【0046】

融合タンパク質は、当技術分野で公知の方法に従って、宿主細胞中で組み換えによって発現させることができる。融合タンパク質は、当技術分野で公知の任意の適切な手段によって、精製することができる。例えば、融合タンパク質は、液体クロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィー、若しくは親和性クロマトグラフィーなどのクロマトグラフィー、又は超遠心分離技術を用いて精製することができる。一部の実施形態においては、融合タンパク質は、クロマトグラフィーを用いずに精製することができる。一部の実施形態においては、融合タンパク質は、逆転移サイクリングを用いて精製することができる。

40

【0047】

a. 結合ポリペプチド

結合ポリペプチドは、少なくとも1つの標的に結合可能な任意のポリペプチドを含み得る。結合ポリペプチドは、少なくとも1つの標的に結合可能である。「標的」は、結合ポリヌクレオチドによって結合されることが可能な存在であり得る。標的は、例えば、他のポリペプチド、細胞表面受容体、糖、抗体、小分子、又はそれらの組み合わせを包含し得

50

る。標的は、バイオマーカーであり得る。標的は、受容体活性化作用により活性化されるか、又は拮抗作用により阻害され得る。結合ポリペプチドは、標的に特異的に結合し得る。結合ポリペプチドは、標的に結合することで、ターゲティング部位 (t a r g e t i n g m o i e t y)、作動薬、拮抗薬、又はそれらの組み合わせとして機能し得る。

【 0 0 4 8 】

結合ポリペプチドは、標的に結合するモノマーであり得る。モノマーは、1つ以上の標的に結合し得る。結合ポリペプチドは、オリゴマーを形成し得る。結合ポリペプチドは、同一又は異なる結合ポリペプチドとオリゴマーを形成し得る。オリゴマーは、標的と結合し得る。オリゴマーは、1つ以上の標的と結合し得る。オリゴマー中の1つ以上のモノマーは、1つ以上の標的と結合し得る。一部の実施形態においては、融合タンパク質は、多価であり得る。一部の実施形態においては、融合タンパク質は、多数の標的に結合し得る。一部の実施形態においては、結合ポリペプチド単独の活性は、融合タンパク質の一部である場合の結合ポリペプチドの活性と同様であり得る。

10

【 0 0 4 9 】

一部の実施形態においては、結合ポリペプチドは、1つ以上の足場タンパク質を含み得る。ここで用いられるように、「足場タンパク質」は、比較的安定し、かつはっきりした三次元構造を有する1つ以上のポリペプチドドメインを指す。足場タンパク質は、親和性操作の可能性をさらに有し得る。一部の実施形態においては、足場タンパク質は、特定の標的に結合するように操作され得る。結合ポリペプチドが1つ以上の足場タンパク質を含む実施形態においては、足場タンパク質は同一又は異なるものであり得る。

20

【 0 0 5 0 】

一部の実施形態においては、結合ポリペプチドはプロテインAを含み得る。プロテインAは、もともと黄色ブドウ球菌 (S t a p h y l o c o c c u s a u r e u s) に由来する42kDのタンパク質である。これは、免疫グロブリンG抗体の定常領域 (F c) に対する高い結合親和性を示し得る。プロテインAは、すべてF c抗体に結合可能な、5つの連結されたドメインを包含する。固定されたプロテインAは、様々な抗体の精製に用いることができる (例えば、H o b e r e t a l . (2 0 0 6) J . C h r o m a t o g r . B を参照されたい、ここで、その開示は参照により全体としてここに組み込まれる)。

30

【 0 0 5 1 】

b . リンカー

上述したように、融合タンパク質は、さらに少なくとも1つのリンカーを包含し得る。一部の実施形態においては、融合タンパク質は、1つ以上のリンカーを包含し得る。このような実施形態においては、リンカーは互いに同一又は異なるものであり得る。融合タンパク質は、少なくとも1の、少なくとも2の、少なくとも3の、少なくとも4の、少なくとも5の、少なくとも6の、少なくとも7の、少なくとも8の、少なくとも9の、少なくとも10の、少なくとも11の、少なくとも12の、少なくとも13の、少なくとも14の、少なくとも15の、少なくとも16の、少なくとも17の、少なくとも18の、少なくとも19の、少なくとも20の、少なくとも25の、少なくとも30の、少なくとも35の、少なくとも40の、少なくとも45の、少なくとも50の、少なくとも55の、少なくとも60の、少なくとも65の、少なくとも70の、少なくとも75の、少なくとも80の、少なくとも85の、少なくとも90の、少なくとも95の、又は少なくとも100のリンカーを包含し得る。融合タンパク質は、500未満の、400未満の、300未満の、又は200未満のリンカーを包含し得る。融合タンパク質は、1から1000のリンカー、例えば10から900、10から800、又は5から500のリンカーを包含し得る。

40

【 0 0 5 2 】

リンカーは、結合ポリペプチドと非構造的ポリペプチドとの間、結合ポリペプチドの間、非構造的ポリペプチドの間、又はそれらの組み合わせに配置され得る。多数のリンカーは、互いに近接して配置され得る。多数のリンカーは、互いに近接し、かつ結合ポリペ

50

チドと非構造的ポリペプチドの間に配置され得る。

【0053】

リンカーは、任意の適切なアミノ酸配列及び長さのポリペプチドであり得る。リンカーは、スペーサーペプチドとして機能し得る。リンカーは、ポリペプチドドメインの間に存在し得る。リンカーは、結合ポリペプチドの結合ドメインを十分に分離し得、一方で結合ドメインの活性を保存し得る。一部の実施形態においては、リンカーは、荷電アミノ酸を含み得る。一部の実施形態においては、リンカーは、柔軟であり得る。一部の実施形態においては、リンカーは、少なくとも1つのグリシン及び少なくとも1つのセリンを含み得る。一部の実施形態においては、リンカーは、(Gly₄Ser)₃(配列番号21)からなるアミノ酸配列を含み得る。一部の実施形態においては、リンカーは、少なくとも1つのプロリンを含み得る。一部の実施形態においては、リンカーは、配列番号22からなるアミノ酸配列を含み得る。

10

【0054】

c. ポリヌクレオチド

さらに、ここに詳述される融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドを開示する。ベクターは、ここに詳述される融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドを包含し得る。ポリペプチドの発現を得るため、ベクターは、典型的にはポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを、発現ベクターであって、直接転写のためのプロモーター、転写/翻訳ターミネーター、及びタンパク質をコードする核酸である場合には、翻訳開始のためのリボソーム結合部位を含有する発現ベクターにサブクロニングする。ベクターの例としては、pet24がある。適切なバクテリアプロモーターは、当技術分野で周知である。さらに、ここに詳述されるように、融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターに形質転換又は形質移入される宿主細胞を開示する。タンパク質発現のためのバクテリアの発現システムは利用可能であり、例えば、大腸菌(E. coli)、Bacillus sp.、及びサルモネラ(Salmonella)が挙げられる(Paiva et al., Gene 1983, 22, 229-235; Mosbach et al., Nature 1983, 302, 543-545、ここで、どちらも、参照により全体としてここに組み込まれる)。このような発現システムのためのキットは、商業的に利用可能である。哺乳類細胞、酵母、及び昆虫細胞のための真核発現システムは、当技術分野で周知であり、かつこれもまた商業的に利用可能である。レトロウイルスの発現システムもまた、用いることができる。

20

30

【0055】

4. 投与

上で詳述した融合タンパク質は、製薬技術分野の当業者に公知の標準的技術に従って、処方することができる。融合タンパク質を含むこのような組成物は、特定の対象の年齢、性別、体重、及び病態などの因子、並びに投与の経路を考慮に入れて、適量でかつ医療技術分野の当業者に公知の技術によって、投与することができる。

【0056】

融合タンパク質は、予防的又は治療的に投与することができる。予防的投与においては、融合タンパク質は、反応を誘発するのに適した量で投与することができる。治療的投与においては、融合タンパク質は、それを必要とする対象に対して、治療的効果を引き出すのに適した量で投与することができる。これを達成するのに十分な量は、「治療的有効量(therapeutically effective dose)」と定義される。この用途に効果的な量は、例えば、レジメン管理された融合タンパク質の特定の組成物、投与の様式、疾患の病期及び重症度、患者の全身の健康状態、並びに処方する医師の判断に依存するであろう。

40

【0057】

融合タンパク質は、すべての内容が参照により全体としてここに組み込まれる、Donnelly et al. (Ann. Rev. Immunol. 1997, 15, 617-648); Felgner et al. (米国特許第5,580,859号、199

50

6年12月3日発行) ; Felgner (米国特許第5,703,055号、1997年12月30日発行) ; 及びCarson et al. (米国特許第5,679,647号、1997年10月21日発行) に描写されているような、当技術分野で公知の方法によって投与することができる。融合タンパク質を、粒子又はビーズに合成することで、例えばワクチン銃 (vaccine gun) を用いて個体に投与可能となる。当技術分野の当業者は、生理学的に容認可能な化合物を含む、薬剂的に容認可能な担体の選択は、例えば投与経路に依存することを了知しているであろう。

【0058】

融合タンパク質は、様々な経路を介して送達され得る。典型的な送達経路は、例えば、皮内、筋肉内又は皮下投与の非経口投与を包含し得る。他の経路は、経口投与、鼻腔内、腔内、経皮、静脈内、動脈内、腫瘍内、腹腔内、及び上皮性の経路を包含し得る。一部の実施形態においては、融合タンパク質は、対象に、静脈内、動脈内、又は腹腔内投与することができる。

10

【0059】

融合タンパク質は、懸濁剤、シロップ剤又はエリキシル剤のような液状製剤であり得る。融合タンパク質は、リポソーム、マイクロスフェア、又は他の高分子マトリックス (例えば、内容が参照により全体としてここに組み込まれる、Felgner et al., 米国特許第5,703,055 ; Gregoriadis, Liposome Technology, Vols. I to III (2nd ed. 1993) に描写される方法による) に取り込まれ得る。リポソームは、リン脂質又は他の脂質からなり得、かつ無毒で生理学的に容認及び代謝可能であり、比較的生成及び投与が簡単な担体になり得る。

20

【0060】

融合タンパク質は、ワクチンであり得る。ワクチンは、エレクトロポレーション、例えば内容が参照により全体としてここに組み込まれる、米国特許第7,664,545号に描写される方法により、投与することができる。エレクトロポレーションは、内容が参照により全体として本明細書に組み込まれる、米国特許第6,302,874 ; 5,676,646 ; 6,241,701 ; 6,233,482 ; 6,216,034 ; 6,208,893 ; 6,192,270 ; 6,181,964 ; 6,150,148 ; 6,120,493 ; 6,096,020 ; 6,068,650 ; 及び5,702,359に描写されている方法及び/又は装置によることができる。エレクトロポレーションは、低侵襲装置 (minimally invasive device) を介して実行することができる。

30

【0061】

一部の実施形態においては、融合タンパク質は、放出制御製剤の形で投与することができる。一部の実施形態においては、融合タンパク質は、1つ以上の熱応答性ポリペプチドを含み得、熱応答性ポリペプチドは、転移温度であって、融合タンパク質が投与前に可溶のままであるような、かつ融合タンパク質が投与時に対象中でゲル様デポ剤に移行するような、転移温度を有する。一部の実施形態においては、融合タンパク質は、1つ以上の熱応答性ポリペプチドを含み得、熱応答性ポリペプチドは、転移温度であって、融合タンパク質が室温で可溶のままであるような、かつ融合タンパク質が投与時に対象中でゲル様デポ剤に移行するような、転移温度を有する。例えば、一部の実施形態においては、融合タンパク質は、1つ以上の熱応答性ポリペプチドを含み得、熱応答性ポリペプチドは、室温 (約25) と体温 (約37) との間の転移温度を有し、これにより、融合タンパク質は投与されてデポ剤を形成することができる。ここで用いられるように、「デポ剤」は融合タンパク質を含むゲル様の組成物であり、融合タンパク質を少しずつ放出する。一部の実施形態においては、融合タンパク質は、皮下又は腫瘍内に注入されてデポ剤 (コアセルベート) を形成し得る。デポ剤は、制御された及び/又は徐放性の融合タンパク質の放出を提供し得る。デポ剤は、例えば循環又は腫瘍への、徐放性の融合タンパク質の放出を提供し得る。一部の実施形態においては、融合タンパク質は、少なくとも1日、少なくとも

40

50

2日、少なくとも3日、少なくとも4日、少なくとも5日、少なくとも6日、少なくとも7日、少なくとも1週間、少なくとも1.5週間、少なくとも2週間、少なくとも2.5週間、少なくとも3.5週間、少なくとも4週間、又は少なくとも1か月の期間にわたって、デポ剤から放出され得る。

【0062】

5. 検出

ここで用いられるように、用語「検出する」又は「存在を判定する」は、検出不可能な濃度、低濃度、通常濃度、又は高濃度の1つ以上の融合タンパク質、標的、又は標的に結合した融合タンパク質の定性的計測を指す。検出は、インビトロ (*in vitro*)、エキスピボ (*ex vivo*)、又はインビボ (*in vivo*) の検出を包含し得る。検出は、1つ以上の融合タンパク質又は標的の存在と、1つ以上の融合タンパク質又は標的の非存在を包含し得る。検出は、1つ以上の融合タンパク質又は標的のレベルの定量化もまた、包含し得る。用語「定量化する」又は「定量化」は、互換的に使用することができ、かつ相対又は絶対にかかわらず、物質 (例えば、融合タンパク質又は標的) の量又は存在量を判定する過程を指し得る。任意の適切な検出方法は、本開示の一般的な範囲に収まる。一部の実施形態においては、融合タンパク質は、検出のために付着されたレポーターを含み得る。一部の実施形態においては、融合タンパク質は、レポーターによって標識することができる。一部の実施形態においては、標的に結合した融合タンパク質の検出は、限定されるものではないが、ウエスタンブロット上のバンド強度、フローサイトメトリー、放射性標識イメージング、細胞結合アッセイ、活性アッセイ、表面プラズモン共鳴 (SPR)、免疫アッセイを包含する方法により、又は当技術分野で公知の様々な他の方法により、判定することができる。

10

20

【0063】

一部の実施形態においては、融合タンパク質が標的に結合及び/又は標的を検出する抗体模倣物である実施形態を含め、任意の免疫アッセイを利用することができる。免疫アッセイは、例えば、酵素結合免疫アッセイ (ELISA)、ラジオイムノアッセイ (RIA)、順方向若しくは逆方向競合阻害アッセイのような競合阻害アッセイ、蛍光偏光アッセイ、又は競合結合アッセイであり得る。ELISAは、サンドイッチELISAであり得る。標的への融合タンパク質の特異的免疫学的結合は、融合タンパク質に付着している直接的標識を介して、又はアルカリホスファターゼ若しくはセイヨウワサビペルオキシダーゼのような間接的標識を介して検出することができる。固定された融合タンパク質の使用は、免疫アッセイに取り込むことができる。融合タンパク質は、種々の支持体、例えば、磁気又はクロマトグラフィーマトリックス粒子、アッセイプレート (例えば、マイクロタイターウェル) の表面、固体材料片などの上に固定化することができる。融合タンパク質又は複数の融合タンパク質を固体支持体上に整列させてコートすることにより、アッセイストリップを調製することができる。次いで、このストリップを試験生物学的試料中に浸漬させることができ、次いで、洗浄および検出ステップを介して迅速に処理して、計測可能なシグナル、例えば有色スポットを生成することができる。

30

【0064】

6. 方法

40

a. 疾患を治療する方法

他の態様では、疾患の治療を、それを必要とする対象において行う方法を開示する。方法は、有効量のここに記載の融合タンパク質を対象に投与することを含み得る。疾患は、癌、代謝疾患、自己免疫疾患、心血管疾患、及び整形外科的障害から選択され得る。一部の実施形態においては、疾患は、少なくとも一つの結合ポリペプチドの標的と関連する疾患であり得る。

【0065】

代謝疾患は、体内の異常な化学的反応が、正常な代謝プロセスを変動させる場合に生じ得る。代謝疾患は、例えば、インスリン耐性、非アルコール性脂肪肝疾患、2型糖尿病、インスリン耐性疾患、心血管疾患、動脈硬化症、脂質関連代謝障害、高血糖症、高インス

50

リン血症、高脂肪血症、及びグルコース代謝障害を包含し得る。

【0066】

自己免疫疾患は、体内に通常存在する物質及び組織に対する身体の異常な免疫応答から生じ得る。自己免疫疾患は、限定されるものではないが、ループス、関節リウマチ、多発性硬化症、インスリン依存性糖尿病、重症筋無力症、グレーブス病、自己免疫性溶血性貧血、自己免疫性血小板減少性紫斑病、グッドパスチャー症候群、尋常性天疱瘡、急性リウマチ熱、連鎖球菌感染後糸球体腎炎、結節性多発動脈炎、心筋炎、乾癬、セリアック病、クローン病、潰瘍性大腸炎、及び線維筋痛を包含し得る。

【0067】

心血管疾患は、心臓又は血管にかかわる疾患のクラスである。心血管疾患は、例えば、狭心症及び心筋梗塞（心臓発作）のような冠動脈疾患（CAD）、脳卒中、高血圧性心疾患、リウマチ性心疾患、心筋症、心臓不整脈、先天性心疾患、心臓弁膜症、心臓炎、大動脈瘤、末梢動脈疾患、及び静脈血栓症を包含し得る。

10

【0068】

整形外科的障害又は筋骨格障害は、四肢、頸部、及び背部を支持する体内の関節、靭帯、筋肉、神経、腱、及び構造の障害又は疼痛である。整形外科的障害は、疼痛を引き起こし、かつ正常な活動を害する変性疾患及び炎症病態を包含し得る。整形外科的障害は、例えば、手根管症候群、上顎炎、及び腱炎を包含し得る。

【0069】

癌は、限定されるものではないが、乳癌、結腸直腸癌、結腸癌、肺癌、前立腺癌、精巣癌、脳癌、皮膚癌、直腸癌、胃癌、食道癌、肉腫、気管癌、頭頸部癌、膵臓癌、肝臓癌、卵巣癌、リンパ癌、子宮頸癌、外陰癌、黒色腫、中皮腫、腎癌、膀胱癌、甲状腺癌、骨癌、癌腫、肉腫、及び軟部組織癌を包含し得る。一部の実施形態においては、癌は、結腸直腸癌であり得る。一部の実施形態においては、癌は、結腸直腸腺癌であり得る。

20

【0070】

一部の実施形態においては、本開示は、関心の腫瘍学的標的のための抗体模倣物の開発における、足場タンパク質の使用方法を提供する。足場タンパク質操作の出現に伴って、立体的かつ構築的制限によって妨げられない有効なタンパク質薬の設計実現性が到来する。有効なタンパク質薬は、診断及び治療において有用となり得るが、標的領域への送達を成功させるには、大きな試練が提起され得る。

30

【0071】

b. 疾患を診断する方法

他の態様では、疾患を診断する方法を開示する。方法は、ここに記載の融合タンパク質を対象に投与する工程、及び標的への融合タンパク質の結合を検出して対象における標的の存在を判定する工程を包含し得る。標的の存在は、対象における疾患を示し得る。一部の実施形態においては、方法は、対象からの試料とここに記載の融合タンパク質とを接触させる工程、試料中の標的のレベルを判定する工程、及び試料中の標的のレベルを標的の対照レベルと比較する工程であって、標的のレベルが対照レベルと異なることが、対象の疾患を示す工程、を包含し得る。一部の実施形態においては、疾患は、癌、代謝疾患、自己免疫疾患、心血管疾患、及び整形外科的障害から選択され得る。一部の実施形態においては、標的は、疾患マーカー又はバイオマーカーを含み得る。一部の実施形態においては、融合タンパク質は、標的に結合及び/又は標的を検出するための抗体模倣物として機能し得る。

40

【0072】

c. 標的の存在を判定する方法

他の態様では、試料中の標的の存在を判定する方法を開示する。方法は、試料とここに記載の融合タンパク質とを、融合タンパク質と試料中の標的との間で複合体を形成することを可能にする条件下で接触させる工程、及び複合体の存在を判定する工程を包含し得る。複合体の存在は、試料中の標的を示し得る。一部の実施形態においては、融合タンパク質は、検出のためのレポーターで標識され得る。

50

【 0 0 7 3 】

一部の実施形態においては、試料は、対象から得ることができ、及び方法は、診断、予後予測、又は対象の治療の効力を評価する工程をさらに包含し得る。方法が対象の治療の効力を評価する工程を包含する場合、方法は、必要に応じて対象の治療を改変して効力を改善する工程をさらに包含し得る。

【 0 0 7 4 】

d . 治療の有効性を判定する方法

他の態様では、疾患に対する治療の有効性の判定を、それを必要とする対象において行う方法を開示する。方法は、対象からの試料とここに記載の融合タンパク質を、融合タンパク質と試料中の標的の間で複合体を形成することを可能にする条件下で接触させる工程、試料中の複合体のレベルを判定する工程であって、複合体のレベルが試料中の標的のレベルを示す工程、及び試料中の標的のレベルを標的の対照レベルと比較する工程であって、標的のレベルが対照レベルと異なる場合に、治療が疾患の治療において有効である又は有効でないと判定する工程、を包含し得る。

10

【 0 0 7 5 】

時点としては、疾患の発症前、療法の施与前、療法の施与中の様々な時点、療法が完了した後、又はそれらの組み合わせを包含し得る。対象への融合タンパク質の投与時には、融合タンパク質は標的に結合し得、標的の存在は、様々な時点での対象における疾患の存在を示す。一部の実施形態においては、標的は、疾患マーカー又はバイオマーカーを含み得る。一部の実施形態においては、融合タンパク質は、標的への結合及び/又は標的の検出のための抗体模倣物として機能し得る。様々な時点における融合タンパク質の標的への結合の比較は、疾患が悪化したか否か、疾患が進行したか否か、療法が疾患を治療又は予防するように機能しているか否か、又はそれらの組み合わせを示し得る。

20

【 0 0 7 6 】

一部の実施形態においては、対照レベルは、対象が治療を開始した期間の前又はその期間中の時点での対象におけるレベルに対応し得、かつ試料は、より遅い時点で対象から採取される。一部の実施形態においては、試料は、対象が治療を受けている期間中の時点で採取され得、かつ対照レベルは、無疾患レベル又は対象が治療を開始した期間よりも前の時点におけるレベルに対応する。一部の実施形態においては、方法は、治療が疾患の治療において有効でないと判定される場合、治療を改変するか、又は異なる治療を対象に施与することをさらに包含し得る。

30

【 0 0 7 7 】

7 . 実施例

実施例 1 : 非反復かつ非構造的ポリペプチドの同定

E L P の非反復の並び替え版を、産生及び試験した。コンピューターアルゴリズムを用いて、200又は400アミノ酸を含む配列であって、各々の配列がE L P の対照物と同一のアミノ酸構成を有するが、並び替えられ又は再配列されたアミノ酸順序を有する配列を同定した。生成した配列は、5から10アミノ酸を含む少なくとも1つのサブ配列であって、(a) 3つの連続した同一アミノ酸を含んだか、(b) 配列に一度よりも多く出現したか、又は(c) 0以上のグリシン(G)でないアミノ酸によって分離される、少なくとも2つのプロリン(P)を含んだサブ配列である場合に却下したため、十分に非反復である。このような束縛により、どちらも構造破壊残基(s t r u c t u r e - b r e a k i n g r e s i d u e s)として同定されているプロリン(P)及びグリシン(G)の、十分な分散が増進された。

40

【 0 0 7 8 】

アルゴリズムは、さらに、8つの非反復配列のパネルであって、各々が、1/6がプロリン(P)であり、かつ1/3がグリシン(G)である240アミノ酸を含む配列を同定した。残りのアミノ酸は、エラスチンに存在する9つの異なるアミノ酸の、様々な組み合わせであった。これらの配列のアミノ酸構成を、図2に描写する。

【 0 0 7 9 】

50

各々の非構造的ポリペプチド配列の反復性を、言語的複雑性スコアの算出によって定量した。言語的複雑性は、同一のアルファベット及びウィンドウから考えられる特有サブ配列の総数で割った、与えられた配列中の特有サブ配列の総数によって、定義される。スコアを、タンパク質解析ツールであるCIDER (Holehouse et al. (2015) Biophys J. を参照されたい、ここで、その開示は参照により全体としてここに組み込まれる) を用いて算出した。ウィンドウ長を、各配列の全配列長と同一となるように設定した。最終スコアは、言語的複雑性スコア及び配列の長さを意味する全配列長の結果として与えられる。配列番号3～6の反復ポリペプチド配列及び配列番号7～18の非反復ポリペプチド配列の最終スコアの結果を、表1に報告する。非反復ポリペプチド配列のすべての最終スコアは、15.0よりも大きかった。

10

表1：反復（配列番号3～6）及び非反復（配列番号7～18）ポリペプチド配列の反復性の特徴づけ

【表1】

| 配列番号 | 長さ及び言語的複雑性の結果 |
|------|---------------|
| 3 | 7.9 |
| 4 | 7.9 |
| 5 | 8.0 |
| 6 | 8.0 |
| 7 | 28.7 |
| 8 | 35.6 |
| 9 | 32.8 |
| 10 | 42.8 |
| 11 | 50.6 |
| 12 | 51.6 |
| 13 | 50.6 |
| 14 | 83.3 |
| 15 | 85.3 |
| 16 | 88.3 |
| 17 | 86.3 |
| 18 | 147.8 |

20

30

40

【0080】

実施例2：非反復かつ非構造的ポリペプチドの発現

全ヌクレオチド配列を、示さない限り、アミノ酸配列からコドンスクランピングを用いて逆翻訳した (Tang, N. C. et al. (2016) Nature Mater. を参照されたい、ここで、その開示は参照により全体としてここに組み込まれる)。Met-Ser-Lys-Gly-Pro-Gly (配列番号19) をコードするN末端リーダー配列及びGly-Trp-Pro (配列番号20) をコードするC末端Hisタグ尾部を、示さない限り、遺伝子に組み込んだ。すべての遺伝子を、商業的合成方法により合成し、かつ改変pET-24a(+)プラスミド (Gen9 Inc., MA, U

50

SA and Genscript Inc., NJ, USA) にクローニングした。結果として得られたプラスミドを、大腸菌 BL21 株コンピテントセルに形質転換した。

【0081】

コロニーを、50 μ g/mL カナマイシンを加えた 2 ~ 5 mL の Terrific Broth (TB) に播種し、37 °C 及び 250 r.p.m で一晩生育させた。1 ミリリットルの種菌を、50 μ g/mL カナマイシンを加えた 1 L の TB に播種し、37 °C 及び 250 r.p.m で 6 ~ 7 時間生育させた。終濃度 1 mM の IPTG を加えて発現を誘導し、細胞を追加で 24 時間生育させた。非構造的ポリペプチドを、前述したように (Christensen et al. (2009) Curr Protoc Protein Sci. を参照されたい、ここで、その開示は参照により全体としてここに組み込まれる)、逆転移サイクリング (ITC) によって精製した。

10

【0082】

実施例 3 : 非反復的かつ非構造的ポリペプチドの特徴づけ

非構造的ポリペプチドの逆転移温度を特徴づけるため、25 μ M で吸光度 350 nm のペプチド溶液を、Cary 300 紫外線可視分光光度計 (Agilent Technologies) を用いて溶液温度機能として監視した。逆転移温度を、周囲の疎水性の増加に伴って蛍光が増加する SYPRO Orange 色素によっても監視した。温度応答性ポリマーは、水溶液中の疎水効果に起因して相転移を示した。そこで、StepOne PlusTM リアルタイム PCR 装置を用いて、蛍光を溶液温度機能として監視した。逆転移温度を、濁度又は蛍光勾配の最大値における温度として定義した。

20

【0083】

濁度特性は、PBS 中で 25 μ M である全ての構成物に対し、約 0 と約 100 との間の加熱曲線又は冷却曲線からなり、当該濁度特性が、A [0.2] (配列番号 7 及び 9) 及び A [0.5] (配列番号 8 及び 10) の非反復版が、それらの反復性対照物 (配列番号 3 及び 5 並びに配列番号 4 及び 6) と同様に、転移温度を有する LCST 相挙動を維持することを示した。さらに、非構造的ポリペプチドは、0 と 100 との間で下限臨界溶液温度 (LCST) 挙動を示した (図 3 (A) ~ (B) 及び図 4 (A) ~ (B) を参照されたい)。

【表 2 - 3】

| |
|--|
| LGTGLTGGTPTGGIPGGIGIPGILTT |
| 配列番号18 PGTYPGYGYVYPTTGGIPGGVVPGGGTKLVPGKKGKGGAKAPGTVPVGAGGGKIVPIYGIAPGKY GYPGGGIVPGITTPGLPTGKKPYGGVPVLYGKLPAGPIPTAGAPGYIAPGVPGGLVKGGTGIAPL GVILVYIGVGGIKGGALPTGGLYPGAGTPGYVGGGAPAGGIALKPGITPGTAAPGLPGKGGKYT YPGGAPGGTGGVPGYPGLALKLGIPTKGGGIGLPIYIGLLPGKPGG |
| 配列番号19 Met-Ser-Lys-Gly-Pro-Gly |
| 配列番号20 Glv-Trp-Pro |
| 配列番号21 (Gly ₄ Ser) ₃ |
| 配列番号22 PQPQPKPQPKPEPEPQPQG |
| 配列番号23 (VPGXG) _n , Xはプロリン以外の任意のアミノ酸であり、かつnは1以上の整数である。 |

10

【 図 1 】

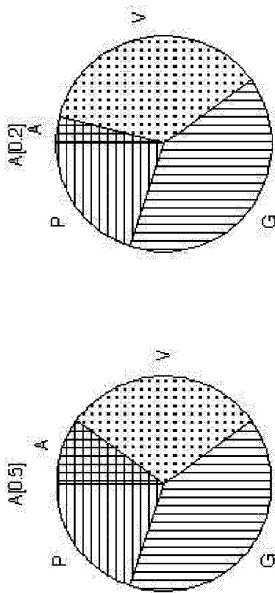


FIG. 1

【 図 2 】

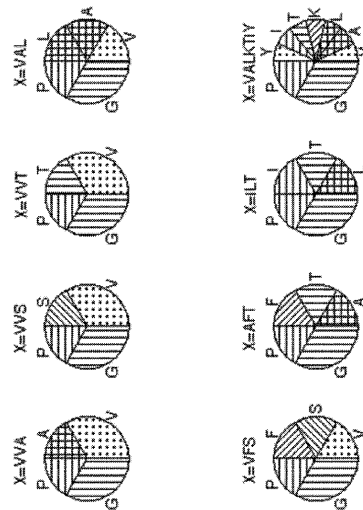


FIG. 2

【 図 3 (A) 】

200アミノ酸

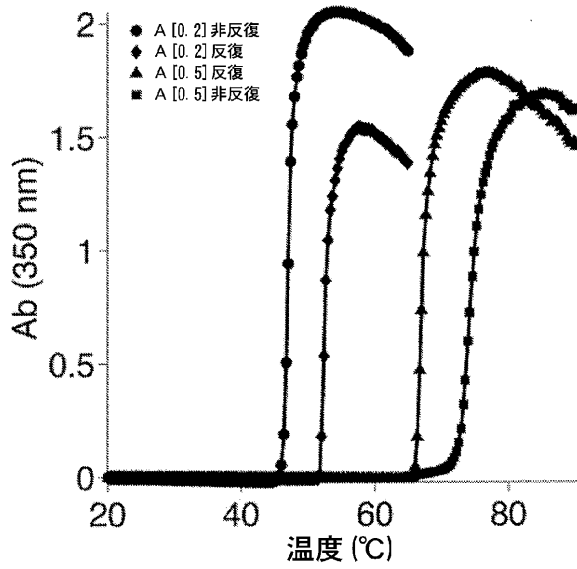


FIG. 3(A)

【 図 3 (B) 】

400アミノ酸

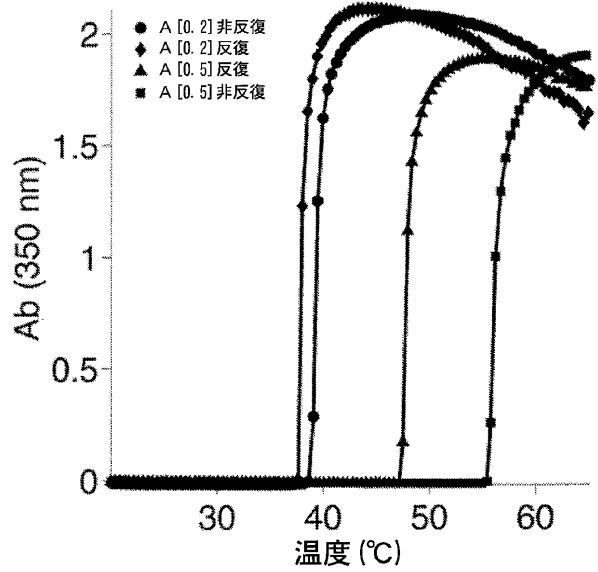


FIG. 3(B)

【 図 4 (A) 】

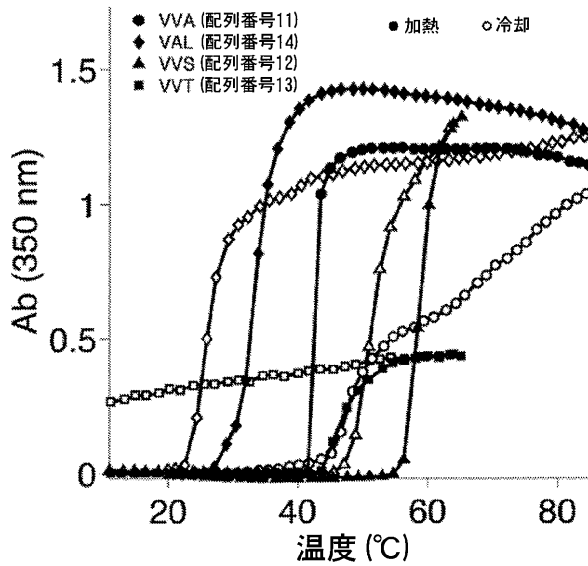


FIG. 4(A)

【 図 4 (B) 】

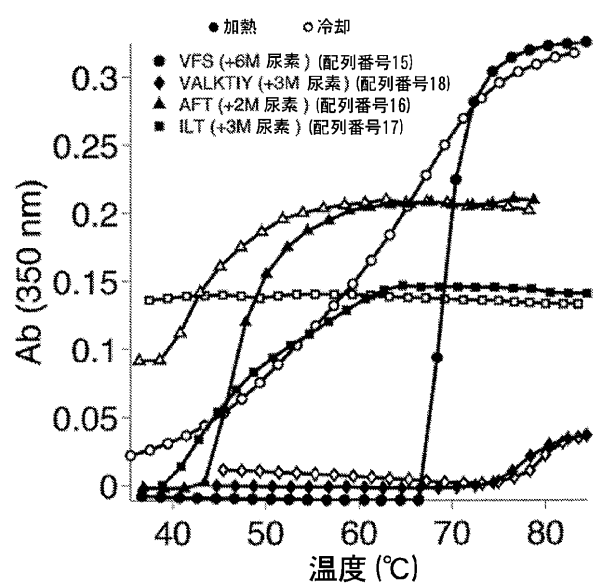


FIG. 4(B)

【配列表】

2020500150000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 17/52887

| A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - C07K 14/00 (2018.01) CPC - A61K 9/5123, A61K 9/5169, A61K 47/42 | | |
|--|--|--|
| According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC | | |
| B. FIELDS SEARCHED | | |
| Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) See Search History Document | | |
| Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched See Search History Document | | |
| Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) See Search History Document | | |
| C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| X ----- A | US 2015/0112022 A1 (DUKE UNIVERSITY) 23 April 2015 (23.04.2015) para [0027]; [0035]-[0036]; [0062]-[0069]; [0111]-[0119]. | 1-5, 7, 8, (10,11)/(1-5,7,8,10) ----- 6, 9, (10,11)/(6,9) |
| A | US 2012/0208742 A1 (PRIMIANO et al.) 16 August 2012 (16.08.2012) claims 1, 4, 11; SEQ ID NO: 56. | 6, 9, (10,11)/(6,9) |
| A | MUIZNIEKS et al. "Modulated growth, stability and interactions of liquid-like coacervate assemblies of elastin." Matrix Biology 36 (2014): 39-50. entire document, especially p. 40; p. 41, col 2, para 3; Tables 1 and 2. | 1 |
| <input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex. | | |
| * Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed | | "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "G" document member of the same patent family |
| Date of the actual completion of the international search | Date of mailing of the international search report | |
| 12 January 2018 | 26 JAN 2018 | |
| Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300 | Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774 | |

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2015)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 17/52887

Box No. 1 Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
- a. forming part of the international application as filed:
 in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 on paper or in the form of an image file.
- b. furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- c. furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
 in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
 on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 17/52887

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.: 12-44
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

—continued on first extra sheet—

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1-11 limited to SEQ ID NO: 7

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 17/52887

--continued from Box III: Observations where unity of invention is lacking--

Group I+: Claims 1-11, directed to an unstructured polypeptide having no discernible repeat motif, and a fusion protein comprising said polypeptide and at least one binding polypeptide. The polypeptide and fusion protein will be searched to the extent that the unstructured polypeptide encompasses a 50 amino acid subsequence of SEQ ID NO: 7. It is believed that claims 1-11 encompass this first named invention, and thus these claims will be searched without fee to the extent that the unstructured polypeptide encompasses a 50 amino acid subsequence of SEQ ID NO: 7. Additional unstructured polypeptides will be searched upon the payment of additional fees. Applicants must specify the claims that encompass any additionally elected unstructured polypeptides. Applicants must further indicate, if applicable, the claims which encompass the first named invention, if different than what was indicated above for this group. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched. An exemplary election would be an unstructured polypeptide comprising a 50 amino acid subsequence of SEQ ID NO: 8 (claim 1-11).

The inventions listed as Group I+ do not relate to a single special technical feature under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

No technical features are shared between the unstructured polypeptide amino acid sequences of Group I+ and, accordingly, these groups lack unity a priori.

Additionally, even if Group I+ inventions were considered to share the technical feature of an unstructured polypeptide having no discernible repeat motif, wherein the polypeptide is soluble below the lower critical solution temperature (LCST), soluble above the upper critical solution temperature (UCST), or a combination thereof, wherein the LCST and UCST are each independently from about 0 deg C to about 100 deg C, and a fusion protein comprising at least one binding polypeptide and at least one of said unstructured polypeptides, these shared technical features are previously disclosed by US 2015/0112022 A1 to Duke University, (hereinafter Duke).

Duke teaches an unstructured polypeptide (para [0036] "FIG. 21. depicts graphs showing multiple Pro and Gly arrangements besides the canonical Pro-Gly dipeptide are conducive to unstructured protein-polymers that display "smart" behavior. Protein-polymers with periodic Pro and Gly residues arranged as PX.sub.nG units, where n=0 (A), 1 (B), 2 (D), 3 and 4 (E), and having pentapeptide, hexapeptide and nonapeptide repeat units display thermally-triggered phase transition behavior. These protein-polymers lack ordered secondary structures as shown by their circular dichroism spectra characteristic of disordered proteins (C)."), having no discernible repeat motif (Table 1 LCST and UCST Behavior of Exemplary Polypeptide Motifs...GAPFGFAIPMGAGFPTGGLAPFGMGLPAGM (SEQ ID NO: 12) LCST...VPGHSHRDFPVLHLVALNSPLSGGMRG (SEQ ID NO: 53) LCST"), wherein the polypeptide is soluble below the lower critical solution temperature (LCST), soluble above the upper critical solution temperature (UCST), or a combination thereof, wherein the LCST and UCST are each independently from about 0 .deg. C to about 100 .deg. C (para [0059]-[0060] "Polypeptides may exhibit phase separation when exposed to a threshold temperature that is above a lower critical solution temperature (LCST) of the polypeptide, or may exhibit phase separation when exposed to temperatures below an upper critical solution temperature (UCST) of the polypeptide. Polypeptides described herein may also exhibit phase separation when exposed to threshold temperatures both above the lower critical solution temperature (LCST) and below the upper critical solution temperature (UCST)...The difference between the two transition temperatures may be at least about 1.deg. C...The resolubilization transition temperature may be higher or lower than the soluble-to-insoluble phase transition temperature"; [0062] "The polypeptides may include a combination of LCST and UCST motifs which may convey both UCST and LCST transition behavior to the polypeptide. The LCST and UCST motifs may be interspersed in the polypeptide. For example, the LCST and UCST motifs may be randomly distributed in the polypeptide"; [0111] "these protein-polymers display zero hysteresis below a critical threshold temperature (typically around 40.deg. C. for the polymers herein synthesized)"). Duke further teaches a fusion protein comprising at least one binding polypeptide and at least one of said unstructured polypeptides (para [0073] "Targeted delivery may be achieved by recognition, binding or affinity of a particular receptor"; [0075]-[0076] "Fusion proteins may be formed which include an environmentally responsive polypeptide operably connected to a polypeptide of interest...The environmentally sensitive polypeptide may also be chemically conjugated to molecules such as therapeutics, carbohydrates, synthetic polymers, polynucleotides and oligonucleotides, including DNA, RNA, as well chemically synthesized small molecules").

As the technical features were known in the art at the time of the invention, they cannot be considered special technical features that would otherwise unify the groups.

Therefore, Group I+ inventions lack unity under PCT Rule 13 because they do not share the same or corresponding special technical feature.

NOTE, claims 12-44 are held unsearchable because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

フロントページの続き

| (51)Int.Cl. | F I | | テーマコード(参考) | |
|---------------------------------|---------|--------|------------|--|
| G 0 1 N 33/531 (2006.01) | G 0 1 N | 33/531 | Z | |
| C 0 7 K 14/47 (2006.01) | C 0 7 K | 14/47 | | |
| C 1 2 N 15/12 (2006.01) | C 1 2 N | 15/12 | | |

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

(74)代理人 100111796

弁理士 服部 博信

(72)発明者 チルコティ アシュトッシュ

アメリカ合衆国 ノースカロライナ州 27701 ダーラム グロリア アベニュー 1001

(72)発明者 タン ニコラス

アメリカ合衆国 ノースカロライナ州 27705 ダーラム アーウィン ロード 2812

スイート 306 デューク ユニバーシティ内

(72)発明者 ケリー ギャレット

アメリカ合衆国 ノースカロライナ州 27705 ダーラム アーウィン ロード 2812

スイート 306 デューク ユニバーシティ内

Fターム(参考) 4C076 AA95 BB11 BB13 BB14 BB21 EE41 EE59 FF32 FF36 FF65
 4H045 AA10 AA20 AA30 BA10 BA11 BA12 BA13 BA14 BA15 BA16
 BA17 BA18 BA19 BA41 EA20 EA50 FA74

| | | | |
|----------------|--|---------|------------|
| 专利名称(译) | 临界溶液温度行为较低的非重复性和非结构性多肽 | | |
| 公开(公告)号 | JP2020500150A | 公开(公告)日 | 2020-01-09 |
| 申请号 | JP2019515805 | 申请日 | 2017-09-22 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 杜克大学 | | |
| 申请(专利权)人(译) | 杜克大学 | | |
| [标]发明人 | チルコティアシュトツシュ ケリーギャレット | | |
| 发明人 | チルコティ アシュトツシュ タン ニコラス ケリー ギャレット | | |
| IPC分类号 | C07K14/00 C07K19/00 C07K7/08 A61K47/42 A61K47/64 G01N33/531 C07K14/47 C12N15/12 | | |
| CPC分类号 | C07K14/00 C07K14/31 C07K2319/00 C07K2319/02 C07K2319/21 A61K38/00 A61P35/00 G01N33/68 G01N2800/52 A61K47/65 | | |
| FI分类号 | C07K14/00.ZNA C07K19/00 C07K7/08 A61K47/42 A61K47/64 G01N33/531.Z C07K14/47 C12N15/12 | | |
| F-TERM分类号 | 4C076/AA95 4C076/BB11 4C076/BB13 4C076/BB14 4C076/BB21 4C076/EE41 4C076/EE59 4C076/FF32 4C076/FF36 4C076/FF65 4H045/AA10 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA11 4H045/BA12 4H045/BA13 4H045/BA14 4H045/BA15 4H045/BA16 4H045/BA17 4H045/BA18 4H045/BA19 4H045/BA41 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA74 | | |
| 代理人(译) | 田中真一郎 ▲▼吉尔场和彦 须田博之 山崎 一夫 服部博信 | | |
| 优先权 | 62/399123 2016-09-23 US | | |
| 外部链接 | Espacenet | | |

摘要(译)

在这里，我们描述了一种非结构性的多肽，缺乏可重复的重复基序。本文还描述了包括至少一种非结构多肽和至少一种结合多肽的融合蛋白。此外，描述了在有此需要的受试者中治疗疾病的方法。该方法可以包括向受试者施用有效量的融合蛋白。

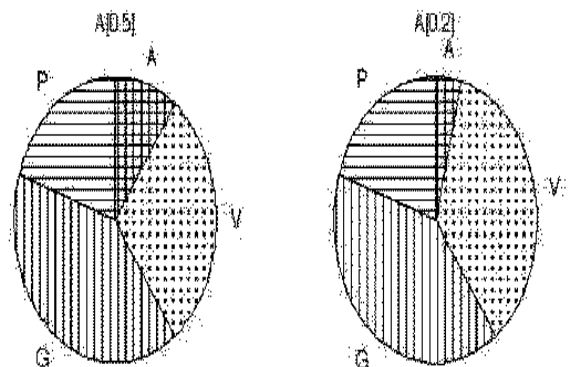


FIG. 1