

(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2019-500850
(P2019-500850A)

(43) 公表日 平成31年1月17日(2019.1.17)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C12N 15/62 (2006.01)	C12N 15/62 ZNAZ	4B065
C07K 19/00 (2006.01)	C07K 19/00	4C076
C07K 16/00 (2006.01)	C07K 16/00	4C084
C07K 14/525 (2006.01)	C07K 14/525	4C087
C12N 15/85 (2006.01)	C12N 15/85 Z	4H045
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求		(全 45 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2018-521279 (P2018-521279)
 (86) (22) 出願日 平成28年10月24日 (2016.10.24)
 (85) 翻訳文提出日 平成30年6月22日 (2018.6.22)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2016/075543
 (87) 国際公開番号 WO2017/068183
 (87) 国際公開日 平成29年4月27日 (2017.4.27)
 (31) 優先権主張番号 62/245,838
 (32) 優先日 平成27年10月23日 (2015.10.23)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 514322124
 アボジェニックス アーゲー
 ドイツ連邦共和国 69120 ハイデル
 ベルク イム ノイエンハイマー フェル
 ト 584
 Im Neuenheimer Feld
 584, 69120 Heidelb
 erg Germany
 (74) 代理人 100108453
 弁理士 村山 靖彦
 (74) 代理人 100110364
 弁理士 実広 信哉
 (74) 代理人 100133400
 弁理士 阿部 達彦

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 一本鎖CD137受容体アゴニスタンパク質

(57) 【要約】

本明細書において、特異的CD137受容体アゴニスタンパク質、これをコードする核酸、及びCD137L関連疾患又は障害を有する対象を処置する方法が提供される。本明細書において提供されるCD137受容体アゴニスタンパク質は3つの可溶性CD137Lドメイン及びFc断片を含む。CD137受容体アゴニスタンパク質は実質的に非凝集性であり、治療、診断及び/又は研究用途に好適である。

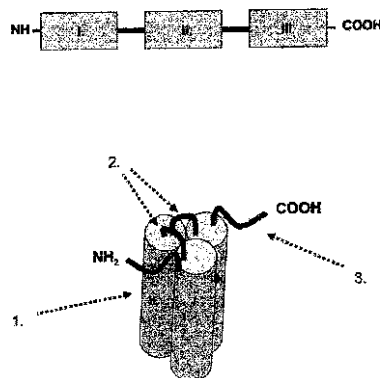


Figure 1

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

一本鎖融合ポリペプチドを含むCD137受容体アゴニスタンパク質であって、
(i)第1の可溶性CD137Lドメイン、
(ii)第1のペプチドリンカー、
(iii)第2の可溶性CD137Lドメイン、
(iv)第2のペプチドリンカー、並びに
(v)第3の可溶性CD137Lドメイン、並びに
(vi)配列番号16及び19～24を含む群から選択されるヒンジリンカー、並びに
(vii)抗体Fc断片を含み、
抗体Fc断片(vii)が配列番号13若しくは14で示されるアミノ酸配列又は配列番号13若しくは14のアミノ酸1～217からなる、CD137受容体アゴニスタンパク質。

10

【請求項 2】

抗体Fc断片(vii)がヒンジリンカー(vi)を介して第3のCD137Lドメイン(v)のC末端に融合している、請求項1に記載のCD137受容体アゴニスタンパク質。

【請求項 3】

実質的に非凝集性である、請求項1又は2に記載のCD137受容体アゴニスタンパク質。

【請求項 4】

第2及び/又は第3の可溶性CD137Lドメインが、任意選択でアミノ酸配列変異を含む、N末端が短縮されたドメインである、請求項1から3のいずれか一項に記載のCD137受容体アゴニスタンパク質。

20

【請求項 5】

可溶性CD137Lドメインのうちの少なくとも1つ、特に可溶性CD137Lドメイン(iii)及び(v)のうちの少なくとも1つが、配列番号1のヒトCD137Lのアミノ酸D86又はR88又はQ89又はG90で開始するN末端配列を有する可溶性CD137Lドメインであり、D86又はR88又はQ89が中性アミノ酸、例えばSer又はGlyで置き換えられていてもよい、請求項1から4のいずれか一項に記載のCD137受容体アゴニスタンパク質。

【請求項 6】

可溶性CD137Lドメインのうちの少なくとも1つ、特に可溶性CD137Lドメイン(iii)及び(v)のうちの少なくとも1つが、

30

(a)D86～G90及び

(b)(Gly/Ser)89～G90

から選択されるN末端配列を有する可溶性CD137Lドメインである、請求項5に記載のCD137受容体アゴニスタンパク質。

【請求項 7】

可溶性CD137Lドメインが配列番号1のアミノ酸E254で終止し、及び/又は任意選択でD86、L87、R88、Q89、D112、V118、A154、A174、A176、A188、T241の位置に又は前記位置の2つ以上に変異を含む、請求項5又は6に記載のCD137受容体アゴニスタンパク質。

【請求項 8】

少なくとも可溶性CD137Lドメイン(iii)が、V240又はT241又はE243で終止する、C末端が短縮されたCD137Lドメインである、請求項5から7のいずれか一項に記載のCD137受容体アゴニスタンパク質。

40

【請求項 9】

可溶性CD137Lドメイン(i)、(iii)及び(v)が配列番号1のヒトCD137Lのアミノ酸89～240からなる、請求項5から8のいずれか一項に記載のCD137受容体アゴニスタンパク質。

【請求項 10】

第1及び第2のペプチドリンカー(ii)及び(iv)が、独立に、グリコシル化されていてもよいアスパラギン残基を任意選択で含む、3～8個のアミノ酸の長さ、特に3、4、5、6、7又は8個のアミノ酸の長さを有し、好ましくは、グリシン/セリンリンカーである、請求項1から9のいずれか一項に記載のCD137受容体アゴニスタンパク質。

50

【請求項 1 1】

第1及び第2のペプチドリンカー(ii)及び(iv)が配列番号2のアミノ酸配列からなる、請求項10に記載のCD137受容体アゴニストタンパク質。

【請求項 1 2】

例えば配列番号17のN末端シグナルペプチドドメインを更に含む、プロテアーゼ切断部位を含んでもよい、並びに/又は、認識/精製ドメイン、例えば配列番号18のStrep-tagを含み及び/若しくはこれに連結されていてもよいC末端要素を更に含む、請求項1から11のいずれか一項に記載のCD137受容体アゴニストタンパク質。

【請求項 1 3】

配列番号15及び25～35のいずれかのアミノ酸配列を含む、請求項1から12のいずれか一項に記載のCD137受容体アゴニストタンパク質。

10

【請求項 1 4】

それぞれが配列番号27、29、30、32、33、34又は35で示されるアミノ酸配列を有する2つのポリペプチドを含む、請求項1から13のいずれか一項に記載のCD137受容体アゴニストタンパク質。

【請求項 1 5】

2つのポリペプチドが

- a) 配列番号27、29、30、32、35の484位、490位及び493位、又は
- b) 配列番号30の489位、490位及び493位、又は
- c) 配列番号31の493位、489位及び502位、又は
- d) 配列番号33若しくは34の487位、493位及び496位

20

に形成された3つの鎖間ジスルフィド結合によって共有結合で連結されている、請求項14に記載のCD137受容体アゴニストタンパク質。

【請求項 1 6】

配列番号27、29のN158及びN318、又は配列番号30、31のN161及びN324、又は配列番号33、34のN159及びN320、又は配列番号35のN86、N158、N246、N318及びN406のリストから選択される1つ又は複数のNグリコシル化アスパラギン残基を含む、請求項14又は15に記載のCD137受容体アゴニストタンパク質。

【請求項 1 7】

ポリペプチドが更に翻訳後修飾されている、請求項1から16のいずれか一項に記載のCD137受容体アゴニストタンパク質。

30

【請求項 1 8】

翻訳後修飾がN末端グルタミンのピログルタメートへの修飾を含む、請求項17に記載のCD137受容体アゴニストタンパク質。

【請求項 1 9】

好ましくは発現制御配列に作動可能に連結された、請求項1～18のいずれか一項に記載のCD137受容体アゴニストタンパク質をコードする核酸分子。

【請求項 2 0】

請求項19に記載の核酸分子を含む発現ベクター。

【請求項 2 1】

請求項19に記載の核酸分子又は請求項20に記載のベクターで形質転換された又はトランスフェクトされた細胞又は非ヒト生命体であって、細胞が例えば原核細胞又は真核細胞、好ましくは哺乳類細胞、又はより好ましくはヒト細胞若しくはチャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞である、細胞又は非ヒト生命体。

40

【請求項 2 2】

請求項1から19のいずれか一項に記載のCD137受容体アゴニストタンパク質、請求項19に記載の核酸分子、又は請求項20に記載のベクターを活性薬剤として含む医薬組成物又は診断用組成物。

【請求項 2 3】

1つ又は複数の薬学的に許容される担体、希釈剤、賦形剤及び/又はアジュバントを更に

50

含む、請求項22に記載の医薬組成物又は診断用組成物。

【請求項24】

治療、より詳細にはCD137Lの機能不全によって引き起こされる、これに関連する、及び/又はこれに付随する障害、特に腫瘍等の増殖性障害、例えば固形又はリンパ腫瘍、感染症、炎症、代謝性疾患、自己免疫障害、例えばリウマトイド及び/又は関節炎疾患、退行性疾患、例えば多発性硬化症等の神経退行性疾患、アポトーシス関連疾患又は移植拒絶反応の予防及び/又は処置において用いるための、請求項22又は23に記載の医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、3つの可溶性CD137Lドメイン及びFc断片を含む特異的CD137受容体アゴニストタンパク質、CD137受容体アゴニストタンパク質をコードする核酸分子、並びにその使用を提供する。CD137受容体アゴニストタンパク質は実質的に非凝集性であり、治療用、診断用、及び/又は研究用途に好適である。

【背景技術】

【0002】

TNFスーパーファミリー(TNFSF)サイトカインの三量体化は、効率的な受容体結合及び活性化に必要であることが知られている。しかし、TNFスーパーファミリーサイトカインの三量体複合体を組み換えモノマー単位から調製することは困難である。

【0003】

WO01/49866及びWO02/09055は、TNFサイトカイン及び多量体化成分、特にC1qタンパク質ファミリー又はコレクチンからのタンパク質を含む組み換え融合タンパク質を開示している。しかしこれらの融合タンパク質の不利益な点は、三量体化ドメインが通常大きな分子量を有すること、及び/又は三量体化がかなり非効率であることである。

【0004】

Schneiderら(J Exp Med 187 (1989)、1205~1213頁)は、TNFサイトカインの三量体はN末端に位置する安定化モチーフによって安定化されていると記載している。CD95Lにおいては、受容体結合ドメイン三量体の安定化はおそらく細胞膜付近に位置するN末端アミノ酸ドメインによって引き起こされている。

【0005】

Shiraishiら(Biochem Biophys Res Commun 322 (2004)、197~202頁)は、CD95Lの受容体結合ドメインはN末端に位置する人工のヘリカルコイルドコイル(ロイシンジッパー)モチーフによって安定化されているであろうと記載している。しかし、ポリペプチド鎖の相互の配向、例えば平行又は逆平行配向は予測困難であることが見出された。更に、コイルドコイルジッパーモチーフにおけるヘプタドリピートの最適な数を決定することは困難である。更に、コイルドコイル構造はpH及び/又はイオン強度が変化した後で高分子量の凝集物を形成する傾向がある。

【0006】

WO01/25277は、細胞受容体の細胞外リガンド結合ドメインに結合する一本鎖オリゴマーポリペプチドに関連し、このポリペプチドは少なくとも3つの受容体結合部位を含み、その少なくとも1つは細胞受容体のリガンド結合ドメインに結合でき、少なくとも1つは細胞受容体のリガンド結合ドメインに効果的に結合できず、それにより一本鎖オリゴマーポリペプチドは受容体に結合することができるが、受容体を活性化することはできない。例えば、モノマーはTNFファミリー、特にTNF- α のサイトカインリガンドから誘導される。

【0007】

WO2005/103077は、TNFファミリーリガンドメンバーの少なくとも3つのモノマー及びTNFリガンドファミリーメンバーのモノマーを互いに連結する少なくとも2つのペプチドリンカーを含む一本鎖融合ポリペプチドを開示している。しかし最近の実験によって、これらの一本鎖融合ポリペプチドは望ましくない凝集を示すことが示されている。

【0008】

10

20

30

40

50

WO2010/010051は、3つの可溶性TNFファミリーサイトカイン及び少なくとも2つのペプチドリンカーを含む一本鎖融合ポリペプチドを開示している。記載された融合ポリペプチドは実質的に非凝集性である。

【0009】

最近の研究によって、抗CD137-mAbのインビボ抗腫瘍活性はFcガンマRによって促進される機構に依存しており、アゴニスト活性のみによるものではないことが示されている。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0010】

【特許文献1】WO01/49866

【特許文献2】WO02/09055

【特許文献3】WO01/25277

【特許文献4】WO2005/103077

【特許文献5】WO2010/010051

【特許文献6】米国特許公開第20090311253A1号

【非特許文献】

【0011】

【非特許文献1】Schneiderら(J Exp Med 187 (1989)、1205~1213頁)

【非特許文献2】Shiraishiら(Biochem Biophys Res Commun 322 (2004)、197~202頁)

【非特許文献3】Sambrookら(1989年)、Molecular Cloning, A Laboratory Manual、Cold Spring Harbor Press

【非特許文献4】Ausubelら(1989年)、Current Protocols in Molecular Biology、John Wiley & Sons

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0012】

インビボにおけるFcガンマRに基づく架橋(Fc-gamma-R based crosslinking)に依存しない高い生物学的活性、高い安定性を示し、効率的な組み換え生産を可能にする新規なCD137受容体アゴニストに対する当技術におけるニーズが存在する。

【課題を解決するための手段】

【0013】

本発明は、インビボにおけるCD137:CD137L相互作用を模倣し、アゴニスト性モノクローナル抗体と比較して低いタンパク分解性及び短いインビボ半減期を示す特異的CD137受容体アゴニストタンパク質を提供する。

【0014】

本発明のCD137受容体アゴニストタンパク質は一般に、(i)第1の可溶性CD137Lサイトカインドメイン、(ii)第1のペプチドリンカー、(iii)第2の可溶性CD137Lドメイン、(iv)第2のペプチドリンカー、(v)第3の可溶性CD137Lドメイン、(vi)第3のペプチドリンカー(例えばヒンジリンカー)、及び(vii)抗体Fc断片を含む。

【0015】

1つの実施形態では、抗体Fc断片(vii)は第1のCD137Lドメイン(i)のN末端及び/又は第3のCD137Lドメイン(v)のC末端に位置している。別の実施形態では、抗体Fc断片は第3のCD137Lドメイン(v)のC末端に位置している。1つの実施形態では、ポリペプチドは実質的に非凝集性である。別の実施形態では、第2及び/又は第3の可溶性CD137Lドメインは、任意選択でアミノ酸配列変異を含む、N末端が短縮されたドメインである。別の実施形態では、可溶性CD137Lドメイン(i)、(ii)及び(iii)は、任意選択でアミノ酸配列変異を含むC末端が短縮されたドメインである。

【0016】

1つの実施形態では、可溶性CD137Lドメインのうちの少なくとも1つ、特に可溶性CD137Lドメイン(iii)及び(v)のうちの少なくとも1つは、ヒトCD137Lのアミノ酸D86又はR88又はQ

10

20

30

40

50

89又はG90で開始するN末端配列を有する可溶性CD137Lドメインであり、D86又はR88又はQ89は中性アミノ酸、例えばSer又はGlyで置き換えられていてもよい。別の実施形態では、可溶性CD137Lドメインのうちの少なくとも1つ、特に可溶性CD137Lドメイン(iii)及び(v)のうちの少なくとも1つは、(a)D86~G90及び(b)(Gly/Ser)89~G90から選択されるN末端配列を有する可溶性CD137Lドメインである。1つの実施形態では、可溶性CD137LドメインはヒトCD137Lのアミノ酸E254で終止し、及び/又は任意選択でD86、L87、R88、Q89、D112、V118、A154、A174、A176、A188、T241の位置に1つ又は複数の変異を含む。1つの実施形態では、可溶性CD137Lドメイン(i)、(iii)及び(v)は配列番号1のヒトCD137Lのアミノ酸D86~E254を含む。

【0017】

1つの実施形態では、可溶性CD137Lドメインのうちの少なくとも1つ、特に少なくとも可溶性CD137Lドメイン(i)はアミノ酸R88で開始するN末端配列を有する可溶性CD137Lドメインであり、R88はSer又はGlyで置き換えられていてもよい。1つの実施形態では、可溶性CD137Lドメインのうちの少なくとも1つ、特に少なくとも可溶性CD137Lドメイン(iii)は、V240で終止する、可溶性のC末端が短縮されたCD137Lドメインである。別の実施形態では、可溶性CD137Lドメインのうちの少なくとも1つ、特に少なくとも可溶性CD137Lドメイン(ii)は、T241で終止する、可溶性のC末端が短縮されたCD137Lドメインである。更に別の実施形態では、可溶性CD137Lドメインのうちの少なくとも1つ、特に少なくとも可溶性CD137Lドメイン(iii)は、E243で終止する、可溶性のC末端が短縮されたCD137Lドメインである。

1つの実施形態では、第1及び第2のペプチドリンカー(ii)及び(iv)は、独立に、グリコシル化されていてもよいアスパラギン残基を任意選択で含む、3~8個のアミノ酸の長さ、特に3、4、5、6、7又は8個のアミノ酸の長さを有し、好ましくは、グリシン/セリンリンカーである。1つの実施形態では、第1及び第2のペプチドリンカー(ii)及び(iv)は配列番号2のアミノ酸配列からなる。別の実施形態では、ポリペプチドは、例えば配列番号17のN末端シグナルペプチドドメインを更に含む、プロテアーゼ切断部位を含んでもよい、並びに/又は、認識/精製ドメイン、例えば配列番号18のセリンリンカーに結合されたStrep-tagを含み及び/若しくはこれに連結されていてもよいC末端要素を更に含む。

【0018】

1つの実施形態では、抗体Fc断片(vii)は、好ましくは配列番号16のヒンジリンカーを介して可溶性CD137Lドメイン(i)及び/又は(v)と融合している。別の実施形態では、抗体Fc断片(vii)は配列番号13又は14で示されるアミノ酸配列からなっている。

【0019】

1つの実施形態では、本発明の一本鎖融合ポリペプチドは配列番号15及び25~35からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。

【0020】

1つの実施形態では、本発明は配列番号27で示されるアミノ酸配列をそれぞれ有する2つの一本鎖融合ポリペプチドの二量体を含むCD137受容体アゴニストタンパク質を提供する。1つの実施形態では、2つのポリペプチドは、各ポリペプチドの484、490、及び493位のシステイン残基の間に形成された3つの鎖間ジスルフィド結合によって共有結合で連結されている。同様のシステイン残基は、配列番号28、29又は32の484位、490位及び493位、配列番号30の489位、495位及び498位、配列番号31の493位、499位及び502位、及び配列番号33又は34の487位、493位及び496位である。

【0021】

1つの実施形態では、配列番号27、28又は29の成熟ポリペプチドの158位及び318位のアスパラギン残基の1つ又は複数はNグリコシル化されている。別の実施形態では、ポリペプチドの158位及び318位のアスパラギン残基は両方ともNグリコシル化されている。同様のアスパラギン残基は配列番号30又は31の161位及び324位、並びに配列番号33又は34の159位及び320位である。

【0022】

10

20

30

40

50

別の実施形態では、ポリペプチドは更に翻訳後修飾されている。別の実施形態では、翻訳後修飾は第1の可溶性ドメイン(i)のD86QムテインのN末端グルタミンのピログルタメートへの修飾を含む。更に別の実施形態では、翻訳後修飾はQ89で開始する第1の可溶性ドメイン(i)のN末端グルタミンのピログルタメートへの修飾を含む。

【図面の簡単な説明】

【0023】

【図1】3つのCD137LドメインI、II、III、可溶性CD137Lドメインを含む一本鎖融合ポリペプチドのドメイン構造を示す図である。

【図2】CD137Lの一般構造を表す概略図である。細胞膜、細胞内に位置するN末端、1.受容体結合ドメイン(RBD)の逆平行折り畳み、2.RBDと細胞膜との界面、3.プロテアーゼ切断部位。

【図3】追加のFab抗体断片を含む一本鎖融合ポリペプチドを示す図である。

【図4】3つのジスルフィド架橋を介してC末端で融合した2つの一本鎖Fc融合ポリペプチドの二量体化を示す図である。

【図5】本発明の六価の一本鎖CD27受容体アゴニスト融合タンパク質の概略表現を示す図である。内部表面領域に存在するCH2糖鎖(5)は通常、「オープンFcコンフォメーション遷移」の間、CH2サブドメインをプロテアーゼから立体的に(2)遮蔽し、ヒンジ-鎖間ジスルフィド結合(4)は減少し、共有結合による鎖間リンケージは破壊される。これにより、CH2の解離と内部表面領域及び上側ヒンジのリジンK223(6)のプロテアーゼへの露出が可能になる。CH3ドメイン(3)の相互親和性が高いために、「オープンスター」における二量体会合は変化しないままである。(1)scCD27L-RBD; (2)CH2ドメイン; (3)CH3ドメイン; (4)ヒンジ-システイン(左側:酸化されてジスルフィド架橋に、右側:遊離チオールを有する還元ステージ); (5)N297位(EU番号付け)に結合したCH2糖鎖; (6)上側ヒンジリジン(K223)

【図6】CD137受容体アゴニストタンパク質(プロテインA)のその受容体への結合を評価するELISAである。

【図7】Tosoh TSKゲルG3000SWxlカラムを用いて1260 Infinity HPLCシステムで実施した、Strep-tagを結合したプロテインA(配列番号28)の分析用サイズ排除クロマトグラフィーを示す図である。カラムに全体積20µl、濃度1mg/mlでタンパク質をロードした。流量は0.5ml/分とした。プロテインAについて16.97分に単一の主ピークが観察される。試料の低分子量緩衝液成分はカラム体積の後に溶出する(>23.5分)。

【図8】非還元及び還元条件におけるプロテインAのSDS-PAGEの結果を示す図である。360ngのプロテインAを、非還元条件(レーン1)又は還元剤としてDTTを含む還元条件(レーン2)で4~12%のBis-Tris SDS-PAGEゲルにロードした。ゲルに130Vの電圧を15分、次いで180Vの電圧を60分かき、続いて銀染色プロトコルによって染色した。A及びBの主バンドの間に、約70~80kDaの分子量差が観察される。これはレーン1の主バンドで観察された分子量の約半分であるので、これはレーン2におけるホモ二量体がジスルフィド架橋によって共有結合で連結されていることを示している。レーン2の還元条件では結合は失われる。

【発明を実施するための形態】

【0024】

本発明は、2つのペプチドリンカーによって連結された少なくとも3つの可溶性CD137Lドメイン、並びにN末端及び/又はC末端に抗体から誘導された二量体化ドメインを含む一本鎖融合ポリペプチドを提供する。本発明者らは二量体化ドメインによる2つの一本鎖融合ポリペプチドの二量体化によって、高い生物学的活性及び良好な安定性を提供する六価のCD137受容体アゴニストが得られることを発見した。

【0025】

好ましくは、一本鎖融合ポリペプチドは非凝集性である。「非凝集性」という用語は、製剤のモノマー含量が50%以上、好ましくは70%以上、より好ましくは90%以上であることを意味する。モノマー含量の凝集物含量に対する比は、サイズ排除クロマトグラフィー(SEC)を用いて凝集物の生成量を検討することによって決定できる。凝集に関する安定性は、異なった保存条件下、例えば4又は25で定義した期間、例えば2~3日から数日、数

10

20

30

40

50

週間及び数か月後、SECによって決定できる。融合タンパク質については、実質的に非凝集性と分類するためには、「モノマー」含量が4又は25の保存で数日、例えば10日、より好ましくは数週間、例えば2、3又は4週間、最も好ましくは数か月、例えば2又は3か月の期間の後で、上で定義した通りであることが好ましい。Fc融合タンパク質の場合の「モノマー」の定義に関して、2つのポリペプチド鎖の会合がFc部分によって促進され、得られた会合タンパク質の機能性単位が2つの鎖からなっている。Fc融合タンパク質の場合には、二量体化一本鎖融合ポリペプチドであるか否かに関わらず、この単位が「モノマー」と定義される。

【0026】

一本鎖融合ポリペプチドは、そのN末端及び/又はC末端に位置するさらなるドメインを含んでよい。さらなる融合ドメインの例は、例えばプロテアーゼ切断部位を含んでもよいN末端シグナルペプチドドメイン又は認識/精製ドメインを含み及び/又はこれに連結されていてよいC末端要素である。好ましい実施形態によれば、融合ポリペプチドはリンカーを介して融合したStrep-tagをそのC末端に含む。短いセリンリンカーを含む例示的なStrep-tagを配列番号18に示す。

【0027】

本発明のCD137受容体アゴニストタンパク質は、CD137Lから誘導された3つの可溶性ドメインを含む。好ましくは、これらの可溶性ドメインはアレル多様体及び/又はその誘導体を含む哺乳類、特にヒトのCD137Lから誘導される。可溶性ドメインは、膜所在ドメインを含まない受容体結合ドメインを含むCD137Lの細胞外部分を含む。TNFスーパーファミリーの他のタンパク質と同様に、CD137Lは15~30アミノ酸のN末端部分、いわゆるストーク領域を介して膜に固定されている。ストーク領域は三量体化に寄与しており、細胞膜に対して一定の距離を提供している。しかし、ストーク領域はプロトマー界面に位置する受容体結合部位を有する三量体受容体結合ドメイン(RBD)の部分ではない。

【0028】

重要なことに、腫瘍壊死因子スーパーファミリーのRBDはそのN末端及びC末端アミノ酸の特定の局在化によって特徴付けられる。前記アミノ酸は三量体の軸に直接隣接し、そのごく近くに位置している。RBDの第1のN末端アミノ酸は、RBDのC末端領域と逆平行ベータストランドを形成している。したがって、上述のRBDの逆平行ベータストランドが細胞膜との界面を形成し、これがストーク領域のアミノ酸を介して細胞膜に連結され、その中に固定されている。ヒトCD137Lはストーク領域並びに、おそらくC末端延長(V240~E254)を含む。

【0029】

CD137受容体アゴニストタンパク質の可溶性CD137Lドメインは、ストーク領域からのアミノ酸を何ら含まないCD137Lの受容体結合ドメインを含むことが極めて好ましい。そうでなければ、次の可溶性ドメインのN末端ストーク領域を補償するために可溶性ドメインの1つのC末端を次の可溶性ドメインのN末端に連結する長いリンカーが必要になり、それによって不安定性及び/又は凝集物の形成が生じることになる。同じ理由で、CD137受容体アゴニストタンパク質の可溶性CD137LドメインはC末端延長からのアミノ酸を全く有しないCD137Lの受容体結合ドメインを含むことが極めて好ましい。

【0030】

そのような可溶性ドメインのさらなる利点は、RBDのN末端アミノ酸が抗薬剤抗体に接近できないことである。好ましくは、(i)第1の可溶性CD137Lドメイン、(ii)第1のペプチドリンカー、(iii)第2の可溶性CD137Lドメイン、(iv)第2のペプチドリンカー、(v)第3の可溶性CD137Lドメインからなる一本鎖融合ポリペプチドは、その天然の対応物の三量体構成を模倣する順序付けられた構造を形成することができ、それにより、それぞれのCD137L受容体のための少なくとも1つの機能性結合部位を含む。したがって、成分(i)~(v)を含む一本鎖融合ポリペプチドは、一本鎖CD137L受容体結合ドメイン(scCD137L-RBD)とも名付けられる。重要なことに、可溶性CD137Lドメイン(i)、(iii)及び(v)はリンカー(ii)及び(iv)によって提供される相互の共有結合によるリンケージで三量体化が強化されているので

10

20

30

40

50

、scCD137L-RBDはホモ三量体の野生型CD137L-RBDと比較して安定性が向上している。

【0031】

CD137受容体アゴニストタンパク質は、3つの機能性CD137受容体結合部位、即ちCD137受容体と複合体を形成し得るアミノ酸配列を含む。したがって、可溶性ドメインは対応するCD137受容体に結合することができる。1つの実施形態では、可溶性ドメインのうちの少なくとも1つは受容体を活性化することができ、それによりアポトーシス及び/又は増殖活性が影響される。さらなる実施形態では、可溶性ドメインの1つ又は複数が、受容体活性化能を有しないものとして選択される。

【0032】

可溶性CD137Lドメインは、配列番号1に示すように、ヒトCD137Lから誘導される。好ましくは、可溶性CD137LドメインはヒトCD137Lから誘導され、特にアミノ酸86、88、89又は90から出発して、特に配列番号1のアミノ酸86~254又は88~254又は89~254を含む。任意選択で、配列番号1のアミノ酸R88は、非荷電アミノ酸、例えばSer又はGlyで置き換えられていてもよく、又はグルタミンで置き換えられる。

【0033】

【表1】

Table 1: 野生型ヒトCD137Lタンパク質の配列

配列番号	配列
1	MEYASDASLDPEAPWPPAPRARACRVLPWALVAGLLLLLLLLAAACAVFLA CPWAVSGARASPGSAASPRLREGPELSPDDPAGLLDLRQGMFAQLVAQNV LLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELR RVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNNSAFGFQ GRLHLHSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVTPEIPAGLPS PRSE

【0034】

上に示したように、可溶性CD137Lドメインは配列番号1に示すように野生型配列を含んでもよい。しかし、これらの可溶性ドメインの1つ又は複数に変異、例えば可溶性ドメインの結合特性を変化させる(例えば増加させ又は減少させる)変異を導入することができることに注目されたい。1つの実施形態では、対応するサイトカイン受容体に結合できない可溶性ドメインを選択することができる。

【0035】

本発明のさらなる実施形態では、可溶性CD137Lドメイン(i)はCD137Lの変異体又はその受容体結合ドメインを含み、それにより親和性が低下し、及び/又はCD137受容体の活性化が低下する。

【0036】

受容体結合及び/又は活性に影響するCD137Lムテイン

変異体は当業者に公知の任意の手法で生成させることができる。本明細書に述べるように、置換はCD137L、例えばヒトCD137L(例えば配列番号1)、又はその受容体結合ドメインのうちの少なくとも1つのアミノ酸に影響することがある。これに関し、好ましい置換は配列番号1のヒトCD137Lの以下のアミノ酸、即ちL115、K127、R150、R193及びQ227のうちの少なくとも1つに影響する。

【0037】

別の好ましい実施形態では、C末端領域I243~E254は可溶性ドメイン(i)、(iii)又は(v)のうちの少なくとも1つから欠失している。

【0038】

アミノ酸置換はCD137L、例えばヒトCD137LのCD137結合又はCD137誘起シグナリングに対する結合及び/又は活性に影響することがある。CD137の結合及び/又は活性はプラスに、即ちより強く、より選択的に若しくはより特異的に、及び/又は受容体をより活性化させるように、影響されることがある。或いは、CD137の結合又は活性はマイナスに、即ちより弱く、より非選択的に若しくはより非特異的に結合に、及び/又は受容体があまり若しくは全く活性化されないように、影響されることがある。

したがって、1つの実施形態は本明細書に記載したCD137受容体アゴニストタンパク質であって、可溶性ドメインのうち少なくとも1つが野生型CD137Lよりも少なくCD137に結合し及び/又はこれを活性化するCD137Lの変異体又はその受容体結合ドメインを含む、CD137受容体アゴニストタンパク質である。

10

【0039】

安定性/可溶性が増大したCD137Lムテイン

本発明のさらなる実施形態では、可溶性CD137Lドメイン(i)、(iii)、及び(v)の1つ又は複数はCD137Lの変異体又はその受容体結合ドメインを含んでよく、それにより自己凝集性が低減し、及び/又はインピボ安定性が延長する。

【0040】

これに関し、好ましい置換はA174[D,N]及びA176[S,T]である。それぞれのCD137Lドメインの変異は同じであっても、異なってもよい。

本発明の一本鎖融合分子は3つの可溶性CD137Lドメイン、即ち成分(i)、(iii)及び(v)を含む。第2及び/又は第3の可溶性CD137Lドメインがアミノ酸配列の変異を含んでもよいN末端が短縮されたドメインである場合には、一本鎖CD137L融合ポリペプチドの凝集に対する安定性が増大する。したがって、好ましくは第2及び第3の可溶性CD137Lドメインの両方は、N末端領域に、好ましくは可溶性CD137LドメインのN末端の最初の5つのアミノ酸の中にアミノ酸配列変異を任意選択で含んでもよい、N末端が短縮されたドメインである。これらの変異は、中性アミノ酸、特にセリン又はグリシンによる塩基性アミノ酸の置き換えを含んでよい。

20

【0041】

これとは対照的に、第1の可溶性CD137Lドメインの選択はそれほど重要ではない。ここでは、全長のN末端配列を有する可溶性ドメインを用いてよい。しかし、第1の可溶性CD137LドメインもN末端が短縮され、任意選択で変異した配列を有してよいことに注目されたい。

30

【0042】

本発明の更に好ましい実施形態では、可溶性CD137Lドメイン(i)、(iii)及び(v)は可溶性ヒトCD137Lドメインである。第1の可溶性CD137Lドメイン(i)は、天然の、短縮された、及び/又は変異した配列から選択してよい。したがって、第1の可溶性CD137Lドメイン(i)はヒトCD137Lのアミノ酸D86又はR88から開始するN末端配列を有し、発現の間のピログルタメートの形成を可能にするためにR88は中性アミノ酸、例えばSer又はGly又はGlnによって置き換えられてもよい。第2及び第3の可溶性CD137Lドメイン(iii)及び(v)は、好ましくはヒトCD137L(配列番号1)のアミノ酸Q89又はG90から開始する、短縮されたN末端配列を有し、Q89は別のアミノ酸、例えばSer又はGlyで置き換えられてもよい。

40

【0043】

好ましくは、可溶性CD137Lドメイン(iii)及び(v)のN末端配列は、

(a)D86又はQ89

(b)(Gly/Ser)89

から選択される。

【0044】

可溶性CD137Lドメインは好ましくはヒトCD137Lのアミノ酸E254で終止する。ある実施形態では、CD137Lドメインは上記の内部変異を含んでよい。

【0045】

50

別の好ましい実施形態では、可溶性CD137Lドメインは好ましくはヒトCD137Lのアミノ酸V240で終止する。ある実施形態では、CD137Lドメインは上記の内部変異を含んでよい。

【0046】

CD137受容体アゴニスタンパク質の成分(ii)及び(iv)は、それぞれ成分(i)と(iii)の間、又は成分(iii)と(v)の間に位置するペプチドリンカー要素である。可撓性のリンカー要素は3~8アミノ酸の長さ、特に3、4、5、6、7、又は8アミノ酸の長さを有する。リンカー要素は好ましくはグリシン/セリンリンカーであり、即ちペプチドリンカーは実質的にアミノ酸グリシン及びセリンからなる。可溶性サイトカインドメインがS又はGで開始する(N末端)場合には、リンカーはこのS又はGの前で終止する。

【0047】

リンカー(ii)及びリンカー(iv)は同じ長さである必要はないことに注目されたい。免疫原性の可能性を低減させるために、短いリンカーを用いることが好ましい。更に、短いリンカーは凝集物を形成する傾向が低減した一本鎖分子をもたらすことが見出された。一方、本明細書に開示したものより実質的に長いリンカーは不都合な凝集特性を示すことがある。

【0048】

所望であれば、リンカーはグリコシル化部位Asn-Xaa-Serを形成するアスパラギン残基を含んでよい。ある実施形態では、リンカーの1つ、例えばリンカー(ii)又はリンカー(iv)は、グリコシル化部位を含む。他の実施形態では、両方のリンカー(iv)がグリコシル化部位を含む。CD137Lアゴニスタンパク質の可溶性を増大させるため、及び/又は免疫原性の可能性を低減させるため、リンカー(ii)若しくはリンカー(iv)、又はその両方がグリコシル化部位を含むことが好ましい。

【0049】

好ましいリンカー配列をTable 2(表2)に示す。好ましいリンカーはGSGSGNGS(配列番号2)である。

【0050】

【表2】

Table 2: リンカー配列の例

配列番号	配列
2	GSGSGNGS
3	GSGSGSGS
4	GGSGSGSG
5	GGSGSG
6	GGSG
7	GGSGNGSG
8	GGNGSGSG
9	GGNGSG
10	GSGSGS
11	GSGS
12	GSG

【0051】

CD137受容体アゴニスタンパク質は、第1のCD137Lドメイン(i)のN末端及び/又は第3のCD137Lドメイン(v)のC末端に位置する抗体Fc断片ドメインを更に含む。好ましくは、抗体Fc断片ドメインは、インビボでFcガンマR受容体と相互作用する能力が低減している。好ましくは、抗体Fc断片ドメインは、配列番号13又は14で示されるアミノ酸配列を含むか、これからなる(Table 3(表3)参照)。配列番号13は野生型ヒトIGG1-Fcと比較してN297S変異を有している。配列番号14はグリコシル化(N297野生型)ヒトIGG1-Fcムテインであり、FcガンマR結合能が低減している。

【0052】

【表3】

10

Table 3: Fc断片ドメインの例

配列番号	配列
13	PAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYSSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP IEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPGK
14	PAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPGK

20

【0053】

30

グリコシル化部位の数及びインビボ安定性

グリコシル化部位の総数及び三次元における糖鎖の個別の場所はCD137受容体アゴニスタンパク質のインビボ安定性に影響する。更に、糖鎖の認識は末端サッカライドの局所的密度、糖鎖ツリーの分枝、及び糖鎖の互いの相対的な場所に依存する。

更に、部分的に分解した糖鎖はレクチンによって促進される機構によってCD137受容体アゴニスタンパク質のインビボ半減期を低下させる。分子上のグリコシル化部位の総数を減少させることによって、得られる化合物ではこれらの機構が起こりにくくなり、半減期が増大する。

【0054】

40

Fcガンマ受容体に基づく結合を避けるために、FcドメインのCH2ドメイン糖鎖の除去が必要である。細胞上のFcRガンマ受容体はインビボで融合タンパク質の高度な架橋をもたらす、CD137受容体のスーパークラスターリングに基づく毒性をもたらす可能性がある。また、ADCCのようなFcによって促進される望ましくない機構が毒性事象をもたらすことがある。したがって、1つの実施形態では、本発明のCD137受容体アゴニスタンパク質上のグリコシル化部位の総数はCH2グリコシル化部位、特にNグリコシル化部位の除去によって減少し、それにより配列番号15(プロテインA)のN297S等価変異(EU番号付けシステムによる)を含むCD137受容体アゴニスタンパク質によって非グリコシル化CH2ドメインが生じる。

【0055】

CH2ドメイン不安定化は追加のヒンジシステインによって補償される

内部表面領域に存在するCH2-グリコシル化は通常、「オープンFcコンフォメーション遷

50

移」の間、サブドメインをプロテアーゼから遮蔽し、ヒンジ-鎖間ジスルフィド結合は減少し、共有結合による鎖間リンケージは破壊される。これにより、CH2の解離と内部表面領域のプロテアーゼへの露出が可能になる。配列番号15のN297S等価変異を有するFcドメインを含むCD137受容体アゴニストタンパク質(プロテインA)(EU番号付けシステムによる)は非グリコシル化CH2ドメインを生成し、したがってプロテアーゼ消化の対象となりやすく、野生型のCH2グリコシル化を有する等価構造よりも安定性が低い。これは、宿主細胞のプロテアーゼが存在し、長期にわたって構造に接近するUSP/DSP/保存の間の化合物の安定性に影響する。したがって、ある実施形態では、CD137受容体アゴニストはCH2グリコシル化部位を有しないが、各ポリペプチド鎖のリンカー配列(例えばGSGSGNGS、配列番号2)中のグリコシル化部位を含む。

10

本発明の好ましい実施形態によれば、抗体Fc断片ドメインはヒンジ-リンカー要素を介して融合している。ヒンジ-リンカー要素は10~30アミノ酸の長さ、特に15~25アミノ酸の長さ、例えば22アミノ酸の長さを有する。「ヒンジ-リンカー」という用語は、ヒンジ-リンカー要素がドメインに結合して生物学的に活性なコンフォメーションを保持することができるために十分な長さを有する任意のリンカーを含む。ヒンジ-リンカー要素は好ましくは本明細書において「Igヒンジ領域」と称する免疫グロブリンのヒンジ領域配列を含む。「Igヒンジ領域」という用語は、1つ又は複数のシステイン残基、例えばジスルフィド結合が免疫グロブリンの2つの重鎖を連結する2つのシステイン残基を含む、天然に産生するIgヒンジ領域配列の一部と配列同一性又は類似性を共有するアミノ酸配列を含む任意のポリペプチドを意味する。

20

【0056】

ヒンジ領域の誘導体及び類似体は変異によって得ることができる。本明細書で言及する誘導体又は類似体は、欠失、挿入、及び/又は置換に帰せられる1つ又は複数のアミノ酸配列の相違を有することを除いて野生型(又は天然に産生するタンパク質)の全長配列と配列同一性又は類似性を共有するアミノ酸配列を含むポリペプチドである。

【0057】

個別のCD137受容体アゴニストタンパク質におけるオープンFcコンフォメーションを有する分子の数は、ヒンジ領域に存在する鎖間ジスルフィド結合の数に依存する。したがって、1つの実施形態では、CH2グリコサイトの除去による影響を改善するために、第3のシステイン(EU番号付けシステムによるC225)を、本発明のCD137受容体アゴニストタンパク質のヒンジ領域に導入した。

30

【0058】

ヒンジ領域におけるリジンのグリシンへの変換により、タンパク質分解安定性が増大する。1つの実施形態では、本発明のCD137受容体アゴニストタンパク質は、上側ヒンジのリジン(EU番号付けシステムによるK223)のグリシンへの変異を更に含み、これによりこの部位におけるタンパク質分解プロセッシングが低減され、したがって融合タンパク質の全体としての安定性が向上する。ヒンジ領域内における上述の第3のシステイン(EU番号付けシステムによるC225)の導入と上述のリジンのグリシンへの変異(EU番号付けシステムによるK223G)を併せることによって、本発明のCD137受容体アゴニストタンパク質の全体としての安定化がもたらされる。

40

上述のシステイン(C225)及びリジンのグリシンへの変異(K223G)を含む特に好ましいヒンジ-リンカー要素は、配列番号16(Table 4(表4))で示されるアミノ酸配列を含み、又はこれからなる。

【0059】

CD137受容体アゴニストタンパク質はN末端シグナルペプチドドメインを更に含んでよく、それにより好適な宿主細胞中でのプロセッシング、例えば細胞外分泌が可能になる。好ましくは、N末端シグナルペプチドドメインはプロテアーゼ切断部位、例えばシグナルペプチダーゼ切断部位を含み、それにより発現の後又は発現の間に除去されて成熟したタンパク質が得られる。特に好ましいN末端シグナルペプチドドメインは配列番号17(Table 4(表4))で示されるアミノ酸配列を含む。

50

【 0 0 6 0 】

更に、CD137受容体アゴニスタンパク質は、認識/精製ドメイン、例えばFLAGドメイン、Strep-tag若しくはStrep-tag IIドメイン、及び/又はポリHisドメインを含み、又はこれに結合した、例えば1~50、好ましくは10~30アミノ酸の長さを有するC末端要素を更にも含んでもよい。好ましい実施形態によれば、融合ポリペプチドは配列番号18(Table 4(表4))に示す短いセリンリンカーを介してC末端に融合したStrep-tagを含む。

【 0 0 6 1 】

好ましいヒンジ-リンカー要素(配列番号16、19~24)、好ましいN末端シグナルペプチドドメイン(配列番号17)、及び好ましいセリンリンカー-Strep-tag(配列番号18)をTable 4(表4)に示す。

【 0 0 6 2 】

【表 4】

Table 4: 例示的なドメイン及びリンカー

配列番号	配列
16	GSSSSSSSSGSCDKTHTCPPC
17	METDTLLVFLVLLVWVPAGNG
18	SSSSSSAWSHPPQFEK
19	GSSSSSSSSGSCDKTHTCPPC
20	GSSSSSSGSCDKTHTCPPC
21	GSSSSSGSCDKTHTCPPC
22	GSSSGSCDKTHTCPPC
23	GSSSGSCDKTHTCPPCGS
24	GSSSGSCDKTHTCPPCGSGS

【 0 0 6 3 】

本発明の1つの実施形態では、融合ポリペプチドは配列番号2のペプチドリンカー要素によって融合された3つの可溶性CD137Lドメインを含む。3つの可溶性CD137Lドメイン(i)、(iii)、(v)の全ては配列番号1のヒトCD137Lのアミノ酸89~240からなる。得られるscCD137L-RBD配列モジュールをTable 5B(表6)の配列番号36に示す。

【 0 0 6 4 】

本発明の更に好ましい実施形態では、融合ポリペプチドは配列番号2のペプチドリンカー要素によって融合された3つの可溶性CD137Lドメインを含む。3つの可溶性CD137Lドメイン(i)、(iii)、(v)の全ては、第1のドメイン(i)にD86Q変異を有する配列番号1のヒトCD137Lのアミノ酸86~240からなる。得られるscCD137L-RBD配列モジュールをTable 5B(表6)の配列番号39に示す。

【 0 0 6 5 】

本発明の別の実施形態では、融合ポリペプチドは配列番号2のペプチドリンカー要素によって融合された3つの可溶性CD137Lドメインを含む。3つの可溶性CD137Lドメイン(i)、(iii)、(v)の全ては、配列番号1のヒトCD137Lのアミノ酸88~240からなる。得られるscCD137L-RBD配列モジュールをTable 5B(表6)の配列番号40に示す。

【 0 0 6 6 】

10

20

30

40

50

本発明の更に別の好ましい実施形態では、融合ポリペプチドは配列番号2のペプチドリンカー要素によって融合された3つの可溶性CD137Lドメインを含む。3つの可溶性CD137Lドメイン(i)、(iii)、(v)の全ては、第1のドメイン(i)にR88Q変異及びドメイン(iii)及び(v)にR88G変異を有する配列番号1のヒトCD137Lのアミノ酸88~240からなる。得られるscCD137L-RBD配列モジュールをTable 5B(表6)の配列番号41に示す。

【0067】

本発明の更に別の好ましい実施形態では、融合ポリペプチドは配列番号2のペプチドリンカー要素によって融合された3つの可溶性CD137Lドメインを含む。3つの可溶性CD137Lドメイン(i)、(iii)、(v)の全ては、第1のドメイン(i)にR88S変異及びドメイン(iii)及び(v)にR88G変異を有する配列番号1のヒトCD137Lのアミノ酸88~240からなる。得られるscCD137L-RBD配列モジュールをTable 5B(表6)の配列番号42に示す。

【0068】

本発明の更に別の好ましい実施形態では、融合ポリペプチドは配列番号2のペプチドリンカー要素によって融合された3つの可溶性CD137Lドメインを含む。3つの可溶性CD137Lドメイン(i)、(iii)、(v)の全ては、配列番号1のヒトCD137Lのアミノ酸89~240からなり、A174N及びA176S変異を含む。得られるscCD137L-RBD配列モジュールをTable 5B(表6)の配列番号43に示す。

【0069】

上述のscCD137L-RBDモジュール(配列番号36、39~43)はTable 2(表2)に記載したリンカー(配列番号2~12)を用いてN末端又はC末端のいずれかに追加のドメインを融合させた融合タンパク質を生成させるためによく適している。

【0070】

CD137L-Fcの好ましい構成

更に、融合ポリペプチドは、配列番号16のヒンジリンカーを介して可溶性CD137Lドメイン(v)にC末端で融合した配列番号13の抗体Fc断片ドメインを含む。発明者らは驚くべきことに、この特定の融合ポリペプチドが二価のアゴニスト抗CD137-mABと比較して改善された生物学的活性を提供し、223位にリジン及びCH2ドメインにN297S変異(EU番号付けによる)を含む融合タンパク質と比較して長期の安定性を有していることを見出した。

【0071】

本発明のCD137受容体アゴニストタンパク質の例示的な実施形態のアミノ酸配列は、配列番号27で示される。

更に、融合ポリペプチドは、例えば配列番号17のN末端シグナルペプチドドメインを含んでもよい。本発明のCD137受容体アゴニストタンパク質の特定の例を配列番号25に示す。

【0072】

別の好ましい実施形態によれば、融合ポリペプチドは配列番号18に示す短いセリンリンカーを介して本発明のポリペプチドに融合したC末端Strep-tagを更に含んでもよい。本発明のこの態様によれば、Fc断片は好ましくは配列番号13又は14に示すアミノ酸配列からなる。更に、Fc断片は、例えば配列番号13のアミノ酸1~127を含む短いFc断片からなってもよい。C末端Strep-tagを含む融合ポリペプチドの特に好ましい例を配列番号15に示す(プロテインA)。

【0073】

配列番号15、25、及び26に示す例示的なCD137受容体アゴニストタンパク質は、それぞれ各配列のアミノ酸1~20にN末端シグナルペプチドドメインを含む。それぞれの場合に、成熟タンパク質はアミノ酸21で開始する。本発明の成熟した例示的なCD137受容体アゴニストタンパク質(シグナルペプチドなし)は、配列番号27~35で示される。上記の例示的なCD137受容体アゴニストタンパク質をTable 5(表5)に示す。

【0074】

配列番号27で示されるCD137受容体アゴニストは、グリコシル化部位(CH2領域のEU番号付けシステムによるN297S変異が非グリコシル化CH2ドメインを提供する)の総数が減少し、ヒンジ領域における鎖間ジスルフィド結合の数が増加し、上部ヒンジのリジンのグリシ

10

20

30

40

50

ンへの変異(EU番号付けシステムによるK223G)が生じている。これらの変化により、分解の可能性及びCD137L受容体のスーパークラスタリング(付随する毒性を伴う)が減少する。

【0075】

配列番号30に示すCD137受容体アゴニストは配列番号36のscCD137L-RBDモジュール、配列番号21の第3のペプチドリンカー、及び(vii)配列番号13の抗体Fc断片を含む。

【0076】

配列番号31に示すCD137受容体アゴニストは配列番号39のscCD137L-RBDモジュール、配列番号16の第3のペプチドリンカー、及び(vii)配列番号13の抗体Fc断片を含む。

【0077】

配列番号32に示すCD137受容体アゴニストは配列番号40のscCD137L-RBDモジュール、配列番号16の第3のペプチドリンカー、及び(vii)配列番号13の抗体Fc断片を含む。

【0078】

配列番号33に示すCD137受容体アゴニストは配列番号41のscCD137L-RBDモジュール、配列番号16の第3のペプチドリンカー、及び(vii)配列番号13の抗体Fc断片を含む。

【0079】

配列番号34に示すCD137受容体アゴニストは配列番号42のscCD137L-RBDモジュール、配列番号16の第3のペプチドリンカー、及び(vii)配列番号13の抗体Fc断片を含む。

【0080】

【表 5 B】

	<p>KAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARN NSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVSGSGNGSQG MFAQLVAQNVLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQ ELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNNSAFGFQGRLL HLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVGSSSSSSSSSGSCDKTHTCPC PAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPR EPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>	10
<p>27 CD137L-wt +SEQ13 FC シグナルなし Strepなし グリコシル 化なし</p>	<p>QGMFAQLVAQNVLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFF QLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNNSAFGFQGR LLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVSGSGNGSQGMFAQLVAQN VLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGE GSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNNSAFGFQGRLLHLSAGQRLG VHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVSGSGNGSQGMFAQLVAQNVLIDGPLSWY SDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHL QPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARH AWQLTQGATVLGLFRVGSSSSSSSSSGSCDKTHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYSSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>	20
<p>28 脱グリコシ ル化Fc シグナルなし +Strep-tag</p>	<p>QGMFAQLVAQNVLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFF QLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNNSAFGFQGR LLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVSGSGNGSQGMFAQLVAQN VLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGE GSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNNSAFGFQGRLLHLSAGQRLG VHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVSGSGNGSQGMFAQLVAQNVLIDGPLSWY SDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHL QPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARH AWQLTQGATVLGLFRVGSSSSSSSSSGSCDKTHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYSSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGSSSSSSSAWSHPQFEK</p>	30

【表 5 C】

<p>29 グリコシル 化FC シグナルな し Strepなし</p>	<p>QGMFAQLVAQNVLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFF QLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGR LLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVSGSGNGSQGMFAQLVAQN VLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGE GSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLG VHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVSGSGNGSQGMFAQLVAQNVLIDGPLSWY SDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHL QPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARH AWQLTQGATVLGLFRVSGSSSSSSSGCDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVS LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>	<p>10</p>
<p>30 SEQ39+FC 13 リンカー21</p>	<p>QLRQGMFAQLVAQNVLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYY VFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGF QGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVSGSGNGSDLRQGMFA QLVAQNVLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELR RVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLS AGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVSGSGNGSDLRQGMFAQLVAQNVL LIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGS GSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVH LHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVSGSSSSSGCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYSSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>	<p>20</p>
<p>31</p>	<p>QLRQGMFAQLVAQNVLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYY VFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGF QGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVSGSGNGSDLRQGMFA QLVAQNVLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELR RVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLS AGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVSGSGNGSDLRQGMFAQLVAQNVL LIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGS GSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVH LHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVSGSSSSSSSGCDKTHTCPPCPAPELLGGPSV</p>	<p>40</p>

【表 5 E】

	<p>LGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVGS^gSGSNGSgQGMFAQLVAQNVLIDGPL SWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLA LHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEAR ARHAWQLTQGATVLGLFRVGS^sSSSSSSSSGSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPK PKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYSSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>	10
<p>35 (Seq27 追 加のグリコ ール部位あ り)</p>	<p>QGMFAQLVAQNVLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVAKAGVYYVFF QLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSANGSAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGR LLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVGS^gSGSNGSgQGMFAQLVAQN VLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGE GSGSVSLALHLQPLRSANGSAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLG VHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVGS^gSGSNGSgQGMFAQLVAQNVLIDGPLSWY SDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHL QPLRSANGSAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARH AWQLTQGATVLGLFRVGS^sSSSSSSSSGSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMI SRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYSSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>	20
		30

【 0 0 8 5 】

【表 6 A】

Table 5B: 例示的なscCD137L-RBDモジュール

36	<p>QGMFAQLVAQNVLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFF QLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGR LLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVSGSGNGSQGMFAQLVAQN VLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGE GSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLG VHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVSGSGNGSQGMFAQLVAQNVLIDGPLSWY SDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHL QPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARH AWQLTQGATVLGLFRV</p>	10
39	<p>QLRQGMFAQLVAQNVLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYY VFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGF QGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVSGSGNGSDLRQGMFA QLVAQNVLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELR RVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLS AGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVSGSGNGSDLRQGMFAQLVAQNVL LIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGS GSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVH LHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRV</p>	20
40	<p>RQGMFAQLVAQNVLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVF FQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQG RLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVSGSGNGSRQGMFAQLVA QNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVA GEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQR LGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVSGSGNGSRQGMFAQLVAQNVLIDGPL SWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLA LHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEAR ARHAWQLTQGATVLGLFRV</p>	30
41	<p>QQGMFAQLVAQNVLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVF FQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQG RLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVSGSGNGSQGMFAQLVA QNVLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVA GEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQR</p>	40

【表 6 B】

	LGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVSGSGNGSgQGMFAQLVAQNVLIDGPL SWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLA LHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEAR ARHAWQLTQGATVLGLFRV	
42	SQGMFAQLVAQNVLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFF FQLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGR RLLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVSGSGNGSgQGMFAQLVA QNVLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVA GEGSGSVSLALHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQR LGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVSGSGNGSgQGMFAQLVAQNVLIDGPL SWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLA LHLQPLRSAAGAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEAR ARHAWQLTQGATVLGLFRV	10
43	QGMFAQLVAQNVLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFF QLELRRVVAGEGSGSVSLALHLQPLRSANGSAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGR LLHLSAGQRLGVHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVSGSGNGSgQGMFAQLVAQN VLLIDGPLSWYSDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGE GSGSVSLALHLQPLRSANGSAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLG VHLHTEARARHAWQLTQGATVLGLFRVSGSGNGSgQGMFAQLVAQNVLIDGPLSWY SDPGLAGVSLTGGLSYKEDTKELVVAKAGVYYVFFQLELRRVVAGEGSGSVSLALHL QPLRSANGSAAALALTVDLPPASSEARNSAFGFQGRLLHLSAGQRLGVHLHTEARARH AWQLTQGATVLGLFRV	20 30

【0087】

本発明のさらなる態様は、本明細書に記載したCD137受容体アゴニストタンパク質をコードする核酸分子に関する。核酸分子はDNA分子、例えば二本鎖若しくは一本鎖DNA分子、又はRNA分子であってよい。核酸分子は、CD137受容体アゴニストタンパク質又はその前駆体、例えば好ましくはCD137受容体アゴニストタンパク質のN末端及び/又はC末端に位置する分泌又は精製のためのシグナル配列又は他の異種のアミノ酸部分を含んでもよいCD137受容体アゴニストタンパク質のプロ-又はプレ-プロフォームをコードする。異種アミノ酸部分は、プロテアーゼ切断部位、例えばファクター-X3、トロンピン又はIgAプロテアーゼ切断部位を介して第1及び/又は第2のドメインに連結されてもよい。本発明の核酸配列の特定の例を配列番号37としてTable 6(表7)に示す。この核酸分子は配列番号25の融合ポリペプチドをコードするオープンリーディングフレームを含む。

【0088】

10

20

30

40

【表 7 A】

Table 6: 例示的なCD137受容体アゴニストタンパク質の核酸配列

配列番号	配列
37	<p>AAGCTTTAGGGATAACAGGGTAATAGCCGCCACCATGGAGACTGACACCCTGCT GGTGTTCGTGCTGCTGGTCTGGGTGCCTGCAGGAAATGGACAGGGCATGTTTCGC TCAACTGGTTCGCACAGAACGTGCTGCTCATTGACGGTCCCCTGTCTTGGTACTC CGATCCAGGGTTGGCAGGAGTGTCTTGACAGGAGGGCTGTCTATAAGGAGGA TACCAAAGAGCTGGTGGTAGCAAAGGCTGGTGTGTATTACGTGTTCTTTCAGCT GGAGCTGCGCAGAGTCGTGCGAGGCCAAGGATCTGGTAGTGTGTCACTGGCACT GCACTTGCAGCCCCCTTCGGTCCGCTGCCGGGGCAGCAGCACTGGCCCTGACCGT CGATCTGCCACCCGCTTCTAGCGAGGCACGAACTCAGCCTTTGGGTTTCAGGG TCGCCTGCTGCACCTGAGCGCCGGACAGAGGCTGGGCGTTCATCTGCACACCGA GGCCAGAGCCAGACACGCTTGGCAGTTGACTCAGGGAGCTACGGTCCCTCGGTCT GTTTCGAGTAGGCAGCGGAAGCGGCAATGGCTCTCAGGGCATGTTTGCTCAGCT GGTAGCCCAGAACGTACTCCTGATCGATGGCCCTCTTTCATGGTACTCAGACCC CGGACTGGCCGGAGTTAGCCTTACAGGTGGGCTTAGTTATAAGGAGGACACAAA GGAATTGGTTGTGGCCAAAGCTGGCGTGTACTATGTGTTCTTCCAGCTTGAGCT CCGCAGAGTCGTGGCTGGGGAGGGCTCTGGCAGTGTGAGCCTTGCCCTTCATCT GCAACCTTTGCGGAGCGCAGCCGGCGCTGCTGCACTGGCCCTTACAGTGGATTT GCCACCCGCAAGTAGTGAAGCTCGCAATTCGCGATTTCGGTTTCCAGGGCCGCTCT GCTCCATCTTCTGCCGGTCAACGCTCTGGGAGTTCACCTCCACACTGAGGCTAG GGCCAGGCATGCTTGGCAGCTGACTCAAGGAGCCACTGTCTTGGGACTCTTTCG GGTAGGCTCCGGGTCTGGCAACGGCTCCAGGGGATGTTTGCCAACTGGTCGC CCAGAATGTCTGCTCATCGATGGTCTCTGAGCTGGTATTCGACCCCTGGACT GGCTGGTGTGAGCCTGACTGGCGGACTCTCCTACAAAGAGGACACCAAGGAACT GGTGGTGGCCAAAGCCGGGTGTACTACGTGTTCTTCCAGTTGGAAGTGC GGCG GGTTGTGGCTGGCGAGGGATCAGGTTCGGT TAGTCTGGCCCTGCACCTCCAGCC TCTGAGGTCTGCTGCTGGT GCCCGCTCTGGCCTTGACCGTCGACCTCCCACC CGCATCTTCCGAAGCCCGAAATTCAGCCTTCGGGTTCCAGGGCAGACTGCTGCA TCTGAGTCTGGACAGCGCCTTGGGGTTCATCTCCACACCGAAGCCAGGGCCCG ACATGCCTGGCAGCTCACACAAGGCGCAACCGTTTTGGGGCTCTTTCGTGTGgg atcctcgagTTCATCGTCCTCATCCGGCTCATGTGATAAGACCCACACCTGCC TCCCTGTCTGCCCTGAGCTGCTGGGCGGACCTTCTGTGTTCTGTTCCTGTTCCCCC CAAGCCTAAGGACACCCTGATGATCTCCAGGACCCCTGAGGTGACCTGTGTGGT</p>

10

20

30

40

【 0 0 8 9 】

【表 7 B】

	GGTGGACGTGTCTCACGAAGATCCCGAGGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGACGG CGTGGAGGTCCACAACGCCAAGACCAAGCCTAGGGAGGAGCAGTACAGCTCCAC CTACCGGGTGGTGTCTGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGATTGGCTGAACGGAAA GGAGTATAAGTGTAAGGTCTCCAACAAGGCCCTGCCTGCCCCATCGAGAAAAC CATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCTCGGGAGCCTCAGGTGTACACCCTGCCTCC TAGCAGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTGGTGAAGGG CTTCTACCCTTCCGATATCGCCGTGGAGTGGGAGTCTAATGGCCAGCCCGAGAA CAACTACAAGACCACCCCTCCTGTGCTGGACTCTGACGGCTCCTTCTTCCTGTA CTCCAAGCTGACCGTGGACAAGTCCAGATGGCAGCAGGGCAACGTGTTCTCCTG CTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAATCACTACACCCAGAAGTCCCTGTCTCT GAGTCCGGGCAAGTAATAggcgcgcc	10
--	---	----

【0090】

核酸分子は発現制御配列、例えば所望の宿主細胞中での核酸分子の発現を可能にする発現制御配列に作動可能に連結されてよい。核酸分子はベクター、例えばプラスミド、バクテリオファージ、ウイルスベクター、染色体統合ベクター等に位置してよい。好適な発現制御配列及びベクターの例は、例えばSambrookら(1989年)、Molecular Cloning, A Laboratory Manual、Cold Spring Harbor Press及びAusubelら(1989年)、Current Protocols in Molecular Biology、John Wiley & Sons又はそれらの最近の版に記載されている。

【0091】

本発明のCD137受容体アゴニストタンパク質をコードする核酸配列を発現するために種々の発現ベクター/宿主細胞系を用いることができる。好適な宿主細胞には、これだけに限らないが、細菌、例えば大腸菌(E.coli)等の原核細胞、酵母細胞等の真核宿主細胞、昆虫細胞、植物細胞若しくは動物細胞、好ましくは哺乳類細胞、及びより好ましくはヒト細胞が含まれる。更に、本発明は上記の核酸分子で形質変換された又はトランスフェクトされた非ヒト生命体に関する。そのようなトランスジェニック生命体は、同種組み換え等の公知の遺伝子伝達の方法によって作成することができる。

【0092】

本発明のさらなる態様は、全て本明細書に記載した少なくとも1つのCD137受容体アゴニストタンパク質、それをコードするそれぞれの核酸、又は形質転換された若しくはトランスフェクトされた細胞を活性薬剤として含む医薬組成物又は診断用組成物に関する。

【0093】

別の態様では、本発明は本明細書に開示するCD137受容体アゴニストタンパク質並びに1つ又は複数の薬学的に許容される担体、希釈剤、賦形剤及び/又はアジュバントを含む医薬組成物を提供する。別の態様では、本発明はCD137受容体アゴニストタンパク質をコードする核酸分子を提供する。別の実施形態では、本発明は核酸分子を含む発現ベクターを提供する。別の実施形態では、本発明は核酸分子を含む細胞を提供する。さらなる実施形態では、細胞は真核細胞である。別の実施形態では、細胞は哺乳類細胞である。別の実施形態では、細胞はチャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞である。他の実施形態では、細胞はCHO-DBX11、CHO-DG44、CHO-S、及びCHO-K1細胞からなる群から選択される。他の実施形態では、細胞はVero、BHK、HeLa、COS、MDCK、HEK-293、NIH-3T3、W138、BT483、Hs578T、HTB2、BT20、T47D、NS0、CRL7030、HsS78Bst、PER.C6、SP2/O-Ag14、及びハイブリドーマ細胞からなる群から選択される。

10

20

30

40

50

【0094】

別の態様では、本発明はCD137L関連疾患又は障害を有する対象を処置する方法を提供し、本方法は対象に有効量のCD137受容体アゴニスタンパク質を投与するステップを含む。1つの実施形態では、CD137受容体アゴニスタンパク質は単独で投与される。別の実施形態では、CD137受容体アゴニスタンパク質は第2の薬剤の投与の前、これと同時に、又はその後に投与される。別の実施形態では、疾患又は障害は腫瘍、感染症、炎症、代謝性疾患、自己免疫障害、退行性疾患、アポトーシス関連疾患、及び移植拒絶反応からなる群から選択される。1つの実施形態では、腫瘍は固形腫瘍である。1つの実施形態では、腫瘍は肉腫、食道がん、及び胃がんからなるがんの群から起こる。別の実施形態では、腫瘍はユーイング肉腫又は線維肉腫から起こる。別の実施形態では、腫瘍は非小細胞肺癌(NSCLC)、膵がん、結腸直腸がん、乳がん、卵巣がん、頭頸部がん、及び小細胞肺癌(SCLC)からなるがんの群から起こる。別の実施形態では、腫瘍はリンパ腫瘍である。1つの実施形態では、腫瘍は血液腫瘍である。別の実施形態では、腫瘍は非ホジキンリンパ腫、白血病、急性リンパ芽球性白血病(ALL)、急性骨髄性白血病(AML)、B細胞リンパ腫、パーキットリンパ腫、慢性骨髄球性白血病(CML)、慢性リンパ球性白血病(CLL)、又はヘアリー細胞白血病から起こる。別の実施形態では、自己免疫障害はリウマチ性疾患、関節性疾患、又はリウマトイド及び関節炎疾患である。さらなる実施形態では、疾患又は障害はリウマチ性関節炎である。別の実施形態では、退行性疾患は神経退行性疾患である。さらなる実施形態では、神経退行性疾患は多発性硬化症である。

10

【0095】

1つの実施形態では、第2の薬剤は化学療法剤、放射線薬剤、又は生物学的薬剤である。1つの実施形態では、第2の薬剤はツベリシブ、イブルチニブ、ナビトクラックス、及びベネトクラックスからなる群から選択される。別の実施形態では、第2の薬剤はアポトーシス薬剤である。1つの実施形態では、アポトーシスの第2の薬剤はボルテゾミブ、アザシジン、ダサチニブ、及びゲフィチニブからなる群から選択される。特定の実施形態では、本明細書に開示する医薬組成物は静脈内又は皮下投与によって患者に投与される。他の実施形態では、開示した医薬組成物は経口、非経口、筋肉内、関節内、気管支内、腹内、関節包内、軟骨内、空腔内、腔内、大脳内、脳室内、結腸内、頸管内、消化管内、肝内、心筋内、骨内、骨盤内、心膜内、腹腔内、胸膜内、前立腺内、肺内、直腸内、腎内、網膜内、髄腔内、滑液内、胸腔内、子宮内、膀胱内、ポータル、経腔、直腸、頬内、舌下腺、鼻内、又は経皮投与によって患者に投与される。

20

30

【0096】

1つの実施形態では、CD137受容体アゴニスタンパク質は単回ポータルとして投与される。別の実施形態では、CD137受容体アゴニスタンパク質はいくつかの分割用量で投与してよい。CD137受容体アゴニスタンパク質は約0.1~100mg/kgで投与することができる。1つの実施形態では、CD137受容体アゴニスタンパク質は約0.1~0.5、0.1~1、0.1~10、0.1~20、0.1~50、0.1~75、1~10、1~15、1~7.5、1.25~15、1.25~7.5、2.5~7.5、2.5~15、5~15、5~7.5、1~20、1~50、7~75、1~100、5~10、5~15、5~20、5~25、5~50、5~75、10~20、10~50、10~75及び10~100mg/kgからなる群から選択される用量で投与することができる。他の実施形態では、CD137受容体アゴニスタンパク質は約0.1~100mg/mlで医薬組成物中に存在する。1つの実施形態では、CD137受容体アゴニスタンパク質は約0.1~0.5、0.1~1、0.1~10、0.1~20、0.1~50、0.1~75、1~10、1~20、1~50、1~75、1~100、5~10、5~15、5~20、5~25、5~50、5~75、10~20、10~50、10~75、又は10~100mg/mlからなる群から選択される量で医薬組成物中に存在する。他の実施形態では、治療有効量のCD137受容体アゴニスタンパク質が対象に投与される。別の実施形態では、予防有効量のCD137受容体アゴニスタンパク質が対象に投与される。

40

【0097】

本明細書において用いる「CD137L関連疾患又は障害」という用語は、有効量のCD137受容体アゴニストを、それを必要とする対象に投与することによって改善される任意の疾患

50

又は障害である。全て本明細書に記載した少なくとも1つのCD137受容体アゴニストタンパク質、それをコードするそれぞれの核酸、又は形質転換された若しくはトランスフェクトされた細胞は、治療、例えばCD137Lの機能不全によって引き起こされる、これに関連する、及び/又はこれに付随する障害、特に腫瘍等の増殖性障害、例えば固形又はリンパ腫瘍、感染症、炎症、代謝性疾患、自己免疫障害、例えばリウマトイド及び/又は関節炎疾患、退行性疾患、例えば多発性硬化症等の神経退行性疾患、アポトーシス関連疾患又は移植拒絶反応の予防及び/又は処置において用いられる。

【0098】

本明細書において用いる「CD137Lの機能不全」という用語は、CD137Lの正常な機能又は発現から逸脱したCD137Lの任意の機能又は発現、例えばCD137Lの正常な生理学的発現レベルと比較したCD137L遺伝子又はタンパク質の過発現、CD137L遺伝子又はタンパク質の低減した又は破壊された発現、CD137Lの正常な生理学的活性又は結合と比較したCD137Lの増加した活性、CD137Lの低減した又は破壊された活性、任意の結合パートナー、例えば受容体、特にCD137L受容体若しくは別のサイトカイン分子に対するCD137Lの増加した結合、任意の結合パートナー、例えば受容体、特にCD137L受容体若しくは別のサイトカイン分子に対する減少した又は破壊された結合として理解されたい。

10

【0099】

種々の実施形態では、CD137受容体を標的とすることによって診断及び/又は処置することができる障害に罹患したヒト対象を診断及び/又は処置する方法が提供され、本方法は本明細書に開示したCD137受容体アゴニストタンパク質をヒト対象に投与するステップを含み、それによりヒト対象における標的(単数又は複数)の活性に対する効果はアゴニスト性であり、1つ又は複数の症状が改善され、及び/又は処置が達成される。本明細書で提供されるCD137受容体アゴニストタンパク質は、乳腺、結腸、直腸、肺(例えば小細胞肺癌「SCLC」及び非小細胞肺癌「NSCLC」)、中咽頭、下咽頭、食道、胃、膵、肝、胆嚢及び胆管、小腸、尿路(腎、膀胱及び尿路上皮等)、女性生殖器官(頸管、子宮、及び卵巣、並びに絨毛腫及び妊娠性絨毛性疾患等)、男性生殖器官(前立腺、精嚢、精巣及び生殖細胞腫瘍等)、内分泌腺(甲状腺、副腎、及び下垂体)、及び皮膚の癌腫、並びに血管腫、黒色腫、肉腫(骨及び軟組織から生じるもの並びにカポジ肉腫を含む)、脳腫瘍、神経、眼、及び髄膜(星状細胞腫、神経膠腫、膠芽腫、網膜芽腫、神経腫、神経芽腫、神経鞘腫、及び髄膜腫を含む)、造血器悪性疾患から生じる腫瘍、急性白血病、急性リンパ芽球性白血病(AL) 30

20

30

【0100】

本明細書に開示したCD137受容体アゴニストタンパク質及び薬学的に許容される担体を含む医薬組成物が提供される。いくつかの実施形態では、医薬組成物は障害を処置するための少なくとも1つの追加的な治療薬剤を含む。例えば、追加的な薬剤は治療剤、化学療法剤、造影剤、細胞毒性剤、血管新生阻害剤、キナーゼ阻害剤(これだけに限らないが、KDR及びTIE-2阻害剤を含む)、共刺激分子モジュレーター又は免疫チェックポイント阻害剤(これだけに限らないが、抗B7.1、抗B7.2、抗B7.3、抗B7.4、抗CD28、抗B7RP1、CTLA4-Ig、抗CTLA-4、抗PD-1、抗PD-L1、抗PD-L2、抗ICOS、抗LAG-3、抗Tim-3、抗VISTA、抗HVEM、抗BTLA、LIGHT融合タンパク質、抗CD137、抗CD137L、抗OX40、抗OX40L、抗CD70、抗CD27、抗CD27L、抗GAL9、抗A2AR、抗KIR、抗IDO-1、抗CD20を含む)、樹状細胞/抗原提示細胞モジュレーター(これだけに限らないが、抗CD40抗体、抗CD40L、抗DC-SIGN、抗Dectin-1、抗CD301、抗CD303、抗CD123、抗CD207、抗DNGR1、抗CD205、抗DCIR、抗CD206、抗ILT7を含む)、ToII様受容体のモジュレーター(これだけに限らないが、抗TLR-1、抗TLR-2、抗TLR-3、抗TLR-4、抗TLR-4、抗TLR-5、抗TLR-6、抗TLR-7、抗TLR-8、抗TLR-9を含む)、接

40

50

着分子ブロッカー(これだけに限らないが、抗LFA-1抗体、抗E/L選択抗体、小分子阻害剤を含む)、抗サイトカイン抗体又はその機能性断片(これだけに限らないが、抗IL-18、抗TNF、又は抗IL-6/サイトカイン受容体抗体を含む)、二重特異性再指向T細胞又はNK細胞の細胞毒性(これだけに限らないが、BiTE(登録商標)を含む)、キメラT細胞受容体(CAR-T)に基づく治療、T細胞受容体(TCR)に基づく治療、治療用がんワクチン、メトトレキサート、シクロスポリン、ラパマイシン、FK506、検出可能なラベル又はレポーター、TNFアンタゴニスト、抗リウマチ剤、筋弛緩剤、麻酔剤、非ステロイド抗炎症剤(NSAID)、鎮痛剤、麻酔剤、鎮静剤、局所麻酔剤、神経筋ブロッカー、抗微生物剤、乾癬治療剤、コルチコステロイド、タンパク同化ステロイド、エリスロポエチン、免疫付与剤、免疫グロブリン、免疫抑制剤、成長ホルモン、ホルモン補充薬剤、放射性医薬品、抗うつ剤、抗精神病薬、興奮剤、喘息薬、ベータアゴニスト、吸入ステロイド、エピネフリン又はアナログ、サイトカイン、又はサイトカインアンタゴニストであってよい。

10

【0101】

ある実施形態では、がんを処置する方法において、又は本明細書に記載した腫瘍からの転移の予防若しくは阻止において、CD137受容体アゴニストタンパク質は単独で、又は1つ又は複数の追加的な薬剤、例えば化学療法剤、放射線薬剤、又は生物学的薬剤と組み合わせて用いることができる。いくつかの実施形態では、薬剤には以下の、13-シス-レチノイン酸、2-CdA、2-クロロデオキシアデノシン、5-アザシチジン、5-フルオロウラシル、5-FU、6-メルカプトプリン、6-MP、6-TG、6-チオグアニン、アブラキサン、アキュテーン(登録商標)、アクチノマイシン-D、アドリアマイシン(登録商標)、アドルシル(登録商標)、アフィニトル(登録商標)、アグリリン(登録商標)、アラコート(登録商標)、アルデスロイキン、アレムツズマブ、ALIMTA、アリトレチノイン、アルカバン-AQ(登録商標)、アルケラン(登録商標)、全トランスレチノイン酸、アルファインターフェロン、アルトレタミン、アメトプテリン、アミフォスチン、アミノグルテチミド、アナグレリド、アナンドロン(登録商標)、アナストロゾール、アラビノシルシトシン、アラ-Cアラネスブ(登録商標)、アレディア(登録商標)、アリミデックス(登録商標)、アロマシン(登録商標)、アラノン(登録商標)、三酸化ヒ素、アルゼラ(商標)、アスパラギナーゼ、ATRA、アバスチン(登録商標)、アザシチジン、BCG、BCNU、ベンダムスチン、ベバシズマブ、ベキサロテン、BEXXAR(登録商標)、ピカルタミド、BiCNU、プレノキササン(登録商標)、プレオマイシン、ボルテゾミブ、ブスルファン、ブスルフェックス(登録商標)、C225、カルシウムロイコポリン、カムパス(登録商標)、カムプトサル(登録商標)、カムプトテシン-11、カペシタピンカラク(商標)、カルボプラチン、カルムスチン、カルムスチンウエーファ、カゾデックス(登録商標)、CC-5013、CC1-779、CCNU、CDDP、CeeNU、セルビジン(登録商標)、セツキシマブ、クロラムブシル、シスプラチン、シトロボラムファクター、クラドリピン、コーチゾン、コスメゲン(登録商標)、CPT-11、シクロホスファミド、シタドレン(登録商標)、シタラピン、シタラピンリポソーマル、シトサル-U(登録商標)、シトキササン(登録商標)、ダカルバジン、ダコゲン、ダクチノマイシン、ダルベポエチンアルファ、ダサチニブ、ダウノマイシン、ダウノルピシン、ダウノルピシン塩酸、ダウノルピシンリポソーマル、ダウノキソーム(登録商標)、デカドロン、デシタピン、デルタ-コルテフ(登録商標)、デルタゾン(登録商標)、デニロイキン、ディフティトックス、デポシト(商標)、デキサメタゾン、デキサメタゾンアセテート、デキサメタゾンリン酸ナトリウム、デキサゾン、デキストラゾキササン、DHAD、DIC、ディオデックス、ドセタキセル、ドキシル(登録商標)、ドキシソルピシン、ドキシソルピシンリポソーマル、ドロキシシア(商標)、DTIC、DTIC-ドーム(登録商標)、デュラロン(登録商標)、ツベリシブ、エフデックス(登録商標)、エリガード(商標)、エレンス(商標)、エロキサチン(商標)、エルスパル(登録商標)、エムシト(登録商標)、エビルピシン、エポエチンアルファ、エルピツクス、エルロチニブ、エルウィナル-アスパラギナーゼ、エストラムスチン、エチオールエトポホス(登録商標)、エトポシド、エトポシドリン酸塩、ユーレキシサン(登録商標)、エベロリムス、エビスタ(登録商標)、エキセメスタン、ファレストン(登録商標)、ファスロデックス(登録商標)、フェマラ(登録商標)、フィルグラスチム、フロクスウリジン、フルダラ(登録商標)、フルダラピン、フルオロブレ

20

30

40

50

ックス(登録商標)、フルオロウラシル、フルオロウラシル(クリーム)、フルオキシメステ
 ロン、フルタミド、フォリン酸、FUDR(登録商標)、フルベストラント、ゲフィニチブ、ゲ
 ムシタピン、ゲムツズマブオゾガマイシン、ゲムザール、グリーベック(商標)、グリアデ
 ル(登録商標)ウェーファ、GM-CSF、ゴセレリン、顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)、顆粒
 球マクロファージコロニー刺激因子(G-MCSF)、ハロテスチン(登録商標)、ハーセプチン(
 登録商標)、ヘキサドロール、ヘキサレン(登録商標)、ヘキサメチルメラミン、HMM、ヒカ
 ムチン(登録商標)、ヒドレア(登録商標)、ヒドロコートアセテート(登録商標)、ヒドロコ
 ーチゾン、ヒドロコーチゾンリン酸ナトリウム、ヒドロコーチゾンコハク酸ナトリウム、
 ヒドロコートンリン酸、ヒドロキシ尿素、イブルチニブ、イブリツモマブ、イブリツモマ
 ブチウキセタン、イダマイシン(登録商標)、イダルビ
 シンイフェックス(登録商標)、インターフェロンアルファ、インターフェロンアルファ-2
 b(PEGコンジュゲート)、イフォスファミド、インターロイキン-11(IL-11)、インターロイ
 キン-2(IL-2)、イマチニブメシレート、イミダゾールカルボキサミド、イントロンA(登録
 商標)、イピリムマブ、イレッサ(登録商標)、イリノテカン、イソトレチノイン、イキサ
 ベピロン、イキセムプラ(商標)、KADCYCLA(登録商標)、キドロラーゼ(t)ラナコート(登録
 商標)、ラパチニブ、L-アスパラギナーゼ、LCR、レナリドミド、レトロゾール、ロイコボ
 リン、ロイケラン、ロイキン(商標)、ロイプロリド、ロイコクリスチン、ロイスタチン(
 商標)、リリルマブ、リポソーマルAra-C、リキッドブレッド(登録商標)、ロムスチン、L-
 PAM、L-ザルコリシン、ルブロン(登録商標)、ルブロンデポ(登録商標)、マツラン(登録商
 標)、マキシデックス、メクロレタミン、メクロレタミン塩酸、メドラロン(登録商標)、
 メドロール(登録商標)、メガス(登録商標)、メゲストロール、メゲストロール酢酸、MEK
 阻害剤、メルファラン、メルカプトプリン、メスナ、メスネックス(商標)、メソトレキセ
 ート、メソトレキセートナトリウム、メチルプレドニソロン、メチコルテン(登録商標)、
 マイトマイシン、マイトマイシン-C、ミトキサントロンM-プレドニソール(登録商標)、MT
 C、MTX、ムスタルゲン(登録商標)、ムスチン、ムタマイシン(登録商標)、ミレラン(登録
 商標)、ミロセル(商標)、ミロタルグ(登録商標)、ナビトクラックス、ナベルピン(登録商
 標)、ネララピン、ネオサル(登録商標)、ニューラスト(商標)、ニューメガ(登録商標)、
 ニューポゲン(登録商標)、ネキサバル(登録商標)、ニランドロン(登録商標)、ニロチニブ
 、ニルタミド、ニペント(登録商標)、ナイトロジェンマスタードノバルデックス(登録商
 標)、ニボルマブ、ノバントロン(登録商標)、エヌプレート、オクトレオチド、オクトレ
 オチド酢酸、オフアツムマブ、オンコスバル(登録商標)、オンコピン(登録商標)、オンタ
 ック(登録商標)、オンキサル(商標)、オブレレルベキン、オラブレッド(登録商標)、オラソ
 ン(登録商標)、オキサリプラチン、パクリタキセル、パクリタキセルタンパク質結合、パ
 ミドロナート、パニツムマブ、パントレチン(登録商標)、パラプラチン(登録商標)、パゾ
 パニブ、ペディアブレッド(登録商標)、PEGインターフェロン、ペガスバルガーゼ、ペグ
 フィルグラスチム、PEG-INTRON(商標)、PEG-L-アスパラギナーゼ、PEMETREXED、ペムプロ
 リズマブ、ペントスタチン、ペルツズマブ、フェニルアラニンマスタード、ピジリズマブ
 、プラチノール(登録商標)、プラチノール-AQ(登録商標)、プレドニソロン、プレドニソ
 ン、プレロン(登録商標)、プロカルバジン、PROCRIT(登録商標)、プロロイキン(登録商標
)、カルムスチンインプラントを伴うプロリフェブロスパン20、プリネトール(登録商標)
 、BRAF阻害剤、ラロキシフェン、レプリミド(登録商標)、リユーマトレックス(登録商標)
 、リツキサン(登録商標)、リツキシマブ、ロフェロン-A(登録商標)、ロミプロスチム、ル
 ベックス(登録商標)、ルビドマイシン塩酸、サンドスタチン(登録商標)、サンドスタチン
 LAR(登録商標)、サルグラモスチム、ソル-コルテフ(登録商標)、ソル-メドロール(登録商
 標)、ソレフェニブ、SPRYCEL(商標)、STI-571、STIVAGRA(商標)、ストレプトゾシン、SU1
 1248、スニチニブ、スーテント(登録商標)、タモキシフェンタルセバ(登録商標)、タルグ
 レチン(登録商標)、タシグナ(登録商標)、タキソール(登録商標)、タキソテレ(登録商標)
 、テモダル(登録商標)、テモゾロミドテムシロリムス、テニボシド、TESPA、サリドマイ
 ド、サロミド(登録商標)、テラシス(登録商標)、チオグアニン、チオグアニンタブロイド
 (登録商標)、チオホスホアミド、チオブレックス(登録商標)、チオテバ、TICE(登録商標)

10

20

30

40

50

、トボサル(登録商標)、トポテカン、トレミフェン、トリセル(登録商標)、トシツモマブ、トラスツズマブ、トリアンダ(登録商標)、トレメリムマブ、トレチノイン、トレキサール(商標)、トリセノックス(登録商標)、TSPA、TYKERB(登録商標)、ウレルマブ、VCR、ベクチピックス(商標)、ベルバン(登録商標)、ベルカード(登録商標)、ベネトクラックス、Ve Pesid(登録商標)、ベサノイド(登録商標)、ピアジュール(商標)、ビダザ(登録商標)、ピンブラスチン、ピンブラスチン硫酸、ピンカサルPfs(登録商標)、ピンクリスチン、ピノレルピン、ピノレルピン酒石酸、VLB、VM-26、ポリノスタット、ポトリエント、VP-16、ブモン(登録商標)、キセロダ(登録商標)、ザノサル(登録商標)、ゼパリン(商標)、ジネカード(登録商標)、ゾラデックス(登録商標)、ゾレドロン酸、ゾリンザ、若しくはゾメタ(登録商標)、及び/又は同様の経路を標的とし、本明細書に特に挙げていない他の任意の薬剤が含まれ得る。

10

【0102】

組み合わせられた治療計画の一部として2つ以上の物質又は成分を用いる場合は、これらは同じ投与経路を介して又は異なった投与経路を介して、実質的に同時に又は別の時に(例えば実質的に同時に、継続して、又は交互の計画に従って)投与することができる。物質又は成分が同じ投与経路を介して同時に投与される場合には、当業者には明らかなように、これらは異なった医薬品製剤若しくは組成物として、又は組み合わせられた医薬品製剤若しくは組成物の一部として、投与してよい。

【0103】

また、組み合わせられた治療計画の一部として2つ以上の活性物質又は成分を用いる場合には、物質又は成分のそれぞれを、その化合物又は成分をそのまま用いるのと同じ量で、同じ計画に従って投与してよく、そのような併用は相乗効果をもたらすことも、もたらさないこともある。しかし、2つ以上の活性物質又は成分の併用によって相乗効果が得られる場合には、投与すべき物質又は成分の1つ、2つ以上、又は全ての量を減少させ、しかも所望の治療作用を得ることも可能である。これは、例えば1つ以上の物質又は成分をその通常の量で用いた場合にその使用に伴う望ましくない副作用を避け、制限し、又は低減させ、しかも所望の薬学的又は治療的効果を得るために有用である。

20

【0104】

本出願に従って用いる治療計画の効果は、臨床医には明らかなように、関連する疾患又は障害についてそれ自体、公知の任意の様式で、決定し、及び/又は追跡することができる。臨床医は、適切にかつケースバイケースで、特定の治療計画を変更し又は改変することによって、所望の治療効果を達成し、望ましくない副作用を避け、制限し、又は低減させ、及び/又は一方で所望の治療効果を達成することと他方で望ましくない副作用を避け、制限し、又は低減させることとのバランスを達成することができる。

30

【0105】

一般に、治療計画は所望の治療効果が達成されるまで、及び/又は所望の治療効果が維持されている間、実行されることになる。この場合も、この期間は臨床医によって決定され得る。

【0106】

種々の実施形態では、1つ又は複数のCD137受容体アゴニストタンパク質を含む医薬組成物が単独で、又は予防薬、治療薬、及び/若しくは薬学的に許容される担体と組み合わせ、本明細書に提供される。種々の実施形態では、本明細書に開示する医薬組成物の使用の非限定的な例には、障害の診断、検出、及び/又はモニタリング、障害若しくはその1つ又は複数の症状の予防、治療、処置、及び/又は改善、並びに/又は研究が含まれる。医薬組成物の単独の、又は予防薬、治療薬、及び/若しくは薬学的に許容される担体と組み合わせた製剤は当業者には公知である(米国特許公開第20090311253A1号)。

40

【0107】

本明細書で用いる「有効量」という語句は、CD137Lの機能不全に関連する又はCD137L関連疾患又は障害に関連する1つ又は複数のパラメーターにおける検出可能な(例えばベースラインから少なくとも約5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%

50

、65%、70%、75%、又はそれを超える)改善をもたらすCD137Lアゴニストタンパク質の量を意味する。

【0108】

本明細書で提供する治療薬を投与方法には、これだけに限らないが、経口投与、非経口投与(例えば皮内、筋肉内、腹腔内、静脈内及び皮下)、硬膜外投与、腫瘍内投与、粘膜投与(例えば鼻内及び経口経路)、及び肺内投与(例えば吸入器又は噴霧器を用いて投与するエアロゾル化合物)が含まれる。特定の投与経路のための医薬組成物の製剤並びに種々の投与方法のために必要な材料及び手技は利用可能であり、当業者には公知である(米国特許公開第20090311253A1号)。

【0109】

種々の実施形態では、投与計画は最適の所望の応答(例えば治療応答又は予防応答)が得られるように調節される。例えば、単回ボラスを投与してもよく、経時的にいくつかの分割用量を投与してもよく、又は治療状況の要求による指示を受けて用量を比例的に減少させ又は増加させてもよい。いくつかの実施形態では、投与を容易にし、用量を均一にするために、非経口組成物を用量単位形態に製剤化してもよい。「用量単位形態」という用語は、処置すべき哺乳類対象のための単位用量として適した物理的に分離された単位を意味し、各単位は必要な薬学的担体に関連する所望の治療効果を得るために算出された所定量の活性化化合物を含む。

本明細書で提供するCD137受容体アゴニストタンパク質の治療又は予防有効量の例示的で非限定的な範囲は、約0.1~100mg/kg(例えば約0.1~0.5、0.1~1、0.1~10、0.1~20、0.1~50、0.1~75、1~10、1~15、1~7.5、1.25~15、1.25~7.5、2.5~7.5、2.5~15、5~15、5~7.5、1~20、1~50、7~75、1~100、5~10、5~15、5~20、5~25、5~50、5~75、10~20、10~50、10~75若しくは10~100mg/kg、又はその間の任意の濃度)である。いくつかの実施形態では、CD137受容体アゴニストタンパク質は医薬組成物中に治療有効濃度で、例えば約0.1~100mg/mlの濃度(例えば約0.1~0.5、0.1~1、0.1~10、0.1~20、0.1~50、0.1~75、1~10、1~20、1~50、1~75、1~100、5~10、5~15、5~20、5~25、5~50、5~75、10~20、10~50、10~75若しくは10~100mg/ml、又はその間の任意の濃度)で存在する。用量値は緩和すべき病状の型及び/又は重篤度によって変動することに注目されたい。いかなる特定の対象に対しても、特定の用量計画は個別の必要性及び/又は組成物を投与する者若しくは投与を監督する者の専門的判断によって時とともに調節できること、並びに本明細書で説明する用量範囲は例示的のみであって特許を請求する組成物の範囲又は実施を限定することを意図していないことを更に理解されたい。

【実施例】

【0110】

1.1 ポリペプチド構造

A) アミノ酸Met1~Gly20

Igカップシグナルペプチド、アミノ酸Gly20の後の推定されるシグナルペプチダーゼ切断部位

B) アミノ酸Gln21~Val172

ヒトCD137Lリガンドの第1の可溶性サイトカインドメイン(CD137L、配列番号1のアミノ酸89~240)

C) アミノ酸Gly173~Ser180

配列番号2の第1のペプチドリンカー要素

D) アミノ酸Gln181~Val332

ヒトCD137Lリガンドの第2の可溶性サイトカインドメイン(CD137L、配列番号1のアミノ酸89~240)

E) アミノ酸Gly333~Ser340

配列番号2の第2のペプチドリンカー要素

F) アミノ酸Gln341~Val492

ヒトCD137Lリガンドの第3の可溶性サイトカインドメイン(CD137L、配列番号1のアミノ酸89~240)

9 ~ 240)

G) アミノ酸Gly493 ~ Cys513

配列番号16のヒンジリンカー要素

H) アミノ酸Pro514 ~ Lys731

配列番号13の抗体Fc断片ドメイン

【0111】

上記のCD137受容体アゴニストタンパク質を配列番号25に示す。

【0112】

示されたリンカーを、例えば配列番号3~12に示すように、他の好ましいリンカーで置き換えてもよい。

【0113】

示されたヒンジリンカー要素を、例えば配列番号19~24に示すように、他の好ましいヒンジリンカーで置き換えてもよい。

【0114】

第1及び第2のペプチドリンカーは同一でなくてもよいことに注目されたい。

【0115】

シグナルペプチド配列(A)は、他の任意の好適な、例えば哺乳類のシグナルペプチド配列で置き換えてもよい。

【0116】

1.2 ポリペプチドをコードする遺伝子カセット

合成遺伝子は好適な宿主細胞、例えば昆虫細胞又は哺乳類細胞における発現のためのコドンの使用に鑑みて最適化される。好ましい核酸配列を配列番号37に示す。

【0117】

(実施例2)

発現及び精製

2.1 融合ポリペプチドのクローニング、発現及び精製

上述の融合タンパク質は、下記の方法によって異なった真核宿主細胞内で組み換えにより発現される。

【0118】

CD137受容体アゴニスト融合タンパク質の小スケール発現の方法

上述のCD137受容体アゴニスト融合タンパク質の小スケールの解析のため、10%のFBS、100units/mlのペニシリン及び100[mu]g/mlのストレプトマイシンを補ったDMEM+GlutaMAX(Gibco)中で増殖させたHek293細胞に、融合ポリペプチドのための発現カセット及び好適な選択マーカー、例えばプラスチジン、プロマイシン又はヒグロマイシン耐性遺伝子を含む機能性発現カセットを含むプラスミドを一時的にトランスフェクトする。これらの例では、最終生成物を得るために複数のポリペプチド鎖が必要な場合には、トランスフェクションの間、発現カセットは1つのプラスミドに結合するか、異なったプラスミドの上に位置することになる。トランスフェクションの3日後に組み換え融合ポリペプチドを含む細胞培養上清が回収され、300Xでの遠心で清澄化され、続いて0.22 μmの無菌フィルターで濾過される。

【0119】

CD137受容体アゴニスト融合タンパク質の大スケール発現及び精製の方法

CD137受容体アゴニスト融合タンパク質の大スケール発現のため、上述のタンパク質をコードする合成DNAカセットを、適切な選択マーカー(例えばプラスチジン、プロマイシン又はヒグロマイシン耐性遺伝子を含む機能性発現カセット)及び宿主細胞ゲノム中でトランスクリプション活性の挿入部位の数を増大させるために好適な遺伝要素を含む真核細胞発現ベクターに挿入する。配列を検証した発現ベクターを、懸濁に適合したチャイニーズハムスター卵巣細胞(CHO-S、Invitrogen)にエレクトロポレーションによって導入する。トランスフェクトした細胞に、トランスフェクション後3日間、適切な選択圧を適用することになる。選択圧の下に培養を続けることにより、ベクター由来の耐性遺伝子を有す

10

20

30

40

50

る生存細胞を回収する。選択した細胞プールを、軌道振盪インキュベーター(100rpm、振盪長50mm)中、37℃及び7%CO₂雰囲気下、化学的に定義された培地(PowerCHO2-CD、Lonza)中で安定的に増殖させ、上述のタンパク質を検出して個別の上清をELISAアッセイによって分析し、最大の特異的産生能を有する細胞プールをタンパク質の産生の前に浸透フラスコ(軌道振盪器、100rpm、振盪長50mm)中で増殖する。

【0120】

実験室スケールのタンパク質産生のため、個別の細胞プールを、Waveバイオリアクター20/50EHT(GE-Healthcare)中、37℃及び7%CO₂雰囲気下、化学的に定義された培地(PowerCHO2-CD、Lonza)中で7~12日間、培養する。基本培地は4mMのグルタマックスを添加したPowerCHO2-CDである。生細胞濃度0.3~0.4×10⁶細胞/ml及び以下の設定(5リットル又は10リットルのバッグについて)振盪頻度18rpm、振盪角7°、気流0.2~0.3L/分、7%CO₂、36.5でWave培養を開始する。Wave培養の間、細胞培養液にPowerFeed A(Lonza)を2回、通常2日目(20%供給)及び5日目(30%供給)に供給する。2回目の供給の後、振盪頻度を22rpmに、また振盪角を8°に増加させる。

10

【0121】

バイオリアクターは通常7日目と12日目の間に、細胞の生存率が80%未満に低下した際に回収する。最初に、手動のデプスフィルターシステム(Millipore Millistak Pod、MCOHC 0.054m²)を用いて培養上清を清浄化する。Strep-tagを結合したタンパク質については、アビジンを加えて最終濃度を0.5mg/Lにする。最後に、ボトルトップフィルター(0.22µm、PES、Corning)を用いてCD137受容体アゴニスト融合タンパク質を含む培養上清を無菌濾過し、さらなる処理まで2~8℃に保存する。

20

【0122】

アフィニティ精製のため、ストレプトアクチンセファロースをカラムに充填し(ゲルベッド2ml)、15mlの緩衝液W(100mM Tris-HCl、150mM NaCl、pH8.0)又はPBS pH7.4で平衡化し、細胞培養上清を流量約4ml/分でカラムに加える。続いてカラムを15mlの緩衝液Wで洗浄し、7×1mlの緩衝液E(100mM Tris-HCl、150mM NaCl、2.5mMデスチオピオチン、pH8.0)を加えることによって、結合したポリペプチドを段階的に溶出させる。或いは、2.5mMのデスチオピオチンを含むPBS pH7.4をこのステップに用いてもよい。

【0123】

ストレプトアクチンセファロース系の方法の代わりに、アフィニティリガンドとして固定化されたプロテインAを含むカラムとAktaクロマトグラフィーシステム(GE-Healthcare)を用いるアフィニティ精製が実施される。融合タンパク質のFcドメインに高いアフィニティを有する固相材料:MABSelect Sure(商標)(GE-Healthcare)を選択する。簡単に述べると、洗浄緩衝液-1(20mM Pi、95mM NaCl、pH7.2)で平衡化したHiTrap MabSelectSureカラム(CV=5ml)に、清浄化した細胞培養上清を、ロード量がカラムベッド1mlあたり融合タンパク質10mgを超えないようにロードする。カラム体積の10倍(10CV)の上述の平衡緩衝液でカラムを洗浄し、次いでカラム体積の4倍(4CV)の洗浄緩衝液-2(20mM Pi、95mM NaCl、pH8.0)でカラムを洗浄して、宿主細胞タンパク質及び宿主細胞DNAを除去する。次いでカラムを溶出緩衝液(20mM Pi、95mM NaCl、pH3.5)で溶出させ、各分画がカラムベッド体積(5ml)に等しい体積を有する10個の分画まで溶出液を収集する。各分画を等体積の上述の洗浄緩衝液-2で中和する。線速度を150cm/時に設定し、上述のアフィニティクロマトグラフィーの間、一定に保つ。溶出分画のタンパク質量を定量し、ピーク分画を超濾過によって濃縮し、サイズ排除クロマトグラフィー(SEC)によって更に精製する。

30

40

【0124】

Aktaクロマトグラフィーシステム(GE Healthcare社)を用いてSuperdex 200 10/300 GL又はHiLoad 26/60カラムでSECを行なう。リン酸緩衝食塩液でカラムを平衡化し、アフィニティ精製して濃縮したポリペプチドを、試料体積がカラム体積の2%(v/v)を超えないようにSECカラムにロードする。Superdex 200 10/300 GLカラム(GE Healthcare社)の場合には流量を0.5ml/分とする。HiLoad 26/60 Superdex 200カラムの場合には流量を2.5ml/分とする。280nmの吸光度でポリペプチドの溶出プロファイルを追跡する。

50

【 0 1 2 5 】

精製した融合ポリペプチドの自然の条件下における見かけの分子量を決定するため、Superdex 200カラムに既知分子量の標準タンパク質をロードする。標準タンパク質の溶出体積に基づいて校正曲線をプロットし、精製した融合ポリペプチドの分子量を決定する。CD 137受容体アゴニスト融合タンパク質を含むFcドメインはSuperdex 200カラムから見かけ分子量約140~180kDaで溶出し、成熟CD137受容体アゴニスト融合ポリペプチドのFcドメインによるホモ二量体化が確認される。

【 0 1 2 6 】

(実施例3)

三価の対照タンパク質

六価のCD137受容体アゴニスト融合タンパク質とバクテリオファージRB69-FOLDONで安定化されたホモ三量体の三価のCD137受容体アゴニスト融合タンパク質との間の相対的結合を比較するため、CHO-S細胞中で発現し、以前のセクションに記載したように精製する。配列を下の表に示す。

【 0 1 2 7 】

【表 8】

配列番号	配列
38 (三価の対照タンパク質)	METD T L L V F V L L V W V P A G N G Q G M F A Q L V A Q N V L L I D G P L S W Y S D P G L A G V S L T G G L S Y K E D T K E L V V A K A G V Y Y V F F Q L E L R R V V A G E G S G S V S L A L H L Q P L R S A A G A A A L A L T V D L P P A S S E A R N S A F G F Q G R L L H L S A G Q R L G V H L H T E A R A R H A W Q L T Q G A T V L G L F R V G S G S S G S S G S S G S G Y I E D A P S D G K F Y V R K D G A W V E L P T A S G P S S S S S S A W S H P Q F E K .

【 0 1 2 8 】

(実施例4)

制限プロテアーゼ消化によるCD137受容体アゴニストタンパク質のインビトロ安定性の決定

実施例1に記載したように、検討すべき全てのCD137受容体アゴニストタンパク質を発現し、六価のFc融合タンパク質として精製する。セットは、CH2ドメインのN297S変異(EU番号付けシステムによる)、及び3つのジスルフィド架橋の生成が可能で、更に上部ヒンジのリジン(EU番号付けシステムによるK223)がグリシンに変異(K223G)して欠落しているヒンジ領域を含むCD137受容体アゴニストタンパク質を含んでいる。制限プロテアーゼ消化アッセイにおいて、3つのジスルフィドを可能にするヒンジの文脈でN297S変異及びK223G変異を同時に含む上述のCD137受容体アゴニストタンパク質を、2つのジスルフィド又は3つのジスルフィドのいずれかを可能にするヒンジ領域の文脈でN297S変異を含むがK223野生型は存在するCD137受容体アゴニストタンパク質と比較することになる。

更に、4アミノ酸に還元された第2のリンカー要素(iv)及び短縮されたヒンジ要素(vi)を有するCD137受容体アゴニストタンパク質を検討する(例えば配列番号32及び34)。両方の組み換え戦略(3つのジスルフィドを可能にするヒンジ領域の文脈でのN297SとK223Gの変異の組合せ)及びリンカー要素の短縮(iv及びvi)は、それぞれの分子の安定性に影響する可能性がある。

本発明の異なったCD137アゴニストタンパク質の安定性は、インビトロの制限プロテアーゼ消化によって取り扱うことができる。この分析のため、上述のCD137受容体アゴニストタンパク質を、異なった時間、異なった温度(例えば4、25、37)で、低濃度のプロテアーゼ(例えばトリプシン、V8プロテアーゼ)とともにインキュベートする。続いて、特定のタンパク分解断片の定量及びその外観を時間にわたって異なった方法、例えばSDS-

10

20

30

40

50

PAGE、分析用SEC又は当技術で公知の分析用マスマスペクトリー法(例えばナノRP-HPLC-ESI-MSMS)によって測定することができる。検討するタンパク質はその配列の大部分を共通して有するので、個別のタンパク質から時間にわたって特定のタンパク分解断片がより速く出現し、その量が多いことを用いて、その相対的安定性を判定し、互いに順位を付けることができる。検討した上述のCD137受容体アゴニストタンパク質のプロテアーゼに基づくデコイ動力学に関して、そのタンパク分解安定性に関する以下の順序が予想される。

【0129】

N297S及びK223G並びに3つのジスルフィドを可能にするヒンジ領域を含むCD137受容体アゴニストタンパク質は同時に、ヒンジ領域にN297Sと野生型K223とを含むCD137受容体アゴニストタンパク質と比較して長期の安定性を有している。ヒンジリンカーとして配列番号21を含むCD137受容体アゴニストタンパク質は、ヒンジリンカー要素として配列番号16を含むCD137受容体アゴニストタンパク質と比較して長期の安定性を有している。

10

【0130】

(実施例5)

安定性/凝集試験

実施例2に記載したように分析用SECによってモノマー及び凝集物の含量を決定する。この特定の目的のため、生理学的pHで生理学的食塩濃度を含む緩衝液(例えば0.9% NaCl、pH 7.4、PBS pH7.4)中で分析を行なう。典型的な凝集分析はSuperdex200カラム(GE Healthcare)で行なう。このカラムは10~800kDaの範囲のタンパク質を分離する。

【0131】

20

天然条件下における精製された融合ポリペプチドの見かけの分子量を決定するため、Superdex200カラムに既知分子量の標準タンパク質をロードする。標準タンパク質の溶出体積に基づいて校正曲線をプロットし、未知分子量の精製された融合タンパク質の見かけの分子量を溶出体積に基づいて算出する。

【0132】

可溶性の非凝集タンパク質のSEC分析により、典型的には定義された溶出体積に明確な単一のタンパク質ピーク(OD 280nm又はOD 214nmで測定)が示される。この溶出体積は特定のタンパク質の見かけの天然の分子量に対応する。Fc融合タンパク質の場合の「モノマー」の定義に関して、2つのポリペプチド鎖の会合がタンパク質のFc部分によって促進され、機能性単位は2つの鎖からなるタンパク質である。Fc融合タンパク質の場合には、二量体化一本鎖融合ポリペプチドであるか否かに関わらず、2つのFc連結ポリペプチド鎖を含むこの単位が「モノマー」と定義される。

30

【0133】

タンパク質の凝集が起こった場合には、SEC分析はより低い保持体積にさらなるタンパク質のピークを示す。タンパク質オリゴマーは凝集の種として働く可能性があり、高含量のオリゴマーはタンパク質の凝集をもたらす可能性がある。高分子量のオリゴマー及び凝集物はSuperdex200カラムのポイド体積に溶出し、その天然の分子量に関してSECで分析することができない。

【0134】

CD137受容体アゴニスト融合タンパク質の精製された製剤は、定義されたモノマータンパク質のみ及び極めて少量のオリゴマータンパク質のみを含むことが好ましい。特定のCD137受容体アゴニスト融合タンパク質製剤の凝集/オリゴマー化の程度はSEC分析に基づき、定義されたモノマー及びオリゴマー/凝集物分画のそれぞれについてのOD280ダイアグラムのピーク面積を算出することによって決定される。全ピーク面積に基づいて、定義されたモノマータンパク質の百分率は以下のように算出される。

40

モノマー含量[%]=[モノマータンパク質のピーク面積]/[全ピーク面積]×100

【0135】

(実施例6)

三価及び六価のCD137受容体リガンド構築物のQCM分析による平衡結合定数の決定

三価及び六価のCD137受容体リガンドの構築物の平衡結合定数(K_D)は、自動化バイオセ

50

ンサーシステム(Attana A100)によって決定される動的結合データ(k_{on} 及び k_{off})に基づいて算出される。A100により、クオーツ結晶マイクロバランス(QCM)手法に基づいてリアルタイムで分子間相互作用を検討することができる。

この目的のため、カルボキシル活性化QCMチップの表面にヒトCD137受容体を固定化する。続いて、三価又は六価のCD137受容体リガンドをそれぞれ、異なった濃度(例えば0.5、1、2、5及び10 $\mu\text{g/ml}$)で被分析物質として用いて、リガンド-受容体結合(k_{on})及び解離(k_{off})の動的結合データを解析する。解析はリアルタイムで行なわれ、対応する K_D を算出することができる。 $K_D=k_{off}/k_{on}$ 。

QCM解析から、三価のCD137受容体リガンドは対応する固定化CD137受容体に低いnM範囲の K_D で結合し、 K_D の予想値は1~500nMであることが示される。しかし、CD137受容体リガンドの六価の構築物は対応する固定化CD137受容体に対してpM範囲の高い結合親和性を示し、 K_D の予想値は1pM~500nMである。動的結合データ(k_{on} 及び k_{off})の共通の特徴は六価の構築物が三価の構築物と比較してより速い k_{on} を示すことである。更に、六価のリガンドは三価のリガンドと比較すればより遅い解離(k_{off})が一般に観察される。

【0136】

(実施例7)

T細胞増殖アッセイ

CD137受容体アゴニストのT細胞活性化能を評価するため、磁性ビーズを用いるネガティブ選択によってヒトバフィーコート製剤からT細胞を精製する。細胞をCFSEで標識し、種々の量のCD137受容体アゴニストありとなしで、抗ヒトCD3抗体と組み合わせて、37℃で2~5日インキュベートする。細胞分割を測定する手段としてのCFSE希釈に関するデータをフローサイトメーターで取得する。細胞培養上清及び捕捉のための抗ヒトIFN γ 抗体を用いるELISAアッセイによって、IFN γ の産生を測定する。

【0137】

T細胞の培養中に抗ヒトCD3抗体とともにCD137受容体アゴニストが存在する場合には、CD4+及びCD8+T細胞の両方によるIFN γ の分泌の明らかな増大が見られることが予想される。IFN γ の産生の増大とともに、フローサイトメトリーを用いるCFSE希釈の測定によって、より多くのT細胞が細胞サイクル中に促進されることが見られると予想される。これは、T細胞の活性化に関してCD137受容体アゴニストの共刺激効果を立証するものである。

【0138】

(実施例8)

CD137アゴニスト結合アッセイ

ネガティブ選択及び磁性ビーズを用いて、新鮮なバフィーコート製剤から一次ヒトT細胞を単離する。細胞をウェルあたり 2×10^6 細胞で24ウェルプレートに播種する。T細胞を抗ヒトCD3抗体(クローンHIT3a、1 $\mu\text{g/ml}$)、抗ヒトCD28抗体(クローンCD28.2、5 $\mu\text{g/ml}$)、及び種々の量のプロテインA(CD137L、10~1000ng/ml)とともにインキュベートし、又は対照として単に培地中に放置する。37℃、3日後に細胞を抗ヒトCD137抗体及び抗ヒトCD4抗体又は抗ヒトCD8抗体で蛍光標識する。CD4+及びCD8+T細胞集団中のCD137蛍光をグアバeasyCyteフローサイトメーターで評価する。

【0139】

抗CD3抗体及び抗CD28抗体とインキュベートしたT細胞集団を培地のみの中に放置した対照細胞と比較すると、CD137の蛍光シグナルが低いことが観察されると予想され、活性化によって誘起された受容体の下方制御が示される。この効果は細胞をCD137アゴニスト(プロテインA)と共インキュベートした場合により強く、用量依存性であり、CD137アゴニスト(プロテインA)によって引き起こされる補助的な効果を示している。このような効果はインビトロにおけるCD137アゴニスト(プロテインA)のその受容体への結合を示唆している。

【0140】

(実施例9)

ヒトインビトロT細胞増殖アッセイ

10

20

30

40

50

健常なドナーの末梢血から全(ヒト)T細胞をネガティブ選択及び磁性ビーズ(パンT細胞分離キット、Miltenyi Biotec社)によって精製し、CFSE(フローサイトメトリー用CellTrace(商標)CFSE Cell Proliferation Kit、ThermoFisher社)で染色し、ウェルあたり 2×10^6 細胞で24ウェルプレートに播種した。細胞を培地のみ、可溶性抗CD3抗体(クローンOKT3、 $1 \mu\text{g/ml}$)のみ、抗CD3抗体及び抗CD28抗体(クローン28.2、 $1 \mu\text{g/ml}$)、又は抗CD3抗体及びそれぞれ10、100又は1000ng/mlのプロテインA(配列番号27)と、37 で5日間インキュベートした。

【0141】

5日目に細胞を洗浄し、DAPI(死細胞を除外するため)及び特異抗体で染色した。Guava EasyCyte 12 フローサイトメーター(EMD Millipore社)を用いるフローサイトメトリーにより、前方散乱(FSC又はサイズ)及び増殖依存性のCFSE希釈の発現を測定した。データ解析はFlowJo 10.1ソフトウェア(FlowJo, LLC社)を用い、試料あたり最低1万個の記録した事象について行なった。正しいゲート位置を決定するため培地対照を用いて前方散乱及びCFSEについてゲーティングすることによって、応答する細胞の百分率を決定した。細胞のサイズが増大したか、CFSEレベルが低下した細胞を、応答する細胞としてラベルした。1人のドナーからの2つの生物学的複製物の個別のデータを下の表(T細胞活性化の定量)に示す。これらの結果はさらなるドナーからの結果と一致し、インビトロにおけるヒトT細胞のプロテインAによる処理によって、抗体刺激のみと比較してT細胞の活性化及び増殖が増大することを明白に示している。

【0142】

【表9】

T細胞活性化の定量

インビトロでのプロテインAによる処理の後のヒトT細胞活性化		
刺激	応答した細胞の%	
	試料1	試料2
培地	3	3
抗CD3	56	62
抗CD3/28	87	85
抗CD3 + APG1472 10ng/ml	71	69
抗CD3 + APG1472 100ng/ml	75	71
抗CD3 + APG1472 1000ng/ml	66	75

【0143】

(実施例10)

受容体結合アッセイ

本発明のCD137受容体アゴニスタンパク質のその対応する受容体への機能的結合を評価するELISAアッセイのため、マイクロタイタープレートを $1 \mu\text{g/ml}$ のCD137-Fc(Bio-Technologie GmbH社、Wiesbaden-Nordenstadt、Germany)でコートした。Starting Block(Life Technologies GmbH社、Darmstadt、Germany)でブロックした後、示した濃度のStrep-tagを有するプロテインA(配列番号28)とともにウェルをインキュベートした。その対応する受容体への結合を、抗Strep-tagペルオキシダーゼ StrepTactin-HRP(1:5000、IBA GmbH社、Goettingen、Germany)を用いるStrep-tag II、及びそれに続く転化したペルオキシダーゼ基質であるTMBワン(Kem-En-Tec Diagnostics社、Taastrup、Denmark)のELISAリーダーにおける波長450nmでの検出によって検出した。図6は、プロテインAのその受容体への濃度依存的な結合を明白に示している。

【符号の説明】

【 0 1 4 4 】

- 1 scCD137L-RBD
- 2 CH2ドメイン
- 3 CH3ドメイン
- 4 ヒンジ-システイン
- 5 N297位に結合したCH2糖鎖
- 6 上側ヒンジリジン(K223)

【 図 1 】

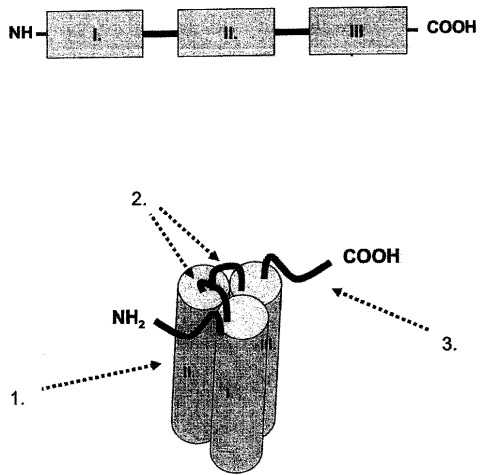


Figure 1

【 図 2 】

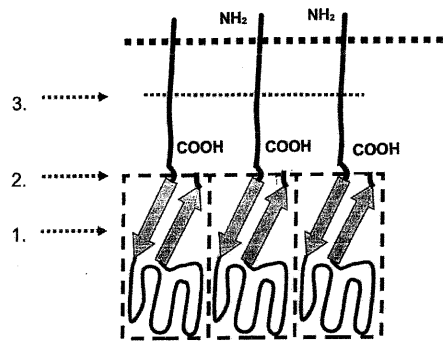


Figure 2

【 図 3 】

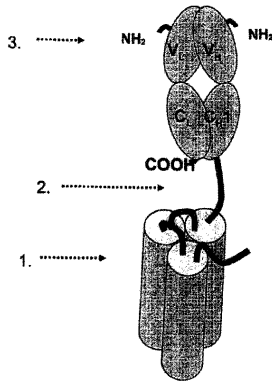


Figure 3

【 図 4 】

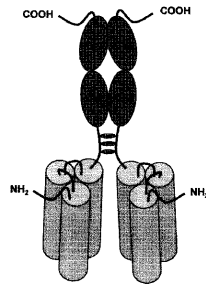


Figure 4

【 図 5 】

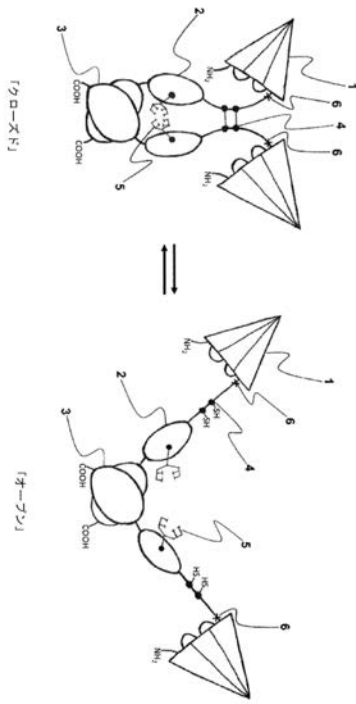


Figure 5

【 図 6 】

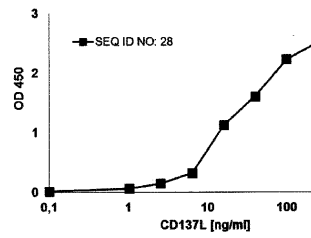
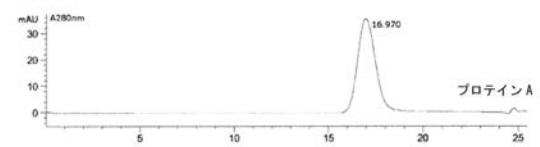


Figure 6

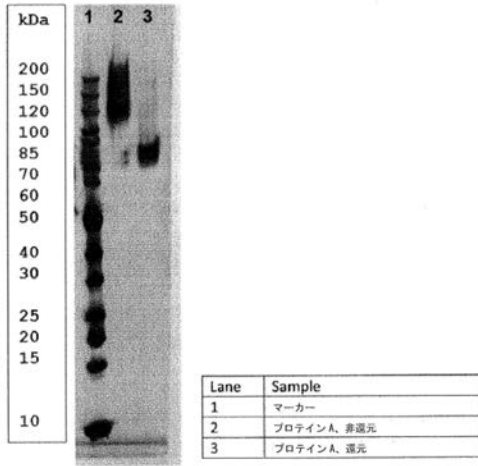
【 図 7 】

Figure 7



【 図 8 】

Figure 8



【 配列表 】

2019500850000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2016/075543

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C12N15/62 C07K14/705 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, Sequence Search		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2010/010051 A1 (APOGENIX GMBH [DE]; HILL OLIVER [DE]; GIEFFERS CHRISTIAN [DE]; THIEMAN) 28 January 2010 (2010-01-28) page 9, line 34 page 10, line 8; claims	1-24
A	WON EUN-YOUNG ET AL: "The Structure of the Trimer of Human 4-1BB Ligand Is Unique among Members of the Tumor Necrosis Factor Superfamily (includes Supplementary information)", JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 285, no. 12, 19 March 2010 (2010-03-19), pages 9202-9210+5PP, XP002765867, ISSN: 0021-9258, DOI: 10.1074/jbc.M109.084442 the whole document	1-24
----- -/--		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" 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 *&* 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 2017		08/02/2017
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Le Cornec, Nadine

2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2016/075543

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2003/223989 A1 (PLUENNEKE JOHN D [US]) 4 December 2003 (2003-12-04) claims; examples 1,2; sequence 4 -----	1-24
A	RABU CATHERINE ET AL: "Production of recombinant human trimeric CD137L (4-1BBL) - Cross-linking is essential to its T cell co-stimulation activity", JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 280, no. 50, 1 December 2005 (2005-12-01), pages 41472-41481, XP002456297, AMERICAN SOCIETY FOR BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY, US ISSN: 0021-9258, DOI: 10.1074/JBC.M506881200 the whole document -----	1-24
A	WO 2012/130471 A1 (UNIV STUTTGART [DE]; PFIZENMAIER KLAUS [DE]; KONTERMANN ROLAND [DE]; S) 4 October 2012 (2012-10-04) claims; figure 1 -----	1-24
A	WO 2013/092983 A2 (INNATE PHARMA [FR]; SCHERRER INST PAUL [CH]; BREGEON DELPHINE [FR]; DE) 27 June 2013 (2013-06-27) sequence 6 -----	1-24

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2016/075543

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2010010051 A1	28-01-2010	CA 2731388 A1	28-01-2010
		CA 2910512 A1	28-01-2010
		DK 2310509 T3	27-04-2015
		DK 2604693 T3	30-05-2016
		EP 2310509 A1	20-04-2011
		EP 2604693 A2	19-06-2013
		EP 2806029 A1	26-11-2014
		EP 3103875 A1	14-12-2016
		ES 2538122 T3	17-06-2015
		ES 2571879 T3	27-05-2016
		HR P20150425 T1	05-06-2015
		HU E025236 T2	29-03-2016
		JP 5674155 B2	25-02-2015
		JP 6046089 B2	14-12-2016
		JP 2011528562 A	24-11-2011
		JP 2014230545 A	11-12-2014
		JP 2014230546 A	11-12-2014
		PL 2604693 T3	30-09-2016
		SI 2310509 T1	31-07-2015
		SM T201500135 B	09-07-2015
		US 2011162095 A1	30-06-2011
		US 2014056843 A1	27-02-2014
		US 2015110734 A1	23-04-2015
		US 2015125419 A1	07-05-2015
		US 2016272695 A1	22-09-2016
		WO 2010010051 A1	28-01-2010
		-----	-----
US 2003223989 A1	04-12-2003	US 2003223989 A1	04-12-2003
		US 2008166336 A1	10-07-2008
-----	-----	-----	-----
WO 2012130471 A1	04-10-2012	AU 2012237456 A1	24-10-2013
		CA 2831820 A1	04-10-2012
		EP 2694550 A1	12-02-2014
		JP 6047142 B2	21-12-2016
		JP 2014511679 A	19-05-2014
		JP 2017000147 A	05-01-2017
		US 2015274827 A1	01-10-2015
		WO 2012130471 A1	04-10-2012
-----	-----	-----	-----
WO 2013092983 A2	27-06-2013	AU 2012356894 A1	24-07-2014
		CA 2858806 A1	27-06-2013
		EP 2793947 A2	29-10-2014
		EP 2793949 A1	29-10-2014
		US 2013189287 A1	25-07-2013
		US 2014356385 A1	04-12-2014
		WO 2013092983 A2	27-06-2013
WO 2013092998 A1	27-06-2013		
-----	-----	-----	-----

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 N 15/28 (2006.01)	C 1 2 N 15/28	
A 0 1 K 67/027 (2006.01)	A 0 1 K 67/027	
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 31/00 (2006.01)	A 6 1 P 31/00	
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	
A 6 1 P 37/02 (2006.01)	A 6 1 P 37/02	
A 6 1 P 3/00 (2006.01)	A 6 1 P 3/00	
A 6 1 P 19/02 (2006.01)	A 6 1 P 19/02	
A 6 1 P 25/00 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	1 0 1
A 6 1 P 37/06 (2006.01)	A 6 1 P 25/00	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 37/06	
A 6 1 K 47/68 (2017.01)	A 6 1 P 43/00	1 1 1
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 47/68	
A 6 1 P 35/02 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	
A 6 1 K 38/19 (2006.01)	A 6 1 P 35/02	
A 6 1 K 35/76 (2015.01)	A 6 1 K 38/19	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	A 6 1 K 35/76	
	G 0 1 N 33/53	D

(81) 指定国 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, T, J, 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, R, O, 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, G, T, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, 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, TZ, UA

- (72) 発明者 クリスティアン・ギーフェルス
ドイツ・6 9 2 2 1・ドッセンハイム・ブリューテンヴェーク・1 2
- (72) 発明者 オリヴァー・ヒル
ドイツ・6 9 2 3 9・ネッカーシュタイナッハ・グライナー・シュトラッセ・4 0
- (72) 発明者 マイノルフ・ティーマン
ドイツ・6 9 1 9 8・シュリースハイム・メリッセンヴェーク・1 8
- (72) 発明者 ティム・シュニーダー
ドイツ・9 7 9 9 9・イガースハイム・タウバーヴェーク・2

F ターム(参考) 4B065 AA01X AA57X AA72X AA88X AA90X AA90Y AB01 AC14 BA02 CA24
CA44 CA46
4C076 AA24 AA95 BB01 BB13 BB15 BB16 BB21 BB22 BB25 BB27
BB29 BB30 CC01 CC04 CC07 CC09 CC21 CC27 CC31 EE41
EE59 FF02 FF04 FF13
4C084 AA01 AA02 AA13 BA01 BA08 BA22 BA23 CA53 DA01 MA13
MA16 MA52 MA55 MA56 MA57 MA59 MA60 MA63 MA66 NA05
NA14 ZA021 ZA022 ZA961 ZA962 ZB071 ZB072 ZB081 ZB082 ZB111

	ZB112	ZB151	ZB152	ZB261	ZB262	ZB271	ZB272	ZB321	ZB322	ZC211
	ZC212	ZC411	ZC412							
4C087	AA01	AA02	BC83	CA12	MA13	MA16	MA52	MA55	MA56	MA57
	MA59	MA60	MA63	MA66	NA05	NA14	ZA02	ZA96	ZB07	ZB08
	ZB11	ZB15	ZB26	ZB27	ZB32	ZC21	ZC41			
4H045	AA10	AA30	BA41	CA40	DA14	EA20	EA50	FA74	GA26	

专利名称(译)	单链CD137受体激动剂蛋白		
公开(公告)号	JP2019500850A	公开(公告)日	2019-01-17
申请号	JP2018521279	申请日	2016-10-24
[标]申请(专利权)人(译)	アポジェニックスアーゲー		
申请(专利权)人(译)	载脂蛋白转基因扫描AG		
[标]发明人	クリスティアンギーフェルス		
发明人	クリスティアン・ギーフェルス オリヴァー・ヒル マイノルフ・ティーマン ティム・シュニーダー		
IPC分类号	C12N15/62 C07K19/00 C07K16/00 C07K14/525 C12N15/85 C12N15/28 A01K67/027 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 A61P35/00 A61P31/00 A61P29/00 A61P37/02 A61P3/00 A61P19/02 A61P25/00 A61P37/06 A61P43/00 A61K47/68 A61K48/00 A61P35/02 A61K38/19 A61K35/76 G01N33/53		
CPC分类号	A61K38/1774 A61K38/191 A61P3/00 A61P19/02 A61P25/00 A61P29/00 A61P31/00 A61P35/00 A61P35/02 C07K14/70575 C07K2319/30 C07K2319/32 C07K2319/74 C07K14/70578 C07K19/00 C07K2319/034 C07K2319/50		
FI分类号	C12N15/62.ZNA.Z C07K19/00 C07K16/00 C07K14/525 C12N15/85.Z C12N15/28 A01K67/027 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 A61P35/00 A61P31/00 A61P29/00 A61P37/02 A61P3/00 A61P19/02 A61P29/00.101 A61P25/00 A61P37/06 A61P43/00.111 A61K47/68 A61K48/00 A61P35/02 A61K38/19 A61K35/76 G01N33/53.D		
F-TERM分类号	4B065/AA01X 4B065/AA57X 4B065/AA72X 4B065/AA88X 4B065/AA90X 4B065/AA90Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA44 4B065/CA46 4C076/AA24 4C076/AA95 4C076/BB01 4C076/BB13 4C076/BB15 4C076/BB16 4C076/BB21 4C076/BB22 4C076/BB25 4C076/BB27 4C076/BB29 4C076/BB30 4C076/CC01 4C076/CC04 4C076/CC07 4C076/CC09 4C076/CC21 4C076/CC27 4C076/CC31 4C076/EE41 4C076/EE59 4C076/FF02 4C076/FF04 4C076/FF13 4C084/AA01 4C084/AA02 4C084/AA13 4C084/BA01 4C084/BA08 4C084/BA22 4C084/BA23 4C084/CA53 4C084/DA01 4C084/MA13 4C084/MA16 4C084/MA52 4C084/MA55 4C084/MA56 4C084/MA57 4C084/MA59 4C084/MA60 4C084/MA63 4C084/MA66 4C084/NA05 4C084/NA14 4C084/ZA021 4C084/ZA022 4C084/ZA961 4C084/ZA962 4C084/ZB071 4C084/ZB072 4C084/ZB081 4C084/ZB082 4C084/ZB111 4C084/ZB112 4C084/ZB151 4C084/ZB152 4C084/ZB261 4C084/ZB262 4C084/ZB271 4C084/ZB272 4C084/ZB321 4C084/ZB322 4C084/ZC211 4C084/ZC212 4C084/ZC411 4C084/ZC412 4C087/AA01 4C087/AA02 4C087/BC83 4C087/CA12 4C087/MA13 4C087/MA16 4C087/MA52 4C087/MA55 4C087/MA56 4C087/MA57 4C087/MA59 4C087/MA60 4C087/MA63 4C087/MA66 4C087/NA05 4C087/NA14 4C087/ZA02 4C087/ZA96 4C087/ZB07 4C087/ZB08 4C087/ZB11 4C087/ZB15 4C087/ZB26 4C087/ZB27 4C087/ZB32 4C087/ZC21 4C087/ZC41 4H045/AA10 4H045/AA30 4H045/BA41 4H045/CA40 4H045/DA14 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA74 4H045/GA26		
代理人(译)	村山彦 安倍晋三龙彦		
优先权	62/245838 2015-10-23 US		
其他公开文献	JP2019500850A5		
外部链接	Espacenet		
摘要(译)			

本文提供了特异性CD137受体激动剂蛋白，编码该蛋白的核酸以及治疗患有CD137L相关疾病或病症的受试者的方法。本文提供的CD137受体激动剂蛋白包含三个可溶性CD137L结构域和Fc片段。CD137受体激动剂蛋白基本上是非聚集性的，适用于治疗，诊断和/或研究应用。

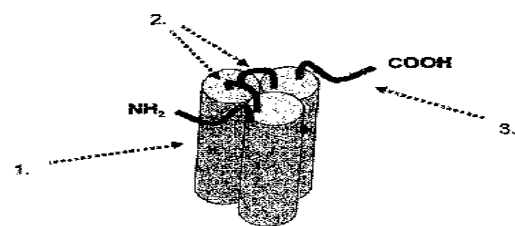


Figure 1