

(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2015-522576

(P2015-522576A)

(43) 公表日 平成27年8月6日(2015.8.6)

(51) Int.Cl.	F 1	テーマコード (参考)
<b>C07K 14/00</b> (2006.01)	C07K 14/00	4 B 02 4
<b>A61K 38/00</b> (2006.01)	A61K 37/02	4 C 08 4
<b>A61K 48/00</b> (2006.01)	A61K 48/00	4 H 04 5
<b>A61P 27/02</b> (2006.01)	A61P 27/02	
<b>A61P 27/10</b> (2006.01)	A61P 27/10	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 44 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2015-519089 (P2015-519089)	(71) 出願人	511109065 モレキュラー・パートナーズ・アーグ MOLECULAR PARTNERS AG イスラエル、テルアビブ 8952 シュリ ーレン、ヴァーギッシュトーレ 14
(86) (22) 出願日	平成25年6月27日 (2013.6.27)	(74) 代理人	110001508 特許業務法人 津国
(85) 翻訳文提出日	平成27年2月25日 (2015.2.25)	(74) 代理人	100078662 弁理士 津国 肇
(86) 國際出願番号	PCT/EP2013/063488	(74) 代理人	100116528 弁理士 三宅 俊男
(87) 國際公開番号	W02014/001442	(74) 代理人	100146031 弁理士 柴田 明夫
(87) 國際公開日	平成26年1月3日 (2014.1.3)		
(31) 優先権主張番号	12174020.3		
(32) 優先日	平成24年6月28日 (2012.6.28)		
(33) 優先権主張国	歐州特許庁 (EP)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 血小板由来成長因子に結合する設計アンキリンリピートタンパク質

## (57) 【要約】

P D G F - B B についての結合特異性を伴う、新たな設計アンキリンリピートタンパク質、ならびにそのような P D G F 結合タンパク質をコードする核酸、そのようなタンパク質を含む医薬的組成物、及び疾患の処置におけるそのようなタンパク質の使用を記載する。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

アンキリンリピートドメインが、P B S 中で、 $10^{-7}$  Mを下回る K<sub>d</sub> を伴い、P D G F - B B に結合する、少なくとも 1 つのアンキリンリピートドメインを含む組換え結合タンパク質。

## 【請求項 2】

アンキリンリピートドメインが、P B S 中で、 $10^{-7}$  Mを下回る I C<sub>50</sub> 値を伴い、P D G F R b e t a への P D G F - B B の結合を阻害する、請求項 1 記載の結合タンパク質。

## 【請求項 3】

アンキリンリピートドメインが、 $10^{-7}$  Mを下回る I C<sub>50</sub> 値を伴い、3 T 3 線維芽細胞の P D G F - B B 刺激性増殖を阻害する、請求項 1 又は 2 記載の結合タンパク質。

## 【請求項 4】

アンキリンリピートドメインが、P D G F - B B への結合について、配列番号 23 ~ 60 からなる群より選択されるアンキリンリピートドメインと競合する、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項記載の結合タンパク質。

## 【請求項 5】

アンキリンリピートドメインが、配列番号 23 ~ 60 からなる群より選択される 1 つのアンキリンリピートドメインと少なくとも 70% のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、

それにおいて、該アンキリンリピートドメインの位置 1 の G 及び / 又は位置 2 の S が、場合により、欠損しており；ならびに、

該アンキリンリピートドメインの最後から二番目の位置の L 及び / 又は最後の位置の N が、場合により、A により交換されている、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項記載の結合タンパク質。

## 【請求項 6】

アンキリンリピートドメインが、配列番号 23 ~ 60 からなる群より選択される 1 つのアンキリンリピートドメインと少なくとも 76% のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、

それにおいて、該アンキリンリピートドメインの位置 1 の G 及び / 又は位置 2 の S が、場合により、欠損しており；ならびに、

該アンキリンリピートドメインの最後から二番目の位置の L 及び / 又は最後の位置の N が、場合により、A により交換されている、請求項 5 記載の結合タンパク質。

## 【請求項 7】

アンキリンリピートドメインが、配列番号 23 ~ 60 からなる群より選択される 1 つのアンキリンリピートドメインと、そのフレームワーク位置において少なくとも 70% のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、

それにおいて、該アンキリンリピートドメインの位置 1 の G 及び / 又は位置 2 の S が、場合により、欠損しており；ならびに、

該アンキリンリピートドメインの最後から二番目の位置の L 及び / 又は最後の位置の N が、場合により、A により交換されている、請求項 5 記載の結合タンパク質。

## 【請求項 8】

アンキリンリピートドメインが、配列番号 23 ~ 60 からなる群より選択され、それにおいて、該アンキリンリピートドメインの位置 1 の G 及び / 又は位置 2 の S が、場合により、欠損しており；ならびに、

該アンキリンリピートドメインの最後から二番目の位置の L 及び / 又は最後の位置の N が、場合により、A により交換されている、請求項 5 記載の結合タンパク質。

## 【請求項 9】

アンキリンリピートドメインが、配列番号 23 ~ 60 からなる群より選択されるアンキリンリピートドメインと同じエピトープに付着する、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項記載の

10

20

30

40

50

結合タンパク質。

【請求項 10】

アンキリンリピートドメインが、配列番号 12、14、15、17、18、及び 19 からなる群より選択されるアミノ酸配列ならびに配列（それにおいて、配列番号 12、14、15、17、18、及び 19 における 9 つまでのアミノ酸が、任意のアミノ酸により交換される）を有するアンキリンリピートモジュールを含む、請求項 1～7 又は 9 のいずれか一項記載の結合タンパク質。

【請求項 11】

アンキリンリピートドメインが、配列番号 12、14、15、17、18、及び 19 からなる群より選択されるアミノ酸配列ならびに配列（それにおいて、配列番号 12、14、15、17、18、及び 19 における 2 つまでのアミノ酸が、任意のアミノ酸により交換される）を有するアンキリンリピートモジュールを含む、請求項 10 記載の結合タンパク質。

10

【請求項 12】

アンキリンリピートドメインが、配列番号 12、14、15、17、18、及び 19 からなる群より選択されるアミノ酸配列ならびに配列（それにおいて、配列番号 12、14、15、17、18、及び 19 のフレームワーク位置における 8 つまでのアミノ酸が、任意のアミノ酸により交換される）を有するアンキリンリピートモジュールを含む、請求項 10 記載の結合タンパク質。

20

【請求項 13】

アンキリンリピートモジュールが、アミノ酸配列 K D E E G T T P L H Y A A V W G H L E I V E V L L K A G A D V N A（配列番号 12）及び配列（それにおいて、配列番号 12 における 9 つまでのアミノ酸が、任意のアミノ酸により交換され、ならびに、それににおいて、

位置 3 の E が、場合により、D、W、Q、I、及び Y からなる群より選択されるアミノ酸により交換され；

位置 4 の E が、場合により、T、D、Y、及び S からなる群より選択されるアミノ酸により交換され；

位置 6 の T が、場合により、S 及び F からなる群より選択されるアミノ酸により交換され；

30

位置 11 の Y が、場合により、F により交換され；

位置 14 の V が、場合により、A、Y、及び T からなる群より選択されるアミノ酸により交換され；

位置 15 の W が、場合により、F、K、V、及び Y からなる群より選択されるアミノ酸により交換される）を有する、請求項 10 記載の結合タンパク質。

40

【請求項 14】

アンキリンリピートモジュールが、アミノ酸配列 K D E E G T T P L H Y A A V W G H L E I V E V L L K A G A D V N A（配列番号 12）（それにおいて、配列番号 12 のフレームワーク位置における 8 つまでのアミノ酸が、任意のアミノ酸により交換され、ならびに、それににおいて、

位置 3 の E が、場合により、D、W、Q、I、及び Y からなる群より選択されるアミノ酸により交換され；

位置 4 の E が、場合により、T、D、Y、及び S からなる群より選択されるアミノ酸により交換され；

位置 6 の T が、場合により、S 及び F からなる群より選択されるアミノ酸により交換され；

位置 11 の Y が、場合により、F により交換され；

位置 14 の V が、場合により、A、Y、及び T からなる群より選択されるアミノ酸により交換され；

位置 15 の W が、場合により、F、K、V、及び Y からなる群より選択されるアミノ酸

50

により交換される)を有する、請求項13記載の結合タンパク質。

【請求項15】

アンキリンリピートドメインが、配列番号13及び16からなる群より選択されるアミノ酸配列ならびに配列(それにおいて、配列番号13及び16における8つまでのアミノ酸が、任意のアミノ酸により交換される)を有するキャッシングモジュールを含む、請求項1~14のいずれか一項記載の結合タンパク質。

【請求項16】

アンキリンリピートドメインが、配列番号13及び16からなる群より選択されるアミノ酸配列ならびに配列(それにおいて、配列番号13及び16のフレームワーク位置における7つまでのアミノ酸が、任意のアミノ酸により交換される)を有するキャッシングモジュールを含む、請求項15記載の結合タンパク質。

10

【請求項17】

P D G F - B Bへの結合特異性を伴うアンキリンリピートドメインが、配列Q D I Y G A T P A D L A A L V G H E D I A E V L Q K L N(配列番号13)及び配列(それにおいて、配列番号13における8つまでのアミノ酸が、任意のアミノ酸により交換され、

それにおいて、

位置3のIが、場合により、K、L、A、及びVからなる群より選択されるアミノ酸により交換され;

位置4のYが、場合により、W、F、及びSからなる群より選択されるアミノ酸により交換され;

20

位置6のAが、場合により、Kにより交換され;

位置14のLが、場合により、F、Y、及びDからなる群より選択されるアミノ酸により交換され;

位置15のVが、場合により、L、I、A、及びNからなる群より選択されるアミノ酸により交換され;ならびに

位置23のVが、I及びLからなる群より選択されるアミノ酸により交換される)を伴う末端キャッシングモジュールを含む、請求項15記載の結合タンパク質。

【請求項18】

P D G F - B Bへの結合特異性を伴うアンキリンリピートドメインが、配列Q D I Y G A T P A D L A A L V G H E D I A E V L Q K L N(配列番号13)(それにおいて、配列番号13における7つまでのアミノ酸が、任意のアミノ酸により交換され、

30

それにおいて、

位置3のIが、場合により、K、L、A、及びVからなる群より選択されるアミノ酸により交換され;

位置4のYが、場合により、W、F、及びSからなる群より選択されるアミノ酸により交換され;

位置6のAが、場合により、Kにより交換され;

位置14のLが、場合により、F、Y、及びDからなる群より選択されるアミノ酸により交換され;

位置15のVが、場合により、L、I、A、及びNからなる群より選択されるアミノ酸により交換され;ならびに、

40

位置23のVが、I及びLからなる群より選択されるアミノ酸により交換される)を伴うC末端キャッシングモジュールを含む、請求項15記載の結合タンパク質。

【請求項19】

アンキリンリピートドメインが、請求項13記載のアンキリンリピートモジュール及び請求項17記載のC末端キャッシングモジュールを含む、請求項1~4のいずれか一項記載の結合タンパク質。

【請求項20】

アンキリンリピートドメインが、配列番号13のC末端キャッシングモジュールが直接続く、配列番号12のアンキリンリピートモジュールを含む、請求項19記載の結合タン

50

パク質。

【請求項 2 1】

アンキリンリピートドメインのアンキリンリピートモジュールのアミノ酸残基の 1 つ又は複数が、アンキリンリピート単位のアラインメント上の対応する位置で見出されるアミノ酸残基により交換される、請求項 1 ~ 7 及び 9 ~ 19 のいずれか一項記載の結合タンパク質。

【請求項 2 2】

配列配列番号 12 ~ 19 及び 23 ~ 61 のいずれかのペプチドを含む、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項記載の結合タンパク質。

【請求項 2 3】

請求項 1 ~ 22 のいずれか一項記載の結合タンパク質をコードする核酸。

【請求項 2 4】

請求項 1 ~ 22 のいずれか一項記載の結合タンパク質又は請求項 23 記載の核酸、ならびに、場合により、医薬的に許容可能な担体及び / 又は希釈剤を含む医薬的組成物。

【請求項 2 5】

滲出性加齢黄斑変性症、ポリープ状脈絡膜血管新生、及び病的近視より選択される状態を処置する方法であって、そのような処置を必要とする患者に、請求項 1 ~ 22 のいずれか一項記載の結合タンパク質の治療的に効果的な量を投与する工程を含む方法。

【請求項 2 6】

滲出性加齢黄斑変性症、ポリープ状脈絡膜血管新生、及び病的近視より選択される状態を処置する方法であって、そのような処置を必要とする患者に、 P D G F - B B に特異的に結合するアンキリンリピートドメイン及び V E G F - A に特異的に結合するアンキリンリピートドメインを含む結合タンパク質の治療的に効果的な量を投与する工程を含む方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、血小板由来成長因子 ( P D G F ) についての結合特異性を伴う設計アンキリンリピートタンパク質、ならびにそのような P D G F 結合タンパク質をコードする核酸、そのようなタンパク質を含む医薬的組成物、及び疾患の処置におけるそのようなタンパク質の使用に関する。

【0002】

発明の背景

【0003】

血小板由来成長因子 ( P D G F ) は、線維芽細胞、平滑筋細胞、及びグリア細胞のための血清成長因子として 30 年以上前に同定された。生理学及び医学におけるその役割は、最近の総説において広範囲に記載されている (Andrae, J., Gallini, R. and Betsholtz, C., Genes Dev., 22, 1276-1312, 2008)。ヒト P D G F は、本来は、2 つの異なるポリペプチド鎖 A ( P D G F - A ; ヒト P D G F - A は、UniProtKB/スイスプロット番号 P 0 4 0 8 5 を有する) 及び B ( P D G F - B ; ヒト P D G F - B は、UniProtKB/スイスプロット番号 P 0 1 1 2 7 を有する) のジスルフィド連結された二量体として同定された。それにより、3 つのタンパク質二量体を形成することができる： P D G F - A A 、 P D G F - A B 、及び P D G F - B B 。最近、2 つの追加の P D G F ポリペプチド鎖 P D G F - C 及び P D G F - D が同定された。現在公知の P D G F 遺伝子及びポリペプチドは、血管内皮成長因子 ( V E G F ) も含む構造的及び機能的に関連する成長因子のファミリーに属する。 P D G F / V E G F 成長因子は、動物界全体にわたり保存されている。

【0004】

P D G F は、2 つの受容体チロシンキナーゼ ( R T K ) 、 P D G F 受容体 ( P D G F R ) アルファ ( P D G F R a l p h a ) 及びベータ ( P D G F R b e t a ) を介して作用し、共通ドメイン構造 ( 5 つの細胞外免疫グロブリン ( I g ) ループ及び分割細胞内チロシ

10

20

30

40

50

ンキナーゼドメインを含む)を伴う。VEGFは、RTKの別個の、しかし、構造的に関連するサブファミリーを通じて作用する。リガンド結合は、受容体の二量体化を促し、それはシグナル伝達を開始する。リガンド構成及び受容体発現のパターンに依存し、異なる受容体二量体を形成しうる。しかし、少数の相互作用だけが、インビポで関連すると思われる; 即ち、PDGF<sub>Ra1pha</sub>を介したPDGF-AA及びPDGF-CC、ならびにPDGF<sub>Rbeta</sub>を介したPDGF-BBの相互作用。

#### 【0005】

PDGFは、発生中に決定的な役割を有するが、しかし、成人における正常な生理学的機能についての限定された証拠がある。動物発生におけるPDGF及びPDGFRの試験によって、原腸形成における、ならびに頭蓋及び心臓神経堤、生殖腺、肺、腸、皮膚、CNS、及び骨格の発生におけるPDGF<sub>Ra1pha</sub>シグナル伝達の役割が明らかになっている。同様に、PDGF<sub>Rbeta</sub>シグナル伝達についての役割は、血管形成及び初期造血において確立されている。PDGFシグナル伝達は、広範な疾患に関与している。PDGFシグナル伝達経路のオートクリン活性化は、特定の神経膠腫、肉腫、及び白血病において含まれる。パラクリンPDGFシグナル伝達は、一般に、上皮癌において観察され、そこで、それは間質補充を誘発し、上皮間葉移行において含まれ、それにより、腫瘍成長、血管新生、浸潤、及び転移に影響する。PDGFは、血管障害(例えばアテローム性動脈硬化症、再狭窄、肺高血圧症、及び網膜疾患など)における、ならびに線維性疾患(肺線維症、肝硬変、強皮症、糸球体硬化症、及び心臓線維症を含む)における病理学的な間葉系応答を駆動する。

10

20

30

40

50

#### 【0006】

このように、増加したPDGF活性は、いくつかの疾患及び病理学的状態と関連付けられてきた。PDGFの原因となる病原性の役割は、一部の疾患について確立されており、PDGFアンタゴニスト(例えばPDGF特異的抗体など)を使用した治療のための見通しを提供する。また、抗VEGF及び抗PDGF薬剤の組み合わせが、特定の眼の血管新生疾患を処置するための相乗的な治療的利益を与えることが示唆されている(WO 2005/020972; Jo, N., Mailhos, C., Ju, M., Cheung, E., Bradley, J., Nishijima, K., Robinson, G.S., Adamis, A.P. and Shima, D.T., Am.J.Pathol., 168(6), 2036-2053, 2006)。

#### 【0007】

抗体の他、標的分子に特異的に結合させ(例、Binz, H.K., Amstutz, P. and Pluckthun, A., Nat.Biotechnol.23, 1257-1268, 2005)、それにより、アンタゴニストとして作用するために使用することができる新規の結合タンパク質又は結合ドメインがある。Fcを持たない結合タンパク質又は結合ドメインの1つのそのような新規のクラスは、設計リピートタンパク質又は設計リピートドメインに基づく(WO 2002/020565; Binz, H.K., Amstutz, P., Kohl, A., Stumpp, M.T., Briand, C., Forrer, P., Gruetter, M.G., and Plueckthun, A., Nat.Biotechnol.22, 575-582, 2004; Stumpp, M.T., Binz, H.K and Amstutz, P., Drug Discov.Today 13, 695-701, 2008)。WO 2002/020565には、リピートタンパク質の大きなライブラリーをどのように構築することができるのか、及びそれらの一般的な適用が記載されている。それにもかかわらず、WO

2002/020565には、PDGF-BBについての結合特異性を伴うリピートドメインも、PDGF-BBに特異的に結合するリピートドメインの具体的なリピートモジュール又はリピート配列モチーフの選択も開示されていない。さらに、WO 2002/020565には、PDGF-BBについての結合特異性を伴うリピートドメインを使用し、PDGF-BB媒介シグナル伝達経路を調節し、成功裏に疾患を処置することができることは示唆されていない。これらの設計リピートドメインは、リピートタンパク質のモジュラー性質を利用してあり、ドメインの疎水性コアを遮蔽することにより、設計リピートドメインを凝集から防止するためのN末端及びC末端キャッピングモジュールを持ちうる(Forrer, P., Stumpp, M.T., Binz, H.K. and Plueckthun, A., FEBS Letters 539, 2-6, 2003)。

## 【0008】

本発明の基盤となる技術的問題は、新規結合タンパク質（例えばアンキリンリピートタンパク質又はドメインなど）を同定することであって、PDGF-BBへの結合特異性を伴い、特定の癌、血管障害（例えば網膜疾患など）、線維性疾患、及び他の病理学的状態の改善された処置のために、PDGF-BB媒介シグナル伝達経路を調節する。この技術的問題への解決は、特許請求の範囲において特徴付けられる実施態様を提供することにより達成される。

## 【0009】

発明の概要

## 【0010】

本発明は、少なくとも1つのアンキリンリピートドメインを含む組換え結合タンパク質に関し、それにおいて、前記アンキリンリピートドメインは、PBS中で、 $10^{-7}$ Mを下回るKdを伴い、PDGF-BBに結合する。

10

## 【0011】

さらに特に、本発明は、少なくとも1つのアンキリンリピートドメインを含む組換え結合タンパク質に関し、それにおいて、前記アンキリンリピートドメインは、PDGF-BBへの結合について、配列番号23～60からなる群より選択されるアンキリンリピートドメインと競合し、又は、それにおいて、前記アンキリンリピートドメインは、配列番号23～60からなる群より選択され、それにおいて、前記アンキリンリピートドメインの位置1のG及び/又は位置2のSが、場合により、欠損している；ならびに、前記アンキリンリピートドメインの最後から二番目の位置のL及び/又は最後の位置のNが、場合により、Aにより交換されている。

20

## 【0012】

さらなる実施態様において、本発明は、少なくとも1つのアンキリンリピートドメインを含む組換えPDGF-BB結合タンパク質に関し、それは、配列番号12、14、15、17、18、及び19からなる群より選択されるアミノ酸配列を有するアンキリンリピートモジュールならびに配列（それにおいて、配列番号12、14、15、17、18、及び19における9つまでのアミノ酸が、任意のアミノ酸により交換されている）を含む。

30

## 【0013】

特に、本発明は、配列番号12～19及び23～61のいずれか1つのペプチドを含む組換えPDGF-BB結合タンパク質に関する。

## 【0014】

本発明は、さらに、本発明の結合タンパク質をコードする核酸分子、及び上で言及する結合タンパク質又は核酸分子の1つ又は複数を含む医薬的組成物に関する。

## 【0015】

本発明は、さらに、本発明の結合タンパク質を使用した病理学的状態の処置の方法に関する。

## 【図面の簡単な説明】

## 【0016】

【図1】NIH-3T3纖維芽細胞増殖の阻害。PDGF-BBについての特異性を伴う種々の濃度のDARPin（DARPin #49により例示される）によるNIH-3T3線維芽細胞の増殖の阻害及び対応する近似阻害曲線を示す。IC<sub>50</sub>値を、次に、近似阻害曲線から、DARPin #49について1.9nmであると算出した。OD、450nmでの光学密度；C、nMでのDARPin #49の濃度；D1、DARPin #49。X軸は対数目盛で示している。DARPin #49の定義については、以下を参照のこと。

40

【図2】PDGF R beta競合アッセイ。PDGF-BBについての特異性を伴う種々の濃度のDARPinによるPDGF R betaへのPDGF-BBの結合の阻害及び対応する近似阻害曲線を、別個の単一実験について示す。IC<sub>50</sub>値を、次に、DARPi

50

n # 50 (D1) 及び # 28 (D2) について約 20 及び 18 pM であると算出した。O D、450 nm での光学密度；C、pM での D A R P i n の濃度。X 軸を対数目盛りで示す。D A R P i n # 50 及び 28 の定義については、以下を参照のこと。

【図3】脈絡膜血管新生の発生に対する抗 P D G F - B B D A R P i n 対賦形剤の効果。マウスを、毎日、賦形剤又は D A R P i n # 61 - P E G 20 (即ち、標準的な手段 (例、W O 2011 / 135067 において記載する通り) により、その C 末端 C y s 残基にわたり P E G 20 へ共役された D A R P i n # 61) を用いて、0 日目から 14 日目まで腹腔内注射した。2 日目に、レーザー熱傷を眼に適用し、脈絡膜血管新生 (C N V) を誘導し、14 日目に、C N V の範囲を測定した。シンボルは、個々の目を表し、3 つの誘導 C N V スポットの各々の平均値を表す。バーは、個々の群の中央値を表す。A、mm<sup>2</sup> での C N V の面積；V、賦形剤 (即ち、P B S)；D1、注射した 1 用量当たり 1.0 mg/kg での P B S 中の D A R P i n # 61 - P E G 20；D2、注射した 1 用量当たり 1 mg/kg での P B S 中の D A R P i n # 61 - P E G 20。

10

#### 【0017】

発明の詳細な説明

#### 【0018】

本発明に従った組換え結合タンパク質又はドメインは、哺乳動物の P D G F - B B について特異的である。好ましくは、本発明に従った組換え結合ドメインは、マウス、ラット、イヌ、ウサギ、サル、又はヒト由来の P D G F - B B について特異的である。より好ましくは、本発明の組換え結合ドメインは、ヒト由来の P D G F - B B について特異的である。

20

#### 【0019】

用語「タンパク質」はポリペプチドを指し、それにおいて、ポリペプチドの少なくとも部分は、そのポリペプチド鎖内及び/又は間の二次、三次、又は四次構造を形成することにより、定義された三次元配置を有する、又は、得ることができる。タンパク質が 2 つ又はそれ以上のポリペプチドを含む場合、個々のポリペプチド鎖は非共有結合的又は共有結合的に、例えば、2 つのポリペプチドの間のジスルフィド結合により連結されうる。タンパク質の部分は、二次又は三次構造を形成することにより定義された三次元配置を個々に有する、又は、得ることができ、「タンパク質ドメイン」と呼ばれる。そのようなタンパク質ドメインは、当業者に周知である。

30

#### 【0020】

用語「組換え」は、組換えタンパク質、組換えタンパク質ドメイン、組換え結合タンパク質などで使用される通り、前記ポリペプチドが、当業者により周知である組換え D N A 技術の使用により產生されることを意味する。例えば、ポリペプチドをコードする組換え D N A 分子 (例、遺伝子合成により產生される) を、細菌発現プラスミド (例、pQE30、Q iagen)、酵母発現プラスミド、又は哺乳動物発現プラスミド中にクローン化することができる。例えば、そのような構築された組換え細菌発現プラスミドは、適切な細菌 (例、大腸菌) 中に挿入される場合、この細菌は、この組換え D N A によりコードされるポリペプチドを產生することができる。対応して產生されたポリペプチドは、組換えポリペプチドと呼ばれる。

40

#### 【0021】

本発明に関連して、用語「ポリペプチド」は、ペプチド結合を介して連結された複数、即ち、2 つ又はそれ以上のアミノ酸の 1 つ又は複数の鎖からなる分子に関する。好ましくは、ポリペプチドは、ペプチド結合を介して連結された 8 を上回るアミノ酸からなる。

#### 【0022】

用語「ポリペプチドタグ」は、ポリペプチド / タンパク質に付着したアミノ酸配列を指し、それにおいて、前記アミノ酸配列は、前記ポリペプチド / タンパク質の精製、検出、又は標的化のために有用であり、あるいは、それにおいて、前記アミノ酸配列は、ポリペプチド / タンパク質の物理化学的挙動を改善し、あるいは、それにおいて、前記アミノ酸配列はエフェクター機能を持つ。結合タンパク質の個々のポリペプチドタグ、部分、及び

50

/又はドメインを、互いに直接的に又はポリペプチドリンクを介して接続してもよい。これらのポリペプチドタグは、全て、当技術分野において周知であり、当業者に完全に利用可能である。ポリペプチドタグの例は、小さなポリペプチド配列、例えば、H i s (例、配列番号 9 の H i s タグ)、m y c、F L A G、もしくは S t r e p タグ又は部分、例えば酵素など(例えば、アルカリリフォスファターゼなどの酵素)であり、それらは前記ポリペプチド/タンパク質の検出を許し、あるいは、標的化のため(例えば免疫グロブリン又はそのフラグメントなど)及び/又はエフェクター分子として使用することができる部分である。

#### 【0023】

用語「ポリペプチドリンク」はアミノ酸配列を指し、それは、例えば、2つのタンパク質ドメイン、ポリペプチドタグとタンパク質ドメイン、タンパク質ドメインと非ポリペプチド部分(例えばポリエチレングリコールなど)、又は2つの配列タグを連結することができる。そのような追加ドメイン、タグ、非ポリペプチド部分、及びリンクは、当業者に公知である。例のリストを、特許出願WO 2002/020565の記載において提供する。そのようなリンクの特定の例は、可変長のグリシン-セリンリンク及びプロリン-スレオニンリンクである;好ましくは、前記リンクは2~24の間のアミノ酸の長さを有する;より好ましくは、前記リンクは、2~16の間のアミノ酸の長さを有する。グリシン-セリン-リンクの例を配列番号10において提供し、プロリン-スレオニン-リンクの例を配列番号11において提供する。好ましくは、配列番号11のプロリン-スレオニン-リンクは、G S により先行される及び/又はG S が続く。

#### 【0024】

用語「ポリマー部分」は、タンパク質性ポリマー部分又は非タンパク質性ポリマー部分のいずれかを指す。「タンパク質性ポリマー部分」は、好ましくは、安定した三次構造を形成しないポリペプチドである。タンパク質性ポリマー部分の例は、XTEN(登録商標)(Amunixの登録商標; WO 2007/103515)ポリペプチド、又はプロリン残基、アラニン残基、及びセリン残基を含むポリペプチド(WO 2008/155134に記載されている通り)である。そのようなタンパク質性ポリマー部分を、標準的なDNAクローニング技術、それに続く、それらの標準的な発現及び精製を使用した遺伝子融合ポリペプチドの生成により、例えば、本発明の結合ドメインに共有結合的に付着させることができる。「非タンパク質性ポリマー部分」は、ポリペプチドから構築されていないポリマー部分である。非タンパク質ポリマー部分の例は、ヒドロキシエチルデンプン(H E S)、ポリエチレングリコール(P E G)、ポリプロピレングリコール、又はポリオキシアルキレンである。用語「P E G化された」は、P E G部分が、例えば、本発明のポリペプチドに共有結合的に付着していることを意味する。本発明のポリマー部分は、分子量において広く変動しうる。好ましくは、前記ポリマー部分は、ポリペプチドリンクにより、結合ドメインに接続される。

#### 【0025】

特定の実施態様において、P E G部分又は任意の他の非タンパク質性ポリマーを、例えば、マレイミドリンクを介して、システィンチオールにカップリングすることができ、システィンは、本明細書に記載する通り、ペプチドリンクを介して、結合ドメインのN又はC末端にカップリングされている。

#### 【0026】

用語「結合タンパク質」は、下でさらに説明する通り、1つ又は複数の結合ドメイン、1つ又は複数の生物活性化合物、及び1つ又は複数のポリマー部分を含むタンパク質を指す。好ましくは、前記結合タンパク質は、4つまでの結合ドメインを含む。より好ましくは、前記結合タンパク質は、2つまでの結合ドメインを含む。最も好ましくは、前記結合タンパク質は、1つだけの結合ドメインを含む。さらに、任意のそのような結合タンパク質は、結合ドメインではない追加のタンパク質ドメイン、多量体化部分、ポリペプチドタグ、ポリペプチドリンク、及び/又は単一のC y s 残基を含みうる。多量体化部分の例は、ペアになり、機能的な免疫グロブリンF c ドメインを提供する免疫グロブリン重鎖定

10

20

30

40

50

常領域、及びロイシンジッパー又は2つのそのようなポリペプチド間に分子間ジスルフィド結合を形成する遊離チオールを含むポリペプチドである。単一のCys残基は、例えば、当業者に周知のマレイミド化学を使用することにより、他の部分をポリペプチドに共役するために使用してもよい。好ましくは、前記結合タンパク質は、組換え結合タンパク質である。また、好ましくは、結合タンパク質の結合ドメインは、異なる標的特異性を持つ。

【0027】

用語「生物活性化合物」は、前記疾患有する哺乳動物に適用された場合に、疾患修飾性である化合物を指す。生物活性化合物は、アンタゴニスト特性又はアゴニスト特性を有しうるが、タンパク質性の生物活性化合物又は非タンパク質性の生物活性化合物でありうる。そのようなタンパク質性の生物活性化合物は、例えば、本発明の結合ドメインに、標準的なDNAクローニング技術、それに続く、それらの標準的な発現及び精製を使用した遺伝子融合ポリペプチドの生成により、共有結合的に付着させることができる。そのような非タンパク質性の生物活性化合物を、例えば、本発明の結合ドメインに、化学的手段により、例えば、マレイミドリンカーを介したシステインチオールへのカップリングにより、共有結合的に付着することができ、システインは、本明細書に記載する通りに、ペプチドリンカーを介して、結合ドメインのN又はC末端にカップリングされている。タンパク質性の生物活性化合物の例は、別個の標的特異性を有する（例、それに結合することにより成長因子を中和する）結合ドメイン、サイトカイン（例、インターロイキン）、成長因子（例、ヒト成長ホルモン）、抗体及びそれらのフラグメント、ホルモン（例、GLP-1）、及び任意の可能なタンパク質性薬物である。非タンパク質性の生物活性化合物の例は、毒素（例、ImmunoGenからのDM1）、GPCRを標的とする小分子、抗生物質、及び任意の可能な非タンパク質性薬物である。

10

20

30

【0028】

用語「結合ドメイン」は、タンパク質スキャフォールドと同じ「フォールディング」（三次元配置）を示し、所定の特性（下に定義する通り）を有するタンパク質ドメインを意味する。そのような結合ドメインは、合理的な、又は最も一般には、当技術分野において公知の技術である、コンビナトリアルタンパク質操作技術により得てもよい（Binz et al., 2005、前掲文献）。例えば、所定の特性を有する結合ドメインは、以下の工程を含む方法により得ることができる：（a）下にさらに定義する通りの、タンパク質スキャフォールドと同じフォールディングを示すタンパク質ドメインの多様なコレクションを提供すること；ならびに（b）前記の多様なコレクションをスクリーニングし、及び／又は前記の多様なコレクションから選択し、前記の所定の特性を有する少なくとも1つのタンパク質ドメインを得ること。タンパク質ドメインの多様なコレクションは、使用中のスクリーニング及び／又は選択システムに従った、いくつかの方法により提供され、当業者に周知の方法（例えばファージディスプレイ又はリボソームディスプレイなど）の使用を含みうる。好ましくは、前記結合ドメインは、組換え結合ドメインである。

【0029】

用語「タンパク質スキャフォールド」は、アミノ酸挿入、置換、又は欠失が高度に許容できる露出表面積を伴うタンパク質を意味する。本発明の結合ドメインを生成するために使用することができるタンパク質スキャフォールドの例は、抗体又はそのフラグメント（例えば単鎖Fv又はFabフラグメントなど）、黄色ブドウ球菌からのプロテインA、モンシロチョウ（*Pieris brassicae*）からのビリン結合タンパク質又は他のリポカリン、アンキリンリピートタンパク質又は他のリピートタンパク質、及びヒトフィブロネクチンである。タンパク質スキャフォールドは、当業者に公知である（Binz et al., 2005、前掲文献；Binz et al., 2004、前掲文献）。

40

【0030】

用語「標的」は、個々の分子、例えば核酸分子、ポリペプチドもしくはタンパク質、炭水化物、又は任意の他の天然分子（そのような個々の分子の任意の部分、あるいは、そのような分子の2つ又はそれ以上の複合体を含む）などを指す。標的は、全細胞又は組織サ

50

ンブルでよく、あるいは、それは任意の非天然分子又は部分でよい。好ましくは、標的は、天然もしくは非天然ポリペプチド又は化学的修飾（例えば、天然もしくは非天然のリン酸化、アセチル化、又はメチル化により修飾される）を含むポリペプチドである。本発明の特定の適用において、標的は P D G F - B B である。

【 0 0 3 1 】

用語「所定の特性」は、特性、例えば標的への結合、標的の遮断、標的媒介反応の活性化、酵素活性、及び関連するさらなる特性などを指す。所望の特性の型に依存して、当業者は、所望の特性を伴う結合ドメインのスクリーニング及び／又は選択を実施するためのフォーマット及び必要な工程を同定することができるであろう。好ましくは、前記の所定の特性は、標的への結合である。

10

【 0 0 3 2 】

リピートタンパク質についての以下の定義は、特許出願 W O 2 0 0 2 / 0 2 0 5 6 5 における定義に基づく。特許出願 W O 2 0 0 2 / 0 2 0 5 6 5 は、さらに、リピートタンパク質の特色、技術、及び適用の一般的な記載を含む。

【 0 0 3 3 】

用語「リピートタンパク質」は、1つ又は複数のリピートドメインを含むタンパク質を指す。好ましくは、前記リピートタンパク質の各々は、4つまでのリピートドメインを含む。より好ましくは、前記リピートタンパク質の各々は、2つまでのリピートドメインを含む。最も好ましくは、リピートタンパク質の各々は、1つだけのリピートドメインを含む。さらに、前記リピートタンパク質は、追加の非リピートタンパク質ドメイン、ポリペプチドタグ、及び／又はポリペプチドリンカーを含みうる。

20

【 0 0 3 4 】

用語「リピートドメイン」は、構造単位として2つ又はそれ以上の連続リピート単位（モジュール）を含むタンパク質ドメインを指し、それにおいて、前記構造単位は、同じフォールディングを有し、堅固に積み重なり、結合疎水性コアを有する超らせん構造を作る。好ましくは、リピートドメインは、さらに、N末端及び／又はC末端キャッピング単位（又はモジュール）を含む。さらにより好ましくは、前記N末端及び／又はC末端キャッピング単位（又はモジュール）は、キャッピングリピートである。

【 0 0 3 5 】

用語「設計リピートタンパク質」及び「設計リピートドメイン」は、特許出願 W O 2 0 0 2 / 0 2 0 5 6 5 において説明される、本発明の手順の結果として得られる、リピートタンパク質又はリピートドメインをそれぞれ指す。「設計リピートタンパク質」及び「設計リピートドメイン」は、合成であり、天然からではない。それらは、それぞれ、対応して設計された核酸の発現により得られる、人工タンパク質又はドメインである。好ましくは、発現は、真核細胞もしくは原核細胞（例えば細菌細胞など）中で、又は、無細胞インビトロ発現系を使用することにより行われる。したがって、設計アンキリンリピートタンパク質（即ち、D A R P i n）は、少なくとも1つのアンキリンリピートドメインを含む、本発明の組換え結合タンパク質に対応する。

30

【 0 0 3 6 】

用語「構造単位」は、ポリペプチドの局所的に順序付けられた部分を指し、ポリペプチド鎖に沿って互いに近い二次構造の2つ又はそれ以上のセグメントの間の三次元相互作用により形成される。そのような構造単位は、構造モチーフを示す。用語「構造モチーフ」は、少なくとも1つの構造単位中に存在する二次構造エレメントの三次元配置を指す。構造モチーフは、当業者に周知である。構造単位単独では、定義された三次元配置を得ることはできない；しかし、それらの連続配置は、例えば、リピートドメイン中のリピートモジュールとして、超らせん構造をもたらす隣接単位の相互安定化に導く。

40

【 0 0 3 7 】

用語「リピート単位」は、1つ又は複数の天然リピートタンパク質のリピート配列モチーフを含むアミノ酸配列を指し、それにおいて、前記「リピート単位」は、複数のコピーにおいて見出され、それは、タンパク質のフォールディングを決定する全ての前記モチー

50

フに共通する定義されたフォールディングトポロジーを示す。そのようなリピート単位は、リピートタンパク質の「リピート構造単位（リピート）」（Forrer et al., 2003、前掲文献により記載される通り）又はリピートタンパク質の「連続相同構造単位（リピート）」（Binz et al., 2004、前掲文献により記載される通り）に対応する。そのようなリピート単位は、フレームワーク残基及び相互作用残基を含む。そのようなリピート単位の例は、アルマジロリピート単位、ロイシンリッチリピート単位、アンキリンリピート単位、テトラトリコペプチドリピート単位、H E A T リピート単位、及びロイシンリッチ変異体リピート単位である。2つ又はそれ以上のそのようなリピート単位を含む天然タンパク質は、「天然リピートタンパク質」として言及される。リピートタンパク質の個々のリピート単位のアミノ酸配列は、互いに比較された場合、有意な数の変異、置換、付加、及び／又は欠失を有しうるが、リピート単位の一般的なパターン、又はモチーフを依然として実質的に保持している。

10

## 【0038】

したがって、用語「アンキリンリピート単位」は、アンキリンリピート（例えば、Forrer et al., 2003、前掲文献により記載される通り）であるリピート単位を意味するものとする。アンキリンリピートは、当業者に周知である。用語「アンキリンリピートドメイン」は、構造単位として、好ましくは、N末端及び／又はC末端キャッピング単位（又はモジュール）として2つ又はそれ以上の連続アンキリンリピート単位（モジュール）を含むリピートドメインを指す。

20

## 【0039】

用語「フレームワーク残基」は、リピート単位のアミノ酸残基、又はリピートモジュールの対応するアミノ酸残基に関し、それは、フォールディングトポロジーに寄与し、即ち、それは、前記リピート単位（又はモジュール）のフォールディングに寄与する、又は、それは、隣接単位（又はモジュール）との相互作用に寄与する。そのような寄与は、リピート単位（又はモジュール）における他の残基との相互作用、あるいはヘリックスもしくはシート中に見出されるポリペプチド骨格の立体構造、又は直線状ポリペプチドもしくはループを形成するアミノ酸ストレッチに対する影響でありうる。

## 【0040】

用語「標的相互作用残基」は、リピート単位のアミノ酸残基、又はリピートモジュールの対応するアミノ酸残基を指し、それらは、標的物質との相互作用に寄与する。そのような寄与は、標的物質との直接的な相互作用、又は他の直接的に相互作用する残基に対する影響（例、リピート単位（又はモジュール）のポリペプチドの立体構造を安定化し、前記標的と直接的に相互作用する残基の相互作用を許す又は増強することによる）でありうる。そのようなフレームワーク残基及び標的相互作用残基は、物理化学的方法（例えばX線結晶解析、NMR、及び／又はCD分光法など）により得られる構造データの分析により、あるいは、構造生物学及び／又は生物情報学における当業者に周知である公知の及び関連する構造情報との比較により同定してよい。

30

## 【0041】

好ましくは、リピート配列モチーフの推定のために使用されるリピート単位は、相同なリピート単位であり、それにおいて、リピート単位は同じ構造モチーフを含み、それにおいて、前記リピート単位のフレームワーク残基の70%超が互いに相同である。好ましくは、前記リピート単位のフレームワーク残基の80%超が相同である。最も好ましくは、前記リピート単位のフレームワーク残基の90%超が相同である。ポリペプチドの間の相同性のパーセンテージを決定するためのコンピュータプログラム（例えばFast a, Blast、又はGapなど）は、当業者に公知である。さらに好ましくは、リピート配列モチーフの推定のために使用されるリピート単位は、定義された標的上で選択されたリピートドメインから得られた、相同なリピート単位である。

40

## 【0042】

用語「リピート配列モチーフ」は、アミノ酸配列を指し、それは、1つ又は複数のリピート単位又はリピートモジュールから推定される。好ましくは、前記のリピート単位又は

50

リピートモジュールは、同じ標的についての結合特異性を有するリピートドメインからである。そのようなリピート配列モチーフは、フレームワーク残基位置及び標的相互作用残基位置を含む。前記フレームワーク残基位置は、リピート単位（又はモジュール）のフレームワーク残基の位置に対応する。同様に、前記の標的相互作用残基位置は、リピート単位（又はモジュール）の標的相互作用残基の位置に対応する。リピート配列モチーフは、固定化された位置及び無作為化された位置を含む。用語「固定化された位置」は、リピート配列モチーフ中のアミノ酸位置を指し、それにおいて、前記位置は、特定のアミノ酸に設定される。ほとんどの場合、そのような固定化された位置は、フレームワーク残基の位置及び／又は特定の標的について特異的である標的相互作用残基の位置に対応する。用語「無作為化された位置」は、リピート配列モチーフ中のアミノ酸位置を指し、それにおいて、2つ又はそれ以上のアミノ酸がアミノ酸位置で許され、例えば、それにおいて、通常の20の天然アミノ酸のいずれかが許され、あるいは、それにおいて、20の天然アミノ酸の大半が許され、例えばシスティン以外のアミノ酸、又はグリシン、システィン、及びプロリン以外のアミノ酸などである。ほとんどの場合、そのような無作為化された位置は、標的相互作用残基の位置に対応する。しかし、フレームワーク残基の一部の位置も無作為化してもよい。

10

## 【0043】

用語「フォールディングトポロジー」は、前記のリピート単位又はリピートモジュールの三次構造を指す。フォールディングトポロジーは、ヘリックス又はシートの少なくとも部分を形成するアミノ酸のストレッチ、あるいは直線状ポリペプチド又はループを形成するアミノ酸ストレッチ、あるいはヘリックス、シート、及び／又は直線状ポリペプチド／ループの任意の組み合わせにより決定される。例えば、アンキリンリピート単位／モジュールは、ターン、それに続く2つの逆平行ヘリックス及び次のリピート単位／モジュールのターンに達するループからなる。

20

## 【0044】

用語「連続」は配置を指し、それにおいて、リピート単位又はリピートモジュールがタンデムに配置される。設計リピートタンパク質において、少なくとも2つ、通常は約2～6、特に少なくとも約6、高頻度には20又はそれ以上のリピート単位（又はモジュール）がある。大半の場合において、リピートドメインのリピート単位（又はモジュール）は、高い程度の配列同一性（対応する位置での同じアミノ酸残基）又は配列類似性（アミノ酸残基は異なるが、しかし、同様の物理化学的特性を有する）を示し、アミノ酸残基の一部は、強く保存されている重要残基でありうる。しかし、アミノ酸挿入及び／又は欠失、ならびに／あるいはリピートドメインの異なるリピート単位（又はモジュール）の間での置換による高い程度の配列変動性は、リピート単位（又はモジュール）の共通のフォールディングトポロジーが維持される限り可能でありうる。

30

## 【0045】

物理化学的手段（例えばX線結晶学、NMR、又はCD分光法など）によりリピートタンパク質のフォールディングトポロジーを直接的に決定するための方法が、当業者に周知である。リピート単位又はリピート配列モチーフを同定及び決定するため、又は、そのようなリピート単位又はモチーフを含む関連タンパク質のファミリーを同定するための方法、例えば、ホモロジー検索（BLASTなど）などが、生物情報学の分野において十分に確立されており、当業者に周知である。初期リピート配列モチーフを改良する工程は、反復プロセスを含みうる。

40

## 【0046】

用語「リピートモジュール」は、設計リピートドメインの繰り返しアミノ酸配列を指し、それらは、本来は、天然リピートタンパク質のリピート単位に由来する。リピートドメイン中に含まれる各々のリピートモジュールは、天然リピートタンパク質のファミリー又はサブファミリー（例、アルマジロリピートタンパク質又はアンキリンリピートタンパク質のファミリー）の1つ又は複数のリピート単位に由来する。さらに好ましくは、リピートドメイン中に含まれる各々のリピートモジュールは、標的上で選択されたりピートドメ

50

インから得られ（例えば、実施例1に記載される通り）、同じ標的特異性を有する、相同的リピート単位から推定されるリピート配列モチーフを含む。

【0047】

したがって、用語「アンキリンリピートモジュール」は、リピートモジュールを意味するものとし、それは、本来は、天然アンキリンリピートタンパク質のリピート単位に由来する。アンキリンリピートタンパク質は、当業者に周知である。

【0048】

「リピートモジュール」は、対応するリピートモジュールの全てのコピー中に存在するアミノ酸残基を伴う位置（「固定化された位置」）及び異なる又は「無作為化された」アミノ酸残基を伴う位置（「無作為化された位置」）を含みうる。

10

【0049】

用語「キャッシングモジュール」は、リピートドメインのN又はC末端リピートモジュールに融合されたポリペプチドを指し、それにおいて、前記キャッシングモジュールは、前記リピートモジュールと強固な三次相互作用（即ち、三次構造相互作用）を形成し、それにより、連続リピートモジュールと接触しない側で、溶媒から前記リピートモジュールの疎水性コアを遮蔽するキャッシングを提供する。前記N及び/又はC末端キャッシングモジュールは、キャッシング単位又はリピート単位に隣接する天然リピートタンパク質中で見出される他の構造単位でありうる、又は、それに由来しうる。用語「キャッシング単位」は、天然の折り畳まれたポリペプチドを指し、それにおいて、前記ポリペプチドは、リピート単位へN又はC末端で融合された特定の構造単位を定義し、それにおいて、前記ポリペプチドは、前記リピート単位と強固な三次相互作用を形成し、それにより、一方の側の前記リピート単位の疎水性コアを、溶媒から遮蔽するキャッシングを提供する。好ましくは、キャッシングモジュール又はキャッシング単位は、キャッシングリピートである。用語「キャッシングリピート」は、前記の隣接リピート単位（又はモジュール）と同様の又は同じフォールディング及び/又は前記の隣接リピート単位（又はモジュール）と配列類似性を有するキャッシングモジュール又はキャッシング単位を指す。キャッシングモジュール及びキャッシングリピートは、WO 2002/020565において、及び、Interlandi et al., 2008（前掲文献）により記載される。N末端アンキリンキャッシングモジュール（即ち、N末端キャッシングリピート）の例は、配列番号1～3であり、アンキリンC末端キャッシングモジュール（即ち、C末端キャッシングリピート）の例は、配列番号4～8、13、及び16である。

20

【0050】

例えば、配列番号49のN末端アンキリンキャッシングモジュールは、位置1～32のアミノ酸によりコードされ、配列番号49のC末端キャッシングモジュールは、位置132～159のアミノ酸によりコードされる。

30

【0051】

本発明に従った組換え結合タンパク質は、少なくとも1つアンキリンリピートドメインを含み、それにおいて、前記アンキリンリピートドメインは、哺乳動物P D G F - B Bについての結合特異性を有する。

40

【0052】

用語「標的についての結合特異性を有する」、「標的に特異的に結合する」、又は「標的特異性」などは、結合タンパク質又は結合ドメインが、P B S中で、無関係のタンパク質（例えば大腸菌マルトース結合タンパク質（M B P）など）よりも低い解離定数を用いて、標的に結合することを意味する。好ましくは、標的についてのP B S中での解離定数は、M B Pについての対応する解離定数よりも、少なくとも10、より好ましくは少なくとも $10^2$ 、さらにより好ましくは少なくとも $10^3$ 、又は最も好ましくは少なくとも $10^4$ 倍低い。

【0053】

P D G F - B Bについての結合特異性を伴うアンキリンリピートドメインを含む組換え結合タンパク質を、実施例において示す。

50

## 【0054】

特に、本発明は、PDGF-BBについての結合特異性を伴うアンキリンリピートドメインを含む、本明細書において定義された通りの組換え結合タンパク質に関し、それは、 $10^{-6}$  Mを下回る解離定数 (Kd) を伴い、PBS中でPDGF-BBと結合する。好ましくは、前記アンキリンリピートドメインは、PBS中で、 $10^{-7}$  Mを下回る、より好ましくは $10^{-8}$  M、 $10^{-9}$  M、 $10^{-10}$  Mを下回る、又は最も好ましくは $10^{-11}$  Mを下回るKdを伴い、PDGF-BBに結合する。

## 【0055】

タンパク質-タンパク質相互作用の解離定数を決定するための方法、例えば表面プラズモン共鳴 (SPR) ベースの技術 (例、SPR平衡分析) 又は等温滴定熱量計 (ITC) などだが、当業者に周知である。特定のタンパク質-タンパク質相互作用の測定Kd値は、異なる条件 (例、塩濃度、pH) 下で測定した場合、変動しうる。このように、Kd値の測定は、好ましくは、タンパク質の標準化溶液及び標準化緩衝液 (例えばPBSなど) を用いて作られる。

10

## 【0056】

PBS中で $10^{-6}$  Mを下回るKdを伴いPDGF-BBに結合するアンキリンリピートドメインを含む組換え結合タンパク質を、実施例2において示す。

## 【0057】

好ましいのは、ヒトPDGF-BBについての結合特異性を伴うアンキリンリピートドメインを含む組換え結合タンパク質である。

20

## 【0058】

さらに好ましいのは、70~300の間のアミノ酸、特に90~200の間のアミノ酸を含むアンキリンリピートドメインを含む組換え結合タンパク質である。

## 【0059】

本発明の結合ドメインは、アンキリンリピートドメイン又は設計アンキリンリピートドメインであり、好ましくは、WO 2002/020565に記載されている通りである。PDGF-BBについての結合特異性を伴う設計アンキリンリピートドメインの例を、実施例において示す。

30

## 【0060】

さらなる実施態様において、本発明は、哺乳動物PDGF-BBについての結合特異性を伴う少なくとも1つのアンキリンリピートドメインを含む組換え結合タンパク質に関し、それにおいて、アンキリンリピートドメインは、PBS中で、 $10^{-7}$  Mを下回るIC<sub>50</sub>値を伴い、PDGF R betaへのPDGF-BBの結合を阻害する。好ましくは、前記アンキリンリピートドメインは、PBS中で、 $10^{-7}$  Mを下回る、より好ましくは $10^{-8}$  M、 $10^{-9}$  M、 $10^{-10}$  Mを下回る、又は最も好ましくは $10^{-11}$  Mを下回るIC<sub>50</sub>値を伴い、PDGF R betaへのPDGF-BBの結合を阻害する。

## 【0061】

半最大阻害濃度 (IC<sub>50</sub>) は、生物学的、生化学的、又は生物物理学的機能を阻害する際での、化合物 (例えば本発明の結合ドメインなど) の有効性の測定値である。タンパク質-タンパク質相互作用の阻害のIC<sub>50</sub>値を決定するための方法 (例えば競合ELISAなど) は、当業者に周知である。タンパク質-タンパク質相互作用の特定の阻害剤の測定IC<sub>50</sub>値は、異なる条件 (例、塩濃度、pH) 下で測定した場合、変動しうる。このように、IC<sub>50</sub>値の測定値は、好ましくは、タンパク質の標準化溶液及び標準化緩衝液 (例えばPBSなど) を用いて作られる。

40

## 【0062】

PBS中で、 $10^{-7}$  Mを下回るIC<sub>50</sub>値を伴い、PDGF R betaへのPDGF-BBの結合を阻害するアンキリンリピートドメインを含む組換え結合タンパク質を、実施例4に示す。

## 【0063】

さらなる実施態様において、本発明は、PDGF-BBについての結合特異性を伴う少

50

なくとも 1 つのアンキリンリピートドメインを含む組換え結合タンパク質に関し、それは、 N I H - 3 T 3 線維芽細胞 ( A T C C 、 カタログ番号 : C R L - 1 6 5 8 ) の P D G F - B B 刺激性増殖を、  $10^{-6}$  M を下回る I C <sub>50</sub> 値を伴い阻害する。好ましくは、前記リピートドメインは、 N I H - 3 T 3 線維芽細胞の P D G F - B B 刺激性増殖を、  $10^{-7}$  M を下回る、より好ましくは  $10^{-8}$  M 、  $10^{-9}$  M 、  $10^{-10}$  M 、又は最も好ましくは  $10^{-11}$  M を下回る I C <sub>50</sub> 値を伴い阻害する。

【 0 0 6 4 】

N I H - 3 T 3 細胞は、成長のために P D G F - B B に応答性であり、そのようなものとして、本発明の化合物の機能的阻害能力を測定するために使用することができる。 N I H - 3 T 3 細胞を、培養培地中で成長させ、次に、 P D G F - B B の添加及び抗 P D G F - B B D A R P i n の滴定に先立つ 7 時間にわたり栄養素を欠乏させた。 P D G F - B B を阻害する本発明の化合物の能力の評価は、 N I H - 3 T 3 細胞の増殖能力により決定され、当業者に周知の標準的な測定法により測定される通りである。 N I H - 3 T 3 線維芽細胞の P D G F - B B 刺激性増殖を、  $10^{-6}$  M を下回る I C <sub>50</sub> 値を伴い阻害するアンキリンリピートドメインを含む組換え結合タンパク質を、実施例 3 に示す。

10

【 0 0 6 5 】

本発明は、 P D G F - B B についての結合特異性を伴う少なくとも 1 つのアンキリンリピートドメインを含む組換え結合タンパク質であって、それにおいて、前記結合タンパク質及び / 又はアンキリンリピートドメインは、 P B S 中での熱的アンフォールディング時に 40 を上回る中点変性温度 ( T m ) を有し、 37 で 1 日間にわたり P B S 中でインキュベートされた場合、濃度 1 0 g/L までで 5 % ( w / w ) 未満の不溶性凝集物を形成する。

20

【 0 0 6 6 】

用語「 P B S 」は、 1 3 7 mM N a C l 、 1 0 mM リン酸、及び 2 . 7 mM K C l を含み、 p H 7 . 4 を有するリン酸緩衝水溶液を意味する。

【 0 0 6 7 】

好ましくは、組換え結合タンパク質及び / 又は結合ドメインは、 p H 7 . 4 の P B S 中での熱的アンフォールディング時に、 45 を上回る、より好ましくは 50 を上回る、より好ましくは 55 を上回る、最も好ましくは 60 を上回る中間点変性温度 ( T m ) を有する。本発明の結合タンパク質又は結合ドメインは、生理学的条件下で、定義された二次及び三次構造を持つ。そのようなポリペプチドの熱的アンフォールディングは、その三次及び二次構造の喪失をもたらし、それは、例えば、円偏光二色性 ( C D ) 測定により追跡することができる。熱的アンフォールディング時での結合タンパク質又は結合ドメインの中点変性温度は、温度を約 1 0 から約 1 0 0 までゆっくりと増加させることによる、前記のタンパク質又はドメインの熱変性時での生理学的緩衝液における協同転移の中点での温度に対応する。熱的アンフォールディング時での中点変性温度の決定は、当業者に周知である。熱的アンフォールディング時での結合タンパク質又は結合ドメインのこの中点変性温度は、前記ポリペプチドの熱的安定性を示している。

30

【 0 0 6 8 】

また、好ましいのは、 5 日間にわたり、好ましくは 1 0 日間にわたり、より好ましくは 2 0 日間にわたり、より好ましくは 4 0 日間にわたり、最も好ましくは 1 0 0 日間にわたり、 37 で、 P B S 中でインキュベートした場合、濃度 2 0 g/L まで、好ましくは 4 0 g / L まで、より好ましくは 6 0 g / L まで、さらにより好ましくは 8 0 g / L まで、最も好ましくは 1 0 0 g / L までの 5 % ( w / w ) の不溶性凝集物を形成する組換え結合タンパク質及び / 又はアンキリンリピートドメインである。不溶性凝集物の形成は、視覚的な沈殿の出現、ゲルろ過、又は動的光散乱により検出することができ、それらは、不溶性凝集物の形成時に強く増加する。不溶性凝集物は、タンパク質サンプルから、  $10'000 \times g$  で 1 0 分間にわたる遠心により除去することができる。好ましくは、組換え結合タンパク質及び / 又はアンキリンリピートドメインは、言及したインキュベーション条件下で、 37 で、 P B S 中で、 2 % 未満、より好ましくは 1 % 、 0 . 5 % 、 0 . 2 % 、 0 . 1 % 、又は、最も好

40

50

ましくは 0.5% (w/w) 未満の不溶性凝集物を形成する。不溶性凝集物のパーセンテージは、可溶性タンパク質からの不溶性凝集物の分離、それに続く、標準的な定量化方法による可溶性及び不溶性画分中のタンパク質量の決定により決定することができる。

【0069】

また、好ましいのは、100 mMジチオトレイトル (DTT) を含む PBS 中での 1 又は 10 時間にわたる 37° でのインキュベーション時に、その天然三次構造を失わない組換え結合タンパク質及び / 又はアンキリンリピートドメインである。

【0070】

1 つの特定の実施態様において、本発明は、PDGF-BB に特異的に結合し、上で定義した通りの、示した又は好ましい中間点変性温度及び非凝集特性を有する、アンキリンリピートドメインを含む組換え結合タンパク質に関する。 10

【0071】

さらなる実施態様において、本発明は、哺乳動物 PDGF-BB についての結合特異性を伴う少なくとも 1 つのアンキリンリピートドメインを含む組換え結合タンパク質に関する、それにおいて、アンキリンリピートドメインは、哺乳動物 PDGF-BB への結合について、配列番号 23 ~ 60 ; 好ましくは配列番号 24、45、及び 50、特に配列番号 24 及び 50 からなる群より選択されるアンキリンリピートドメインと競合する。

【0072】

また、好ましくは、前記リピートドメインは、哺乳動物 PDGF-BB への結合について、DARPin # 23 ~ 60 の群より選択される結合タンパク質と競合する。好ましくは、前記リピートドメインは、哺乳動物 PDGF-BB への結合について、DARPin # 24、45、及び 50 の群からの結合タンパク質と競合する。より好ましくは、前記アンキリンリピートドメインは、哺乳動物 PDGF-BB への結合について、結合タンパク質 DARPin # 24 又は 50 と競合する。 20

【0073】

用語「結合について競合する」は、同じ標的に同時に結合するための本発明の 2 つの異なる結合ドメインの不能を意味し、両方が個々に同一の標的に結合することができる。このように、そのような 2 つの結合ドメインは、前記標的への結合について競合する。好ましくは、前記の 2 つの競合する結合ドメインは、前記標的上のオーバーラップする又は同じ結合エピトープに結合する。2 つの結合ドメインが標的への結合について競合するか否かを決定するための方法、例えば競合酵素結合免疫吸着検定法 (ELISA) 又は競合 SPR 測定 (例、BioRadからのProteon機器を使用することによる) などが、当業者に周知である。例えば、配列番号 # 49 又は配列番号 # 58 のアンキリンリピートドメインは、ヒト PDGF への結合について、配列番号 # 50 のアンキリンリピートドメインと競合する。 30

【0074】

用語「エピトープ」は、標的タンパク質 (例えば PDGF-BB など) の表面上の特定の部位を意味し、それに、本発明の結合ドメイン、例えばアンキリンリピートドメインなどが、それ自体を付着する。この用語は、抗体のエピトープへの類似性において定義され、それは、当業者に周知である。本発明の 2 つの結合ドメインが同じエピトープに結合する場合、それらは、PDGF-BB についての結合について競合する。エピトープの厳密な分子配置は、例えば、PDGF-BB との複合体中の本発明の結合ドメインのタンパク質 X 線結晶 (当業者に周知の方法) により、解明することができる。 40

【0075】

さらなる実施態様において、本発明は、哺乳動物 PDGF-BB についての結合特異性を伴う少なくとも 1 つのアンキリンリピートドメインを含む組換え結合タンパク質に関する、それにおいて、前記アンキリンリピートドメインは、配列番号 23 ~ 60 からなる群より選択される 1 つのアンキリンリピートドメインと少なくとも 70% アミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、

それにおいて、前記アンキリンリピートドメインの位置 1 の G 及び / 又は位置 2 の S が 50

、場合により、欠損しており；ならびに、

前記アンキリンリピートドメインの最後から二番目の位置の L 及び / 又は最後の位置の N が、場合により、A により交換される。

【0076】

好ましくは、本発明の組換え結合タンパク質中のそのようなアンキリンリピートドメインは、配列番号 24、45、及び 50；より好ましくは、24 及び 50 からなる群より選択される 1 つのアンキリンリピートドメインと少なくとも 70% のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0077】

好ましくは、本発明の組換え結合タンパク質中のそのようなアンキリンリピートドメインは、配列番号 23～60 からなる群より選択されるアンキリンリピートドメインの N 末端と C 末端キャッピングモジュールの間に存在する 1 つ、2 つ、もしくは 3 つのリピートモジュールと、少なくとも 70% アミノ酸配列同一性、例えば、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又は 100% アミノ酸配列同一性を伴うアミノ酸配列を含む。

【0078】

好ましくは、70% アミノ酸配列同一性の代わりに、本発明の組換え結合タンパク質中のそのようなアンキリンリピートドメイン又はアンキリンリピートドメイン中の N 末端と C 末端キャッピングモジュールの間に存在するそのような 1 つ、2 つ、もしくは 3 つのリピートモジュールは、少なくとも 75%、より好ましくは少なくとも 76%、より好ましくは少なくとも 80%、より好ましくは少なくとも 85%、より好ましくは少なくとも 90%、又は最も好ましくは少なくとも 95% アミノ酸配列同一性を伴うアミノ酸配列を含む。好ましくは、アミノ酸配列同一性の言及するパーセンテージは、フレームワーク位置中にある。

【0079】

好ましくは、リピートドメイン配列番号 23～60 における 30 アミノ酸まで、例えば、30、29、28、27、26、25、24、23、22、21、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、1、又は無アミノ酸が、別のアミノ酸により交換される。好ましくは、配列番号 23～60 における 25 までのアミノ酸、より好ましくは 20 までのアミノ酸、より好ましくは 15 までのアミノ酸、さらにより好ましくは 11 までのアミノ酸、より好ましくは 8 つまでのアミノ酸、より好ましくは 5 つまでのアミノ酸、より好ましくは 2 つまでのアミノ酸、及び最も好ましくは無アミノ酸が交換される。

【0080】

好ましくは、アミノ酸が配列番号 13 又は 16 のキャッピングモジュール、配列番号 12、14、15、17、18、及び 19 のリピートモジュール、又は配列番号 23～60 のリピートドメインにおいて交換される場合、これらのアミノ酸は、A、D、E、F、H、I、K、L、M、N、Q、R、S、T、V、W、及び Y からなる群より；より好ましくは、A、D、E、H、I、K、L、Q、R、S、T、V、及び Y からなる群より選択される。また、好ましくは、アミノ酸は、相同アミノ酸により交換される；即ち、アミノ酸は、同様の生物物理学的特性を伴う側鎖を有するアミノ酸により交換される。例えば、負荷電アミノ酸 D は、負荷電アミノ酸 E により置換されうる、又は、疎水性アミノ酸（例えば L など）は、A、I、又は V により置換されうる。ポリペプチド中の別のアミノ酸によるアミノ酸の交換の技術は当業者に周知である。

【0081】

さらなる実施態様において、本発明は、哺乳動物 P D G F - B B についての結合特異性を伴う少なくとも 1 つのアンキリンリピートドメインを含む組換え結合タンパク質に関し、それにおいて、前記アンキリンリピートドメインは、配列番号 23～60 からなる群よ

10

20

30

30

40

50

り選択され、

それにおいて、前記アンキリンリピートドメインの位置1のG及び/又は位置2のSが、場合により、欠損しており；ならびに、

前記アンキリンリピートドメインの最後から二番目の位置のL及び/又は最後の位置のNが、場合により、Aにより交換される。

【0082】

好ましくは、そのようなアンキリンリピートドメインは、配列番号24、45、及び50；より好ましくは、24及び50からなる群より選択される。

【0083】

さらなる実施態様において、本発明は、組換え結合タンパク質に関し、それにおいて、アンキリンリピートドメインは、配列番号23～60からなる群より選択されるアンキリンリピートドメインと同じエピトープに付着する。好ましくは、そのようなアンキリンリピートドメインは、配列番号24、45、及び50；より好ましくは、24及び50からなる群より選択される。

【0084】

さらなる実施態様において、本発明は、哺乳動物P D G F - B Bについての結合特異性を伴う少なくとも1つのアンキリンリピートドメインを含む組換え結合タンパク質に関し、それにおいて、前記アンキリンリピートドメインは、配列番号12、14、15、17、18、及び19からなる群より選択されるアミノ酸配列を有するアンキリンリピートモジュールならびに配列（それにおいて、配列番号12、14、15、17、18、及び19からなる群における9つまでのアミノ酸が、任意のアミノ酸により交換される）を含む。

【0085】

好ましくは、前記アンキリンリピートドメインのそのようなアンキリンリピートモジュールは、配列番号12、14、及び17；より好ましくは、12及び17からなる群より選択される。

【0086】

好ましくは、配列番号12、14、15、17、18、及び19のリピートモジュールにおける8つまでのアミノ酸が、別のアミノ酸、より好ましくは7つまでのアミノ酸、より好ましくは6つまでのアミノ酸、より好ましくは5つまでのアミノ酸、さらにより好ましくは4つまでのアミノ酸、より好ましくは3つまでのアミノ酸、より好ましくは2つまでのアミノ酸、及び最も好ましくは1つのアミノ酸により交換される。好ましくは、アミノ酸の言及する交換は、フレームワーク位置中にある。したがって、配列番号12、14、15、17、18、及び19のフレームワーク位置中の8つまでのアミノ酸を、任意のアミノ酸、好ましくは7、6、5、4、3、又は2までのアミノ酸、最も好ましくは1つのアミノ酸により交換する。

【0087】

さらなる実施態様において、本発明は、組換え結合タンパク質に関し、それにおいて、P D G F - B Bへの結合特異性を伴うアンキリンリピートドメインは、アンキリンリピート配列K D E E G T T P L H Y A A V W G H L E I V E V L L K A G A D V N A（配列番号12）及び配列（それにおいて、配列番号11における9つまでのアミノ酸が、任意のアミノ酸により交換され、ならびに、それにおいて、

位置3のEが、場合により、D、W、Q、I、及びY、好ましくはD及びWからなる群より選択されるアミノ酸により交換され；

位置4のEが、場合により、T、D、Y、及びS、好ましくはT及びDからなる群より選択されるアミノ酸により交換され；

位置6のTが、場合により、S及びFからなる群より選択されるアミノ酸により、好ましくはSにより交換され；

位置11のYが、場合により、Fにより交換され；

位置14のVが、場合により、A、Y、及びTからなる群より選択されるアミノ酸によ

10

20

30

40

50

り、好ましくは A により交換され；ならびに

位置 15 の W が、場合により、F、K、V、及び Y、好ましくは F 及び Y からなる群より選択されるアミノ酸により交換される) を伴うリピートモジュールを含む。

【0088】

さらなる実施態様において、本発明は、哺乳動物 P D G F - B B についての結合特異性を伴う少なくとも 1 つのアンキリンリピートドメインを含む組換え結合タンパク質に関し、それにおいて、前記アンキリンリピートドメインは、配列番号 13 及び 16 からなる群より選択されるアミノ酸配列を有するキャッピングモジュールならびに配列(それにおいて、配列番号 13 及び 16 における 9 つまでのアミノ酸が、任意のアミノ酸により交換される)を含む。

10

【0089】

好ましくは、前記アンキリンリピートドメイン中に含まれる配列番号 13 及び 16 のキャッピングモジュールにおける 8 つまでのアミノ酸が、配列番号 13 及び 16 における他のアミノ酸、より好ましくは 7 つまでのアミノ酸、より好ましくは 6 つまでのアミノ酸、より好ましくは 5 つまでのアミノ酸、さらにより好ましくは 4 つまでのアミノ酸、より好ましくは 3 つまでのアミノ酸、より好ましくは 2 つまでのアミノ酸、より好ましくは 1 つまでのアミノ酸、及び最も好ましくは無アミノ酸により交換される。

【0090】

さらに別の実施態様において、本発明は、組換え結合タンパク質に関し、それにおいて、P D G F - B B への結合特異性を伴うアンキリンリピートドメインは、配列 Q D I Y G A T P A D L A A L V G H E D I A E V L Q K L N (配列番号 13) 及び配列(それにおいて、配列番号 13 における 9 つまでのアミノ酸が、任意のアミノ酸により交換され、

20

それにおいて、

位置 3 の I が、場合により、K、L、A、及び V、好ましくは L、A、及び V からなる群より選択されるアミノ酸により交換され；

位置 4 の Y が、場合により、W、F、及び S、好ましくは W 及び F からなる群より選択されるアミノ酸により交換され；

位置 6 の A が、場合により、K により交換され；

位置 14 の L が、場合により、F、Y、及び D、好ましくは F 及び Y からなる群より選択されるアミノ酸により交換され；

30

位置 15 の V が、場合により、L、I、A、及び N、好ましくは L 及び I からなる群より選択されるアミノ酸により交換され；ならびに

位置 23 の V が、I 及び L からなる群より選択されるアミノ酸により交換される) を伴う C 末端キャッピングモジュールを含む。

【0091】

好ましいのは、組換え結合タンパク質であり、それにおいて、アンキリンリピートドメインは、配列番号 12 のアンキリンリピートモジュール及び C 末端キャッピングモジュール配列番号 13 を含む。好ましくは、前記 C 末端キャッピングモジュールは、前記アンキリンリピートドメイン中の前記アンキリンリピートモジュールに直接続く。

40

【0092】

さらに別の実施態様において、本発明は、組換え結合タンパク質に関し、それにおいて、P D G F - B B への結合特異性を伴うアンキリンリピートドメインは、アンキリンリピート配列 K D Q E G T T P L H F A A S V G H L E I V E V L L K A G A D V N A (配列番号 15) 及び配列(それにおいて、配列番号 15 における 9 つまでのアミノ酸が、任意のアミノ酸により交換され、ならびに、

それにおいて、

位置 3 の Q が、場合により、A により交換され；

位置 4 の E は、場合により、D により交換され；

位置 6 の T は、場合により、E により交換され；

位置 11 の F は、場合により、Y により交換され；

50

位置 14 の S は、場合により、V により交換され；及び  
位置 15 の V は、場合により、W により交換される) を伴うリピートモジュールを含む。  
。

【 0 0 9 3 】

さらに別の実施態様において、本発明は、組換え結合タンパク質に関し、それにおいて、P D G F - B B への結合特異性を伴うアンキリンリピートドメインは、配列 Q D H Y G A T P A D L A A L I G H E D I A E V L Q K L N (配列番号 16) 及び配列 (それにおいて、配列番号 15 における 9 つまでのアミノ酸が、任意のアミノ酸により交換され、ならびに、

それにおいて、

10

位置 3 の H が、場合により、I により交換され；ならびに、

位置 4 の Y は、場合により、W により交換される) を伴う C 末端キャッピングモジュールを含む。

【 0 0 9 4 】

さらに別の実施態様において、本発明は、組換え結合タンパク質に関し、それにおいて、P D G F - B B への結合特異性を伴うアンキリンリピートドメインは、アンキリンリピート配列 K D L N G Q T P L H L A A D I G H L E I V E V L L K A G A D V N A (配列番号 17) 及び配列 (それにおいて、配列番号 17 における 9 つまでのアミノ酸が、任意のアミノ酸により交換され、ならびに、

それにおいて、

20

位置 1 の K が、場合により、Q 又は I により交換され；

位置 3 の L は、場合により、N により交換され；及び

位置 27 の A は、場合により、H により交換される) を伴うリピートモジュールを含む。  
。

【 0 0 9 5 】

さらに別の実施態様において、本発明は、組換え結合タンパク質に関し、それにおいて、P D G F - B B への結合特異性を伴うアンキリンリピートドメインは、アンキリンリピート配列 K D Y A G S T P L R L A A W A G H L E I V E V L L K A G A D V N A (配列番号 18) 及び配列 (それにおいて、配列番号 18 における 9 つまでのアミノ酸が、任意のアミノ酸により交換され、ならびに、

30

それにおいて、

位置 1 の K が、場合により、Q により交換され；

位置 14 の W は、場合により、H により交換され；

位置 15 の A は、場合により、V により交換され；及び

位置 27 の A は、場合により、N 又は Y により交換される) を伴うリピートモジュールを含む。

【 0 0 9 6 】

さらに別の実施態様において、本発明は、組換え結合タンパク質に関し、それにおいて、P D G F - B B への結合特異性を伴うアンキリンリピートドメインは、アンキリンリピート配列 K D Y F G Y T P L H L A A Y F G H L E I V E V L L K A G A D V N A (配列番号 19) 及び配列 (それにおいて、配列番号 19 における 9 つまでのアミノ酸が、任意のアミノ酸により交換され、ならびに、

40

それにおいて、

位置 1 の K が、場合により、N により交換され；

位置 12 の A は、場合により、T により交換され；

位置 13 の A は、場合により、T により交換され；

位置 22 の E は、場合により、D により交換され；及び

位置 27 の A は、場合により、H 又は Y により交換される) を伴うリピートモジュールを含む。

【 0 0 9 7 】

50

さらに好ましいのは、N末端又はC末端アンキリンキャッピングリピートをそれぞれ含むN末端又はC末端アンキリンキャッピングモジュールであって、それにおいて、前記キヤッピングリピート中のアミノ酸残基の1つ又は複数が、対応するアンキリンキャッピング単位又はアンキリンリピート単位のアラインメント上の対応する位置で見出されるアミノ酸残基により置換される。

【0098】

アミノ酸の置換は、20の、ほとんどの場合、天然アミノ酸のいずれかによりうる、好ましくは、A、D、E、F、H、I、K、L、M、N、Q、R、S、T、V、W、及びYからなる群より；より好ましくは、A、D、E、H、I、K、L、Q、R、S、T、V、及びYからなる群より選択されるアミノ酸によりうる。また、好ましくは、アミノ酸の置換は、相同なアミノ酸による；即ち、アミノ酸は、同様の生物物理学的特性を伴う側鎖を有するアミノ酸により置換される。例えば、負荷電アミノ酸Dは、負荷電アミノ酸Eにより置換されうる、又は、疎水性アミノ酸（例えばLなど）は、A、I、又はVにより置換されうる。相同アミノ酸によるアミノ酸の置換は、当業者に周知である。

10

【0099】

また、好ましいのは、配列番号4～8、13、及び16に基づく上のC末端キャッピングモジュールのいずれかの位置27及び28にアミノ酸Aを含むC末端アンキリンキャッピングモジュールである。

【0100】

また、好ましいのは、配列番号4～8、13、及び16に基づく上のC末端キャッピングモジュールのいずれかの位置1～26まで又は位置1～27までのアミノ酸を含むC末端キャッピングモジュールである。

20

【0101】

配列番号1～3の位置1のアミノ酸G及び/又は位置2のSを、特性に対する任意の見かけ上の影響を伴わずに、N末端アンキリンキャッピングモジュールから除去することができる。これらの2つのアミノ酸は、アンキリンリピートドメインを、さらなるアミノ酸及びタンパク質に接続するためのリンカーとしての役割を果たす。本発明は、また、N末端アンキリンキャッピングモジュールを含む、そのようなアンキリンリピートドメインを含み、それにおいて、位置1のG及び/又は位置2のSが除去されている。本明細書において定義する通りのアンキリンリピートドメインにおけるアミノ酸位置（例、「位置33」）を、したがって、適応し、数のシフトをもたらすことが理解される。例えば、「位置33」は「位置32」になる（1つのアミノ酸が欠けている場合）、又は「位置33」は「位置31」になる（2つのアミノ酸が欠けている場合）。

30

【0102】

本発明のアンキリンリピートドメインのアンキリンキャッピングモジュールを、アンキリンキャッピングモジュールにより、当業者に公知の技術（例えばアミノ酸配列のアラインメント、変異誘発、及び遺伝子合成など）を組み合わせることにより交換することができる。例えば、配列番号49のC末端キャッピングリピートを、配列番号8のC末端キャッピングリピートにより、（i）配列番号8を伴う配列アラインメントによる、配列番号49のC末端キャッピングリピート（即ち、配列位置132～159）の決定、（i i）配列番号49の決定されたC末端キャッピングリピートの配列を、配列番号8の配列を用いて置換すること、（i i i）交換されたC末端キャッピングモジュールをコードするリピートドメインをコードする遺伝子の生成、（i v）大腸菌の細胞質中の改变リピートドメインの発現、及び（v）標準的な手段による改变リピートドメインの精製により置換することができる。さらなる例として、配列番号49のN末端キャッピングリピートを、配列番号2のN末端キャッピングリピートにより、（i）配列番号2を伴う配列アラインメントによる、配列番号49のN末端キャッピングリピート（即ち、配列位置1～32）の決定、（i i）配列番号49の決定されたN末端キャッピングリピートの配列を、配列番号2の配列を用いて置換すること、（i i i）交換されたN末端キャッピングモジュールをコードするリピートドメインをコードする遺伝子の生成、（i v）大腸菌の細胞質中

40

50

での改変リピートドメインの発現、及び( v )標準的な手段による改変リピートドメインの精製により置換することができる。

【 0 1 0 3 】

さらに、本発明のアンキリンリピートドメインは、N末端アンキリンキャッピングモジュール(例えば、配列番号2のN末端キャッピングリピート)、それに続く、1つ又は複数のリピートモジュール(例えば、配列番号49の位置33～131までのアミノ酸残基を含む3つのアンキリンリピートモジュール)及びC末端キャッピングモジュール(即ち、配列番号8のC末端キャッピングリピート)を、遺伝子合成の手段により組み立てることにより遺伝的に構築することができる。遺伝的に組み立てられたリピートドメイン遺伝子を、次に、上に記載する通りに、大腸菌において発現させることができる。

10

【 0 1 0 4 】

さらに好ましいのは、組換え結合タンパク質、リピートドメイン、リピートモジュール、アミノ酸C、M、又はNを欠くアミノ酸配列を有するN末端キャッピングモジュール又はC末端キャッピングモジュールである。

【 0 1 0 5 】

さらに好ましいのは、組換え結合タンパク質、リピートドメイン、リピートモジュール、アミノ酸N、それに続くGを欠くアミノ酸配列を有するN末端キャッピングモジュール又はC末端キャッピングモジュールである。

20

【 0 1 0 6 】

さらに好ましいのは、任意のそのようなN末端又はC末端キャッピングモジュールを含む組換え結合タンパク質又はリピートドメインである。

【 0 1 0 7 】

本発明に従ったアンキリンリピートドメインを含む組換え結合タンパク質のさらに好ましい実施態様において、前記リピートドメインのN末端キャッピングモジュールのアミノ酸残基の1つ又は複数を、N末端キャッピング単位のアラインメント上の対応する位置で見出されるアミノ酸残基により交換する。好ましくは、30%までのアミノ酸残基を交換し、より好ましくは、20%まで、さらにより好ましくは、10%までのアミノ酸残基を交換する。最も好ましくは、そのようなN末端キャッピング単位は、天然N末端キャッピング単位である。

30

【 0 1 0 8 】

本発明に従ったアンキリンリピートドメインを含む組換え結合タンパク質のさらに好ましい実施態様において、前記リピートドメインのC末端キャッピングモジュールのアミノ酸残基の1つ又は複数を、C末端キャッピング単位のアラインメント上の対応する位置で見出されるアミノ酸残基により交換する。好ましくは、30%までのアミノ酸残基を交換し、より好ましくは、20%まで、さらにより好ましくは、10%までのアミノ酸残基を交換する。最も好ましくは、そのようなC末端キャッピング単位は、天然C末端キャッピング単位である。

【 0 1 0 9 】

さらに別の特定の実施態様において、アミノ酸残基の30%まで、より好ましくは、アミノ酸残基の20%まで、さらにより好ましくは、10%までを、リピート単位、N末端キャッピング単位、又はC末端キャッピング単位の対応する位置において見出されないアミノ酸を用いて交換する。

40

【 0 1 1 0 】

用語「コンセンサス配列」は、アミノ酸配列を指し、それにおいて、前記コンセンサス配列は、複数のリピート単位の構造的及び/又は配列アラインメントにより得られる。2つ又はそれ以上の構造的及び/又は配列アラインメントリピート単位を使用し、そしてアラインメントにおけるギャップを許すことで、各々の位置で最も高頻度なアミノ酸残基を決定することが可能である。コンセンサス配列は、各々の位置で最も高頻度に表わされるアミノ酸を含むその配列である。2つ又はそれ以上のアミノ酸が、平均を上回り单一の位置で表わされる事象において、コンセンサス配列は、それらのアミノ酸のサブセットを含

50

みうる。前記の2つ又はそれ以上のリピート単位は、単一のリピートタンパク質中に含まれるリピート単位から、あるいは、2つ又はそれ以上の異なるリピートタンパク質から取ってもよい。

【0111】

コンセンサス配列及びそれらを決定するための方法は、当業者に周知である。

【0112】

「コンセンサスアミノ酸残基」は、コンセンサス配列中の特定の位置で見出されるアミノ酸である。2つ又はそれ以上、例、3、4、又は5つのアミノ酸残基が、2つ又はそれ以上のリピート単位において同様の確率で見出される場合、コンセンサスアミノ酸は、最も高頻度で見出されるアミノ酸の1つ、あるいは、2つ又はそれ以上のアミノ酸残基の組み合わせでありうる。

10

【0113】

さらに好ましいのは、非天然キャッピングモジュール、リピートモジュール、結合タンパク質、又は結合ドメインである。

【0114】

用語「非天然」は、合成又は天然からではないことを意味し、より具体的には、この用語はヒトの手製を意味する。用語「非天然結合タンパク質」又は「非天然結合ドメイン」は、前記結合タンパク質又は前記結合ドメインが、合成（即ち、アミノ酸からの化学的合成により產生される）又は組換えであり、天然からではないことを意味する。「非天然結合タンパク質」又は「非天然結合ドメイン」は、それぞれヒトが作ったタンパク質又はドメインであり、対応する設計核酸の発現により得られる。好ましくは、発現は、真核生物もしくは細菌の細胞中で、又は、無細胞インビトロ発現系を使用することにより行われる。さらに、この用語は、前記結合タンパク質又は前記結合ドメインの配列が、配列データベース中、例えば、GenBank、EMBL-Bank、又はSwiss-Prot中の非人工配列エントリーとして存在しないことを意味する。これらのデータベース及び他の同様の配列データベースが、当業者に周知である。

20

【0115】

1つの特定の実施態様において、本発明は、PDGF-BBへ特異的に結合するアンキリンリピートドメインを含み、及び血管内皮成長因子A（VEGF-A）へ特異的に結合するアンキリンリピートドメインをさらに含む組換え結合タンパク質に関する。PDGF-BBについての特異性を伴うアンキリンリピートドメインの例を、本明細書において与え、VEGF-Aへの特異性を伴うアンキリンリピートドメインの例が、WO 2010/060748 (US 2011/0207668) 及びWO 2011/135067 (US 2013/0116197)において記載されており、その全開示が、参照により、本明細書において組み入れられる。そのような2つのリピートドメインを、ポリペプチドリンカーにより、遺伝的手段により、当業者に公知の方法により連結することができる。本発明の1つの実施態様において、PDGF-BBに特異的に結合するアンキリンリピートドメイン及びVEGF-Aに特異的に結合するアンキリンリピートドメインを含む組換え結合タンパク質を使用し、網膜の疾患及び脈絡膜新生血管疾患、例えば滲出性加齢黄斑変性症、ポリープ状脈絡膜血管新生、及び病的近視などを処置してもよい。

30

【0116】

別の好ましい実施態様は、PDGF-BBへの結合に関する1、2、3又はそれ以上の内部リピートモジュールを含む、PDGF-BBについての結合特異性を伴うアンキリンリピートドメインを含む組換え結合タンパク質である。好ましくは、そのようなアンキリンリピートドメインは、N末端キャッピングモジュール、2~4の内部リピートモジュール、及びC末端キャッピングモジュールを含む。また、好ましくは、前記キャッピングモジュールは、キャッピングリピートである。また、好ましくは、前記キャッピングモジュールは、PDGF-BBへの結合に関する。

40

【0117】

さらに好ましいのは、PDGF-BBについての結合特異性を伴う前記アンキリンリピ

50

ートドメインの2つ又はそれ以上を含む組換え結合タンパク質である。好ましくは、前記結合タンパク質は、前記リピートドメインの2つ又は3つを含む。前記の2つ又はそれ以上のリピートドメインは、同じ又は異なるアミノ酸配列を有する。

【0118】

本発明に従ったアンキリンリピートドメインを含む組換え結合タンパク質のさらに好ましい実施態様において、前記アンキリンリピートドメインのリピートモジュールのアミノ酸残基の1つ又は複数を、リピート単位のアラインメント上の対応する位置で見出されるアミノ酸残基により交換する。好ましくは、30%までのアミノ酸残基を交換し、より好ましくは、20%まで、さらにより好ましくは、10%までのアミノ酸残基を交換する。最も好ましくは、そのようなリピート単位は、天然リピート単位である。

10

【0119】

さらに別の実施態様において、アミノ酸残基の30%まで、例えば、アミノ酸残基の29%、28%、27%、26%、25%、24%、23%、22%、21%、20%、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、又は0%を、リピート単位の対応する位置において見出されないアミノ酸を用いて交換する。より好ましくは、アミノ酸残基の20%まで、さらにより好ましくは10%までを、リピート単位の対応する位置において見出されないアミノ酸を用いて交換する。

【0120】

さらなる実施態様において、本明細書において記載する組換えP D G F - B B 結合タンパク質又はドメインのいずれかを、1つ又は複数の追加の部分、例えば、異なる標的に結合し、二重特異的結合薬剤を作る部分、生物活性化合物、標識部分（例、蛍光標識、例えばフルオレセイン、又は放射活性トレーサーなど）、タンパク質精製を促進する部分（例、小ペプチドタグ、例えばH i s タグ又はs t r e p タグなど）、改善された治療的効力のためにエフェクター機能を提供する部分（例、抗体依存的な細胞媒介性細胞傷害性を提供する抗体のF c 部分、毒性タンパク質部分、例えば緑膿菌外毒素A（E T A ）など、又は小分子毒性薬剤、例えばメイタンシノイド又はD N A アルキル化薬剤など）、又は改善された薬物動態を提供する部分などに共有結合的に結合させてもよい。改善された薬物動態は、認知された治療的な必要性に従って評価されうる。しばしば、恐らくは、タンパク質が、投与後に、血清中で利用可能なままである時間を増加させることにより、バイオアベイラビリティを増加させること及び／又は用量の間の時間を増加させることが望ましい。一部の例において、経時的なタンパク質の血清濃度の連続性を改善させる（例、投与後から短時間での濃度と次の投与前から短時間での濃度の間のタンパク質の血清濃度における差を減少させる）ことが望ましい。血液からのクリアランスを遅くする傾向がある部分は、ヒドロキシエチルデンブン（H E S ）、ポリエチレングリコール（P E G ）、糖（例、シアル酸）、十分に許容されるタンパク質部分（例、F c フラグメント又は血清アルブミン）、及び豊富な血清タンパク質（例えば抗体F c フラグメント又は血清アルブミンなど）についての特異性及び親和性を伴う結合ドメイン又はペプチドを含む。血清アルブミンについての親和性を伴う、そのような結合ドメインの例が、W O 2 0 1 2 / 0 6 9 6 5 4において提供されている。本発明の組換え結合タンパク質を、哺乳動物において（例、マウス、ラット、又はヒトにおいて）、ポリペプチドのクリアランス速度を、非修飾ポリペプチドと比べて、3倍より大きく低下させる部分に付着させてもよい。

30

【0121】

さらなる実施態様において、本発明は、特定の組換え結合タンパク質、特定のアンキリンリピートドメイン、特定のアンキリンリピートモジュール、及び特定のキャッピングモジュールをコードする核酸分子に関する。さらに、前記核酸分子を含むベクターを考える。

40

【0122】

さらに、上で言及した組換え結合タンパク質、特に、リピートドメインを含む結合タンパク質、又は特定の結合タンパク質をコードする核酸分子の1つ又は複数、ならびに、場

50

合により、医薬的に許容可能な担体及び／又は希釈剤を含む医薬的組成物を考える。医薬的に許容可能な担体及び／又は希釈剤は、当業者に公知であり、下でより詳細に説明する。さらに、上で言及した結合タンパク質、特に、リピートドメインを含む結合タンパク質の1つ又は複数を含む診断用組成物を考える。

## 【0123】

医薬的組成物は、上に記載する組換え結合タンパク質及び医薬的に許容可能な担体、賦形剤、又は安定剤を含む（例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. [1980]に記載される通り）。当業者に公知の適した担体、賦形剤、又は安定剤は、生理食塩水、リングル溶液、デキストロース溶液、ハンクス溶液、固定油、オレイン酸エチル、生理食塩水中の5%デキストロース、等張性及び化学的安定性を増強させる物質、緩衝液、ならびに保存剤である。他の適した担体は、それ自体が、組成物（例えば、タンパク質、多糖類、ポリ乳酸、ポリグリコール酸、重合アミノ酸、及びアミノ酸共重合体など）を受ける個体に有害な抗体の産生を誘導しない任意の担体を含む。医薬的組成物は、また、追加の活性薬剤（例えば抗癌剤又は抗血管形成剤など）を含む組み合せ製剤でありうる。

## 【0124】

インビオ投与のために使用される製剤は、無菌又は滅菌でなければならない。これは、滅菌ろ過膜を通したろ過により容易に達成される。

## 【0125】

医薬的組成物は、当業者の知識内の任意の適した方法により投与されうる。

10

## 【0126】

さらに、上で言及する医薬的組成物のいずれかが、障害の処置のために考えられる。

## 【0127】

本発明は、さらに、処置の方法を提供する。この方法は、それを必要とする患者に、本発明の結合タンパク質の治療的に効果的な量、すなわち、患者に所望の効果を生じるのに十分な量を投与することを含む。

20

## 【0128】

さらに、それを必要とする患者に、上で言及する医薬的組成物の効果的な量を投与することを含む、ヒトを含む哺乳動物において病理学的状態を処置する方法が考えられる。

## 【0129】

そのような病理学的状態の例は、アテローム性動脈硬化症、再狭窄、肺高血圧症、眼及び網膜疾患ならびに線維性疾患（肺線維症、肝硬変、強皮症、糸球体硬化症、及び心線維症を含む）である。また、抗P D G F - B B 治療は、腫瘍学、病理学的状態（例えば神経膠腫、肉腫、白血病、リンパ腫、及び上皮癌など）のために有用である。

30

## 【0130】

本発明に従った組換え結合タンパク質又はアンキリンリピートドメインは、いくつかの方法、例えばバクテリオファージ（WO 1990/002809、WO 2007/006665）又は細菌細胞（WO 1993/010214）の表面上でのディスプレイ、リボソームディスプレイ（WO 1998/048008）、プラスミド上のディスプレイ（WO 1993/008278）、又は共有結合的RNAリピートタンパク質ハイブリッド構築物を使用することにより（WO 2000/032823）、又は細胞内発現及び選択／スクリーニング、例えばタンパク質相補性アッセイ（WO 1998/341120）などにより得られうる及び／又はさらに進化されうる。そのような方法は、当業者に公知である。

40

## 【0131】

本発明に従った組換え結合タンパク質又はアンキリンリピートドメインの選択／スクリーニングのために使用されるアンキリンリピートタンパク質のライブラリーは、当業者に公知のプロトコールに従って得てもよい（WO 2002/020565、Binz, H.K., et al., J. Mol. Biol., 332, 489-503, 2003、及びBinz et al., 2004、前掲文献）。P D G F - B B についての特異性を伴うアンキリンリピートドメインの選択のための、その

50

のようなライブラリーの使用を、実施例1において例示する。さらに、本発明のアンキリンリピートドメインは、本発明に従ったアンキリンリピートモジュール及び適切なキャッピングモジュール又はキャッピングリピート(Forrer, P., et al., FEBS letters 539, 2-6, 2003)から、標準的な組換えDNA技術(例、WO 2002/020565, Binz et al., 2003、前掲文献、及びBinz et al., 2004、前掲文献)を使用して、モジュール組み立てされうる。

#### 【0132】

本発明は、実施例に記載される特定の実施態様に制限されない。他の供給源を、以下に記載する一般的な概要に従って使用及び加工してよい。

#### 【0133】

#### 実施例

#### 【0134】

下に開示する出発材料及び試薬の全てが、当業者に公知であり、商業的に利用可能である、又は、周知の技術を使用して調製することができる。

#### 【0135】

#### 材料

化学薬品はFluka (Switzerland) から購入した。オリゴヌクレオチドはMicrosynth (Switzerland) からであった。特記なき場合、DNAポリメラーゼ、制限酵素、及び緩衝液は、New England Biolabs (USA) 又はFermentas (リトアニア) からであった。クローニング及びタンパク質産生株は、大腸菌XL1-b1ue (Stratagene, USA) 又はBL21 (Novagen, USA) であった。組換えヒト及びマウスPDGF-BBを、Reliatech (ドイツ；それぞれ、製品番号200-055及びM10-125) から購入した。ビオチン化PDGF-BBを、標準的なビオチン化試薬及び方法を使用して、タンパク質の1級アミンへのビオチン部分のカップリングを介して化学的に得た。

#### 【0136】

#### 分子生物学

特記なき場合、方法は、記載されるプロトコールに従って実施する (Sambrook J., Fritsch E. F. and Maniatis T., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory 1989, New York)。

#### 【0137】

#### 設計アンキリンリピートタンパク質ライブラリー

設計アンキリンリピートタンパク質ライブラリーを生成するための方法が、記載されている (WO 2002/020565; Binz et al. 2003、前掲文献; Binz et al. 2004、前掲文献)。そのような方法により、無作為化アンキリンリピートモジュール及び/又は無作為化キャッピングモジュールを有する設計アンキリンリピートタンパク質ライブラリーを構築することができる。例えば、そのようなライブラリーは、したがって、固定化N末端キャッピングモジュール(例、配列番号2のN末端キャッピングモジュール)又は配列番号64に従った無作為化N末端キャッピングモジュール、配列番号20、62、又は63の配列モチーフに従った1つ又は複数の無作為化リピートモジュール、及び固定化C末端キャッピングモジュール(例、配列番号8のC末端キャッピングモジュール)又は配列番号65に従った無作為化C末端キャッピングモジュールに基づいて組み立てることができうる。好ましくは、そのようなライブラリーを、リピート又はキャッピングモジュールの無作為化位置にアミノ酸C、G、M、N (G残基の前に)、又はPを有さないよう組み立てる。また、配列番号20、62、又は63の配列モチーフに従った無作為化リピートモジュールを、さらに、位置10及び/又は位置17で無作為化することができうる；配列番号64の配列モチーフに従った無作為化N末端キャッピングモジュールを、さらに、位置7及び/又は位置9で無作為化することができうる；ならびに、配列番号65の配列モチーフに従った無作為化C末端キャッピングモジュールを、さらに、位置10、11、及び/又は17で無作為化することができうる。

#### 【0138】

10

20

30

40

50

さらに、そのようなライブラリー中のそのような無作為化モジュールは、無作為化アミノ酸位置を伴う追加のポリペプチドループ挿入を含みうる。そのようなポリペプチドループ挿入の例は、抗体の相補性決定領域（CDR）ループライブラリー又はデノボ生成されたペプチドライブラリーである。例えば、そのようなループ挿入を、ガイドンスとして、ヒトリボヌクレアーゼLのN末端アンキリンリピートドメインの構造を使用して設計することができる（Tanaka, N., Nakanishi, M., Kusakabe, Y., Goto, Y., Kitade, Y., Nakamura, K.T., EMBO J. 23(30), 3929-3938, 2004）。10のアミノ酸が、2つのアンキリンリピートドメインと同様に、アンキリンリピートタンパク質ライブラリーは、アンキリンリピートドメインの1つ又は複数のベータ-ターン中に挿入される可変長（例、1～20のアミノ酸）の無作為化ループ（固定化及び無作為化位置を伴う）を含んでもよい。

10

## 【0139】

アンキリンリピートタンパク質ライブラリーの任意のそのようなN末端キャッピングモジュールは、好ましくは、RILLLAモチーフ（例、配列番号64における位置21から26に存在する）の代わりに、RELLKA又はRILKAAモチーフを持ち、アンキリンリピートタンパク質ライブラリーの任意のそのようなC末端キャッピングモジュールは、好ましくは、KLNモチーフ（例、配列番号65における最後の3つのアミノ酸）の代わりに、KAA又はKLAモチーフを持つ。

20

## 【0140】

そのようなアンキリンリピートタンパク質ライブラリーの設計は、標的と相互作用するアンキリンリピートドメインの公知の構造により導かれうる。そのような構造の例は、それらのProtein Data Bank（PDB）固有のアクセション又は同定コード（PDB-ID）により同定され、1WDY、3V31、3V30、3V2X、3V2O、3UXG、3TWQ-3TWX、1N11、1S70、及び2ZGDである。

20

## 【0141】

設計アンキリンリピートタンパク質ライブラリーの例（例えばN2C及びN3C設計アンキリンリピートタンパク質ライブラリーなど）が記載されている（WO 2002/020565；Binz et al. 2003、前掲文献；Binz et al. 2004、前掲文献）。N2C及びN3C中の桁は、N末端とC末端キャッピングモジュールの間に存在する無作為化リピートモジュールの数を記載する。

30

## 【0142】

リピート単位及びモジュール内部の位置を定義するために使用される命名法は、Binz et al. 2004、前掲文献に基づき、アンキリンリピートモジュール及びアンキリンリピート単位の境界が、1つのアミノ酸位置だけシフトしているという改変を伴う。例えば、Binz et al. 2004（前掲文献）のアンキリンリピートモジュールの位置1は、本開示のアンキリンリピートモジュールの位置2に対応する。結果的に、Binz et al. 2004（前掲文献）のアンキリンリピートモジュールの位置33は、本開示の以下のアンキリンリピートモジュールの位置1に対応する。

30

## 【0143】

全てのDNA配列をシークエンシングにより確認し、全ての記載されたタンパク質の算出された分子量を質量分析により確認した。

40

## 【0144】

実施例1：PDGF-BBについての結合特異性を伴うアンキリンリピートドメインを含む結合タンパク質の選択

## 【0145】

リボソームディスプレイ（Hanes, J. and Plueckthun, A., PNAS 94, 4937-42, 1997）を使用し、PDGF-BBについての結合特異性を伴う多くの設計アンキリンリピートタンパク質（DARPin）を、Binz et al. 2004（前掲文献）により記載される通りのDARPinライブラリーより選択した。特異的（PDGF-BB）及び非特異的（MBP、大腸菌マルトース結合タンパク質）標的に向けた、選択されたクローンの結合を、粗抽

50

出物 E L I S A により評価し、 P D G F - B B 結合タンパク質が成功裏に選択されたことを示す。例えば、配列番号 2 3 ~ 6 1 のアンキリンリピートドメインは、 P D G F - B B についての結合特異性を伴うアンキリンリピートドメインを含む、選択された結合タンパク質のアミノ酸配列を構成する。 P D G F - B B への結合特異性を伴う、そのようなアンキリンリピートドメインからの個々のアンキリンリピートモジュールを、配列番号 1 2 、 1 4 、 1 5 、 1 7 、 1 8 、及び 1 9 において提供する。 P D G F - B B への結合特異性を伴う、そのようなアンキリンリピートドメインの個々のキャッピングモジュールを、配列番号 1 3 及び 1 6 において提供する。

## 【 0 1 4 6 】

リボソームディスプレイによる P D G F - B B 特異的アンキリンリピートタンパク質の選択 10

P D G F - B B 特異的アンキリンリピートタンパク質の選択は、リボソームディスプレイ (Hanes and Plueckthun、前掲文献) により、標的タンパク質としてのヒト及びマウス P D G F - B B 、上に記載される通りの設計アンキリンリピートタンパク質のライブラリー、及び確立されたプロトコール (Zahnd, C., Amstutz, P. and Plueckthun, A., Nat. M ethods 4, 69-79, 2007) を使用して実施した。各々の選択ラウンド後の逆転写 (R T) - P C R サイクルの数を、 4 0 から 3 0 に、一定に低下させ、結合剤の濃縮に起因する収率に調整した。選択の最初の 4 ラウンドでは、標準的なリボソームディスプレイ選択を行い、減少する標的濃度及び増加する洗浄ストリンジエンシーを使用し、ラウンド 1 からラウンド 4 まで選択圧を増加させた (Binz et al. 2004、前掲文献)。高親和性の抗 P D G F - B B D A R P i n を濃縮するために、標準的なリボソームディスプレイ選択 (上) の第 4 ラウンドからのアウトプットを、増加した選択ストリンジエンシーを伴うオフ速度選択ラウンドに供した (Zahnd, 2007、前掲文献)。最後の標準的な選択ラウンドを実施し、オフ速度選択された結合タンパク質を增幅及び回収した。 20

## 【 0 1 4 7 】

選択されたクローンは、粗抽出物 E L I S A により示される通り、 P D G F - B B に特異的に結合する

P D G F - B B に特異的に結合する個々の選択された D A R P i n を、酵素結合免疫吸着検定法 (E L I S A) により、 D A R P i n 発現細胞の大腸菌粗抽出物を使用して、標準的なプロトコールを使用して同定した。リボソームディスプレイにより選択された D A R P i n を、 p Q E 3 0 (Qiagen) 発現ベクター中にクローン化し、大腸菌 X L 1 - B 1 u e (Strategene) 中に形質転換し、次に、 3 7 で、 1 ml の成長培地 (1% グルコース及び 1 0 0  $\mu$ g/ml アンピシリンを含む 2 Y T) を含む 9 6 深底ウェルプレート (單一ウェル中に各々のクローン) 中で一晩成長させた。 5 0  $\mu$ g/ml アンピシリンを含む 1 ml の新鮮 2 Y T に、新鮮な 9 6 深底ウェルプレートにおいて、 1 0 0  $\mu$ l の一晩培養物を用いて接種した。 3 7 で 2 時間にわたるインキュベーション後、発現を I P T G (1 mM 最終濃度) で誘導し、 3 時間にわたり持続した。細胞を収集し、 1 0 0  $\mu$ l の B - P E R I I (Pierce) 中に再懸濁させ、室温で、攪拌を伴い、 1 5 分間にわたりインキュベートした。次に、 9 0 0  $\mu$ l の P B S - T C (0.25% カゼイン加水分解物、 0.1% Tween20 (登録商標) 、 p H 7.4 を添加した P B S ) を加え、細胞細片を遠心により除去した。 1 0 0  $\mu$ l の各々の溶解クローンを、 P D G F - B B 又はそれらのビオチン部分を介して固定化された無関係の M B P のいずれかを含む、 NeutrAvidin コーティングした MaxiSorp プレートのウェルに適用し、 1 時間にわたり室温でインキュベートした。 P B S - T (0.1% Tween 20 (登録商標) 、 p H 7.4 を用いて補充した P B S ) を用いた広範囲の洗浄後、プレートを、モノクローナルホースラディッシュ標識抗 R G S (H i s) 4 抗体 (3 4 6 5 0 , Qiagen) を使用した標準的 E L I S A 手順を使用して現像した。結合を、次に、 P O D 基質 (Roche) により検出した。色の発生を、 4 0 5 n m で測定した。そのような細胞粗抽出物 E L I S A による数百のクローンのスクリーニングによって、 P D G F - B B についての特異性を伴う百を上回る異なる D A R P i n が明らかになった。これらの結合タンパク質を、さらなる分析のために選んだ。 P D G F - B B に特異的に結合する、 40

Tween 20 (登録商標) 、 p H 7.4 を用いて補充した P B S ) を用いた広範囲の洗浄後、プレートを、モノクローナルホースラディッシュ標識抗 R G S (H i s) 4 抗体 (3 4 6 5 0 , Qiagen) を使用した標準的 E L I S A 手順を使用して現像した。結合を、次に、 P O D 基質 (Roche) により検出した。色の発生を、 4 0 5 n m で測定した。そのような細胞粗抽出物 E L I S A による数百のクローンのスクリーニングによって、 P D G F - B B についての特異性を伴う百を上回る異なる D A R P i n が明らかになった。これらの結合タンパク質を、さらなる分析のために選んだ。 P D G F - B B に特異的に結合する、 50

選択されたアンキリンリピートドメインのアミノ酸配列の例を、配列番号 23 ~ 61 について提供する。

【0148】

P D G F - B B についての結合特異性を伴うこれらのアンキリンリピートドメイン及び P D G F - B B についての結合特異性を伴わないネガティブコントロール D A R P i n (即ち、D A R P i n # 21 及び # 22) を、下に記載する通りの単純なタンパク質精製を促進するための N 末端 H i s タグを提供する p Q E (QIAgen, Germany) ベースの発現ベクター中にクローン化した。このように、以下の D A R P i n をコードする発現ベクターを構築した：

D A R P i n # 21 (その N 末端に融合された H i s タグ (配列番号 9 ) を伴う配列番号 21) ; 10  
 D A R P i n # 22 (その N 末端に融合された H i s タグ (配列番号 9 ) を伴う配列番号 22) ;  
 D A R P i n # 23 (その N 末端に融合された H i s タグ (配列番号 9 ) を伴う配列番号 23) ;  
 D A R P i n # 24 (その N 末端に融合された H i s タグ (配列番号 9 ) を伴う配列番号 24) ;  
 D A R P i n # 25 (その N 末端に融合された H i s タグ (配列番号 9 ) を伴う配列番号 25) ; 20  
 D A R P i n # 26 (その N 末端に融合された H i s タグ (配列番号 9 ) を伴う配列番号 26) ;  
 D A R P i n # 27 (その N 末端に融合された H i s タグ (配列番号 9 ) を伴う配列番号 27) ;  
 D A R P i n # 28 (その N 末端に融合された H i s タグ (配列番号 9 ) を伴う配列番号 28) ;  
 D A R P i n # 29 (その N 末端に融合された H i s タグ (配列番号 9 ) を伴う配列番号 29) ;  
 D A R P i n # 30 (その N 末端に融合された H i s タグ (配列番号 9 ) を伴う配列番号 30) ;  
 D A R P i n # 31 (その N 末端に融合された H i s タグ (配列番号 9 ) を伴う配列番号 31) ; 30  
 D A R P i n # 32 (その N 末端に融合された H i s タグ (配列番号 9 ) を伴う配列番号 32) ;  
 D A R P i n # 33 (その N 末端に融合された H i s タグ (配列番号 9 ) を伴う配列番号 33) ;  
 D A R P i n # 34 (その N 末端に融合された H i s タグ (配列番号 9 ) を伴う配列番号 34) ;  
 D A R P i n # 35 (その N 末端に融合された H i s タグ (配列番号 9 ) を伴う配列番号 35) ;  
 D A R P i n # 36 (その N 末端に融合された H i s タグ (配列番号 9 ) を伴う配列番号 36) ; 40  
 D A R P i n # 37 (その N 末端に融合された H i s タグ (配列番号 9 ) を伴う配列番号 37) ;  
 D A R P i n # 38 (その N 末端に融合された H i s タグ (配列番号 9 ) を伴う配列番号 38) ;  
 D A R P i n # 39 (その N 末端に融合された H i s タグ (配列番号 9 ) を伴う配列番号 39) ;  
 D A R P i n # 40 (その N 末端に融合された H i s タグ (配列番号 9 ) を伴う配列番号 40) ;  
 D A R P i n # 41 (その N 末端に融合された H i s タグ (配列番号 9 ) を伴う配列番 50

号 4 1 ) ;  
 D A R P i n # 4 2 ( その N 末端に融合された H i s タグ ( 配列番号 9 ) を伴う配列番号 4 2 ) ;  
 D A R P i n # 4 3 ( その N 末端に融合された H i s タグ ( 配列番号 9 ) を伴う配列番号 4 3 ) ;  
 D A R P i n # 4 4 ( その N 末端に融合された H i s タグ ( 配列番号 9 ) を伴う配列番号 4 4 ) ;  
 D A R P i n # 4 5 ( その N 末端に融合された H i s タグ ( 配列番号 9 ) を伴う配列番号 4 5 ) ;  
 D A R P i n # 4 6 ( その N 末端に融合された H i s タグ ( 配列番号 9 ) を伴う配列番号 4 6 ) ;  
 D A R P i n # 4 7 ( その N 末端に融合された H i s タグ ( 配列番号 9 ) を伴う配列番号 4 7 ) ;  
 D A R P i n # 4 8 ( その N 末端に融合された H i s タグ ( 配列番号 9 ) を伴う配列番号 4 8 ) ;  
 D A R P i n # 4 9 ( その N 末端に融合された H i s タグ ( 配列番号 9 ) を伴う配列番号 4 9 ) ;  
 D A R P i n # 5 0 ( その N 末端に融合された H i s タグ ( 配列番号 9 ) を伴う配列番号 5 0 ) ;  
 D A R P i n # 5 1 ( その N 末端に融合された H i s タグ ( 配列番号 9 ) を伴う配列番号 5 1 ) ;  
 D A R P i n # 5 2 ( その N 末端に融合された H i s タグ ( 配列番号 9 ) を伴う配列番号 5 2 ) ;  
 D A R P i n # 5 3 ( その N 末端に融合された H i s タグ ( 配列番号 9 ) を伴う配列番号 5 3 ) ;  
 D A R P i n # 5 4 ( その N 末端に融合された H i s タグ ( 配列番号 9 ) を伴う配列番号 5 4 ) ;  
 D A R P i n # 5 5 ( その N 末端に融合された H i s タグ ( 配列番号 9 ) を伴う配列番号 5 5 ) ;  
 D A R P i n # 5 6 ( その N 末端に融合された H i s タグ ( 配列番号 9 ) を伴う配列番号 5 6 ) ;  
 D A R P i n # 5 7 ( その N 末端に融合された H i s タグ ( 配列番号 9 ) を伴う配列番号 5 7 ) ;  
 D A R P i n # 5 8 ( その N 末端に融合された H i s タグ ( 配列番号 9 ) を伴う配列番号 5 8 ) ;  
 D A R P i n # 5 9 ( その N 末端に融合された H i s タグ ( 配列番号 9 ) を伴う配列番号 5 9 ) ;  
 D A R P i n # 6 0 ( その N 末端に融合された H i s タグ ( 配列番号 9 ) を伴う配列番号 6 0 ) ;  
 D A R P i n # 6 1 ( その N 末端に融合された H i s タグ ( 配列番号 9 ) を伴う配列番号 6 1 ) 。  
 【 0 1 4 9 】

D A R P i n の高レベル及び可溶性発現

さらなる分析のために、上に記載する通りの細胞粗抽出物 E L I S A において特異的な P D G F - B B 結合を示す、選択されたクローンを、大腸菌 B L 2 1 又は X L 1 - B 1 u e 細胞において発現させ、標準的なプロトコールを使用し、それらの H i s タグを使用して精製した。5 0 m l の静置一晩培養物 ( T B 、 1 % グルコース、 1 0 0 m g / l アンピシリン ; 3 7 ) を使用し、 1 1 の培養物 ( グルコースを伴わない同じ培地 ) に接種した。6 0 0 n m での吸光度 0 . 7 ( B L 2 1 については 1 ) で、培養物を、 0 . 5 m M I P T G を用いて誘導し、 3 7 で 4 時間にわたりインキュベートした。培養物を遠心し、結果として

10

20

30

30

40

50

得られたペレットを、40mlのTBS500 (50mM Tris-HCl、500mM NaCl、pH 8) 中に再懸濁し、超音波処理した。ライセートを再遠心し、グリセロール (10% (v/v) 最終濃度) 及びイミダゾール (20mM 最終濃度) を、結果として得られた上清に加えた。タンパク質を、製造者 (QIAgen、ドイツ) の指示に従い、Niニトリロ三酢酸カラム (2.5mlカラム容積) 上で精製した。あるいは、6×Hisタグを欠くDARPin又は選択されたリピートドメインを、陰イオン交換クロマトグラフィー、それに続くサイズ排除クロマトグラフィーにより、標準的な樹脂及び当業者に公知のプロトコールに従って精製した。PDGF-BBへの結合特異性を伴う、高度に可溶性のDARPinの200mgまでを、1リットルの大腸菌培養物から精製することができ、SDS-15% PAGEから推定した通り、純度 > 95%を伴う。そのような精製DARPinを、さらなる特徴付けのために使用する。  
10

#### 【0150】

実施例2：表面プラズモン共鳴分析による、PDGF-BBについての特異性のための結合を伴うDARPinの特徴付け

#### 【0151】

ヒト及びマウスからのビオチン化PDGF-BB分子を、フローセルにおいて、コーディングしたストレプトアビジンへの結合を通じて固定化し、種々の選択されたDARPinとの相互作用を分析した。

#### 【0152】

##### 表面プラズモン共鳴 (SPR) 分析

SPRを、ProteOn機器 (BioRad) を使用して測定した。測定は、当業者に公知の標準的な手順に従って実施した。泳動緩衝液は、0.005% Tween 20 (登録商標) を含むPBS (pH 7.4) であった。ニュートラビジンを、GLCチップ (BioRad) 上で、約8000共鳴単位 (RU) のレベルまで、共有結合的に固定化した。ニュートラビジンでコーティングしたチップ上でPDGF-BBの固定化を、次に、実施した。DARPin-PDGF-BBの相互作用を、次に、12.5、6.26、3.13、及び1.67nM (オン速度測定) の濃度のDARPinの連続希釈物を含む100μlの泳動緩衝液 (0.005% Tween (登録商標) を含むPBS) を注射することにより測定し、一定流速30μl/分 (オフ速度測定) で、10分間から3時間までの間の泳動緩衝液流が続いた。非コーティングレファレンスセル及びレファレンス注射 (即ち、泳動緩衝液だけの注射) のシグナル (即ち、共鳴単位 (RU) 値) を、PDGF-BBの注射後に得られたRUトレースから減算した (ダブルレファレンス)。オン速度及びオフ速度の測定値から得られたSRPトレースから、対応するDARPin-PDGF-BB相互作用のオン及びオフ速度を決定することができる。  
20

#### 【0153】

結果を表1にまとめた。解離定数 (Kd) を、推定されたオン及びオフ速度から、当業者に公知の標準的な手順を使用して算出した。

10

20

30

## 【表1】

表1: SPRにより決定したDARPin PDGF-BB相互作用  
(ヒト及びマウス)の解離定数

DARPin#	Kd [M] (ヒト)	Kd [M] (マウス)	
23	2.14E-11	1.72E-11	
24	3.01E-11	n.d.	
25	1.47E-11	1.28E-11	10
26	1.77E-11	1.74E-11	
28	1.71E-11	n.d.	
29	1.05E-10	n.d.	
30	1.10E-10	n.d.	
31	1.09E-10	n.d.	
32	6.38E-11	8.34E-11	
33	8.06E-11	9.04E-11	
34	7.75E-11	5.92E-11	20
35	9.56E-11	9.81E-11	
36	2.42E-11	5.30E-11	
37	1.52E-10	8.28E-11	
38	9.41E-11	5.83E-11	
39	1.72E-10	3.82E-10	
40	3.44E-11	6.08E-11	
42	8.05E-11	9.74E-11	
43	1.29E-06	1.51E-06	
44	7.68E-11	9.02E-11	30
45	1.08E-10	n.d.	
46	1.12E-10	n.d.	
47	9.37E-11	n.d.	
48	1.13E-10	1.21E-10	
49	7.69E-11	1.02E-10	
50	1.15E-10	n.d.	
51	1.21E-10	n.d.	
53	1.28E-10	n.d.	40
54	2.45E-10	n.d.	
55	5.55E-11	n.d.	
56	1.50E-10	n.d.	
57	1.23E-10	n.d.	
58	2.57E-10	n.d.	
59	1.71E-10	n.d.	

n.d.: 未決定

実施例3：P D G F - B Bについての結合特異性を伴うD A R P i nによる線維芽細胞増殖の阻害

【0155】

N I H - 3 T 3 線維芽細胞は、P D G F - B Bを含むアッセイのために使用した標準的な細胞株であった。1日目、70%~80%コンフルエンスで、細胞を収集し、96ウェルプレート中に、成長培地で5000個細胞/ウェルの密度を伴い播種し、培地をアッセイ培地に変えることによる約7~8時間後での細胞の飢餓が続き、24時間にわたりインキュベートした。全てのインキュベーション条件は、37で、5% C O<sub>2</sub>流を伴った。細胞の飢餓に続き、2日目、培地を、成長因子ヒトP D G F - B Bの希釈系列を含む新鮮アッセイ培地(増殖アッセイ用)又は阻害アッセイ用のD A R P i nの2.5倍希釈系列(200nM~0.05nM)を伴う20ng/mLヒトP D G F - B Bの阻害混合物に変えた。細胞を、別の48時間にわたり、この条件において、20μLのW S T - 1試薬(Roche製品番号11644807001)の添加時にインキュベートした。この試薬によって、生細胞の数を分析する比色アッセイが可能になる。シグナルの読み出しを、W S T - 1の添加後2、4、及び6時間のいくつかの時点で、A<sub>600nm</sub>での補正バックグラウンドを伴い、A<sub>450nm</sub>で行った。

10

【0156】

結果を表2においてまとめた。I C<sub>50</sub>値を、GraphPad Prismソフトウェア及び当業者に公知の標準的な手順を使用し、上に記載する通りに得られた滴定曲線から算出した。例の滴定曲線を、D A R P i n # 49について、図1において与える。

20

【表2】

表2: PDGF-BBにより誘導されたNIH-3T3細胞増殖の種々のDARPinによる阻害効力

DARPin#	I C <sub>50</sub> [nM]
24	1.4
28	1.6
30	3.2
49	1.9
59	2.0

30

【0157】

実施例4：受容体競合アッセイによるP D G F - B Bについての結合特異性を伴うD A R P i nの特徴付け

【0158】

その受容体P D G F R b e t aへのヒトP D G F - B Bの結合を阻害するためのP E G化抗P D G F - B B D A R P i nの効力を、受容体競合E L I S A(PDGF-BB Quantikine, R&D Systemsに基づく)において決定した。P D G F R b e t a / F cキメラをマイクロプレート上にプレコーティングしている。D A R P i nを、PDGF-BB Quantikineキット(R&D Systems)からのアッセイ希釈剤中で、定められた量のP D G F - B Bを用いてプレインキュベートし、室温で、2時間にわたり、750rpmでの攪拌を伴いインキュベートした。これらのプレインキュベーション混合物を、次に、プレコーティングしたウェル中に移し、D A R P i nにより遮断されない任意のP D G F - B Bを、固定化した受容体により結合させた。任意の非結合物質を洗い流した後、P D G F - B Bについて特異的なホースラディッシュペルオキシダーゼ連結ポリクローナル抗体をウェルに加えた。任意の非結合抗体-酵素試薬を除去するための洗浄に続き、基質溶液をウェルに加え、色が、結合したP D G F - B Bの量に比例して発生していた。色の発生を停止させ、色の密度を405nmで測定した。このアッセイにおいて、テストしたD A R P i nは、表3において

40

50

まとめる通り、高いPDGF-BB阻害効力を示した。例の滴定曲線を、DARPinのセットについて、図2において与える。IC<sub>50</sub>値を、GraphPad Prismソフトウェア及び当業者に公知の標準的な手順を使用し、上に記載する通りに得られた滴定曲線から算出した。

【表3】

表3: DARPinによるその受容体PDGFRbetaとのPDGF-BB相互作用の阻害  
(平均IC<sub>50</sub>値を与える)

DARPin#	IC <sub>50</sub> [pM]	
23	22	10
24	15	
28	16	
29	15	
30	490	
31	480	
34	210	
37	> 400	20
38	85	
44	130	
45	160	
46	150	
47	140	
49	66	
50	32	
51	8	30
52	68	
53	36	
54	210	
55	14	
56	170	
57	204	
58	470	40

【0159】

実施例5: PDGF-BBについての結合特異性を伴うDARPinによるマウスにおけるレーザー誘導性脈絡膜血管新生の阻害

【0160】

新生血管の成長に対する効果をインビボでテストした。マウスのレーザー脈絡膜血管新生モデルを選び、発表及び記載されている通りに実施した (Takahashi, K., Saishin, Y., Saishin, Y., King, A.G., Levin, R. and Campochiaro, P.A., Arch. Ophthalmol. 127 (4), 494 - 499, 2009)。

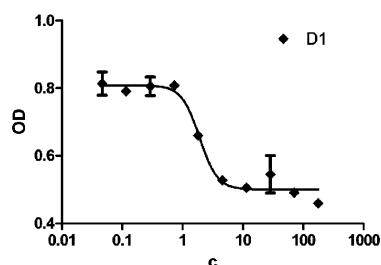
脈絡膜血管新生 (CNV) を、以前に記載された通りに、ブルッフ膜のレーザー光凝固

誘導性破裂により誘導した。2日目に、成体 C 5 7 B L / 6 マウスを、塩酸ケタミン (100 mg/kg 体重) を用いて麻酔し、瞳孔を、1% トロピカミドを用いて散大させた。532 nm ダイオードレーザー光凝固 (75  $\mu$ m スポットサイズ、0.1 秒の継続時間、120 mW) の 3 つの熱傷を、各々の網膜に、OcuLight GL ダイオードレーザーのスリットランプ送達システムを用いて、網膜を見るためのコンタクトレンズとしてハンドヘルドカバースリップを使用して送達した。熱傷を、網膜の後極の 9、12、及び 3 時の位置において実施した。レーザー時の気泡の产生は、ブルッフ膜の破裂を示し、脈絡膜血管新生を得る際の重要な因子であり、従って、気泡が产生した熱傷だけを試験に含めた。D A R P i n # 6 1 - P E G 2 0 を、毎日、それぞれ濃度 10 又は 1 mg/kg を用いて、図 3 において示す通りに投与した。14 日目、マウスを、フルオレセイン標識デキストランを用いて心臓灌流し、網膜フラットマウントを、記載される通りに調製し (Takahashi et al.、前掲文献)、新生血管形成の面積を、画像分析により定量化した。統計分析を、1 方向 A N O V A 及びダネットポストテストを使用して実施し、全ての D A R P i n 群を賦形剤群と比較した。これらの技術は、全て、当業者に公知である。結果を図 3 に示す。

10

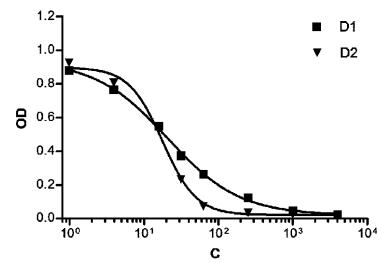
【図 1】

Fig. 1



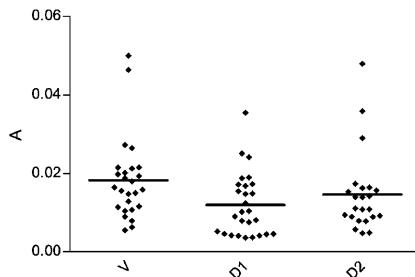
【図 2】

Fig. 2



【図 3】

Fig. 3



【配列表】

2015522576000001.app

## 【国際調査報告】

<b>INTERNATIONAL SEARCH REPORT</b>		International application No. PCT/EP2013/063488
<b>Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of Item 1.c of the first sheet)</b>		
1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:		
a. (means)		
<input type="checkbox"/>	on paper	
<input checked="" type="checkbox"/>	in electronic form	
b. (time)		
<input checked="" type="checkbox"/>	in the international application as filed	
<input type="checkbox"/>	together with the international application in electronic form	
<input type="checkbox"/>	subsequently to this Authority for the purpose of search	
2. <input type="checkbox"/> In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in 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/EP2013/063488

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C12N15/10 C07K14/49 C07K14/71 G01N33/68
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)  
C12N C07K G01N

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, Sequence Search, EMBASE, FSTA, WPI Data

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 02/20565 A2 (UNIV ZUERICH [CH]; STUMPP MICHAEL TOBIAS [CH]; FORRER PATRICK [CH]; BI) 14 March 2002 (2002-03-14) cited in the application the whole document ----- X BINZ H KASPAR ET AL: "High-affinity binders selected from designed ankyrin repeat protein libraries", NATURE BIOTECHNOLOGY, NATURE PUBLISHING GROUP, NEW YORK, NY, US, vol. 22, no. 5, 18 April 2004 (2004-04-18) , pages 575-582, XP002343919, ISSN: 1087-0156, DOI: 10.1038/NBT962 cited in the application the whole document ----- -/-	1-7, 9-19,21, 23,24
		1-7, 9-19,21, 23,24

Further documents are listed in the continuation of Box C.

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

29 August 2013

19/09/2013

Name and mailing address of the ISA/

Authorized officer

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel: (+31-70) 340-2040,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Madruga, Jaime

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2013/063488

## C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	STUMPP M T ET AL: "DARPins: A new generation of protein therapeutics", DRUG DISCOVERY TODAY, ELSEVIER, RAHWAY, NJ, US, vol. 13, no. 15-16, 1 August 2008 (2008-08-01), pages 695-701, XP023440383, ISSN: 1359-6446, DOI: 10.1016/J.DRUDIS.2008.04.013 [retrieved on 2008-07-11] cited in the application the whole document -----	1-7, 9-19,21, 23,24
X	WO 2011/135067 A1 (MOLECULAR PARTNERS AG [CH]; BINZ HANS KASPAR [CH]; FORRER PATRIK [CH];) 3 November 2011 (2011-11-03) cited in the application the whole document -----	1-7, 9-19,21, 23,24
X	WO 2009/068649 A2 (GLAXO GROUP LTD [GB]; ASHMAN CLAIRE [GB]; BATUWANGALA THIL [GB]; BURDE) 4 June 2009 (2009-06-04) pages 28,35,36; claims 14, 15; sequence 128 -----	1-7, 9-19,21, 23,24
Y	pages 24,25; examples -----	1-7, 9-19,21, 23,24
X	WO 2006/129828 A2 (CANON KK [JP]; SHIOTUKA HIDENORI [JP]; HATAKEYAMA SATORU [JP]; NOMOTO) 7 December 2006 (2006-12-07) claims; sequence 6 -----	1-7, 9-19,21, 23,24
Y	SHEN ET AL: "An antibody directed against PDGF receptor beta enhances the antitumor and the anti-angiogenic activities of an anti-VEGF receptor 2 antibody", BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, ACADEMIC PRESS INC. ORLANDO, FL, US, vol. 357, no. 4, 10 May 2007 (2007-05-10), pages 1142-1147, XP022106979, ISSN: 0006-291X, DOI: 10.1016/J.BBRC.2007.04.075 the whole document -----	1-7, 9-19,21, 23,24
Y	HONGCHAO SHAN ET AL: "Inhibitory effect of soluble platelet-derived growth factor receptor [beta] on intraosseous growth of breast cancer cells in nude mice", CANCER SCIENCE, vol. 102, no. 10, 4 August 2011 (2011-08-04), pages 1904-1910, XP055035691, ISSN: 1347-9032, DOI: 10.1111/j.1349-7006.2011.02026.x the whole document -----	1-7, 9-19,21, 23,24
3	-----	-/-

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2013/063488

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2006/050984 A2 (SCHERING AG [DE]; BEIER RUDOLF [DE]; PUEHLER FLORIAN [DE]) 18 May 2006 (2006-05-18) claims; example 7 -----	1-7, 9-19,21, 23,24
X,P	PETER-CHRISTIAN KLÖHN ET AL: "IBC's 23nd Annual Antibody Engineering, 10th Annual Antibody Therapeutics International Conferences and the 2012 Annual Meeting of The Antibody Society: December 3-6, 2012, San Diego, CA", MABS, vol. 5, no. 2, 3 December 2012 (2012-12-03), - 1 March 2013 (2013-03-01), pages 178-201, XP055070468, ISSN: 1942-0862, DOI: 10.4161/mabs.23655 page 195, right-hand column -----	1-3, 24-26
X,P	Leonardzehr: "Molecular Partners continues to validate DARPin platform", BioTuesdays , 11 September 2012 (2012-09-11), XP002711999, Retrieved from the Internet: URL: <a href="http://biotuesdays.com/2012/09/11/molecular-partners-continues-to-validate-darpin-platform/">http://biotuesdays.com/2012/09/11/molecular-partners-continues-to-validate-darpin-platform/</a> [retrieved on 2013-08-29] page 2 -----	1-3, 24-26
3		

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No  
PCT/EP2013/063488

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO 0220565	A2 14-03-2002	AT 448301 T AU 1816602 A CA 2421447 A1 DK 1332209 T3 EP 1332209 A2 EP 2149604 A1 ES 2335861 T3 JP 2004508033 A US 2004132028 A1 US 2009082274 A1 US 2012142611 A1 WO 0220565 A2		15-11-2009 22-03-2002 14-03-2002 29-03-2010 06-08-2003 03-02-2010 06-04-2010 18-03-2004 08-07-2004 26-03-2009 07-06-2012 14-03-2002
WO 2011135067	A1 03-11-2011	AR 081361 A1 AU 2011247563 A1 CA 2797996 A1 CN 103002920 A EP 2563400 A1 JP 2013531616 A KR 20130076821 A SG 185068 A1 TW 201141509 A US 2013116197 A1 WO 2011135067 A1		29-08-2012 10-01-2013 03-11-2011 27-03-2013 06-03-2013 08-08-2013 08-07-2013 28-12-2012 01-12-2011 09-05-2013 03-11-2011
WO 2009068649	A2 04-06-2009	AR 069495 A1 AU 2008328726 A1 CA 2706419 A1 CN 101932608 A CO 6280497 A2 DE 112008003232 T5 EA 201000704 A1 EP 2222709 A2 EP 2615115 A2 EP 2641919 A2 GB 2468232 A JP 2011504742 A KR 20100097720 A MA 31940 B1 PE 12342009 A1 TW 200944231 A US 2009148905 A1 US 2011008345 A1 UY 31504 A1 WO 2009068649 A2		27-01-2010 04-06-2009 04-06-2009 29-12-2010 20-05-2011 24-02-2011 30-12-2010 01-09-2010 17-07-2013 25-09-2013 01-09-2010 17-02-2011 03-09-2010 01-12-2010 07-09-2009 01-11-2009 11-06-2009 13-01-2011 17-07-2009 04-06-2009
WO 2006129828	A2 07-12-2006	US 2009215197 A1 WO 2006129828 A2		27-08-2009 07-12-2006
WO 2006050984	A2 18-05-2006	AU 2005303912 A1 BR P10517834 A CA 2585435 A1 CN 101056646 A CN 101875919 A EA 200700975 A1 EP 1812026 A2 EP 2292246 A1 JP 2008519590 A		18-05-2006 21-10-2008 18-05-2006 17-10-2007 03-11-2010 28-12-2007 01-08-2007 09-03-2011 12-06-2008

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No  
PCT/EP2013/063488

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
	KR 20070085314 A		27-08-2007
	NZ 554429 A		27-08-2010
	NZ 581958 A		28-01-2011
	NZ 585895 A		27-05-2011
	NZ 591733 A		26-10-2012
	US 2008206201 A1		28-08-2008
	US 2011020282 A1		27-01-2011
	WO 2006050984 A2		18-05-2006
	ZA 200705060 A		31-12-2008

## 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 15/09 (2006.01) C 1 2 N 15/00 A

(81) 指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,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,R,S,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,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,H,R,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KN,KP,KR,KZ,LA,LK,LR,LS,LT,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,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC

(74) 代理人 100145104  
弁理士 膝館 祥治

(74) 代理人 100122736  
弁理士 小國 泰弘

(74) 代理人 100122747  
弁理士 田中 洋子

(74) 代理人 100132540  
弁理士 生川 芳徳

(72) 発明者 バウマン,ミヒヤエル  
スイス国、ツェーハー - 8 4 0 6 ヴィンタートゥール、アグネスシュトラーセ 8

F ターム(参考) 4B024 AA01 BA61 BA80 CA01 DA03 DA06 EA04 GA11 HA01 HA08  
4C084 AA02 AA13 BA01 BA08 BA23 CA53 DB70 NA14 ZA331 ZC411  
4H045 AA10 AA30 BA10 EA20 FA74