

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6010528号
(P6010528)

(45) 発行日 平成28年10月19日 (2016. 10. 19)

(24) 登録日 平成28年9月23日 (2016. 9. 23)

(51) Int. Cl.

F I

C 0 7 K 14/47 (2006. 01)
A 6 1 K 38/04 (2006. 01)
A 6 1 K 39/395 (2006. 01)
A 6 1 P 27/02 (2006. 01)
A 6 1 P 9/00 (2006. 01)

C O 7 K 14/47 Z N A
A 6 1 K 37/43
A 6 1 K 39/395 D
A 6 1 K 39/395 N
A 6 1 P 27/02

請求項の数 20 (全 29 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2013-506674 (P2013-506674)
(86) (22) 出願日 平成23年4月29日 (2011. 4. 29)
(65) 公表番号 特表2013-531616 (P2013-531616A)
(43) 公表日 平成25年8月8日 (2013. 8. 8)
(86) 国際出願番号 PCT/EP2011/056824
(87) 国際公開番号 W02011/135067
(87) 国際公開日 平成23年11月3日 (2011. 11. 3)
審査請求日 平成26年4月3日 (2014. 4. 3)
(31) 優先権主張番号 10161685. 2
(32) 優先日 平成22年4月30日 (2010. 4. 30)
(33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

(73) 特許権者 511109065
モレキュラー・パートナーズ・アーゲー
MOLECULAR PARTNERS
AG
スイス国、ツェーハー 8 9 5 2 シュリ
ーレン、ヴァーギシュトラッセ 1 4
(74) 代理人 110001508
特許業務法人 津国
(74) 代理人 100078662
弁理士 津国 肇
(74) 代理人 100131808
弁理士 柳橋 泰雄
(74) 代理人 100135873
弁理士 小澤 圭子

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 VEGF-Aレセプターの相互作用を阻害する改変結合タンパク質

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

アンキリン反復ドメインおよびポリエチレングリコール部分を含むリコンビナント結合タンパク質であって、該アンキリンドメインが、VEGF-A 165と結合し、VEGFR-2に結合するVEGF-A 165を阻害し、

前記アンキリン反復ドメインは、(1) 配列番号：1のアミノ酸1ないし159と、(2) 配列番号：2のアミノ酸1ないし159と、(3) 配列番号：3のアミノ酸1ないし126と、(4) 配列番号：4のアミノ酸1ないし126と、(5) 配列番号：5のアミノ酸1ないし126と、(6) 配列番号：6のアミノ酸1ないし126と、(7) 配列番号：7のアミノ酸1ないし159とからなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、前記ポリエチレングリコール部分は1 kDaないし100 kDaの分子量を有する、リコンビナント結合タンパク質。

【請求項 2】

アンキリン反復ドメインが、そのC末端でペプチド結合を介してポリペプチドリンカーおよびC末端Cys残基にコンジュゲーションしている結合タンパク質であって、該C末端Cysのチオールが、ポリエチレングリコール部分にコンジュゲーションしており、該ポリエチレングリコール部分はマレイミド結合ポリエチレングリコールである、請求項1記載の結合タンパク質。

【請求項 3】

マレイミド結合ポリエチレングリコールが、 α -[3-(3-マレイミド-1-オキシ

10

20

プロピル) アミノ] プロピル - ω - メトキシ - ポリオキシエチレンである、請求項 2 記載の結合タンパク質。

【請求項 4】

配列番号：2、3、5、6 または 7 のアンキリン反復タンパク質から成る群より選択されるアンキリン反復タンパク質を含む、請求項 1 記載の結合タンパク質。

【請求項 5】

ポリエチレングリコール部分が、10 ないし 40 kDa の分子量を有する、請求項 2 ~ 4 のいずれか一項記載の結合タンパク質。

【請求項 6】

配列番号：3 のアンキリン反復タンパク質を含み、該アンキリン反復タンパク質の C 末端 C y s のチオールが、ポリエチレングリコール部分にコンジュゲーションしており、該ポリエチレングリコール部分はマレイミド結合ポリエチレングリコールである、請求項 1 記載の結合タンパク質。

10

【請求項 7】

マレイミド結合ポリエチレングリコールが、 α - [3 - (3 - マレイミド - 1 - オキシプロピル) アミノ] プロピル - ω - メトキシ - ポリオキシエチレンであり、ポリエチレングリコール部分が、少なくとも 10 kDa の分子量を有する、請求項 6 記載の結合タンパク質。

【請求項 8】

請求項 1 ~ 7 のいずれか一項記載の結合タンパク質の有効量と、場合により薬学的に許容されうる担体および / または希釈剤とを含む、病的血管新生の処置に使用するための薬学的組成物。

20

【請求項 9】

眼疾患の処置に使用するための、請求項 8 記載の薬学的組成物。

【請求項 10】

硝子体内注射による眼疾患の処置に使用するための、請求項 8 記載の薬学的組成物。

【請求項 11】

病的血管新生処置用医薬を製造するための請求項 1 ~ 7 のいずれか一項記載の結合タンパク質の使用であって、該結合タンパク質の有効量がそれを必要とする患者に投与される、使用。

30

【請求項 12】

配列番号：3 のアミノ酸 1 ないし 126 を含むアンキリン反復ドメインおよびポリエチレングリコール部分を含むリコンビナント結合タンパク質であって、該ポリエチレングリコール部分は 2 ないし 40 kDa の分子量を有し、前記アンキリン反復ドメインは、その C 末端でペプチド結合を介して C 末端 C y s 残基を有するポリペプチドリンカーにコンジュゲーションしており、該 C 末端 C y s のチオールが、ポリエチレングリコール部分にコンジュゲーションし、該ポリエチレングリコール部分はマレイミド結合ポリエチレングリコールであり、該マレイミド結合ポリエチレングリコールは、 α - [3 - (3 - マレイミド - 1 - オキシプロピル) アミノ] プロピル - ω - メトキシ - ポリオキシエチレンである、リコンビナント結合タンパク質。

40

【請求項 13】

配列番号：3 のアミノ酸 1 ないし 126 を含むアンキリン反復ドメインおよびポリエチレングリコール部分を含むリコンビナント結合タンパク質であって、該ポリエチレングリコール部分は 2 ないし 40 kDa の分子量を有し、配列番号：3 のアミノ酸配列は、その C 末端 C y s 残基のチオールを介してポリエチレングリコール部分にコンジュゲーションしており、該ポリエチレングリコール部分はマレイミド結合ポリエチレングリコールであり、該マレイミド結合ポリエチレングリコールが、 α - [3 - (3 - マレイミド - 1 - オキシプロピル) アミノ] プロピル - ω - メトキシ - ポリオキシエチレンである、リコンビナント結合タンパク質。

【請求項 14】

50

ポリエチレングリコール部分は15ないし30kDaの分子量を有する、請求項13記載のリコンビナント結合タンパク質。

【請求項15】

請求項13記載の結合タンパク質の有効量と、場合により薬学的に許容されうる担体および/または希釈剤とを含む、病的血管新生の処置に使用するための薬学的組成物。

【請求項16】

眼疾患の処置に使用するための、請求項15記載の薬学的組成物。

【請求項17】

硝子体内注射による眼疾患の処置に使用するための、請求項15記載の薬学的組成物。

【請求項18】

請求項12記載の結合タンパク質の有効量と、場合により薬学的に許容されうる担体および/または希釈剤とを含む、病的血管新生の処置に使用するための薬学的組成物。

【請求項19】

眼疾患の処置に使用するための、請求項18記載の薬学的組成物。

【請求項20】

病的血管新生処置用医薬を製造するための請求項12記載の結合タンパク質の使用であって、該結合タンパク質の有効量がそれを必要とする患者に投与される、使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

発明の分野

本発明は、VEGF-Aに特異的な改変リコンビナント結合タンパク質、そのようなタンパク質を含む薬学的組成物ならびに腫瘍および眼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

既存の脈管系からの新しい血管の成長である血管新生は、腫瘍成長および眼疾患を含めたいくつかの病的状態、特に加齢性黄斑変性(AMD)または糖尿病性黄斑浮腫(DME)などの眼の新生血管形成疾患における重要な過程である(Carmeliet, P., Nature 438, 932-936, 2005)。血管内皮成長因子(VEGF)は、内皮細胞においてVEGFレセプター(VEGFR)チロシンキナーゼを活性化することによって血管新生およびリンパ管新生を刺激する(Ferrara, N., Gerber, H. P. and LeCouter, J., Nature Med. 9, 669-676, 2003)。

【0003】

哺乳類VEGFファミリーは、VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D(FIGFとしても知られている)および胎盤成長因子(PlGF、PGFとしても知られている)と呼ばれる5種の糖タンパク質から成る。VEGF-Aは、抗血管新生療法のための有効なターゲットであることが示されている(Ellis, L. M. and Hicklin, D. J., Nature Rev. Cancer 8, 579-591, 2008)。VEGF-Aリガンドは、VEGFR-1(FLT1としても知られている)、VEGFR-2(KDRとしても知られている)およびVEGFR-3(FLT4としても知られている)と呼ばれる、構造が類似した3種のIII型レセプター型チロシンキナーゼに結合して活性化させる。VEGFリガンドは、これらチロシンキナーゼレセプターのそれぞれに対して別個の結合特異性を有し、そのことがそれらの機能多様性の原因となる。リガンドの結合に応答して、VEGFRチロシンキナーゼは、別個の下流のシグナル伝達経路のネットワークを活性化する。VEGFR-1およびVEGFR-2は、主に血管内皮上から見出され、一方でVEGFR-3は、大部分はリンパ管内皮上から見出される。これらのレセプターは、全て、細胞外ドメイン、1回膜貫通領域、およびキナーゼ挿入ドメインによって割り込まれたコンセンサスチロシンキナーゼ配列を有する。最近になって、本来セマフォリン/コラプシンファミリーのニューロンガイダンスメディエーターに対するレセプターとして同定されたニューロピ

10

20

30

40

50

リン (NRP - 1) が、VEGF - A に対するアイソフォーム特異的レセプターとして作用することが示された。

【0004】

VEGF - A 遺伝子内の 8 個のエクソンからの選択的スプライシングによって生成する様々なアイソフォームの VEGF - A が知られている。全てのアイソフォームは、エクソン 1 ~ 5 および末端エクソンであるエクソン 8 を有する。ヘパリン結合ドメインをコードするエクソン 6 および 7 は、含まれることがあるし、含まれないこともある。これにより、それらのアミノ酸の数に応じて VEGF - A 165、VEGF - A 121、VEGF - A 189 などと名付けられるタンパク質ファミリーが生じる。しかしながら、エクソン 8 は、ヌクレオチド配列中に 2 個の 3' スプライス部位を有し、その部位が細胞によって使用されて、同一の長さであるが C 末端アミノ酸配列が異なる 2 種のファミリーのアイソフォームを生成する可能性がある (Varey, A.H.R. et al., British J. Cancer 98, 1366-1379, 2008)。血管新生促進ファミリーのアイソフォームである VEGF - A xxx (「xxx」は成熟タンパク質のアミノ酸の数を示す) は、エクソン 8 中の最も近位の配列の使用によって生成する (エクソン 8 a が含まれるようになる)。最近になって記載された抗血管新生性 VEGF - A xxx b アイソフォームは、近位のスプライス部位から遺伝子に沿って 66 bp 離れた遠位のスプライス部位の使用によって生成する。これは、スプライシングによるエクソン 8 a の切り出しおよび VEGF - A xxx b ファミリーをコードする mRNA 配列の産生を招く。VEGF - A 165 は、主な血管新生促進アイソフォームであり、一般に多様なヒト固形腫瘍に過剰発現している。VEGF - A 165 b は、最初に同定された、エクソン 8 b をコードするアイソフォームであり、抗血管新生効果を有することが示された (Varey et al., 上記引用文中; Konopatskaya, O. et al., Molecular Vision 12, 626-632, 2006)。それは、内因性阻害型の VEGF - A であり、VEGF - A が誘導する内皮細胞の増殖および移動を減少させる。それは、VEGFR - 2 に結合することができるが、VEGF - A 165 b の結合は下流のシグナル伝達経路のレセプターのリン酸化も活性化も招かない。

【0005】

抗体によるリガンドまたはレセプターの中和を含めた VEGF - A シグナル伝達阻害ならびにチロシンキナーゼ阻害剤を用いた VEGF - A レセプターの活性化およびシグナル伝達遮断のためのいくつかのアプローチがある。VEGF - A ターゲティング療法は、AMD、DME、腎細胞ガンおよび肝細胞ガンに単剤として有効であるが、一方で転移性結腸直腸ガン、非小細胞肺癌および転移性乳がんを有する患者に対しては化学療法と組み合わせた場合にのみ有益であることが示されている (Narayanan, R. et al., Nat Rev. Drug Discov. 5, 815-816, 2005; Ellis and Hicklin, 上記引用文中)。

【0006】

リガンドまたはレセプターを中和するために、抗体に加えて他の結合ドメインを使用することができる (Skerra, A., J. Mol. Recog. 13, 167-187, 2000; Binz, H. K., Amstutz, P. and Plueckthun, A., Nat. Biotechnol. 23, 1257-1268, 2005)。一つのそのような新規クラスの結合ドメインは、設計された反復ドメインをベースとする (国際公開公報第 02/20565 号; 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)。国際公開公報第 02/20565 号は、大きなライブラリーの反復タンパク質をどのように構築することができるか、およびその一般応用について記載している。それにもかかわらず、国際公開公報第 02/20565 号は、VEGF - A xxx に対して結合特異性を有する反復ドメインの選択も、VEGF - A xxx に対して特異的に結合する反復ドメインの具体的な反復配列モチーフも開示していない。

【0007】

現在利用可能な治療法で VEGF - A をターゲティングすることは、全ての患者にも全ての疾患に対しても有効なわけではない (例えば EGF R 発現ガン)。VEGF - A ターゲティング療法に関連する治療上の利益は複雑であり、おそらく複数のメカニズムを伴う

10

20

30

40

50

ことが、ますます明らかになりつつさえある (Ellis and Hicklin、上記引用文中)。例えば、ベバシズマブ (Avastin (登録商標)) もしくはラニビズマブ (Lucentis (登録商標)) (国際公開公報第 96/030046 号、国際公開公報第 98/045331 号および国際公開公報第 98/045332 号参照) などの市販の抗 VEGF 薬、または VEGF-Trap (登録商標) (国際公開公報第 00/075319 号) などの臨床開発中の薬物は、血管新生促進型の VEGF-A と抗血管新生型の VEGF-A を区別しないので、両方を阻害する。結果として、それらの薬物は血管新生を阻害するが、健康な組織から不可欠な生存因子、すなわち VEGF-Axxx b も欠乏させ、細胞毒性および用量制限性の副作用を生じ、そのことが今度は有効性を制限する。現行の抗 VEGF-A 療法に共通の副作用は、消化管穿孔、出血、高血圧、血栓塞栓症およびタンパク尿である (Kamba, T. and McDonald, D.M., Br. J. Cancer 96, 1788-95, 2007)。AMD の処置用の別の市販抗 VEGF 薬はペガプタニブである (国際公開公報第 98/018480 号; Macugen (登録商標)、Pfizer の登録商標)。ペガプタニブは、ターゲットタンパク質に特異的に結合する単鎖核酸である PEG 化抗 VEGF アプタマーである。新生血管 AMD の処置のために、Lucentis (登録商標) を用いた視力の転帰が Macugen (登録商標) よりも優れているという十分な証拠があり、薬物間の安全性の差を示唆する決定的な証拠はない。結果として、Macugen (登録商標) は、この疾患のために一般に使用される治療法ではない。

【0008】

総じて、ガンおよび他の病的状態を処置するために改善された抗血管新生剤の必要性が存在する。

【0009】

本発明の根底をなす技術的問題は、ガンおよび他の病的状態、例えば AMD または DME などの眼疾患の改善された処置用の、VEGF-Axxx に対して結合特異性を有する反復ドメインなどの新規な抗血管新生剤を同定することである。この技術的課題の解決は、特許請求の範囲に特徴づけられた態様を提供することによって達成される。

【0010】

発明の概要

本発明は、アンキリン反復ドメインおよび少なくとも分子量 5 kDa のポリエチレングリコール部分を含むリコンビナント結合タンパク質に関し、ここで、該アンキリンドメインは、 10^{-9} M 未満の K_d で VEGF-Axxx と結合し、VEGFR-2 に結合する VEGF-Axxx を阻害する。

【0011】

好ましい一態様では、ポリエチレングリコール部分は、結合ドメインの単一の Cys 残基に結合している。

【0012】

本発明は、さらに、1 種または複数種の上述の結合タンパク質または核酸分子を含む薬学的組成物に関する。

【0013】

本発明は、さらに、本発明の結合タンパク質を使用した、ガンおよび他の病的状態、例えば AMD または DME などの眼疾患の処置方法に関する。

【図面の簡単な説明】

【0014】

【図 1】選択された設計アンキリン反復タンパク質のイヌ VEGF-A164 との特異的結合を示す図である。選択されたクローンと、イヌ VEGF-A164 (VEGF) および陰性対照タンパク質 (MBP、Escherichia coli マルトース結合タンパク質) との相互作用を、粗抽出物の ELISA によって示す。ビオチン化イヌ VEGF-A164 および MBP をニュートラアビジン (NeutrAvidin) 上に固定化した。数字は、イヌ VEGF-A164 または対応するヒト VEGF-A165 に対するリボソームディスプレイで選択された単一の DARPin クローンを表す。A = 吸光度。白棒線は、イヌ VEGF-A164 への結合を示し、黒棒線は、MBP への非特異的バックグラウンド結合を示す。

【図2a】選択されたDARPinによるスフェロイドの伸長阻害を示す図である。スフェロイド伸長阻害アッセイにおける発芽の長さを、様々な濃度の(a)DARPin#30(配列番号:4のアミノ酸1~126)、VEGF-Axxxに特異性を有するDARPin、または(b)VEGF-Axxxに対して特異性を有さない陰性対照DARPinであるDARPin NCの存在下で示す。

【図2b】選択されたDARPinによるスフェロイドの伸長阻害を示す図である。スフェロイド伸長阻害アッセイにおける発芽の長さを、様々な濃度の(a)DARPin#30(配列番号:4のアミノ酸1~126)、VEGF-Axxxに特異性を有するDARPin、または(b)VEGF-Axxxに対して特異性を有さない陰性対照DARPinであるDARPin NCの存在下で示す。

10

【図3a】VEGF-Aアイソフォームの特異的認識を示す図である。VEGF-Aアイソフォームへの結合タンパク質の表面プラズモン共鳴(SPR)分析。(a)および(b):Avastin(登録商標)のSPR分析。イヌVEGF-A164(a)またはイヌVEGF-A164b(b)が固定化されたフローセルに250nM Avastin(登録商標)を100秒間適用し、続いて緩衝液流で洗浄した。

【図3b】VEGF-Aアイソフォームの特異的認識を示す図である。VEGF-Aアイソフォームへの結合タンパク質の表面プラズモン共鳴(SPR)分析。(a)および(b):Avastin(登録商標)のSPR分析。イヌVEGF-A164(a)またはイヌVEGF-A164b(b)が固定化されたフローセルに250nM Avastin(登録商標)を100秒間適用し、続いて緩衝液流で洗浄した。

20

【図3c】VEGF-Aアイソフォームの特異的認識を示す図である。VEGF-Aアイソフォームへの結合タンパク質の表面プラズモン共鳴(SPR)分析。(c)および(d):DARPin#27(配列番号:1のアミノ酸1~159)のSPR分析。イヌVEGF-A164(c)またはイヌVEGF-A164b(d)が固定化されたフローセルに250nM DARPin#27を100秒間適用し、続いて緩衝液流で洗浄した。RU=共鳴ユニット。

【図3d】VEGF-Aアイソフォームの特異的認識を示す図である。VEGF-Aアイソフォームへの結合タンパク質の表面プラズモン共鳴(SPR)分析。(c)および(d):DARPin#27(配列番号:1のアミノ酸1~159)のSPR分析。イヌVEGF-A164(c)またはイヌVEGF-A164b(d)が固定化されたフローセルに250nM DARPin#27を100秒間適用し、続いて緩衝液流で洗浄した。RU=共鳴ユニット。

30

【図4】ウサギ眼におけるヒトVEGF-A165の効率的な阻害を示す図である。眼におけるヒトVEGF-A165の阻害に果たすDARPinの有効性をLucentis(登録商標)と比較して示す血管漏出ウサギモデル。1日目にPBS、DARPin#30またはLucentis(登録商標)のいずれかを各ウサギの一方の眼に硝子体内注射により適用する(処置眼)。4日目または30日目に各ウサギの両眼をヒトVEGF-A165 500ngの硝子体内注射により誘発した。VEGF-A165注射の48時間後に、フルオレセインナトリウムの静脈内注射の1時間後に全ての眼の硝子体および網膜中のフルオレセイン含量を測定することによって全ての眼を評価した。R=処置眼/未処置眼のフルオレセイン測定値の比。標準偏差をエラーバーによって示す。4-PBS=PBS注射の4日後の比(対照);4-D=DARPin#30注射の4日後の比;30-D=DARPin#30注射の30日後の比;4-L=Lucentis(登録商標)注射の4日後の比;30-L=Lucentis(登録商標)注射の30日後の比。

40

【0015】

発明の詳細な説明

哺乳類VEGF-Aは、二つのファミリーの選択的スプライシングされたアイソフォームとして存在する:(i)エクソン8の近位のスプライシングによって生成した血管新生促進「VEGF-Axxx」アイソフォームおよび(ii)エクソン8の遠位のスプライシングによって生成した抗血管新生「VEGF-Axxx b」アイソフォーム。好ましく

50

は、本発明による結合ドメインは、イヌ、ウサギ、サルまたはヒト起源の血管新生促進 VEGF - A x x x に対して特異的である。より好ましくは、本発明による結合ドメインは、ヒト起源の血管新生促進 VEGF - A x x x に対して特異的である。最も好ましくは、本発明による結合ドメインは、ヒト VEGF - A 1 6 5 に対して特異的である。

【 0 0 1 6 】

「タンパク質」という用語は、少なくとも一部のポリペプチドが、そのポリペプチド鎖内および／または鎖間で二次、三次、または四次構造を形成することによって所定の三次元配置を有するかまたは獲得することが可能なポリペプチドを表す。タンパク質が 2 本以上のポリペプチドを含む場合、個別のポリペプチド鎖は、非共有または共有に、例えば 2 本のポリペプチド間のジスルフィド結合によって連結している場合がある。二次または三次構造を形成することによって所定の三次元配置を個別に有するかまたは獲得することが可能なタンパク質部分は、「タンパク質ドメイン」と名付けられる。そのようなタンパク質ドメインは、当業者に周知である。

10

【 0 0 1 7 】

リコンビナントタンパク質、リコンビナントタンパク質ドメインなどに使用されるような「リコンビナント」という用語は、該ポリペプチドが関連技術分野の専門家に周知のリコンビナント DNA 技法の使用によって産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（例えば遺伝子合成によって産生される）リコンビナント DNA 分子を細菌発現プラスミド（例えば p Q E 3 0、Qiagen）にクローニングすることができる。そのような構築リコンビナント発現プラスミドを細菌（例えば E. coli）に挿入すると、この細菌は、このリコンビナント DNA によってコードされるポリペプチドを産生することができる。それに応じて産生されたポリペプチドは、リコンビナントポリペプチドと呼ばれる。

20

【 0 0 1 8 】

「ポリペプチドタグ」という用語は、ポリペプチド／タンパク質に結合したアミノ酸配列であって、該ポリペプチド／タンパク質の精製、検出、もしくはターゲティングに有用なアミノ酸配列、またはポリペプチド／タンパク質の物理化学的挙動を改善するアミノ酸配列、またはエフェクター機能をもつアミノ酸配列を表す。結合タンパク質の個別のポリペプチドタグ、部分および／またはドメインは、直接またはポリペプチドリinkerを介して相互に結合している場合がある。これらのポリペプチドタグは、全てが当技術分野において周知であり、当業者に十分に利用可能である。ポリペプチドタグの例は、短いポリペプチド配列、例えば、H i s タグ、m y c タグ、F L A G タグ、もしくは S t r e p タグ、または該ポリペプチド／タンパク質の検出を可能にする部分、例えば酵素など（例えばアルカリホスファターゼのような酵素）、またはターゲティングのため（免疫グロブリンもしくはそのフラグメント）および／もしくはエフェクター分子として使用できる部分である。

30

【 0 0 1 9 】

「ポリペプチドリinker」という用語は、例えば、2 個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ポリエチレングリコールなどの非ポリペプチド部分、または 2 個の配列タグを連結することが可能なアミノ酸配列を表す。そのような追加的なドメイン、タグ、非ポリペプチド部分およびリinkerは、関連分野の技術者に公知である。一連の例は、特許出願である国際公開公報第 0 2 / 2 0 5 6 5 号の明細書に提供されている。そのようなリinkerの特定の例は、多様な長さのグリシン - セリンリinkerおよびプロリン - トレオニンリinkerであり；好ましくは、該リinkerは 2 から 2 4 の間のアミノ酸長を有し；より好ましくは、該リinkerは、2 から 1 6 の間のアミノ酸長を有する。

40

【 0 0 2 0 】

本発明に関連して、「ポリペプチド」という用語は、複数の、すなわち 2 個以上のアミノ酸の 1 本または複数本の鎖がペプチド結合を介して連結したものから成る分子に関する。好ましくは、ポリペプチドは、ペプチド結合を介して連結した 8 個よりも多いアミノ酸

50

から成る。

【0021】

「ポリマー部分」という用語は、タンパク質性ポリマー部分または非タンパク質性ポリマー部分のいずれかを表す。「タンパク質性ポリマー部分」は、好ましくは、安定な三次構造を形成しないものの、RTにおいてPBS中で約0.1mMの濃度で1ヶ月間保存したときに、10%以下（サイズ排除クロマトグラフィー（SEC）によって決定されるとき、好ましくは5%以下；同様に好ましくは2%以下；なおいっそう好ましくは1%以下；最も好ましくは検出不能量）のオリゴマーまたは凝集体を形成するポリペプチドである。そのようなタンパク質性ポリマー部分は、SECに関する分子量標準として球状タンパク質を使用した場合に、SECにおいてその有効分子量よりも高い見かけの分子量で流れる。好ましくは、SECによって決定された該タンパク質性ポリマー部分の見かけの分子量は、それらのアミノ酸配列から計算されたそれらの有効分子量の1.5、2または2.5倍高い。また好ましくは、SECによって決定された該非タンパク質性ポリマー部分の見かけの分子量は、それらの分子組成から計算されたそれらの有効分子量の2、4または8倍高い。好ましくは、円偏光二色性（CD）の測定によって決定するとき、該タンパク質性ポリマー部分のアミノ酸の50%、70%または90%よりも多くでさえ、RTにおいてPBS中で約0.1mMの濃度で安定な二次構造を形成していない。最も好ましくは、該タンパク質性ポリマーは、ランダムコイルコンフォメーションの典型的な近UV CDスペクトルを示す。そのようなCD分析は、当業者に周知である。同様に好ましいのは、50、100、200、300、400、500、600、700または800個よりも多いアミノ酸から成るタンパク質性ポリマー部分である。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；国際公開公報第07/103515号）ポリペプチド、または国際公開公報第08/155134号記載のプロリン、アラニンおよびセリン残基を含むポリペプチドである。そのようなタンパク質性ポリマー部分は、例えば、標準DNAクローニング技法に続くそれらの標準発現および精製を使用して、遺伝的融合ポリペプチドの生成によって本発明の結合ドメインに共有結合させることができる。VEGF-Axxxに結合する反復ドメインおよびそのようなタンパク質性ポリマー部分を含む結合タンパク質の例は、配列番号：1および配列番号：4に示される。配列番号：1のアミノ酸位置1～159は反復ドメインに相当し、配列番号：1のアミノ酸位置161～1025はタンパク質性ポリマー部分に相当する。配列番号：4のアミノ酸位置1～126は反復ドメインに相当し、配列番号：4のアミノ酸位置131～640は、タンパク質性ポリマー部分に相当する。

【0022】

本発明のポリマー部分は、分子量が広く変動する場合がある（すなわち約1kDa～約150kDa）。好ましくは、ポリマー部分は、少なくとも2、5、10、20、30、50、70または100kDaの分子量を有する。

【0023】

好ましくは、該ポリマー部分は、ポリペプチドリinkerによって結合ドメインに結合している。そのようなポリペプチドリinkerの例は、配列番号：8および配列番号：9のアミノ酸1～8である。

【0024】

非タンパク質性ポリマー部分の例は、ヒドロキシエチルデンプン（HES）、ポリエチレングリコール（PEG）、ポリプロピレングリコール、またはポリオキシアルキレンである。「PEG化」という用語は、PEG部分が例えば本発明のポリペプチドに共有結合していることを意味する。反復ドメインと、非タンパク質性ポリマー部分を結合させるのに有用なC末端Cys残基との間にポリペプチドリinkerを有する反復タンパク質の例は、配列番号：2、3、5、6および7である。

【0025】

特定の一態様では、PEG部分または任意の他の非タンパク質性ポリマーが、例えばマレイミドリinkerを介してシステイン性チオールと結合し、そのシステインがペプチドリ

10

20

30

40

50

ンカーを介して本明細書記載の結合ドメインのN末端またはC末端に結合している場合がある（例えば配列番号：3）。

【0026】

「結合タンパク質」という用語は、下記にさらに説明されるように1個または複数の結合ドメインおよび1個または複数のポリマー部分を含むタンパク質を表す。好ましくは、該結合タンパク質は、最大4個の結合ドメインを含む。より好ましくは、該結合タンパク質は、最大2個の結合ドメインを含む。最も好ましくは、該結合タンパク質は、1個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的な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inkerおよび/または単一のCys残基を含む場合がある。多量体化部分の例は、対にならって機能的免疫グロブリンFcドメインを提供する免疫グロブリン重鎖定常領域、およびロイシンジッパーまたは2本のポリペプチドの間で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ようなポリペプチドである。例えば当業者に周知のマレイミド化学反応を使用することによって他の部分をポリペプチドにコンジュゲーションするために、単一のCys残基を使用することができる。

10

【0027】

好ましくは、該結合タンパク質は、最大4個のポリマー部分を含む。より好ましくは、該結合タンパク質は、最大2個のポリマー部分を含む。最も好ましくは、該結合タンパク質は、ポリマー部分を1個だけ含む。

【0028】

20

同様に好ましくは、分子量標準として球状タンパク質を使用したSECによってRTにおいてPBS中に0.1mMの濃度で分析した場合に、該結合タンパク質は、少なくとも70、100、200、300、500または800kDaの見かけの分子量を有する。

【0029】

「結合ドメイン」という用語は、タンパク質の足場として同じ「フォールド」（三次元配置）を示すタンパク質ドメインであって、下記に定義されるような予め決定された性質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、当業界で公知の技法である、合理的技法、または最も一般的にはコンビナトリアルタンパク質工学技法によって得ることができる（Skerra, 2000上記引用文中；Binz et al., 2005、上記引用文中）。例えば、予め決定された性質を有する結合ドメインは、（a）下記にさらに定義されるタンパク質足場と同じフォールドを示すタンパク質ドメインの多様な集まりを提供するステップ；ならびに（b）該多様な集まりをスクリーニングすることおよび/または該多様な集まりから選択して、該予め決定された性質を有する少なくとも1個のタンパク質ドメインを得るステップを含む方法によって得ることができる。タンパク質ドメインの多様な集まりは、使用されるスクリーニングシステムおよび/または選択システムによるいくつかの方法によって提供することができ、ファージディスプレイまたはリボソームディスプレイなどの当業者に周知の方法の使用を含む。

30

【0030】

「タンパク質の足場」という用語は、アミノ酸の挿入、置換または欠失に高度に耐性の表面領域が露出したタンパク質を意味する。本発明の結合ドメインを生成させるために使用することのできるタンパク質の足場の例は、抗体またはそのフラグメント、例えば単鎖FvもしくはFabフラグメントなど、Staphylococcus aureus由来プロテインA、Pieris brassicae由来ビリン結合タンパク質または他のリボカリン、アンキリン反復タンパク質または他の反復タンパク質、およびヒトフィブロネクチンである。タンパク質の足場は、当業者に公知である（Binz et al., 2005、上記引用文中；Binz et al., 2004、上記引用文中）。

40

【0031】

「予め決定された性質」という用語は、ターゲットへの結合、ターゲットの遮断、ターゲット介在性反応の活性化、酵素活性などの性質、および関連するさらなる性質を表す。所望の性質の種類に応じて、通常の技能を有する者は、所望の性質を有する結合ドメイン

50

のスクリーニングおよび/または選択を行うための形式および必要なステップを同定することができる。好ましくは、該予め決定された性質は、ターゲットへの結合性である。

【0032】

好ましくは、本発明の結合タンパク質は、抗体またはそのフラグメント、例えば Fab もしくは scFv フラグメントではない。抗体およびそのフラグメントは、当業者に周知である。

【0033】

同様に好ましくは、本発明の結合ドメインは、抗体中に存在するような免疫グロブリンのフォールドおよび/またはフィブロンネクチン III 型ドメインを含まない。免疫グロブリンのフォールドは、2枚のβシート状に配置された約7個の逆平行β鎖の2層サンドイッチから成る通常のオールβタンパク質のフォールドである。免疫グロブリンのフォールドは当業者に周知である。例えば、免疫グロブリンのフォールドを含むそのような結合ドメインは、国際公開公報第07/080392号または国際公開公報第08/097497号に記載されている。

10

【0034】

さらに好ましくは、本発明の結合ドメインは、VEGFR-1またはVEGFR-2に見出されるような免疫グロブリン様ドメインを含まない。そのような結合ドメインは、国際公開公報第00/075319号に記載されている。

【0035】

好ましい結合ドメインは、抗血管新生効果を有する結合ドメインである。結合ドメインの抗血管新生効果は、実施例2に記載されたHUECスフェロイドの発芽アッセイなどの、当業者に周知のアッセイによって決定することができる。

20

【0036】

さらに好ましいのは、70から300個の間のアミノ酸、特に100から200個の間のアミノ酸を含む結合ドメインである。

【0037】

さらに好ましいのは、遊離Cys残基を欠如する結合ドメインである。遊離Cys残基は、ジスルフィド結合の形成に関与していない。なおいっそう好ましいのは、Cys残基を全く有さない結合ドメインである。

【0038】

本発明の好ましい結合ドメインは、反復ドメインまたは設計された反復ドメイン、好ましくは国際公開公報第02/20565号に記載されたようなものである。

30

【0039】

特に好ましい結合ドメインは、設計されたアンキリン反復ドメイン(Binz, H. K. et al., 2004、上記引用文中)、好ましくは国際公開公報第02/20565号に記載されたようなものである。設計されたアンキリン反復ドメインの例を実施例に示す。

【0040】

反復タンパク質についての本明細書下記の定義は、特許出願である国際公開公報第02/20565号における定義に基づく。特許出願である国際公開公報第02/20565号は、さらに、反復タンパク質の特徴、技法および応用の全般的な説明を包含する。

40

【0041】

「反復タンパク質」という用語は、1個または複数個の反復ドメインを含むタンパク質を表す。好ましくは、該反復タンパク質のそれぞれは、最大4個の反復ドメインを含む。より好ましくは、該反復タンパク質のそれぞれは、最大2個の反復ドメインを含む。最も好ましくは、反復タンパク質のそれぞれは、1個だけの反復ドメインを含む。さらに、該反復タンパク質は、追加的な非反復タンパク質ドメイン、ポリペプチドタグおよび/またはポリペプチドリンカーを含む場合がある。

【0042】

「反復ドメイン」という用語は、2個以上の連続する反復ユニット(モジュール)を構造ユニットとして含むタンパク質ドメインを表し、ここで、該構造ユニットは同じフォー

50

ルドを有し、密に積み重なって、例えば合同の疎水性コアを有するスーパーヘリックス構造を創成する。

【 0 0 4 3 】

「設計された反復タンパク質」および「設計された反復ドメイン」という用語は、特許出願である国際公開公報第 0 2 / 2 0 5 6 5 号に説明された発明手順の結果として得られた反復タンパク質または反復ドメインをそれぞれ表す。設計された反復タンパク質および設計された反復ドメインは、合成されたものであり、天然由来ではない。それらは、それ相応に設計された核酸の発現によって得られた、それぞれ人造のタンパク質またはドメインである。好ましくは、その発現は、真核細胞もしくは細菌細胞などの原核細胞において、または無細胞 *in vitro* 発現系を使用することによって行われる。

10

【 0 0 4 4 】

「構造ユニット」という用語は、ポリペプチド鎖に沿って相互に近接している 2 個以上の二次構造セグメントの間の三次構造的な相互作用によって形成された、ポリペプチドの局所的に秩序化された部分を表す。そのような構造ユニットは、構造モチーフを表す。「構造モチーフ」という用語は、少なくとも 1 個の構造ユニット中に存在する二次構造エレメントの三次元配置を表す。構造モチーフは、当業者に周知である。構造ユニット単独では定義された三次元構造を獲得できないが、例えば反復ドメイン中の反復モジュールとしてそれらを連続的に配置すると、隣接ユニットの相互安定化に繋がり、スーパーヘリックス構造を生じる。

【 0 0 4 5 】

20

「反復ユニット」という用語は、1 種または複数種の天然反復タンパク質の反復配列モチーフを含むアミノ酸配列を表し、ここで、該「反復ユニット」は、複数のコピー中から見出され、該モチーフの全てに共通な定義されたフォールディングトポロジーを示し、タンパク質のフォールドを決定する。そのような反復ユニットの例は、アルマジロ反復ユニット、ロイシンリッチ反復ユニット、アンキリン反復ユニット、テトラトリコ (tetratrico) ペプチド反復ユニット、H E A T 反復ユニット、およびロイシンリッチ変異型反復ユニットである。2 個以上のそのような反復ユニットを有する天然タンパク質は、「天然反復タンパク質」と呼ばれる。反復タンパク質の個別の反復ユニットのアミノ酸配列は、相互に比較するとかなりの数の突然変異、置換、付加および/または欠失を有する場合があるが、一方で反復ユニットの全般パターンまたはモチーフはまだ実質的に保持されている。

30

【 0 0 4 6 】

好ましくは、反復配列モチーフの推測のために使用される反復ユニットは、例えば実施例 1 に記載されたようにターゲットに対して選択された反復ドメインから得られた、同じターゲット特異性を有する相同反復ユニットである。

【 0 0 4 7 】

「反復配列モチーフ」という用語は、1 個または複数個の反復ユニットから推定されるアミノ酸配列を表す。好ましくは、該反復ユニットは、同じターゲットに対して結合特異性を有する反復ドメイン由来である。

【 0 0 4 8 】

40

「フォールディングトポロジー」という用語は、該反復ユニットの三次構造を表す。フォールディングトポロジーは、 α ヘリックスもしくは β 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、あるいは直鎖ポリペプチドもしくはループ、または α ヘリックス、 β シートおよび/もしくは直鎖ポリペプチド/ループの任意の組み合わせを形成するアミノ酸ストレッチによって決定される。

【 0 0 4 9 】

「連続的」という用語は、反復ユニットまたは反復モジュールが縦列配置された配置を表す。設計された反復タンパク質中には、少なくとも 2 個、通常は約 2 ~ 6 個、特に少なくとも約 6 個、往々にして 20 個以上の反復ユニットがある。大部分の場合、反復ユニットは、高度の配列同一性 (対応する位置に同じアミノ酸残基) または配列類似性 (アミノ

50

酸残基は異なるが類似の物理化学的性質を有する)を示し、いくつかのアミノ酸残基は、天然タンパク質から見出される異なる反復ユニット中に強く保存されている主な残基でありうる。しかしながら、共通のフォールディングトポロジーが維持されている限り、アミノ酸の挿入および/もしくは欠失、ならびに/または天然タンパク質中に見出される異なる反復ユニット間の置換により高度の配列変動性が可能である。

【0050】

X線結晶分析法、NMRまたはCD分光法などの物理化学的手段によって反復タンパク質のフォールディングトポロジーを直接決定するための方法は、当業者に周知である。反復ユニットもしくは反復配列モチーフを同定および決定するための方法、または相同性検索(BLAST他)などの、そのような反復ユニットもしく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は、生物情報学の分野で十分に確立しており、当業者に周知である。最初の反復配列モチーフを精密化するステップは、反復プロセスを含む場合がある。

10

【0051】

「反復モジュール」という用語は、天然反復タンパク質の反復ユニットから元々由来する、設計された反復ドメインの反復アミノ酸配列を表す。反復ドメイン中に含まれる各反復モジュールは、天然反復タンパク質のファミリーまたはサブファミリー、例えばアルマジロ反復タンパク質またはアンキリン反復タンパク質のファミリーの1個または複数の反復ユニットに由来する。

【0052】

20

「反復モジュール」は、アミノ酸残基が対応する反復モジュールの全コピー中に存在する位置(「固定位置」)、および異なるまたは「ランダム化」アミノ酸残基を有する位置(「ランダム化位置」)を含むうる。

【0053】

「キャッピングモジュール」という用語は、反復ドメインのN末端またはC末端反復モジュールに融合したポリペプチドを表し、ここで、該キャッピングモジュールは、該反復モジュールと密な三次相互作用を形成することによって、連続的な反復モジュールと接触していない側で該反復モジュールの疎水性コアを溶媒から遮蔽するキャップを提供する。該N末端および/またはC末端キャッピングモジュールは、天然反復タンパク質中から見出される、反復ユニットに隣接するキャッピングユニットまたは他のドメインの場合があり、またはそれに由来しうる。「キャッピングユニット」という用語は、天然のフォールディングしたポリペプチドであって、N末端またはC末端が反復ユニットに融合している特定の構造ユニットを定義するポリペプチドを表し、ここで、該ポリペプチドは該反復ユニットと密な三次構造的な相互作用を形成することによって、一方の側で該反復ユニットの疎水性コアを溶媒から遮蔽するキャップを提供する。そのようなキャッピングユニットは、該反復配列モチーフと配列類似性を有しうる。キャッピングモジュールおよびキャッピング反復は、国際公開公報第02/020565号に記載されている。例えば、配列番号:2のN末端キャッピングモジュールは、位置1~32のアミノ酸によってコードされる。同様に好ましいのは、位置5にグリシンまたはアスパラギン酸残基を有するようなN末端キャッピングモジュールである。

30

40

【0054】

「ターゲット」という用語は、核酸分子、ポリペプチドもしくはタンパク質、糖質などの個別の分子、またはそのような個別の分子の任意の部分を含めた任意の他の天然分子、またはそのような分子の2種以上の複合体を表す。ターゲットは、細胞全体または組織試料であってもよく、または任意の非天然分子もしくは部分であってもよい。好ましくは、ターゲットは化学的改変を有する、例えば天然または非天然のリン酸化、アセチル化、またはメチル化によって改変された、天然または非天然のポリペプチドまたはポリペプチドである。本発明の特定の適用では、ターゲットはVEGF-AxxxまたはVEGFR-2である。

【0055】

50

「コンセンサス配列」という用語はアミノ酸配列を表し、ここで、該コンセンサス配列は、複数の反復ユニットの構造および/または配列アライメントを行うことによって得られる。構造および/または配列アライメントを行われた2種以上の反復ユニットを使用し、そしてアライメント中にギャップを見込んで、各位置で最高頻度の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、各位置で最高頻度であるアミノ酸を含む配列である。2種以上のアミノ酸が単一の位置で平均よりも多い事象では、コンセンサス配列にそれらのアミノ酸サブセットが含まれる場合がある。該2種以上の反復ユニットは、単一の反復タンパク質、または2種以上の異なる反復タンパク質中に含まれる反復ユニットから採用されうる。

【0056】

10

コンセンサス配列およびそれを決定する方法は、当業者に周知である。

【0057】

「コンセンサスアミノ酸残基」は、コンセンサス配列中のある位置に見出されるアミノ酸である。2種以上、例えば3、4または5種のアミノ酸残基が該2種以上の反復ユニットから類似の確率で見出される場合、コンセンサスアミノ酸は、最高頻度で見出されるアミノ酸の1種、または該2種以上のアミノ酸残基の組み合わせでありうる。

【0058】

さらに好ましいのは、非天然結合タンパク質または結合ドメインである。

【0059】

「非天然」という用語は、合成であるかまたは天然由来でないことを意味し、より具体的には、この用語は人工であることを意味する。「非天然結合タンパク質」または「非天然結合ドメイン」という用語は、該結合タンパク質または該結合ドメインが合成（すなわちアミノ酸から化学合成によって製造された）またはリコンビナントであり、天然由来ではないことを意味する。「非天然結合タンパク質」または「非天然結合ドメイン」は、それぞれ、それに対応して設計された核酸の発現によって得られる人工のタンパク質またはドメインである。好ましくは、その発現は、真核細胞または細菌細胞において行われるか、または無細胞 *in vitro* 発現系を使用することによって行われる。さらに、その用語は、該結合タンパク質または該結合ドメインの配列が配列データベース、例えばGenBank、EMBL-BankまたはSwiss-Protにおける非人工配列の登録配列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および他の類似の配列データベースは、当業者に周知である。

20

【0060】

結合ドメインは、VEGF-AxxxとVEGFR-2の間の見かけの解離定数 (K_d) が 10^2 倍よりも大きく、好ましくは 10^3 倍よりも大きく、より好ましくは 10^4 倍よりも大きく、より好ましくは 10^5 倍よりも大きく、最も好ましくは 10^6 倍よりも大きく増加するようにVEGF-Axxxに結合することまたはVEGFR-2に結合することのいずれかによってVEGFR-2に結合するVEGF-Axxxを阻害することができる。好ましくは、結合ドメインとVEGF-AxxxまたはVEGFR-2のいずれかとの相互作用に関する K_d は、 10^{-7} M未満、好ましくは 10^{-8} M未満、より好ましくは 10^{-9} M未満、より好ましくは 10^{-10} M未満、最も好ましくは 10^{-11} M未満である。タンパク質-タンパク質相互作用の解離定数を決定する、表面プラズモン共鳴 (SPR) に基づく技法などの方法は、当業者に周知である。

30

【0061】

好ましい結合ドメインは、VEGF-Axxxと結合する。なおいっそう好ましいのは、ヒトVEGF-A165と結合する結合ドメインである。

【0062】

「PBS」という用語は、137mM NaCl、10mMリン酸塩および2.7mM KClを含有し、pH7.4を有するリン酸緩衝水溶液を意味する。

【0063】

好ましいのは、100mMジチオスレイトール (DTT) を含有するPBS中で37℃において1または10時間インキュベーションしたときにそのネイティブな三次元構造を失

40

50

わない結合タンパク質および/または結合ドメインである。

【0064】

特定の態様では、本発明は、VEGFR-2に結合するVEGF-Axxxを阻害する結合ドメインを含み、表示されたまたは好ましい変性中点温度および上記に定義された非凝集性を有する結合タンパク質であって、100nM未満のIC₅₀値を有するHUVECスフェロイドの発芽を阻害する結合タンパク質に関する。

【0065】

「HUVEC」という用語は、正常なヒト臍帯静脈から単離することができ、VEGF-Aの刺激に応答性であるヒト臍帯静脈内皮細胞を意味する。実施例2に記載されたような、HUVECスフェロイドの発芽を測定するアッセイは、当業者に周知である。

10

【0066】

IC₅₀値は、HUVECスフェロイドの発芽などの実験的に決定されたパラメータの50%のin vitro阻害に必要な、結合タンパク質または結合ドメインなどの物質の濃度である。IC₅₀値は、当業者が容易に決定することができる(Korff T. and Augustin H.G., J. Cell Biol. 143(5), 1341-52, 1998)。

【0067】

好ましいのは、10nM未満、好ましくは1nM未満、より好ましくは0.1nM未満、最も好ましくは0.05nM未満のIC₅₀値でHUVECスフェロイドの発芽を阻害する結合タンパク質および/または結合ドメインである。

【0068】

20

さらに好ましいのは、相当するラニズマブ(Lucentis(登録商標)、Genentechの登録商標)、ベバシズマブ(Avastin(登録商標)、Genentechの登録商標)、アフリベルセプト(VEGF Trap(登録商標)、Regeneronの登録商標)、またはペガプタニブ(Macugen(登録商標)、Pfizerの登録商標)のIC₅₀値よりも低いIC₅₀値でHUVECスフェロイドの発芽を阻害するモノマー性結合タンパク質および/または結合ドメインである。

【0069】

VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D、PIGFまたはPDGFとの好ましい結合ドメイン相互作用に関するK_dは、1nMよりも大きく、好ましくは10nMよりも大きく、より好ましくは10²nMよりも大きく、なおいっそう好ましくは10³nMよりも大きく、最も好ましくは10⁴nMよりも大きい。

30

【0070】

好ましくは、VEGF-Axxxは、イヌVEGF-A164またはサルVEGF-A165またはヒトVEGF-A165のいずれかであり、VEGF-Axxx bは、イヌVEGF-A164 bまたはサルVEGF-A165 bまたはヒトVEGF-A165 bのいずれかである。

【0071】

別の好ましい態様は、VEGFR-2に結合するVEGF-Axxxを阻害する結合ドメインを含むリコンビナント結合タンパク質であり、ここで、該結合ドメインは、反復ドメインまたは設計された反復ドメインである。そのような反復ドメインは、VEGF-Axxxへの結合に関与する1、2、3個またはそれよりも大きい内部反復モジュールを含む。好ましくは、そのような反復ドメインは、N末端キャッピングモジュール、2~4個の内部反復モジュール、およびC末端キャッピングモジュールを含む。好ましくは、該結合ドメインは、アンキリン反復ドメインまたは設計されたアンキリン反復ドメインである。

40

【0072】

好ましいリコンビナント結合タンパク質は、ポリエチレングリコール(PEG)部分とコンジュゲーションした本明細書記載の結合ドメインを含み、ここで好ましくは、該PEG部分は該結合ドメインの単一のCys残基に結合している。好ましくは、該Cys残基は、該結合ドメインのC末端に遺伝的に導入される。次に、PEG部分は、化学的手段に

50

よって、例えば、当業者に周知のマレイミド化学反応を使用することによって結合させることができる。単一のCys残基にコンジュゲーションしているPEG部分を含むそのような結合タンパク質の例を実施例に示す。

【0073】

本発明の好ましい一態様は、本明細書記載の結合ドメインを含むリコンビナント結合タンパク質を含み、ここで、該結合ドメインは、そのC末端でペプチド結合を介して配列番号：8にコンジュゲーションしており、配列番号：8は、今度はC末端システイン性チオールで α -[3-(3-マレイミド-1-オキソプロピル)アミノ]プロピル- ω -メトキシ-ポリオキシエチレン(NOF、Sunbright ME-200MA(20 kD)またはSunbright ME-400MA(40 kD))などのマレイミド結合型PEGにコンジュゲーションしている。一態様では、 α -[3-(3-マレイミド-1-オキソプロピル)アミノ]プロピル- ω -メトキシ-ポリオキシエチレンは、少なくとも約2、5、10、20、30、40、50、70、または100 kDの分子量を有する。ある態様では、 α -[3-(3-マレイミド-1-オキソプロピル)アミノ]プロピル- ω -メトキシ-ポリオキシエチレンは、少なくとも約20または少なくとも約40 kDの分子量を有する。

10

【0074】

別の好ましい態様は、VEGF-Axxxに対して結合特異性を有する少なくとも1個の反復ドメインを含む、上記に定義されたようリコンビナント結合タンパク質であり、ここで、該反復ドメインは、配列番号：1～7の反復ドメインの群より選択される反復ドメインとVEGF-Axxxへの結合を競合する。好ましくは、該反復ドメインは、配列番号：1または3の反復ドメインとVEGF-Axxxへの結合を競合する。より好ましくは、該反復ドメインは、配列番号：3の反復ドメインとVEGF-Axxxへの結合を競合する。

20

【0075】

「結合を競合する」という用語は、本発明の2種の異なる結合ドメインが同じターゲットに同時には結合できないが、両方が個別には同じターゲットに結合可能なことを意味する。したがって、そのような2種の結合ドメインは、該ターゲットへの結合を競合する。2種の結合ドメインがターゲットへの結合を競合するかどうかを判定するための競合ELISAまたは競合SPR測定(例えばBioRad製Proteon装置を使用することによる)などの方法は、当業者に周知である。

30

【0076】

選択された反復タンパク質とVEGF-Axxxへの結合を競合するリコンビナント結合タンパク質は、競合酵素結合性免疫吸着アッセイ(ELISA)などの当業者に周知の方法によって同定することができる。

【0077】

別の好ましい態様は、配列番号：1～7の反復ドメインから成る群より選択される、VEGF-Axxxに対して結合特異性を有する反復ドメインを含むリコンビナント結合タンパク質である。好ましくは、該反復ドメインは、配列番号：2または3の反復ドメインより選択される。より好ましくは、該反復ドメインは配列番号：3の反復ドメインである。

40

【0078】

1個または複数個のポリエチレングリコール部分が、結合タンパク質中の異なる位置に結合している場合があり、そのような結合は、アミン、チオールまたは他の適切な反応基との反応によって成し遂げることができる。ポリエチレングリコール部分の結合(PEG化)は、部位特異的な場合があり、ここで、適切な反応基は、PEG化が優先的に起こる部位を創出するためにタンパク質中に導入されるか、または結合タンパク質中に元々存在する。チオール基は、システイン残基中に存在することがあり、アミン基は、例えばポリペプチドのN末端に見出される一級アミン、またはリシンもしくはアルギニンなどのアミノ酸の側鎖中に存在するアミン基でありうる。好ましい一態様では、結合タンパク質は、所望の位置にシステイン残基を有するように改変され、例えばマレイミド官能基を担持す

50

るポリエチレングリコール誘導体との反応によって、システイン上での部位特異的 PEG 化を可能にする。ポリエチレングリコール部分は、分子量が広く変動する可能性があり（すなわち約 1 kDa ~ 約 100 kDa）、分岐型または直鎖型でありうる。好ましくは、ポリエチレングリコールは、約 1 ~ 約 50 kDa、好ましくは約 10 ~ 約 40 kDa、なおいっそう好ましくは約 15 ~ 約 30 kDa、もっとも好ましくは約 20 kDa の分子量を有する。

【0079】

さらなる一態様では、本発明は、特定のリコンビナント結合タンパク質をコードする核酸分子に関する。さらに、該核酸分子を含むベクターが考慮される。

【0080】

さらに、1 種または複数種の上述の結合タンパク質、特に反復ドメインを含む特定のリコンビナント結合タンパク質、または特定のリコンビナント結合タンパク質をコードする核酸分子と、場合により薬学的に許容されうる担体および/または希釈剤とを含む薬学的組成物が考慮される。薬学的に許容されうる担体および/または希釈剤は、当業者に公知であり、以下にさらに詳細に説明される。さらになお、1 種または複数種の上述のリコンビナント結合タンパク質、特に反復ドメインを含む結合タンパク質を含む診断組成物が考慮される。

【0081】

本発明の結合タンパク質は、VEGF が誘導する病的血管新生、血管漏出（浮腫）、肺高血圧、腫瘍形成および/または炎症障害を抑制または予防する。「抑制」で、リコンビナントタンパク質が、言及された病態をある程度、例えば 10 % もしくは 20 %、より好ましくは 50 %、特に 70 %、80 % もしくは 90 %、または 95 % までも予防することが理解される。

【0082】

「浮腫」という用語は、血管漏出によって引き起こされる状態を意味する。炎症時の血管拡張および透過性増加は、支配的な病原メカニズムでありうる。例えば、浮腫は、脳卒中後の梗塞拡大の原因となり、ガン患者に重篤な頭蓋内高血圧を引き起こすおそれがある。さらに、血漿タンパク質の血管外滲出は、潜在腫瘍の転移拡大に有利に働き、気道のうっ血は致命的な喘息発作を引き起こすおそれがある。炎症時に起こる血管漏出の増加は、呼吸困難、腹水、腹膜硬化症（透析患者の場合）、癒着形成（腹部手術）および転移性拡大につながりうる。

【0083】

「血管新生」という用語は、新しい血管が形成される基本プロセスを意味する。ヒトにおける血管新生の第一期は、胚発生最初の 3 ヶ月間に行われるが、血管新生は、また、筋肉または脂肪の増加などの組織成長期に、および月経周期および妊娠時に、正常な生理学的プロセスとしても起こる。

【0084】

「病的血管新生」という用語は、いくつかの病的状態の維持および進行時の血管の形成および成長を表す。病的血管新生の特定例は、血管（アテローム性動脈硬化、血管腫、血管内皮腫）、骨および関節（関節リウマチ、滑膜炎、骨軟骨破壊、骨髄炎、パニス成長、骨棘形成、新生物および転移）、皮膚（いば、化膿性肉芽腫、発毛、カポジ肉腫、瘢痕ケロイド、アレルギー性浮腫、新生物）、肝臓、腎臓、肺、耳および他の上皮（肝炎、糸球体腎炎、肺炎を含めた炎症過程および感染過程；ならびに喘息、鼻茸、耳炎、移植障害、肝再生障害、新生物および転移）、子宮、卵巣および胎盤（子宮内避妊具による不正子宮出血、卵胞嚢胞形成、卵巣過剰刺激症候群、子宮内膜症、新生物）、脳、神経および眼（未熟児網膜症、糖尿病網膜症、脈絡膜および他の眼内障害、白質軟化症、新生物および転移）、心臓および作業過負荷による骨格筋、脂肪組織（肥満）、内分泌器官（甲状腺炎、甲状腺腫脹、膵臓移植障害）、造血（AIDS でのカポジ症候群）、血液悪性腫瘍（白血病）、ならびにリンパ管（腫瘍転移、リンパ増殖性障害）において見出される。

【0085】

「網膜虚血性疾患」という用語は、網膜の血液供給および酸素が減少しており、網膜の

10

20

30

40

50

末梢部がその栄養源を失い、適正に機能することを停止することを意味する。網膜虚血性疾患の特定の例は網膜症である。網膜症につながる日常病は、糖尿病網膜症、網膜中心静脈閉塞、頸動脈狭窄、および鎌状赤血球網膜症である。糖尿病網膜症は、糖尿病患者における失明の主因である。虚血網膜では、新生血管の成長が起こる（新生血管形成）。これらの血管は、しばしば、網膜表面上、視神経、または虹彩表面の眼前部で成長する。新生血管は、必要な栄養の流れに取って代わることはできず、その代わりに硝子体出血、網膜剥離、およびコントロール不能の緑内障などの多くの問題を引き起こすおそれがある。新生血管が脆弱で出血しやすいことから、これらの問題が生じる。その初期段階になった場合、時に汎網膜光凝固術で増殖糖尿病網膜症を抑えることができる。しかしながら、場合により、硝子体切除術が唯一の選択肢である。

10

【 0 0 8 6 】

これらの網膜症に加えて、眼の血管疾患には、また、黄斑変性および糖尿病性黄斑浮腫（DME）などの眼内新生血管形成疾患が含まれる。黄斑変性は、黄斑の真下の脈絡膜血管の新生血管成長に起因する。非滲出型と滲出型の2種類の黄斑変性がある。滲出型黄斑変性が全ての黄斑変性の15%だけを構成し、ほぼ全ての滲出型黄斑変性が失明につながる。加えて、滲出型黄斑変性は、ほぼ常に非滲出型黄斑変性に起因する。ひとたび一方の眼が滲出型黄斑変性を患うと、その状態はほぼ常にもう一方の眼を冒す。滲出型黄斑変性は、主に高齢者に見出されることから、しばしば、滲出型加齢黄斑変性wet-AMDと呼ばれる。

【 0 0 8 7 】

20

糖尿病網膜症（DR）およびDMEは、先進国の労働年齢の集団における失明の主因である。世界的に増えつつある糖尿病の個体数から、DRおよびDMEが失明および後年の関連機能障害の主要な誘因であり続けるであろうと示唆される。プロテインキナーゼC-β活性化、血管内皮成長因子の産生増加、酸化ストレスならびに細胞内ソルビトールおよび終末糖化産物の蓄積を含めたいくつかの生化学的メカニズムは、DR/DMEを特徴付ける血管破裂の原因となるおそれがある。これらの経路の阻害は、DRおよびDMEに対する介入として有望である。

【 0 0 8 8 】

「肺高血圧」という用語は、肺動脈の血圧が異常に高い障害を意味する。心臓または肺の他の疾患の不存在下では、それは原発性肺高血圧と呼ばれる。肺細動脈のびまん性狭細は、病的動脈新生に続く血流抵抗の増加に対する応答としての肺高血圧の結果として起こる。発生率は、100,000人に対して8人である。しかしながら、肺高血圧は、また、気腫、慢性気管支炎またはびまん性間質性線維症などの慢性閉塞性肺疾患（COPD）の合併症として、および喘息型（asthmatic form）COPDを有する患者において起こることがある。COPDの発生率は、10,000人に対して約5人である。

30

【 0 0 8 9 】

さらに、本発明の結合タンパク質は、炎症、より具体的には炎症障害を処置するために使用することができる。

【 0 0 9 0 】

本明細書で使用される「炎症」という用語は、生体組織の損傷に対する局所反応、特に小血管、その内容物およびそれらの関連した構造の局所反応を意味する。血液成分の血管壁を通った組織への通過は、炎症の特徴であり、そのように形成された組織収集体は、滲出物または浮腫と呼ばれる。生体組織を損傷する任意の有害なプロセス、例えば細菌感染、過剰な熱、寒冷、粉砕などの機械的損傷、酸、アルカリ、照射、またはウイルス感染が、関与する器官または組織にかかわりなく炎症を引き起こすおそれがある。「炎症性疾患」として分類された疾患、ならびに熱傷から肺炎、らい病、結核および関節リウマチに至る組織反応が、全て「炎症」であることは明らかであろう。

40

【 0 0 9 1 】

本発明による結合タンパク質は、腫瘍形成を処置するために使用することができる。「腫瘍」という用語は、既存の体細胞から明らかな原因なしに発生し、目的のある機能を持

50

たず、自律的に無制限の成長をする傾向によって特徴付けられる異常な組織塊を意味する。腫瘍中の細胞はその外観および他の特徴が異常なことから、腫瘍は炎症性または他の腫脹とは全く異なる。異常な細胞、即ち一般に腫瘍を構成する種類の細胞は、一つまたは複数の下記の変化：（１）肥大、すなわち個々の細胞のサイズの増加；（２）過形成、すなわち所与のゾーン内の細胞数の増加；（３）退形成、すなわちより原始的または未分化型に向けての細胞の物理的特徴の退行を経る点で正常細胞と異なる。腫瘍は、良性、例えば、脂肪腫、血管腫、骨腫、軟骨腫および腺腫でありうる。悪性腫瘍の例は、ガン腫（例えば乳房腫瘍、呼吸器、消化管、内分泌腺および泌尿生殖器系のガン腫）、肉腫（線維組織、脂肪組織、筋肉、血管、骨および軟骨を含めた結合組織における）、ガン肉腫（上皮および結合組織の両方における）、白血病およびリンパ腫、神経組織（脳を含む）の腫瘍、およびメラノーマ（色素沈着した皮膚細胞のガン）である。腫瘍に対する本発明の結合タンパク質の使用は、また、照射、光線力学的治療、化学療法または外科手術などの当技術分野で公知の任意の他の腫瘍療法と組み合わせることができる。

【 0 0 9 2 】

薬学的組成物は、上記の結合タンパク質および薬学的に許容されうる担体、賦形剤または安定化剤（Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. [1980]）を含む。当業者に公知の適切な担体、賦形剤または安定化剤は、食塩水、リンゲル液、ブドウ糖溶液、ハanks液、固定油、オレイン酸エチル、食塩水中の5%ブドウ糖、等張性および化学的安定性を高める物質、緩衝剤ならびに保存料である。他の適当な担体には、組成物を投与される個体に有害な抗体の産生をそれ自体誘導しない任意の担体、例えば、タンパク質、多糖、ポリ乳酸、ポリグリコール酸、ポリマー性アミノ酸およびアミノ酸コポリマーなどが含まれる。薬学的組成物は、また、抗ガン剤または抗血管新生剤（例えばヒトVEGF-A_{xxx}b；好ましくはヒトVEGF-A₁₆₅b）などの追加的な活性薬剤を含む配合剤でありうる。

【 0 0 9 3 】

眼疾患の処置のための好ましい薬学的組成物は、上記結合タンパク質、非限定的にポリソルベート20（例えば約0.04%）を含めた非イオン性界面活性剤などの界面活性剤、ヒスチジン、リン酸塩または乳酸などの緩衝剤、およびスクロースまたはトレハロースなどの糖を含む。好ましくは、そのような組成物は、上記結合タンパク質およびPBSを含む。該薬学的組成物または本明細書記載の任意の他の薬学的組成物は、眼の一部に局部的に局所投与されるか、または眼内に、例えば結膜下（subconjunctival）腔、眼球周囲腔もしくは眼球後腔に注射されるか、または直接眼内注射されうる。または、該薬学的組成物またはそのような他の薬学的組成物は、非経口投与により全身投与されうる。好ましくは、該薬学的組成物またはそのような他の薬学的組成物は、硝子体内注射により眼に適用される。同様に好ましくは、該薬学的組成物は、点眼薬として眼に局部的に適用される。点眼薬は、角膜（眼の中心の透明部分）に適用することにより、分子を眼内に透過させることができる。眼の後部を冒す疾患の処置には、結膜の下または眼球周囲に注射したときに、結合タンパク質が強膜を透過することが最も望ましい場合がある。眼の表面をモデュレーションして分子の透過を改善する予備ステップの後に、結合タンパク質の投与を行ってもよい。好ましくは、角膜上皮などの上皮層を透過促進剤によってモデュレーションして、例えば上記の分子を十分に迅速に透過させる。眼疾患に対する本発明の結合タンパク質の使用は、また、光線力学的治療などの当技術分野で公知の任意の他の治療と組み合わせることができる。

【 0 0 9 4 】

in vivo投与に使用されるべき製剤は、無菌または滅菌済みでなければならない。これは、無菌濾過膜を通す濾過によって容易に達成される。

【 0 0 9 5 】

徐放性製剤を調製してもよい。本発明の一態様では、本発明の結合タンパク質を提供するために眼内植込剤を使用することができる。徐放性製剤の適切な例には、本発明のポリペプチドを含有する固体疎水性ポリマーの半透過性マトリックスであって、造形品、例え

ばフィルムまたはマイクロカプセルの形態のマトリックスが含まれる。徐放性マトリックスの例には、ポリエステル、ヒドロゲル（例えば、ポリ（２－ヒドロキシエチル－メタクリレート）、またはポリビニルアルコール、ポリラクチド、Ｌ－グルタミン酸－γ－エチル－Ｌ－グルタメートコポリマー、非分解性エチレン－酢酸ビニルコポリマー、分解性乳酸－グリコール酸コポリマー、例えばLUPRON DEPOT（登録商標）（乳酸－グリコール酸コポリマーおよびロイプロリド酢酸塩から構成される注射用ミクロスフェア）、およびポリ－Ｄ－（－）－３－ヒドロキシ酪酸が含まれる。

【００９６】

薬学的組成物は、技術者の知識の範囲内での任意の適切な方法によって投与することができる。好ましい投与経路は非経口である。非経口投与では、本発明の医薬は、上記に定義されたような薬学的に許容されうる賦形剤と共に、液剤、懸濁剤または乳剤などの注射用単位量剤形で製剤化される。投薬量および投与様式は、処置されるべき個体および特定の疾患に依存する。一般に、薬学的組成物は、本発明の結合タンパク質が１μg/kgから２０mg/kgの間、より好ましくは１０μg/kgから５mg/kgの間、最も好ましくは０．１から２mg/kgの間の用量で与えられるように投与される。好ましくは、それはボーラス投与で与えられる。持続注入も使用することができ、持続注入には、浸透圧ミニポンプを介する持続皮下送達が含まれる。その場合、薬学的組成物は、５～２０μg/kg/minの間、より好ましくは７から１５μg/kg/minの間の用量で注入されうる。特に、薬学的組成物は、本発明の結合タンパク質が注射１回あたり０．１mgから１０mgの間、より好ましくは注射１回あたり０．３mgから６mg、最も好ましくは注射１回あたり１mgから４mgの用量で与えられるように眼内注射により投与される。さらに、薬学的組成物は、１０から１２０mg/mlの間、より好ましくは２０から１００mg/mlの間、最も好ましくは４０から８０mg/mlの間の濃度の本発明の結合タンパク質を含有する溶液の１滴が眼に適用されるように、点眼液によって眼に投与される。

【００９７】

本発明の別の態様では、VEGF-Axxxの活性を阻害する上記結合タンパク質は、VEGF-Axxxについて上記したのと同じPIGFの阻害レベルでPIGFの活性を阻害する結合タンパク質または小分子と組み合わせて使用することができる。この態様は、VEGF-Axxxレベルが増加している部位でPIGFが血管新生性であることが見出されるという事実に基づく。さらに、VEGF-Axxxの活性を阻害する上記結合タンパク質は、血小板由来成長因子(PDGF)、VEGF-CまたはVEGFファミリータンパク質の他のメンバー、腫瘍壊死因子α(TNFα)、デルタ様リガンド(delta-like) 4(Dll4)、インターロイキン6(IL-6)、ニューロピリンまたはアンジオポエチン2(Ang2)の活性を阻害する結合タンパク質または小分子と組み合わせて使用することができる。

【００９８】

本発明は、さらに、処置方法を提供する。一局面では、網膜症を処置する方法であって、それを必要とする患者に治療有効量の本発明の結合タンパク質、特にヒトVEGF-AxxxとヒトVEGFR-2の間の相互作用を阻害するが、ヒトVEGF-AxxxとヒトVEGFR-2の相互作用を阻害しない結合タンパク質を投与することを含む方法が提供され、そして、その結合タンパク質は、VEGFR-2介在性血管新生を阻害する。

【００９９】

本発明は、さらに、記載された結合タンパク質を使用して、細胞におけるVEGF-Aの生物学的活性を阻害またはVEGFR-2によって仲介される生物学的活性を阻害するための方法に関する。細胞は、in vivoまたはex vivoの状況の場合があり、例えば、生きている生物の細胞、培養細胞または組織試料中の細胞でありうる。この方法は、該細胞を、本明細書に開示されたVEGF-A/VEGFR-2相互作用阻害性結合タンパク質のいずれかと、そのような生物学的活性を阻害するのに十分な量および時間接触させることを含む。

【０１００】

10

20

30

40

50

本発明は、VEGF-AxxxまたはVEGFR-2の阻害に応答する状態を有する対象を処置するための方法を提供する。そのような方法は、該対象に、有効量の本明細書記載の結合タンパク質を投与することを含む。状態は、不適切な血管新生により特徴付けられるものでありうる。状態は、過剰増殖状態でありうる。処置に適する状態（または障害）の例には、自己免疫障害、炎症障害、網膜症（特に増殖網膜症）およびガン、特に上記疾患の一つが含まれる。本明細書記載の任意の結合タンパク質を、そのような障害、特に自己免疫障害、炎症障害、網膜症およびガンから成る群より選択される障害の処置のための医薬を調製するために使用することができる。処置に適する好ましい状態（または障害）は、ファーストライン転移性腎細胞ガン、再発多形性膠芽腫、補助（adjuvant）結腸ガン、補助HER2陰性乳ガン、補助HER2陽性乳ガン、補助非小細胞肺ガン、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫、ファーストライン進行胃ガン、ファーストラインHER2陰性転移性乳ガン、ファーストラインHER2陽性転移性乳ガン、ファーストライン転移性卵巣ガン、消化管間質腫瘍、高リスク型カルチノイド、ホルモン不応性前立腺ガン、新たに診断された多形性膠芽腫、転移性頭頸部ガン、再発白金製剤感受性卵巣ガン、セカンドライン転移性乳ガン、進展型小細胞肺ガン、以前に処置されたCNS転移および再発多発性骨髄腫を有する非鱗状非小細胞肺ガン、前立腺ガン、非小細胞肺ガン（NSCLC）、結腸直腸ガンおよび膵臓ガン、進行卵巣ガン（AOC）、症候性悪性腹水を有するAOC患者ならびに非ホジキンリンパ腫である。

【0101】

本発明によるリコンビナント結合タンパク質は、バクテリオファージ（国際公開公報第90/02809号、国際公開公報第07/006665号）もしくは細菌細胞（国際公開公報第93/10214号）表面上でのディスプレイ、リボソームディスプレイ（国際公開公報第98/48008号）、プラスミド上でのディスプレイ（国際公開公報第93/08278号）などのいくつかの方法によって、または共有結合性RNA-反復タンパク質ハイブリッド構築物（国際公開公報第00/32823号）もしくはタンパク質相補アッセイ（国際公開公報第98/341120号）などによる細胞内発現および選択/スクリーニングを使用することによって入手および/またはさらに進展させることができる。そのような方法は、当業者に周知である。

【0102】

本発明によるリコンビナント結合タンパク質の選択/スクリーニングのために使用されるアンキリン反復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よって得ることができる（国際公開公報第02/020565号、Binz, H.K. et al., JMB, 332, 489-503, 2003、およびBinz et al., 2004、上記引用分中）。VEGF-Axxx特異的DARPinの選択のためのそのようなライブラリーの使用を、実施例1に示す。類似して、上述のアンキリン反復配列モチーフを使用して、アンキリン反復タンパク質のライブラリーを構築することができ、それをVEGF-Axxx特異的DARPinの選択またはスクリーニングのために使用することができる。さらに、本発明の反復ドメインは、標準的なリコンビナントDNA技法（例えば国際公開公報第02/020565号、Binz et al., 2003上記引用文中およびBinz et al., 2004、上記引用文中）を使用して、本発明による反復モジュールおよび適切なキャッピングモジュールから（Forrer, P., et al., FEBS letters 539, 2-6, 2003）モジュール方式で組み立てることができる。

【0103】

本発明は、実施例に記載された特定の態様に限定されない。他の原料を用いて下記概略にしたがって加工してもよい。

【0104】

実施例

下記に開示した全ての出発材料および試薬は、当業者に公知であって、市販されているか、または周知の技法を用いて調製することができる。

【0105】

材料

10

20

30

40

50

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) 製であった。特に述べない限り、DNAポリメラーゼ、制限酵素および緩衝剤は、New England Biolabs (USA) またはFermentas (Lithuania) 製であった。クローニングおよびタンパク質生産株は、E. coli XL1-blue (Stratagene, USA) であった。VEGF変異体は、R&D Systems (Minneapolis, USA) 製であるか、またはチャイニーズハムスター卵巣細胞もしくはPichia pastorisから産生させ、標準プロトコールにしたがって精製した (Rennel, E. S. et al., European J. Cancer 44, 1883-94, 2008; Invitrogen製Pichia発現系)。ビオチン化VEGF変異体は、標準ビオチン化試薬および方法 (Pierce, USA) を使用して精製VEGF変異体の一級アミンにビオチン部分を結合させることによって化学的に得た。

10

【0106】

分子生物学

特に述べない限り、記載されたプロトコール (Sambrook J., Fritsch E. F. and Maniatis T., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory 1989, New York) による方法を行う。

【0107】

設計アンキリン反復タンパク質ライブラリー

N2CおよびN3C設計アンキリン反復タンパク質ライブラリーは、記載されている (国際公開公報第02/20565号; Binz et al. 2003、上記引用文中; Binz et al. 2004、上記引用文中)。N2CおよびN3C中の数字は、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ランダム化反復モジュールの数を説明している。反復ユニットおよびモジュール内の位置を定義するために使用された命名法は、Binzら (2004、上記引用文中) を、反復モジュールおよび反復ユニットの境界が1アミノ酸位置だけ移動するように改変したものに基づく。例えばBinzら (2004、上記引用文中) の反復モジュールの位置1は、本開示の反復モジュールの位置2に相当し、それゆえにBinzら (2004、上記引用文中) の反復モジュールの位置33は、本開示の後続の反復モジュールの位置1に相当する。

20

【0108】

全てのDNA配列を、配列決定により確認し、全ての記載されたタンパク質の計算分子量を、質量分析によって確認した。

【0109】

実施例1: VEGF-Axxxに対して結合特異性を有する反復ドメインを含む結合タンパク質の選択

30

リボソームディスプレイ (Hanes, J. and Plueckthun, A., PNAS 94, 4937-42, 1997) を使用して、VEGF-Axxxに対して結合特異性を有する多数の設計アンキリン反復タンパク質 (DARPin) を、Binzら (2004、上記引用文中) によって記載されたN2CまたはN3C DARPinライブラリーから選択した。選択されたクローンの特異的 (VEGF-Axxx) ターゲットおよび非特異的 (MBP、E. coliマルトース結合タンパク質) ターゲットに対する結合を、粗抽出物のELISAによって評価したが、そのELISAは、VEGF-Axxx結合タンパク質がうまく選択されたことを示した (図1)。配列番号: 1~7の反復ドメインは、VEGF-Axxxに対する結合特異性を有する反復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。選択されたバインダーの配列分析から、ある選択されたファミリーのバインダーに固有の特異的アンキリン反復配列モチーフが明らかとなった。

40

【0110】

リボソームディスプレイによるVEGF-Axxx特異的アンキリン反復タンパク質の選択

VEGF-Axxx特異的アンキリン反復タンパク質の選択は、ターゲットタンパク質としてイヌVEGF-A164またはヒトVEGF-A165、記載された設計アンキリン反復タンパク質ライブラリー (国際公開公報第02/020565号、Binz et al., 2003、上記引用文中およびBinz et al., 2004、上記引用文中)、および確立されたプロト

50

コール (Zahnd, C., Amstutz, P. and Plueckthun, A., Nat. Methods 4, 69-79, 2007) を使用して、リボソームディスプレイ (Hanes and Plueckthun、上記引用文中) によって行った。リボソームディスプレイの選択ラウンドは、N2CおよびN3Cの両方のDARPinライブラリーを用いてイヌまたはヒトVEGF変異体 (ニュートラアビジンまたはストレプトアビジン上に固定化されたビオチン化変異体を含む) に関して、確立されたプロトコール (Binz et al. 2004、上記引用文中) を使用して行った。各選択ラウンド後の逆転写 (RT) - PCRサイクルの回数を、バインダーの濃縮による収率に合わせて40回から30回に常に減らした。単一クローンのELISAおよびSPR測定から明らかとなったように、イヌVEGFに関する最初の4回の選択ラウンドによって、親和性がナノモル濃度のDARPinのプールを回収した。さらに改善された親和性のDARPinを見出すために、2および3回目の最初のリボソームディスプレイ選択ラウンド後のプールを採用して、ニュートラアビジンまたはストレプトアビジン上に固定化されたビオチン化ヒトまたはイヌVEGFに関して追加的なオフレート (off-rate) 選択を行い、続いてヒトVEGFに関してオンレート (on-rate) 選択ラウンドを行った。

【0111】

粗抽出物ELISAによって示されたように、選択されたクローンは、VEGF-Axxxに特異的に結合する

VEGF-Axxxに特異的に結合する個々の選択されたDARPinを、標準プロトコールを用いてDARPin発現細胞の粗Escherichia coli抽出物を使用した酵素結合免疫吸着アッセイ (ELISA) によって同定した。選択されたクローンをpQE30 (Qiagen) 発現ベクターにクローニングし、E. coli XL1-Blue (Stratagene) 中にトランスフォーメーションし、次に成長培地 (1% グルコースおよび100 µg/ml アンピシリンを含有する2YT) 1mlが入っている96深型ウェルプレート (ウェル1個に各クローン) に入れて37 °Cで一晩成長させた。50 µg/ml アンピシリンを含有する新鮮2YT 1mlに新鮮96深型ウェルプレート中の一晩培養物100 µlを接種した。37 °Cで2時間インキュベーション後に、IPTG (1mM終濃度) で発現を誘導し、3時間続けた。細胞を採集し、B-PER II (Pierce) 100 µl中に再懸濁し、振盪しながら室温で15分間インキュベーションした。次にPBS-TB (0.2% BSA、0.1% Tween20を補充されたPBS, pH 7.4) 900 µlを加え、遠心分離によって細胞片を除去した。VEGF-Axxx変異体または無関係のMBPのいずれかがそのビオチン部分を介して固定化されたものが入っている、ニュートラアビジンコーティング済みMaxiSorpプレートのウェルに各溶解クローン100 µlを適用し、RTで1時間インキュベーションした。PBS-T (0.1% Tween20を補充されたPBS, pH 7.4) で徹底的に洗浄した後に、一次抗体として抗RGS (His)₄モノクローナル抗体 (34650, Qiagen) および二次試薬としてアルカリホスファターゼとコンジュゲーションしたヤギ抗マウスポリクローナル抗体 (A3562, Sigma) を使用した標準ELISA手順を用いてプレートを作り上げた。次に、アルカリホスファターゼに関する基質として4-ニトロフェニルリン酸二ナトリウム (4NPP, Fluka) を使用することによって結合を検出した。発色を405 nmで測定した。VEGF-AxxxへのDARPinの結合を確認するために使用された実施例の粗抽出物ELISAからの結果を図1に示す。そのような粗細胞抽出物ELISAによる数百個のクローンのスクリーニングから、VEGF-Axxxに対して特異性を有する100種よりも多くの異なるDARPinが明らかとなった。これらの結合タンパク質をさらなる分析のために選択した。VEGF-Axxxに特異的に結合する、選択されたアンキリン反復ドメインのアミノ酸配列の例を、配列番号: 1~7に提供する。

【0112】

VEGF-Axxxに対して結合特異性を有する選択された反復ドメインから反復配列モチーフを推定する

VEGF-Axxxに対して結合特異性を有する選択された反復ドメインのアミノ酸配列を、さらに、当業者に公知の配列分析ツールによって分析した (国際公開公報第02/020565号; Forrer et al., 2003、上記引用文中; Forrer, P., Binz, H.K., Stump

10

20

30

40

50

p, M.T. and Plueckthun, A., ChemBioChem, 5(2), 183-189, 2004)。それにもかかわらず、反復配列モチーフを推定するために天然反復モチーフが使用された国際公開公報第02/020565号とは対照的に、本明細書では、VEGF-Axxxに対して結合特異性を有する選択された反復ドメインの反復ユニットから反復配列モチーフを推定した。それにより、共通の反復配列モチーフを含む選択された反復ドメインのファミリーが決定された。

【0113】

DARPinの高レベルの可溶性発現

さらなる分析のために、上記粗細胞抽出物ELISAにおいて特異的VEGF-Axxx結合を示す選択されたクローンをE. coli XL1-blue細胞において発現させ、標準プロト

コールを用いてそのHisタグを利用して精製した。静置一晚培養物(LB、1%グルコース、100mg/lアンピシリン; 37℃) 25mlを使用して1l培養物(同培地)に接種した。A(600) = 0.7のときに0.5mM IPTGを用いて培養物を誘導し、37℃で4時間インキュベーションした。培養物を遠心分離し、結果として生じたペレットをTBS500(50mM Tris-HCl, 500mM NaCl, pH8) 40ml中に再懸濁し、超音波処理した。溶解物を再遠心分離し、結果として生じた上清にグリセロール(10%(v/v)終濃度)およびイミダゾール(20mM終濃度)を添加した。製造業者の説明書(QIAgen, Germany)にしたがってNi-ニトリロ三酢酸カラム(カラム体積2.5ml)にかけてタンパク質を精製した。SDS-15%PAGEから推定された通り、1リットルのE. coli培養物からVEGF-Axxxへの結合特異性を有する最大200mgの高溶解性DARPinを、純度>95%で精製することができた。そのような精製DARPinをさらなる特徴づけのために使用する。

【0114】

実施例2：スフェロイド伸長アッセイにおけるVEGF-Axxxへの結合特異性を有する選択されたDARPinのIC₅₀値の決定

コラーゲンマトリックス中に包埋されたHUVECスフェロイドへのVEGF-Axxxの添加は、スフェロイドの発芽につながる。VEGF-Axxx阻害剤の添加は、発芽形成を遮断し、それは、発芽の数および長さによって統計的に定量することができる。異なる濃度の阻害剤および一定量のVEGFを添加することによって、IC₅₀を決定することができる。

【0115】

VEGF-Axxx特異的DARPinによるスフェロイド発芽の阻害

スフェロイド伸長アッセイは、標準プロトコール(Korff et al., 上記引用文中)にしたがって行った。VEGF-Axxxに対して特異性を有するDARPinを選択し、実施例1に記載したように純度>96%に精製した。ヒト臍帯静脈細胞を単層培養で集密になるまで成長させた。トリプシン処理後に、細胞懸濁物を懸滴中に入れて、スフェロイド、すなわち約500個の組織化された凝集HUVECを形成させた。スフェロイドをコラーゲンマトリックス中に包埋し、VEGF-A165で刺激して発芽の伸長を開始させた。追加的に発芽阻害剤を添加して、それが発芽阻害に及ぼす作用を観察した。スフェロイド1個あたりの発芽数および発芽長は、グラフィックソフトウェアを使用して定量した。

【0116】

2種の例示的なスフェロイド発芽アッセイからの結果を図2a(VEGF-Axxxに対して結合特異性を有するDARPin#30)および図2b(DARPin NC、VEGF-Axxxに対する結合特異性を有さない陰性対照DARPin; 例えばDARPin E3__5(Binz et al., 2005上記引用文中))に示す。このアッセイで最も性能の良いDARPinは、10~50pMの範囲のIC₅₀値を示したが、Avastin(登録商標)、Lucentis(登録商標)およびMacugen(登録商標)は、並行実験で150~500pMの範囲のIC₅₀値を示した。

【0117】

実施例3：表面プラズモン共鳴分析によるAvastin(登録商標)と比較したDARPin

27のターゲット特異性の決定

イヌVEGF-A164またはイヌVEGF-A164bをフローセル中に固定化し、DARPin#27（配列番号：1のアミノ酸1～159に相当する反復ドメイン）およびAvastin（登録商標）と固定化ターゲットとの相互作用を分析した。

【0118】

表面プラズモン共鳴（SPR）分析

ProteOn装置（BioRad）を使用してSPRを測定した。送液用緩衝液（running buffer）は、20mM HEPES（pH7.4）、150mM NaClおよび0.005% Tween 20であった。約1200RUのイヌVEGF-A164またはイヌVEGF-A164bをGLCチップ（BioRad）上に固定化した。流量60μl/分で緩衝液流5分、濃度250nMでのAvastin（登録商標）またはDARPin#27のインジェクション100秒、および緩衝液流で数分のオフレート測定で相互作用を測定した。未コーティング参照細胞のシグナルを測定値から差し引いた。

【0119】

結果を図3a（AvastinとイヌVEGF-A164との相互作用）、図3b（AvastinとイヌVEGF-A164bとの相互作用）、図3c（DARPin#27とイヌVEGF-A164との相互作用）および図3d（DARPin#27とイヌVEGF-A164bとの相互作用）に示す。Avastinが両方の固定化VEGFアイソフォームと明らかに相互作用する一方で、DARPin#27は、VEGF-A164bではなく、VEGF-A164とだけ相互作用を示す。

【0120】

実施例4：血管漏出ウサギモデルにおけるVEGF-A165阻害でのDARPin#30のin vivo有効性

PEG化DARPin#30（アミノ酸1～126に相当する配列番号：4の反復ドメイン）またはLucentis（登録商標）を硝子体内注射によってウサギ眼内に適用し、続くヒトVEGF-A165の硝子体内注射によって誘導される血管漏出をそれらが阻害する有効性を試験した。

【0121】

ウサギにおける血管漏出阻害の測定

1日目にPBS、PEG化DARPin#30（125μg）または等モル量のLucentis（登録商標）（162μg）のいずれかを硝子体内注射によって各ウサギの一方の眼（処置された眼）内に適用する。4日目または30日目に各ウサギの処置された眼をヒトVEGF-A165 500ngの硝子体内注射によって誘発した。VEGF-A165注射の48時間後に、フルオレセインナトリウムの静脈内注射（50mg/kg動物体重、0.9%（w/v）食塩溶液中に10%（w/v））の1時間後に全ての眼におけるフルオレセイン含量を測定することによって全ての動物の両眼を評価した。処置された眼および未処置の眼における蛍光量の比を各動物について計算した。1という比は、処置された眼における追加的な蛍光漏出の不在に相当し、1よりも大きな比は、未処置対照の眼よりも処置された眼の方が大きな蛍光漏出であることを示す。

【0122】

PEG化DARPinの調製

単一のCys残基およびマレイミド化学反応を利用することによるタンパク質のPEG化は、当業者に周知であり、確立されたプロトコール（例えばPierceからのもの）にしたがって行うことができる。標準的なクロマトグラフィー法を用いて、追加的なC末端リンカー（GGGSGGGSC、配列番号：8）を含むDARPin#30を均質付近まで精製した。DTTを使用してタンパク質を完全に還元し、ゲル濾過により精製してDTTを除去し、緩衝液をPBSに交換した。PBSに溶解したPEG-マレイミド（メトキシ-ポリエチレングリコール-オキシプロピルアミノ-プロピルマレイミド；NOF, no. Sunbright ME-200MA）をPBS中のDARPinと、約15%モル濃度過剰のPEG-マレイミドとなるように室温で2～4時間混合する。次に、標準的な陰イオン交換クロマトグラ

フィーを用いることによってPEG化DARPinを非反応性DARPin部分および非反応性PEG部分から分離する。

【0123】

結果を図4に示す。PEG化DARPin#30およびLucentis(登録商標)の両方が、硝子体内注射によって適用された4日後に、VEGF-A165が誘導する血管漏出からウサギの眼を保護することができた。しかしながら、Lucentis(登録商標)ではなくPEG化DARPin#30だけが硝子体内注射の最大30日後までVEGF-A165が誘導する血管漏出からウサギの眼を保護することができた。

【0124】

他の実験では、本発明の異なる結合タンパク質の硝子体内消失半減期を、ウサギ眼への硝子体内注射後に測定した。追加的なC末端リンカー(GGGSGGGSC、配列番号:8)を含むDARPin#30を、20kDaおよび40kDaの非タンパク質性PEG部分に、NOF製のそれぞれのマレイミドPEGを使用してコンジュゲーションさせた(実施例5参照)。DARPin#30、20kDaのPEG部分にコンジュゲーションしたDARPin#30および40kDaのPEG部分にコンジュゲーションしたDARPin#30について、消失半減期は、3.5日(±0.3日)、6.1日(±1.0日)および5.4日(±0.8日)と決定された。驚くことに、非タンパク質性PEG部分の分子量を20kDaから40kDaに増加させても消失半減期の増加を招かなかった。配列番号:4の反復ドメインの代わりに配列番号:1(アミノ酸1~159)または配列番号:3(アミノ酸1~126)の反復ドメインを含む結合タンパク質が使用された対応する実験において同じ傾向が観察された。

【0125】

実施例5:リコンビナント結合タンパク質

VEGF-Axxxに結合する反復ドメインおよびタンパク質性ポリマー部分を含むリコンビナント結合タンパク質の例は、配列番号:1および4である。配列番号:1の反復ドメインは、アミノ酸1~159に相当し、配列番号:1のタンパク質性ポリマー部分は、アミノ酸160~1,024に相当する。配列番号:4の反復ドメインは、アミノ酸1~126に相当し、配列番号:4のタンパク質性ポリマー部分はアミノ酸127~536に相当する。

【0126】

配列番号:1および4の結合タンパク質を、当業者に公知の標準技法を使用してEscherichia coliの細胞質中に発現させた(例えば、Qiagen(Germany)製pQE発現系を参照されたい)。開始Metの後に小さなGly残基(すなわち配列番号:1および4の位置1でのアミノ酸)が続いていることから、発現ベクターによって追加的にコードされるMet残基は、発現されたポリペプチドからE. coliの細胞質中で効率的に切断された。細胞を溶解させ(例えばフレンチプレスを使用することによる)、当業者に公知の標準的なクロマトグラフィー技法を使用することによって粗細胞抽出物から結合タンパク質を均質付近まで精製した。

【0127】

VEGF-Axxxと結合する1個の反復ドメインおよび1個の非タンパク質性ポリマー部分を含むリコンビナント結合タンパク質の例を、配列番号:2、3、5、6、および7の反復タンパク質を使用して産生させた。これらの反復タンパク質は、N末端反復ドメインに続いてポリペプチドリンカーおよびC末端Cysを含む。それぞれの反復ドメインは、配列番号:2および7についてはアミノ酸1~159に、配列番号:3~6についてはアミノ酸1~126に相当する。当業者に公知の標準技法を使用して、Escherichia coliの細胞質中に配列番号:2、3、5、6、および7の反復タンパク質を発現させた(例えば、Qiagen(Germany)製Expressionist参照)。開始Metの後に小さなGly残基(すなわち配列番号:2、3、5、6、および7の位置1でのアミノ酸)が続くことから、発現ベクターによって追加的にコードされるMet残基は、発現されたポリペプチドからE. coliの細胞質中で効率的に切断された。細胞を溶解させ(例えばフレンチプレスを使用

することによる)、当業者に公知の標準的なクロマトグラフィー技法を使用することによって粗細胞抽出物から結合タンパク質を均質付近まで精製した。

【 0 1 2 8 】

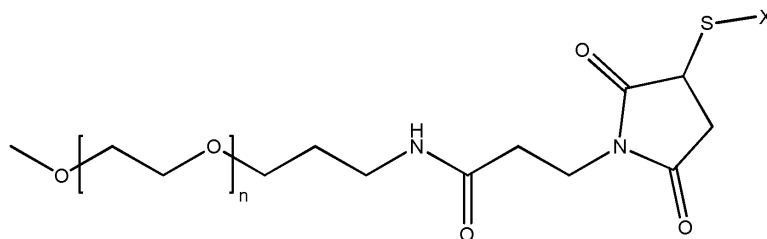
次に、単一の C y s 残基を含む精製反復タンパク質を、実施例 4 に概略したような標準的なマレイミド化学反応を使用して非タンパク質性ポリマー部分にコンジュゲーションさせた。それによって、配列番号：2 の反復タンパク質および 4 0 kDa の非タンパク質性 P E G 部分 (例えば NOF 製の 4 0 kDa マレイミド - P E G (α - [3 - (3 - マレイミド - 1 - オキソプロピル) アミノ] プロピル - ω - メトキシ - ポリオキシエチレン)、製造番号 Sunbright ME-400MA)、配列番号：3 の反復タンパク質および 2 0 kDa の非タンパク質性 P E G 部分 (例えば NOF 製の 2 0 kDa マレイミド - P E G (α - [3 - (3 - マレイミド - 1 - オキソプロピル) アミノ] プロピル - ω - メトキシ - ポリオキシエチレン)、製造番号 Sunbright ME-200MA)、配列番号：5 の反復タンパク質および 1 2 kDa の非タンパク質性 P E G 部分 (例えば NOF 製の 1 2 kDa マレイミド - P E G (α - [3 - (3 - マレイミド - 1 - オキソプロピル) アミノ] プロピル - ω - メトキシ - ポリオキシエチレン)、製造番号 Sunbright ME-120MA)、配列番号：6 の反復タンパク質および 5 kDa の非タンパク質性 P E G 部分 (例えば NOF 製の 5 kDa マレイミド - P E G (α - [3 - (3 - マレイミド - 1 - オキソプロピル) アミノ] プロピル - ω - メトキシ - ポリオキシエチレン)、製造番号 Sunbright ME-050MA) ならびに配列番号：7 の反復タンパク質および 2 kDa の非タンパク質性 P E G 部分 (例えば NOF 製の 2 kDa マレイミド - P E G (α - [3 - (3 - マレイミド - 1 - オキソプロピル) アミノ] プロピル - ω - メトキシ - ポリオキシエチレン)、製造番号 Sunbright ME-020MA) を含む本発明の結合タンパク質を製造した。次にさらに、当業者に公知の標準的なクロマトグラフィー技法によって非 P E G 化反復タンパク質および過剰の P E G から P E G 化反復タンパク質を分離した。

【 0 1 2 9 】

このように、配列番号：2、3、5、6、および 7 をその C 末端システインのチオールでマレイミド P E G (α - [3 - (3 - マレイミド - 1 - オキソプロピル) アミノ] プロピル - ω - メトキシ - ポリオキシエチレン) にコンジュゲーションさせた。それによって以下の構造：

【 0 1 3 0 】

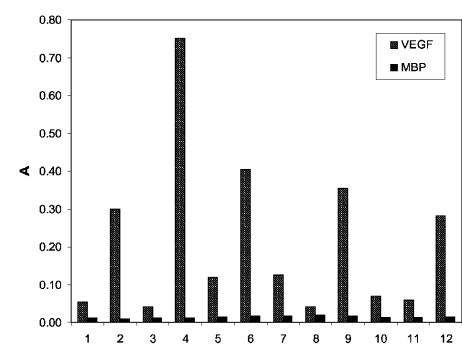
【 化 1 】



[式中、X は配列番号：2、3、5、6、または 7 であり；n は正の整数である] を製造した。

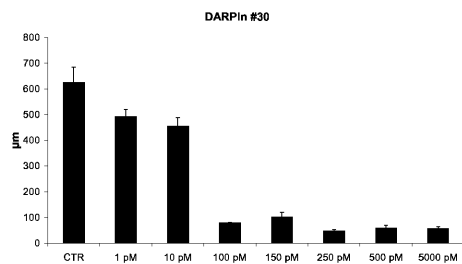
【 図 1 】

Fig. 1



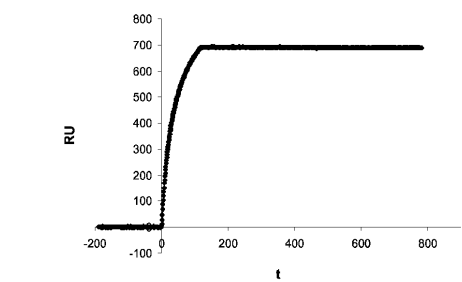
【 図 2 a 】

Fig. 2a



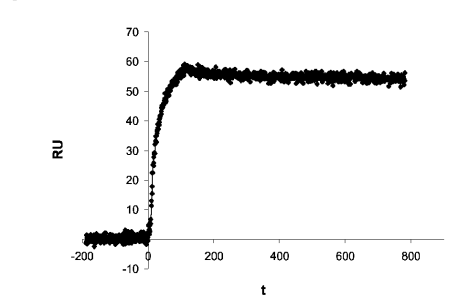
【 図 3 b 】

Fig. 3b



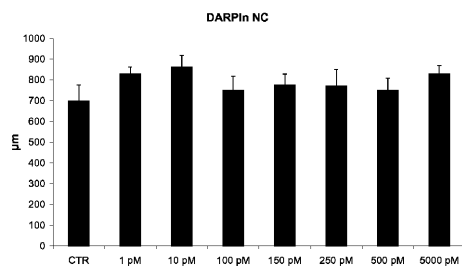
【 図 3 c 】

Fig. 3c



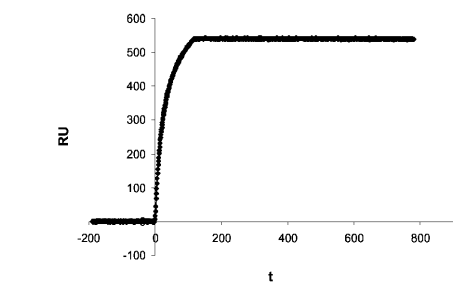
【 図 2 b 】

Fig. 2b



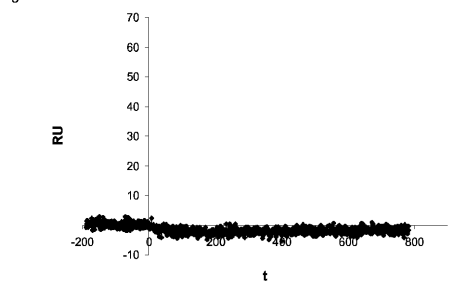
【 図 3 a 】

Fig. 3a



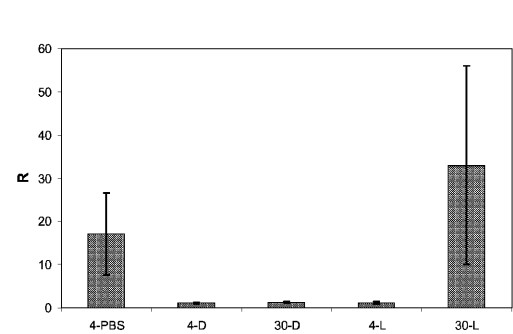
【 図 3 d 】

Fig. 3d



【 図 4 】

Fig. 4



【配列表】

0006010528000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 6 1 P 35/00	(2006.01)	A 6 1 P	9/00
A 6 1 K 47/48	(2006.01)	A 6 1 P	35/00
A 6 1 K 47/34	(2006.01)	A 6 1 K	47/48
C 1 2 N 15/09	(2006.01)	A 6 1 K	47/34
		C 1 2 N	15/00
			A

(74)代理人 100116528
弁理士 三宅 俊男

(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

(74)代理人 100146031
弁理士 柴田 明夫

(74)代理人 100146422
弁理士 田中 聖

(72)発明者 ビンツ, ハンス・カスパー
スイス国、ツェーハー - 8 9 0 3 ビルメンズドルフ、パッハシュトラース 2 7

(72)発明者 フォーレル, パトリック
スイス国、ツェーハー - 8 9 5 3 ディーティコン、ライナッカーシュトラース 1 7

(72)発明者 シュトゥンプ, ミハエル・トビアス
スイス国、ツェーハー - 8 9 5 4 ゲロルツヴィル、クラッツシュトラース 6

審査官 松岡 徹

(56)参考文献 国際公開第 2 0 0 0 / 0 5 9 9 2 6 (W O , A 1)
特表 2 0 0 9 - 5 3 8 3 5 7 (J P , A)
Inoki et al. , The FASEB Journal , Vol.16, No.2 , (2001)
Stumpp et al. , Drug Discovery Today , Vol.13, No15/16 , p.695-701(2008)

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

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