

(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2017-509651

(P2017-509651A)

(43) 公表日 平成29年4月6日(2017.4.6)

(51) Int.Cl.		F I			テーマコード (参考)
C O 7 K 14/78 (2006.01)		C O 7 K	14/78	Z N A	4 H O 4 5
C 1 2 N 15/09 (2006.01)		C 1 2 N	15/00	A	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 45 頁)

(21) 出願番号	特願2016-558059 (P2016-558059)	(71) 出願人	391015708
(86) (22) 出願日	平成27年3月19日 (2015. 3. 19)		ブリストル・マイヤーズ スクイブ カン
(85) 翻訳文提出日	平成28年11月11日 (2016. 11. 11)		パニー
(86) 国際出願番号	PCT/US2015/021466		B R I S T O L - M Y E R S S Q U I B
(87) 国際公開番号	W02015/143156		B C O M P A N Y
(87) 国際公開日	平成27年9月24日 (2015. 9. 24)		アメリカ合衆国08543ニュージャージー
(31) 優先権主張番号	61/955, 975		州 プリンストン、ルート206アンド
(32) 優先日	平成26年3月20日 (2014. 3. 20)		・プロビンス・ライン・ロード
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100081422
(31) 優先権主張番号	62/084, 270		弁理士 田中 光雄
(32) 優先日	平成26年11月25日 (2014. 11. 25)	(74) 代理人	100084146
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 山崎 宏
		(74) 代理人	100122301
			弁理士 富田 憲史

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 安定化したフィブロネクチンベーススキャフォールド分子

(57) 【要約】

標的に特異的に結合する、フィブロネクチンベースのスキャフォールド(FBS)ドメイン、例えば¹⁰F n 3分子を含むタンパク質を提供し、ここで、該FBSドメインは、P m X n (Pはプロリンであり、Xは任意のアミノ酸であり、nは0または少なくとも1である整数であり、mは少なくとも1である整数である)からなる領域に、C末端で連結し、該P m X n部分は、該P m X n部分に連結していないタンパク質と比較して、FBSドメインの性質の増強、例えば安定性の向上をもたらす。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

標的に特異的に結合する、単離されたフィブロネクチンベースのスキヤフォールド(F B S)タンパク質であって、該 F B S が非天然起源の F B S であり、該 F B S が C 末端において、アミノ酸配列 P m X n (P はプロリンであり、X は任意のアミノ酸であり、m は少なくとも 1 である整数であり、n は 0 または少なくとも 1 である整数である)からなる部分に連結しており、該 P m X n 部分が、P m X n 部分に連結していない F B S タンパク質と比較して、F B S タンパク質の性質を増強させる、単離された F B S タンパク質。

【請求項 2】

該部分が P からなる (m は 1 であり、n は 0 である)、請求項 1 記載の単離された F B S タンパク質。

10

【請求項 3】

該部分が P P からなる (m は 2 であり、n は 0 である)、請求項 1 に記載の単離された F B S タンパク質。

【請求項 4】

該部分が P m X n からなる (n は 1 ～ 1 5 0 である)、請求項 1 に記載の単離された F B S タンパク質。

【請求項 5】

該部分が P m X n からなる (n は 1 ～ 1 0 である)、請求項 1 に記載の単離された F B S タンパク質。

20

【請求項 6】

該部分が P m X n からなる (n は 1 ～ 5 である)、請求項 1 に記載の単離された F B S タンパク質。

【請求項 7】

該部分が、PI、PC、PID、PIE、PIDK(配列番号 6 1)、PIEK(配列番号 6 3)、PIDKP(配列番号 6 5)、PIEKP(配列番号 6 7)、PIDKPS(配列番号 6 9)、PIEKPS(配列番号 7 1)、PIDKPC(配列番号 7 3)、PIEKPC(配列番号 7 5)、PIDKPSQ(配列番号 7 7)、PIEKPSQ(配列番号 7 9)、PIDKPCQ(配列番号 8 1)、PIEKPCQ(配列番号 8 3)、PHHHHHH(配列番号 8 7)または PCHHHHHH(配列番号 8 6)からなる、請求項 1 に記載の単離された F B S タンパク質。

【請求項 8】

F B S タンパク質が、F n 3 タンパク質である、請求項 1 ～ 7 のいずれか記載の単離された F B S タンパク質。

30

【請求項 9】

F n 3 タンパク質が、^{1 0} F n 3 タンパク質である、請求項 8 に記載の単離された F B S タンパク質。

【請求項 10】

^{1 0} F n 3 タンパク質がヒト ^{1 0} F n 3 タンパク質である、請求項 9 に記載の単離された F B S タンパク質。

【請求項 11】

配列番号 1 と少なくとも 5 0 % 同一であるアミノ酸配列を含む、請求項 1 ～ 1 0 のいずれか記載の単離された F B S タンパク質。

40

【請求項 12】

少なくとも 1 つのループまたは 1 つのスキヤフォールド領域に少なくとも 1 つのアミノ酸変異を含む、請求項 1 ～ 1 1 のいずれかに記載の単離された F B S タンパク質。

【請求項 13】

アミノ酸配列

【化 1】

VSDVPRDLEVVA(X)_uLLISW(X)_vYRITY(X)_wFTV(X)_xATISGL(X)_yYTITVYA(X)_zI
SINYRT(配列番号 9)

50

((X)_u、(X)_v、(X)_w、(X)_x、(X)_yおよび(X)_zは、野生型アミノ酸配列(配列番号1)からなるか、対応する野生型配列に少なくとも1つのアミノ酸の差異を含み、該配列は、1～10個のスキフォールド、N末端および／またはC末端変異を含んでよい)を含む、請求項1～12のいずれかに記載の単離されたFBSタンパク質。

【請求項14】

配列番号1と少なくとも50%同一であるアミノ酸配列を含む、請求項1～13のいずれかに記載の単離されたFBSタンパク質であって、該FBSタンパク質のC末端アミノ酸残基が、PmXnからなる部分に融合しており、該FBSタンパク質が、500nM未満のK_dで標的に特異的に結合し、該標的には、配列番号1を含む、野生型¹⁰F_n3分子は結合しない、単離されたFBSタンパク質。

10

【請求項15】

配列番号1と少なくとも70%同一であるアミノ酸配列を含む、請求項14に記載の単離されたFBSタンパク質。

【請求項16】

PmXnからなる部分が、FBSタンパク質のC末端アミノ酸残基に、ペプチド結合を介して結合している、請求項1～15のいずれかに記載の単離されたFBSタンパク質。

【請求項17】

PmXnがPまたはPCである、請求項1～16のいずれかに記載の単離されたFBSタンパク質。

【請求項18】

配列番号1に少なくとも60%同一であるアミノ酸配列を含む、請求項1～17のいずれかに記載の、単離されたFBSタンパク質であって、FBSタンパク質のC末端アミノ酸残基が、ペプチド結合を介してプロリンに結合しており、該FBSタンパク質が、500nM未満のK_dで標的に特異的に結合し、該標的には、配列番号1を含む野生型¹⁰F_n3分子が結合しない、単離されたFBSタンパク質。

20

【請求項19】

PmXnの少なくとも1つのXがシステインである、請求項1～18のいずれかに記載の単離されたFBSタンパク質。

【請求項20】

該システインが異種性部分に結合している、請求項19に記載の単離されたFBSタンパク質。

30

【請求項21】

該異種性分子が検出可能な部位である、請求項20に記載の単離されたFBSタンパク質。

【請求項22】

該異種性分子が薬物部分であり、該薬物部分とFBSが、FBS-薬物結合体を形成する、請求項20または21に記載の単離されたFBSタンパク質。

【請求項23】

PmXnによりもたらされる性質の増強が、安定性の上昇である、請求項1～22のいずれかに記載の単離されたタンパク質。

40

【請求項24】

安定性の上昇が、少なくとも1℃、2℃、3℃、4℃、5℃またはそれ以上のT_mの上昇である、請求項23に記載の単離されたFBSタンパク質。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願への相互引用

本出願は、2014年3月20日出願の米国仮出願第61/955,975号および、2014年11月25日出願の米国仮出願第62/084,270号に基づく優先権を主張し、当該文献の内容は、引用により、本明細書に具体的に包含される。

50

【背景技術】

【0002】

アドネクチンは、10番目のヒトフィブロネクチンタイプIIIドメイン($^{10}\text{Fn3}$)由来である、高親和性および特異的な標的結合特性を有する治療用タンパク質のクラスである。野生型 $^{10}\text{Fn3}$ がきわめて安定であり可溶性を示すのに対し、野生型配列から、順番に4〜31個の変異を含む、標的結合性の $^{10}\text{Fn3}$ バリエーションは、その安定性および溶解度が幅広く変動する。言い換えれば、野生型 $^{10}\text{Fn3}$ 配列のいずれの変異も、標的結合に必要なものであっても、タンパク質の安定性を低下させる危険性を含んでいる。結果として、好ましくは、アドネクチンの治療標的への結合に介在する残基の特性によらず、野生型 $^{10}\text{Fn3}$ 配列になし得る修飾であって、該配列を安定化させる修飾を決定することが望ましい。

10

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0003】

本明細書では、安定化したフィブロネクチンベーススキャフォールド(FBS)タンパク質、例えば Fn3 、例えば、 PmXn (Pがプロリンであり、Xが任意のアミノ酸であり、mが少なくとも1である整数であり、nが0または少なくとも1である整数である)からなる部分にC末端で結合している $^{10}\text{Fn3}$ 分子(例えばヒト $^{10}\text{Fn3}$ 分子)を提供し、ここで、該 PmXn 部分は、FBSタンパク質の少なくとも1つの特徴、例えば熱安定性を増強させる。

20

【図面の簡単な説明】

【0004】

【図1】ヒト $^{10}\text{Fn3}$ ドメインの結晶構造(PDB ID: 1FNA)および、該構造中に見えるポリペプチドのタンパク質配列を示す。該構造の最後の2残基である、C末端βストランドGのすぐ下流の、目的の配列中の「EI」を黒色の球形で示す。

【発明を実施するための形態】

【0005】

定義

「アミノ酸残基」は、ペプチド結合の形成の際に水分子が失われた(窒素側からの H^+ および炭素側からの OH^-)後に残っているアミノ酸の部分である。

30

【0006】

本明細書において、「 $^{10}\text{Fn3}$ ドメイン」または「 $^{10}\text{Fn3}$ 部分」または「 $^{10}\text{Fn3}$ 分子」は、野生型の $^{10}\text{Fn3}$ およびその生物学的に活性なバリエーション、例えば、標的、例えば標的タンパク質に特異的に結合する生物学的に活性なバリエーションを指す。野生型ヒト $^{10}\text{Fn3}$ ドメインは、配列番号1〜8に示すアミノ酸配列のうちの1つを含んでいてよい。野生型ヒト $^{10}\text{Fn3}$ ドメインの生物学的に活性なバリエーションとしては、配列番号1〜8のいずれかを含む $^{10}\text{Fn3}$ ドメインと比較して、少なくとも、または最大で、または約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、30、35、40または45個のアミノ酸変化、すなわち、置換、付加または欠失を含む $^{10}\text{Fn3}$ ドメインが挙げられる。野生型 $^{10}\text{Fn3}$ ドメインの生物学的に活性なバリエーションはまた、配列番号1〜8のいずれかを含む $^{10}\text{Fn3}$ ドメインと比較して、最大1〜3、1〜5、1〜10、1〜15、1〜20、1〜25、1〜30、1〜35、1〜40または1〜45個のアミノ酸の変化を含んでいてよい。特定の態様において、野生型 $^{10}\text{Fn3}$ ドメインの生物学的に活性なバリエーションは、配列番号1〜8のいずれかを含む $^{10}\text{Fn3}$ ドメインと比較して、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、30、35、40または45個以下のアミノ酸の変化、すなわち、置換、付加または欠失を含む。アミノ酸の変化は、ループ領域内、ストランド内またはN末端もしくはC末端領域内であってよい。アミノ酸変化を許容する例示的な変性 $^{10}\text{Fn3}$ アミノ酸配列を、本明細書中で、配列番号

40

50

9～16として記載する。

【0007】

「ポリペプチド」は、長さ、翻訳後修飾、または機能を問わず、2つ以上のアミノ酸の任意の配列を意味する。ポリペプチドは、天然アミノ酸および非天然アミノ酸、例えば参照により本明細書に組み込まれる米国特許第6,559,126号明細書に記載されているものを含むことができる。ポリペプチドは種々の標準的な化学的方法のいずれかで修飾することもできる(例えばアミノ酸は保護基で修飾することができ；カルボキシ末端アミノ酸は末端アミド基にすることができ；アミノ末端残基は、例えば親油性を強化するための基などで修飾することができ；または、ポリペプチドを化学的にグリコシル化するか、他の方法で修飾して、安定性またはインビボ半減期を延長することができる)。ポリペプチド修飾は、該ポリペプチドに他の構造、例えば環状化合物または他の分子を結合させることを含んでよく、立体配置(すなわちRもしくはS；またはLもしくはD)が変化している1つ以上のアミノ酸を含有するポリペプチドも含み得る。

【0008】

本明細書における¹⁰Fn3ドメイン(または部分または分子)の「領域」は、ループ(AB、BC、CD、DE、EFおよびFG)、βストランド(A、B、C、D、E、FおよびG)、N末端(配列番号1のアミノ酸残基第1番～第7番に対応)、またはC末端(配列番号1のアミノ酸残基第93番～第101番に対応)のいずれかを指す。

【0009】

¹⁰Fn3ドメイン(または部分)の「ノースポールループ」は、¹⁰Fn3ドメインのBC、DEおよびFGループのいずれか1つを指す。

【0010】

¹⁰Fn3ドメイン(または部分)の「サウスポールループ」は、¹⁰Fn3ドメインのAB、CDおよびEFループのいずれか1つを指す。

【0011】

「スキャフォールド領域」は、ヒト¹⁰Fn3ドメインの任意の非ループ領域を指す。スキャフォールド領域には、A、B、C、D、E、FおよびGβストランドならびにN末端領域(配列番号1の1番目～7番目の残基に対応するアミノ酸)およびC末端領域(配列番号1の93番目～94番目の残基に対応するアミノ酸)が含まれる。

【0012】

「パーセント(%)アミノ酸配列同一性」は、本明細書では、最大のパーセント配列同一性が得られるように配列をアラインメントし、必要であればギャップを導入した後に、保存的置換をいずれも配列同一性の一部であるとはみなさずに、選択した配列中のアミノ酸残基と同一な、候補配列中のアミノ酸残基の百分率と定義する。パーセントアミノ酸配列同一性を決定するためのアラインメントは、当技術分野の技能の範囲内にある種々の方法で、例えばBLASTSM、BLASTSM-2、ALIGN、ALIGN-2またはMegalign(DNASTAR(登録商標))ソフトウェアなどの公的に利用可能なコンピュータソフトウェアを用いて行うことができる。当業者は、アラインメントを測定するための適当なパラメータを、比較される配列の全長にわたる最大のアラインメントを達成するために必要な任意のアルゴリズムを含めて、決定することができる。

【0013】

本明細書での目的には、アミノ酸配列Aの、アミノ酸配列Bへの、またはアミノ酸配列Bとの、またはアミノ酸配列Bに対する%アミノ酸配列同一性(これは、所与のアミノ酸配列Bに、または所与のアミノ酸配列Bと、または所与のアミノ酸配列Bに対して、一定の%アミノ酸配列同一性を有する、または含む、所与のアミノ酸配列Aと、言い換えることもできる)は、以下のように算出される：

分数X/Yの100倍

(ここで、Xは、配列アラインメントプログラム、例えばBLASTSM、BLASTSM-2、ALIGN、ALIGN-2またはMegalign(DNASTAR(登録商標))が、そのプログラムによるAとBのアラインメントにおいて、完全一致(identical match)とスコアリングしたアミノ酸残基の数であ

10

20

30

40

50

り、YはB中のアミノ酸残基の総数である)。アミノ酸配列Aの長さがアミノ酸配列Bの長さとは等しくない場合には、Bに対するAの%アミノ酸配列同一性が、Aに対するBの%アミノ酸配列同一性と等しくなくなることは、理解されるであろう。

【0014】

本明細書において、ポリペプチドのアミノ酸残基は、(1)該残基の側鎖または主鎖の非水素原子のいずれかが、複合体の実験的に決定された三次元構造に基づいて、結合標的の任意の原子から5オングストローム以内に見いだされ、かつ／または(2)該残基を、野生型¹⁰F_n3(例えば配列番号1)におけるその等価物、アラニン、または問題の残基と類似するサイズの側鎖または問題の残基より小さい側鎖を有する残基に変異させることにより、標的に対する平衡解離定数の測定値が上昇(例えば k_{on} の上昇)する場合、標的の「結合に寄与する」とみなす。

10

【0015】

ポリペプチドの血清または血漿「半減期」は、一般に、該ポリペプチドの血清中濃度が、インビボで、例えばポリペプチドの分解および／または自然の機序によるポリペプチドのクリアランスもしくは隔離などによって、50%減少するのに要する時間と定義することができる。半減期は、例えば薬物動態分析によるなど、自体公知の任意の方法で決定し得る。好適な技術は当業者には明らかであるが、例えば一般的には、霊長類に適切な用量のポリペプチドを投与する工程；前記霊長類から血液試料または他の試料を定期的な間隔で採取する工程；前記血液試料中のポリペプチドのレベルまたは濃度を決定する工程；およびこのように得たデータ(のプロット)から、ポリペプチドのレベルまたは濃度が投薬時の初期レベルと比較して50%低減するまでの時間を算出する工程を伴い得る。半減期を決定するための方法は、例えば、Kenneth et al., Chemical Stability of Pharmaceuticals: A Handbook for Pharmacists (1986); Peters et al., Pharmacokinetic Analysis: A Practical Approach (1996); およびGibaldi, M. et al., Pharmacokinetics, Second Rev. Edition, Marcel Dekker (1982)に見出すことができる。

20

【0016】

血清半減期は、 $t_{1/2-\alpha}$ 、 $t_{1/2-\beta}$ および曲線下面積(AUC)などのパラメータを使って表現することができる。「半減期の増大」は、これらのパラメータのいずれか1つ、これらのパラメータのいずれか2つ、またはこれら3つのパラメータの全ての上昇を指す。特定の実施形態において、半減期の増大は、 $t_{1/2-\beta}$ の増大を指し、 $t_{1/2-\alpha}$ および／もしくはAUCまたはその両者の増大を伴う場合も、伴わない場合もある。

30

【0017】

医薬品、例えばFBS部分およびHSA部分を含むタンパク質の「有効期間」は、該製品が、分解を起こさずに保存されている時間の長さである。例えば、有効期間は、該製品の0.1%、0.5%、1%、5%または10%が分解する時間と定義し得る。

【0018】

概要

本明細書では、標的に特異的に結合するフィブロネクチンベースのスキヤフォールド(FBS)ドメイン、例えば¹⁰F_n3分子のようなF_n3を含むタンパク質を提供し、該FBSドメインは、PmX_n(Pはプロリンであり、Xは任意のアミノ酸であり、nは0または少なくとも1である整数であり、mは少なくとも1である整数である)からなる領域にC末端で結合している。本願は、少なくとも一部には、プロリンおよび、所望により1つ以上のアミノ酸を、¹⁰F_n3分子のC末端に付加することにより、該¹⁰F_n3分子の少なくとも1つの特徴、例えば熱安定性または溶解度が、非修飾¹⁰F_n3分子と比較して向上することに基づく。

40

【0019】

本明細書に記載する¹⁰F_n3分子は、任意の目的の標的に結合するように設計し得る。例示的な態様では、標的は、抗原、ポリペプチドまたは目的の治療用タンパク質標的である。治療上望ましい標的の例としては、腫瘍壊死因子 α (TNF- α)、VEGFR2、

50

P C S K 9、I L-23、E G F RおよびI G F 1 Rが挙げられる。

【0020】

フィブロネクチンベースのスキヤフォールド

本明細書において、「フィブロネクチンベースのスキヤフォールド」または「F B S」タンパク質または部分は、フィブロネクチンタイプ I I I (「F n 3」) リピートに基づくタンパク質または部分を指す。F n 3 は、免疫グロブリン (I g) フォールド (すなわち、7つのβストランドおよび6つのループからなる、I g 様βサンドウィッチ構造) を有する小さい (約10 kDa) ドメインである。フィブロネクチンは18個のF n 3 リピートを有し、該リピート間の配列相同性は低い、それらは全て三次構造において高い類似性を示す。F n 3 ドメインはまた、フィブロネクチンの他の多くのタンパク質、例えば接着分子、細胞表面分子、例えばサイトカイン受容体および糖結合ドメインにも存在する。概説としては、Bork et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89(19):8990-8994 (1992); Bork et al., J. Mol. Biol., 242(4):309-320 (1994); Campbell et al., Structure, 2(5):333-337 (1994); Harpez et al., J. Mol. Biol., 238(4):528-539 (1994)) を参照のこと。「F B S」タンパク質または部分という語は、これらの他のタンパク質 (すなわち非フィブロネクチン分子) 由来のF n 3 ドメインに基づくスキヤフォールドを含むことを意図している。

【0021】

F n 3 ドメインは、小さく、単量体であり、溶解性かつ安定である。該ドメインはジスルフィド結合を欠くため、還元条件下で安定である。F n 3 ドメインは、N末端からC末端に向かって順に、βまたはβ様ストランドA；ループA B；βまたはβ様ストランドB；ループB C；βまたはβ様ストランドC；ループC D；βまたはβ様ストランドD；ループD E；βまたはβ様ストランドE；ループE F；βまたはβ様ストランドF；ループF G；およびβまたはβ様ストランドGを含む。7本の逆平行βストランドが2つのβシートとして配置され、それが安定なコアを形成すると同時に、βまたはβ様ストランドをつなぐループから構成される2つの「面」を作り出している。ループA B、C D、およびE Fが一つの面 (「サウスポール」) に位置し、ループB C、D E、およびF Gが反対の面 (「ノースポール」) 上に位置する。

【0022】

F n 3 分子中のループは、構造的に、抗体の相補性決定領域 (C D R) と類似しており、変更がある場合は、F n 3 分子の標的、例えば標的タンパク質への結合に関与してよい。F n 3 分子の他の領域、例えばβまたはβ様ストランドおよびN末端またはC末端領域もまた、変更がある場合、標的への結合に関与してよい。A B、B C、C D、D E、E F および F G ループのいずれかまたは全てが、標的への結合に関与してよい。任意のβストランドまたはβ様ストランドが、標的への結合に関与してよい。F n 3 ドメインはまた、1つ以上のループまたは1つ以上のβストランドまたはβ様ストランドを介して標的に結合してよい。結合には、N末端またはC末端領域が必要であってもよい。タンパク質で用いるためのF B S ドメインは、全てのループ、全てのβストランドまたはβ様ストランドおよび／またはそれらの一部のみを含んでいてよく、ここで、F B S ドメインが標的に特異的に結合するのが好ましい場合、特定のループおよび／または特定のβストランドもしくはβ様ストランドおよび／またはNまたはC末端領域は修飾 (または変更) されている。例えば、F B S ドメインは、1、2、3、4、5または6個のループ、1、2、3、4、5、6、7または8個のβストランドを含んでいてよく、場合によって、N末端および／またはC末端領域を含んでいてよく、ここで、1つ以上のループ、1つ以上のβストランド、N末端領域および／またはC末端領域は、野生型のF B S ドメインと比較して修飾されている。

【0023】

例示的な態様において、本明細書に記載する、リガンド (または標的) 結合性のF B S 部分は、10番目のフィブロネクチンタイプ I I I ドメイン、すなわち、F n 3 の10番目のモジュール (¹⁰ F n 3) に基づくものである。野生型ヒト ¹⁰ F n 3 部分のアミノ酸配

列は次の通りである：

【化 1】

***VSDVPRDLEVVAATPTSL*LLISWDAPAVTVRYYYRITYGETGGNSPVQEFTVPGSKS
TATISGLKPGVDYTTITVYAVTGRGDSPASSKPI***SINYRT* (配列番号 1)

(A B、C DおよびE Fループに下線を付し；B C、F GおよびD Eループは太字で強調しており；βストランドは、各ループ領域の間または各ループ領域に隣接して位置し；N末端領域は斜体で示す)。配列番号 1 の最後の 2 つのアミノ酸残基は、C 末端領域の一部である。

【0024】

野生型ヒト¹⁰Fn3 分子はまた、N末端領域またはその一部を欠失しているものを含む。例えば、野生型¹⁰Fn3 分子は、1 番目、1～2 番目、1～3 番目、1～4 番目、1～5 番目、1～6 番目または1～7 番目のアミノ酸残基が欠失している配列番号 1 を含んでいてよい(それぞれ配列番号 2～8)。表 1 は、これらの野生型ヒト¹⁰Fn3 部分のアミノ酸配列を示す：

10

【表 1】

表1:種々のN末端領域を有する野生型ヒト¹⁰F_n3分子のアミノ酸配列

バージョン	N末端領域	野生型ヒト ¹⁰ F _n 3コアドメイン	全長
1	VSDVPRD (配列番号19)	LEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYRITYGETG GNSPVQEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYTITVY AVTGRGDSPASSKPISINYRT (配列番号17)	配列番号1
2	SDVPRD (配列番号20)	LEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYRITYGETG GNSPVQEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYTITVY AVTGRGDSPASSKPISINYRT (配列番号17)	配列番号2
3	DVPRD (配列番号21)	LEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYRITYGETG GNSPVQEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYTITVY AVTGRGDSPASSKPISINYRT (配列番号17)	配列番号3
4	VPRD (配列番号22)	LEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYRITYGETG GNSPVQEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYTITVY AVTGRGDSPASSKPISINYRT (配列番号17)	配列番号4
5	PRD	LEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYRITYGETG GNSPVQEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYTITVY AVTGRGDSPASSKPISINYRT (配列番号17)	配列番号5
6	RD	LEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYRITYGETG GNSPVQEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYTITVY AVTGRGDSPASSKPISINYRT (配列番号17)	配列番号6
7	D	LEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYRITYGETG GNSPVQEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYTITVY AVTGRGDSPASSKPISINYRT (配列番号17)	配列番号7
8	—	LEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYRITYGETG GNSPVQEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYTITVY AVTGRGDSPASSKPISINYRT (配列番号17)	配列番号8

10

20

30

40

50

【0025】

いくつかの態様において、A Bループは配列番号1の14番目～第17番目の残基に対応し、B Cループが23番目～31番目の残基に対応し、C Dループが37番目～47番目の残基に対応し、D Eループが51番目～56番目の残基に対応し、E Fループが63番目～67番目の残基に対応し、F Gループが75番目～87番目の残基に対応する。B C、D EおよびF Gループは分子の一面(すなわち「ノースポール」)に沿って並び、A B、C DおよびE Fループは、分子の反対の面(すなわち「サウスポール」)に沿って並ぶ。配列番号1において、βストランドAは8番目～13番目の残基に対応し、βストランドBは18番目～22番目の残基に対応し、βストランドCは32番目～36番目の残基に対応し、βストランドDは48番目～50番目の残基に対応し、βストランドEは57番目～62番目の残基に対応し、βストランドFは68番目～74番目の残基に対応し、β

ストランド G は 88 番目～92 番目の残基に対応する。例えば、β ストランド A、ループ A B、β ストランド B 等の形成において、ストランド A とストランド B が、ループ A B を介して結合しているように、β ストランドは、対応するループによって互いに結合している。

【0026】

ヒト¹⁰F_n3 ドメインに基づく F B S タンパク質の例は、アドネクチン(Adnexus、Bristol-Myers Squibb の全額出資子会社)である。アドネクチンは、¹⁰F_n3 ドメインの C D R 様ループ領域、β ストランド、N 末端および／または C 末端領域が、所望の化合物に結合できるタンパク質を得るために修飾されている、¹⁰F_n3 分子である。例えば、米国特許第 7,115,396 号明細書は、B C、D E および F G ループの変化によって、高親和性 T N F α 結合剤となっている ¹⁰F_n3 ドメインタンパク質を記載している。米国特許第 7,858,739 号明細書は、B C、D E および F G ループの変化により、高親和性 V E G F R 2 結合剤となっている F_n3 ドメインタンパク質を記載している。

【0027】

特定の態様において、F B S 部分は、一般的に、次の変性配列により定義される：

【化 2】

VSDVPRDLEVVAAX_uLLISWX_vYRITYX_wFTVX_xATISGLX_yYTITVYAX_z

ISINYRT (配列番号 9)

か、または、それぞれ N 末端のアミノ酸を 1 個、2 個、3 個、4 個、5 個、6 個または 7 個欠失する点を除いて配列番号 9 と同一である配列番号 10～16 の群から選択される配列により定義される ¹⁰F_n3 部分を含む。表 2 は、これらの変性ヒト¹⁰F_n3 分子のアミノ酸配列を示す。

【表 2】

表2:種々のN末端領域を有する、変性野生型ヒト¹⁰F_n3分子のアミノ酸配列

バージョン	N末端領域	変性野生型ヒト ¹⁰ F _n 3コアドメイン	全長
1	VSDVPRD (配列番号19)	LEVVAAX _u LLISWX _v YRITYX _w FTVX _x ATISGLX _y YTITVYAX _z ISINYRT(配列番号18)	配列番号9
2	SDVPRD (配列番号20)	LEVVAAX _u LLISWX _v YRITYX _w FTVX _x ATISGLX _y YTITVYAX _z ISINYRT(配列番号18)	配列番号10
3	DVPRD (配列番号21)	LEVVAAX _u LLISWX _v YRITYX _w FTVX _x ATISGLX _y YTITVYAX _z ISINYRT(配列番号18)	配列番号11
4	VPRD (配列番号22)	LEVVAAX _u LLISWX _v YRITYX _w FTVX _x ATISGLX _y YTITVYAX _z ISINYRT(配列番号18)	配列番号12
5	PRD	LEVVAAX _u LLISWX _v YRITYX _w FTVX _x ATISGLX _y YTITVYAX _z ISINYRT(配列番号18)	配列番号13
6	RD	LEVVAAX _u LLISWX _v YRITYX _w FTVX _x ATISGLX _y YTITVYAX _z ISINYRT(配列番号18)	配列番号14
7	D	LEVVAAX _u LLISWX _v YRITYX _w FTVX _x ATISGLX _y YTITVYAX _z ISINYRT(配列番号18)	配列番号15
8	—	LEVVAAX _u LLISWX _v YRITYX _w FTVX _x ATISGLX _y YTITVYAX _z ISINYRT(配列番号18)	配列番号16

【0028】

配列番号 25～32 および 50 において、A B ループは (X)_u によって表され、B C ループは (X)_v によって表され、C D ループは (X)_w によって表され、D E ループは (X)_x によって表され、E F ループは (X)_y によって表され、F G ループは X_z によって表され

る。Xは任意のアミノ酸を表し、Xに続く下付き文字はアミノ酸の数の整数を表す。特に、u、v、w、x、yおよびzは、それぞれ独立して、2～20、2～15、2～10、2～8、5～20、5～15、5～10、5～8、6～20、6～15、6～10、6～8、2～7、5～7、または6～7アミノ酸のいずれであってもよい。βストランドの配列(配列番号9における下線部)は、配列番号9～16に示す対応するアミノ酸との比較で、7つ全てのスキファールド領域にわたって、0個～10個、0個～8個、0個～6個、0個～5個、0個～4個、0個～3個、0個～2個、または0個～1個のいずれかの置換、欠失または付加を有し得る。いくつかの態様において、βストランドの配列は、配列番号9～16に示す対応するアミノ酸との比較で、7つ全てのスキファールド領域にわたって、0個～10個、0個～8個、0個～6個、0個～5個、0個～4個、0個～3個、0個～2個、または0個～1個のいずれかの置換、例えば保存的置換を有し得る。

10

【0029】

特定の実施形態では、疎水性コアアミノ酸残基(上記配列番号9における太字の残基)が固定され、置換、保存的置換、欠失または付加はいずれも、疎水性コアアミノ酸残基以外の残基で起こる。したがって、いくつかの態様において、本明細書に提供するポリペプチドの疎水性コア残基は、野生型ヒト¹⁰F_n3ドメイン(例えば配列番号1)との比較で、修飾されていない。

【0030】

いくつかの態様において、FBS部分は¹⁰F_n3ドメインを含み、該¹⁰F_n3ドメインは、ループAB；ループBC；ループCD；ループDE；ループEF；およびループFGを含み、野生型ヒト¹⁰F_n3ドメインの対応するループ配列と比較して、アミノ酸配列が変化しているループAB、BC、CD、DE、EFおよびFGから選択される少なくとも1つのループを有する。いくつかの態様において、単一のループが変化している。いくつかの態様において、最大で2つのループが変化している。いくつかの態様において、最大で3つのループが変化している。いくつかの態様において、BC、DEおよび/またはFGループが変化している。特定の態様において、AB、CDおよびEFループが変化している。特定の態様において、該FGループのみが、変化しているループである。特定の態様において、CDループのみが変化しているループである。他の態様において、CDループおよびFGループは共に変化しており、場合によっては、他のループは全く変化してなくてよい。特定の態様において、CDループおよびEFループは共に変化しており、場合によっては、他のループは全く変化してなくてよい。いくつかの態様において、1つ以上の特定のスキファールドの変化を、1つ以上のループの変化と組み合わせる。「変化する」という語は、鋳型配列(すなわち、対応する野生型ヒトフィブロネクチンドメイン)と比較した、1以上のアミノ酸の変化を意味し、アミノ酸の付加、欠失および置換を含む。変化したループおよび/またはスキファールド領域(例えばβストランド、N末端領域および/またはC末端領域)の特定の組合せを含む例示的な¹⁰F_n3分子を本明細書中にさらに記載する。

20

30

【0031】

所望の標的に対して強い親和性を有する¹⁰F_n3結合ドメインを得るために、ループ領域の全ての残基が修飾される必要はないということは、理解されるべきである。さらに、ループ領域の挿入および欠失があっても、高親和性¹⁰F_n3結合ドメインを作製し得る。

40

【0032】

いくつかの態様において、AB、BC、CD、DE、EFおよびFGから選択される1つ以上のループを、野生型ヒト¹⁰F_n3中の対応するループと比較して長さを延長または短縮してよい。任意の特定のポリペプチドにおいて、1つ以上のループの長さを延長しても、1つ以上のループの長さを低下させても、またはそれらを組み合わせてもよい。いくつかの態様において、特定のループの長さを、2～25、2～20、2～15、2～10、2～5、5～25、5～20、5～15、5～10、10～25、10～20または10～15アミノ酸延長してよい。いくつかの態様において、特定のループの長さを、1

50

～15、1～11、1～10、1～5、1～3、1～2、2～10または2～5アミノ酸低下させてよい。特に、¹⁰F_n3のFGループは、13残基の長さであり、抗体重鎖の対応するループは、4～28残基の範囲にある。したがって、標的結合のためのFGによって、ポリペプチド中の抗原結合を最適化するために、¹⁰F_n3のFGループの長さをおよび配列を、可能な限り最大の可動性および標的結合における親和性を得るために変化させてよい。

【0033】

いくつかの態様において、該FBS部分は、非ループ領域が、配列番号1の非ループ領域と少なくとも80、85、90、95、98または100%同一であるアミノ酸配列を含み、AB、BC、CD、DE、EFおよびFGから選択される少なくとも1つのループが変化している、¹⁰F_n3ドメインを含む。例えば、特定の態様において、該ABループは、最大で4アミノ酸の置換、最大で10アミノ酸の挿入、最大3アミノ酸の欠失またはその組合せを有してよく；BCループは、最大10アミノ酸の置換、最大4アミノ酸の欠失、最大10アミノ酸の挿入、またはその組合せを有してよく；CDループは、最大6アミノ酸の置換、最大10アミノ酸の挿入、最大4アミノ酸の欠失またはその組合せを有してよく；DEループは最大6アミノ酸の置換、最大4アミノ酸の欠失、最大13アミノ酸の挿入またはその組合せを有してよく；EFループは、最大5アミノ酸の置換、最大10アミノ酸の挿入、最大3アミノ酸の欠失またはその組合せを有してよく、および／またはFGループは最大12アミノ酸の置換、最大11アミノ酸の欠失、最大25アミノ酸の挿入またはその組合せを有してよい。

【0034】

いくつかの態様において、FBS部分は、配列番号1～16を含む配列群から選択されるアミノ酸配列を有するヒト¹⁰F_n3ドメインと少なくとも40%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%または90%の同一性を示す¹⁰F_n3ドメインを含む。特定の態様において、本明細書で提供するFBS部分は、配列番号1～16を含むアミノ酸配列の群から選択されるアミノ酸配列と少なくとも50%の同一性を示す。他の態様において、FBS部分は、配列番号1～16を含むアミノ酸配列の群から選択されるアミノ酸配列と少なくとも65%の同一性を示す。特定の態様において、ループの1以上は、野生型の配列の対応するループの配列と比較して修飾されていないか、および／または、βストランドの1つ以上は、野生型配列のβストランドに相当する配列と比較して修飾されていないか、および／または、N末端またはC末端領域は修飾されていない。特定の態様において、FBS部分の¹⁰F_n3ドメインのβストランドまたはβ様ストランドは、それぞれ、配列番号1の対応するβストランドまたはβ様ストランドの配列と、少なくとも80%、85%、90%、95%または100%同一であるアミノ酸配列を含むか、実質的に該配列からなるか、または該配列からなる。βストランド領域のバリエーションは、生理学的な条件でポリペプチドの安定性を妨げないものであることが好ましい。

【0035】

いくつかの態様において、¹⁰F_n3ドメインの非ループ領域を、1つ以上の保存的置換で修飾し得る。¹⁰F_n3ドメイン中のアミノ酸の5%、10%、20%、さらには30%またはそれより多くを、リガンドに対する¹⁰F_n3のアフィニティを実質的に変化させることなく、保存的置換によって改変してよい。特定の態様において、非ループ領域、例えばβストランドが、0～15、0～10、0～8、0～6、0～5、0～4、0～3、1～15、1～10、1～8、1～6、1～5、1～4、1～3、2～15、2～10、2～8、2～6、2～5、2～4、5～15、または5～10個のいずれかの保存的アミノ酸置換を含み得る。例示的な態様において、スキファールド修飾が、リガンドに対する¹⁰F_n3結合物質の結合親和性を、100分の1未満、50分の1未満、25分の1未満、10分の1未満、5分の1未満、または2分の1未満に低減し得る。このような変化は、インビボでの¹⁰F_n3の免疫原性を変化させ得るものであり、免疫原性が低下する場合には、そのような変化は望ましいものであり得る。本明細書における「保存的

置換」は、対応する対照残基と物理的または機能的に類似する残基である。すなわち、保存的置換とその対照残基とは、類似するサイズ、形状、電荷、化学的性質、例えば、共有結合または水素結合を形成する能力を含む、を有する。例示的な保存的置換としては、Dayhooe et al., Atlas of Protein Sequence and Structure 5:345-352 (1978 & Supp.)に記載の、許容される点突然変異について定義された基準を満たすものが挙げられる。保存的置換の例としては、以下の群に含まれる置換が挙げられる：(a)バリン、グリシン；(b)グリシン、アラニン；(c)バリン、イソロイシン、ロイシン；(d)アスパラギン酸、グルタミン酸；(e)アスパラギン、グルタミン；(f)セリン、スレオニン；(g)リジン、アルギニン、メチオニン；および(h)フェニルアラニン、チロシン。

【0036】

10

本明細書において、また、ループ修飾とスキャフォールド修飾との組み合わせを有する¹⁰F_n3ドメインを提供する。結合体は、(i)ループAB、BC、CD、DE、EF、またはFGの少なくとも1つのアミノ酸配列中の修飾と、(ii)少なくとも1つのスキャフォールド領域のアミノ酸配列中の修飾(すなわち、少なくとも1つのβストランド、N末端領域、および/またはC末端領域中の修飾)とを含み、修飾ループと修飾スキャフォールド領域とがともに、同一標的への結合に寄与する、¹⁰F_n3ドメインを含んでいてよい。例示的な態様において、スキャフォールド領域修飾がループ領域中の修飾に隣接して位置する。例えば、ABループが修飾されている場合、スキャフォールド変異は、¹⁰F_n3ドメインの直鎖配列においてABループに隣接するβストランドAおよび/またはβストランドB中に位置する傾向があり得る。他の態様において、修飾のクラスターを、¹⁰F_n3ドメインの直鎖配列において互いに隣接するループ領域およびスキャフォールド領域中に、共に見出すことができる。例えば、ループ修飾とスキャフォールド修飾の両方を有する¹⁰F_n3結合物質は、F_n3ドメインの直鎖配列において互いに隣接する次の組み合わせのループ領域とスキャフォールド領域に、アミノ酸修飾のクラスターを有し得る：βストランド/ループ/βストランド、ループ/βストランド/ループ、ループ/βストランド/ループ/βストランド、末端領域/βストランド/ループ、またはループ/βストランド/末端領域など。例えば、ループ修飾とスキャフォールド修飾との新規な組み合わせを有するF_n3ドメインは、20個の連続したアミノ酸の区間においてm該アミノ酸のうちの少なくとも15個が野生型と比較して修飾されているような、修飾クラスターを有し得る。他の態様において、連続的な区間において、20残基のうちの少なくとも17残基、20残基のうちの少なくとも18残基、25残基のうちの少なくとも17残基、25残基のうちの少なくとも20残基、または30残基のうちの少なくとも25残基が、対応するアミノ酸の区間における野生型F_n3ドメイン配列と比較して修飾されている。特定の態様において、¹⁰F_n3ドメインは、無修飾(すなわち野生型)配列の区分によって分離された、2つまたは3つの修飾クラスターを有し得る。修飾されるいずれの領域(すなわちループ、βストランドまたは末端領域)についても、その領域の全体または一部分だけが、野生型配列と比較して、修飾されていてよい。βストランド領域が修飾される場合、疎水性コア残基は無修飾(すなわち、野生型)のままであり、βストランド中の非コア残基の1つ以上が修飾されているのが好ましい。

20

30

【0037】

40

いくつかの態様において、¹⁰F_n3ドメインは、分子の「ウエストサイド」に沿った結合面を含む(「ウエストサイド結合物質」または「WS結合物質」)。WS結合物質は、配列番号1に示す、対応するCDおよびFGループ配列と比較して、修飾されたCDループおよび修飾されたFGループを有する¹⁰F_n3ドメインを含み得る。CDループとFGループはともに、同一の標的への結合に寄与する。特定の態様において、WS結合物質は、F_n3ドメイン内の1つ以上の領域にさらに修飾を含み得る。例えば、WS結合物質は、CDおよび/またはFGループに隣接するβストランド領域の1つ以上に、スキャフォールド修飾を含み得る。特に、WS結合物質は、βストランドC、βストランドD、βストランドF、および/またはβストランドGの1つ以上に配列修飾を含み得る。例示的なスキャフォールド修飾としては、配列番号1のアミノ酸位置：33、35、49、69、

50

71、73、89および／または91に対応する1つ以上のスキファールド領域位置における修飾が挙げられる。WS結合物質は、BCループ、特にBCループのC末端側部分にも、修飾を含み得る。一の態様において、BCループの最後の2残基(すなわち、野生型¹⁰Fn3ドメイン中のアミノ酸30および31に対応する残基)が、野生型配列との比較で、修飾されている。追加のループ修飾およびスキファールド修飾の全部または一部が、修飾CDループおよび修飾FGループとの組合せで、標的への結合に寄与し得る。疎水性コア残基は、野生型配列と比較して、修飾されていないことが好ましい。

【0038】

例示的なWS結合剤としては、30、31、33、35、37、38、46、47、49、50、67、69、71、73、75、76、84、85、86、87、89または91の位置に、野生型または変異したアミノ酸を有するものが挙げられる。

【0039】

いくつかの態様において、¹⁰Fn3ドメインは、CDループ、DEループ、そして場合によってはEFループに修飾を含み、ループ修飾は全て標的結合に寄与する。これらのポリペプチドを「フロント結合物質」と呼ぶ。フロント結合物質はさらに、1つ以上のスキファールド領域、特に修飾ループ領域に隣接または近接するスキファールド領域にも、修飾を含み得る。例えば、フロント結合物質は、野生型Fn3ドメイン、例えばヒト¹⁰Fn3ドメイン(配列番号1)の対応するβストランドの配列と比較して、βストランドC、βストランドD、および／またはβストランドEの1つ以上にスキファールド修飾を含み得る。好ましくは、疎水性コア残基は、野生型配列と比較して、修飾されていない。フロント結合物質中に存在し得る例示的なスキファールド修飾としては、配列番号1のアミノ酸位置36、49、58および／または50に対応する1つ以上の位置における修飾が挙げられる。そのようなスキファールド修飾は、修飾ループと共に、標的の結合に寄与し得る。特定の態様において、フロント結合物質は、Fn3、例えば¹⁰Fn3ドメインの数個のループ領域とストランド領域とにまたがる修飾のクラスターを含み得る。特に、フロント結合物質は、野生型Fn3、例えばヒト¹⁰Fn3ドメイン(配列番号1)の残基36～66に対応するアミノ酸間の31残基のうちの、少なくとも15、20、24、25、または27残基に、修飾を含み得る。ループ修飾および／またはストランド修飾は、アミノ酸の置換、欠失および／もしくは挿入、またはそれらの組み合わせを含み得る。例示的な態様において、CDループは、Fn3、例えば野生型ヒト¹⁰Fn3ドメイン(配列番号1)のCDループと比較して、長さが延長されているか、または短縮されている。

【0040】

いくつかの態様において、¹⁰Fn3ドメインは、EFおよびFGループに修飾を含み、それらのループ修飾は同一の標的への結合に寄与する。これらのポリペプチドを本明細書では「バック結合物質」と称する。バック結合物質は、他のループ領域および／またはスキファールド領域にさらなる修飾を含み得る。例えば、バック結合物質は、ABループの少なくとも一部分、好ましくはABループのN末端側部分に、修飾を含み得る。例示的な態様において、ABループの最初の2アミノ酸(すなわち、野生型¹⁰Fn3ドメインのアミノ酸残基14および15に対応)が、野生型配列と比較して、修飾されている。特定の態様において、バック結合物質は、1つ以上のスキファールド修飾、特に修飾ループ領域に隣接する1つ以上のスキファールド領域中に修飾を含み得る。例えば、バック結合物質は、βストランドA、βストランドG、N末端領域、および／またはC末端領域の1つに、1つ以上の修飾を含有し得る。好ましくは、疎水性コア残基は、野生型配列と比較して、修飾されていない。例示的なスキファールド修飾としては、配列番号1または6のアミノ酸位置1～7、9～13、89、91、93および／または94に対応する1つ以上の位置における修飾が挙げられる。追加のループ修飾および／またはスキファールド修飾の1つ以上は、修飾EFおよびFGループと共に、ターゲットへの結合に寄与し得る。好適なループ領域および／またはスキファールド領域の修飾としては、アミノ酸の置換、欠失および／または挿入、またはそれらの組み合わせが挙げられる。一定の

実施形態では、F Gループのアミノ酸配列が、野生型ヒト¹⁰Fn3ドメイン(配列番号1)のF Gループと比較して、長さが延長されているか、または短縮されている。

【0041】

特定の態様において、バック結合物質は、¹⁰Fn3ドメイン中の数個の領域の連続スパンにわたって、修飾アミノ酸残基のクラスターを含み得る。例えば、Fn3、例えば¹⁰Fn3ドメインの最初の15アミノ酸残基のうちの少なくとも14残基は、野生型Fn3、例えばヒト¹⁰Fn3ドメイン(配列番号1)中の対応する残基と比較して、修飾されていてもよく、かつ／または野生型、Fn3、例えばヒト¹⁰Fn3ドメイン(配列番号1または23)の残基80～97(または94)に対応するアミノ酸の18残基の少なくとも15残基は、野生型配列中の対応する残基と比較して修飾されていてもよい。¹⁰Fn3分子において、94番目よりもさらにC末端側の位置のアミノ酸について言及するときは、¹⁰Fn3分子は、Fn3ドメインの10番目と11番目のリピートの間の可動性のリンカー、すなわちEIDKPSQを含むため、101アミノ酸の長さのタンパク質を形成する状態にある(したがって、C末端でEIDKPSQに結合している配列番号1を配列番号23により表す)。

10

【化3】

**VSDVPRDLEVVAATPTSLISWDAPAVTVRYRITYGETGGNSPVQEFTVPGSKS
TATISGLKPGVDYTTIVYAVTGRGDSPASSKPIISNYRT EIDKPSQ (配列番号 23)**

【0042】

一定の実施形態において、¹⁰Fn3ドメインは、野生型配列の対応する領域の配列との比較で、βストランドA、ループAB、βストランドB、ループCD、βストランドE、ループEF、およびβストランドFのアミノ酸配列に修飾を含む。これらのポリペプチドを本明細書では「サウスポール結合物質」または「SP結合物質」と称する。修飾ループおよび修飾ストランドは、同一標的への結合に寄与する。CDループのアミノ酸配列は、野生型Fn3、例えばヒト¹⁰Fn3ドメイン(配列番号1または23)のCDループと比較して、長さが延長されていても、または長さが短縮されていてもよい。サウスポール結合物質は、野生型配列の対応する領域の配列と比較して、βストランドGおよび／またはC末端領域にさらに修飾を含み得る。例示的な態様において、サウスポール結合物質は、野生型配列の位置11、12、19、60、61、69、91、93および95～97

20

30

【0043】

いくつかの態様において、¹⁰Fn3ドメインは、配列番号1または23に示す、対応するBC、DEおよびFGループ配列と比較して修飾されたBC、DEおよびFGループならびに、βストランドC、βストランドD、βストランドFおよびβストランドGストランド残基の1つ以上のさらなる修飾を含む。βストランド領域修飾とループ領域の修飾は共に標的への結合に寄与する。これらのタンパク質を本明細書では「ノースウエスト結合物質」または「NW結合物質」と称する。例示的な態様において、NW結合物質は、配列番号1または23のスキファールド領域位置R33、T49、Y73およびS89に対応するアミノ酸位置のいずれか1つまたはその組み合わせに、1つ以上のスキファールド修飾を含む。ループ領域およびスキファールド領域中の好適な修飾には、アミノ酸の置換、欠失および／もしくは挿入、またはそれらの組み合わせが含まれる。一の態様において、BC、DEおよびFGループの1つ以上は、野生型配列と比較して、長さが延長されているか、または短縮されているか、またはその組み合わせである。特定の態様において、BC、DEおよびFGループのそれぞれは、野生型配列(例えば配列番号1または23)と比較して、長さが延長されているか、短縮されているか、またはその組み合わせである。特定の態様において、BCループの一部のみ、特にC末端部分のみが、野生型配列と比較して修飾されている。例えば、BCループは、野生型BCループのアミノ酸27～31に対応するアミノ酸残基のみが修飾されていて、BCループの残りの部分(すなわち、野生型ループの残基23～26に対応する部分)が無修飾のままであってもよい。

40

50

【0044】

いくつかの態様において、 ^{10} F n 3ドメインは、修飾BC、DEおよびFGループと、N末端領域、 β ストランドA、 β ストランドBおよび／または β ストランドEのいずれか1つまたはその組み合わせに1つ以上の追加の修飾とを含む。これらのタンパク質を本明細書では「ノースイースト結合物質」または「NE結合物質」と呼ぶ。例示的实施形態において、NE結合物質は、野生型配列(配列番号1または23)のスキファールド領域位置1～7、E9、L19、S21および／またはT58に対応するアミノ酸のいずれか1つまたはその組み合わせが修飾されている。修飾ループ領域および修飾スキファールド領域の組み合わせがターゲットへの結合に寄与する。

【0045】

いくつかの態様において、 ^{10} F n 3ドメインは、AB、CD、DEおよびEFループの1つ以上の中の修飾および、 β ストランドB、 β ストランドDおよび／または β ストランドEの1つ以上におけるさらなる修飾を含む。これらのタンパク質を本明細書では「サウスフロント結合物質」と称する。修飾ループ残基と修飾ストランド残基の組み合わせが、標的への結合に寄与する。例示的な態様において、サウスフロント結合物質は、配列番号1または23のスキファールド領域位置L19、T49、T58、S60、および／またはG61に対応する1つ以上のアミノ酸位置および／または配列番号1または23のループ領域位置T14～S17、P51、T56、G40～E47、および／またはK63～G65に対応する1つ以上のアミノ酸位置が、修飾され得る。例示的な態様において、サウスフロント結合物質は、野生型配列の残基18および20に対応するアミノ酸間のABループおよび／またはCDループにおいて、長さが延長されているか、または短縮されているか。

【0046】

いくつかの実施形態において、 ^{10} F n 3ドメインは、配列番号1または23の対応するストランドと比較して修飾された β ストランドAおよび β ストランドGを含む。これらのタンパク質を本明細書では「AG結合物質」または「AGストランド」結合物質という。一定の実施形態では、AGストランド結合物質が、Fn3、例えば ^{10} F n 3ドメインのN末端およびC末端部分に修飾のクラスターを含み、一方、Fn3の中央部分は無修飾のままである。例えば、AGストランド結合物質は、 ^{10} F n 3ドメインの最初の19アミノ酸(すなわち、配列番号1または23のアミノ酸位置1～19に対応するもの)のうちの19アミノ酸中16アミノ酸における修飾、および ^{10} F n 3ドメインの最後の18アミノ酸(すなわち、配列番号9のアミノ酸位置84～101に対応するもの)のうちの18アミノ酸中13～17アミノ酸または ^{10} F n 3ドメインの最後の22アミノ酸(すなわち、配列番号9のアミノ酸位置80～101に対応するもの)のうちの22アミノ酸中14～18アミノ酸における修飾を含み得る。例示的实施形態において、AG結合物質は、配列番号9の位置1～7、9、11～17、19、84～89および91～97に対応する1つ以上の位置に修飾を含み得る。好ましくは、AG結合物質中の修飾領域は、同じターゲットへの結合に寄与する。

【0047】

いくつかの実施形態において、 ^{10} F n 3ドメインは、修飾されたCDおよびEFループと、配列番号1または23の位置69または91～97に対応する残基のいずれか1つまたはその組み合わせにおける追加の修飾とを含む。これらのタンパク質を本明細書では「サウスウエスト結合物質」または「SW結合物質」と呼ぶ。修飾ループ領域と修飾スキファールド領域は、ターゲットへの結合に寄与する。

【0048】

特定の態様において、タンパク質は、BCループの一部が野生型のままである、免疫原性が低下した ^{10} F n 3ドメインを含む。好ましくは、該ポリペプチドは、BCループの大部分に修飾を有する等価なポリペプチドと比較して、免疫原性が低いことが好ましい。例示的な態様において、BCループのN末端部分は野生型のままである。例えば、BCループの最初のまたは1、2、3、4、5もしくは5残基が野生型のままであり、BCルー

10

20

30

40

50

プの残りのC末端残基が修飾されていてよい。BCループのN末端領域の少なくとも一部が野生型であるFn3デザインにおいて、BCループに隣接している、βストランドBおよび/またはβストランドCの全体または一部(すなわち、βストランドBのC末端領域および/またはβストランドCのN末端領域)を、野生型配列と比較して非修飾状態にすることが望ましい場合もある。例示的な態様において、BCループのN末端領域に野生型配列を有し、免疫原性が低下しているFn3ドメインは、N末端領域、βストランドA、ABループ、およびβストランドBに全く修飾を有していなくてよい。BCループの一部を野生型として有するFn3設計において、BCループの修飾されている部分が、¹⁰F_n3ドメインの他の領域の修飾とともに、標的結合に寄与していてもよい。

【0049】

特定の態様において、タンパク質は、免疫原性が低下した¹⁰F_n3ドメインを含み、ここで、βストランドB/BCループ/βストランドC中の強力なHLAアンカー(「BCアンカー」)は、除去または破壊されている(例えば、1以上のHLA配列への結合親和性を低下させる方法により、野生型配列と比較して修飾されている)。例えば、BCアンカーは、Fn3、例えば¹⁰F_n3のドメインを、配列番号1のL19、S21、R33および/またはT35に対応する1つ以上の位置で修飾することにより除去または破壊し得る。BCアンカーを除去または破壊したとき、BC領域の潜在的な免疫原性を有意に上昇させることなく、BCループの配列を修飾することが可能である。したがって、該Fn3設計の多くは、βストランドBおよび/またはβストランドCにおける修飾に加えて、BCループに修飾を有する。BCループは、場合によってはFn3ドメインの他の領域中の修飾と組み合わせて、標的結合に寄与し得る。βストランドBおよび/またはβストランドCにおける修飾は、標的結合に寄与してもしなくてもよい。

【0050】

例示的な態様において、FBS部分、例えば¹⁰F_n3ドメインは、所望の標的に、500nM未満、100nM未満、50nM未満、10nM未満、5nM未満、1nM未満、500pM未満または100pM未満のK_dで結合する。いくつかの態様において、FBS部分、例えば¹⁰F_n3ドメインは、所望の標的に、1pM~1μM、100pM~500nM、1nM~500nMまたは1nM~100nMのK_dで結合する。例示的な態様において、¹⁰F_n3部は、野生型¹⁰F_n3ドメイン、特に、例えば配列番号1~8を有する野生型ヒト¹⁰F_n3ドメインが結合しない標的に特異的に結合する。

【0051】

特定の態様において、FBS部分は、配列番号1~16からなる配列群から選択されるアミノ酸配列と、少なくとも40%、50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%または99%同一であるアミノ酸配列を含み、FBS部分は標的に特異的、例えば500nM未満、100nM未満、50nM未満、10nM未満、5nM未満、1nM未満、500pM未満、100pM未満、またはそれより小さいK_dで結合する。該FBS部分は、1以上のループおよび1以上のスキャホールド領域にアミノ酸の変化(または変更)を含んでいてよい。

【0052】

いくつかの態様において、インテグリン結合モチーフの「アルギニン-グリシン-アスパラギン酸」(RGD)(配列番号1の第78番~第80番のアミノ酸)の1つ以上の残基が、インテグリン結合を妨げるために置換されていてよい。いくつかの態様において、本明細書で提供するポリペプチドのFGループは、RGDインテグリン結合部位を含まない。一の態様において、該RGD配列は、(N末端からC末端の方向で)極性アミノ酸-中性アミノ酸-産生アミノ酸配列により置換されている。特定の態様において、該RGD配列は、SGEまたはRGEで置換されている。

【0053】

いくつかの態様において、FBS部分のN末端および/またはC末端領域のアミノ酸配列は、¹⁰F_n3ドメインの相当する領域、例えば配列番号1と比較して、欠失、置換または挿入により修飾されている。

10

20

30

40

50

【0054】

特定の態様において、配列番号1の最初の1、2、3、4、5、6、7、8または9個のアミノ酸配列は、配列番号1を有する野生型ヒト¹⁰F_n3ドメインの相当するアミノ酸配列と比較して、本明細書で提供するポリペプチドにおいて修飾または欠失してよい。例示的な態様において、配列番号1～16のいずれかの1～7、8または9個のアミノ酸に相当するアミノ酸は、1～20、1～15、1～10、1～8、1～5、1～4、1～3、1～2または1アミノ酸の長さの代替N末端領域で置換されている。例示的な代替となるN末端領域としては(アミノ酸一文字表記で表す)M、MG、G、MGVSDVPRDL(配列番号24)およびGVSDVPRDL(配列番号25)または配列番号24または25のいずれかのN末端短縮型が挙げられる。他の適当な代替となるN末端領域としては、例えば、X_nSDVPRDL(配列番号26)、X_nDVPRDL(配列番号27)、X_nVPRDL(配列番号28)、X_nPRDL(配列番号29)、X_nRDL(配列番号30)、X_nDL(配列番号31)またはX_nL(n=0、1または2個のアミノ酸であり、n=1である場合、XはMe tまたはG l yであり、n=2である場合、XはMe t - G l yである)が挙げられる。Me t - G l y配列を、¹⁰F_n3ドメインのN末端に付加する場合、Mは通常切断され、GがN末端に残る。他の態様において、代替となるN末端領域は、アミノ酸配列MASTSG(配列番号32)を含む。

10

【0055】

本明細書にさらに記載するように、いくつかの態様において、配列番号1の最初の7個または8個の残基(即ち第1～7番または第1～8番の残基)を欠失し、例えば配列番号8のアミノ酸配列を有する¹⁰F_n3ドメインを作製する。付加的な配列を、配列番号1～16のいずれかのアミノ酸配列を有する¹⁰F_n3ドメインのN末端またはC末端に付加してもよい。例えば、いくつかの態様において、N末端の延長部分は、M、MGおよびGからなる群から選択されるアミノ酸配列からなる。例えば、配列番号1～16のいずれかの前に、M、MGまたはGがあってもよい。

20

【0056】

特定の態様において、FBS部分は、フィブロネクチン、例えばヒトフィブロネクチンのタイプIIIドメインの10番目のリピート以外のF_n3リピートに基づいてよい。例えば、FBS部分は、他のフィブロネクチンタイプIIIリピート、例えば1番目、2番目、3番目、4番目、5番目、6番目、7番目、8番目、9番目、10番目、11番目、12番目、13番目、14番目、15番目、16番目、17番目および18番目のF_n3リピートのいずれかに類似してよい。さらに他の態様において、FBS部分は、フィブロネクチン以外の分子由来であってよい。例示的なFBS部は、フィブロネクチン中で見られるものと互いに類似した配列を有する、15個のF_n3ドメインから構成されるタンパク質である、テネイシン由来であってよい。これらのリピートは、例えば、Jacobs et al., Protein Engineering, Design & Selection, 25:107 (2012)に記載されている。フィブロネクチン分子およびテネイシン分子のリピートの相同性に基づいて、これらの相同性に基づく人工分子を作製した。フィブロネクチン分子のドメインの相同性に基づくコンセンサスアミノ酸配列を含むタンパク質をFibconおよびFibconB(国際公開第2010/093627号およびJacobs et al. (2012)、上掲)と称し、テネイシン分子のドメインの相同性に基づくものをTenconと称する。例示的なFibconアミノ酸配列は、次のアミノ酸配列を含む：

30

40

【化4】

MPAPTDLRFTNETPSSLLISWTPPRVQITGYIIRYGPVGS DGRVKEFTVPPSVSSATI
TGLKPGTEYTISVIALKDNQESEPLRGRVTTGG (FibconB; 配列番号33)

(ループABはアミノ酸13～16(TPSS; 配列番号34)からなり、ループBCは、アミノ酸22～28(TPPRVQI; 配列番号35)からなり、ループCDは、アミノ酸38～43(VGSDGR; 配列番号36)からなり、ループDEはアミノ酸51～54(PSVS; 配列番号37)からなり、ループEFはアミノ酸60～64(GLKPG; 配列番号38)からなり、ループFGはアミノ酸75～81(KDNQESEP; 配列番号39)からなる。他のFibconアミノ酸配列は

50

、次のアミノ酸配列：

【化 5】

LDAPTDLQVTNVTDTISITVSWTPPSATITGYRITYTPSNGPGEPKELTVPPSSSTSVTI
TGITPGVEYVVSUYALKDNQESPLVGTCTT (配列番号 40; Jacobs et al., 上掲)

を含む。

【0057】

テネイシン由来のFn3タンパク質としては、Tencons(国際公開第2010/051274号、国際公開第2010/051310号および国際公開第2011/137319号、当該文献は、引用により具体的に本明細書中に包含される)。例示的なTenconタンパク質は次のアミノ酸配列を有する：

10

【化 6】

LPAPKNLVVSEVTEDSLRLSWTAPDAAFDSFLIQYQESEKVGGEAINLTVPGSERSY
DLTGLKPGTEYTVSIYGVKGGHRSNPLSAEFTT (配列番号 41; Jacobs et al., 上掲、
および国際公開第 2011/137319 号)

(ループ A B は、アミノ酸 13～16 (TEDS; 配列番号 42) からなり、ループ B C は、アミノ酸 22～28 (TAPDAAF; 配列番号 43) からなり、ループ C D は、アミノ酸 38～43 (SEKVG; 配列番号 44) からなり、ループ D E はアミノ酸 51～54 (GSER; 配列番号 45) からなり、ループ E F はアミノ酸 60～64 (GLKPG; 配列番号 46) からなり、ループ F G はアミノ酸 75～81 (KGGHRSN; 配列番号 47) からなる。

20

【0058】

Fibcon、FibconBまたはTencon部分またはその標的結合性バリエーションは、それ自体によって、または異種性部分に結合するかのいずれかによって、本明細書に記載するように融合することができる。他のタンパク質由来のFn3ドメイン、例えば細胞表面ホルモンおよびサイトカインレセプター、シャペロンおよび糖結合ドメインを、本明細書に記載するように結合させてよい。

【0059】

FBSタンパク質または部分は、例えば、国際公開第2010/093627号、国際公開第2011/130324号、国際公開第2009/083804号、国際公開第2009/133208号、国際公開第02/04523号、国際公開第2012/016245号、国際公開第2009/023184号、国際公開第2010/051310号、国際公開第2011/020033号、国際公開第2011/051333号、国際公開第2011/051466号、国際公開第2011/092233号、国際公開第2011/100700号、国際公開第2011/130324号、国際公開第2011/130328号、国際公開第2011/137319号、国際公開第2010/051274号、国際公開第2009/086116号、国際公開第09/058379号、国際公開第2013/067029号、国際公開第2012/016245号、国際公開第2014/120891号および国際公開第2014/043344号(これらの文献は全て、参照により、具体的に本明細書に包含される)に記載されており：これらの出版物に記載されているFBSタンパク質または部分は、いずれも、本明細書に記載するように使用してよい。

30

【0060】

特定の態様において、タンパク質は、少なくとも2つのFBS部分を含む。例えば、該タンパク質は、多価のFBS部分を含む。例えば、多価のFBSは、2個、3個またはそれ以上のFBS部分、例えば、共有結合している¹⁰Fn3ドメインを含んでいてよい。例示的な態様において、該FBS部分は、2つの¹⁰Fn3ドメインを含む、二重特異性または二量体のタンパク質である。

40

【0061】

多価のタンパク質中のFBS部分、例えば¹⁰Fn3ドメインは、ポリペプチドリンカーにより結合してよい。例示的なポリペプチドリンカーとしては、1～20、1～15、1～10、1～8、1～5、1～4、1～3または1～2アミノ酸を有するポリペプチドが挙げられる。¹⁰Fn3ドメインの結合に適当なリンカーは、分離しているドメインが、互いに独立してフォールディングし、標的分子への親和性の高い結合を可能にする

50

三次元構造を可能にするものである。適当なリンカーの具体例としては、グリシンーセリンベースリンカー、グリシンープロリンベースリンカー、プロリンーアラニンベースリンカーならびに他の任意の本明細書に記載のリンカーが挙げられる。いくつかの態様において、該リンカーは、グリシンープロリンをベースとするリンカーである。これらのリンカーは、グリシンおよびプロリン残基を含み、3～30、10～30および3～20アミノ酸の長さであってよい。該リンカーの例としては、GPG、GPGPGPG(配列番号48)およびGPGPGPGPGPG(配列番号49)が挙げられる。いくつかの態様において、該リンカーはプロリンーアラニンベースのリンカーである。これらのリンカーは、プロリンおよびアラニン残基を含み、3～30、10～30、3～20および6～18アミノ酸の長さであってよい。該リンカーの例としては、PAPAPA(配列番号50)、PAPAPAPAPAPA(配列番号51)およびPAPAPAPAPAPAPAPAPA(配列番号52)が挙げられる。いくつかの態様において、該リンカーは、グリシンーセリンベースのリンカーである。これらのリンカーは、グリシンおよびセリン残基を含み、8～50、10～30および10～20アミノ酸の長さであってよい。該リンカーの例としては、GSGSGSGSGS((GS)₅; 配列番号53)、GSGSGSGSGSGS((GS)₆; 配列番号54)、GSGSGSGSGSGSGSGSGS((GS)₁₀; 配列番号55)、GGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSG((G₄S)₄; 配列番号56)、GGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSG((G₄S)₅; 配列番号57)およびGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSG((G₄S)₅; 配列番号58)が挙げられる。例示的な態様において、該リンカーは、Asp-Lys(DK)ペアを全く含まない。

10

【0062】

PmXn部分、例えば安定化部分

20

特定の態様において、FBS、例えば¹⁰F_n3部分は、PmXn(Pがプロリンである、Xが任意のアミノ酸であり、mが少なくとも1である整数であり、nが0または少なくとも1である整数であり、PがXのN末端側である)からなる部分にC末端で連結している。該PmXn部分は、¹⁰F_n3部分のC末端アミノ酸、例えば(配列番号1の番号付けに基づいて)94番目のアミノ酸に直接結合してよい。該PmXn部分は、ペプチド結合を介して、¹⁰F_n3部分の94番目のアミノ酸に結合してよい。PmXn部分は、配列番号1のアミノ酸配列に相同であるか、または、表1もしくは2に示すアミノ酸配列を含むか、または、実質的に該配列からなるアミノ酸配列を有する¹⁰F_n3部分に結合してよい。配列番号1の末端の単一のプロリンを、「95Pro」または「Pro95」または「P95」または「95P」と称する。

30

【0063】

PmXn部分に連結している例示的な¹⁰F_n3部分としては:

【化7】

LEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYRITYGETGGNSPVQEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYTTIVYAVTGRGDSPASSKPISINYRTPmXn (配列番号59)

【化8】

VSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYRITYGETGGNSPVQEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYTTIVYAVTGRGDSPASSKPISINYRTPmXn (配列番号60)

40

が挙げられる。

【0064】

PmXnにおいて、mは、1、2、3またはそれより大きくてよい。例えば、mは、1～3であるか、または、mは、1～2であってよい。「n」は、0、1、2、3またはそれ以上であってよく、例えば、nは、1～3または1～2であってよい。

【0065】

本明細書にさらに記載するように、これらの¹⁰F_n3部分を、1以上のループおよび/または1以上のβストランドのアミノ酸配列を修飾することによって、標的に結合(し、FBS部分を形成)するように修飾してよい。PmXnに連結しているFBS部分は、「修飾FBS部」と称する。したがって、本明細書では、配列番号59または60に少な

50

くとも約50%、60%、70%、80%、90%または95%同一であるアミノ酸配列を含むFBS部分を含むタンパク質であって、PmXnを含み、該FBSが標的に(RGDドメインを介するのとは異なる方法で)特異的に結合する、タンパク質を提供する。

【0066】

PmXnにおいて、nは0であってよく、この場合、該タンパク質のC末端アミノ酸は、Pm、例えばPである。特定の態様において、nは0ではなく、例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10またはそれ以上であってよい。例えば、nは、0~10、0~5、0~3、1~10、1~5、1~3または1~2であってよい。しかし、10を超えるアミノ酸が該プロリンに結合していてもよい。例えば、タンデムFBS部分または他のポリペプチドに融合したFBS部分において、FBS部分のC末端アミノ酸は、1以上のプロリンに結合してよく、最後のプロリンは、第二のFBS部分または、異種性部分に結合している。したがって、特定の態様において、nは、0~100、0~200、0~300、0~400、0~500またはそれ以上の範囲の整数であってよい。

【0067】

特定の態様において、PmXnはシステインを含む。例えば、プロリンの後の最初のアミノ酸はシステインであってよく、該システインは、該分子中の最後のアミノ酸であっても、または、該システインの後に1以上のアミノ酸が続いていてもよい。システインの存在により、異種性部分がFBS部分、例えば化学部分、例えばPEGに結合することが可能になる。システインを含む例示的なPmXn部分としては：PmCXn(Cはシステインである)が挙げられる。他の例は、PmXn₁CXn₂(n₁およびn₂は独立して0または少なくとも1である整数である)である。例えば、n₁は1であってよく、n₂は1、2、3、4または5であってよい。

【0068】

例示的なPmXn部分としては、表3に記載のものが挙げられる。

【表3】

表3：例示的なPmXn部分

1つのプロリンを有する部分	2つのプロリンを有する部分
P	PP
PI	PPI
PC	PPC
PID	PPID
PIE	PPIE
PIDK (配列番号61)	PPIDK (配列番号62)
PIEK (配列番号63)	PPIEK (配列番号64)
PIDKP (配列番号65)	PPIDKP (配列番号66)
PIEKP (配列番号67)	PPIEKP (配列番号68)
PIDKPS (配列番号69)	PPIDKPS (配列番号70)
PIEKPS (配列番号71)	PPIEKPS (配列番号72)
PIDKPC (配列番号73)	PPIDKPC (配列番号74)
PIEKPC (配列番号75)	PPIEKPC (配列番号76)
PIDKPSQ (配列番号77)	PPIDKPSQ (配列番号78)
PIEKPSQ (配列番号79)	PPIEKPSQ (配列番号80)
PIDKPCQ (配列番号81)	PPIDKPCQ (配列番号82)
PIEKPCQ (配列番号83)	PPIEKPCQ (配列番号84)
PHHHHHHH (配列番号85)	PPHHHHHH (配列番号86)
PCHHHHHH (配列番号87)	PPCHHHHH (配列番号88)

10

20

30

40

50

【0069】

任意の P m X n 部分、例えば表 3 に記載のものの後に、ヒスチジンテイル、例えば 6 x H i s タグ、または他のタグが続いてよい。これは、ヒスチジンテイルが、P m X n に含まれていてよいことを排除するものではない。

【0070】

P m X n 部分の F B S 部分への付加により、F B S 部分の 1 つ以上の特性が増強する。例えば、実施例に示すように、¹⁰ F n 3 部分の熱安定性が、P m X n 部分に連結していない部分と比較して向上する。熱安定性の改善は、他の望ましい性質、例えば溶解度、適切なフォールディングおよび発現レベルを改善することが予期される。例えば、実施例に示すように、P m X n 部分が F B S の C 末端に存在することにより、F B S の溶解度が、P m X n 部分に連結していない F B S に比較して上昇する。

10

【0071】

したがって、特定の態様において、F B S、例えば¹⁰ F n 3 部分の T m は、P m X n 部に結合していない F B S 部分と比較して、少なくとも 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14 または 15 °C 上昇する。例えば、該 T m は、P m X n 部に結合していない F B S 部と比較して、1 ~ 30、1 ~ 25、1 ~ 20、1 ~ 15、1 ~ 10 または 1 ~ 5 °C 上昇してよい。T m は、例えば次のように、熱スキャン蛍光法 (T S F) により測定し得る。タンパク質サンプル、例えば HTPP アンプルを、P B S 中で、0.2 mg/ml に規準化する。PBS で 1 : 40 に希釈した SYPRO (登録商標) 橙色の色素 1 μ l を各サンプル 25 μ l に添加し、プレート、透明 96 ウェルマイクロプレートの接着性シールで密封する。サンプルを、BioRad RT-PCR 機器を用いて、温度を 25 °C から 95 °C に、一分あたり 2 °C の速度で上昇させてスキャンする。データを BioRad CFX manager 2.0 software を用いて解析する。T m はまた、次のように、示差走査測定 (D S C) によっても測定し得る。0.5 mg/ml の溶液を、70 p.s.i の圧力下で一分あたり 1 °C の速度で、15 °C から 110 °C に上昇させることにより、VP-Capillary Differential Scanning calorimeter (GE Microcal) でスキャンする。データを、Origin Software (OriginLab Corp) を用いた最良適合を用いて、適当なバッファの対照試行と比較して解析する。

20

【0072】

特定の態様において、F B S 部分の溶解度は、P m X n 部分に連結することにより上昇する。該分子は、少なくとも 10 mg/ml、20 mg/ml、30 mg/ml、40 mg/ml、50 mg/ml、60 mg/ml、70 mg/ml、80 mg/ml、90 mg/ml または 100 mg/ml の濃度で存在してよい。

30

【0073】

P K E 部分

F B S 部分は、P K E 部分に連結し、F B S 部分の半減期を延長させてよい。例示的な P K E 部分としては、ヒト血清アルブミン；ヒト血清アルブミンに結合するタンパク質 (例えば H S A または A B D に結合する F B S)；F c；またはその任意の部分またはペリアント；および P E G があげられる。これらの部分は、P m X n 部分および／または F B S の N 末端または C 末端に連結し得る。

【0074】

システイン結合標識および治療剤

特定の態様において、P m X n 部分 (アミノ酸「X」の少なくとも 1 つ以上はシステインである) に連結した F B S 部分 (「修飾 F B S 部」と称する) は、1 つ以上のシステインを介して、異種性部分、例えば標識化部分、生物活性部分 (例えば治療剤) または結合部分に連結している。

40

【0075】

本明細書に記載の F B S 部分は、C 末端のシステインを介して治療剤に結合し、免疫結合体、例えば F B S - 薬物結合体 (F B S - D C；「アデクチン - 薬物結合体」とも称する) を形成してよい。

【0076】

50

FBS-DCでは、FBSは、薬物に結合しており、該FBSは、FBS-DCを、該抗原を発現する標的細胞、例えばがん細胞に向かわせるための標的化剤として機能している。好ましくは、該抗原は腫瘍関連抗原、すなわち、がん細胞に特有に発現するか、または過剰発現する抗原である。そこに至ると、薬物は、該標的細胞内か、または、その近傍のいずれかで放出され、治療剤として作用する。抗体とともに、例えばがん利用で用いられる、薬物結合体の薬物作用機序および使用については、Schrama et al., Nature Rev. Drug Disc., 5:147 (2006)を参照のこと。

【0077】

薬物結合体において使用するための適当な治療剤としては、代謝拮抗薬、アルキル化剤、DNA副溝結合剤、DNA干渉物質、DNAクロスリンカー、ヒストンジアセチラーゼ阻害剤、核外輸送阻害剤、プロテアソーム阻害剤、トポイソメラーゼIまたはII阻害剤、熱ショックタンパク質阻害剤、チロシンキナーゼ阻害剤、抗生物質および抗有糸分裂剤が挙げられる。FBS-DCでは、該FBSと治療剤は、好ましくは、切断可能なリンカー、例えばペプチジル、ジスルフィドまたはヒドラゾンリンカーを介して結合している。より好ましくは、該リンカーは、ペプチジルリンカー、例えばVal-Cit、Ala-Val、Val-Ala-Val、Lys-Lys、Pro-Val-Gly-Val-Val (配列番号89)、Ala-Asn-Val、Val-Leu-Lys、Ala-Ala-Asn、Cit-Cit、Val-Lys、Lys、Cit、Ser、またはGluである。FBS-DCは、米国特許第7,087,600号；第6,989,452号；および第7,129,261号明細書；国際公開第02/096910号；国際公開第07/038658号；国際公開第07/051081号；国際公開第07/059404号；国際公開第08/083312号；および国際公開第08/103693号；米国特許出願公開第2006/0024317号；第2006/0004081号；および第2006/0247295号明細書に記載の方法と同様の方法により製造でき、当該文献の記載は、引用により本明細書に包含される。リンカーは、それ自体が、例えば、マレイミド化学を用いて、PmXn部分(式中、少なくとも1つのXはシステインである)に結合、例えば共有結合してよい。例えば、リンカーは、FBS-PmXn(少なくとも1つのXはシステインである)に共有結合してよい。例えば、リンカーは、FBS-PmCn(式中、Pはプロリンであり、Cはシステインであり、mおよびnは、少なくとも1である整数、例えば1~3である)に結合してよい。システインへのライゲーションは、マレイミド化学を用いて、当該分野で知られているように行ってよい(例えば、Imperiali, B. et al., Protein Engineering: Nucleic Acids and Molecular Biology, Vol. 22, pp. 65-96, Gross, H.J., ed. (2009))。リンカーをFBS上のシステインに結合させるためには、該リンカーは、例えば、マレイニイミド部分を含んでいてよく、該部分は、システインと反応して、共有結合を形成する。特定の態様において、システインの周囲のアミノ酸は、化学反応を促進するように最適化されている。例えば、システインは、一連の正に荷電したアミノ酸に囲まれたシステインと比較して、より反応が速くなるために、負に荷電したアミノ酸に囲まれていてよい(欧州特許第1074563号明細書)。

【0078】

がんの処置のためには、該薬物は、標的がん細胞の死を引き起こす細胞傷害性の薬物であるのが好ましい。FBS-DCで用い得る細胞傷害性薬物としては、次の種類の化合物およびその類似体および誘導体が挙げられる：

- (a) エンジン、例えばカリチアマイシン(例えば、Lee et al., J. Am. Chem. Soc., 109:3464, 3466 (1987)参照) およびウンシアラマイシン(例えばDavies et al., 国際公開第2007/038868号 (2007)およびChowdari et al., 米国特許第8,709,431号明細書(2012)参照)；
- (b) ツブリシン(例えば、Domling et al., 米国特許第7,778,814号明細書 B2 (2010)；Cheng et al., 米国特許第8,394,922号明細書 B2 (2013)；およびCong et al., 米国特許出願公開第2014/0227295号明細書 A1 参照)；
- (c) CC-1065およびデュオカルマイシン(例えば、Boger, 米国特許第6,545,530号明細書 B1 (2003)；Sufi et al., 米国特許第8,461,117号明細書 B2 (2013)；およびZh

ang et al., 米国特許出願公開第2012/0301490号 A1 (2012)参照);

(d) エポチロン(例えば、Vite et al., 米国特許出願公開第2007/0275904号明細書A1 (2007) および米国特許RE42,930 E (2011)参照);

(e) オーリスタチン(例えば、Senter et al., 米国特許第6,844,869号明細書 B2 (2005) およびDoronina et al., 米国特許第7,498,298号明細書B2 (2009)参照);

(f) ピロロベンゾジアゼピン(PBD)二量体(例えばHoward et al., 米国特許出願公開第2013/0059800号 A1 (2013)および第2013/0028919号明細書 A1 (2013);および国際公開第2013/041606号 A1 (2013)参照); および

(g) マイタンシノイド、例えばDM1およびDM4(例えばChari et al., 米国特許第5,208,020号明細書 (1993)およびAmphlett et al., 米国特許第7,374,762号明細書B2 (2008)参照)。 10

【0079】

特定の態様において、FBS-PmXn(式中、少なくとも1つのXはシステインである)は、例えば、インビトロまたはインビボ検出またはイメージングに用いるための、標識部分または検出可能な部分に連結してよい。

【0080】

検出可能な標識は、インビトロ診断の分野で現在用いられている種々の種類の任意のもの、例えば、粒子状標識、例えばコロイド金のような金属ゲル、例えば、 N_2S_2 、 N_3S または N_4 タイプのペプチドキレート剤とともに提示される、 I^{125} または Tc^{99} のような同位体、蛍光マーカを含む発色団、ビオチン、発光性マーカ、リン光マーカ等、ならびに、特定の基質を検出可能なマーカに変換する酵素標識および、例えばポリメラーゼ連鎖反応による増幅後に明らかになる、ポリヌクレオチドタグが挙げられる。 20
 ビオチン化固体は、アビジンまたはストレプトアビジン結合により検出可能になる。適当な酵素標識としては、セイヨウワサビペルオキシダーゼ、アルカリンホスファターゼ等が挙げられる。例えば、該標識は、1,2 ジオキセタン基質、例えばアダマンチルメトキシホスホリルオキシフェニルジオキセタン(AMPPD)、3-(4-(メトキシスピロ{1,2-ジオキセタン-3,2'-(5'-クロロ)トリシクロ{3.3.1.1^{3,7}}デカン}-4-イル)フェニルリン酸)二ナトリウム(CSPD)ならびにCDPおよびCDP-STAR(登録商標)または当該分野で公知の他の発光性基質、例えばテルビウム(III)およびユーロピウム(III)のような適当なランタニドのキレートの変換後に、化学発光の存在または形成を測定することにより検出される、アルカリンホスファターゼ酵素であってよい。 30

【0081】

使用してよい検出可能な部分としては、放射活性剤、例えば放射活性重金属、例えば、鉄キレート、ガドリニウムまたはマンガンの放射活性キレート、酸素、窒素、鉄、炭素またはガリウムの陽子放射体、 ^{18}F 、 ^{60}Cu 、 ^{61}Cu 、 ^{62}Cu 、 ^{64}Cu 、 ^{124}I 、 ^{86}Y 、 ^{89}Zr 、 ^{66}Ga 、 ^{67}Ga 、 ^{68}Ga 、 ^{44}Sc 、 ^{47}Sc 、 ^{11}C 、 ^{111}In 、 ^{114m}In 、 ^{114}In 、 ^{125}I 、 ^{124}I 、 ^{131}I 、 ^{123}I 、 ^{131}I 、 ^{123}I 、 ^{32}Cl 、 ^{33}Cl 、 ^{34}Cl 、 ^{74}Br 、 ^{75}Br 、 ^{76}Br 、 ^{77}Br 、 ^{78}Br 、 ^{89}Zr 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{86}Y 、 ^{90}Y 、 ^{177}Lu 、 ^{99}Tc 、 ^{212}Bi 、 ^{213}Bi 、 ^{212}Pb 、 ^{225}Ac または ^{153}Sm が挙げられる。 40

【0082】

検出方法は、選択した標識により決定される。ラベルまたはその反応産物の出現は、該標識が粒子状であり、適当なレベルで集積する場合、裸眼で、または、分光光度計、ルミノメーターおよび、蛍光光度計のような機器を全て、標準の方法に準じて用いることにより検出する。

【0083】

検出可能な部分を、当該分野で公知の方法によりシステインに連結してよい。検出可能な部位が、例えば本明細書にさらに記載するような、放射活性剤である場合、前記の検出可能な部分は、システインと反応性であるキレート剤、例えば、キレート剤を含むマ 50

レイミド、例えばマレイミド-NODAGAまたはマレイミド-DBCOを介してFBSに連結する。マレイミド-NODAGAまたはマレイミド-DBCOを、FBSのC末端上のシステインと反応させて(例えば、PmXn部分(式中、少なくとも1つのXはシステインである)を介して)、それぞれ、FBS-NODAGAまたはFBS-DBCOを得てよい。次のキレート剤のいずれか1つを、用いてよい、ただし、該キレート剤は、システインと反応する反応基を含むか、または含むように修飾されていてよい: DFO、DOTAおよびその誘導体(CB-DO2A、3p-C-DEPA、TCMC、Oxo-DO3A)、TE2A、CB-TE2A、CB-TE1A1P、CB-TE2P、MM-TE2A、DM-TE2A、diamsarおよび誘導体、NODASA、NODAGA、NOTA、NETA、TACN-TM、DTPA、1B4M-DTPA、CHX-A"-DTPA、TRAP(PRPP9)、NOPPO、AAZTAおよび誘導体(DATA)、H₂dedpa、H₄オクタパ、H₂アザパ、H₅デカパ、H₆ホスパ、HBED、SHBED、BPCA、CP256、PCTA、HEHA、PEPA、EDTA、TETAおよびTRITTAベースのキレート剤、および近縁の類似体および誘導体。

【0084】

特定の態様において、FBSを、PETトレーサーを用いて標識し、インビボイメージング剤として使用する。例えば、FBSを、PETトレーサー⁶⁴Cuで標識してよい。⁶⁴Cuは、キレート剤、例えばマレイミド-NODAGAを用いて、C末端システイン残基に結合してよい。

【0085】

例示的な分子

特定の態様において、タンパク質は、(i) 配列番号1~16のいずれか1つと少なくとも約50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%または99%同一であるアミノ酸配列を含むFBS部分; および(ii) PmXn(Pはプロリンであり、Xは任意のアミノ酸であり、mは少なくとも1である整数であり、nは0であるか、または少なくとも1である整数である)を含み、該タンパク質は、標的に特異的に(例えば、表面プラズモン共鳴(SPR)、例えばBiacoreによって決定される、500nM未満、100nM未満、50nM未満、10nM未満、5nM未満、1nM未満、500pM未満、100pM未満のK_dで)結合し、該PmXn部分は、非修飾FBS部分からなるタンパク質と比較して、FBS部分の性質を少なくとも1つ改善する。

【0086】

特定の態様において、PmXn部分により増強した性質は、増大したタンパク質安定性、例えば、融解温度の、少なくとも1℃、2℃、3℃、4℃、5℃、6℃、7℃、8℃、9℃、10℃、11℃、12℃、13℃、14℃、15℃、1~15℃、2~15℃、3~15℃、5~15℃、5~15℃、1~10℃、2~10℃、3~10℃、4~10℃または5~10℃の上昇である。T_mは、例えば、熱スキャン蛍光法(TSF)示差走査熱量測定(DSC)により決定し得る。「上昇T_m」は、T_mの統計学的に有意な上昇を指す。

【0087】

特定の態様において、FBS部分およびPmXn部分を含むタンパク質は、組成物、例えば医薬組成物に、少なくとも10mg/ml、20mg/ml、30mg/ml、40mg/ml、50mg/ml、60mg/ml、70mg/ml、80mg/ml、90mg/mlまたは100mg/mlの濃度で存在する。

【0088】

特定の態様において、FBS部分およびPmXn部分を含むタンパク質は、組成物、例えば医薬組成物に、殆どの場合単量体として存在し、例えば、該組成物中の該タンパク質の少なくとも80%、85%、90%、95%、98%または99%が単量体形態で存在する。タンパク質溶液の単量体の程度は、例えば、A214nmおよびA280nm UVの検出および、蛍光検出(励起=280nm、放出=350nm)を伴う、Agilent 1100または1200 HPLC systemにおけるSuperdex column(GE Healthcare)の使用により、サイズ排除クロマトグラフィー(SEC)により決定し得る。100mM 硫酸ナトリウム、100mM リン

10

20

30

40

50

酸ナトリウム、150 mM 塩化ナトリウムのバッファー(例えば pH 6.8)を SEC カラムの適当な流速で使用し得る。ゲル濾過の標準(Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)を、分子量の較正のために用いる。

【0089】

特定の態様において、FBS 部分および PMXn 部分を含むタンパク質は、非修飾 FBS 部分と少なくとも同等の強度の生物学的活性を有する。生物学的活性は、標的への結合親和性またはアッセイにおける生物学的活性、例えば腫瘍の破壊能であってよい。特定の態様において、該タンパク質の生物学的活性は、非修飾 FBS 部分の活性の 5%、10%、25%、50%、100%、2 倍またはそれ以上の範囲にある。

【0090】

FBS および PMXn 部分を含むタンパク質はまた、上述の特性の組合せを含んでいてよい。例えば、タンパク質は、最大 50 mg/ml の濃度で可溶性であり、少なくとも 90% が単量体形態で存在し、および／または、少なくとも非修飾 FBS と同程度の強度の生物学的活性を有していてよい。

【0091】

増強活性について言及する場合、該増強は、統計学的に有意な増強である。

【0092】

核酸-タンパク質技術

特定の結合特性を有する FBS ドメインを迅速に作製し、試験する 1 つの方法は、Adnexus, a Bristol-Myers Squibb Company の核酸-タンパク質技術である。Profusion と称する、核酸-タンパク質融合(RNA-および DNA-タンパク質融合)を利用する該インビトロ発現およびタグ技術は、タンパク質への結合に重要な新規のポリペプチドおよびアミノ酸モチーフの特定に使用し得る。核酸-タンパク質技術は、タンパク質を、それをコードする遺伝情報に共有結合させる技術である。RNA-タンパク質技術およびフィブロネクチンベースのスクフォールドタンパク質ライブラリースクリーニング方法についての詳細な記載については、Szostak et al., 米国特許第 6,258,558 号; 第 6,261,804 号; 第 6,214,553 号; 第 6,281,344 号; 第 6,207,446 号; 第 6,518,018 号明細書; 国際公開第 00/34784 号; 第 01/64942 号; 第 02/032925 号; および Roberts et al., Proc Natl. Acad. Sci., 94:12297-12302 (1997) を参照のこと(当該文献は引用により本明細書に包含される)。

【0093】

ベクターおよびポリヌクレオチドの実施態様

FBS 部分、本明細書に記載の PMXn 部分を含む種々のタンパク質の任意のものをコードする核酸を、化学的、酵素によってまたは組換えによって合成してよい。コドン使用は、細胞中での発現を改善するように選択してよい。該コドン使用は、選択する細胞種に依存する。大腸菌および他の細菌ならびに哺乳類細胞、植物細胞、酵母細胞および昆虫細胞についての特化したコドン使用パターンが開発されている。例えば Mayfield et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 100(2):438-442 (Jan. 21, 2003); Sinclair et al., Protein Expr. Purif., 26(1):96-105 (Oct. 2002); Connell, N.D., Curr. Opin. Biotechnol., 12(5):446-449 (Oct. 2001); Makrides et al., Microbiol. Rev., 60(3):512-538 (Sep. 1996); および Sharp et al., Yeast, 7(7):657-678 (Oct. 1991) を参照のこと。

【0094】

核酸操作の一般的な技術は、例えば、Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition, Vols. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989) または、Ausubel, F. et al., Current Protocols in Molecular Biology, Green Publishing and Wiley-Interscience, New York (1987) およびその定期的な更新に記載されており、これらは、引用により本明細書に包含される。ポリペプチドをコードする DNA は、哺乳類、ウイルスまたは昆虫遺伝子由来の適当な転写または翻訳調節エレメントに作動可能に連結している。該調節エレメントとしては、転写プロモーター、転写を調節するための付加的なオペレーター配列、適当な mRNA リボソーム結合部位をコードする配列および転写および翻訳の終結を制御する配列が挙げられる。通常複製基点により付与され

10

20

30

40

50

る、ホストにおける複製能、および、形質転換体の認識を促進する選択遺伝子をさらに組み込んでよい。

【0095】

本明細書に記載のタンパク質は、直接的だけではなく、例えば、異種性ポリペプチドとして産生してよく、該異種性ポリペプチドは、成熟タンパク質またはポリペプチドのN末端に特異的な切断部位を有するシグナル配列または他のポリペプチドであるのが好ましい。選択される異種性シグナル配列は、好ましくは、ホスト細胞により認識およびプロセシング(すなわちシグナルペプチダーゼにより切断)されるものである。未変性のシグナル配列を認識およびプロセシングしない原核宿主細胞については、該シグナル配列を、例えば、アルカリホスファターゼ、ペニシリナーゼ、lppまたは熱安定性エンテロトキシンIIリーダーの群から選択される原核生物シグナル配列により置換する。酵母の分泌については、天然のシグナル配列を、例えば、酵母インベルターゼリーダー、ファクターリーダー(サッカロミセスおよびクリベロマイセスの α -ファクターリーダー配列を含む)、または酸性ホスファターゼ、C. albicansグルコアミラーゼリーダーまたは国際公開第90/13646号に記載のシグナルで置換してよい。哺乳類細胞の発現では、哺乳類シグナル配列ならびにウイルス分泌リーダー、例えば、単純ヘルペスgDシグナルが利用可能である。該前駆体領域のDNAを、リーディングフレーム中で、該タンパク質をコードするDNAにライゲーションしてもよい。

【0096】

発現ベクターおよびクローニングベクターはともに、該ベクターが1種以上の選択した宿主細胞で複製することを可能にする核酸配列を含む。一般的に、クローニングベクターにおいて、この配列は、該ベクターが、宿主染色体DNAからは独立して複製することを可能にするものであり、複製起点または、自己複製配列を含む。該配列は、種々の細菌、酵母およびウイルスについてよく知られている。pBR322の複製起点は、殆どのグラム陰性細菌に適当であり、2 μ プラスミドの複製起点は、酵母に適当であり、種々のウイルス起点(SV40、ポリオーマ、アデノウイルス、VSVまたはBPV)は、哺乳類細胞中のクローニングベクターに適当である。一般的に、複製起点要素は、哺乳類発現ベクターには必要ではない(SV40起点を典型的に使用してよいのは、初期プロモーターを含むからという理由にのみよるものである)。

【0097】

発現およびクローニングベクターは、選択マーカーとも呼ばれる、選択遺伝子を含んでいてよい。典型的な選択遺伝子は、(a) 抗生物質または他の毒素、例えばアンピシリン、ネオマイシン、メトトレキサートまたはテトラサイクリンへの耐性を与えるタンパク質をコードするか、(b) 栄養要求性の欠損を補完するか、または、(c) 複合培地から得られない重要な栄養素を供給する、例えばバチルス菌のD-アラニンラセマーゼをコードする遺伝子。

【0098】

酵母で用いるのに適当な選択遺伝子は、酵母プラスミドYRp7に存在するtrp1遺伝子である(Stinchcomb et al., Nature, 282:39 (1979))。trp1遺伝子は、トリプトファン中での増殖能を各酵母の変異株、例えば、ATCC(登録商標)No. 44076またはPEP4-1の選択マーカーとなる(Jones, Genetics, 85:12 (1977))。酵母宿主細胞ゲノム中にtrp1破壊が存在することにより、トリプトファンの非存在下における増殖による形質転換の検出のために有効な環境がもたらされる。同様に、Leu2欠損酵母株(ATCC(登録商標)20,622または38,626)は、Leu2遺伝子を保有する公知のプラスミドにより補完される。

【0099】

発現およびクローニングベクターは、通常、宿主生物により認識されるプロモーターを含み、該タンパク質をコードする核酸に作動可能に連結している。真核宿主に用いるのが適当であるプロモーターとしては、phoAプロモーター、 β -ラクタマーゼおよびラクトースプロモーター系、アルカリンホスファターゼ、トリプトファン(trp)プロモーター

系、およびハイブリッドプロモーター、例えばtacプロモーターが挙げられる。しかし、他の公知の細菌プロモーターが適当である。細菌系に用いるプロモーターはまた、該タンパク質をコードするDNAに作動可能に連結したShine-Dalgarno (S.D.)配列を含む。

【0100】

真核生物についてのプロモーター配列は知られている。実質的に全ての真核生物遺伝子は、転写が開始する部位の約25～30塩基上流に位置する、ATリッチ領域を有する。転写開始点の70～80塩基上流に見られる他の配列は、CNCAAT(配列番号109)であり、Nは任意のヌクレオチドであってよい。殆どの真核遺伝子の3'末端には、コード配列の3'末端へのポリAテイル付加シグナルであり得るAATAAA(配列番号110)が存在する。これらの配列は全て、真核発現ベクターへの挿入に適当である。

10

【0101】

酵母ホストで用いるための適当なプロモーター配列の例としては、3-ホスホリグリセートキナーゼまたは他の解糖酵素、例えばエノレーゼ、グリセルアルデヒド-3-ホスフェートデヒドロゲナーゼ、ヘキソキナーゼ、ピルビン酸デカルボキシラーゼ、ホスホフルクトキナーゼ、グルコース-6-ホスフェートイソメラーゼ、3-ホスホグリセリン酸ムターゼ、ピルビン酸キナーゼ、トリオースリン酸イソメラーゼ、ホスホグルコースイソメラーゼおよびグルコキナーゼのプロモーターが挙げられる。

【0102】

成長条件により転写制御されるという付加的な利点を有する誘導性プロモーターである、他の酵母プロモーターは、アルコールデヒドロゲナーゼ2、イソチトクロームC、酸性ホスファターゼ、窒素代謝に関連する分解酵素、メタロチオネイン、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼおよびマルトースおよびガラクトース利用に重要である酵素のプロモーター領域である。酵母発現に用いる適当なベクターおよびプロモーターは、さらに、欧州特許出願公開73,657および国際公開第2011/124718号および国際公開第2012/059486号に記載されている。また、酵母エンハンサーを、酵母プロモーターと共に用いるのが有利である。

20

【0103】

哺乳類宿主細胞のベクターからの転写は、例えば、ポリオーマウイルス、鶏痘ウイルス、アデノウイルス(例えばアデノウイルス2)、ウシバピローマウイルス、トリ肉腫ウイルス、サイトメガロウイルス、レトロウイルス、B型肝炎ウイルスおよび最も好ましくは、サルウイルス40(SV40)のようなウイルスより得たプロモーター、異種性の哺乳類プロモーター、例えばACTIN(登録商標)プロモーター、熱ショックプロモーターにより調節し得る。ただし、該プロモーターは、宿主細胞系と適合するものである。

30

【0104】

SV40ウイルスの初期プロモーターおよび後期プロモーターは、SV40ウイルス複製起点をも含む、SV40制限断片として得るのが好都合である。ヒトサイトメガロウイルスの最初期プロモーターは、HindIII制限断片として得るのが好都合である。ベクターとしてウシバピローマウイルスを用いて、哺乳類ホストのDNAを発現させる系が米国特許第4,419,446号明細書に記載されている。この系の修飾は、米国特許第4,601,978号明細書に記載されている。単純ヘルペスウイルス由来のチミジンキナーゼプロモーターの制御下の、マウス細胞における、ヒトβインターフェロンcDNAの発現については、Reyes et al., Nature, 297:598-601 (1982)を参照のこと。あるいは、プロモーターとして、ラウスサルコーマウイルスの末端反復配列を用いてよい。

40

【0105】

タンパク質をコードするDNAの高等真核生物による転写は、しばしば、エンハンサー配列をベクターに挿入することにより上昇する。哺乳類遺伝子(グロブリン、エラスターゼ、アルブミン、α-フェトプロテインおよびインスリン)由来の多くのエンハンサー配列が知られている。しかしながた、当業者が典型的に用いるのは、真核細胞ウイルス由来のエンハンサーである。例としては、複製起点の後期側のSV40エンハンサー(bp 100～270)、サイトメガロウイルス初期プロモーターエンハンサー、複製起点の後期

50

側のポリオーマエンハンサーおよびアデノウイルスエンハンサーが挙げられる。Yaniv, Nature, 297:17-18 (1982) on enhancing elements for activation of eukaryotic promotersを参照のこと。該エンハンサーは、ベクター中にポリペプチドコード配列の5'または3'で、分かれて入れてよいが、プロモーターの5'部位に位置するのが好ましい。

【0106】

真核宿主細胞(例えば、酵母、真核、昆虫、植物、動物、ヒトまたは他の多細胞生物由来の有核細胞)で用いられる発現ベクターはまた、転写およびmRNAの安定化に必要な配列を含む。該配列は、一般的に、真核またはウイルスのDNAまたはcDNAの、5'および、場合によっては3'、非翻訳領域から得ることができる。これらの領域は、該ポリペプチドをコードするmRNAの非翻訳部分に、ポリアデニル化断片として転写されるヌクレオチド区分を含む。1つの有用な転写終結成分は、ウシ成長ホルモンポリアデニル化領域である。国際公開第94/11026号および本明細書に記載の発現ベクターを参照のこと。

【0107】

組換えDNAは、また、タンパク質の精製に有用であり得る任意の種類のタンパク質タグ配列を含んでいてよい。タンパク質タグの種類としては、ヒスチジントグ、FLAG(登録商標)タグ、mycタグ、HAタグまたはGSTタグが挙げられるが、これらに限定されない。細菌、真菌、酵母および哺乳類細胞ホストに用いるのに適当なクローニングおよび発現ベクターは、Cloning Vectors: A Laboratory Manual, Elsevier, New York (1985)に記載されており、当該文献の関連する開示は、引用により本明細書に包含される。

【0108】

発現コンストラクトは、宿主細胞に適当な方法を用いて、宿主細胞に導入してよく、これは当業者には明らかなことである。核酸の宿主細胞の導入については、種々の方法が当該分野で公知であり、例えば、エレクトロポレーション、塩化カルシウム、塩化リビジウム、リン酸カルシウム、DEAEデキストランまたは他の物質を用いた形質導入；微粒子銃；リポフェクション；および(該ベクターが感染性物質である場合)感染が挙げられるが、これらに限定されない。

【0109】

適当な宿主細胞としては、原核細胞、酵母、哺乳類細胞または細菌細胞が挙げられる。適当な細菌としては、グラム陰性またはグラム陽性生物、例えば大腸菌またはバチルス菌種が挙げられる。好ましくは、サッカロマイセス種、例えば出芽酵母である、酵母もまた、ポリペプチドの作製に使用し得る。種々の哺乳類または昆虫細胞培養系もまた、組換えタンパク質の発現に用い得る。昆虫細胞における異種性タンパク質の作製のためのバキュロウイルス系が、Luckow et al. (Bio/Technology, 6:47 (1988))に概説されている。適当な哺乳類宿主細胞株の例としては、内皮細胞、COS-7サル腎臓細胞、CV-1、L細胞、C127、3T3、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞、ヒト胎児由来腎臓細胞、Hela、293、293TおよびBHK細胞株が挙げられる。精製タンパク質は、適当な宿主/ベクター系を組換えタンパク質を発現するように培養することにより作製される。次いで、該FBSタンパク質を培養培地または細胞抽出物から精製する。

【0110】

タンパク質作製

宿主細胞は、本明細書に記載の発現ベクターまたはクローニングベクターを用いて形質転換し、プロモーターの誘導、形質転換対の選択または、所望の配列をコードする遺伝子の増幅に適当なように改変した慣用される栄養培地中で培養する。

【0111】

タンパク質の作製に用いられる宿主細胞は、種々の培地で培養してよい。市販の培地、例えばHam's F10 (Sigma)、Minimal Essential Medium ((MEM)、(Sigma))、RPMI-1640 (Sigma)およびダルベッコ変法イーグル培地 ((DMEM)、(Sigma))が宿主細胞の培養に適当である。さらに、Ham et al., Meth. Enzymol., 58:44 (1979), Barnes et al., Anal. Biochem., 102:255 (1980), 米国特許第4,767,704号；第4,657,866号；第4,927,762号；

10

20

30

40

50

第4,560,655号；または第5,122,469号明細書；国際公開第90/03430号；第87/00195号；または米国特許第RE30,985号明細書に記載の任意の培地を、ホスト細胞の培養培地として用いてよい。これらの培地にうち任意のものに、必要に応じて、ホルモンおよび／または他の増殖因子(例えばインスリン、トランスフェリンまたは上皮細胞成長因子)、塩(例えば塩化ナトリウム、塩化カルシウム、塩化マグネシウムおよびリン酸塩)、緩衝剤(例えばH E P E S)、ヌクレオチド(例えばアデノシンおよびチミジン)、抗生物質(例えばゲンタマイシン薬剤)、トレース要素(通常、 μ モルの範囲の最終濃度で存在する無機化合物と定義される)およびグルコースまたは同等のエネルギー源を補充してよい。他の任意の補助物質も、当業者に公知である適当な濃度で含まれていてよい。培養条件、例えば、温度、pH等は、以前に発現のために該ホスト細胞に用いたものであり、当業者には明らかである。

10

【0112】

本明細書に記載のタンパク質は、無細胞翻訳系を用いて製造し得る。かかる目的のために、該タンパク質をコードする核酸を、mRNAを産生するためのインビトロでの翻訳および、該mRNAの、使用する特定の無細胞系(真核生物、例えば哺乳類または酵母の無細胞翻訳系または原核、例えば細菌の無細胞翻訳系)における無細胞翻訳を可能にするために、修飾する必要がある。

【0113】

タンパク質は、化学合成(例えばSolid Phase Peptide Synthesis, Second Edition, The Pierce Chemical Co., Rockford, IL (1984)に記載の方法)によっても製造し得る。該タンパク質への修飾もまた、化学合成により作製し得る。

20

【0114】

本明細書に記載のタンパク質は、タンパク質化学の分野で一般的に知られている単離/精製方法により精製し得る。非限定的な例としては、抽出、再結晶化、(例えば、硫酸アンモニウムまたは硫酸ナトリウムを用いた)塩析、遠心分離、透析、超遠心分離、吸着クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、順相クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、ゲル濾過、ゲル透過クロマトグラフィー、親和性クロマトグラフィー、電気泳動、向流分配またはこれらの任意の組合せが挙げられる。精製後、タンパク質を当該分野で公知の種々の任意の方法により異なるバッファーへの交換および／または濃縮を行ってよく、該方法としては、濾過および透析が挙げられるが、これらに限定されない。

30

【0115】

精製タンパク質は、好ましくは少なくとも85%の純度、より好ましくは少なくとも95%の純度であり、最も好ましくは少なくとも98%または99%の純度である。厳密な純度の数値に関わらず、医薬製品として使用するための該タンパク質は十分に純粋である。

【0116】

例示的な使用

修飾FBSタンパク質を、PmXn成分の添加により修飾される該FBSタンパク質を使用し得る任意の目的に使用することができる。

40

【0117】

一の局面において、本出願は、障害の処置に有用である修飾FBS成分を含む、タンパク質を提供する。処置し得る疾患または障害は、FBS成分の結合特異性により指示される。本明細書に記載するように、修飾FBS成分は、所望の任意の標的に結合するように設計されていてよい。例示的な標的としては、例えば、TNF- α 、VEGFR2、PCSK9、IL-23、EGFRおよびIGF1Rが挙げられる。単なる例示であるが、TNF- α に結合する修飾FBS成分を、自己免疫疾患、例えば関節リウマチ、炎症性腸疾患、感染および喘息の処置に使用してよい。本明細書に記載の修飾FBSは、がんの処置にも使用し得る。

【0118】

50

特定の態様において、疾患、例えばがん罹患している対象を処置する方法は、該対象に、修飾 F B S 薬物結合体を投与することを含む。

【0119】

本明細書において、対象に薬物を投与する方法を提供する。いくつかの態様において、該対象はヒトである。いくつかの態様において、タンパク質は、哺乳類、特にヒトにとって薬学的に許容される。「薬学的に許容される」組成物は、有意な有害な医学的結果を伴わずに、動物に投与される組成物を指す。薬学的に許容される組成物の例としては、インテグリン結合ドメイン(RGD)を含む組成物、および、本質的にエンドトキシンまたは発熱物質を含まないか、または、エンドトキシンまたは発熱物質のレベルが非常に低い組成物が挙げられる。

10

【0120】

本明細書に記載する修飾 F B S タンパク質の他の用途としては、インビトロまたはインビボでの検出アッセイにおける使用が挙げられる。例えば、それらを、サンプル中の標的分子の検出に使用してよい。方法は、該サンプルを、本明細書に記載の修飾 F B S と接触させることを含んでいてよく、ここで、該接触は、F B S 標的複合体形成、および、該複合体の検出による、該サンプル中の該標的の検出が可能である条件下で行う。検出は、当該分野で認識されている任意の技術、例えば、X線検出、免疫学アッセイ、蛍光検出、質量分析または表面プラズモン共鳴を用いて行ってよい。該サンプルは、ヒトまたは他の哺乳類由来であってよい。診断目的のために適当な剤は、全身のイメージングのための放射性同位体、サンプル試験のための放射性同位体、酵素、蛍光標識および他の適当な抗体タグを含む、検出可能な標識である。

20

【0121】

特定の態様において、本明細書に記載の修飾 F B S は、種々の診断およびイメージング適用に有用である。特定の態様において、修飾 F B S を、インビボで検出可能である部分で標識し、該標識 F B S は、例えば、全身のイメージングのための、インビボイメージング剤として使用してよい。例えば、一の態様において、対象における、特定の抗原を含む腫瘍を検出する方法は、該対象に、検出可能な標識に連結した修飾 F B S を投与し、適当な時間の経過後、該対象における該標識を検出することを含む。

【0122】

F B S イメージング剤は、特定の抗原、特定の抗原のレベルの上昇を伴う障害または疾患、例えば、腫瘍が選択的に該抗原を過剰発現するがんの診断に使用し得る。同様に、特定の抗原に特異的に結合する修飾 F B S は、該抗原に関連する症状について処置されている対象における抗原レベルのモニターに使用し得る。修飾 F B S は、修飾の有無に関わらず使用可能であり、検出可能な成分の共有または非共有結合により標識されていてよい。

30

【0123】

製剤および投与

本出願は、さらに、本明細書に記載のタンパク質を含む、薬学的に許容される組成物であって、本質的にエンドトキシンおよび／または発熱物質を含まない、組成物を提供する。

【0124】

タンパク質を含む治療用組成物は、所望の純度を有する本明細書に記載のタンパク質を、所望により、生理学的に許容される担体、賦形剤または安定化剤と混合することにより、水性液剤、凍結乾燥または他の乾燥製剤の形態で、保存用に調製される(0sol, A., ed., Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th Edition (1980))。許容される担体、賦形剤または安定化剤は、使用する用量および濃度において、レシピエントに対して非毒性であり、リン酸、クエン酸および他の有機酸のようなバッファー；アスコルビン酸およびメチオニンを含む抗酸化剤；保存料（例えばオクタデシルジメチルベンジルアンモニウムクロリド；塩化ヘキサメトニウム；塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム；フェノール、ブチルもしくはベンジルアルコール；アルキルパラベン、例えばメチルもしくはプロピルパラベン；カテコール；レゾルシノール；シクロヘキサノール；3-ペンタノール

40

50

；およびm-クレゾール)；低分子量(約10残基未満)ポリペプチド；タンパク質、例えば血清アルブミン、ゼラチンまたは免疫グロブリン；親水性ポリマー、例えばポリビニルピロリドン；アミノ酸、例えばグリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニンまたはリジン；単糖、二糖および、グルコース、マンノースまたはデキストランを含む他の炭水化物；キレート剤、例えばEDTA；スクロース、マンニトール、トレハロースまたはソルビトールを含む糖；塩形成対イオン、例えばナトリウムイオン；金属錯体(例えばZn-タンパク質複合体)；および／または非イオン界面活性剤、例えばTween、PLURONIC(登録商標)またはポリエチレングリコール(PEG)を含む。

【0125】

本明細書において、該製剤は、また、処置する特定の適応症について必要であれば、2つ以上の有効成分、好ましくは、互いに悪性の影響を及ぼさない、相補的な活性を有する有効成分を含んでいてもよい。該分子は、意図する目的に有効な量での組合せで存在するのが適当である。

【0126】

該タンパク質は、また、例えば、それぞれ、コロイド薬物伝達系(例えばリポソーム、アルブミンマイクロカプセル、マイクロエマルジョン、ナノ粒子およびナノカプセル)またはマクロエマルジョンにおいて、例えば、コアセルベーション技術または界面重合によって製造されたマイクロカプセル、ヒドロキシメチルセルロースもしくはゼラチンマイクロカプセルおよびポリ(メチルメタクリレート)マイクロカプセルに封入されていてよい。該技術は、Osol, A., ed., Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th Edition (1980)に記載されている。

【0127】

インビボ投与に用いる製剤は、無菌である必要がある。これは、無菌フィルターメンブレンを通して濾過することにより容易に達成される。

【0128】

徐放製剤を調製してもよい。徐放製剤の適当な例としては、本明細書に記載のタンパク質を含む固体疎水ポリマーの半透性マトリクスが挙げられ、該マトリクスは、造形品、例えば、フィルムまたはマイクロカプセルの形態である。徐放マトリクスの例としては、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))、ポリ乳酸(米国特許第3,773,919号明細書)、L-グルタミン酸とエチル-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、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酢酸ロイプロリドから構成される、注入可能な微粒子)およびポリ-D-(1-3-ヒドロキシ酪酸が挙げられる。エチレン-ビニルアセテートおよび乳酸-グリコール酸のようなポリマーは、100日間にわたって、分子を放出させることが可能であるのに対し、特定のヒドロゲルは、より短い期間にわたってタンパク質を放出する。カプセル化されたタンパク質が体内に長期間残る場合、該タンパク質は、37℃において水分に暴露された結果として、変性または凝集し、生物活性の損失および免疫原性の変化を起こす可能性がある。関連する機構によって、安定化のための合理的な戦略を考案することができる。例えば、凝集機構が、チオジスルフィドの交換を介する分子内S-S結合形成であることが明らかになっている場合、安定化は、適当な添加剤を用いた、スルフィドリル残基の修飾、酸性溶液からの凍結乾燥、水分含量の調節および特定のポリマーマトリクス組成物の展開により達成し得る。

【0129】

各タンパク質の用量が、該タンパク質の特性に依存するものであることは、当業者が理解することであるが、好ましい用量は、約10mg/m²～約2000mg/m²、より好ましくは約50mg/m²～約1000mg/m²の範囲であってよい。

【0130】

治療適用のためには、薬学的に許容される剤形で、該タンパク質を対象に投与する。該タンパク質は、急速投与で、または連続的に一定期間、静脈内投与しても、筋肉内、皮下

、関節内、滑膜内、髄腔内、経口、局所または吸入経路により投与してよい。該タンパク質はまた、腫瘍内、腫瘍周囲、病巣内または病変周囲経路によって、局所的または全身性の治療効果を発揮するように投与してよい。適当な薬学的に許容される担体、希釈剤および賦形剤は、当業者には、臨床条件を保証するものとしてよく知られており、当業者が決定し得るものである。適当な担体、希釈剤および／または賦形剤の例としては：(1) ダルベッコリン酸緩衝食塩水(pH約7.4、ヒト血清アルブミン約1mg/ml～約25mg/ml含有)、(2) 0.9% 生理食塩水(0.9% w/v NaCl)および(3) 5% (w/v) デキストロースが挙げられる。本発明の方法は、インビトロ、インビボまたはエクスビボで実施し得る。

【0131】

タンパク質および1種以上の付加的な治療剤の投与は、共投与するか、または連続的に投与するいずれの場合であっても、治療適用のために、上述のように行ってよい。共投与に適当な薬学的に許容される担体、希釈剤および賦形剤は、共投与する具体的な治療剤の特性によるものであることは、当業者が理解することである。

【0132】

該タンパク質は、凍結乾燥よりもむしろ水性の剤形で存在する場合、典型的に、約0.1mg/ml～100mg/mlの濃度で製剤されるが、これらの範囲を超えた広範囲の変動が許容される。疾患の処置のために、適当なタンパク質の用量は、処置する疾患の種類、該疾患の重度および経過、該タンパク質が予防目的で投与されるのかまたは治療目的で投与されるのか、以前の治療の過程、該患者の病歴および、融合物に対する応答、および担当医の決定に依存する。該タンパク質は、1回で、または一連の処置にわたって患者に投与するのが適当である。

【0133】

例示的な態様

1. 標的に特異的に結合する、単離されたフィブロネクチンベースのスカフォールド(FBS)タンパク質であって、該FBSが非天然起源のFBSであり、該FBSがC末端において、アミノ酸配列PmXn(Pはプロリンであり、Xは任意のアミノ酸であり、mは少なくとも1である整数であり、nは0または少なくとも1である整数である)からなる部分に連結しており、該PmXn部分が、PmXn部分に連結していないFBSタンパク質と比較して、FBSタンパク質の性質を増強させる、FBSタンパク質。
2. 該部分がPからなる(mは1であり、nは0である)、態様1記載の、単離されたFBSタンパク質。
3. 該部分がPPからなる(mは2であり、nは0である)、態様1に記載の、単離されたFBSタンパク質。
4. 該部分がPmXnからなる(nは1～150である)、態様1に記載の、単離されたFBSタンパク質。
5. 該部分がPmXnからなる(nは1～10である)、態様1に記載の、単離されたFBSタンパク質。
6. 該部分がPmXnからなる(nは1～5である)、態様1に記載の、単離されたFBSタンパク質。
7. 該部分が、PI、PC、PID、PIE、PIDK(配列番号61)、PIEK(配列番号63)、PIDKP(配列番号65)、PIEKP(配列番号67)、PIDKPS(配列番号69)、PIEKPS(配列番号71)、PIDKPC(配列番号73)、PIEKPC(配列番号75)、PIDKPSQ(配列番号77)、PIEKPSQ(配列番号79)、PIDKPCQ(配列番号81)、PIEKPCQ(配列番号83)、PHHHHHH(配列番号87)またはPCHHHHHH(配列番号86)からなる、態様1に記載の、単離されたFBSタンパク質。
8. FBSタンパク質が、Fn3タンパク質である、態様1～7のいずれか記載の、単離されたFBSタンパク質。
9. Fn3タンパク質が、¹⁰Fn3タンパク質である、態様8に記載の、単離されたFBSタンパク質。
10. ¹⁰Fn3タンパク質がヒト¹⁰Fn3タンパク質である、態様9に記載の、単離

10

20

30

40

50

された F B S タンパク質。

1 1. 配列番号 1 と少なくとも 5 0 % 同一であるアミノ酸配列を含む、態様 1 ～ 1 0 のいずれか記載の、単離された F B S タンパク質。

1 2. 少なくとも 1 つのループまたは 1 つのスキフォールド領域に少なくとも 1 つのアミノ酸変異を含む、態様 1 ～ 1 1 のいずれかに記載の、単離された F B S タンパク質。

【0 1 3 4】

1 3. アミノ酸配列

【化 9】

**VSDVPRDLEVVA(X)_uLLISW(X)_vYRITY(X)_wFTV(X)_xATISGL(X)_yYTITVYA(X)_zI
SINYRT (配列番号 9)**

10

((X)_u、(X)_v、(X)_w、(X)_x、(X)_yおよび(X)_zは、野生型アミノ酸配列(配列番号 1)からなるか、対応する野生型配列に少なくとも 1 つのアミノ酸の差異を含み、該配列は、1 ～ 1 0 個のスキフォールド、N 末端および／または C 末端変異を含んでよい)

を含む、態様 1 ～ 1 2 のいずれかに記載の、単離された F B S タンパク質。

1 4. 配列番号 1 と少なくとも 5 0 % 同一であるアミノ酸配列を含む、態様 1 ～ 1 3 のいずれかに記載の単離された F B S タンパク質であって、該 F B S タンパク質の C 末端アミノ酸残基が、P m X n からなる部分に融合しており、該 F B S タンパク質が、5 0 0 nM 未満の K_d で標的に特異的に結合し、該標的には、配列番号 1 を含む、野生型^{1 0} F n 3 分子は結合しない、単離された F B S タンパク質。

20

1 5. 配列番号 1 と少なくとも 7 0 % 同一であるアミノ酸配列を含む、態様 1 4 に記載の、単離された F B S タンパク質。

1 6. P m X n からなる部分が、F B S タンパク質の C 末端アミノ酸残基に、ペプチド結合を介して結合している、態様 1 ～ 1 5 のいずれか記載の、単離された F B S タンパク質。

1 7. P m X n が P または P C である、態様 1 ～ 1 6 のいずれか記載の、単離された F B S タンパク質。

1 8. 配列番号 1 に少なくとも 6 0 % 同一であるアミノ酸配列を含む態様 1 ～ 1 7 のいずれか記載の、単離された F B S タンパク質であって、F B S タンパク質の C 末端アミノ酸残基が、ペプチド結合を介してプロリンに結合しており、該 F B S タンパク質が、5 0 0 nM 未満の K_d で標的に特異的に結合し、該標的には、配列番号 1 を含む野生型^{1 0} F n 3 分子は結合しない、単離された F B S タンパク質。

30

1 9. P m X n の少なくとも 1 つの X がシステインである、態様 1 ～ 1 8 のいずれかに記載の、単離された F B S タンパク質。

2 0. 該システインが異種性部分に結合している、態様 1 9 記載の、単離された F B S タンパク質。

2 1. 該異種性分子が検出可能な部分である、態様 2 0 記載の、単離された F B S タンパク質。

2 2. 該異種性分子が薬物部分であり、該薬物部分と F B S が、F B S - 薬物結合体を形成する、態様 2 0 または 2 1 に記載の、単離された F B S タンパク質。

40

2 3. P m X n によりもたらされる性質の増強が、安定性の上昇である、態様 1 ～ 2 2 のいずれかに記載の、単離されたタンパク質。

2 4. 安定性の上昇が、少なくとも 1 °C、2 °C、3 °C、4 °C、5 °C またはそれ以上の、T_m の上昇である、態様 2 3 記載の単離された F B S タンパク質。

【0 1 3 5】

次の代表的な実施例は、重要な付加的な情報、例示および、種々の態様において、本発明の実施に適用し得る指示およびその等価物を含むものである。これらの実施例は、本発明の説明を手助けすることを意図するものであり、その範囲を限定することを意図するものではなく、そのように解釈されるべきものでもない。

【実施例】

50

【0136】

実施例1: $^{10}\text{Fn3}$ 分子のC末端にプロリンを付加することによる、熱安定性の向上

天然では、 $^{10}\text{Fn3}$ は、一連の長いフィブロネクチンタイプ III ドメインの一部であり; $^{10}\text{Fn3}$ の直接下流にあるドメインは、 $^{11}\text{Fn3}$ と名付けられている。下記の配列は、 $^{10}\text{Fn3}$ (斜体) および $^{11}\text{Fn3}$ (太字) ドメインおよびその間の接合部(下線部)の野生型配列を示す。

【化10】

**VSDVPRDLEVVAATPTSLISWDAPAVTVRYRITYGETGGNSPVQEFTVPGSKSTATIS
GLKPGVDYTTITVYAVTGRGDSPASSKPISINYRTEIDKPSQMQVTDVQDNSISVKWLP
SSSPVTGYRVTTTPKNGPGPTKTKTAGPDQTEMTEGLQPTVEYVVSVYAQNPSG
ESQPLVQTAVT (配列番号 90)**

10

【0137】

$^{10}\text{Fn3}$ の結晶および NMR 構造および、 $^{10}\text{Fn3}$ と $^{11}\text{Fn3}$ の配列比較に基づけば(Dickinson et al., “Crystal structure of the tenth type III cell adhesion module of human fibronectin”, J. Mol. Biol., 36:1079-1092 (1994)), この配列の最初の二残基である、RTは、 $^{10}\text{Fn3}$ の最終 β ストランド(「ストランド G」)の一部であり、該配列の残りの部分である EIDKPSQ は、構造化した 10 番目および 11 番目のフィブロネクチンタイプ III ドメインの間の可動性のリンカーである。

【0138】

$^{10}\text{Fn3}$ に基づいて操作されたタンパク質ドメインのC末端は、クローニング、発現および精製を促進するために、野生型配列から修飾されていることがしばしばである。アドネクチンの操作された異なるC末端の調査により、RTEからRTPへの変異により、いくつかの異なるアドネクチンの熱安定性が向上したことが明らかになった。表4には、この試験で用いた異なるC末端を記載する。

20

【表4】

表4: 本試験で比較した、 $^{10}\text{Fn3}$ と $^{11}\text{Fn3}$ の間の野生型リンカーおよび、操作したアドネクチンC末端配列。「PおよびHisタグを有する操作した短C末端」および「PCを有する操作した短C末端」は、RTEからRTPへの変異を含む。

記述子	配列	目的	コメント
$^{10}\text{Fn3}$ と $^{11}\text{Fn3}$ の間の野生型の接合部	RTEIDKPSQ (配列番号91)	天然ヒト配列	RTEを含む
Hisタグを有する操作した長C末端	RTEIEKPSQH ₆ (配列番号92)	H ₆ は、金属-キレートクロマトグラフィーによる精製を可能にする	RTEを含む; DK→EK変異は、プロテアーゼに対する感受性を低下させた
PおよびHisタグを有する操作した短C末端	RTPH ₆ (配列番号93)	H ₆ は、金属-キレートクロマトグラフィーによる精製を可能にする	RTPを含む
ECを有する操作した短C末端	RTEC (配列番号94)	Cは、マレイミド化学法を用いた、部位特異的な修飾を可能にする	RTEを含む; 精製タグなし
PCを有する操作した短C末端	RTPC (配列番号95)	Cは、マレイミド化学法を用いた、部位特異的な修飾を可能にする	RTPを含む; 精製タグなし

30

40

50

【 0 1 3 9 】

RTEからRTPへの変異の、アドネクチンの熱安定性に対する影響を、そのC末端が異なる何対かのアドネクチンを比較することにより試験した。表5は、この試験に用いた、アドネクチンの対をその名称、標的および熱力学的性質とともに示す。アドネクチン1は、標的Xに結合するアドネクチンである。記載するアドネクチンは全て、PROfusion(mRNAディスプレイ)技術を用いて、高複雑度ライブラリより選択し、部位特異的な変異導入により再操作したC末端を有していた。タンパク質の全長配列を下記に示す。

【表5】

表5: クローン名、C末端、標的および溶融温度(0.5mg/mL、PBS中、pH7.4における示差走査熱量測定により決定される)。アドネクチンPRD-1414およびPRD-1417を、40kDa、2-分枝PEG(NOF、カタログ番号GL2-400MA01)に結合させた。

タンパク質ID (RTE) C末端	タンパク質ID (RTP) C末端	標的	T _m (RTE)	T _m (RTP)	RTE含有タンパク 質と比較した、RT P含有タンパク質 におけるT _m の上 昇
ADX_2382_D09 RTEIEKPSQH ₆ (配列番号92)	ADX_5484_A03 RTPH ₆ (配列番号93)	PCSK9	84°C	87°C	+3°C
ADX_2987_H07 RTEIEKPSQH ₆ (配列番号92)	ADX_5484_A04 RTPH ₆ (配列番号93)	ミオスタ チン	56°C	57°C	+1°C
PRD-1414 RTEC-PEG (配列番号94)	PRD-1417 RTPC-PEG (配列番号95)	PCSK9	64°C	76°C	+12°C
アドネクチン1 RTEIEKPSQH ₆ (配列番号94)	アドネクチン1 RTPH ₆ (配列番号95)	X	61°C	64°C、 72°C	+3°C、+11°C

【 0 1 4 0 】

この実施例で用いたタンパク質のアミノ酸配列：

ADX_2382_D09:

【化11】

MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAEGYGYRITYGETGGNSPVQEFTVPVS
KGTATISGLKPGVDYTTTVYAVEFDFFGAGYYHRPISINYRTEIDKPSQH₆HHHHH*
(配列番号96)

ADX_5484_A03:

【化12】

MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAEGYGYRITYGETGGNSPVQEFTVPVS
KGTATISGLKPGVDYTTTVYAVEFDFFGAGYYHRPISINYRTPHHHHHH* (配列番
号97)

ADX_2987_H07:

10

20

30

40

【化 1 3】

MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWTLPHAGRAHYRITYGETGGNSPVQEFTVPG
 RGVTTATISGLKPGVDYTTTVYAVTVTTTKVIHYKPISINYRTEIDKPSQHSHHHH*
 (配列番号 97)

ADX_5484_A04:

【化 1 4】

MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWTLPHAGRAHYRITYGETGGNSPVQEFTVPG
 RGVTTATISGLKPGVDYTTTVYAVTVTTTKVIHYKPISINYRTPHHHHHH* (配列番
 号 98)

10

PRD-1414:

【化 1 5】

MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAEGYGYRITYGETGGNSPVQEFTVPVS
 KGTATISGLKPGVDYTTTVYAVEFDFPGAGYYHRPISINYRTEC* (配列番号 99)

PRD-1417:

【化 1 6】

MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAEGYGYRITYGETGGNSPVQEFTVPVS
 KGTATISGLKPGVDYTTTVYAVEFDFPGAGYYHRPISINYRTPC* (配列番号 100)

20

上記の各配列中の「*」は停止コドンおよび各アドネクチンの C 末端を示す。

【0 1 4 1】

N 末端の M を各タンパク質の細菌による発現の間に除いた。精製 PRD-1414 および PRD-1417 タンパク質の C 残基を、各タンパク質の特徴付けの前に P E G に結合させた。

【0 1 4 2】

表 5 に示すように、C 末端に野生型グルタミン酸の代わりにプロリンを含む C 末端を有するアドネクチン (RTE から RTP への変異) は、より高い熱安定性を示す。ヒト ^{1 0} F n 3 と

^{1 1} F n 3 の間の天然のリンカー上でモデリングされたより長い C 末端を、プロリンおよびヘキサヒスチジン精製タグのみを含むより短い操作 C 末端で置換したときに、いくつかの例において安定性の上昇が観察された。より短い操作 C 末端およびポリエチレングリコール (P E G) を有する ^{1 0} F n 3 タンパク質において、C 末端プロリンの付加時にも、熱安定性の向上が見られた。安定性の向上は、この特定の位置におけるプロリンの存在によるものといえることができる。

30

【0 1 4 3】

実施例 2: C 末端プロリンによる、第二の P C S K 9 アドネクチンの安定化

本実施例は、他の P C S K 9 アドネクチン分子の熱安定性もまた、C 末端プロリンの添加により向上することを示す。

【0 1 4 4】

この実施例において、P E G 化 (40 kDa 分枝 P E G) P C S K 9 アドネクチン ADX_2013_E01 の C 末端を、NYRTEIEKPCQ (配列番号 101) から NYRTPC (配列番号 102) に変異させ、熱安定性を T S F により測定した。このアドネクチンのアミノ酸配列は、国際公開第 2011/130354 号に記載されている。結果から、NYRTEIEKPCQ (配列番号 101) C 末端を有する P E G 化アドネクチンは、70 °C の T m を有し、NYRTPC (配列番号 102) C 末端を有する P E G 化アドネクチンは、76 °C の T m を有することが示された。

40

【0 1 4 5】

したがって、この P C S K 9 アドネクチンの熱安定性は、C 末端プロリンの存在により 6 °C 上昇する。

【0 1 4 6】

50

実施例 3：種々の C 末端の熱安定性についての比較

この実施例は、C 末端にプロリンを有する、または有さないアドネクチンならびに C 末端に 2 つのプロリンを有するアドネクチンの熱安定性についての比較を示す。

【0147】

実施例 1 に記載するアドネクチンの 2 つ (P C S K 9 に結合する ADX_2392_D09 および ミオスタチンに結合する ADX_2987_H07) および 1 つの付加的な、異なる標的に結合するアドネクチン (アドネクチン 1、標的 X に結合) を、表 6 に記載するように N 末端において修飾し、その熱安定性および単量体 % を決定した。異なる標的 (X) に対するアドネクチン (「アドネクチン 1」) もまた、同じ C 末端配列を用いて修飾した。熱安定性を T S F により決定し、単量体 % を S E C により決定した。

【表 6】

表6: 種々の C 末端を有するアドネクチンの単量体 % および熱安定性

親/C末端	NYRTEIEKPSQ H ₆ (配列番号103)	NYRTH ₆ (配列番号104)	NYRTPH ₆ (配列番号105)	NYRTPPH ₆ (配列番号106)
ADX_2392_D09 PCSK9	>99% 84℃	>99% 83℃	>99% 87℃	99% 87℃
ADX_2987_H07 ミオスタチン	99% 56℃	>99% 51℃	>99% 57℃	>99% 57℃
アドネクチン1 標的X	~8% 61℃	>99% 58℃	>98% 64℃、72℃	>98% 64℃、72℃

【0148】

表 6 に記載する結果は、C 末端の特性は、単量体 % には有意な影響を全く及ぼさないが、融解温度 (T_m) には影響を及ぼすことを示す。実施例 1 に記載するように、両方のアドネクチンについて、NYRTPH₆ (配列番号 105) は、NYRTH₆ (配列番号 104) と比較して、P C S K 9 アドネクチンについては 4℃、およびミオスタチンアドネクチンについては 6℃ 熱安定性を上昇させる。さらに、第二のプロリンの存在により、単一のプロリンによるのと同程度の安定化効果がもたらされる。

したがって、1 または 2 個の C 末端プロリンの存在により、C 末端プロリンを有さない同じ分子と比較して、アドネクチンの熱安定性が向上する。

【0149】

実施例 4：C 末端プロリンの付加により溶解度が上昇する

この実施例は、C 末端プロリンの存在が、C 末端プロリンを持たない同じタンデムアドネクチンと比較して、タンデムアドネクチンの溶解度を上昇させることを示す。

【0150】

タンデムアドネクチン、すなわち、リンカーで結合した、互いに異なる標的に結合する、NYRTE (配列番号 107) C 末端または NYRTP (配列番号 108) C 末端のいずれかを含む 2 つのアドネクチンを大腸菌 B L R 細胞で発現させ、30℃ で発酵させた。プロリンを有さないタンデムの力価は、1.2 g/L 溶解タンパク質および総タンパク質 2.8 g/L であり、これにより、発現されているタンパク質は、43% が可溶性であることが示された。プロリンを有する該タンデムの力価は溶解性タンパク質 2.56 g/L および総タンパク質 2.61 g/L であった。プロリンを有さないタンデムの不溶画分を復元し、98% 純粋であり、2.5 mg/mL が単量体である溶液を得た後であっても、このタンパク質組成物は、標的に対する有意な結合を示さず、このことから、該タンパク質組成物は、適切に再フォールディングし得ないことが示された。

【0151】

したがって、2 つのタンパク質間の差異は、C 末端に E 対 P が存在すること似すぎないことを考慮すると、結果は、プロリンの存在がタンデムの溶解度を上昇させることを

示すものである。

【0152】

背景技術、発明の詳細な説明、図面の簡単な説明および実施例で引用する各文献(特許、特許出願、雑誌の記事、アブストラクト、研究室マニュアル、書籍、GENBANK(登録商標)アクセス番号、SWISS-PROT(登録商標)アクセス番号または他の開示を含む)は、その全体の記載が、引用により本明細書中に包含される。

【0153】

本発明は、本明細書に記載の態様により範囲が限定されるものではなく、該態様は、本発明の個々の態様の1個の例示であることを意図するものであり、機能的に等価なものは、本発明の範囲内に含まれることが意図されている。本発明のモデルおよび方法への種々の改変は、本明細書に記載のものに加えて、前述の記載から当業者には明らかなものであり、これらも同様に、本明細書の範囲内に含まれることが意図されている。該改変または他の態様は、本発明の範囲および精神から離れなければ、実施することができる。

10

【図1】

FIG. 1



RDLEVVAATPTSLISWDAPAVTVRYRYITYGETGGNSPVQEFTVPGSKSTATISGLK
PGVDYITIVYAVTGRGDSPASSKPISINYRTEI

【配列表】

2017509651000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2015/021466

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C07K14/78
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, Sequence Search, EMBASE, INSPEC, 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 2011/130354 A1 (SQUIBB BRISTOL MYERS CO [US]; CAMPHAUSEN RAY [US]; CLOAD SHARON T [US]) 20 October 2011 (2011-10-20) cited in the application	1,2,4-6, 8-24
Y	paragraph [0187] - paragraph [0190] -----	1-24
X	WO 2011/150133 A2 (SQUIBB BRISTOL MYERS CO [US]; CAMPHAUSEN RAY [US]; O'LOUGHLIN JOHN [US]) 1 December 2011 (2011-12-01)	1,2,4-6, 8-24
Y	page 27 - page 28; sequences 7, 16-18 -----	1-24
Y	FR 2 819 809 A1 (COMMISSARIAT ENERGIE ATOMIQUE [FR]) 26 July 2002 (2002-07-26) page 17, line 1 - line 5 -----	1-24
Y	US 2010/040646 A1 (NASSAL MICHAEL [DE] ET AL) 18 February 2010 (2010-02-18) paragraphs [0025], [0082] -----	1-24
-/-		

☒ 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

19 June 2015

Date of mailing of the international search report

02/07/2015

Name and mailing address of the ISA/

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

Authorized officer

Ury, Alain

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2015/021466

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	W0 2007/062064 A2 (UNIV CALIFORNIA SAN DIEGO [US]; AROIAN RAFFI V [US]; LI XIANG-QIAN [US] 31 May 2007 (2007-05-31) page 5, line 22 - line 23 -----	1-24
Y	US 2005/095604 A1 (KIM TAE-WAN [US] ET AL) 5 May 2005 (2005-05-05) paragraphs [0006], [0155], [0161] -----	1-24
Y	US 2003/190740 A1 (ALTMAN ELLIOT [US]) 9 October 2003 (2003-10-09) paragraphs [0095], [0153], [0158] -----	1-24

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2015/021466

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2011130354 A1	20-10-2011	AR 081454 A1	05-09-2012
		AU 2011240650 A1	29-11-2012
		CA 2796338 A1	20-10-2011
		CL 2012002884 A1	01-04-2013
		CN 103068843 A	24-04-2013
		EA 201270761 A1	29-03-2013
		EP 2558491 A1	20-02-2013
		JP 2013531613 A	08-08-2013
		KR 20130056871 A	30-05-2013
		MA 34209 B1	02-05-2013
		PE 02382013 A1	11-03-2013
		SG 184220 A1	29-11-2012
		TW 201141508 A	01-12-2011
		US 2012094909 A1	19-04-2012
		US 2013210703 A1	15-08-2013
		UY 33331 A	31-10-2011
		WO 2011130354 A1	20-10-2011
WO 2011150133 A2	01-12-2011	CN 103180339 A	26-06-2013
		EP 2576615 A2	10-04-2013
		JP 2013534812 A	09-09-2013
		US 2013184212 A1	18-07-2013
		WO 2011150133 A2	01-12-2011
FR 2819809 A1	26-07-2002	AT 370160 T	15-09-2007
		CA 2435097 A1	01-08-2002
		CN 1487951 A	07-04-2004
		DE 60221805 T2	15-05-2008
		DK 1368372 T3	07-01-2008
		EP 1368372 A2	10-12-2003
		ES 2291439 T3	01-03-2008
		FR 2819809 A1	26-07-2002
		IL 156799 A	15-04-2010
		JP 4307838 B2	05-08-2009
		JP 2004535366 A	25-11-2004
		KR 20040011454 A	05-02-2004
		MX PA03006263 A	29-04-2005
		US 2006121538 A1	08-06-2006
		WO 02059146 A2	01-08-2002
		ZA 200305576 A	21-07-2004
US 2010040646 A1	18-02-2010	AT 538134 T	15-01-2012
		AU 2007294249 A1	13-03-2008
		BR PI0716545 A2	02-04-2013
		CA 2662707 A1	13-03-2008
		CN 101541828 A	23-09-2009
		CO 6160336 A2	20-05-2010
		DK 2059525 T3	05-03-2012
		EP 1897887 A1	12-03-2008
		EP 2059525 A1	20-05-2009
		ES 2377742 T3	30-03-2012
		JP 5160545 B2	13-03-2013
		JP 2010502658 A	28-01-2010
		KR 20090059118 A	10-06-2009
		MY 146926 A	15-10-2012
		NZ 575360 A	26-11-2010
		PT 2059525 E	27-02-2012
		RU 2009112721 A	20-10-2010

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2015/021466

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date	
		SI 2059525 T1	30-03-2012	
		US 2010040646 A1	18-02-2010	
		WO 2008028535 A1	13-03-2008	
		ZA 200901825 A	31-03-2010	

WO 2007062064	A2	31-05-2007	US 2010024075 A1	28-01-2010
			WO 2007062064 A2	31-05-2007

US 2005095604	A1	05-05-2005	US 2005095604 A1	05-05-2005
			WO 2005044196 A2	19-05-2005

US 2003190740	A1	09-10-2003	AU 2003261305 A1	16-02-2004
			CA 2493306 A1	05-02-2004
			EP 1537137 A2	08-06-2005
			US 2003190740 A1	09-10-2003
			US 2006099571 A1	11-05-2006
			US 2009004696 A1	01-01-2009
			US 2012059145 A1	08-03-2012
			US 2014106341 A1	17-04-2014
			WO 2004011485 A2	05-02-2004

フロントページの続き

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

(72)発明者 ダーサ・リポブセク

アメリカ合衆国02453マサチューセッツ州ウォルサム、ビーバー・ストリート100番、ブリ
ストルーマイヤーズ・スクイブ・カンパニー内

Fターム(参考) 4H045 AA10 AA20 AA30 BA10 CA40 EA20 FA72 FA74 GA26