

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6200806号
(P6200806)

(45) 発行日 平成29年9月20日 (2017. 9. 20)

(24) 登録日 平成29年9月1日 (2017. 9. 1)

(51) Int. Cl.

F I

C O 7 K	19/00	(2006. 01)	C O 7 K	19/00	Z N A
A 6 1 K	35/12	(2015. 01)	A 6 1 K	35/12	
A 6 1 K	38/00	(2006. 01)	A 6 1 K	38/00	
A 6 1 P	43/00	(2006. 01)	A 6 1 P	43/00	1 1 1
C O 7 K	14/47	(2006. 01)	C O 7 K	14/47	

請求項の数 38 (全 84 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2013-511403 (P2013-511403)
(86) (22) 出願日	平成23年5月20日 (2011. 5. 20)
(65) 公表番号	特表2013-530146 (P2013-530146A)
(43) 公表日	平成25年7月25日 (2013. 7. 25)
(86) 国際出願番号	PCT/US2011/037459
(87) 国際公開番号	W02011/146902
(87) 国際公開日	平成23年11月24日 (2011. 11. 24)
審査請求日	平成26年5月19日 (2014. 5. 19)
審判番号	不服2016-9843 (P2016-9843/J1)
審判請求日	平成28年6月30日 (2016. 6. 30)
(31) 優先権主張番号	61/347, 040
(32) 優先日	平成22年5月21日 (2010. 5. 21)
(33) 優先権主張国	米国 (US)
(31) 優先権主張番号	13/068, 808
(32) 優先日	平成23年5月20日 (2011. 5. 20)
(33) 優先権主張国	米国 (US)

(73) 特許権者	508044829
	メリマック ファーマシューティカルズ
	インコーポレーティッド
	アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ケ
	ンブリッジ ワン ケンドル スクエア
	スイート ビー7201
(74) 代理人	100081422
	弁理士 田中 光雄
(74) 代理人	100084146
	弁理士 山崎 宏
(74) 代理人	100122301
	弁理士 富田 憲史
(74) 代理人	100157956
	弁理士 稲井 史生

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 二重特異的融合タンパク質

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(a) 損傷細胞の細胞外空間に露出されているホスファチジルセリンに結合特異性を有する標的化ドメイン、ここで該標的化ドメインはアネキシン、またはそれらの断片である；

(b) 組織の細胞表面に関する増殖因子受容体に結合特異性を有する活性化ドメインであって、該活性化ドメインが該増殖因子受容体にさらされると、組織の再生または生存を調節するように該活性化ドメインが該増殖因子受容体に結合する；および

(c) 二重特異的融合タンパク質の半減期を調節する、半減期モジュレータ：を含む二重特異的融合タンパク質。

【請求項 2】

(a) 損傷細胞の細胞外空間に露出されているホスファチジルセリンに結合特異性を有する少なくとも1個の標的化ドメイン、ここで該標的化ドメインはアネキシン、またはそれらの断片を含む；

(b) 組織の細胞表面に関する少なくとも1個の増殖因子受容体に結合特異性を有する少なくとも1個の活性化ドメインであって、該活性化ドメインが該増殖因子受容体にさらされると、組織の再生または生存を促進するように該活性化ドメインが該増殖因子受容体に結合する；および

(c) 二重特異的融合タンパク質の半減期を調節する、半減期モジュレータ：を含む融合タンパク質。

10

20

【請求項 3】

標的化ドメインが生物活性を有さない、請求項 1 または 2 に記載の融合タンパク質。

【請求項 4】

標的化ドメインおよび活性化ドメインが、同じ細胞の異なる分子と結合する、請求項 1 または 2 に記載の融合タンパク質。

【請求項 5】

標的化ドメインおよび活性化ドメインが、異なる細胞の異なる分子と結合する、請求項 1 または 2 に記載の融合タンパク質。

【請求項 6】

活性化ドメインが、線維芽細胞増殖因子、ニューレグリン / ヘレグリン、インスリン様成長因子、肝細胞増殖因子、血管内皮増殖因子、間質細胞由来因子、血小板由来増殖因子、テラトカルシノーマ由来増殖因子、マスト細胞 / 幹細胞増殖因子、高親和性神経成長因子、BDNF / N - 3 増殖因子、NT - 3 増殖因子、骨形態形成タンパク質、それらの変異体、それらのアイソフォーム、それらの断片およびそれらの組合せからなる群から選択される、請求項 1 または 2 に記載の融合タンパク質。

10

【請求項 7】

標的化ドメインが、 10^{-6} M から 10^{-12} M の範囲の解離定数 K_d で、標的分子と結合する、請求項 1 または 2 に記載の融合タンパク質。

【請求項 8】

標的化ドメインが融合タンパク質のアミノ末端にあり、活性化ドメインが融合タンパク質のカルボキシ末端にある、請求項 1 または 2 に記載の融合タンパク質。

20

【請求項 9】

標的化ドメインが活性化ドメインのアミノ末端にある、請求項 1 または 2 に記載の融合タンパク質。

【請求項 10】

標的化ドメインが活性化ドメインのカルボキシ末端にある、請求項 1 または 2 に記載の融合タンパク質。

【請求項 11】

標的化ドメインが融合タンパク質のカルボキシ末端にあり、活性化ドメインが融合タンパク質のアミノ末端にある、請求項 1 または 2 に記載の融合タンパク質。

30

【請求項 12】

半減期モジュレータが非免疫原性のタンパク質である、請求項 1 または 2 に記載の融合タンパク質。

【請求項 13】

半減期モジュレータがヒト血清アルブミン、アルファ - フェトプロテイン、ビタミン D 結合タンパク質、トランスサイレチン、単一鎖の抗体 Fc ドメイン、プロリン - 、アラニン - 、および / または、セリン - 豊富な配列、アルブミン結合ドメイン抗体、それらの変異体、それらの断片、およびそれらの組合せのうちの一からの配列を含む、請求項 1 2 に記載の融合タンパク質。

【請求項 14】

半減期モジュレータが血清アルブミンアミノ酸配列と少なくとも 90 % 同一である少なくとも 100 個の連続したアミノ酸を含む、請求項 1 3 に記載の融合タンパク質。

40

【請求項 15】

半減期モジュレータが配列番号 10、12、14 ~ 29、45 ~ 49、65 ~ 71 または 105 のいずれか一つに記載されるアミノ酸配列を有する、請求項 1 3 に記載の融合タンパク質。

【請求項 16】

アネキシンがアネキシン V であり、配列番号 31、81、82 または 83 のいずれか一つに記載される配列を有する、請求項 1 または 2 に記載の融合タンパク質。

【請求項 17】

50

半減期モジュレータを融合タンパク質に結びつけるコネクタをさらに含む、請求項 1 または 2 に記載の融合タンパク質。

【請求項 18】

in vivo で 2 時間から 24 時間の間の半減期を示す、請求項 1 または 2 に記載の融合タンパク質。

【請求項 19】

in vivo で 24 時間より長い時間の半減期を示す、請求項 1 または 2 に記載の融合タンパク質。

【請求項 20】

in vivo で 1 週間より長い期間の半減期を示す、請求項 1 または 2 に記載の融合タンパク質。 10

【請求項 21】

融合タンパク質が、細胞動員、アポトーシスの抑制、および/または、細胞増殖の誘導を促進する、請求項 1 または 2 に記載の融合タンパク質。

【請求項 22】

融合タンパク質が、細胞の損傷を防ぎ、細胞の成長を促進し、幹細胞の運動性を促進し、幹細胞の分化を促進する、請求項 1 または 2 に記載の融合タンパク質。

【請求項 23】

組織が、心臓組織または腎組織、骨、軟骨、間接、皮膚、肝組織、膵臓組織、血球、肺組織、または神経組織である、請求項 1 または 2 に記載の融合タンパク質。 20

【請求項 24】

さらにリーダーポリペプチドを含む、請求項 1 または 2 に記載の融合タンパク質。

【請求項 25】

リーダーポリペプチドが、配列番号 41 ~ 42、87 ~ 91 または 244 に記載される配列を含む、請求項 24 に記載の融合タンパク質。

【請求項 26】

ポリヒスチジン含有ポリペプチドをさらに含む、請求項 1 または 2 に記載の融合タンパク質。

【請求項 27】

標的化ドメインが配列番号 31、81 ~ 83 のいずれか一つに記載される配列を含む、請求項 1 または 2 に記載の融合タンパク質。 30

【請求項 28】

活性化ドメインが配列番号 3 ~ 9、32 ~ 40、50 ~ 56、または 60 ~ 64 のいずれか一つに記載される配列を含む、請求項 1 または 2 に記載の融合タンパク質。

【請求項 29】

ポリヒスチジン含有ポリペプチドが、配列番号 43 ~ 44、または 92 ~ 94 のいずれか一つに記載される配列を有する、請求項 26 に記載の融合タンパク質。

【請求項 30】

活性化ドメインが *NRG1 beta*、*IGF1*、*SDF-1*、*IL-33*、それらの変異体、それらのアイソフォーム、それらの断片およびそれらの組み合わせからなる群から選択される、請求項 6 に記載の融合タンパク質。 40

【請求項 31】

医薬上好適な担体および治療上有効量の請求項 1 ~ 30 のいずれか 1 項に記載の融合タンパク質を含む、医薬組成物。

【請求項 32】

組織再生を調節するように、対象の組織損傷を治療するための、請求項 31 に記載の医薬組成物。

【請求項 33】

(i) 組織の損傷細胞の細胞外空間に露出されているホスファチジルセリンに結合特異性を有する、アネキシンまたはその断片である標的化ドメイン；および (ii) 増殖因子 50

受容体に結合特異性を有する活性化ドメイン、を含み、それによって標的化ドメインがホスファチジルセリンに特異的に結合し、その結果組織の第一の細胞に二重特異的融合タンパク質を標的化し、かつ、それによって活性化ドメインが増殖因子受容体にさらされると、組織の再生を促進するように活性化ドメインが第二の細胞の増殖因子受容体を活性化する、

組織再生または生存を促進するための二重特異的融合タンパク質。

【請求項 3 4】

(i) 組織の損傷細胞の細胞外空間に露出されているホスファチジルセリンに結合特異性を有する、アネキシンまたはその断片である標的化ドメイン； (i i) 増殖因子受容体に結合特異性を有する活性化ドメイン； (i i i) 二重特異的融合タンパク質の半減期を調節する、半減期モジュレータを含み、それによって標的化ドメインがホスファチジルセリンに特異的に結合し、その結果組織の第一の細胞に二重特異的融合タンパク質を標的化し、かつ、それによって活性化ドメインが増殖因子受容体にさらされると、組織の再生を促進するように活性化ドメインが第二の細胞の増殖因子受容体を特異的に活性化する、組織再生または生存を促進するための二重特異的融合タンパク質。

10

【請求項 3 5】

標的化ドメインおよび活性化ドメインが異なる細胞に関する分子に結合する、請求項 3 または 3 4 に記載の二重特異的融合タンパク質。

【請求項 3 6】

幹細胞をさらに含む、請求項 3 1 に記載の医薬組成物。

20

【請求項 3 7】

請求項 1 ~ 3 0 のいずれか 1 項に記載の融合タンパク質をコードする核酸分子。

【請求項 3 8】

アネキシンが、ホスファチジルセリン結合親和性を維持している間、アネキシンの内在化を減少させるように改質される、請求項 1 または 2 に記載の融合タンパク質。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【 0 0 0 1 】

関連出願

本願は、2010年5月21日に出願された米国仮特許出願第61/347,040；2011年5月20日に出願された米国特許出願第13/112,907および2011年5月20日に出願された、代理人整理番号132463-010104の、「二重特異的タンパク質」と題する米国特許出願の優先権を主張し、これらは出典明示によりその全体を本明細書に組み入れる。

30

【 0 0 0 2 】

技術分野

本発明は、一般に治療用途を有する融合タンパク質に関し、より具体的には二重特異的融合タンパク質、そのような融合タンパク質を含む医薬組成物、および損傷組織を修復するためのそのような融合タンパク質の使用方法に関する。

【背景技術】

40

【 0 0 0 3 】

背景技術

組織再生は、目標が罹患したまたは損傷した組織の生物学的機能を回復することにある、総合的な科学である。組織再生は心筋梗塞などの主要な臨床上の問題に対処する。冠動脈狭窄が心臓の一部への血液供給を断ち切ると、心臓発作として一般的に知られる、心筋梗塞が起こる。結果としての酸素不足は、心臓が内因性の再生プログラムおよび自己修復を十分に活性化できないことにより、不可逆の組織損傷（壊死およびアポトーシス）を引き起こす。そのような組織の損傷はうっ血性心不全、心臓がもはや血液を効率的に輸送することができない状態、の主な原因である。米国では、毎年100万件より多い心臓発作があり、そして、およそ500万人はうっ血性心不全に苦しめられている。

50

【 0 0 0 4 】

損傷した心臓組織の再生のための効果的な治療方法は全くない。うっ血性心不全のための現在の療法は、不整脈、動脈硬化の進行、および再発性心筋梗塞を予防することに向けられ、根本的な組織損傷に対処するものではない。うっ血性心不全と診断された患者の半数以上は、診断から5年以内に死亡する。

【 0 0 0 5 】

幹細胞治療は心臓の修復のための潜在的な新しい戦略である。実験室レベルでは、幹細胞から心筋細胞を生成することが可能である。このことは、幹細胞が患者の心臓組織などの損傷組織を修復できることを示唆するが、このようなアプローチに基づくいかなる治療法も現在利用可能ではない。幹細胞治療で直面する1つの困難は、臨床的に有意な修復をもたらすことができる程度の、損傷組織への十分な数の幹細胞の標的化である。

10

【 0 0 0 6 】

その結果、当分野において、損傷組織の修復または再生のための方法、または組織修復を促進するための幹細胞などの細胞の標的化を改良するための方法の必要性がある。本発明はこの必要性を満たし、さらに他の関連する利点を提供する。

【 発明の概要 】

【 課題を解決するための手段 】

【 0 0 0 7 】

発明の概要

本発明は、二重特異的融合タンパク質、二重特異的融合タンパク質をコードする核酸分子およびそのような二重特異的融合タンパク質を用いる治療方法を提供する。ある実施態様において、本発明は：(a)組織の損傷細胞に関する標的分子に結合特異性を有する標的化ドメインであって、該分子は生存細胞の細胞内にあり、損傷細胞の細胞外空間に露出されている；(b)組織の細胞表面に関する増殖因子受容体に結合特異性を有する活性化ドメインであって、該活性化ドメインが増殖因子受容体にさらされると、組織の再生または生存を調節するように活性化ドメインが増殖因子受容体に結合する、を含む二重特異的融合タンパク質を提供する。いくつかの実施形態において、二重特異的融合タンパク質はさらにペプチド半減期モジュレータを含む。

20

【 0 0 0 8 】

本発明のある実施態様において、二重特異的融合タンパク質は、(a)組織の損傷細胞に関する標的分子に結合特異性を有する標的化ドメインであって、該分子は生存細胞の細胞内にあり、損傷細胞の細胞外空間に露出されている；(b)組織の細胞表面に関する分子に結合特異性を有する活性化ドメインであって、該活性化ドメインが表面関連分子(s u r f a c e - a s s o c i a t e d m o l e c u l e)にさらされると、組織の再生または生存を調節するように活性化ドメインが表面関連分子に結合する；および(c)二重特異的融合タンパク質の半減期を調節する、半減期モジュレータ、を含む。

30

【 0 0 0 9 】

本発明の他の実施態様において、二重特異的融合タンパク質は、(a)組織に関する標的分子に結合特異性を有する標的化ドメイン；(b)組織の細胞表面に関する分子に結合特異性を有する活性化ドメインであって、該活性化ドメインが該分子にさらされると、組織の再生または生存を調節するように該活性化ドメインが該分子に結合する；および(c)二重特異的融合タンパク質の半減期を調節する、半減期モジュレータ、を含む。

40

【 0 0 1 0 】

本発明の他の実施態様において、二重特異的融合タンパク質は、(a)組織に関する標的分子に結合特異性を有する標的化ドメイン；(b)組織の細胞表面に関する分子に結合特異性を有する結合ドメインであって、該結合ドメインが該分子にさらされると、組織の再生または生存を調節するように該結合ドメインが該分子に結合する；および(c)二重特異的融合タンパク質の半減期を調節する、半減期モジュレータ、を含む。

【 0 0 1 1 】

本発明のさらに他の実施態様において、二重特異的融合タンパク質は、(a)組織に関

50

する少なくとも1個の標的分子に結合特異性を有する少なくとも1個の標的化ドメイン；
 (b) 組織の細胞表面に関する少なくとも1個の分子に結合特異性を有する少なくとも1
 個の活性化ドメインであって、該活性化ドメインが該分子にさらされると、組織の再生ま
 たは生存を調節するように該活性化ドメインが該分子に結合する；および(c) 二重特異
 的融合タンパク質の半減期を調節する、半減期モジュレータ、を含む。

【0012】

いくつかの実施形態において、活性化ドメインまたは結合ドメインは増殖因子受容体、
 サイトカイン受容体または幹細胞関連抗原に特異的に結合する。いくつかの実施形態にお
 いて、標的化ドメインは生物活性を有さない。標的化ドメインおよび活性化ドメインは、
 同じ細胞の異なる分子と結合でき、また異なる細胞の異なる分子に結合できる。

10

【0013】

いくつかの実施形態において、活性化ドメインは、線維芽細胞増殖因子(FGF)、上
 皮成長因子(EGF)、ニューレグリン/ヘレグリン(NRG/HRG)、インスリン様
 成長因子(IGF)、肝細胞増殖因子(HGF)、チモシン、顆粒球コロニー刺激因子(
 G-CSF)、幹細胞因子(SCF)/マスト細胞増殖因子(MGF)、ペリオスチン、
 血管内皮増殖因子(VEGF)、間質細胞由来因子(SDF)、血小板由来増殖因子(P
 DGF)、テラトカルシノーマ由来増殖因子(TDGF)、ベータ-神経成長因子(NG
 F)、脳由来神経栄養因子(BDNF)、ニューロトロフィン-3(NT-3)、トロン
 ボポエチン(TPO)、骨形態形成タンパク質(BMP)、アクチビンA、ベータセルリ
 ン、ベータ-カテニン、dic k k o p fホモログ1(DKK1)、エリスロポエチン(
 EPO)、成長ホルモン(GH)、ヘパリン結合性EGF様増殖因子(HBEGF)、イン
 スリン、インターロイキン(IL)、白血病抑制因子(LIF)、単球走化性タンパク
 質1(MCP1/CCL2)、プレイオトロフィン(PTN)、形質転換増殖因子(TG
 F)、腫瘍壊死因子(TNF)、Wnt、活性化受容体に特異性を有する抗体、それら
 の変異体、それらのアイソフォーム、それらの断片およびそれらの組合せからなる群から選
 択される。いくつかの実施形態において、活性化ドメインは配列番号3-9、32-40
 または50-64のいずれか一つに記載される配列を含む。

20

【0014】

標的化ドメインおよび活性化ドメインは、融合タンパク質のアミノ末端、カルボキシ末
 端にあることができる。いくつかの実施形態において、標的化ドメインは融合タンパク質
 のアミノ末端にあり、活性化ドメインは融合タンパク質のカルボキシ末端にある。いくつ
 かの実施形態において、標的化ドメインはカルボキシ末端にあり、活性化ドメインは融合
 タンパク質のアミノ末端にある。

30

【0015】

いくつかの実施例において、半減期モジュレータは非免疫原性のタンパク質である。半
 減期モジュレータはヒト血清アルブミン、ヒト血清アルブミンのドメインIII、アルファ
 -フェトプロテイン、ビタミンD結合タンパク質、トランスサイレチン抗体Fcドメイ
 ン、抗体Fcドメインの単鎖版、プロリン-、アラニン-、および/または、セリン-
 豊富な配列、それらの変異体、それらの断片、およびそれらの組合せのうちの一からの配
 列を含むことができる。例えば、半減期モジュレータは血清アルブミンアミノ酸配列と少
 なくとも80%同一である少なくとも100個の連続したアミノ酸を含む。いくつかの実
 施形態において、半減期モジュレータは配列番号10、12、14-29、45-49、
 65-71または105のいずれか一つに記載されるアミノ酸配列を有する。

40

【0016】

いくつかの実施形態において、標的化ドメインはミオシン、心臓ミオシン、DNA、ホ
 スファチジルセリン、P-セレクチン、ICAM-1、c-Met(HGF受容体)、そ
 れらの変異体、それらの断片、およびそれらの組合せからなる群から選択される標的分子
 と結合する。いくつかの実施形態において、標的化ドメインは、 10^{-6} Mから 10^{-1}
 2 Mの範囲の解離定数Kdで、標的分子と結合する。標的化ドメインはアネキシン、シナ
 プトタグミン、抗ホスファチジルセリン抗体、PS4A7、ラクトアドヘリン、抗ミオシ

50

ン抗体、抗DNA抗体、aDNASI1、aDNASI22、それらの変異体、それらの断片、およびそれらの組合せからなる群より選択できる。いくつかの実施形態において、標的化ドメインは配列番号1-2、30-31、72-73、76-83または85-86のいずれか一つに記載される配列を有する。いくつかの実施形態において、抗体は配列番号1、2、30、73、76-80のいずれか一つに記載される配列を有するscFv抗体である。いくつかの実施形態において、アネキシンはアネキシンVであり、配列番号31、81、82または83のいずれか一つに記載される配列を有する。いくつかの実施形態において、標的化ドメインは配列番号1、2、30、31または72-86のいずれか一つに記載される配列を含む。

【0017】

10

いくつかの実施形態において、二重特異的融合タンパク質は半減期モジュレータを融合タンパク質に結びつけるコネクタをさらに含む。二重特異的融合タンパク質は、*in vivo*で2時間から6時間の間、6時間から24時間の間、24時間より長い時間、または1週間より長い期間の半減期を示すことができる。

【0018】

いくつかの実施形態において、融合タンパク質は、細胞動員、細胞増殖のアポトーシス、および/または、誘導の抑制を促進する。いくつかの実施形態において、融合タンパク質は、細胞の損傷を防ぎ、細胞の成長を促進し、幹細胞の運動性を促進し、かつ/または、幹細胞の分化を促進する。いくつかの実施形態において、融合タンパク質は組織再生を促進する。組織は、心臓組織、腎組織、骨、軟骨、間接、皮膚、肝組織、膵臓組織、血球、肺組織、または神経系であり得る。

20

【0019】

いくつかの実施形態において、融合タンパク質はさらにリーダーポリペプチド(*leader polypeptide*)を含む。リーダーポリペプチドは、配列番号41、42、87-91または244のいずれか一つに記載される配列を含むことができる。

【0020】

いくつかの実施形態において、融合タンパク質はポリペプチドアフィニティータグを含む。いくつかの実施形態において、アフィニティータグは融合タンパク質のアミノ末端、融合タンパク質のカルボキシ末端、または融合タンパク質の中間にある。いくつかの実施形態において、融合タンパク質はヘキサヒスチジン含有ポリペプチドを含む。ヘキサヒスチジン含有ポリペプチドは、配列番号43、44、または92-94のいずれか一つに記載される配列を有することができる。

30

【0021】

本明細書において提供される二重特異的結合剤は、必ずしも2個の結合特異性に制限されるというわけではない。ある実施形態において、標的化ドメインに加えて、二重特異的融合タンパク質は、ペプチド結合を経て直接または間接的に結び付けられる2個以上の活性化ドメインを含む。ある実施形態において、活性化ドメインに加えて、二重特異的融合タンパク質はペプチド結合を経て直接または間接的に結び付けられる2個以上の標的化ドメインを含む。

【0022】

40

他の実施態様において、本発明は、上記の二重特異的融合タンパクを生理学的に許容される担体との組合せで含む、医薬組成物を提供する。

【0023】

さらに他の実施態様の中で、病理的な組織障害に苦しむ患者に医薬組成物を投与して、その結果患者の病理的な組織障害を低下させることを含む、患者の病理的な組織障害を治療するための方法が提供される。

【0024】

本発明の態様は対象の組織再生または生存を促進する方法に関し、その方法は、(a)(i)組織の損傷細胞に関する標的分子に結合特異性を有する標的化ドメインであって、該分子は生存細胞の細胞内にあり、損傷細胞の細胞外空間に露出されている；および(i

50

i) 増殖因子受容体に結合特異性を有する活性化ドメイン、を含む二重特異的融合タンパク質を提供すること；および (b) それを必要とする患者に治療上有効な量の二重特異的融合タンパク質を投与し、それによって標的化ドメインが組織の損傷細胞に関する標的分子に特異的に結合し、その結果組織の第一の細胞に二重特異的融合タンパク質を標的化し、かつ、それによって活性化ドメインが増殖因子受容体にさらされると、組織の再生を促進するように活性化ドメインが第二の細胞の増殖因子受容体を活性化すること、を含む。

【0025】

いくつかの実施形態において、対象の組織再生または生存を促進する方法は、(a) (i) 標的分子に結合特異性を有する標的化ドメイン；(ii) 受容体に結合特異性を有する活性化ドメイン；(iii) 二重特異的融合タンパク質の半減期を調節する、半減期モジュレータを含む二重特異的融合タンパク質を提供すること；および (b) それを必要とする患者に治療上有効な量の二重特異的融合タンパク質を投与し、それによって標的化ドメインが標的分子に特異的に結合し、その結果組織の第一の細胞に二重特異的融合タンパク質を標的化し、かつ、それによって活性化ドメインが増殖因子受容体にさらされると、組織の再生を促進するように活性化ドメインが第二の細胞の受容体を特異的に活性化すること、を含む。

10

【0026】

いくつかの実施形態において、第一および第二の細胞は同じである。また他の実施形態において、第一および第二の細胞は異なる。いくつかの実施形態において、第一の細胞は生存細胞であり、第二の細胞は損傷細胞である。また他の実施形態において、第一の細胞は損傷細胞であり、第二の細胞は生存細胞である。いくつかの実施形態において、方法は患者に幹細胞を投与することをさらに含む。

20

【0027】

ある実施形態において、病理的な組織損害は心筋梗塞に関する心臓組織の損傷である。他の実施形態において、病理的な組織損害は腎臓組織の損傷である。他の実施形態において、病理組織損害は骨、軟骨、関節、皮膚、肝組織、膵臓組織、血球、肺組織、または神経系におけるものである。ある実施形態において、そのような方法は患者に幹細胞を投与することをさらに含む。

【0028】

上記で説明されるように、二重特異的融合タンパク質をコードする核酸分子も本明細書において提供される。ある実施形態において、核酸分子はDNAであり、かつ、DNAはさらに二重特異的融合タンパク質コード配列に任意に結び付けられ、コーディング配列の転写および翻訳が少なくとも1個の真核細胞型で現れるような、転写および翻訳調節塩基配列を含む。

30

【0029】

本発明のこれらのおよび他の実施態様は、以下の詳細な記載を参照することにより明らかになるであろう。

【0030】

配列表の記載

配列番号1は、抗DNAscFv SI-1のアミノ酸配列である。

40

【0031】

配列番号2は、抗DNAscFv SI-22のアミノ酸配列である。

【0032】

配列番号3は、野生型ヒトIGF-I(成熟形態)に対応する増殖因子ポリペプチドのアミノ酸配列である。

【0033】

配列番号4は、D12A置換を有するヒトIGF-1に対応する増殖因子ポリペプチドのアミノ酸配列である。

【0034】

配列番号5は、E9A置換を有するヒトIGF-1に対応する増殖因子ポリペプチドの

50

アミノ酸配列である。

【 0 0 3 5 】

配列番号 6 は、ヒト H G F アルファ鎖 N - K 1 ドメインに対応する増殖因子ポリペプチドのアミノ酸配列である。

【 0 0 3 6 】

配列番号 7 は、ヒト H G F アルファ鎖 K 1 ドメインに対応する増殖因子ポリペプチドのアミノ酸配列である。

【 0 0 3 7 】

配列番号 8 は、ヒト H G F アルファ鎖 N - K 2 融合に対応する増殖因子ポリペプチドのアミノ酸配列である。

10

【 0 0 3 8 】

配列番号 9 は、ヒト H G F アルファ鎖 K 2 ドメインに対応する増殖因子ポリペプチドのアミノ酸配列である。

【 0 0 3 9 】

配列番号 10 は、C 3 4 S および N 5 0 3 Q 置換を有するヒト血清アルブミン (H S A) リンカーのアミノ酸配列である。

【 0 0 4 0 】

配列番号 11 は、C 3 4 S および N 5 0 3 Q 置換を有する H S A リンカーの核酸配列である。

【 0 0 4 1 】

20

配列番号 12 は、H S A のアミノ酸配列である。

【 0 0 4 2 】

配列番号 13 は、H S A の核酸配列である。

【 0 0 4 3 】

配列番号 14 は、C 3 4 S および N 5 0 3 Q 置換およびポリペプチドコネクタを有する H S A リンカーのアミノ酸配列である。

【 0 0 4 4 】

配列番号 15 は、C 3 4 S および N 5 0 3 Q 置換およびポリペプチドコネクタを有する H S A リンカーのアミノ酸配列である。

【 0 0 4 5 】

30

配列番号 16 は、C 3 4 S および N 5 0 3 Q 置換およびポリペプチドコネクタを有する H S A リンカーのアミノ酸配列である。

【 0 0 4 6 】

配列番号 17 は、C 3 4 S および N 5 0 3 Q 置換およびポリペプチドコネクタを有する H S A リンカーのアミノ酸配列である。

【 0 0 4 7 】

配列番号 18 は、C 3 4 S および N 5 0 3 Q 置換およびポリペプチドコネクタを有する H S A リンカーのアミノ酸配列である。

【 0 0 4 8 】

配列番号 19 は、ポリペプチドコネクタを有する H S A リンカーのアミノ酸配列である。

40

【 0 0 4 9 】

配列番号 20 は、ポリペプチドコネクタを有する H S A リンカーのアミノ酸配列である。

【 0 0 5 0 】

配列番号 21 は、ポリペプチドコネクタを有する H S A リンカーのアミノ酸配列である。

【 0 0 5 1 】

配列番号 22 は、ポリペプチドコネクタを有する H S A リンカーのアミノ酸配列である。

50

【 0 0 5 2 】

配列番号 2 3 は、ポリペプチドコネクタを有する H S A リンカーのアミノ酸配列である。

【 0 0 5 3 】

配列番号 2 4 は、C 3 4 S 置換を有する H S A リンカー、ドメイン I のアミノ酸配列である。

【 0 0 5 4 】

配列番号 2 5 は、H S A リンカー、ドメイン I I のアミノ酸配列である。

【 0 0 5 5 】

配列番号 2 6 は、N 5 0 3 Q 置換を有する H S A リンカー、ドメイン I I I のアミノ酸配列である。 10

【 0 0 5 6 】

配列番号 2 7 は、H S A リンカー、ドメイン I のアミノ酸配列である。

【 0 0 5 7 】

配列番号 2 8 は、H S A リンカー、ドメイン I I I のアミノ酸配列である。

【 0 0 5 8 】

配列番号 2 9 は、ヒトアルファ - フェトプロテインのアミノ酸配列である。

【 0 0 5 9 】

配列番号 3 0 は、抗ホスファチジルセリン s c F v P S 4 A 7 のアミノ酸配列である。 20

【 0 0 6 0 】

配列番号 3 1 は、ヒトアネキシン V (A n x V) のアミノ酸配列である。

【 0 0 6 1 】

配列番号 3 2 は、ヒト H G F アルファ鎖 N - K 1 ドメインに対応する増殖因子ポリペプチドのアミノ酸配列である。

【 0 0 6 2 】

配列番号 3 3 は、ヒト H G F アルファ鎖 K 1 ドメインに対応する増殖因子ポリペプチドのアミノ酸配列である。

【 0 0 6 3 】

配列番号 3 4 は、ヒト H G F アルファ鎖 N - K 2 ドメインに対応する増殖因子ポリペプチドのアミノ酸配列である。 30

【 0 0 6 4 】

配列番号 3 5 は、ヒト H G F アルファ鎖 K 2 ドメインに対応する増殖因子ポリペプチドのアミノ酸配列である。

【 0 0 6 5 】

配列番号 3 6 は、ヒト V E G F アルファ単量体に対応する増殖因子ポリペプチドのアミノ酸配列である。

【 0 0 6 6 】

配列番号 3 7 は、ヒト V E G F アルファ二量体に対応する増殖因子ポリペプチドのアミノ酸配列である。 40

【 0 0 6 7 】

配列番号 3 8 は、ヒト F G F 2 に対応する増殖因子ポリペプチドのアミノ酸配列である。

【 0 0 6 8 】

配列番号 3 9 は、ヒト N R G 1 アルファ、E G F 様ドメインに対応する増殖因子ポリペプチドのアミノ酸配列である。

【 0 0 6 9 】

配列番号 4 0 は、ヒト N R G 1 アルファ、全配列に対応する増殖因子ポリペプチドのアミノ酸配列である。

【 0 0 7 0 】

配列番号 4 1 は、二重特異的融合タンパク質リーダーポリペプチドのアミノ酸配列である。

【 0 0 7 1 】

配列番号 4 2 は、二重特異的融合タンパク質リーダーポリペプチドのアミノ酸配列である。

【 0 0 7 2 】

配列番号 4 3 は、C - 末端ヘキサヒスチジン含有ポリペプチドのアミノ酸配列である。

【 0 0 7 3 】

配列番号 4 4 は、C - 末端ヘキサヒスチジン含有ポリペプチドのアミノ酸配列である。

【 0 0 7 4 】

配列番号 4 5 は、H S A リンカーのアミノ酸配列である。

【 0 0 7 5 】

配列番号 4 6 は、N 末端および C 末端の短いコネクタポリペプチドを有する H S A リンカーのアミノ酸配列である。

【 0 0 7 6 】

配列番号 4 7 は、N 末端および C 末端の短いコネクタポリペプチドを有する H S A リンカーのアミノ酸配列である。

【 0 0 7 7 】

配列番号 4 8 は、N 末端および C 末端の短いコネクタポリペプチドを有する H S A リンカーのアミノ酸配列である。

【 0 0 7 8 】

配列番号 4 9 は、N 末端および C 末端の短いコネクタポリペプチドを有する H S A リンカーのアミノ酸配列である。

【 0 0 7 9 】

配列番号 5 0 は、ヒト F G F 2 に対応する増殖因子ポリペプチドの変異体のアミノ酸配列である。

【 0 0 8 0 】

配列番号 5 1 は、ヒト H G F アルファ鎖に対応する増殖因子ポリペプチドのアミノ酸配列である。

【 0 0 8 1 】

配列番号 5 2 は、ヒト H G F アルファ鎖 K 1 ドメインに対応する増殖因子ポリペプチドのアミノ酸配列である。

【 0 0 8 2 】

配列番号 5 3 は、ヒト H G F アルファ鎖 N - K 2 ドメインに対応する増殖因子ポリペプチドのアミノ酸配列である。

【 0 0 8 3 】

配列番号 5 4 は、ヒト H G F アルファ鎖 K 2 ドメインに対応する増殖因子ポリペプチドのアミノ酸配列である。

【 0 0 8 4 】

配列番号 5 5 は、ヒト N R G 1 ベータ細胞外ドメインに対応する増殖因子ポリペプチドのアミノ酸配列である。

【 0 0 8 5 】

配列番号 5 6 は、ヒト N R G 1 ベータ E G F 様ドメインに対応する増殖因子ポリペプチドのアミノ酸配列である。

【 0 0 8 6 】

配列番号 5 7 は、ヒト完全長ペリオスチンのアミノ酸配列である。

【 0 0 8 7 】

配列番号 5 8 は、ヒトペリオスチンの領域のアミノ酸配列である。

【 0 0 8 8 】

配列番号 5 9 は、ヒト骨形成タンパク質 - 2 に対応する増殖因子ポリペプチドのアミノ

10

20

30

40

50

酸配列である。

【 0 0 8 9 】

配列番号 6 0 は、一本鎖ヒト骨形成タンパク質 - 2 に対応する増殖因子ポリペプチドのアミノ酸配列である。

【 0 0 9 0 】

配列番号 6 1 は、血管内皮増殖因子 B に対応する増殖因子ポリペプチドのアミノ酸配列である。

【 0 0 9 1 】

配列番号 6 2 は、ヒト血管内皮増殖因子 B の一部のアミノ酸配列である。

【 0 0 9 2 】

配列番号 6 3 は、ヒト血管内皮増殖因子 B の一部のアミノ酸配列である。

【 0 0 9 3 】

配列番号 6 4 は、ヒト血管内皮増殖因子 B の一部のアミノ酸配列である。

【 0 0 9 4 】

配列番号 6 5 は、ヒト血清アルブミン (H S A) のドメイン I I I のアミノ酸配列である。

【 0 0 9 5 】

配列番号 6 6 は、改質 (m o d i f i e d) ビタミン D 結合タンパク質 (m V D B P) のアミノ酸配列である。

【 0 0 9 6 】

配列番号 6 7 は、改質ヒト血清アルブミンのドメイン I I I のアミノ酸配列である。

【 0 0 9 7 】

配列番号 6 8 は、ヒト A F P のアミノ酸配列である。

【 0 0 9 8 】

配列番号 6 9 は、改質 A F P のアミノ酸配列である。

【 0 0 9 9 】

配列番号 7 0 は、アルブミン結合ドメインヒト抗体 (a l b u d A b) のアミノ酸配列である。

【 0 1 0 0 】

配列番号 7 1 は、s c F c と名づけられた、単量体の異型 F c のアミノ酸配列である。

【 0 1 0 1 】

配列番号 7 2 は、シナプトタグミン I のアミノ酸配列である。

【 0 1 0 2 】

配列番号 7 3 は、抗 D N A s c F v 抗体のアミノ酸配列である。

【 0 1 0 3 】

配列番号 7 4 は、非結合性シナプトタグミン I 変異体のアミノ酸配列である。

【 0 1 0 4 】

配列番号 7 5 は、非結合性 s c F v 変異体 (D A s c F v) のアミノ酸配列である。

【 0 1 0 5 】

配列番号 7 6 は、B 7 s c F v 抗ミオシン s c F v 抗体のアミノ酸配列である。

【 0 1 0 6 】

配列番号 7 7 は、F D 2 抗ミオシン s c F v 抗体のアミノ酸配列である。

【 0 1 0 7 】

配列番号 7 8 は、M C A 1 抗ミオシン s c F v 抗体のアミノ酸配列である。

【 0 1 0 8 】

配列番号 7 9 は、M C B 1 1 抗ミオシン s c F v 抗体のアミノ酸配列である。

【 0 1 0 9 】

配列番号 8 0 は、S 3 F 5 抗ミオシン s c F v 抗体のアミノ酸配列である。

【 0 1 1 0 】

配列番号 8 1 は、ヒトアネキシン V の変異体 (A n x V m C 3 1 7 S) のアミノ酸配列

10

20

30

40

50

である。

【 0 1 1 1 】

配列番号 8 2 は、ヒトアネキシン V の変異体 (A n x V m 3) のアミノ酸配列である。

【 0 1 1 2 】

配列番号 8 3 は、ヒトアネキシン V の変異体 (A n x V m 2 3) のアミノ酸配列である。

【 0 1 1 3 】

配列番号 8 4 は、ヒトアネキシン V の非結合性変異体 (A n x V m 1 2 3 4) のアミノ酸配列である。

【 0 1 1 4 】

配列番号 8 5 は、ラクトアドヘリンの変異体のアミノ酸配列である。

【 0 1 1 5 】

配列番号 8 6 は、ラクトアドヘリンの変異体のアミノ酸配列である。

【 0 1 1 6 】

配列番号 8 7 は、アルファ接合因子のアミノ酸配列である。

【 0 1 1 7 】

配列番号 8 8 は、a p p 8 リーダーポリペプチドのアミノ酸配列である。

【 0 1 1 8 】

配列番号 8 9 は、a g a 2 シグナルペプチドのアミノ酸配列である。

【 0 1 1 9 】

配列番号 9 0 は、S U C 2 シグナルペプチドのアミノ酸配列である。

【 0 1 2 0 】

配列番号 9 1 は、合成シグナルペプチドのアミノ酸配列である。

【 0 1 2 1 】

配列番号 9 2 は、ヘキサヒスチジンタグのアミノ酸配列である。

【 0 1 2 2 】

配列番号 9 3 は、ヘキサヒスチジンタグのアミノ酸配列である。

【 0 1 2 3 】

配列番号 9 4 は、ヘキサヒスチジンタグのアミノ酸配列である。

【 0 1 2 4 】

配列番号 9 5 から 1 0 4、および配列番号 1 8 2 から 1 8 4 は、ポリペプチドリンカーのアミノ酸配列に対応する。

【 0 1 2 5 】

配列番号 1 0 5 は、プロリン -、アラニン - および / またはセリン - 豊富な配列のアミノ酸配列である。

【 0 1 2 6 】

配列番号 1 0 6 は、a D N A S I 1 __ m H S A __ I G F 1 融合タンパク質のアミノ酸配列である。配列番号 1 0 7 は、a D N A S I 1 __ m H S A __ I G F 1 融合タンパク質の核酸配列である。

【 0 1 2 7 】

配列番号 1 0 8 は、a P S 4 A 7 __ m H S A __ I G F 1 融合タンパク質のアミノ酸配列である。配列番号 1 0 9 は、a P S 4 A 7 __ m H S A __ I G F 1 融合タンパク質の核酸配列である。

【 0 1 2 8 】

配列番号 1 1 0 は、a D N A S I 1 __ m H S A __ H G F (N K 1) 融合タンパク質のアミノ酸配列である。配列番号 1 1 1 は、a D N A S I 1 __ m H S A __ H G F (N K 1) 融合タンパク質の核酸配列である。

【 0 1 2 9 】

配列番号 1 1 2 は、a P S 4 A 7 __ m H S A __ H G F (N K 1) 融合タンパク質のアミノ酸配列である。配列番号 1 1 3 は、a P S 4 A 7 __ m H S A __ H G F (N K 1) 融合タ

10

20

30

40

50

ンパク質の核酸配列である。

【 0 1 3 0 】

配列番号 1 1 4 は、 $A n \times V m 1 2 3 4 _m H S A _I G F 1$ 融合タンパク質のアミノ酸配列である。配列番号 1 1 5 は、 $A n \times V m 1 2 3 4 _m H S A _I G F 1$ 融合タンパク質の核酸配列である。

【 0 1 3 1 】

配列番号 1 1 6 は、 $A n \times V m 1 2 3 4 _m H S A _N R G 1 b (E G F)$ 融合タンパク質のアミノ酸配列である。配列番号 1 1 7 は、 $A n \times V m 1 2 3 4 _m H S A _N R G 1 b (E G F)$ 融合タンパク質の核酸配列である。

【 0 1 3 2 】

配列番号 1 1 8 は、 $A n \times V _m H S A _F G F 2$ 融合タンパク質のアミノ酸配列である。配列番号 1 1 9 は、 $A n \times V _m H S A _F G F 2$ 融合タンパク質の核酸配列である。

10

【 0 1 3 3 】

配列番号 1 2 0 は、 $A n \times V _m H S A _N R G 1 b (E G F)$ 融合タンパク質のアミノ酸配列である。配列番号 1 2 1 は、 $A n \times V _m H S A _N R G 1 b (E G F)$ 融合タンパク質の核酸配列である。

【 0 1 3 4 】

配列番号 1 2 2 は、 $F G F 2 _m H S A _A n \times V m 1 2 3 4$ 融合タンパク質のアミノ酸配列である。配列番号 1 2 3 は、 $F G F 2 _m H S A _A n \times V m 1 2 3 4$ 融合タンパク質の核酸配列である。

20

【 0 1 3 5 】

配列番号 1 2 4 は、 $a D N A S I 1 _m H S A _F G F 2$ 融合タンパク質のアミノ酸配列である。配列番号 1 2 5 は、 $a D N A S I 1 _m H S A _F G F 2$ 融合タンパク質の核酸配列である。

【 0 1 3 6 】

配列番号 1 2 6 は、 $a D N A S I 1 _m H S A _N R G 1 b (E G F)$ 融合タンパク質のアミノ酸配列である。配列番号 1 2 7 は、 $a D N A S I 1 _m H S A _N R G 1 b (E G F)$ 融合タンパク質の核酸配列である。

【 0 1 3 7 】

配列番号 1 2 8 は、 $A n \times V _m H S A _V E G F B (1 1 1)$ 融合タンパク質のアミノ酸配列である。配列番号 1 2 9 は、 $A n \times V _m H S A _V E G F B (1 1 1)$ 融合タンパク質の核酸配列である。

30

【 0 1 3 8 】

配列番号 1 3 0 は、 $A n \times V _m H S A _V E G F B (1 6 7)$ 融合タンパク質のアミノ酸配列である。配列番号 1 3 1 は、 $A n \times V _m H S A _V E G F B (1 6 7)$ 融合タンパク質の核酸配列である。

【 0 1 3 9 】

配列番号 1 3 2 は、 $A n \times V _m H S A _H G F (N K 1)$ 融合タンパク質のアミノ酸配列である。配列番号 1 3 3 は、 $A n \times V _m H S A _H G F (N K 1)$ 融合タンパク質の核酸配列である。

40

【 0 1 4 0 】

配列番号 1 3 4 は、 $A n \times V _m H S A _I G F 1$ 融合タンパク質のアミノ酸配列である。配列番号 1 3 5 は、 $A n \times V _m H S A _I G F 1$ 融合タンパク質の核酸配列である。

【 0 1 4 1 】

配列番号 1 3 6 は、 $I G F 1 _m H S A _A n \times V$ 融合タンパク質のアミノ酸配列である。配列番号 1 3 7 は、 $I G F 1 _m H S A _A n \times V$ 融合タンパク質の核酸配列である。

【 0 1 4 2 】

50

配列番号 138 は、I G F 1 __ m H S A __ A n x V m 1 2 3 4 融合タンパク質のアミノ酸配列である。配列番号 139 は、I G F 1 __ m H S A __ A n x V m 1 2 3 4 融合タンパク質の核酸配列である。

【 0 1 4 3 】

配列番号 140 は、H G F (N K 1) __ m H S A __ A n x V 融合タンパク質のアミノ酸配列である。配列番号 141 は、H G F (N K 1) __ m H S A __ A n x V 融合タンパク質の核酸配列である。

【 0 1 4 4 】

配列番号 142 は、N R G 1 b (E G F) __ m H S A __ A n x V 融合タンパク質のアミノ酸配列である。配列番号 143 は、N R G 1 b (E G F) __ m H S A __ A n x V 融合タンパク質の核酸配列である。

10

【 0 1 4 5 】

配列番号 144 は、F G F 2 __ m H S A __ A n x V 融合タンパク質のアミノ酸配列である。配列番号 145 は、F G F 2 __ m H S A __ A n x V 融合タンパク質の核酸配列である。

【 0 1 4 6 】

配列番号 146 は、V E G F B (1 6 7) __ m H S A __ A n x V 融合タンパク質のアミノ酸配列である。配列番号 147 は、V E G F B (1 6 7) __ m H S A __ A n x V 融合タンパク質の核酸配列である。

【 0 1 4 7 】

20

配列番号 148 は、V E G F B (1 1 1) __ m H S A __ A n x V 融合タンパク質のアミノ酸配列である。配列番号 149 は、V E G F B (1 1 1) __ m H S A __ A n x V 融合タンパク質の核酸配列である。

【 0 1 4 8 】

配列番号 150 は、I G F 1 __ m H S A __ B 7 s c F v 融合タンパク質のアミノ酸配列である。配列番号 151 は、I G F 1 __ m H S A __ B 7 s c F v 融合タンパク質の核酸配列である。

【 0 1 4 9 】

配列番号 152 は、I G F 1 __ m H S A __ S y t 1 融合タンパク質のアミノ酸配列である。配列番号 153 は、I G F 1 __ m H S A __ S y t 1 融合タンパク質の核酸配列である。

30

【 0 1 5 0 】

配列番号 154 は、I G F 1 __ m H S A __ a D N A S I 1 融合タンパク質のアミノ酸配列である。配列番号 155 は、I G F 1 __ m H S A __ a D N A S I 1 融合タンパク質の核酸配列である。

【 0 1 5 1 】

配列番号 156 は、N R G 1 b (E G F) __ m H S A __ B 7 s c F v 融合タンパク質のアミノ酸配列である。配列番号 157 は、N R G 1 b (E G F) __ m H S A __ B 7 s c F v 融合タンパク質の核酸配列である。

【 0 1 5 2 】

40

配列番号 158 は、N R G 1 b (E G F) __ m H S A __ S y t 1 融合タンパク質のアミノ酸配列である。配列番号 159 は、N R G 1 b (E G F) __ m H S A __ S y t 1 融合タンパク質の核酸配列である。

【 0 1 5 3 】

配列番号 160 は、N R G 1 b (E G F) __ m H S A __ a D N A S I 1 融合タンパク質のアミノ酸配列である。配列番号 161 は、N R G 1 b (E G F) __ m H S A __ a D N A S I 1 融合タンパク質の核酸配列である。

【 0 1 5 4 】

配列番号 162 は、F G F 2 __ m H S A __ B 7 s c F v 融合タンパク質のアミノ酸配列である。配列番号 163 は、F G F 2 __ m H S A __ B 7 s c F v 融合タンパク質の核酸配

50

列である。

【 0 1 5 5 】

配列番号 1 6 4 は、F G F 2 __m H S A __S y t 1 融合タンパク質のアミノ酸配列である。配列番号 1 6 5 は、F G F 2 __m H S A __S y t 1 融合タンパク質の核酸配列である。

【 0 1 5 6 】

配列番号 1 6 6 は、F G F 2 __m H S A __a D N A S I 1 融合タンパク質のアミノ酸配列である。配列番号 1 6 7 は、F G F 2 __m H S A __a D N A S I 1 融合タンパク質の核酸配列である。

【 0 1 5 7 】

配列番号 1 6 8 は、B 7 s c F v __m H S A __I G F 1 融合タンパク質のアミノ酸配列である。配列番号 1 6 9 は、B 7 s c F v __m H S A __I G F 1 融合タンパク質の核酸配列である。

【 0 1 5 8 】

配列番号 1 7 0 は、S y t 1 __m H S A __I G F 1 融合タンパク質のアミノ酸配列である。配列番号 1 7 1 は、S y t 1 __m H S A __I G F 1 融合タンパク質の核酸配列である。

【 0 1 5 9 】

配列番号 1 7 2 は、a D N A S I 1 __m H S A __I G F 1 融合タンパク質のアミノ酸配列である。配列番号 1 7 3 は、a D N A S I 1 __m H S A __I G F 1 融合タンパク質の核酸配列である。

【 0 1 6 0 】

配列番号 1 7 4 は、B 7 s c F v __m H S A __N R G 1 b (E G F) 融合タンパク質のアミノ酸配列である。配列番号 1 7 5 は、B 7 s c F v __m H S A __N R G 1 b (E G F) 融合タンパク質の核酸配列である。

【 0 1 6 1 】

配列番号 1 7 6 は、S y t 1 __m H S A __N R G 1 b (E G F) 融合タンパク質のアミノ酸配列である。配列番号 1 7 7 は、S y t 1 __m H S A __N R G 1 b (E G F) 融合タンパク質の核酸配列である。

【 0 1 6 2 】

配列番号 1 7 8 は、B 7 s c F v __m H S A __F G F 2 融合タンパク質のアミノ酸配列である。配列番号 1 7 9 は、B 7 s c F v __m H S A __F G F 2 融合タンパク質の核酸配列である。

【 0 1 6 3 】

配列番号 1 8 0 は、S y t 1 __m H S A __F G F 2 融合タンパク質のアミノ酸配列である。配列番号 1 8 1 は、S y t 1 __m H S A __F G F 2 融合タンパク質の核酸配列である。

【 0 1 6 4 】

配列番号 1 8 5 は、I G F 1 __m H S A __D A s c F v 融合タンパク質のアミノ酸配列である。配列番号 1 8 6 は、I G F 1 __m H S A __D A s c F v 融合タンパク質の核酸配列である。

【 0 1 6 5 】

配列番号 1 8 7 - 1 9 0 は、ヒト F G F 2 (配列番号 : 3 8) に対応する増殖因子ポリペプチドの核酸配列である。

【 0 1 6 6 】

配列番号 1 9 1 - 1 9 4 は、H G F アルファ鎖 N - K 1 ドメイン (配列番号 : 6 、配列番号 : 3 2) に対応する増殖因子ポリペプチドの核酸配列である。

【 0 1 6 7 】

配列番号 1 9 5 - 1 9 7 は、野生型ヒト I G F - I (配列番号 3) に対応する増殖因子ポリペプチドの核酸配列である。

10

20

30

40

50

【 0 1 6 8 】

配列番号 1 9 8 は、ヒト N R G 1 アルファ、全配列（配列番号 4 0 ）に対応する増殖因子ポリペプチドの核酸配列である。

【 0 1 6 9 】

配列番号 1 9 9 は、ヒト N R G 1 アルファ、E G F 様ドメイン（配列番号 3 9 ）に対応する増殖因子ポリペプチドの核酸配列である。

【 0 1 7 0 】

配列番号 2 0 0 - 2 0 2 は、ヒト N R G 1 ベータ E G F 様ドメイン（配列番号 5 6 ）に対応する増殖因子ポリペプチドの核酸配列である。

【 0 1 7 1 】

配列番号 2 0 3 は、ヒトペリオスチンの領域（配列番号 5 8 ）に対応する増殖因子ポリペプチドの核酸配列である。

【 0 1 7 2 】

配列番号 2 0 4 は、ヒト骨形成タンパク質 - 2 （配列番号 5 9 ）に対応する増殖因子ポリペプチドの核酸配列である。

【 0 1 7 3 】

配列番号 2 0 5 は、一本鎖ヒト骨形成タンパク質 - 2 （配列番号 6 0 ）に対応する増殖因子ポリペプチドの核酸配列である。

【 0 1 7 4 】

配列番号 2 0 6 は、ヒト V E G F アルファ単量体（配列番号 3 6 ）に対応する増殖因子ポリペプチドの核酸配列である。

【 0 1 7 5 】

配列番号 2 0 7 は、ヒト V E G F アルファ二量体（配列番号 3 7 ）に対応する増殖因子ポリペプチドの核酸配列である。

【 0 1 7 6 】

配列番号 2 0 8 - 2 0 9 は、血管内皮増殖因子 B （配列番号 6 1 ）に対応する増殖因子ポリペプチドの核酸配列である。

【 0 1 7 7 】

配列番号 2 1 0 - 2 1 1 は、ヒト血管内皮増殖因子 B に対応する増殖因子ポリペプチドの核酸配列である。

【 0 1 7 8 】

配列番号 2 1 2 - 2 1 4 は、C 3 4 S および N 5 0 3 Q 置換を有するヒト血清アルブミン（H S A）リンカー（配列番号 1 0 ）に対応する半減期モジュレータの核酸配列である。

【 0 1 7 9 】

配列番号 2 1 5 は、改質ヒト血清アルブミンのドメイン I I I （配列番号 6 7 ）に対応する半減期モジュレータの核酸配列である。

【 0 1 8 0 】

配列番号 2 1 6 は、改質 A F P （配列番号 6 9 ）に対応する半減期モジュレータの核酸配列である。

【 0 1 8 1 】

配列番号 2 1 7 は、アルブミン結合ドメインヒト抗体（配列番号 7 0 ）に対応する半減期モジュレータの核酸配列である。

【 0 1 8 2 】

配列番号 2 1 8 は、s c F c と名づけられた、単量体の異型 F c （配列番号 7 1 ）に対応する半減期モジュレータの核酸配列である。

【 0 1 8 3 】

配列番号 2 1 9 は、改質ビタミン D 結合タンパク質、m V D B P （配列番号 6 6 ）に対応する半減期モジュレータの核酸配列である。

【 0 1 8 4 】

10

20

30

40

50

配列番号 220 - 221 は、抗 D N A s c F v 抗体（配列番号 73）に対応する核酸配列である。

【0185】

配列番号 222 は、抗 D N A s c F v S I - 1（配列番号 1）に対応する核酸配列である。

【0186】

配列番号 223 は、B 7 s c F v 抗ミオシン s c F v 抗体（配列番号 76）に対応する核酸配列である。

【0187】

配列番号 224 は、抗ホスファチジルセリン s c F v P S 4 A 7（配列番号 30）に対応する核酸配列である。

10

【0188】

配列番号 225 - 227 は、ヒトアネキシン V（配列番号 31）に対応する核酸配列である。

【0189】

配列番号 228 は、ヒトアネキシン V の変異体（C 3 1 7 S、配列番号 81）に対応する核酸配列である。

【0190】

配列番号 229 - 230 は、ヒトアネキシン V の変異体（A n x V m 3、配列番号 82）に対応する核酸配列である。

20

【0191】

配列番号 231 - 232 は、ヒトアネキシン V の変異体（A n x V m 2 3、配列番号 83）に対応する核酸配列である。

【0192】

配列番号 233 - 234 は、ヒトアネキシン V の変異体（A n x V m 1 2 3 4、配列番号 84）に対応する核酸配列である。

【0193】

配列番号 235 は、シナプトタグミン I（配列番号 72）に対応する核酸配列である。

【0194】

配列番号 236 - 237 は、非結合性 s c F v 変異体（D A s c F v；配列番号 75）に対応する核酸配列である。

30

【0195】

配列番号 238 は、リーダーポリペプチドに対応する核酸配列である。

【0196】

配列番号 239 は、アルファ接合因子に対応する核酸配列である。

【0197】

配列番号 240 は、a p p 8 リーダーポリペプチドに対応する核酸配列である。

【0198】

配列番号 241 は、a g a 2 シグナルペプチドに対応する核酸配列である。

【0199】

配列番号 242 は、S U C 2 シグナルペプチドに対応する核酸配列である。

40

【0200】

配列番号 243 は、合成シグナルペプチドに対応する核酸配列である。

【0201】

配列番号 244 は、アルファ因子シグナル配列に対応するアミノ酸配列である。配列番号 245 は、アルファ因子シグナル配列に対応する核酸配列である。

【0202】

配列番号 246 は、D A s c F v __ m H S A __ I G F 1 融合タンパク質のアミノ酸配列である。配列番号 247 は、D A s c F v __ m H S A __ I G F 1 融合タンパク質の核酸配列である。

50

【 0 2 0 3 】

配列番号 2 4 8 は、D A s c F v _ m H S A _ H G F (N K 1) 融合タンパク質のアミノ酸配列である。配列番号 2 4 9 は、D A s c F v _ m H S A _ H G F (N K 1) 融合タンパク質の核酸配列である。

【 0 2 0 4 】

配列番号 2 5 0 は、A n x V m 1 2 3 4 _ m H S A 融合タンパク質のアミノ酸配列である。配列番号 2 5 1 は、A n x V m 1 2 3 4 _ m H S A 融合タンパク質の核酸配列である。

【 0 2 0 5 】

配列番号 2 5 2 は、A n x V _ m H S A 融合タンパク質のアミノ酸配列である。配列番号 2 5 3 は、A n x V _ m H S A 融合タンパク質の核酸配列である。

10

【 0 2 0 6 】

配列番号 2 5 4 は、N R G 1 b (E G F) _ m H S A _ A n x V m 1 2 3 4 融合タンパク質のアミノ酸配列である。配列番号 2 5 5 は、N R G 1 b (E G F) _ m H S A _ A n x V m 1 2 3 4 融合タンパク質の核酸配列である。

【 0 2 0 7 】

配列番号 2 5 6 は、A n x V m 2 3 _ m H S A 融合タンパク質のアミノ酸配列である。配列番号 2 5 7 は、A n x V m 2 3 _ m H S A 融合タンパク質の核酸配列である。

【 0 2 0 8 】

配列番号 2 5 8 は、A n x V m 1 2 3 4 _ m H S A _ V E G F B (1 1 1) 融合タンパク質のアミノ酸配列である。配列番号 2 5 9 は、A n x V m 1 2 3 4 _ m H S A _ V E G F B (1 1 1) 融合タンパク質の核酸配列である。

20

【 0 2 0 9 】

配列番号 2 6 0 は、A n x V m 1 2 3 4 _ m H S A _ V E G F B (1 6 7) 融合タンパク質のアミノ酸配列である。配列番号 2 6 1 は、A n x V m 1 2 3 4 _ m H S A _ V E G F B (1 6 7) 融合タンパク質の核酸配列である。

【 0 2 1 0 】

配列番号 2 6 2 は、A n x V m 1 2 3 4 _ m H S A _ H G F (N K 1) 融合タンパク質のアミノ酸配列である。配列番号 2 6 3 は、A n x V m 1 2 3 4 _ m H S A _ H G F (N K 1) 融合タンパク質の核酸配列である。

30

【 0 2 1 1 】

配列番号 2 6 4 は、A n x V m 1 2 3 4 _ m H S A _ F G F 2 融合タンパク質のアミノ酸配列である。配列番号 2 6 5 は、A n x V m 1 2 3 4 _ m H S A _ F G F 2 融合タンパク質の核酸配列である。

【 0 2 1 2 】

配列番号 2 6 6 は、m H S A _ A n x V 融合タンパク質のアミノ酸配列である。配列番号 2 6 7 は、m H S A _ A n x V 融合タンパク質の核酸配列である。

【 0 2 1 3 】

配列番号 2 6 8 は、m H S A _ A n x V m 2 3 融合タンパク質のアミノ酸配列である。配列番号 2 6 9 は、m H S A _ A n x V m 2 3 融合タンパク質の核酸配列である。

40

【 0 2 1 4 】

配列番号 2 7 0 は、m H S A _ A n x V m 1 2 3 4 融合タンパク質のアミノ酸配列である。配列番号 2 7 1 は、m H S A _ A n x V m 1 2 3 4 融合タンパク質の核酸配列である。

【 0 2 1 5 】

配列番号 2 7 2 は、H G F (N K 1) _ m H S A _ A n x V m 1 2 3 4 融合タンパク質のアミノ酸配列である。配列番号 2 7 3 は、H G F (N K 1) _ m H S A _ A n x V m 1 2 3 4 融合タンパク質の核酸配列である。

【 0 2 1 6 】

配列番号 2 7 4 は、V E G F B (1 6 7) _ m H S A _ A n x V m 1 2 3 4 融合タンバ

50

ク質のアミノ酸配列である。配列番号275は、VEGF B (1 6 7) __m H S A __A n x V m 1 2 3 4 融合タンパク質の核酸配列である。

【0217】

配列番号276は、VEGF B (1 1 1) __m H S A __A n x V m 1 2 3 4 融合タンパク質のアミノ酸配列である。配列番号277は、VEGF B (1 1 1) __m H S A __A n x V m 1 2 3 4 融合タンパク質の核酸配列である。

【図面の簡単な説明】

【0218】

【図1】図1は、精製IGF1 __m H S A __A n x V (1 3 6)、IGF1 __m H S A __A n x V m 1 2 3 4 (1 3 8)、NRG1 b (E G F) __m H S A __A n x V (1 4 2) およびNRG1 b (E G F) __m H S A __A n x V m 1 2 3 4 融合タンパク質のSDS - PAGEである。

10

【0219】

【図2】図2は、アポトーシスを起こした心臓細胞における陽性対照の、ヨウ化プロピジウム (P I) を加えるAnnexin V - F I T C アポトーシス検出のフローサイトメトリーである。

【0220】

【図3】図3は、図2に示されたF I T CおよびP Iチャネルのフローサイトメトリーヒストグラムである。

【0221】

20

【図4】図4は、アポトーシスを起こした心臓細胞における、ヨウ化プロピジウムを加えるIGF1 __m H S A __A n x Vのフローサイトメトリーである。

【0222】

【図5】図5は、図4に示されたF I T CおよびP Iチャネルのフローサイトメトリーヒストグラムである。

【0223】

【図6】図6は、アポトーシスを起こした心臓細胞における、ヨウ化プロピジウムを加えるIGF1 __m H S A __A n x V m 1 2 3 4のフローサイトメトリーである。

【0224】

【図7】図7は、図6に示されたF I T CおよびP Iチャネルのフローサイトメトリーヒストグラムである。

30

【0225】

【図8】図8は、アポトーシスを起こした心臓細胞における陽性対照の、ヨウ化プロピジウム (P I) を加えるAnnexin V - F I T C アポトーシス検出のフローサイトメトリーである。

【0226】

【図9】図9は、図8に示されたF I T CおよびP Iチャネルのフローサイトメトリーヒストグラムである。

【0227】

【図10】図10は、IGF1での予備遮断 (p r e - b l o c k i n g) なしの、アポトーシスを起こした心臓細胞における、ヨウ化プロピジウムを加えるIGF1 __m H S A __A n x Vのフローサイトメトリーである。

40

【0228】

【図11】図11は、図10に示されたF I T CおよびP Iチャネルのフローサイトメトリーヒストグラムである。

【0229】

【図12】図12は、IGF1での予備遮断 (p r e - b l o c k i n g) なしの、アポトーシスを起こした心臓細胞における、ヨウ化プロピジウムを加えるIGF1 __m H S A __A n x V m 1 2 3 4のフローサイトメトリーである。

【0230】

50

【図13】図13は、図12に示されたFITCおよびPIチャンネルのフローサイトメトリーヒストグラムである。

【0231】

【図14】図14は、800nMのIGF1で10分間の予備遮断を行う、アポトーシスを起こした心臓細胞における、ヨウ化プロピジウムを加えるIGF1__mHSA__AnxVのフローサイトメトリーである。

【0232】

【図15】図15は、図14に示されたFITCおよびPIチャンネルのフローサイトメトリーヒストグラムである。

【0233】

【図16】図16は、ESC由来心臓細胞がドキシソルピシン処理の有無に関わらずアポトーシスを起こした集団を示すことを示すグラフである。Ann-HSA=AnxV__mHSA。M1234-Ann-HSA=AnxVm1234__mHSA。

【0234】

【図17】図17は、アポトーシスを起こしたESC由来心臓細胞への、AnxVm1234__mHSAではなく、AnxV__mHSAの特異的結合性を示すフローサイトメトリーである。

【0235】

【図18】図18は、アポトーシスを起こしたESC由来心臓細胞への、AnxV__mHSA__NRG1b(EGF)の特異的結合性を示すフローサイトメトリーである。

【0236】

【図19】図19は、ホスファチジルセリンへの、IGF1__mHSA__Synt1およびIGF1__mHSA__AnxVの特異的結合性を示すグラフである。

【0237】

【図20】図20は、DNAへの、aDNASI1__mHSA__FGF2、aDNASI1__mHSA__NRG1b(EGF)およびIGF1__mHSA__aDNASI1の特異的結合性を示すグラフである。

【0238】

【図21】図21は、DU145細胞における、融合タンパク質NRG1b(EGF)__mHSA__AnxV、および陽性対照NRG1b(EGF)によるpAktの刺激を示すグラフである。

【0239】

【図22】図22は、DU145細胞における、融合タンパク質AnxV__mHSA__NRG1b(EGF)、および陽性対照NRG1b(EGF)によるpAktの刺激を示すグラフである。

【0240】

【図23】図23は、DU145細胞における、融合タンパク質IGF1__mHSA__AnxV、融合タンパク質IGF1__mHSA__AnxVm1234および陽性対照IGF1によるpAktの刺激を示すグラフである。

【0241】

【図24】図24は、DU145細胞における、融合タンパク質IGF1__mHSA__B7scFv、および陽性対照IGF1によるpAktの刺激を示すグラフである。

【0242】

【図25】図25は、心臓細胞における、IGF1、およびIGF1__mHSA__AnxVによるpAktの用量反応刺激を示すグラフである。

【0243】

【図26】図26は、ESC由来心筋細胞における、FGF2およびAnxV__mHSA__FGF2によるpErkの刺激を示すグラフである。

【0244】

【図27】図27は、アポトーシスを起こしたHL-1細胞と予備混合したタンパク質(

10

20

30

40

50

黒い棒)、および未処理のHL-1細胞と予備混合したタンパク質(灰色の棒)によって誘導されたpAktレベルを示すグラフである。

【0245】

【図28】図28は、ELISA測定のための1群あたり2個の心臓を調製するための心臓の切開を示す。右上の差し込みは切片B1の断面図を示す。切片Aおよび切片B1遠隔部(remote)の大部分が健康な組織を含む一方で、切片B1-梗塞部(infarct)およびB2は梗塞のほとんどすべておよびその近傍の境界領域を含む。LV:左室。

【0246】

【図29】図29は、投与後3回での心臓におけるIGF1-mHSA-AnxVおよび非結合性IGF1-mHSA-AnxVm1234融合タンパク質の測定を示すグラフである。黒い棒は梗塞および境界領域で見られたタンパク質の濃度を示し、灰色の棒は非梗塞領域で見られたタンパク質の濃度を示す。1群あたり2個のマウスが示される。群2は標的化タンパク質IGF1-mHSA-AnxVを投与されたマウスに対応し、群3は非結合性変異体IGF1-mHSA-AnxVm1234を投与されたマウスに対応する。

10

【0247】

【図30】図30はマウスがIGF1-mHSA-AnxVで処理された24時間後の免疫組織化学的染色した心臓部の代表的な顕微鏡写真である。

【0248】

【図31】図31は、IGF1-mHSA-AnxVm1234で処理されたマウスからの梗塞した組織および境界領域を示す心臓の切片を免疫組織化学的染色した代表的な顕微鏡写真である。時点は投与後24時間であった。

20

【0249】

【図32】図32は、マウス実験において用いられる第一の抗HSA抗体による、HSA含有タンパク質またはHSA生成組織の染色特異性を示すために用いられる、対照の顕微鏡写真である。

【発明を実施するための形態】

【0250】

発明の詳細な説明

本発明の態様は、2個の結合ドメイン、特定の標的分子または標的細胞に結合特異性を有する標的化ドメインおよび組織再生を調節する受容体に結合特異性を有する活性化ドメインを含む二重特異的融合タンパク質を対象とする。いくつかの実施形態において、活性化ドメインが細胞を活性化する役割を果たす間、標的化ドメインは二重特異的融合タンパク質の標的を標的細胞または組織に絞る役割を果たし、その結果、標的組織の再生を促進する。本明細書で用いられる「二重特異的タンパク質」は2個以上の特定の分子に特異的に結合する能力を有する融合タンパク質をいう。

30

【0251】

いくつかの実施形態において、二重特異的融合タンパク質は(1)組織の損傷細胞に関する標的分子に結合特異性を有する標的化ドメインであって、該分子は生存細胞の細胞内にあり、損傷細胞の細胞外空間に露出されている;および(2)組織の細胞の増殖因子受容体またはサイトカイン受容体に結合特異性を有する活性化ドメインであって、該活性化ドメインが増殖因子受容体またはサイトカイン受容体にさらされると、組織の再生または生存を調節するように活性化ドメインが増殖因子受容体またはサイトカイン受容体に結合する、を含む。

40

【0252】

いくつかの実施形態において、二重特異的融合タンパク質は(1)組織の損傷細胞に関する標的分子に結合特異性を有する標的化ドメインであって、該分子は生存細胞の細胞内にあり、損傷細胞の細胞外空間に露出されている;(2)組織の細胞表面に関する分子に結合特異性を有する活性化ドメインであって、該活性化ドメインが膜関連分子にさらされると、組織の再生または生存を調節するように活性化ドメインが膜関連分子に結合する、

50

および(3)二重特異的融合タンパク質の半減期を調節する、半減期モジュレータ、を含む。

【0253】

いくつかの実施形態において、二重特異的タンパク質は：(1)虚血関連分子に結合する標的化ポリペプチドドメイン；および(2)組織再生または生存を調節するような増殖因子ポリペプチドまたはサイトカインポリペプチドなどの活性化ドメイン、を含む。

【0254】

いくつかの実施形態において、二重特異的融合タンパク質は(1)組織に関する標的分子に結合特異性を有する標的化ドメイン；(2)組織の細胞表面に関する分子に結合特異性を有する結合ドメイン(例えば、活性化ドメイン)であって、該結合ドメインが該分子にさらされると、組織の再生または生存を促進するように結合ドメインが該分子に結合する、および(3)二重特異的融合タンパク質の半減期を調節する、半減期モジュレータ、を含む。

10

【0255】

ある実施形態において、二重特異的融合タンパク質は半減期モジュレータ(HLM)を含む。いくつかの実施形態において、HLMはポリペプチドである。HLMは2個の末端、N末端およびC末端を有することができ、一方の末端において、標的化ポリペプチドドメインとペプチド結合を経て連結され、他方の末端において活性化ドメインとペプチド結合を経て連結される。他の実施形態において、半減期モジュレータは一方の末端(N末端またはC末端)にて活性化ドメインまたは標的化ドメインと連結される。従って、半減期モジュレータは二重特異性融合タンパク質のN末端またはC末端にあることができる。半減期モジュレータは標的化ドメインまたは活性化ドメインとペプチド結合を経て連結され得る。

20

【0256】

本発明の他の態様は、(1)組織に関する少なくとも1個の標的分子に結合特異性を有する少なくとも1個の標的化ドメイン；(2)組織の細胞表面に関する少なくとも1個の分子に結合特異性を有する少なくとも1個の(活性化ドメインなどの)結合ドメインであって、該結合ドメインが該分子にさらされると、組織の再生を促進するように該結合ドメインが該分子に結合する；および(3)任意に、二重特異的融合タンパク質の半減期を調節する、半減期モジュレータ、を含む融合タンパク質に関する。いくつかの実施形態において、融合タンパク質は2個以上の標的化ドメイン、各々の標的化ドメインは組織に関する標的分子に結合親和性を有する、を含み得る。各々の標的化ドメインは、同じ結合特異性(例えば、同じ標的分子への結合特異性)、または異なる結合特異性(例えば、異なる標的分子への結合特異性)を有し得る。いくつかの実施形態において、融合タンパク質は2個以上の活性化ドメインを含む。各々の活性化ドメインは、同じ結合特異性(例えば、細胞上の同じ受容体への結合特異性)、または異なる結合特異性(例えば、細胞上の異なる受容体への結合特異性)を有し得る。

30

【0257】

当業者は、そのような二重特異的融合タンパク質が組織再生で使われることができるのを理解するであろう。いくつかの実施形態において、組織または臓器障害に続いて、または組織の細胞が損傷され得る事象に続いて、損傷細胞において二重特異的融合タンパク質を使用できる。いくつかの実施形態において、二重特異的融合タンパク質は1個以上の増殖因子および/またはサイトカイン(例えば、ケモカイン)および/またはインテグリンを発現する細胞を活性化できる。他の実施形態において、例えば損傷、または組織の細胞が損傷され得る事象かまたは機能不全になり得る事象(例えば、糖尿病におけるベータ細胞機能障害)に続いて、1個以上の増殖因子および/またはサイトカイン(例えば、ケモカイン)受容体および/またはインテグリンを組織に発現する細胞(例えば、幹細胞、先祖細胞または免疫細胞)を供給するために、二重特異的融合タンパク質が使われることができる。さらにまた、*in vivo*で、そのような二重特異的融合タンパク質の投与は、損傷組織または損傷器官の修復または再生を容易にするために使用され得る。

40

50

【 0 2 5 8 】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載された二重特異的タンパク質は、組織生存の調節において使われることができる。例えば、二重特異的タンパク質は、細胞の生存力を高めるか、または維持できる。いくつかの実施形態において、二重特異的融合タンパク質は生存促進経路または細胞生存経路を活性化できる。いくつかの実施形態において、二重特異性タンパク質はアポトーシスを調節できる。

【 0 2 5 9 】

いくつかの実施形態において、二重特異的タンパク質は (a) 標的化ポリペプチドドメインであって、該標的化ドメインが標的分子に結合し、その結果組織の第一の細胞に二重特異的融合タンパク質を標的化する、および (b) 受容体に結合特異性を有する活性化ドメイン、を有することができる。活性化ドメインが受容体にさらされると、活性化ドメインは細胞動員、アポトーシスの抑制、細胞増殖の誘導、生存促進経路の活性化、再生、組織の生存を促進するように第二の細胞の受容体を活性化できる。当業者は、二重特異的融合タンパク質が最初の細胞集団に結合し、同じ細胞集団 (例えば、自己分泌方法) 上、または、異なった細胞集団 (例えば、傍分泌方法) 上で働くことができるのを理解するであろう。いくつかの実施形態において、標的化ドメインは損傷している第一の細胞集団に関する標的分子に特異的に結合し、活性剤ドメインは生存細胞の第二の細胞集団の受容体に結合する。さらにまたいくつかの実施形態において、標的化ドメインは第一の細胞集団の表面にて組織特異的標的分子に特異的に結合し、活性剤ドメインは第二の細胞集団に特異的に働く。第一の細胞は、生存細胞、または「リスク」細胞であり得る。本明細書で使用する「リスク」細胞はまだアポトーシスを受けていないか、または損傷していないが、損傷するリスクにさらされている生存細胞のことをいう。

【 0 2 6 0 】

いくつかの実施形態において、二重特異的タンパク質は、組織または器官の異なる細胞上で異なる分子に結合する、2 個の異なる (標的化ドメインおよび活性剤ドメインなどの) 結合ドメインを有する。さらに、他の実施形態において、二重特異的タンパク質は、組織の同じ標的細胞上で異なる分子に結合する 2 個の異なる結合ドメインを有し、標的化ドメインは標的細胞に特異的に結合するように選択され、活性化ドメインは組織再生を促進するように選択される。

【 0 2 6 1 】

本明細書で使用する「ポリペプチド」なる用語は、ペプチド結合によって結びつけられた複数のアミノ酸残基からなる分子をいう。本用語はそのように結びつけられたアミノ酸残基の数に関して全く意味を有さない。

【 0 2 6 2 】

本明細書で使用する「二重特異的」なる用語は、融合タンパク質の、2 個の異なるリガンド : (標的化ポリペプチドドメインにより結合した) 標的分子および活性化ドメインの受容体、と相互作用する能力をいう。標的化ポリペプチドドメインおよび活性化ドメインの結合特性について、以下でさらに詳細に議論する。

【 0 2 6 3 】

本明細書で使用する「標的分子」なる用語は、組織 (例えば、罹患しているまたは損傷している組織) に関するあらゆる分子をいう。「標的細胞」は二重特異的タンパク質またはその標的化ドメインが特異的に結合できる細胞を意味する。好ましい標的分子は、標的細胞の外部で露出されるか、または増える。いくつかの実施形態において、標的分子は損傷細胞に関し、標的分子は生存細胞または損傷細胞の細胞内部に存在し、かつ損傷細胞の細胞外空間に露出される。そのような分子は、例えば壊死 (DNA など) またはアポトーシス (例えば、ホスファチジルセリン) を受ける細胞で露出される分子、ミオシン (その組織型特異的サブタイプを含む)、ICAM - 1 または P - セレクチンを含む。さらに他の実施形態において、標的分子は、正常または機能的な細胞または組織で検出されるレベルと比べて、罹患したまたは機能不全の細胞または組織の表面で存在するかまたは増やされた分子である。

【0264】

細胞は脂質二重層を含む原形質膜（または細胞膜）によって境界される。細胞膜はサイトゾル（細胞の内側または細胞質側）に面する表面および細胞外空間または細胞外部に面する表面を有すると考えられ得る。アポトーシスの間、陰イオンリン脂質の内側から原形質膜の外葉までの二層間の運動が起こる。アネキシンV、シナプトタグミンIまたはラクトアドヘリンなどのリン脂質結合タンパク質は、細胞膜外葉のホスファチジルセリンの存在を検出するために使用される。ホスファチジルセリンは、通常、生存細胞または非損傷細胞では細胞質側に制限され、アポトーシスにおいて細胞表面外側または細胞外空間に露出されるようになる、リン脂質である。ホスファチジルセリンは、*in vivo*の画像解析においてマーカーとして使用された（表2を参照）。

10

【0265】

いくつかの実施形態において、標的分子は「虚血関連分子」である。「虚血関連分子」は、虚血または酸欠の後に、有意に高いレベル（例えば、少なくとも2倍高い）で検出されるあらゆる分子である。本明細書で提供されるものを含む、いかなる好適な結合アッセイも、虚血関連分子を特定するために使用され得る。検出される増加するレベルの分子は、上方調節または減少した代謝の結果によるものであり得、または増加する接近性（*accessibility*）（例えば、細胞損傷からもたらされる）のためであり得る。ある実施形態において、虚血関連分子が虚血後組織の細胞において、虚血事象を受けていない同じ組織の細胞に比べて有意に高いレベル（例えば、少なくとも2倍高い）で検出される（すなわち、分子は、虚血後組織で特有かまたは増やされる。更なる実施形態において、虚血関連分子は細胞損傷に関連する（すなわち、分子は同じ型の非損傷細胞より損傷細胞において有意に高いレベルで検出される）。ある虚血関連分子は、虚血事象の後（または心臓の虚血を再現するために使用されるモデル系において）、心臓で増やされる（2倍またはより高い）。そのような分子は、例えば、壊死（DNAなどの）またはアポトーシスを受ける筋細胞または他の心臓細胞で露出される分子、コラーゲン（コラーゲンI、II）、ミオシン（その組織型特異的サブタイプを含む）または虚血後心臓で増やされる他の細胞外基質タンパク質などの傷ついた心臓組織で増やされる分子を含む。そのような分子は、*in vivo*での虚血再かん流または*in vitro*での模擬虚血再かん流に続く、または酸欠、ATP減少、増加する活性酸素種（ROS）、一酸化窒素シンターゼ（NOS）生産、または*in vitro*で培養された細胞の血清飢餓などの状態への暴露に続く、増加を基に特定できる。

20

30

【0266】

標的化ポリペプチドドメイン

組織に関する標的分子（例えば、虚血関連分子）への結合は、標的化ポリペプチドドメインによって仲介される。このドメインは、この機能を果たすいかなるポリペプチド配列であってもよい。好ましくは、標的分子への標的化ドメインの結合は、生物活性を有さない。本明細書で用いられる、「生物活性」は、融合タンパク質のドメインへの分子の露出により実施される既知の活性として定義されたものをいう。

【0267】

いくつかの実施形態において、標的化ドメインは、標的分子、その断片またはその変異体に結合親和性を有する非抗体の自然発生のポリペプチドである。さらに、他の実施形態において、標的化ポリペプチドドメインは1個以上の抗体可変領域を含む。当業者は、直接または間接的に標的分子に結合できるいかなる標的化ドメインも検討されることを理解するであろう。

40

【0268】

いくつかの実施形態において、標的化ドメインは、アネキシンV（配列番号：31）、その断片、またはその変異体（配列番号：81-83）である。アネキシンVはホスファチジルセリン（PS）に結合する。いくつかの実施形態において、アネキシンVは、二量体構成を減少させるために、システイン316をセリンまたはアラニンで置換するように改質される。いくつかの実施形態において、アネキシンVは、ホスファチジルセリン結合

50

親和性を維持している間、アネキシンVの内在化を減少させるように改質される。いくつかの実施形態において、アネキシンVの1個以上の残基が、標的分子への結合の、より好適なオンレート、または標的分子への結合の、より好適なオフレート、を達成するように結合性を改質するために改変され得る。いくつかの実施形態においてD144がNに置換され、かつ/またはE228がAに置換されたアネキシンVの変異体を使用できる(Mirra, 1997; Kenis, 2004; Kenis 2010およびUngthum, 2010を参照)。

【0269】

他の実施形態において、標的化ドメインは、シナプトタグミンI、その断片、またはその変異体である。シナプトタグミンI(SytI)は約5~40nMの結合親和性でCa²⁺(2+)依存の方法でホスファチジルセリンと結合することが示された。いくつかの実施形態において、標的化ドメインとして、シナプトタグミン(例えば、C2B)の2個のC2ドメインの1個を使用できる。いくつかの実施形態において、標的化ドメインはシグナル伝達または膜輸送(例えば、プロテインキナーゼC、血液凝固因子V、およびVII)に関与するCa²⁺依存膜標的化タンパク質のC2ドメインである。いくつかの実施形態において、標的化ドメインは配列番号:72において記載される配列を有する。乳脂肪球-EGF8としても知られるラクトアドヘリンは、マクロファージによって分泌される45kDaのホスファチジルセリン結合性糖蛋白質である。ラクトアドヘリンはアミノ末端にEGF様ドメイン、およびカルボキシ末端に2個のC-ドメインを含む。従って、いくつかの実施形態において、標的化ドメインはラクトアドヘリン、その断片またはその変異体のC-ドメインを含む。いくつかの実施形態において、C2ドメインの1個以上の残基が、標的分子への結合の、より好適なオンレート、または標的分子への結合の、より好適なオフレート、を達成するように結合性を改質するために改変され得る。いくつかの実施形態において、標的化ドメインは配列番号:85または86において記載される配列を有する。いくつかの実施形態において、標的化ポリペプチドドメインはT細胞免疫グロブリンムチン1および4(TIMタンパク質)を含む。他の実施形態において、標的化ポリペプチドドメインは血漿2糖蛋白質1を通して間接的にホスファチジルセリンと結合できる3G4抗体または抗体ドメインを含む。さらに、他の実施形態において、標的化ポリペプチドドメインはホスファチジルセリンと結合できる抗ホスファチジルセリン抗体(例えば、PS4A7、配列番号30)または抗体ドメインを含む。

【0270】

いくつかの実施形態において、標的化ポリペプチドドメインは標的分子に結合するポリペプチドを含む。そのようなポリペプチドの代表的なものは、本明細書で配列番号31、72、81-83または85-86として提供される配列を含むかまたは有する。そのようなポリペプチド核酸配列の代表的なものは、本明細書で配列番号225-232または235として提供される配列を含むかまたは有する。

【0271】

標的化ドメインとして天然ポリペプチドを使用できる。しかしながら、そのような天然配列の部分および改変された配列を有するポリペプチドを、そのようなポリペプチドが以下により詳細に記載されるように、適切な結合親和性(K_d)で標的分子と結合する能力を有する限り、使用でき得ることは明らかであろう。

【0272】

本発明で用いられる、「抗体」は、免疫グロブリンの遺伝子によって実質的にコードされた1個以上のポリペプチドからなるタンパク質である。典型的な抗体は、2個の相同な対のポリペプチド鎖から構成される四量体であり、各々の対は1個の「軽」(約25kD)、および1個の「重」鎖(約50-70kD)を有する。「V_L」および「V_H」はそれぞれこれらの軽鎖および重鎖をいう。「抗体可変領域」は、主として抗原認識に関与するアミノ酸残基を含む抗体の可変鎖(V_LまたはV_H)のN-末端領域である。当業者は容易に、抗体可変領域を特定し、抗原認識をもたらすために必要な最小サイズを決定することができる。通常、抗体可変領域は少なくとも70個のアミノ酸残基、および、より一

10

20

30

40

50

般的に少なくとも100個のアミノ酸残基を含む。抗体可変領域を含むポリペプチドは、さらに他の軽鎖、および/または重鎖系列を含み得、さらに抗体由来ではない配列を(必要ではないが)含み得る。抗体可変領域の配列は自然に発生し得るか、または、機能(抗原認識)が維持される限り、標準技術を用いて改質され得ることは、明らかであろう。抗体可変領域を含むあるポリペプチドは、一本鎖抗体(単一のポリペプチド鎖として存在する抗体)、より好ましくは、可変重鎖領域および可変軽鎖領域が連続したポリペプチドを形成するように(直接またはペプチドリinkerを通して)結合している一本鎖Fv抗体(s c F v)である。s c F v抗体は、化学的に合成され得るか、または直接あるいはペプチドコードリinkerにより連結されたV_H-およびV_L-コード配列を含む核酸から発現され得る。

10

【0273】

「結合」または「特異的結合」は本明細書において相互に用いられ、二重特異的タンパク質が特定の分子(例えば、標的化ドメインが標的分子に実質的な親和性を示すか、または活性化ドメインが受容体などの細胞表面に関する分子に実質的な親和性を示す)または、分子に接している細胞または組織に実質的な親和性を示すことを示し、融合タンパク質(または、その標的化ポリペプチドドメインまたはその活性化ドメイン)が特定の分子に実質的な親和性を有する場合に起こるといわれており、他の分子と有意な交差反応性を示さないものは選択的である。好ましい実質的な結合は、 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} 、 10^{-9} 、 10^{-10} 、 10^{-11} 、 10^{-12} Mまたはそれより良い解離定数(K_d)での結合を含む。例えば、抗体抗原相互作用の K_d は50%の抗体と抗原分子が熱力学平衡で共に結合する抗体の濃度(モル濃度として表現される)を示す。したがって、適当な固定抗原濃度のときに、50%の高い(すなわち、強い)親和性抗体が、より低い親和性の抗体が同じパーセントでの結合を達成するために必要であろうものよりも低い抗体濃度にて、抗原分子と結合するであろう。 K_d はまた、オンおよびオフレート(K_{on} および K_{off})の動的な比であり;すなわち、 $K_d = K_{off} / K_{on}$ である。したがって、低い K_d 値は、より高い(より強い)親和性を示す。本明細書で用いられる、「より良い」親和性は、より強い親和性であり、その比較対象よりも低い数値の解離定数によって特定される、すなわち、 10^{-10} Mの K_d は 10^{-9} Mの K_d よりも低い数値であり、それゆえより良い親和性を示す。 10^{-7} Mより良い(すなわち、より低い K_d 値であり、それゆえより強い)親和性、好ましくは 10^{-8} Mより良い親和性が一般に好ましい。本明細書で説明されたものの中間的な値も考慮され、好ましい結合親和性は解離定数の範囲として示すことができ、例えば、本明細書で開示される抗体の好ましい結合親和性は、 10^{-6} から 10^{-12} M (すなわち、マイクロモルからピコモル)、好ましくは 10^{-7} から 10^{-12} M、より好ましくは 10^{-8} から 10^{-12} M、さらにより良い範囲の K_d 値により示される。「有意な交差反応性を示さない」抗体は、目標からはずれた抗原(off-target antigen)に結合しないであろうものである。例えば、一の実施形態において、心臓ミオシンに特異的および選択的に結合する抗体は、心臓ミオシン以外のミオシン分子または非ミオシンタンパク質またはペプチドよりも、心臓ミオシンに対して少なくとも2、好ましくは3、または4以上の桁の量のより良い親和性(すなわち、2、3、または4以上の桁の量のより低い K_d 値を示す結合)を示すであろう。結合親和性および選択性は、そのような特性を決定するために当分野で認識されるいずれの方法を用いることで決定でき、それは、例えば、Scatchard分析および/または競合結合アッセイの使用を含む。

20

30

40

【0274】

当技術分野で周知の技術のいずれかを用いて、結合を評価および K_d 値を測定し得る。例えば、虚血関連DNA分子への結合は、標的DNA断片で適切な固相担体(例えば、ビーズ、ELISAプレートまたはBIAcoreチップ)をコーティングすることによって、一般的に評価される。DNAのいかなる配列にも結合する標的化ポリペプチドドメインでは、10塩基対以上の(一本鎖または二本鎖)のDNA断片は固体基質に固定化される。特定の配列またはDNA複合体(例えば、DNAヒストン複合体)に結合する標的化

50

ポリペプチドでは、適切な対応する標的が固定化される。虚血関連分子を添加する前に、タンパク質の非特異的結合部位はBSA、乳、またはいかなる他の適切な遮断剤で遮断される。非コートウェルまたは非標的分子でコートされたウェルは特異性の対照 (control) の役割を果たす。二重特異的融合タンパク質 (または標的化ポリペプチドドメイン) の増加する濃度は、標的でコートされた基質または対照基質で培養される。標的と結合しない融合タンパク質またはドメインはまた、特異性の対照として試験される。二重特異的融合タンパク質 (または標的化ポリペプチドドメイン) の標的特異的、用量依存的結合は、使用される固相担体および結合技術に対応する標準プロトコルを用いる、増加用量の関数として、対照に対する標的への二重特異的融合タンパク質 (または標的化ポリペプチドドメイン) 結合の量を測定することにより評価される。そのようなプロトコルの代表的なものは、Wassaf et al., Anal. Biochem. 351 (2) : 241 - 53 (2006); Epub 2006 Feb 10 (BIOCORE); および Murray and Brown, J. Immunol. Methods. 127 (1) : 25 - 8 (1990) (ELISA) を含む。加えて、固定化された標的分子の量を変える研究または競合としての可溶性標的分子の量の増加を含む研究が、結合および特異性を監視するために実施され得る。

10

【0275】

標的分子への結合についての結合親和性および動的オンおよびオフレートは、標準的な技術を用いて測定され、他の陰性対照分子 (例えば、無関係の標的化ポリペプチドまたは標的化ポリペプチドを欠く融合タンパク質または非結合性標的ポリペプチドをもつ融合タンパク質) および陽性対照分子 (例えば、標的分子と結合する親抗体、または標的分子と結合することが知られている他の抗体または抗体断片) と比較される。例えば、非結合性標的化ポリペプチドは、非結合性アネキシンV変異体 (配列番号: 84、核酸配列灰列番号233 - 234)、非結合性シナプトタグミン変異体 (配列番号: 74) または非結合性scFv (配列番号: 75; 核酸配列配列番号236 - 237) であり得る。

20

【0276】

ある実施形態において、 K_d は、バイオセンサー (例えば表面プラズモン共鳴 (例えば、BIAcore) または共鳴ミラー分析 (resonant mirror analysis) (IASys)) を用いて測定される。そのような測定は、Hefta et al., Measuring Affinity Using Biosensors, in "Antibody Engineering: A Practical Approach," McCafferty et al. (eds), pp. 99 - 116 (Oxford University Press, 1996)、およびそれらに引用された文献に記載されるように実施し得る。簡潔には、動的オンおよびオフレート (K_{on} および K_{off}) が、虚血関連分子が組み合わせられたセンサーチップを使用して測定される。結合 (K_{on}) を評価するために、結合が質量感知検出を用いて監視される間に、異なる濃度の二重特異性タンパク質 (または標的化ポリペプチドドメイン) 溶液がチップを流れる。BIAcoreシステム (GE Healthcare; Piscataway, NJ) を用いて、 K_{on} は、 R が観察されたシグナルであるところの、 dR/dt に対する R のプロットの傾きである。結合に続いて、解離は、緩衝液をチップに流すことにより、測定され、 K_{off} は類似した方法で測定される。そして、 K_d は、以下の式を用いることで計算される:

30

40

$$K_d = K_{off} / K_{on}$$

【0277】

本発明の文脈では、二重特異的融合タンパク質が、 10^{-8} Mより低い、好ましくは 10^{-7} M、 10^{-8} M、 10^{-9} Mまたは 10^{-10} Mより低い K_d で結合していれば、標的分子と結合している。また、このアッセイでの標的分子への二重特異的融合タンパク質の結合は陰性対照への二重特異的融合タンパク質の結合よりも、有意に高い (例えば、少なくとも2、10、または100倍高い)。好ましくは、固定化された標的への結合もまた、過剰の可溶性標的の使用に匹敵し得る。

50

【0278】

上で述べたように、ある標的分子は損傷細胞に特異的（または、その中で増やされる）である。代表的な標的分子はホスファチジルセリン、DNA、ミオシン、心臓ミオシン、c-Met（HGF受容体）、ホスファチジルセリン、P-セレクチン、およびICAM-1を含むが、これらに限られるものではない。損傷細胞への結合は、壊死またはアポトーシスを誘導された状態にさらされた培養細胞を用いることで、簡便に*in vivo*で示される。例えば壊死は、虚血/再かん流を刺激された培養心筋細胞で誘導され、本質的にはShan et al., Am. J. Physiol. Cell. Physiol. 294: 833-841 (2008)で説明されるように、アポトーシスを受けた細胞数の控除が後に続く、LDH放出アッセイ、またはトリパンブルーアッセイを使用して監視できる。このアッセイは、下記でより詳細に議論するように、総死細胞の数および、総数および壊死に起因するアポトーシスを起こした細胞の数の違いを定量化する。アポトーシスを誘導する状態は、 H_2O_2 への露出を含み、アポトーシスは、例えば、アネキシンV結合、アポトーシスによって活性化される既知のカスパーゼによる標的ペプチド配列の開裂、またはDNAラダーリング（本質的にKuramochi, J. Biol. Chem. 279(49): 51141-47(2004)に記載されるような、TUNELアッセイにより測定される）を含む、当分野で既知のさまざまな技術のいずれかを使用することで監視できる。壊死またはアポトーシスを受ける細胞への結合は、アポトーシスまたは壊死の誘導に続いて、細胞に蛍光標識された二重特異的融合タンパク質（または標的化ポリペプチドドメイン）または適切な対照タンパク質を加えることにより、評価し得る。数分から1日間の範囲の時間の細胞でのタンパク質の培養の後、細胞は洗浄され、次に、免疫蛍光、フローサイトメトリー、または同様の技術を使用して、細胞に結合した蛍光が測定される。あるいは、二重特異的融合タンパク質（または標的化ポリペプチドドメイン）または、ELISA実施で一般的な習慣である、二重特異的融合タンパク質（または標的化ポリペプチドドメイン）に結合する抗体と結合（conjugate）した酵素の使用または放射性同位元素標識法を含む、他の結合二重特異的タンパク質（または標的化ポリペプチドドメイン）の検出方法が使用され得る。障害を被っていない細胞（例えば、アポトーシスおよび壊死を受けていない細胞）と比較して、虚血後の細胞（例えば、壊死またはアポトーシスを受けている細胞）へのより高い（例えば2倍より高い）結合が検出されれば、二重特異的融合タンパク質（または標的化ポリペプチドドメイン）は標的細胞に結合している。

【0279】

*in vivo*標的化は、例えば、動物モデルへの虚血の誘導、および虚血の前後の標的組織において投与された二重特異的融合タンパク質（または標的化ポリペプチドドメイン）のレベルを比較することによって、示され得る。損傷細胞への*in vivo*標的化は、動物モデルにおける組織損傷の誘導、二重特異的融合タンパク質（または標的化ポリペプチドドメイン）の投与、および損傷細胞と非損傷細胞における二重特異的融合タンパク質（または標的化ポリペプチドドメイン）のレベルの比較によって示され得る一の実施形態において、二重特異的融合タンパク質は、虚血再かん流傷害に続く、組織の損傷領域を標的化するよう設計される。このような場合には、*in vivo*標的化の実証は、好ましくは虚血に続く血液供給の回復を引き起こす方法で、組織損傷を誘導することにより、実施し得る。多数の方法が、異なった組織でこれを行うために利用可能である。例えば、簡単な止血帯でマウスの後肢への血流を一時的に妨げることができる。あるいは、腎臓に導く動脈上で一時的な鉗子を使うことができる。マウス、ラット、犬、およびブタに示されるように、冠動脈の一時的な遮断で心臓の虚血再かん流傷害を誘導できる。動物モデルにおける組織損傷を引き起こすための代表的な方法を表1にまとめる。

【表 1】

表 1. 虚血再かん流傷害を誘導するために用いられる代表的な方法

器官または組織	損傷を誘導するために用いられる方法	引用文献
心臓	マウス：左冠動脈前下行枝（LAD）の30分までの固定後の再かん流 ラット：冠動脈結紮	Dumont et al., Circulation 102(13):1564-8 (2000) Davis, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 23:103(21):8155-60 (2006)
腎臓	マウス：小児縫合（pediatric suture）での腎動脈の1-6時間の固定	Chen et al., FASEB J. 4(12):3033-39 (1990)
肝臓	犬：肝茎および肝臓動脈（腹腔動脈の近く）の血管鉗子での交差固定 豚：詳細は引用文献	Miranda et al., Braz. J. Med. Biol. Res. 40(6):857-65 (2007) Kobayashi et al., World J. Gastroenterol. 13(25):3487-92 (2007)
後肢		Zbinden et al., Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 292: H1891-H1897 (2007)

10

20

【0280】

虚血再かん流傷害のための動物モデルは以下の参照でさらに詳細である：

Greenberg et al., Chapter 7. Mouse models of ischemic angiogenesis and ischemia-reperfusion injury. Methods Enzymol. 444:159-74 (2008).

30

Chimenti et al., Myocardial infarction: animal models. Methods Mol. Med. 98:217-26 (2004).

Black SC, In vivo models of myocardial ischemia and reperfusion injury: application to drug discovery and evaluation. J. Pharmacol. Toxicol. Methods 43(2):153-67 (2000).

【0281】

標的化の特異性は、二重特異的融合タンパク質（または標的化ポリペプチドドメイン）沈着の比較を、Chen et al., FASEB J. 4(12):3033-39 (1990)に示されるように、固定された腎臓と固定されていない腎臓において、またはZbinden et al., Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 292: H1891-H1897 (2007)示されるように、放射性標識二重特異的融合タンパク質（または標的化ポリペプチドドメイン）を用いて、処理された後肢と未処理の後肢において、行うことにより照明できる。あるいは、二重特異的融合タンパク質（または標的化ポリペプチドドメイン）は、均質化された組織において、ELISAを用いて検出できるか、または画像化に適切な金属（例えば、Tc99、YまたはGd）で標識した二重特異的融合タンパク質（または標的化ポリペプチドドメイン）を用いてリアルタイムで画像化できる。心臓の損傷領域での特異

40

50

的な沈着は、Dumont et al., Circulation 102(13): 1564-8 (2000)に記載されるように測定できる。タンパク質の損傷組織への標的化を実行するための代表的な方法は表2に示される。

【表2】

表2. 損傷組織への標的化の実行

標的化された損傷器官または組織	標的化導入を実行するために用いられる方法	引用文献
心臓	ヒト：アネキシンVのTc99標識化、その後の心筋梗塞患者のSPECTを用いるヒトでの画像化、その後の血管形成または血栓溶解を経る再かん流への試み	Hofstra et al., The Lancet 356 (9225): 209-12 (2000)
心臓	マウス：組織学的に検出された心筋層における分配による虚血再かん流のネズミモデルにおける、アネキシンVの蛍光標識	Dumont et al., Circulation 102(13): 1564-8 (2000)
心臓	ヒト：アネキシンVのTc99標識化、その後の心臓移植拒絶反応を起こしている患者のSPECTを用いるヒトでの画像化	Hofstra et al., The Lancet 356 (9225): 209-12 (2000)
心臓	マウス：心臓組織で共焦点顕微鏡を使用して画像化された、蛍光標識された増殖因子	Urbanek, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102 (24):8692-97 (2005)
放射性標識された抗体からDNAを用いて標的化された損傷腎臓	固定された腎臓と固定されていない腎臓のレントゲン写真 腎臓の特定の細胞構造に局在化を示すマイクロオートラジオグラフ I131標識化抗体をDNAに用いた（と標識化された対照）マウス全体の画像化 非標的組織において沈着を示すI125-標識抗体の生体内分布	Chen et al., FASEB J. 4(12): 3033-9 (1990)

【0282】

上述のとおり、ある標的化ポリペプチドドメインは、標的分子（例えば、DNA、ミオシン（心臓ミオシン）はc-Met、P-セレクトリン、ICAM-1）に結合する抗体を含む。いくつかの実施形態において、標的化ドメインは抗ミオシン抗体（例えば、ヒトの心臓ミオシンに対するR11D-10、心臓ミオシン重鎖に対する2G4-sD7、ヒトの心臓ミオシン重鎖に対する1B2および5C2、ヒトの心臓ミオシンに対する2F4、ミオシンに対するモノクローナル抗体、B7抗体、B7 scFv、または当分野で既知の他の抗体）である。いくつかの実施形態において、ある標的化ポリペプチドドメインは、標的分子に結合するscFv抗体を含む。例えば、標的化ドメインは抗DNA S1-

1 scFv (aDNA S11、配列番号1または73)、抗DNA SI-22 scFv (aDNA S122、配列番号: 2) であり得る。そのような抗体およびscFv抗体の代表的なものは、本明細書において提供される配列番号1、2、30、73および76-80の配列を含むかまたは有する。いくつかの実施形態において、そのような抗体およびscFv抗体核酸配列の代表的なものは、本明細書において提供される配列番号220-224の配列を含むかまたは有する。

【0283】

またあるいは、機能的に関連する抗体も標的化ポリペプチドドメインとして使用され得ることが明らかであろう。抗体は主に6個の重および軽鎖相補性決定領域(CDRs)に位置するアミノ酸残基を通して、標的抗原と相互作用する。この理由から、CDRs内のアミノ酸配列は、CDRsの外側の配列に比べて、個々の抗体の間で多様性がある。CDR配列はほとんどの抗体抗原相互作用の原因となるので、異なる抗体からの枠組み配列と1個の抗体からのCDR系列を組み合わせることにより、元の抗体の特性を模倣するように改質された抗体を生成することが可能である。そのような枠組み配列は、生殖系抗体遺伝子配列を含む公共のDNAデータベースから得ることができる。

【0284】

したがって、本明細書において提供される標的化ポリペプチドドメイン配列の1個以上のCDRを、元の標的化ポリペプチドドメインの結合特性を保有する機能的に関連する抗体を作成するために使用できる。一の実施形態において、追加の、組み換え型に操作された標的化ポリペプチドドメインを作成するために、配列番号: 1、2、30、73および76-80から選択される1個以上のCDR領域が、既知のヒトのフレームワーク領域およびCDRと組換え的に組合せられる。重および軽鎖可変枠組み領域はいくつかのまたは異なった抗体配列に由来することができる。CDR領域は、VbaseやIMGTなどのデータベースにおける既知の配列との位置あわせを用いることで容易に同定される。得られる標的化ポリペプチドドメインは、配列番号: 1、2、30、73および76-80の標的化ポリペプチドドメインと1個以上のCDRを共有する。ある実施形態において、標的化ポリペプチドドメインは、配列番号: 1、2、30、73および76-80に記載されるCDRの1個以上を含む。

【0285】

当分野において、抗体の重および軽鎖CDR3ドメインが抗原への抗体の結合特異性/親和性において特に重要な役割を果たすことは周知である。従って、ある実施形態において、本明細書に記載される特定の抗体の重および/または軽鎖CDR3を含む抗体が、生成される。抗体はさらに本明細書に記載される抗体の重および/または、軽鎖のCDR1および/またはCDR2を含むことができる。

【0286】

上述した改変抗体のCDR1、2および/または3領域は、本明細書において開示されるように、正確なアミノ酸配列を含むことができる。しかしながら、当業者は、特に、エピトープ特異性を改変せずにCDR3配列よりもより多くの変異を許容する、CDR1およびCDR2系列のために、正確なCDR配列からの何らかの逸脱(そのような逸脱は、例えば、保存アミノ酸配列の置換である)が可能であり得ることを理解するであろう。従って、他の実施形態において、改変抗体は、本明細書で指定された抗体の対応するCDRと、例えば、80%、90%、95%、98%、99%または99.5%同一の、1個以上のCDR1およびCDR2から構成され得る。

【0287】

他の実施形態において、CDRの1個以上の残基が、結合のより好適なオンレート、または結合のより好適なオフレートを達成する結合を改質するために改変され得る。この戦略を用いて、はるかに高い結合親和力(例えば、 $K_d = 10^{-10}$ 以下)を有する抗体を得ることができる。CDR領域を改変し、続いて得られた結合性分子を結合における所望の変化のために選別するために当分野で周知の親和性成熟の技術が使用できる従って、CDRが改変されるときに、結合性と低い免疫原性の最良の組合せに最適化された抗体を得

10

20

30

40

50

るように、結合親和性の変化ならびに免疫原性を監視および記録できる。

【0288】

これらの改質後の抗原結合親和性が実質的に減少しない限り、1個以上の、抗体の可変領域の重および/または軽鎖の結合領域(すなわち、非CDR残基)または枠組み配列内で改質させることもできる。

【0289】

活性化ドメイン

活性化ドメインは、細胞ネットワークの活性または1個の位置から他の位置までの細胞の動員を検出可能に調節するあらゆるポリペプチドである。いくつかの実施形態において、活性化ドメインは、細胞表面にて受容体と結合することにより、信号変換経路を活性化することができる。いくつかの実施形態において、ある活性化ドメインは、増殖因子ポリペプチド、サイトカインポリペプチド(例えば、ケモカインポリペプチド)、またはあらゆる受容体アゴニストまたはインテグリン結合リガンドである。

そのような調節が、細胞増殖の誘導、細胞成長の誘導、細胞生存の促進および/または、アポトーシスの抑制などの細胞ネットワークの活動の増加か減少であり得ること、明らかであろう。いくつかの実施形態において、活性化ドメインは他の因子または細胞(例えば、幹細胞)を動員できる。

【0290】

増殖因子ポリペプチドは検出可能に増殖因子受容体(HGFまたはIGF受容体など)の活性化を調節する。そのようなポリペプチドのいくつかは、適切な標的細胞において対応する増殖因子受容体の活性化の測定により決定されるとして、少なくとも10%の野生型生物活性を保有する、野生型肝細胞増殖因子(HGF)、HGFアルファ鎖(例えば、GENBANK受入番号P14210)、またはその誘導体である。活性化は、例えば、本質的にはNishi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:7018-7023 (1998)に記載されるAKTのような、受容体キナーゼまたは下流タンパク質のリン酸化の測定により評価され得る。当分野で既知のMTTおよびCTGアッセイもまた、使用され得る。

【0291】

いくつかの実施形態において、活性化ドメインは増殖因子である。いくつかの実施形態において、活性化ドメインは前述のまたは変異体のタンパク質を含む。代表的な活性化ドメインは、線維芽細胞増殖因子(FGF)、線維芽細胞増殖因子1(FGF1)、線維芽細胞増殖因子2(FGF2、基本的な線維芽細胞増殖因子(bFGF)としても知られている)、線維芽細胞増殖因子2、146aa(FGF2-146aa)、線維芽細胞増殖因子2、157aa(FGF2-157aa)、線維芽細胞増殖因子4(FGF4)、線維芽細胞増殖因子7(FGF7)、上皮増殖因子(EGF)、インスリン様増殖因子(IGF)、インスリン様増殖因子1(IGF1)、インスリン様増殖因子2(IGF2)、肝細胞増殖因子(HGF)、肝細胞増殖因子-NK1ドメイン(HGF-NK1)、肝細胞増殖因子-K1ドメイン(HGF-K1)、肝細胞増殖因子-NK2ドメイン(HGF-NK2)、肝細胞増殖因子K2ドメイン(HGF-K2)、ニューレグリン(NRG、ヘレグリン(HRG)としても知られている)、ニューレグリン-1ベータ細胞外ドメイン(NRG1beta-ECD)、ニューレグリン-1ベータEGF様ドメイン(NRG1beta-EGF)、チモシン、チモシンベータ4(Tbeta4)、顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)幹細胞因子(SCF、マスト細胞増殖因子(MGF)としても知られている)、ペリオスチン、血管内皮増殖因子(VEGF、血管内皮増殖因子-Aとしても知られている(VEGF-A)、血管内皮増殖因子-A-121(VEGF-A-121)、血管内皮増殖因子-A-165(VEGF-A-165)、血管内皮増殖因子B(VEGF-B)、血管内皮増殖因子-B-167(VEGF-B-167)、血管内皮増殖因子C(VEGF-C)、間質細胞由来因子(SDF)、間質細胞由来因子-1(SDF-1)、間質細胞由来因子-1アルファ(SDF-1alpha)、血小板由来増殖因子(PDGF)、血小板由来増殖因子-AA(PDGF-AA)、血小板由来増殖

10

20

30

40

50

因子 - A B (P D G F - A B)、血小板由来増殖因子 - B B (P D G F - B B)、テラトカルシノーマ由来増殖因子 (T D G F)、テラトカルシノーマ由来増殖因子 1 (T D G F 1)、神経成長因子 (N G F)、ベータ - 神経成長因子 (b e t a - N G F)、脳由来神経栄養因子 (B D N F)、ニューロトロフィン - 3 (N T - 3)、トロンプオエチン (T P O)、形質転換増殖因子 - ベータ 1 (T G F - b e t a 1)、形質転換増殖因子 - ベータ 2 (T G F - b e t a 2)、骨形態形成タンパク質 (B M P)、骨形態形成タンパク質 - 2 (B M P 2)、一本鎖 B M P - 2 (s c B M P 2)、骨形態形成タンパク質 3 (B M P 3)、骨形態形成タンパク質 4 (B M P 4)、アクチビン A、ベータセルリン、ベータ - カテニン、d i c k k o p f ホモログ 1 (D K K 1)、エリスロポエチン (E P O)、成長ホルモン (G H)、ヘパリン結合性 E G F 様増殖因子 (H B E G F)、インスリン、インターロイキン (I L)、インターロイキン 6 (I L - 6)、インターロイキン 10 (I L - 10)、インターロイキン 33 (I L - 33)、白血病抑制因子 (L I F)、単球走化性タンパク質 1 (M C P 1、C C L 2 としても知られている)、プレイオトロフィン (P T N)、腫瘍壊死因子アルファ (T N F - a l p h a)、W n t、W n t 1、W n t 2、W n t 3 a、W n t 7 a、W n t 8 a、W n t 11、または活性化受容体のための特異性を有する抗体、それらの変異体、それらのアイソフォーム、それらの断片およびそれらの組み合わせを含むが、これらに限られるものではない。いくつかの実施形態において、活性化ドメインは、増殖因子か増殖因子ドメインの一本鎖を含むように設計される。例えば、活性化ドメインは、リンカー (例えば、G G G G S G G G S G G G S (配列番号 : 103)) を経て共に結合する増殖因子ドメイン (例えば、B M P - 2) の 2 個以上のコピーを含めるように設計され得る。

【0292】

代表的な増殖因子ポリペプチドは、本明細書において配列番号 : 3 - 9、32 - 40、または 50 - 64 で記載される配列を有する。代表的な増殖因子は、本明細書において配列番号 : 187 - 211 で記載される核酸配列によってコードされ得る。

【0293】

標的化ドメインのいくつかの C D R のために上述したとおり、ポリペプチドドメイン、1 個以上のドメインを共有する活性化ドメイン、モジュール、または活性化ドメインもしくは配列番号 : 3 - 9、32 - 40 または 50 - 64 の変異体をもつアミノ酸配列が検討される。そのようなドメイン、モジュール、またはアミノ酸配列が特定され得、そのような活性化ドメインが、周知の技術を用いることで構成され得る。したがって、ある実施形態において、活性化ドメインは、少なくとも 1 個のドメイン、モジュール、アミノ酸配列または配列番号 : 3 - 9、32 - 40 または 50 - 64 に記載される変異体を含む。同様に、サイトカインポリペプチドは、同じ方法を基に、対応するサイトカイン受容体の活性化を調節する。

ある実施形態において、活性化ドメインは、細胞表面で増殖因子と結合する、増殖因子ポリペプチドである。代表的なそのような増殖因子受容体は、上皮成長因子 (E G F)、ニューレグリン / ヘレグリン (N R G / H R G)、線維芽細胞増殖因子 (F G F)、インスリン様成長因子 (例えば、I G F - I)、血小板由来増殖因子 (P D G F)、血管内皮成長因子 (V E G F)、そのアイソフォーム (例えば、V E G F - A または V E G F - C)、テラトカルシノーマ由来増殖因子 1 (T D G F 1)、形質転換増殖因子アルファ (T G F - α)、形質転換増殖因子ベータ (T G F - β)、およびそのアイソフォーム、例えば、T G F - β 1、T G F - β 2、トロンプオエチン (T H P O) またはペリオスチンである。他のそのような受容体は、マスト / 幹細胞増殖因子受容体 (S C F R)、肝細胞増殖因子受容体 (H G F 受容体、すなわち、c - M e t)、E r b B - 2、E r b B - 3、E r b B - 4、高親和性神経成長因子受容体、B D N F / N T - 3 増殖因子受容体、N T - 3 増殖因子受容体、または血管内皮増殖因子受容体 1 (V E G F R - I) を含む。

【0294】

代表的なサイトカイン受容体は、例えば F L サイトカイン受容体、サイトカイン受容体共通ガンマ鎖のための受容体、インターロイキン - 10 受容体アルファ鎖、インターロイ

10

20

30

40

50

キン - 10 受容体ベータ鎖、インターロイキン - 12 受容体ベータ - 1 鎖、インターロイキン - 12 受容体ベータ - 2 鎖、インターロイキン - 13 受容体アルファ - 1 鎖、インターロイキン - 13 受容体アルファ - 2 鎖、インターロイキン - 17 受容体、インターロイキン - 17 B 受容体、インターロイキン 21 受容体前駆体、インターロイキン - 1 受容体 I 型、インターロイキン - 1 受容体 II 型、インターロイキン - 2 受容体アルファ鎖、インターロイキン - 2 受容体ベータ鎖、インターロイキン - 3 受容体アルファ鎖、インターロイキン - 4 受容体アルファ鎖、インターロイキン - 5 受容体アルファ鎖、インターロイキン - 6 受容体アルファ鎖、インターロイキン - 6 受容体ベータ鎖、インターロイキン - 7 受容体アルファ鎖、高親和性インターロイキン - 8 受容体 A、高親和性インターロイキン - 8 受容体 B、インターロイキン - 9 受容体、インターロイキン - 18 受容体 1、インターロイキン - 1 受容体様 1 前駆体、インターロイキン - 1 受容体様 2、トール様受容体 1、トール様受容体 2、トール様受容体 5、CX3C ケモカイン受容体 1、C - X - C ケモカイン受容体 3 型、C - X - C ケモカイン受容体 4 型、C - X - C ケモカイン受容体 5 型、C - X - C ケモカイン受容体 6 型、C - C ケモカイン受容体 1 型、C - C ケモカイン受容体 2 型、C - C ケモカイン受容体 3 型、C - C ケモカイン受容体 4 型、C - C ケモカイン受容体 6 型、C - C ケモカイン受容体 7 型、C - C ケモカイン受容体 8 型、C - C ケモカイン受容体 9 型、C - C ケモカイン受容体 10 型、C - C ケモカイン受容体 11 型、ケモカイン受容体様 2、およびケモカイン X C 受容体を含む。さらに、他の活性化ドメインは溶質キャリアー有機アニオン輸送体ファミリーのための受容体、メンバー 1A2 (SLCO1A2)、スフィンゴシンキナーゼ 1 (SPHK1)、分泌リンタンパク質 1 (SPP1) オステオポンチン (OPN) と呼ばれる、腫瘍タンパク質 53 (TP53)、トロポニン T 1 型 (TNNT1)、TSPY 様タンパク質 2 (TSPYL2)、ビスファチン、WAP4 二硫化中核ドメイン 1 (WFDC1)、チモシンベータ 4、無羽型 (wingless-type) MMTV 結合部位ファミリー、メンバー 11 (WNT11) である。代表的な活性化ドメインは、例えばレジスチン、間質性細胞由来因子 - 1 (SDF-1)、シグナル誘導性増殖関連遺伝子 1 (SIPA1)、および上述された他のリガンドのいずれか、ならびに実質的に同族の受容体に結合する能力を保有する上述の部分や誘導体、を含む。

【0295】

インテグリンは、他の細胞またはそれを囲む組織への細胞接着を仲介する受容体である。ンテグリンは細胞表面と、フィブロネクチン、ビトロネクチン、コラーゲンおよびラミニニンなどの細胞外基質成分を結合する。代表的なインテグリンは、例えば、 $\alpha_1\beta_1$ 、 $\alpha_2\beta_1$ 、 $\alpha_4\beta_1$ 、 $\alpha_5\beta_1$ 、 $\alpha_6\beta_1$ 、 $\alpha_L\beta_2$ 、 $\alpha_M\beta_2$ 、 $\alpha_{IIb}\beta_3$ 、 $\alpha_v\beta_3$ 、 $\alpha_v\beta_5$ 、 $\alpha_v\beta_6$ 、 $\alpha_6\beta_4$ 、を含む。

【0296】

初期の試験として、適切な受容体への二重特異的融合タンパク質（または、その活性剤ドメイン）の結合は、当分野で既知の技術を用いることで評価され得る。1 個の代表的なアッセイでは、適切な受容体の組換え型の細胞外ドメインで適切な固相担体をコーティングすることにより、結合が示される。二重特異的融合タンパク質の活性化ドメインによって認識されない受容体からの細胞外ドメインは、特異的対照として用いられる。また、いかなる固定された受容体も有しない支持基質は、参照として用いられる。虚血関連分子への結合のための上記と同様の方法は、使用される固相担体および結合技術に対応する標準プロトコルを用いて、受容体への特異的、用量依存的結合について実行される。また、受容体の量を変化させるか、または競合としての可溶性標的のレベルを増やすことを含む研究が、結合性および特異性を監視するために実行される。あるいは、二重特異的融合タンパク質は支持体に固定化され、対応する受容体の可溶性の細胞外ドメインの結合は、用量依存性、特異的結合性を示すために用いられる。

【0297】

二重特異的融合タンパク質の受容体への結合のための結合親和力および動的オンおよびオフレートは標準技術を用いて測定され、他の陰性対照分子（対照活性化ドメインと無関

10

20

30

40

50

系の融合タンパク質、活性剤ドメインを欠いている融合タンパク質)および陽性対照分子(増殖因子またはサイトカインなどの、組換え型の野生型受容体リガンド)と比較される。二重特異的融合タンパク質の平衡および動的結合パラメータはまた、リガンドの他の分子との融合が、リガンドのその対応する受容体との通常の結合に影響するかどうか測定するために、非融合の野生型リガンドで測定した同じパラメータと比較される。そのような情報は、二重特異的融合タンパク質の有効量を決定するために使用され得る。

【0298】

二重特異的融合タンパク質は陰性対照で観察されたそれよりも有意に高い親和性(例えば、少なくとも100倍)で固定化された増殖因子受容体、またはサイトカイン受容体に結合する。さらに、固定化された受容体への結合は、過剰の可溶性ポリペプチド、可溶性受容体、またはポリペプチドもしくは受容体に結合し、それらの相互作用を遮断する抗体を使用することで競合できる。好ましくは、二重特異的融合タンパク質は、天然のリガンドのその受容体への結合性の1000倍以内の親和性で、受容体またはサイトカインと結合する。

【0299】

二重特異的融合タンパク質(または活性化ドメイン)は、同族の受容体活性化を調節する能力をさらに有する。そのような活性は、例えば、新生子ラット心室筋細胞(NRVM)または細胞株などの培養心筋細胞を使用する、虚血再かん流の細胞モデルを使用して評価され得る。一般に、模擬的な虚血(SI)は代謝阻害剤(デオキシグルコースおよびジチオン酸塩)および代謝物質(高カリウム、乳酸、低pH)または嫌気性チャンバーでの酸欠によって引き起こされる。再かん流は、酸素処理された緩衝液中の再懸濁によって模倣される。いかなる外因性の代謝阻害剤または代謝物質がない場合、虚血—酸欠および代謝物質蓄積の2個の第一の構成要素を提供する、虚血の*in vitro*での成人心筋細胞ペレットモデルが、開発された。表3は、二重特異的融合タンパク質が心筋細胞の損害を防いで、心臓幹細胞の成長、運動性または分化を促進する、および/または損傷組織の修復を促進する能力を示すための代表的な方法を示す。

10

20

【表 3】

表 3. 活性評価方法

態様	アッセイ	引用文献
活性化ドメインの局在と保持動態	・ E L I S A による細胞溶解物中の活性化ドメインの検出 ・ 免疫蛍光（フローサイトメトリーまたは顕微鏡）による細胞中の活性化ドメインの検出	Davis, Proc Natl Acad Sci USA 103(21):8155-60 (2006) Urbanek, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102 (24): 8692-97 (2005)
活性化ドメインによるシグナル伝達	・ フローサイトメトリー、免疫蛍光、E L I S A、ホスホラベリング、またはウェスタンによる細胞中のホスホー a k t またはホスホー E R K の検出	Davis, Proc Natl Acad Sci USA 103(21):8155-60 (2006) Urbanek, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102 (24): 8692-97 (2005)
酸欠後のアポトーシスまたは他の細胞ストレス要因からの細胞の保護	・ 免疫蛍光またはフローサイトメトリーによるアネキシン V 結合 ・ カスパーゼ活性の検出 ・ T U N E L アッセイ（T U N E L - 陽性細胞の減少する数） ・ D N A ラダーリング 細胞の生存 H ₂ O ₂ 暴露に続く心筋細胞生存性の増進。棒状体細胞の数 遺伝子発現の p P C R 評価	
壊死に対する細胞の保護	H & E 染色による壊死部分の減少	
癒痕形成の減少	梗塞領域の線維芽細胞の数の減少 コラーゲン沈着減少 癒痕形成に関連する他のマトリクスタンパク質での減少	
梗塞領域への C S C の移動	c - k i t +、s c a - 1 +、M D R 1 + 細胞数、および小筋細胞へ遷移する数の時間依存性増加	Urbanek, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102 (24): 8692-97 (2005)
筋細胞修復（m y o c y t e m e c h a n i c s）および細胞融合:	筋細胞サイズの度数分布 ピーク短縮 収縮および再伸展の速度 細胞融合（X 染色体の数）の評価	Urbanek, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102 (24): 8692-97 (2005)
心臓の機能評価	M I - 処理と M I - 非処理の動物の比較 ・ L V E D P ・ L V D P ・ + d p / d T ・ L V 重量 ・ 室体積 ・ 拡張期壁応力 ・ 生存	Urbanek, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102 (24): 8692-97 (2005)
心筋再生	再生された心筋の構成 処理および非処理の動物の梗塞領域での B r d U + 細胞の評価 処理および非処理の動物の梗塞領域のミオシン + 細胞	Urbanek, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102 (24): 8692-97 (2005)
心臓の構造	梗塞面積 線維症 心筋細胞肥大	Urbanek, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102 (24): 8692-97 (2005)

【 0 3 0 0 】

天然の増殖因子およびサイトカインは活性化ドメインとして使用できる。しかしながら、そのような天然配列の部分および改変された配列を有するポリペプチドを、そのような

10

20

30

40

50

ポリペプチドが同族の受容体（例えば、以下で議論するアッセイの一つを使用する）を活性化する能力を保有し、そのようなポリペプチドが検出可能に受容体を、好ましくは天然のリガンドで観察されるものの少なくとも1%（好ましくは、少なくとも10%）程度受容体を活性化する条件で、使用でき得ることは明らかであろう。増殖因子受容体と結合するいくつかの活性化ドメインは、本明細書において配列番号：3 - 9、32 - 40、および50 - 64にて提供される。そのような配列を含む融合タンパク質の活性は当分野において周知である（例えば、Hashino et al., J. Biochem. 119(4):604-609 (1996); Nishi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:7018-23 (1998)）。

10

【0301】

特定用途のための活性化ドメインは所望の治療結果に基づいて選択され得る。一般に、例えばFGF2、VEGFアルファまたはその部分または誘導体を含み、同族の受容体に結合する能力を実質的に保有する活性剤ドメインは、血管新生を増加させるために使用され得る。生存の増加、および幹細胞の分化（再生）の目的のために、IGF、HGFまたはNRG1（または、その部分または派生物）を含む活性化ドメインが、使用され得る。

【0302】

いくつかの場合、同時に活性化ドメインと標的化ポリペプチドの両方の活動を評価することは望ましい。ELISAはこの目的のために都合よく使用され得る。

【0303】

20

標的化ポリペプチド（例えば、DNA）の基質はELISAプレートに吸着され、その後適切なBSA含有バッファーで遮断される。その後、二重特異的融合タンパク質が添加され、続いて活性化の組換え基質（例えば、活性剤が増殖因子であれば、基質は組換え型同族の受容体か受容体断片（細胞外ドメインである）が添加される。この基質は、検出のために蛍光標識されるか、またはリガンド結合にそれほど影響しない受容体の領域に標識した抗体を用いて検出される。

【0304】

一般に、二重特異的融合タンパク質の*in vivo*活性は、二重特異的融合タンパク質の活性化ドメインによって制御される分子のシグナル伝達の変化を検出することによって、評価される。これは典型的に、細胞表面受容体のリン酸化状態の変化または処理組織のフローサイトメトリー、免疫蛍光、ELISA、ホスホラベリング、またはウェスタン分析によって検出されるホスホ-AKTまたはホスホ-ERKなどの下流の伝達物質に關与する。他の機能評価は、染色による生存細胞の数およびのための試験、アネキシンV結合によるアポトーシスのレベル（免疫蛍光を経て）、またはフローサイトメトリー、カスパーゼ活性の検出、TUNELアッセイ（TUNEL陽性細胞の数の減少）またはDNAラダーリングを含む。各々の場合において、アッセイで検出された制御された分子のレベル、機能活性、またはリン酸化における変化が有意（例えば、少なくとも2倍）に誘導されていれば、二重特異的融合タンパク質は*in vivo*で機能する。

30

患者の損傷組織の修復は、あらゆる臨床的に関連している規格を使用して評価できる。例えば、筋細胞また線維芽細胞の数などの細胞数、または瘢痕化の量の定量によって、または出力のための機能的アッセイ、またはLVDP、LVDP、+dp/dT、LV重量、室体積、および拡張期壁応力を含む心臓の機能評価の構造的態様と共に、梗塞組織の修復を測定できる。そのような評価のための方法は周知であり、文献に十分に記載される。一般に、そのような臨床的評価のいずれかにおいて、有意な（例えば、少なくとも2倍の）変化をもたらすならば、二重特異的融合タンパク質は損傷組織を修復するといえる。

40

【0305】

半減期モジュレータ

当業者は、治療への応用で用いられる二重特異的タンパク質が、それらの比較的低い分子量のため最適の血清半減期を示さない可能性を理解するであろう。したがって、いくつかの治療への応用では、二重特異的タンパク質の半減期を調節することが、望ましくなり

50

得る。いくつかの実施形態において、器官の病的な障害をうけたまたは損傷した領域での二重特異的タンパク質の蓄積を達成するために、二重特異的タンパク質は半減期モジュレータと結合 (conjugate) される。そのような半減期モジュレータは融合タンパク質の生体内の半減期を増加させることができる。例えば、半減期変調器を含む二重特異的タンパク質の半減期は約 1 時間、2 時間、3 時間、4 時間、5 時間、6 時間以上である。いくつかの実施形態において、半減期モジュレータを含む二重特異的タンパク質の半減期は約 24 時間以上である。いくつかの実施形態において、半減期モジュレータを含む二重特異的タンパク質の半減期は約 1 週間以上である。

【0306】

標的化ポリペプチドドメインと活性化ドメインはペプチド結合を通して直接連結され得る。いくつかの実施形態において、それらは半減期モジュレータを経て連結され得る。好ましい実施形態において、半減期モジュレータはポリペプチドである。従って、半減期モジュレータは 2 個の末端、N - 末端、および C - 末端を有することができる。いくつかの実施形態において、連結する、半減期モジュレータが、ペプチド結合を経てある末端で標的化ポリペプチドドメインに連結され、ペプチド結合を経てもう片方の末端で活性化ドメインに連結される。ある実施形態において、リンカーは N - 末端において標的化ポリペプチドドメインの C - 末端と、C - 末端において活性化ドメインの N - 末端と連結される。他の実施形態において、リンカーは C - 末端において標的化ポリペプチドドメインと、N - 末端において活性化ドメインと連結される。またさらに、他の実施形態において、半減期モジュレータは二重特異的タンパク質の末端の一つで連結される。例えば、いくつかの実施形態において、半減期モジュレータは C - 末端において活性化ドメインの N - 末端と連結される。他の実施形態において、半減期モジュレータは標的化ドメインの C - 末端において連結される。他の実施例において、半減期モジュレータは N - 末端において活性化ドメインの C - 末端と連結できる。さらにまた、他の実施形態において、半減期モジュレータは N - 末端において標的化ドメインの C - 末端と連結できる。

【0307】

いくつかの実施形態において、半減期モジュレータは、腎クリアランスを最小にするように、二重特異的タンパク質の大きさを約 70 kDa を超えるか相当半径に推進するように設計される。いくつかの実施形態において、半減期モジュレータは、FcRn 受容体仲介の再生を通して、または、ヒト血清アルブミン (HSA) などの血清成分への結合を通して二重特異的融合タンパク質の半減期を延長するように設計される。

【0308】

好ましくは、半減期モジュレータはヒトにおいて非免疫原性である。半減期モジュレータは、少なくとも 100 の連続したアミノ酸から成る領域の上で少なくとも 50 % の配列同一性を保有する、ヒト血清タンパク質またはその誘導体であり得る。本明細書で用いられる、「配列同一性」は、ポリヌクレオチドまたはポリペプチド配列の参照配列との比較に関連して、ポリヌクレオチドまたはポリペプチド配列が最適に並べられるとき、ポリヌクレオチドまたはポリペプチド配列が同じであるか、または参照配列内の対応する位置で、特定の割合で同じヌクレオチドまたは残基を有する。

【0309】

いくつかの実施形態において、半減期モジュレータに存在する 1 個以上のグリコシル化部位のグリコシル化で半減期モジュレータを改質できる。例えば、以下のアミノ酸：アスパラギン、セリン、トレオニンを半減期モジュレータのグリコシル化を改質するために加えるか、または除くことができる。いくつかの実施形態において、二重特異的タンパク質の半減期モジュレータのグリコシル化は二重特異的タンパク質の半減期を調節できる。いくつかの実施形態において、半減期モジュレータ配列は、グリコシル化を減少させるように改質される。そのような改質は、Asn (N) の Gln (Q) または Ala (A) による置換、および / または、Ser (S) の Thr (T) または Ala (A) による置換を含む。

【0310】

ヒト血清アルブミン（HSA）は、一つにはFcRnとの結合および再生利用のため、天然に長い血清半減期を有する。HSAは血液で最も豊富なタンパク質であり、ヒトにおいて安全性が示されている。いくつかの実施形態において、HSAの503位置のアスパラギン、脱アミド化され、半減期を減少させ得る、をN503Q置換により除去できる。いくつかの実施形態において、HSAのシステインC34をセリンまたはアラニン（SまたはA）に置換して遊離システインを除去し、交互に起きるジスルフィド結合構成を最小にし得る。いくつかの実施形態において、半減期モジュレータはN503Q置換および追加のグリシン末端をもつ改質HSAのドメインIII（mHSA_{III}）の改質型である。そのような改質型はFcRnに結合するHSA特性および増加された血清半減期を保有する。いくつかの実施形態において、半減期モジュレータは、ヒト血清アルブミンアミノ酸配列（配列番号：12）と少なくとも70%、80%、85%、90%、95%同一の少なくとも100個の連続したアミノ酸を含む。いくつかの実施形態において、半減期モジュレータは、配列番号10、12、24-28、65、または67に記載された配列を含む。いくつかの実施形態において、半減期モジュレータ核酸配列は配列番号212-215に記載された配列を含む。

10

【0311】

いくつかの実施形態において、半減期モジュレータは、ヒトアルファ・フェトプロテイン（AFP）アミノ酸配列（配列番号：29、68）と少なくとも70%、80%、85%、90%、95%同一の少なくとも100個の連続したアミノ酸を含む。いくつかの実施形態において、AFPのN-結合型グリコシル化部位はN251Q置換で除去される。いくつかの実施形態において、半減期モジュレータは配列番号29、68、または69に記載された配列を含む。いくつかの実施形態において、半減期モジュレータ核酸配列は配列番号216に記載された配列を含む。

20

【0312】

いくつかの実施形態において、半減期モジュレータは、ビタミンD結合タンパク質（VDBP）アミノ酸配列と少なくとも70%、80%、85%、90%、95%同一の少なくとも100個の連続したアミノ酸を含む。いくつかの実施形態において、VDBPのN-結合型グリコシル化部位はN288QまたはN288T置換で除去される。いくつかの実施形態において、半減期モジュレータは配列番号66に記載された配列を含む。いくつかの実施形態において、半減期モジュレータ核酸配列は配列番号219に記載された配列を含む。

30

【0313】

いくつかの実施形態において、半減期モジュレータは、ヒトトランスサイレチン（TTR）アミノ酸配列と少なくとも70%、80%、85%、90%、95%同一の少なくとも100個の連続したアミノ酸を含む。いくつかの実施形態において、トランスサイレチンN118 N-結合型グリコシル化部位を除去するように改質される。いくつかの実施形態において、半減期モジュレータはトランスサイレチンの単量体型である。

【0314】

いくつかの実施形態において、半減期モジュレータは、ヒトFcアミノ酸配列と少なくとも70%、80%、85%、90%、95%同一の少なくとも100個の連続したアミノ酸を含む。抗体のFcドメインは天然に、FcRnと結合し、延長された半減期をもたらす能力を有する。いくつかの実施形態において、抗体のFcドメインはFc（ガンマ）Rと結合しないように操作される。例示的な実施形態において、FcドメインはN397をQで置換するよう操作される（N297Q変異体）。いくつかの実施形態において、半減期モジュレータはscFcと名づけられたFcの単量体型変異体である。例えば、天然に二量体化してFcを形成するIgG重鎖サブセットはヒンジ-CH2-CH3である。いくつかの実施形態において、Fcドメインは、ヒンジ-CH2-CH3-リンカー-ヒンジ-CH2-CH3を創出するために、GGGGSGGGSGGGSGGGGS（配列番号：104）のような可動性リンカーとヒンジ-CH2-CH3との結合により一本鎖を形成する操作される。例示的な実施形態において、一本鎖Fc（scFc）はN3

40

50

97をQで置換およびC220をSで置換(N297Q、C220S)するように操作される。いくつかの実施形態において、scFcドメインは配列番号71に記載された配列を含む。いくつかの実施形態において、半減期モジュレータ核酸配列は配列番号218に記載された配列を含む。

【0315】

いくつかの実施形態において、半減期モジュレータは、PASylationアミノ酸配列と少なくとも70%、80%、85%、90%、95%同一の少なくとも100個の連続したアミノ酸を含む。PASylationは、PEGylationを模倣するプロリン-、アラニン-、および/または、セリン豊富な配列(WO/2008、155134を参照)である。プロリン、アラニン、および/またはセリンのポリペプチド伸長は大きな流体力学半径で準構造化された立体的なドメインを形成し、その結果、融合タンパク質のクリアランスを抑える。いくつかの実施形態において、PASylationアミノ酸配列は約200、300、400、500または600のアミノ酸長である。例えば、PASylationはアミノ酸配列ASPAAPAPASPAAPAPSAAPA(配列番号:105)の20回の反復である。

【0316】

いくつかの実施形態において、半減期モジュレータは、アルブミン結合ドメインヒト抗体(albudaAb)アミノ酸配列(配列番号:70)と少なくとも70%、80%、85%、90%、95%同一の少なくとも100個の連続したアミノ酸を含む。アルブミン結合ドメイン抗体は、血清アルブミンに非共有的に結合することによって、融合タンパク質半減期を増加させることができる(WO2008/096158を参照)。いくつかの実施形態において、アルブミン結合ドメインヒト抗体は、Lys-Arg Kex2プロテアーゼ部位を除去し、C-末端アルギニンを除去するために操作される。いくつかの実施形態において、半減期モジュレータ核酸配列は配列番号217に記載された配列を含む。

【0317】

そのような半減期モジュレータの代表的なものとして、配列番号10、12、14-29、45-49、65-71または105のいずれかに記載された配列を含む。

【0318】

いくつかの実施形態において、半減期モジュレータはジスルフィド結合を形成する能力を減少するためにシステイン残基をセリンまたはアラニン残基で置換するように改質できる。

【0319】

半減期モジュレータは、二重特異的融合タンパク質と、単独または短い(例えば、2から20のアミノ酸残基)のコネクタポリペプチドを用いて、組み込まれ得るか、結合(conjugate)され得る。いくつかの実施形態において、コネクタポリペプチドは、半減期モジュレータの一または両端の、N-末端において、C-末端において、またはN-末端およびC-末端の両方に存在しています。リンカーのN-末端での使用のための好適な短いコネクタポリペプチドは、例えば-Gly-Ala-(GA)および-Ala-Ser-(AS)などのジペプチドを含む。リンカーのC-末端での使用のための好適な短いコネクタポリペプチドは例えば-Leu-Gln-(LQ)および-Thr-Gly-(TG)などのジペプチドを含む。いくつかの実施形態において、コネクタは2個のアミノ酸より長い。例えば、コネクタは5、10、15、20、30、40、50、60、70、80、90、100長のアミノ酸である。好ましくは、そのようなコネクタは、柔軟(例えば、グリシン豊富)であるかまたは構造化(例えば、アルファ・ヘリックス豊富)されている。いくつかの実施形態において、コネクタまたはポリペプチドリンカーは配列番号:41-42、87-91に記載された配列を有する。いくつかの実施形態において、コネクタはトランスサイレチンなどのヒトタンパク質に基づく。

【0320】

配列番号:46-49は、N-およびC-末端の両方に代表的なコネクタジペプチドを

持つ配列番号：45の半減期モジュレータを記載する。しかしながら、そのような短いコネクタポリペプチドおよび、存在するなら、配列番号：95-104または182-184に記載されるコネクタは、半減期モジュレータの1個または両方のいずれかに位置し得ることは明らかであろう。

【0321】

ある好適な半減期モジュレータは、半減期モジュレータなしの融合タンパク質と比べて、二重特異的融合タンパク質の長期の半減期を提供する。半減期モジュレータの半減期への効果は、生理条件下で安定性を決定するアッセイを用いることで評価できる。例えば、二重特異的融合タンパク質は、試料が培養直後および24時間毎に取り除かれる条件で、37で120時間、血清（例えば、ヒト血清）中で培養できる。続いて、上述された結合アッセイは、各々の時点で機能的な二重特異的融合タンパク質のレベルを検出するために実施される。続いて、このレベルは半減期比較を提供するために半減期モジュレータなしで（または異なった半減期モジュレータを使用して）組み立てられた二重特異的融合タンパク質のレベルが比較される。

10

【0322】

任意の要素および代表的な二重特異的融合タンパク質

上述されたものの追加の要素が、本明細書において提供された二重特異的融合タンパク質に任意に含まれていることは、明らかであろう。そのような要素は、二重特異的融合タンパク質の発現の促進、調製または精製、あるいは標的化の機能を果たすことを含む様々な目的のために存在し得る。例えば、N-末端リーダーポリペプチドが存在し得る。代表的なリーダーポリペプチドは、配列番号：41-42、87-91、または244のいずれか一つに記載される配列を含むかまたは有する。あるいはまた、二重特異的融合タンパク質は精製を容易にするためにポリヒスチジン（例えば、ヘキサヒスチジン）タグを含み得る。そのようなタグは、少なくとも6個のヒスチジンの連続したアミノ酸残基を含み、C-またはN-末端に位置し得る。ある実施形態において、ヘキサヒスチジンタグは二重特異的融合タンパク質のC-末端にて含まれる。追加アミノ酸残基もまた、残りの二重特異的融合タンパク質とポリヒスチジンの結合点に存在し得る。本明細書にて提供されるある二重特異的融合タンパク質は、配列番号：43、44または92-94に記載されるようなC-末端ポリヒスチジン含有ポリペプチドを含む。

20

【0323】

ある二重特異的融合タンパク質は、以下の一つを満たす一般構造体を有する（N-末端からC-末端を、左から右に示す）：

30

【表 4】

リーダ ーポリ ペプチ ド (任意)	-	標的化 ポリペ プチド ドメイ ン	-	短いコ ネクタ ポリペ プチド (任意)	-	半減期 モジュ レータ	-	短いコ ネクタ ポリペ プチド (任意)	-	活性化ド メイン	-	ポリヒ スチジ ン含有 ポリペ プチド (任意)	
または													
リーダ ーポリ ペプチ ド (任意)	-	活性化 ドメイ ン	-	短いコ ネクタ ポリペ プチド (任意)	-	半減期 モジュ レータ	-	短いコ ネクタ ポリペ プチド (任意)	-	標的化ポ リペプチ ドドメイ ン	-	ポリヒ スチジ ン含有 ポリペ プチド (任意)	10
または													
リーダ ーポリ ペプチ ド (任意)	-	半減期 モジュ レータ	-	短いコ ネクタ ポリペ プチド (任意)	-	標的化 ポリペ プチド ドメイ ン	-	短いコ ネクタ ポリペ プチド (任意)	-	活性化ド メイン	-	ポリヒ スチジ ン含有 ポリペ プチド (任意)	20
または													
リーダ ーポリ ペプチ ド (任意)	-	半減期 モジュ レータ	-	短いコ ネクタ ポリペ プチド (任意)	-	活性化 ドメイ ン	-	短いコ ネクタ ポリペ プチド (任意)	-	標的化ポ リペプチ ドドメイ ン	-	ポリヒ スチジ ン含有 ポリペ プチド (任意)	30
または													
リーダ ーポリ ペプチ ド (任意)	-	標的化 ポリペ プチド ドメイ ン	-	短いコ ネクタ ポリペ プチド (任意)	-	活性化 ドメイ ン	-	短いコ ネクタ ポリペ プチド (任意)	-	半減期モ ジュレー タ	-	ポリヒ スチジ ン含有 ポリペ プチド (任意)	40
または													
リーダ ーポリ ペプチ ド (任意)	-	活性化 ドメイ ン	-	短いコ ネクタ ポリペ プチド (任意)	-	標的化 ポリペ プチド ドメイ ン	-	短いコ ネクタ ポリペ プチド (任意)	-	半減期モ ジュレー タ	-	ポリヒ スチジ ン含有 ポリペ プチド (任意)	

【 0 3 2 4 】

代表的な二重特異的融合タンパク質は以下を含む（N - 端末から C - 端末まで）：

（ a ）リーダーポリペプチド（例えば、配列番号： 4 1 - 4 2、 8 7 - 9 1 または 2 4 4 に記載される配列を含むが有する）；

（ b ）標的化ポリペプチドドメイン（例えば、配列番号： 1、 2、 3 0、 3 1、 7 2、 7

3、76-83または85-86に記載される配列を含むか有する)；
 (c) 任意に、短いコネクタポリペプチド；
 (d) 半減期モジュレータ(例えば、配列番号：10、12、14-29、45-49、65-71、または105のいずれか一つに記載される配列を含むか有する)；
 (e) 任意に、短いコネクタポリペプチド；
 (f) 活性化ドメイン(例えば、配列番号：3-9、32-40、または50-64のいずれか一つに記載される配列を含むか有する)；および
 (g) ポリヒスチジン含有ポリペプチド(例えば、配列番号：43-44または92-94に記載される配列を含むか有するポリペプチドなどのヘキサヒスチジン含有ポリペプチド)。

10

【0325】

例えば、そのような二重特異的融合タンパク質のいくつかは以下を含む(N-末端からC-末端まで)：

(a) リーダーポリペプチド(例えば、配列番号：41-42、87-91または244に記載される配列を含むか有する)；
 (b) 標的化ポリペプチドドメイン(例えば、配列番号：1、2、30、31、72、73、76-83または85-86に記載される配列を含むか有する)；
 (c) 半減期モジュレータ(例えば、配列番号：10、12、14-29、45-49、65-71、または105のいずれか一つに記載される配列を含むか有する)；
 (d) 任意に、短いコネクタポリペプチド；
 (e) 活性化ドメイン(例えば、配列番号：3-9、32-40、または50-64のいずれか一つに記載される配列を含むか有する)；および
 (f) ポリヒスチジン含有ポリペプチド(例えば、配列番号：43-44または92-94に記載される配列を含むか有するポリペプチドなどのヘキサヒスチジン含有ポリペプチド)。

20

【0326】

他の二重特異的融合タンパク質は以下を含む(N-末端からC-末端まで)：

(a) リーダーポリペプチド(例えば、配列番号：41-42、87-91または244に記載される配列を含むか有する)；
 (b) 活性化ドメイン(例えば、配列番号：3-9、32-40、または50-64のいずれか一つに記載される配列を含むか有する)；
 (c) 任意に、短いコネクタポリペプチド；
 (d) 半減期モジュレータ(例えば、配列番号：10、12、14-29、45-49、65-71、または105のいずれか一つに記載される配列を含むか有する)；
 (e) 任意に、短いコネクタポリペプチド；
 (f) 標的化ポリペプチドドメイン(例えば、配列番号：1、2、30、31、72、73、76-83または85-86に記載される配列を含むか有する)；
 (g) ポリヒスチジン含有ポリペプチド(例えば、配列番号：43-44または92-94に記載される配列を含むか有するポリペプチドなどのヘキサヒスチジン含有ポリペプチド)。

30

40

【0327】

さらに他の二重特異的融合タンパク質は以下を含む(N-末端からC-末端まで)：

(a) リーダーポリペプチド(例えば、配列番号：41-42、87-91または244に記載される配列を含むか有する)；
 (b) 半減期モジュレータ(例えば、配列番号：10、12、14-29、45-49、65-71、または105のいずれか一つに記載される配列を含むか有する)；
 (c) 任意に、短いコネクタポリペプチド；
 (d) 活性化ドメイン(例えば、配列番号：3-9、32-40、または50-64のいずれか一つに記載される配列を含むか有する)；
 (e) 任意に、短いコネクタポリペプチド；

50

(f) 標的化ポリペプチドドメイン (例えば、配列番号：1、2、30、31、72、73、76 - 83 または 85 - 86 に記載される配列を含むか有する)；

(g) ポリヒスチジン含有ポリペプチド (例えば、配列番号：43 - 44 または 92 - 94 に記載される配列を含むか有するポリペプチドなどのヘキサヒスチジン含有ポリペプチド)。

【0328】

さらに他の二重特異的融合タンパク質は以下を含む (N - 末端から C - 末端まで)：

(a) リーダーポリペプチド (例えば、配列番号：41 - 42、87 - 91 または 244 に記載される配列を含むか有する)；

(b) 半減期モジュレータ (例えば、配列番号：10、12、14 - 29、45 - 49、65 - 71、または 105 のいずれか一つに記載される配列を含むか有する)； 10

(c) 任意に、短いコネクタポリペプチド；

(d) 標的化ポリペプチドドメイン (例えば、配列番号：1、2、30、31、72、73、76 - 83 または 85 - 86 に記載される配列を含むか有する)；

(e) 任意に、短いコネクタポリペプチド；

(f) 活性化ドメイン (例えば、配列番号：3 - 9、32 - 40、または 50 - 64 のいずれか一つに記載される配列を含むか有する)；

(g) ポリヒスチジン含有ポリペプチド (例えば、配列番号：43 - 44 または 92 - 94 に記載される配列を含むか有するポリペプチドなどのヘキサヒスチジン含有ポリペプチド)。 20

【0329】

さらに他の二重特異的融合タンパク質は以下を含む (N - 末端から C - 末端まで)：

(a) リーダーポリペプチド (例えば、配列番号：41 - 42、87 - 91 または 244 に記載される配列を含むか有する)；

(b) 標的化ポリペプチドドメイン (例えば、配列番号：1、2、30、31、72、73、76 - 83 または 85 - 86 に記載される配列を含むか有する)；

(c) 任意に、短いコネクタポリペプチド；

(d) 活性化ドメイン (例えば、配列番号：3 - 9、32 - 40、または 50 - 64 のいずれか一つに記載される配列を含むか有する)；

(e) 任意に、短いコネクタポリペプチド； 30

(f) 半減期モジュレータ (例えば、配列番号：10、12、14 - 29、45 - 49、65 - 71、または 105 のいずれか一つに記載される配列を含むか有する)；

(g) ポリヒスチジン含有ポリペプチド (例えば、配列番号：43 - 44 または 92 - 94 に記載される配列を含むか有するポリペプチドなどのヘキサヒスチジン含有ポリペプチド)。

【0330】

さらに他の二重特異的融合タンパク質は以下を含む (N - 末端から C - 末端まで)：

(a) リーダーポリペプチド (例えば、配列番号：41 - 42、87 - 91 または 244 に記載される配列を含むか有する)；

(b) 活性化ドメイン (例えば、配列番号：3 - 9、32 - 40、または 50 - 64 のいずれか一つに記載される配列を含むか有する)； 40

(c) 任意に、短いコネクタポリペプチド；

(d) 標的化ポリペプチドドメイン (例えば、配列番号：1、2、30、31、72、73、76 - 83 または 85 - 86 に記載される配列を含むか有する)；

(e) 任意に、短いコネクタポリペプチド；

(f) 半減期モジュレータ (例えば、配列番号：10、12、14 - 29、45 - 49、65 - 71、または 105 のいずれか一つに記載される配列を含むか有する)；

(g) ポリヒスチジン含有ポリペプチド (例えば、配列番号：43 - 44 または 92 - 94 に記載される配列を含むか有するポリペプチドなどのヘキサヒスチジン含有ポリペプチド)。 50

【0331】

いくつかの実施形態において、短いコネクタポリペプチドは配列番号：95 - 104または182 - 184に記載される配列を含む。

【0332】

いくつかの実施形態において、任意の短いコネクタポリペプチドはジペプチド (Gly - Ala; Ala - Ser; Leu - Gln; Thr - Gly) または配列番号：95 - 104および182 - 184に列挙される配列を有するポリペプチドである。

【0333】

代表的な二重特異的融合タンパク質は、aDNASI1__mHSA__IGF1、aPS4A7__mHSA__IGF1、aDNASI1__mHSA__HGF(NK1)、aPS4A7__mHSA__HGF(NK1)、AnxV__mHSA__FGF2、AnxV__mHSA__NRG1b(EGF)、aDNASI1__mHSA__FGF2、aDNASI1__mHSA__NRG1b(EGF)、AnxV__mHSA__VEGFB(111)、AnxV__mHSA__VEGFB(167)、AnxV__mHSA__HGF(NK1)、AnxV__mHSA__IGF1、IGF1__mHSA__AnxV、HGF(NK1)__mHSA__AnxV、NRG1b(EGF)__mHSA__AnxV、FGF2__mHSA__AnxV、VEGFB(167)__mHSA__AnxV、VEGFB(111)__mHSA__AnxV、IGF1__mHSA__B7scFv、IGF1__mHSA__Sy t1、IGF1__mHSA__aDNASI1、NRG1b(EGF)__mHSA__B7scFv、NRG1b(EGF)__mHSA__Sy t1、NRG1b(EGF)__mHSA__aDNASI1、FGF2__mHSA__B7scFv、FGF2__mHSA__Sy t1、FGF2__mHSA__aDNASI1、B7scFv__mHSA__IGF1、Sy t1__mHSA__IGF1、aDNASI1__mHSA__IGF1、B7scFv__mHSA__NRG1b(EGF)、Sy t1__mHSA__NRG1b(EGF)、B7scFv__mHSA__FGF2、Sy t1__mHSA__FGF2を含むが、これらに限られない。代表的な二重特異的融合タンパク質は、配列番号：106、108、110、112、118、120、124、126、128、130、132、134、136、140、142、144、146、148、150、152、154、156、158、160、162、164、166、168、170、172、174、176、178、180に記載される配列を有することができ、または配列番号：107、109、111、113、119、121、125、127、129、131、135、137、141、143、145、147、149、151、153、155、157、159、161、163、165、167、169、171、173、175、179または181に記載される配列を有する核酸からコードできる。

【0334】

代表的な二重特異的融合タンパク質は、DAscFv__mHSA__IGF1、DAscFv__mHSA__HGF(NK1)、AnxVm1234__mHSA__VEGFB(111)、AnxVm1234__mHSA__VEGFB(167)、AnxVm1234__mHSA__HGF(NK1)、AnxVm1234__mHSA__IGF1、AnxVm1234__mHSA__NRG1b(EGF)、AnxVm1234__mHSA__FGF2、HGF(NK1)__mHSA__AnxVm1234、NRG1b(EGF)__mHSA__AnxVm1234、FGF2__mHSA__AnxVm1234、VEGFB(167)__mHSA__AnxVm1234、VEGFB(111)__mHSA__AnxVm1234、IGF1__mHSA__DAscFv、NRG1b(EGF)__mHSA__DAscFv、FGF2__mHSA__DAscFv、DAscFv__mHSA__NRG1b(EGF)、およびDAscFv__mHSA__FGF2を含むが、これらに限定されない非結合性標的化ポリペプチドを含む。代表的な二重特異的融合タンパク質は、配列番号：114、116、138、185、246、248、254、258、260、262、264、272、274、276に記載される配列を有することができ、または配列番号：115、116、123、139、186、247、249、255、259、261、263、

10

20

30

40

50

265、273、275または277に記載される配列を有する核酸からコードできる。

【0335】

二重特異的融合タンパク質の調製

二重特異的タンパク質は液相および固相ペプチド合成および組換えDNA技術を含む標準的な技術を用いて合成し得る。固相合成のため、配列のC-末端アミノ酸は不溶性担体に取り付けられ、残余のアミノ酸は順に結合される。約50アミノ酸より長いポリペプチドに関しては、より短い領域がこの方法で合成され、続いてより長いポリペプチドを形成するため濃縮され得る。カルボキシル末端の活性化による（例えば、カップリング試薬N,N'-ジシクロヘキシルカルボジイミドの使用による）ペプチド結合を形成する方法は当分野で周知である。

10

【0336】

組換えDNA技術のため、二重特異的融合タンパク質をコードするDNAは、化学的または融合タンパク質の各々をコードするDNAを分離およびライゲートして調製される。二重特異的融合タンパク質の各セグメントをコードするDNAは既知の遺伝子から分離または*de novo*で合成され得る。DNAの直接化学合成のための方法は当分野で周知であり、そのような合成は、自動合成器を使用することにより慣習的に実施される。化学合成は一本鎖のポリヌクレオチドを製造し、それは、相補的な配列とのハイブリダイゼーション、またはDNAポリメラーゼを使用することにより二本鎖に変換される。一般に、化学DNA合成が二重特異的融合タンパク質より短い系列に制限される間、完全な二重特異的融合タンパク質がより短い配列のインフレーションでのライゲーションで得られ得ることは明らかであろう。あるいは、二重特異的融合タンパク質をコードするDNA配列は、クローニングによって調製される。クローニング技術は当分野で周知であり、例えば、*Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (3rd ed.), Cold Spring Harbor Laboratory Press (2001)*などの標準的な文献により十分に説明される。DNAの一部が、完全な長さのコード配列を生成するようにインフレーションと一緒にライゲートされ得る。

20

【0337】

いったん二重特異的融合タンパク質をコードするDNAを得ると、DNAは原核生物または真核宿主細胞における発現のためにベクターにクローニングされ得る。そのようなベクターにDNAを組み込むための技術は当業者に周知である。そのような発現ベクターの中では、二重特異的融合タンパク質をコードするDNAは、発現に必要なヌクレオチド配列（例えば、適当なプロモーターと必要なら終結シグナル）に動作可能に連結される。プロモーターは、（典型的には5'からコード配列に位置する）、隣接して連結されるコード配列の転写を指示するヌクレオチド配列である。終結シグナルは、翻訳を停止する終止コドンおよび/または転写の終止シグナルであり得る。また、追加の調節要素（例えば、エンハンサー要素）も発現ベクターの中に存在し得る。そのようなベクターは、好ましくは核外遺伝子またはウイルス・ベクターである。好ましくは、発現ベクターはさらに選択への抵抗を与える選択可能なマーカーを含む。これによって、細胞がベクターをその染色体に安定して統合することができ、（順にクローニングされ、細胞株に拡張できる増殖巣を形成できる。さまざまな選択可能なマーカーは当分野で既知であり、例えば、アンピシリン、メトロキサート、ミコフェノール酸、アミノグリコシドG-418、ハイグロマイシン、およびプロマイシンへの耐性遺伝子を含む。当業者は、大腸菌、他の細菌性宿主、酵母およびCOS、CHO、HeLaおよび骨髓腫細胞株などの様々な高等真核細胞を含む、タンパク質の発現のために利用可能は多数の発現系に詳しい。

30

40

【0338】

宿主細胞は、標準方法を使用することで二重特異的融合タンパク質をコードするDNAを含むベクターで形質転換されるか、またはトランスフェクトされる。宿主細胞における発現はDNAの対応するmRNAへの転写、続いて二重特異的融合タンパク質を生成するmRNAの翻訳をもたらす。

50

【0339】

いったん発現されると、二重特異的融合タンパク質は、例えば、硫安沈殿またはアフィニティーカラムクロマトグラフィーなどを含む標準的な手順に従って精製できる。医薬用途において、少なくとも約90～95%の同一性の実質的に純粋な構造が好ましく、98から99%以上の同一性が最も好ましい。部分的にまたは望ましい同一性までいったん精製されると、治療上使用されるには、ポリペプチドは実質的にエンドトキシンを含まないものであるべきである。

【0340】

医薬組成物

本発明はまた、本明細書に記載されるように、少なくとも1個の二重特異的融合タンパク質を少なくとも1個の生理学的に許容できる担体と共に含む医薬組成物を提供する。そのような組成物は、組織損傷を防ぐ、または損傷組織を修復または再生するために、組織損傷に罹患しているかまたはそのリスクを有する患者を治療するために使用され得る。そのような患者は例えば心筋梗塞、腎臓損傷および/または脳梗塞を経験した患者を含む。所望により、幹細胞または損傷組織の修復を容易にする他の剤などの他の活性成分が医薬組成物に含まれ得る。

【0341】

本明細書で使用される、「生理学的に許容できる」なる用語は、動物、特にヒトにおける使用のために、連邦政府または州政府の監督官庁によって承認されているかまたは、米国薬局方または他の一般に認識された薬局方に記載されることを意味する。「担体」なる用語は二重特異的融合タンパク質と共に投与される希釈剤、アジュバント、賦形剤、またはビヒクルをいう。生理学的に許容できる担体は石油、動物、植物または合成起源のものを含む、水または油などの無菌液体（例えば、ラッカセイ油、大豆油、鉱油、または胡麻油）であり得る。医薬組成物が静脈に投与されるとき、水は好ましい担体である。食塩水、および水溶性デキストロスおよびグリセロール溶液もまた、液体担体、特に注射剤に使うことができる。好適な医薬賦形剤は例えばでんぷん、ブドウ糖、乳糖、蔗糖、ゼラチン、麦芽、米、小麦粉、チョーク、シリカゲル、ステアリン酸ナトリウム、グリセロールモノステアレート、タルク、塩化ナトリウム、脱脂粉乳、グリセロール、プロピレン、グリコール、水、およびエタノールを含む。組成物はまた、所望により、少量の湿潤剤、乳化剤またはpH緩衝剤も含むことができる。

【0342】

医薬組成物は予防および/または、治療の処置のために、いかなる適切な投与方法、例えば、非経口、鼻腔内、または、経皮などの局所投与を含む、のために製剤化され得る。これらの組成物は、投与方法に適合する、溶液、懸濁液、タブレット、錠剤、カプセル剤、粉末、エアロゾルおよび徐放性製剤などの様々な周知のあらゆる形態をとることができる。組成物は伝統的なバインダーとトリグリセリドなどの担体で座薬として製剤化できる。経口製剤は、医薬品グレードのマニトール、乳糖、でんぷん、ステアリン酸マグネシウム、セルロース、炭酸マグネシウムなどの標準的な担体を含むことができる。投与と担体の好適な調剤のモードの例は、“Remington: The Science and Practice of Pharmacy,” A. R. Gennaro, ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA (21st ed., 2005)に記載される通りである。

【0343】

一般的に、本明細書で提供された医薬組成物は、非経口（例えば、静脈、筋肉内の、または、皮下の注射）、または経口摂取または局所適用で投与される。非経口的投与において、担体で二重特異的融合タンパク質を懸濁するか、または溶解することができる。一般に、無菌の水性担体、例えば水、バッファー、塩水またはリン酸緩衝生理食塩水など、が好ましい。また、無菌の固定油は溶剤または懸濁化剤として使用され得る。この目的のため、合成モノ-またはジグリセリドを含む、いかなる無菌の固定油を使用し得る。また、オレイン酸などの脂肪酸は注射用組成物の調製に使用される。医学的に許容できる、pH

調整および緩衝剤、等張化剤、分散剤、懸濁化剤、湿潤剤、洗浄剤、保存料、局部麻酔薬および緩衝剤などの補助剤も、生理的状态に近似するために含まれ得る。

【0344】

一の好ましい実施形態において、医薬組成物は患者（例えば、ヒト）への静脈内投与のために製剤化される。典型的には、静脈内投与のための組成物は無菌の等張水系バッファー溶液である。必要であるところでは、組成物が、可溶化剤および、注射の場所で苦痛を和らげるためにリグノカインなどの局部麻酔薬も含み得る。一般に、成分は、単位剤形、例えば、凍結乾燥した粉末または活性剤の量を示すアンプルまたは小袋（sachette）などの密封された（例えば、密封して封をされた）容器における無水の濃縮物、において別々に、または共に混合されて供給される。点滴によって投与される組成物であるところでは、無菌の医薬グレードの水または塩水を含む点滴ボトルに分注される。組成物が注射で投与されるところでは、成分が投与の前に混合され得るように、注射用蒸留水か塩水のアンプルを提供できる。

10

【0345】

経口での使用を意図する組成物は例えば、タブレット、トローチ、ドロップ、水性または油性の懸濁液、分散性粉末または顆粒、乳剤、ハードまたはソフトカプセル、シロップまたはエリキシル剤として存在し得る。そのような組成物は、甘味剤、香味剤、着色剤および保存料などの1個以上の成分を含み得る。タブレットは、タブレットの製造に適した生理学的許容できる賦形剤と混合された有効成分を含む。そのような賦形剤は、例えば、不活性希釈剤、顆粒化および崩壊剤、結合剤および平滑剤を含む。経口用途のための製剤化もまた、有効成分が不活性の固体の希釈剤に混合されるハードなゼラチンカプセル、または有効成分が水または油媒体に混合されるソフトなゼラチンカプセルとして存在し得る。水性懸濁液は、水性懸濁液の製造に適した1個以上の賦形剤と混合された有効成分を含む。そのような賦形剤は懸濁化剤および分散または湿潤剤を含む。加水による水性懸濁液の調製に適した分散性粉末および顆粒は、分散または湿潤剤懸濁化剤および1個以上の保存料との混合物において有効成分を提供する。

20

【0346】

油性の懸濁液は、植物油（例えば、ラッカセイ油、オリーブ油、ゴマ油またはココナッツ油）または液状パラフィンなどの鉱油において有効成分を懸濁することにより製剤化され得る。医薬組成物はまた、水中油型乳化物であり得る。油相は植物油、鉱油、またはそれらの混合物であり得る。好適な乳化剤は、例えば、天然に生成するガム類、天然に生成するリン脂質および無水物を含む。

30

【0347】

医薬組成物は、通常の滅菌処理で滅菌され得るか、または滅菌ろ過され得る。無菌の水溶液はそのまま使用されるために包装され得るか、または投与の前に無菌の水性担体と組み合わせられる凍結乾燥製品として凍結乾燥され得る。水性医薬組成物のpHは典型的に3から11の間、より好ましくは5から9の間または6から8の間、最も好ましくは7から7.5などの、7から8であろう。

【0348】

本明細書で提供される二重特異的融合タンパク質は一般的に、患者への単回投与量で治療上有効な量を送達するような濃度で医薬組成物内に存在する。治療上有効な量は、損傷組織の検出可能な修復または再生、または組織の損傷の兆候の減少のように、認識できる患者の利益をもたらす量である。治療上有効な量は、表3で例示された動物モデルの一つ以上における検出可能な組織修復または再生を達成するために十分な量から近似できる。それにもかかわらず、使用される二重特異的融合タンパク質の活性；患者の年齢、体重、健康全般、性別、および食事；投与の時間と経路；排せつ速度；複合薬などのあらゆる同時処理；治療中の患者における組織損傷の型と重症度、を含むさまざまな要素が治療上有効な量に影響するのは、明らかであろう。最適な用量は、当分野で周知の、慣用の試験、および手順を用いることで確立され得る。一般に、用量は投与量あたり約0.5 mgから約400 mgの二重特異的融合タンパク質（例えば、1投与量あたり0.5 mg、

40

50

1 mg、2 mg、5 mg、10 mg、50 mg、100 mg、200 mg、300 mg、または400 mg)までの範囲である。一般に、1日あたり、体重キログラムあたり約0.1 mgから約100 mgの範囲の投与量レベルを提供する組成物が好ましい。ある実施形態において、単位用量形態は約10 mgから100 mgの間の二重特異的融合タンパク質を含む。

【0349】

医薬組成物は、組織損傷の治療または予防のため（例えば、心筋梗塞または腎臓損傷の治療のため）にパッケージ化され得る。パッケージ化された医薬製剤は、治療上有効量の本明細書に記載されたような少なくとも1個の医薬組成物を保持する容器および含まれる組成物が患者における組織損傷（心筋梗塞または腎臓損傷など）の治療のために使用されることを示す使用説明（例えば、ラベル）を含む。医薬組成物は、各々が密封された容器において固定量の二重特異的融合タンパク質を含む、複数の単回投与単位でパッケージされ得る。あるいは、容器は医薬組成物の複数回投与を保持し得る。

10

【0350】

治療方法

医薬組成物は、患者の病理的組織障害を治療するために患者（好ましくは牛、豚、馬、鶏肉、猫、犬、またはより好ましくはヒト、などの哺乳動物）に投与できる。本発明の文脈において、「治療」なる用語は予防的および治療的投与の両方を含む。予防的応用では、本明細書に記載される医薬組成物は、組織損傷の予防、遅延または重症度の減少のために、病理的組織障害に罹患しているかそうでなければリスクのある患者に投与される。治療的応用では、治療は、病理的組織障害の重症度を減少させるか、または障害の後に組織を再生させるために実施される。いくつかの実施形態において、他の治療用の組成物と組み合わせることで医薬組成物を投与できる。

20

【0351】

代表的な病理的組織障害は、心臓組織の損傷（例えば、心筋梗塞に関する障害）、腎臓組織の損傷、および組織の損傷、および虚血性脳梗塞（例えば、脳虚血（brain ischemia）としても知られている脳の局所貧血（cerebral ischemia）、重篤な肢虚血または他の虚血）に続く組織損傷を含む。いくつかの実施形態において、障害から組織を保護するためおよび/または組織または器官障害後の組織および/または血液供給の再生のため、医薬組成物を使用できる。

30

【0352】

いくつかの実施形態において、医薬組成物を自己免疫疾患、例えばLupusとしても知られる全身性エリテマトーデス（SLE）を予防する、遅延、減少、または治療するために投与できる。SLEは多くの組織または系、例えば、関節、皮膚、肝臓、腎臓、血球、心臓、肺、神経系、血管、が攻撃されて、炎症を起こすようになる場所の自己免疫疾患である。免疫系は自己に対して、特に核タンパク質およびDNAに対して抗体を生産する。いくつかの実施形態において、医薬組成物は、それを必要とする対象に、障害から組織を保護するため、および障害の後に組織を再生するために投与できる。いくつかの実施形態において、既存の免疫抑制または他の治療と組み合わせることで医薬組成物を投与できる。

40

【0353】

いくつかの実施形態において、医薬組成物は、それを必要とする対象に、I型糖尿病を予防、遅延、減少または治療するために投与できる。I型糖尿病において、生体の自己免疫系はすい臓のインシュリン生産ベータ細胞を破壊する。いくつかの実施形態において、医薬組成物は、それを必要とする対象に、ベータ細胞を再生するために投与できる。いくつかの実施形態において、医薬組成物は、当分野で既知のI型糖尿病治療と組み合わせることで投与できる。

【0354】

いくつかの実施形態において、医薬組成物は、それを必要とする対象に、組織または器官の変性を予防、遅延、減少または治療するために投与できる。例えば、医薬組成物をアルツハイマー病、パーキンソン病、多発性硬化症、またはルー・ゲーリッグ病としても知

50

られる筋萎縮性側索硬化症（ALS）などの脳、脊椎または神経の変性を治療するために使用できる。いくつかの実施形態において、医薬組成物は、当分野で既知の既存の治療と組み合わせて投与できる。

【0355】

いくつかの実施形態において、医薬組成物は、それを必要とする対象に、骨および／または軟骨に関する疾患を予防、遅延、減少またはを治療するために投与できる。いくつかの実施形態において、骨および／または軟骨組織を再生するために医薬組成物を使用できる。医薬組成物は、当分野で既知の既存の治療と組み合わせて投与できる。

【0356】

例えば、リポソームでカプセル化、微粒子、マイクロカプセル、二重特異的融合タンパク質を発現できる組換え細胞、受容体介在、またはレトロウイルス、または他の核酸ベクターを含むあらゆる様々な既知の送達系を、二重特異的融合タンパク質を投与するために使用できる。二重特異的融合タンパク質は、いかなる便利な経路、例えば、注入、静脈内ポータス、上皮または皮膚粘膜内（例えば、口腔粘膜、直腸または腸の粘膜など）を通した吸収で投与され得、他の生理活性物質と共に投与され得る。投与は、全身または局所とできる。加えて、二重特異的融合タンパク質を心室内およびくも膜下注入を含む、あらゆる適当な経路で中枢神経系に導入することが望ましく；脳室内注射は例えば、オマヤ槽などの貯蔵槽に取り付けられた心室内カテーテルによって容易にされ得る。さらに、経肺投与も、例えば、吸入器または噴霧器の使用、およびエアロゾル化剤（aerosolizing agent）を含む製剤によって用いることができる。

【0357】

特定の実施形態において、本発明の二重特異的融合タンパク質を、局所的に、治療が必要である領域に投与することが望ましいことであり得；これは、例えば、外科手術の際の局所注入、局所的適用の方法により（例えば、外科後の創傷包帯と併せて）、注射、カテーテル、座薬、またはインプラント、該インプラントは、多孔質、無孔またはゲル状材料を有する、により達成され得る。他の実施形態において、リポソームなどの小胞を二重特異的融合タンパク質を送達するために利用できる。さらに別の実施形態において、制御放出系；例えば、そのような制御放出系は治療標的またはその近く（例えば、組織損傷をうけているか、またはリスクのある生体の器官）に位置し得る、で二重特異的融合タンパク質を送達する。そのような送達系の使用は当業者に周知である。

【0358】

いくつかの実施形態において、本明細書で提供される二重特異的融合タンパク質は、その損傷組織に幹細胞を動員する能力により、少なくとも部分的に、病理的組織障害を治療するために効果的である。ある場合において、十分な幹細胞が患者（例えば、心臓幹細胞）の中に存在し得る。しかしながら、ある実施形態において、幹細胞（例えば、自己骨髄由来幹細胞）を共投与することは、有益であり得る。そのような幹細胞は、二重特異的融合タンパク質の前または後に投与されるか、または同時に（同じ医薬組成物においてまたは分離された組成物において）、投与され得る。

【0359】

いくつかの実施形態において、本明細書で提供される二重特異的タンパク質は、組織生存の増進に有効である。いくつかの実施形態において、二重特異的タンパク質は、投与され、特定の組織または器官（例えば、心臓）を標的化することができる。二重特異的タンパク質はその後、標的化ドメインの組織関連標的分子との結合を通して、特定の組織または器官（例えば、他の器官ではない、心臓）で蓄積できる。いったん標的分子と結合すると、二重特異的融合タンパク質は標的分子から解離、離れて再度標的分子、傍分泌様方法における組織の異なる細胞（例えば、損傷細胞または「リスク」細胞）の増殖因子受容体、またはサイトカイン受容体と再結合（re-associate）できる。

【0360】

上述のように、至適用量は、当分野で既知の要素に依存するが、一般に、投与量あたり約0.5mgから約400mgの二重特異的融合タンパク質（例えば、投与量あたり10

10

20

30

40

50

mg、50 mg、100 mg、200 mg、300 mg、または400 mg)の範囲である。治療法上、二重特異的融合タンパク質の(上記の医薬組成物中の)一投与量は、時間、日、週、月、または年あたり1回以上(例えば、時、日、週、月、または年あたり2、4、5、6、7、8、9、10、11、12回)治療的に患者に投与できる。より一般的に、体重のキログラムあたり約0.1 mgから約100 mgの範囲の二重特異的融合タンパク質の量を含む日ごとまたは週ごとの単回投与で、投与される。

【0361】

他の実施形態において、二重特異的融合タンパク質を含む医薬組成物は、週あたり約0.1 mgから週あたり約2500 mg、週あたり約0.1 mgから週あたり約10 mg、週あたり約1 mgから週あたり約100 mg、週あたり約10 mgから週あたり約500 mg、週あたり約100 mgから週あたり約2500 mg、週あたり約10 mgから週あたり約100 mg、週あたり約100 mgから週あたり約1000 mgの範囲の投与量で患者に投与され得る。あるいは、二重特異的融合タンパク質を含む医薬組成物は、一日おきに約0.1 mgから一日おきに約500 mg、一日おきに約1 mgから一日おきに約75 mg、一日おきに約10 mgから一日おきに約50 mg、一日おきに約20 mgから一日おきに約40 mgの範囲の投与量で投与され得る。あるいは、二重特異的融合タンパク質を含む医薬組成物は、週あたり約0.1 mgを3回から週あたり約100 mgを3回、週あたり約1 mgを3回から週あたり約75 mgを3回、週あたり約10 mgを3回から週あたり約50 mgを3回、週あたり約20 mgを3回から週あたり約40 mgを3回、の範囲の投与量で投与され得る。

【0362】

さらなる実施形態において、二重特異的融合タンパク質を含む医薬組成物は、哺乳動物(例えば、ヒト)に1、2、3または4時間;日あたり1、2、3または4回;1日おきまたは3、4、5、または6日おき;週あたり1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10回;二週おきに;月あたり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、26、27、28、29、または30回;2ヶ月おきに;6ヶ月あたり1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10回;年あたり1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または20回;または半年おきに投与される。治療計画の間、二重特異的融合タンパク質を含む医薬組成物が、必ずというわけではないが、異なる頻度で投与され得ることは、明らかであろう。

【0363】

以下の実施例が限定の目的でなく、例示の目的で提供される。特に明記しない限り、すべての試薬および溶剤は、標準の商用グレードであり、更なる精製なしで使用される。慣用的な変更を使用して、以下の実施例で提供された手順は、本発明の範囲内で、異なる二重特異的融合タンパク質および医薬組成物を調製および使用するために、当業者により変更され得る。

【実施例】

【0364】

実施例1 代表的な二重特異的融合タンパク質の調製

標的化ポリペプチドドメインがDNAと結合し、活性化ドメインがNRG1である二重特異的融合タンパク質が調製された。2個のドメインが改質ヒト血清アルブミン(HSA)リンカーによって連結された。NRG1は短いコネクタポリペプチドを組み込むHSAリンカーのアミノ末端に組換え的に融合され、抗DNA scFvは追加の短いコネクタポリペプチドを組み込む改質されたHSAリンカーのカルボキシ末端に組換え的に融合された。改質されたHSAリンカーは2個のアミノ酸置換を含む。天然のHSAの位置34のシステイン残基は、この部位での酸化による潜在的なタンパク質の多様性を減少させるためにセリンに変異した。天然のHSAのアミノ酸503の、脱アミドに高感受性で、減少した薬理半減期をもたらす得るアスパラギン残基は、グルタミンに変異した。改質されたHSAリンカーは二重特異的融合タンパク質に延長された循環半減期を与える。

【0365】

実施例2 二重特異的融合タンパク質の *in vitro* 活性

実施例1で調製された代表的な二重特異的融合タンパク質（そこでは、標的化ポリペプチドドメインがDNAと結合し、活性化ドメインがNRG1である）の両方の部分の活性は、二重特異的融合タンパク質の両方のアームがそれらの基質に同時に結合したときにだけ活性を与えるように設計されたELISAを用いて試験された。ELISAは、本質的にStokes et al., J. Clin. Pathol. 35(5): 566-573 (1982)およびGripenberg et al., Scand. J. Immunol. 1:151-157 (1978)に記載されるとおり10
に実施された。より具体的に、二重特異的融合タンパク質の、1から50ng/mlのPBS溶液が、DNA（抗DS-DNA抗体ELISAキット（Alpha Diagnostic International, Dist by Autogen Bioclear, UK）で予備吸着されたプレートのウェルに添加され、検出抗体が添加される工程まで、製造者の指示通りに培養し、洗浄された。この段階で、100μlの1から50ng/mlビオチン化ヤギ抗ヒトNRG1-β1（R&D Systems BAF377）（「活性化アーム」への抗体）のPBS/1%BSA/0.05%Tween溶10
液が全てのウェルに加えられ、室温で1時間培養され、0.05%Tween-20と共にPBSで洗浄された。PBSで希釈された100μlのストレプトアビジン-HRP（2ug/mlのストック（R&D System 890803）の1:200の希釈）が各々のウェルに加えられ、室温で30分間培養された。0.05%Tween-20と共にPBSでの最終洗浄の後、100μlのSuperSignal ELISA Pico Chemiluminescent Substrate（製造者の説明書通りに、Piere, cat#34077）が添加され、蛍光（代表的な陽性シグナル）が、Fusion Microplate reader（Packard）または同様の機器で測定された。20

【0366】

検出されたシグナル量は、二重特異的融合タンパク質があるウェルで、DNAがないウェルまたは効力のないアーム（すなわち、活性化ドメインまたは標的化ポリペプチドドメインを含まない）を含む陰性対照に比べて、優位に高い（少なくとも100倍高い）。加えて、シグナルはウェルに加えられた二重特異的融合タンパク質の量により変化することが見られた。30

【0367】

実施例3 二重特異的融合タンパク質の *in vivo* 活性

実施例1で調製された代表的な二重特異的融合タンパク質の *in vivo* 活性は、融合タンパク質の活性化ドメインによって制御される分子におけるシグナル変化を検出することによって、決定される。この融合タンパク質NRG1の活性化ドメインにおいて、活性は、未処理または模擬処理された心臓と比較して、二重特異的融合で処理された心臓における、リン酸化Erbb-3の増加の検出によって評価される。心筋梗塞は、C57BL/6マウスで気管内挿管、換気、および開胸に続く左冠状動脈（LCA）のライゲーションで発生する。冠動脈閉塞症は左室壁の色変化の迅速な検査および胸の閉鎖前の心電図のST上昇によって確認される。模擬処理マウスは、LCAライゲーションなしで同じ外科の手順を受けた。40

【0368】

対照および二重特異的融合タンパク質処理マウスからの、心筋梗塞の誘導に続くかまたは正常なマウスの心臓は、Dhein, Mohr and Delmar, Practical Methods in Cardiovascular Research, 2005, p. 473（Springer, New York）に記載されるように、取り出され、4%のパラホルムアルデヒドで固定され、包埋され、区分され、標本にされた。ホスホ-Erbb3抗体（Cell Signaling Technology; Beverly (MA)）は、免疫蛍光によるホスホ-Erbb3の検出に使50

用される。未処理の心臓に対して、処理したものにおいてホスホ - E r b B 3 レベルの 2 倍の増加かそれ以上が観察され、機能的な活性化剤を暗示した。この増加は、シグナルを示す細胞の数 (1 領域あたりの数、または全体に占める割合)、細胞あたりのシグナル強度の増加、またはそれらの両方のいずれかである。

【 0 3 6 9 】

実施例 4 二重特異的融合タンパク質を用いるマウスでの組織損傷修復

実施例 1 の代表的な二重特異的融合タンパク質を含む組成物を、上述通りの心筋梗塞の誘導に続いて、マウスに投与した。投与は静脈注射である (例えば、尾静脈)。投与に続いて、心臓機能は以下の通り評価される。マウスを抱水クロラル (4 0 0 m g / k g 体重、腹腔内) で麻酔し、閉胸標本における左室 (L V) 圧および L V + および - d P / d t の測定のため、右頸動脈にマイクロチップ圧力トランスデューサ (モデル S P R - 6 7 1、M i l l a r) をカニューレ挿入する。測定は二重特異的融合タンパク質による処理が心臓機能に影響することを確認するために未処理の対照マウスから得られたものと比較される。これらの測定の少なくとも一つを用いて評価した心臓機能において、有意な改善が観察された。

【 0 3 7 0 】

実施例 5 融合タンパク質の発現および精製

標的化ドメイン、半減期モジュレータ、および活性化ドメインを含む融合タンパク質が設計され、発現され、精製された。標的化ドメインおよび活性化ドメインの様々な組み合わせは、異なる方向における m H S A (配列番号 1 0) 半減期モジュレータ、異なる短いコネクタポリペプチド配列、および異なるポリペプチドリーダー配列で組み立てられた。合成 D N A 配列は、意図する発現生物 (例えば、C H O または P i c h i a p a s t o r i s) のコドン使用頻度、特定の制限酵素認識部位を含めるまたは避けるという要望、および当分野で既知のコドン最適化のための他の要素を考慮して各々のアミノ酸配列について設計された。D N A 配列は、発現プラスミド、該プラスミドは発現生物に形質転換され、融合タンパク質が過剰発現される、に構築され、および / または組み立てられた。各々の融合タンパク質は、C i b a c r o n B l u e S e p h a r o s e クロマトグラフィー、N i 親和性クロマトグラフィー、陰イオン交換クロマトグラフィー、およびサイズ排除クロマトグラフィーを含む異なる方法の組合せを用いて精製された。

【 0 3 7 1 】

完全な融合タンパク質または融合タンパク質に組み込まれるべき部分 (例えば、個々の標的化ドメイン、半減期モジュレータドメイン、または活性化ドメイン) をコードする D N A は、商業ソース (B i o B a s i c、D N A 2 . 0) より購入した。アミノ酸配列は明らかに定義された。コドン使用頻度や制限部位 (要求されるか、または禁止される) などの制約は業者に伝えられた。興味のあるタンパク質をコードする最終的な D N A 配列が、i s o - コード配列の理論上のプールから、それらの規制、および低い発現 (m R N A レベルにおける高い二次構造の回避など)、および業者の選好を避けるための一般的な戦略に従い、業者により選択された。いくつかの場合、コドン使用頻度は C H O または P i c h i a 単独に合わせた。他の場合において、各々の生物の分配でまれなコドン避けるために、組合せコドン使用頻度表が用いられた。いくつかの場合、完全長の融合タンパク質は、発現ベクターにおいて業者により供給された。他の場合において、興味のある発現ベクターのサブクローニングが必要であった。サブクローニング操作は、I I 型制限酵素と D N A リガーゼ (N e w E n g l a n d B i o l a b s) を用いる伝統的な方法を使用することで実行された。代替の組み合わせおよび標的化、活性化、および半減期モジュレータドメインの方向をもつ融合タンパク質を精算するための追加の分子クローニングは、これらの技術ならびにポリメラーゼ連鎖反応 (P C R) を使用することで実施された。融合タンパク質は、機能的ドメインのいずれかの容易な置換または再構築のため、D N A レベルで機能的ドメインの間の連結点に位置する 1 個以上の I I 型制限部位と設計された。必要ならば、制限部位またはリンカー領域が、P C R に使用されるプライマーにそれらを組み込むことにより配列に加えられた。

【0372】

いくつかの場合、タンパク質は、P i c h i a P i n k E x p r e s s i o n S y s t e m (I n v i t r o g e n A 1 1 1 5 1 キット) を用いて、P i c h i a p a s t o r i s で発現された。興味のあるタンパク質をコードする遺伝子が、組換えタンパク質の分泌を許容する発現 p P i n k α - H C プラスミドを使用して、S a c c h a r o m y c e s c e r e v i s i a e α 接合因子分泌シグナルで、インフレイムでクローニングされた。他の場合において、タンパク質は、S e l e x i s / C H O のクローン系を用いて精製された。興味があるタンパク質をコードする遺伝子は、組換えタンパク質の発現を許容するために、S e l e x i s ベクターにクローニングされ、ポリクロニアル C H O - K 1 細胞にトランスフェクトされた。p P i n k α - H C プラスミドは、大腸菌において環状プラスミドの増殖および選択のための細菌性の複製起点 (p U C) および耐性マーカー (アンピシリン) を含む。それはまた、P i c h i a への形質転換の間に線形ベクターの統合を標的化するために用いられる、T R P 2 遺伝子、および P i c h i a のアデニン栄養要求性の補足のために含まれる、A D E 2 遺伝子も含む。A O X 1 プロモーターはメタノール誘導で高レベルの転写を確実にし、C Y C 1 配列は効率的な転写終結を確実にする。プラスミドへの A D E 2 欠損 P i c h i a の統合はアデニン欠損培地における生存駆動の選択 (v i a b i l i t y - d r i v e n s e l e c t i o n) ならびにコロニー色調に基づくスクリーニングを可能にした。高いコピー要素は白く見えたが、低いコピー要素は P i c h i a 空胞における、プリン前駆体の蓄積のためピンクまたは赤に見えた。白いコロニーがタンパク質産生のために選択され、いくつかの場合において、いくつかのコロニーが大規模生産 (リットル) の前に小規模のタンパク質生産 (ミリリットル) の効率のためにスクリーニングされた。p P i n k α - H C プラスミドマップおよび詳細は I n v i t r o g e n より利用可能である。

【0373】

他の場合では、タンパク質は、S e l e x i s / C H O クローン系を使用することで精製された。例示的な発現ベクターは p M P 2 0 K (S E L E X I S) であり、例示的細胞株は C H O - k 1 - S (S E L E X I S) である。p M P 2 0 K は一般的に使用された遺伝要素を使用する。発現はヒトの G A P D プロモーターによって駆動される。M a t r i x A t t a c h m e n t R e g i o n または M A R 要素といわれる遺伝要素は、染色質の動的組織化を制御し、周囲の染色質の効果から隣接する遺伝子を隔離し、その結果、コピー数依存、位置依存の遺伝子発現を増加させる。M A R 要素は、組換えタンパクの所望のレベルの発現を示すクローンの分離の確率を改善し、生産の安定性を増加させることを示した。発現プラスミドに加えて、抗生物質耐性プラスミド (p S V 2 - n e o 、S E L E X I S など) もまた、安定した形質転換体の選択のために、使用された。発現プラスミドは直線化され (例えば、P v u l で) 、その後 Q I A Q U I C K 精製 (Q I A G E N) が続いた。L i p o f e c t a m i n e L T X (I n v i t r o g e n) は、O p t i M e m I (G i b c o) における C H O 細胞へのトランスフェクションのために使用された。トランスフェクトされた細胞は、10% F B S 含有 F 1 2 H a m s 培地で2日間選択圧なし、その後4日間の選択圧で回復され、次いで、選択圧ありの無血清培地に変更された。H y C l o n e 登録商標 (T h e r m o S c i e n t i f i c) は、H T 補完剤 (G I B C O) と共に、H S A - 融合 B B A に使用される。

【0374】

発現に続いて、製造者の指示 (G E H e a l t h c a r e) に従って、タンパク質は C i b a c r o n B l u e S e p h a r o s e クロマトグラフィー、N i 親和性クロマトグラフィー、陰イオン交換クロマトグラフィー、およびサイズ排除クロマトグラフィーの組み合わせで精製された。タンパク質生産は、ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動 (S D S - P A G E) により監視された。

【0375】

P i c h i a p a s t o r i s のタンパク質の発現とクロマトグラフィーによるその後の精製。

興味のあるタンパク質をコードする遺伝子が、組み換えタンパク質の分泌発現を許容するために、pPink α -HCプラスミド(Invitrogen A11151キットを含む)を使用して、*Saccharomyces cerevisiae* α 接合因子分泌シグナル(配列番号244、245)でインフレームでクローニングされた。加えて、His6-タグをコードするDNAは、Ni親和性クロマトグラフィーにおいて組み換えタンパク質の精製の選択肢を許容するために遺伝子の3'末端に加えられた。簡潔に、プラスミドは化学的に有用な*Pichia Pink Strain 2*(Invitrogen、カタログ番号A11154)に形質転換され、培養物はBMMY(バッファー複合グリセロール培地=1%酵母エキス、2%ペプトン、100mM磷酸カリウム、pH6.0、硫酸アンモニウム含有、アミノ酸なしの1.34%Yeast Nitrogen Base、0.0004%ビオチン、1%グリセロール)中で、振盪培養器で30℃でOD600=2~6まで生育された。このとき細胞はペレット状となり、タンパク質の発現が元の培地の1/5容量のBMMY(バッファー複合メタノール培地=1%酵母エキス、2%ペプトン、100mMリン酸カリウム、pH6.0、硫酸アンモニウム含有、アミノ酸なしの1.34%Yeast Nitrogen Base、0.0004%ビオチン、0.5~1%メタノール)での培地の交換により誘導された。培養物は、その後、振盪培養器で20~30℃にて追加の24~48時間で生育された。12~24時間ごとに、追加のメタノール(最終濃度0.5~1%(v/v)まで)が培地に追加された。採取時点で、細胞は遠心分離によりペレット状となり、上澄みが回収され、滅菌ろ過され、精製まで(典型的には採取から3日以内)4℃にて保管された。

【0376】

以下の融合タンパク質は、下記の方法に基づいて精製されたIGF1__mHSA__AnxV(配列番号136、137);IGF1__mHSA__AnxVm1234(配列番号138、139);NRG1b(EGF)__mHSA__AnxV(配列番号142、143);NRG1b(EGF)__mHSA__AnxVm1234(配列番号254、255);FGF2__mHSA__AnxV(配列番号144、145)。組み換えタンパク質は、製造者の指示に従い、重力流で、Ni Sepharose 6 Fast Flow樹脂(GE Healthcare 17-5318-04;樹脂1mL/50mLの上澄み)を使用するNi親和性クロマトグラフィーによって精製された。これらの精製からの素通り画分はその後、50mM NaCl、20mM Tris、pH7.0にバッファー交換し、遠心分離を用いて、同じバッファーで平衡したHiTrap Blue HP 1mLカートリッジ(GE Healthcare、17-0412-01)にロードされた。製造者の指示に従い、タンパク質は、20mM Tris、pH7.0、50mM NaCl、溶出バッファーとしての30mMオクタン酸ナトリウムを使用することで精製された。Ni親和性クロマトグラフィーおよびBlue Sepharoseクロマトグラフィーからの溶出液は、組み合わせられ、遠心濃縮器を用いて、PBS(100mMリン酸ナトリウム、150mM NaCl)pH7.2に濃縮/バッファー交換された。試料は、次にHiPrep 26/60 Sephacryl S-200 High resolutionカラム(GE Healthcare 17-1195-01)にロードされ、タンパク質はPBS(100mMリン酸ナトリウム、150mM NaCl)、pH7.2、1.3mL/分の流速で溶出した。(SDS-PAGE)で同定されるような、興味のあるタンパク質を含む画分がプールされ、遠心濃縮器を用いて濃縮された。

【0377】

最終的な純度はSDS-PAGEによって評価された。図1はIGF1__mHSA__AnxV(136)、IGF1__mHSA__AnxVm1234(138)、NRG1b(EGF)__mHSA__AnxV(142)、およびNRG1b(EGF)__mHSA__AnxVm1234のSDS-PAGEを示す。レーン1はタンパク質分子量標準に対応する。レーン2、4、6は非還元性条件のタンパク質試料に対応する。レーン3、5、7、9は還元性条件(50mMジチオスレイトール(DTT))のタンパク質試料に対応する。図1に示されるように、融合タンパク質(配列番号136)はSDS-PAGEゲル上

の正しい分子量 (MW) (MW = 111 kDa が予想される) に泳動した。純度は > 80 % である。DTT がいないとき、いくつかのダイマー (< 10 % の総タンパク量) が存在し、タンパク質は二重バンドとして泳動した。切断 (truncation) は、観測された二重バンドパターンの原因であるかもしれない。図 1 に示すように、以下のタンパク質 IGF1__mHSA__AnxVm1234 (配列番号 138)、NRG1b (EGF)__mHSA__AnxV (配列番号 142)、NRG1b (EGF)__mHSA__AnxVm1234 (配列番号 254) は SDS-PAGE ゲル上の正しい分子量 (MW) (MW = 111 kDa が予想される) に泳動した。これらの融合タンパク質の純度は 80 % より優れていた。DTT がいないとき、いくつかのダイマー (< 10 % の総タンパク量) が存在し、ダイマーは DTT の添加で除去された。

10

【0378】

精製の後、FGF2__mHSA__AnxV 融合タンパク質 (配列番号 144) の純度は約 50 % であった。融合タンパク質は二重バンドとして泳動し、そのうちの一つは正しい MW (120 kDa) であり、一つは下側の MW であった。この結果は、下側の分子量バンドが切断産物であることを示唆し得る。

【0379】

組み換え型の融合タンパク質 AnxV__mHSA__FGF2 (配列番号 118) は、製造者の指示に従い、重力流で、Ni Sepharose 6 Fast Flow 樹脂 (GE Healthcare 17-5318-04; 樹脂 1 mL / 50 mL の上澄み) を使用する Ni 親和性クロマトグラフィーによって精製された。結合 / 洗浄バッファーは 20 mM リン酸カリウム、pH 7.4、500 mM NaCl、25 mM イミダゾールから構成され、溶出バッファーは 20 mM リン酸カリウム、pH 7.4、500 mM NaCl、450 mM イミダゾールから構成された。精製に続いて、純度が SDS-PAGE により評価された。融合タンパク質は、ゲルの上を正しい MW (120 kDa) で泳動し、80 % より優れた純度を示した。

20

【0380】

AnxV__mHSA__NRG1b (EGF) (配列番号 120、121)、AnxVm1234__mHSA__NRG1b (EGF) (配列番号 116、117)、AnxV__mHSA__IGF1 (配列番号 134、135)、AnxVm1234__mHSA__IGF1 (配列番号 114、115)、AnxVm1234__mHSA__FGF2 (配列番号 264、265)、IGF1__mHSA__B7scFv (配列番号 150、151)、aDNASI1__mHSA__FGF2 (配列番号 124、125)、aDNASI1__mHSA__NRG1b (EGF) (配列番号 126、127)、IGF1__mHSA__Synt1 (配列番号 152、153)、Synt1__mHSA__IGF1 (配列番号 170、171)、IGF1__mHSA__aDNASI1 (配列番号 154、155) NRG1b (EGF)__mHSA__B7scFv (配列番号 156、157) は、下記の方法に従って精製された。Blue Sepharose 6 Fast Flow 樹脂 (GE Healthcare 17-0948-03) は、通常の手順を用いて Econo-pac (Bio-Rad 732-1010) カラム (内径 1.5 cm; 4 mL 樹脂 / カラム) に充てんされた。クロマトグラフィーは 8 チャンネルぜん動ポンプを用いて実施された。カラムは 50 mM NaCl、20 mM Tris、pH 7.0 を含むバッファー (Blue Sepharose Wash Buffer) で平衡化された。タンパク質を発現する上澄みの伝導度は脱イオン水で Blue Sepharose Wash Buffer に適合するように (伝導度計を用いて測定されるものとして) 調製された。各々のタンパク質発現培養物からの上澄みは 4 ~ 5 mL / min でカラムにロードされた。カラムは 5 ~ 10 カラム容量の Blue Sepharose Wash Buffer で洗浄された。タンパク質はその後、5 ~ 10 カラム容量の低塩 (LS) 溶出バッファー (20 mM Tris、pH 7.1、50 mM NaCl、45 mM オクタン酸ナトリウム) で溶出された。いくつかの場合 (配列番号 120、116、134、114、264 を有するタンパク質) において、この溶出工程は 5 x 1.5 mL 画分 (A1 ~ 5) に続いて、7 x 4 m

30

40

50

Lの画分(B1~7)に分割された。

低塩溶出バッファーでの溶出に続いて、5カラム容量の高塩(HS)溶出バッファー(20mM Tris、pH7.1、1M NaCl、45mMオクタン酸ナトリウム)で追加のタンパク質を溶出した。画分は、タンパク質含有量のために遠心限外濾過(Sartorius-Stedim、VS2022)で濃縮され、PD-10カラム(GE17-0851-01)を使用して0.1Mリン酸ナトリウム、0.15M NaCl、pH7.2に脱塩してSDS-PAGEによって分析された。興味があるタンパク質を含む画分がプールされた。AnxV__mHSA__NRG1b(EGF)(配列番号120)融合タンパク質の画分はSDS-PAGEにより分析された。精製された融合タンパク質は約50%の純度であった。SDS-PAGEの分析はゲル上に二重バンドを示した。バンドの一つは完全長の融合タンパク質の予想されたMW(112kDa)であり、バンドの一つはそれが切断産物であったと示唆し得る下側のMWで特徴付けられた。8. AnxVm1234__mHSA__NRG1b(EGF)(配列番号116)融合タンパク質の画分はSDS-PAGEにより分析された。SDS-PAGE分析は約50%の純度を示し、ゲル上に二重バンドを示した。バンドの一つは完全長の融合タンパク質の正しいMW(112kDa)であり、バンドの一つはそれが切断産物であったと示唆し得る下側のMWで特徴付けられた。AnxV__mHSA__IGF1(配列番号134)融合タンパク質の画分はSDS-PAGEにより分析された。SDS-PAGE分析は約50%の純度を示し、ゲル上に二重バンドを示した。バンドの一つは完全長の融合タンパク質の正しいMW(111kDa)であり、バンドの一つはそれが切断産物であったと示唆し得る下側のMWで特徴付けられた。AnxVm1234__mHSA__IGF1(配列番号114)融合タンパク質の画分はSDS-PAGEにより分析された。SDS-PAGE分析は約50%の純度を示し、ゲル上に二重バンドを示した。バンドの一つは完全長の融合タンパク質の正しいMW(111kDa)であり、バンドの一つはそれが切断産物であったと示唆し得る下側のMWで特徴付けられた。AnxVm1234__mHSA__FGF2(配列番号264)融合タンパク質の画分はSDS-PAGEにより分析された。SDS-PAGE分析は約50%の純度を示し、ゲル上に二重バンドを示した。バンドの一つは完全長の融合タンパク質の正しいMW(120kDa)であり、バンドの一つはそれが切断産物であったと示唆し得る下側のMWで特徴付けられた。IGF1__mHSA__B7scFv(配列番号150)融合タンパク質の画分はSDS-PAGEにより分析された。SDS-PAGE分析は50%より高い純度を示し、ゲル上に二重バンドを示した。バンドの一つは完全長の融合タンパク質の正しいMW(102kDa)であり、バンドの一つはそれが切断産物であったと示唆し得る下側のMWで特徴付けられた。aDNASI1__mHSA__FGF2(配列番号124)融合タンパク質はSDS-PAGEにより分析され20%未満の純度を示し、完全長の融合タンパク質の正しいMW(110kDa)に対応するバンドを示した。下側のMWバンドの存在は、タンパク質が開裂または切断され得たことを示唆した。aDNASI1__mHSA__NRG1b(EGF)(配列番号126)融合タンパク質はSDS-PAGEにより分析され50%未満の純度を示し、完全長の融合タンパク質の正しいMW(110kDa)に対応するバンドを示した。下側のMWバンドの存在は、タンパク質が開裂または切断され得たことを示唆した。IGF1__mHSA__Synt1(配列番号152)融合タンパク質はSDS-PAGEにより分析され約50%の純度を示し、完全長の融合タンパク質の正しいMW(91kDa)に対応するバンドを示した。下側のMWバンドの存在は、タンパク質が開裂または切断され得たことを示唆した。Synt1__mHSA__IGF1(配列番号170)融合タンパク質はSDS-PAGEにより分析され50%未満の純度を示し、完全長の融合タンパク質の正しいMW(91kDa)に対応するバンドを示した。下側のMWバンドの存在は、タンパク質が開裂または切断され得たことを示唆した。IGF1__mHSA__aDNASI1(配列番号154)融合タンパク質はSDS-PAGEにより分析され約50%の純度を示し、完全長の融合タンパク質の正しいMW(102kDa)に対応するバンドを示した。NRG1b(EGF)__mHSA__B7scFv(配列番号156)融合タンパク質はSDS-PAGEにより分析さ

10

20

30

40

50

れ50%未満の純度を示し、完全長の融合タンパク質の正しいMW(102kDa)に対応するバンドおよび切断産物に対応し得る下側のMWバンドを示した。

【0381】

AnxVmHSA(配列番号252、253)およびAnxVm1234__mHSA(配列番号250、251)融合タンパク質は下記の方法で精製された。タンパク質は硫酸アンモニウム(82%の最終濃度まで加えられる)によりPichia発現上澄みから沈殿された。沈殿は、PBSバッファーに再懸濁され、一晚、PBSに対して透析された。透析に続いて、タンパク質は50mM NaCl、20mMリン酸カリウム、pH7.0で平衡化されたHiPrep 26/60 Sphacryl S-200 High Resolutionカラム(GE Healthcare 17-1195-01)にロードされた。タンパク質は同じバッファーで溶出され、溶出液からの画分はSDS-PAGEで分析され、興味のあるタンパク質を含む画分がプールされた。次に、このプールされた溶出液は20mMリン酸カリウム、50mM NaCl、pH7.0で平衡化された1mL HiTrap Q Sepharose Fast Flowカラム(GE Healthcare 17-5053-01)にロードされた(1mL/分の流速で)。タンパク質は溶出バッファー(20mMリン酸カリウム、500mM NaCl、pH7.0)で、1mL/分にて20カラム容量の勾配で溶出した。画分は集められ、SDS-PAGEで分析された。興味のあるタンパク質を含む画分がプールされた。最終純度は還元剤の存在または不存在下でSDS-PAGEによって評価された。融合タンパク質AnxVmHSA(配列番号252)はSDS-PAGEで分析され、完全長のタンパク質の予想されたMW(104kDa)に対応するバンドと共に90%より高い純度を示した。いくつかのダイマー(総タンパク量の<10%)が存在したが、DTTの存在で除去された。融合タンパク質AnxVm1234__mHSA(配列番号252)はSDS-PAGEで分析され、完全長のタンパク質の予想されたMW(104kDa)に対応するバンドと共に、90%より高い純度を示した。いくつかのダイマー(総タンパク量の<10%)が存在したが、DTTの存在で除去された。

【0382】

Selexis/CHO発現系におけるタンパク質の発現とクロマトグラフィーによるその後の精製。

興味のあるタンパク質を発現する安定したSelexis CHO細胞株は、振盪培養器で5~8%のCO₂、37℃にて無血清培地で培養された。成長に使用される培地は：1LのEx-Cell登録商標CD CHO Fusion培地(Sigma、14365C-1000ML)、40mLの200mM L-グルタミン(Invitrogen、25030-081)、10mLの100X HT補完剤(Invitrogen、11067-030)であった。細胞の播種密度は0.3~0.5×10⁶細胞/mLであった。いったん2~4×10⁶細胞/mLに達すると、希望の培養液量(6L)に達するまで、培養物が希釈された。Cell Boost溶液(1LのddH₂O、35gのCell Boost5(Hyclone、30865.01)、20gのD-グルコース、NaOHでpHを7.0に調整)は、最終的な大きい培養物に、播種した3~5日後に(Cell Boostの量=培養物の7-12%)加えられた。興味のある分泌タンパク質を含む細胞上清が、培養物生存率が90%より下に下降すると(培養物をその最終容量に希釈した後~1週間)、すぐに採取された。細胞上清が遠心分離によって採取され、滅菌ろ過された。精製が1週間以内に実施される場合は、上清は4℃で保存され、そうでなければ、上清は-80℃で保存された。

【0383】

融合タンパク質aDNASI1(L23)__mHSA__HGF(NK1)(配列番号110、111)、DAscFv__mHSA__IGF1(配列番号246、247)、DAscFv__mHSA__HGF(NK1)(配列番号248、249)は下記の方法で精製された。Selexis/CHO発現からの上澄みは、ddH₂Oで1:0.5に希釈され、5mL Blue Sepharoseカラムに2回通された。タンパク質は45m

Mオクタン酸ナトリウムを含むバッファーで希釈され、PBSに対して透析した。タンパク質は、次に、ddH₂Oで1:1に希釈し、1mLのQ陰イオン交換カラムにロードされて、緩やかな勾配（勾配 = 10% B、A = 1:1 PBS:水、B = PBS中の1M NaCl、PBS = 標準Dulbecco PBS、Mg/Caなし）で溶出した。興味のあるタンパク質を含む画分はブールされ、アリコート中で凍結された。最終的な純度はSDS-PAGEにより評価された。すべての精製タンパク質が、90%より高い純度を示し、SDS-PAGEにおいて単一のバンドに泳動した。図14は予想された114kDaのMWにおける単一のバンドを有するaDNASI1(L23)_mHSA_HGF(NK1)（配列番号110）融合タンパク質のSDS-PAGEを示した。図15は予想された102kDaのMWにおける単一のバンドを有するDAscFv_mHSA_IGF1（配列番号246）融合タンパク質のSDS-PAGEを示した。図15は予想された115kDaのMWにおける単一のバンドを有するDAscFv_mHSA_HGF(NK1)（配列番号248）融合タンパク質のSDS-PAGEを示した。

【0384】

実施例6 二重特異的融合タンパク質の損傷細胞への特異的結合

標的化ドメイン、半減期モジュレータ、および活性化ドメインを含む融合タンパク質が作成され、標的化ドメインを通して*in vitro*での損傷細胞に特異的に結合するその能力が検証された。使用される標的化ドメインは、アポトーシスの間、外側の細胞表面で露出されるようになるホスファチジルセリンに結合する、ヒトアネキシンV（AnxV、配列番号31）であった。特異的結合は、異なる活性化ドメインをもつ融合タンパク質、および異なる融合方向性（例えば、N-末端活性化ドメインとC-末端標的化ドメイン、およびN-末端標的化ドメインとC-末端活性化ドメイン）による融合タンパク質を含む、さまざまな融合タンパク質に示された。特異的結合はまた、心筋細胞および胚幹細胞由来（ESC由来）心臓細胞を含む、異なる細胞型の損傷細胞への結合も示した。いくつかの場合、心筋梗塞後の*in vivo*での細胞損傷状態を模擬するための酸化的ストレスを誘導するため、細胞は過酸化水素（H₂O₂）で損傷された。アネキシンVの非結合性変異体（AnxVm1234、配列番号84）含む融合タンパク質は、損傷細胞に結合せず、融合タンパク質の結合がアネキシンV標的化ドメインによって調節されたことを示した。全体的に見て、これらのデータは融合された標的化ドメインの特異的結合を通して、活性化ドメインを特異的に損傷細胞に送達する融合タンパク質の能力を示す。

【0385】

細胞への融合タンパク質の結合はフローサイトメトリーを使用して観察された。アポトーシス細胞死は過酸化水素（H₂O₂）処理からの酸化的ストレスによって誘導された。アポトーシスを起こした細胞または死細胞が、ヨウ化プロピジウム（PI）での標識化、または蛍光アネキシンVを基にした市販のアポトーシス検出キットによる標識化により同定された。いくつかの場合、融合タンパク質はまず、後の検出のために蛍光染料で、共有結合で標識化された。これらの場合において、融合タンパク質の非結合性変異体で培養された同等な細胞が、PI陽性であるが融合タンパク質蛍光陰性である一方、アポトーシスを起こした細胞への融合タンパク質の特異的結合は、PIおよび融合タンパク質蛍光の両方に陽性である細胞を観察することにより示された。他の場合において、融合タンパク質は最初に共有結合で標識化されず、代わりに、タンパク質融合で半減期モジュレータに結合する蛍光標識された二次抗体が、融合タンパク質の検出のために使用された。これらの場合では、アポトーシスを起こした細胞への融合タンパク質の特異的結合は、市販のアネキシンVを基にした検出キットからの蛍光シグナルの量と、融合タンパク質二次抗体からの蛍光シグナルの量の間の強い相関関係を示すことにより、示された。

【0386】

A. IGF1_mHSA_AnxVのアポトーシスを起こした心臓細胞への特異的結合。
融合タンパク質IGF1_mHSA_AnxV（配列番号136）およびIGF1_mHSA_AnxVm1234（配列番号138）は、実施例5に記載の通り、発現され、精製された。両方のタンパク質は、製造者の指示に従い、Alexa Fluor 488

8 (Alexa Fluor 488 マイクロスケールタンパク質標識化キット、Invitrogen、A30006) で共有結合で標識化された。HL-1 細胞 (William C. Claycomb、Louisiana State University Health Sciences Center)、成熟心筋細胞の特性をもつ心筋細胞株、はゼラチン/フィブロネクチンでプレコートされた 96 ウェルのプレート (BD/Falcon、353072) に、10% FBS (Sigma、12103C)、2 mM L-グルタミン (Invitrogen/Gibco、25030)、100 U/mL ペニシリン + 100 ug/mL ストレプトマイシン (Invitrogen/Gibco、15070) および 0.1 mM ノルエピネフリン (Sigma、A0937) を含む完全培地 (Claycomb 培地 (Sigma、51800C) 中に 1:3 で播種され、37 および 5% の CO₂ で培養された。2 日後に、細胞に、400 uM H₂O₂ (Sigma、H1009) が補足された培地 0.1 mL/ウェルが供給され、37 および 5% の CO₂ で 15 分間培養された。次に、H₂O₂ が補足された培地を各ウェルから吸引し、完全培地に置き換え、細胞は 37 および 5% の CO₂ で 20 ~ 24 時間培養された。翌日、離れた細胞を集めるため、各ウェルからの培地が 96-deepwell v-bottom プレート (USA Scientific、1896-1110) に移された。細胞は 1 回、PBS (Sigma、D8537) で洗浄され、次に、40 µL の 0.025% トリプシン-EDTA を使用してトリプシン処理され、37 の培養器に置かれた。細胞分離は顕微鏡で監視され、トリプシンを非活性化するために 10% FBS を加えた 100 µL/ウェルの DMEM が加えられた。細胞は冷 PBS で洗浄され、100 µL の結合バッファー (Annexin V-FITC アポトーシス検出キット、BD Biosciences、556547 の成分) に再懸濁された。Alexa Fluor 488 標識化融合タンパク質が次いで添加され、氷上で 1 時間、暗所で培養された。アポトーシスを起こした細胞の陽性対照検出は、アネキシン V-FITC アポトーシス検出キット (BD Biosciences、556547) を用いて得られた。どちらの場合も、3 µL のヨウ化プロピジウム (PI) が培養の最終 15 分で添加された。細胞は BD FACSCanto II フローサイトメータで、適切な非染色および単一染色 (single stain) された対照を校正のために使用して、分析された。

【0387】

アポトーシスを起こした細胞は、BD Biosciences アポトーシス検出キットからのアネキシン V-FITC およびヨウ化プロピジウム (PI) で共標識 (co-label) された (図 2 および 3)。56% の細胞は、アポトーシスまたは細胞死の遅延を示す、二重陽性の象限にあった。陽性および陰性の集団は適正に分離された。

【0388】

IGF1__mHSA__AnxV (配列番号 136) および IGF1__mHSA__AnxVm1234 (配列番号 138) は、それぞれ、7.1 および 8.1 mol 染料/mol タンパク質の標識化度 (DOL) を達成して、Alexa Fluor 488 でそれぞれ標識された。アポトーシスを起こした細胞はまた、80 ng (7.1 nM) の IGF1__mHSA__AnxV および PI (図 4 および 5)、または 80 ng (7.1 nM) の IGF1__mHSA__AnxVm1234 および PI (図 6 および 7) で共標識された。IGF1__mHSA__AnxV によって標識された細胞は、融合タンパク質がアポトーシスを起した細胞または死細胞に特異的に結合したことを示す、アポトーシス検出キットの陽性対照と非常に類似した、非常によく分離された二重陽性のピーク (細胞の 53%) を示した。他方では、IGF1__mHSA__AnxVm1234 によって標識された細胞は二重陽性のピークを示さず (細胞の 0%)、これは非結合性標的化アームが、計画されたようにアポトーシスを起した細胞または死細胞に結合しなかったことを示した。まとめると、これらのデータは、標的化ドメインとしてのアネキシン V (AnxV) を含む融合タンパク質がアポトーシスを起したまたは死滅した心臓細胞に特異的に結合でき、従って、障害をうけたまたは損傷した心臓組織を治療するために、活性化ドメインなどの生物学的 (例えば、治療法の) 効果を有する融合剤または分子を送達するために使用され得ることを

示した。

【0389】

B. IGF1__mHSA__AnxVのアポトーシスを起こした心臓細胞への特異的結合。

実施例6Aで観察された、アポトーシスを起した心臓細胞への結合がIGF1__mHSA__AnxV融合タンパク質のAnxV標的化ドメインに特異的であり、細胞表面IGF受容体へのIGF1ドメインの結合の結果でないことを検証するため、いかなる／全てのIGF1細胞表面受容体を飽和および遮断するためのIGF1予備培養工程を含めた実験を繰り返した。H₂O₂濃度を200 μMとした以外は、実施例6Aと同じ方法を用いた。加えて、結合バッファーへの細胞の再懸濁の後に、しかしAlexa Fluor 488で標識された融合タンパク質の添加の前に、いかなる／全てのIGF1細胞表面受容体を予備遮断するために、800 nMのIGF1 (Calbiochem、407240) が添加され、10分間培養された。

10

【0390】

図8および9におけるアネキシンV - FITCおよびPI陽性対照は、約40%が、遅延されたアポトーシスまたは細胞死の集団を示す、二重陽性であることを示した。図10および11は、実施例6Aに示されたように、非結合性対照融合、IGF1__mHSA__AnxVm1234が結合を示さなかった(図12および13)一方で、アポトーシスを起した細胞へのIGF1__mHSA__AnxVの結合を示した。次に、IGF1__mHSA__AnxVが感知され得る程度にIGF1ドメインを通して細胞に結合しなかったことを示すために、アッセイはIGF1遮断工程を加えて繰り返された。図14および15は、過剰なIGF1の存在下、およびそこでの培養後でさえ、アポトーシスを起した細胞とIGF1__mHSA__AnxVの結合を示した。これらのデータは、AnxV標的化ドメインが、タンパク質融合体のアポトーシスを起した細胞への特異的結合に関与することを示した。

20

【0391】

C. AnxV__mHSAの、アポトーシスを起したESC由来心臓細胞への特異的結合。

AnxV__mHSA (配列番号252) およびAnxVm1234__mHSA (配列番号250) は、製造者の指示に従って、Alexa Fluor 647 (Alexa Fluor 647カルボン酸、スクシンイミジルエステル、Invitrogen、A-20006) に直接結合 (conjugate) された。胚幹細胞由来 (ESC由来) 心臓細胞 (Peter Zandstra, University of Toronto) は、本質的にはYang et al (Nature 2008, 453: 524 - 8) に記載の通りに得られた。Bauwens CL, et al. . Tissue Eng Part A. 2011 Apr 25. , Geometric Control of Cardiomyogenic Induction in Human Pluripotent Stem Cells. " からプロトコルを得た。凝集を基にしたhESCsの分化が、以前に記載した心筋系列への分化に向けられる、無血清のプロトコルを使用して実施された。hESC凝集体サイズは、マイクロウェルの加工された表面 (textured surface) を含む、AggreWell™ インサート (STEMCELL Technologies) 中で、定められた細胞濃度での強制的な凝集によって制御された。簡潔に、フィーダー枯渇hESCの単一細胞懸濁液は1000細胞/ウェルの密度でAggreWell™ に沈降された。細胞は低酸素状態で、ROCK阻害剤および0.5 ng/mlのBMP4の添加と共に、基本培地としてのGlutamax、アスコルビン酸、トランスフェリン、ペニシリン/ストレプトマイシンが補足されたStemPro34中で一晩凝集させた。1日目に、培地は、10 ng/mlのBMP4、3 ng/mlのアクチビンA、および5 ng/mlのbFGFをもつ基本培地で置き換えられた。4日目に、細胞はマイクロウェルから取り出され、DMEM F12で洗浄され、5% KOSRを補足して、10 ng/mlのVEGFおよび150 ng/mlのDkk1をもつ基本培地中の低クラスプレートに移された。8日目に、培地を10 ng/mlのVEGF、150 ng/mlのDkk1、および5 ng/mlのbF

30

40

50

G Fをもつ基本培地で置き換えられた。12日目に、再び培地を置き換え（同じサイトカイン）、16日目までに細胞を正常酸素圧条件に移した。

【0392】

P I 標識およびアネキシン V - F I T C 検出キットに基づき、H₂O₂またはドキシソルピシン処理なしでも、心臓細胞は測定可能なアポトーシスを起した集団を示す（図16）。ドキシソルピシンの更なる添加はアポトーシスを起した画分を増加させなかった。それにもかかわらず、アポトーシスを起した細胞集団はアポトーシス標的化融合タンパク質の結合を試験するのに十分であった。心臓細胞集団はまた、アネキシン V - F I T C 検出キットで共培養される間、A n x V __ m H S A または A n x V m 1 2 3 4 __ m H S A のどちらかと共に培養された。A n x V m 1 2 3 4 __ m H S A 融合からではなく、A n x V __ m H S A 融合での A l e x a F l u o r 6 4 7 からの蛍光シグナルは、アポトーシス検出キットからの F I T C シグナルと強く相関し（図17）、これは A n x V __ m H S A がアポトーシスを起した E S C 由来心臓細胞に特異的に結合することを示した。

【0393】

D . A n x V __ m H S A __ N R G 1 b (E G F) の、アポトーシスを起した E S C 由来心臓細胞への特異的結合。

アポトーシスを起した E S C 由来心臓細胞との融合タンパク質 A n x V __ m H S A __ N R G 1 b (配列番号 1 2 0) の結合は、共有結合している蛍光色素分子での融合タンパク質の第一の改変の代わりに、二次検出計画を使用することで示された。融合タンパク質は製造者の指示に従って A l e x a F l u o r 6 4 7 (A l e x a F l u o r 6 4 7 カルボン酸、スクシンイミジルエステル、I n v i t r o g e n、A - 2 0 0 0 6) によってそれ自身が共有結合で標識された抗 H S A 抗体（アフィニティー精製したヤギ抗ヒトアルブミン抗体、B e t h y l L a b s、A 8 0 - 1 2 9 A）を使用して検出された。心臓細胞は実施例 6 C に記載の通り、アネキシン V - F I T C 検出キットで共培養される間、A n x V __ m H S A __ N R G 1 b (E G F) と培養された。融合タンパク質は抗 H S A A l e x a F l u o r 6 4 7 二次抗体により検出された。A l e x a F l u o r 6 4 7 からの蛍光シグナルは、アポトーシス検出キットからの F I T C シグナルと強く相関した（図18）。これは A n x V __ m H S A __ N R G 1 b (E G F) がアポトーシスを起した E S C 由来心臓細胞に特異的に結合することを示した。さらに、融合タンパク質を除いた（図18の「リガンドなし」）が、二次検出試薬でまだ培養された対照実験は、A l e x a F l u o r 6 4 7 シグナルとアポトーシスを基にする F I T C 信号に少しの相関関係も示さず、これは、元の A l e x a F l u o r 6 4 7 蛍光シグナルが二次抗体単独での結合によるものではなく、融合タンパク質自身の結合によるものであることを示した。

【0394】

実施例 7 . 融合タンパク質のそれらの標的への特異的結合

患者の疾患関連領域に治療額を局所化するプロセスは、興味のある領域に制限されるかまたは特に豊富である分子エピトープを標的とすることによって達成できる。例えば、心筋梗塞は、この目的に利用できる、組織損傷の数個の標的分子（例えば、DNA、心臓ミオシン、およびホスファチジルセリン）を露出できる。いくつかの融合タンパク質が、これらの標的分子に特異的な標的化ドメインを含むように作成された。特に、アネキシン V およびシナプトタグミンはホスファチジルセリンを標的とするために使用でき、S I - 1 一本鎖可変断片 (a D N A S I s c F v) は DNA を標的とするために使用できる。しかしながら、当業者は、融合タンパク質に結合ドメインを含めることが各々の個々のドメインの特性の欠失または変化（例えば、結合親和性の変化、生物活性の変化）をもたらし得ることを理解するであろう。本明細書に開示された融合タンパク質の機能性が維持されるかどうかを決定するため、E L I S A を基にした i n v i t r o での結合テストが開発され、適用された。本質的には、アッセイは、標的に適した融合タンパク質が、ウェル表面に覆われた同族の標的分子とのそれらの相互作用によって、激しい洗浄にも関わらず、マイクロプレートウェルに保持されたことを示した。融合タンパク質の存在は免疫化学

的に定量された。同族の標的分子が存在しない、または同族でない標的分子が存在するとき、予期しない標的化ドメインの交差反応の不存在下で、保持は予想されなかった。同族の標的分子のあるときの保持、およびないときのクリアランスの組み合わせは、結合特異性および標的化機能の証拠であった。

【0395】

マイクロプレート (Pierce 15041) は、興味のあるエピトープでコーティングされた。ホスファチジルセリン (PS, Avanti Polar Lipids 840032) は、50 μ L / ウェルの 12.5 μ g / mL のメタノール中の溶液を蒸発して乾燥することにより被覆された。DNA (Sigma D3664) は、10 μ g / mL の DNA および DNA Coating Reagent (Pierce 17250) の予備混合された 1 : 1 の溶液の 50 μ L をウェルに添加することにより、被覆された。ミオシンは、Dulbecco の PBS 中の 10 g / mL 溶液を培養することにより、被覆された。全ての被覆反応が室温にて 2 時間、200 rpm で振動しながら実施された。洗浄の後、250 μ L / ウェルでタンパク質なしの遮断バッファー (Pierce 37572) が加えられ、プレートは室温で 3 ~ 4 時間培養された。さらなる洗浄の後、100 μ L のクロマトグラフィー精製融合タンパク質が、160 ng / mL ~ 20 μ g / mL の範囲の濃度でウェルに加えられた。結合は、10 mM HEPES、140 mM NaCl、2.5 mM CaCl₂、pH 7.4 中で、室温で 2 時間進行した。さらなる洗浄の後、100 μ L の検出抗体 (HRP 結合ヤギ抗ヒトアルブミン抗、Bethyl Labs A80-129P) が、各々 PBST で 1 : 5,000 または 1 : 50,000 の希釈度でウェルに添加され、30 ~ 60 分間培養された。さらなる洗浄の後、75 μ L のペルオキシダーゼ基質 (Pierce TMB Ultra 34028) がアプライされ、有意な着色を観察して、反応は 75 μ L の Stop 溶液 (KPL 50-85-05) でクエンチされた。ウェルの吸光度はプレートリーダー (Tecan M200 Pro) で 450 nm にて読みとられた。すべての融合タンパク質および抗体の組み合わせは三重で実施された。すべての洗浄工程は、自動化 96 ウェルプレート洗浄器 (Biotek, ELx405) を用いて、サイクルの間に、5 秒の浸漬のある 250 μ L の PBST 投入および吸引、および振盪工程がある工程の 4 サイクルで構成された。模擬コートされた空のウェル (溶媒、コート試薬、またはバッファーのみ) および融合タンパク質のないウェルは陰性対照として含まれた。

【0396】

融合タンパク質は、実施例 5 で詳述されるように、作成された。IGF1-mHSA-Syt1 (配列番号 152) および IGF1-mHSA-AnxV (配列番号 136) はホスファチジルセリンに特異的に結合することを示した (図 19)。aDNASI1-mHSA-FGF2 (配列番号 124)、aDNASI1-mHSA-NRG1b (EGF) (配列番号 126)、および、IGF1-mHSA-aDNASI1 (配列番号 154) は、DNA に特異的に結合することを示した (図 20)。

【0397】

融合タンパク質は、標的分子と特異的に結合することを示し、これは標的化ドメインを半減期モジュレータおよび活性化ドメインに融合したあとで、機能的な結合の保持を示し、さらにまた融合タンパク質に融合される能力を有する標的化ドメイン (ならびに標的) の幅を実証する。ホスファチジルセリンなどの特定の標的はアネキシン V およびシナプトタグミンなどのさまざまな結合ドメインに対処し得る。逆に、aDNASI1 がそのメンバーである、抗体由来 scFv のような、特定のタンパク質のクラスは、対応する多種の標的分子またはエピトープに結合するメンバーの大きな多様性を有する。融合タンパク質への scFv の成功した組み込みは、他の融合タンパク質における抗体由来標的化の応用の可能性を示すものである。aDNASI1 ドメインはさらに、N - または C - 末端融合方向性のいずれにおいて、ならびに様々な活性化ドメインを含む融合において機能的であることが示された。総合すると、これらの結果は、融合タンパク質の標的化が、特定の標的エピトープ、特定の標的化ドメインのクラス、特定の翻訳方向性、または特定の活性化

ドメイン含有分子制限されないであろうことを確認する。

【0398】

実施例8．細胞活性の改質

精製融合タンパク質の活性化ドメインの生物活性は、刺激細胞において下流のシグナル伝達を測定することにより、*in vitro*で示された。融合タンパク質の有効性は野生型、非融合活性化ドメインのものと比較された。異なる活性化ドメイン、異なる標的化ドメイン、および異なる融合方向性があるさまざまな融合タンパク質が作成され、生物活性を示した。これらのデータは、融合タンパク質が生物活性であり、生存促進または増殖の経路などの細胞経路にシグナル伝達できるように作成できることを示す。

【0399】

各融合タンパク質は陽性対照、市販で得られた非融合型のその活性化ドメイン、と並んで試験された。活性標的化ドメイン（例えば、AnxV）ならびに非結合対照標的化ドメイン（例えば、AnxVm1234またはDAscFv）のある融合タンパク質の両方が使用され、活性化ドメインの活性が標的化ドメインの固有性および機能から独立していることが示された。刺激されるべき細胞が生育され、血清飢餓し、その後融合タンパク質で刺激された。次に、タンパク質は洗い流され、細胞活性はホスホ-Akt（pAkt）またはホスホ-Erk（pErk）のいずれかのためにELISAによって測定された。

【0400】

A.NRG1b（EGF）融合タンパク質を用いる癌細胞でのAKT活性の刺激。

実施例5に記載のように、融合タンパク質NRG1b（EGF）__mHSA__AnxV（配列番号142）およびAnxV__mHSA__NRG1b（EGF）（配列番号120）が作成された。野生型NRG1b（EGF）はR&D Systems（396HB/CF）から入手された。DU145細胞、ヒト前立腺癌、上皮性細胞は、10%のFBS（Hyclone、SH30071）、2mMのL-グルタミン（Invitrogen/Gibco、25030）および50U/mLペニシリン+50ug/mLストレプトマイシン（Invitrogen/Gibco、15070）を含む完全培地RPMI-1640（（Invitrogen/Gibco、11875））中で、96ウェルプレート（BD/Falcon、353072）に25,000の細胞/ウェルで播種されて、一晚、37 °Cおよび5%のCO₂で培養された。翌日、培地が吸引され、細胞は0.1mL/ウェルのPBS（カルシウムおよびマグネシウムのない、Sigma、D8537）で洗浄され、細胞は0.1mL/ウェルのRPMI-1640+0.5%のFBSで再供給され、細胞は20~24時間、37 °Cおよび5%のCO₂で培養された。翌日、細胞は、既存の0.1mL/ウェルに25μL/ウェルで添加する希釈された融合タンパク質または対照タンパク質で37 °Cおよび5%CO₂で10分間刺激された。刺激はウェルから培地を吸引して停止され、0.2mL/ウェルの冷PBSで洗浄された。細胞はあらかじめ調製された、25μL/ウェルの完全M-PER溶解バッファ（哺乳動物タンパク質抽出試薬（Pierce/ThermoScientific、78501）150mM NaCl、プロテアーゼ阻害剤カクテル（Roche complete mini、04693124001）、およびホスファターゼ阻害剤（Roche PhosSTOP、04906837001））で溶解された。プレートは密封され、細胞はオービタルシェーカーで4 °Cにて30分間溶解され、溶解物はドライアイス上で寒気凍結され、-78 °Cで保管された。384ウェル平滑白色プレート（MaxiSorp、Nunc、460372）が、抗Akt捕捉抗体（clone SKB1、Millipore、05-591）でコートされ、密封され、室温で一晩保管された。

【0401】

翌日、細胞溶解物が解凍され、ELISAプレート洗浄および遮断された。解凍された溶解物はプールされ、ELISAプレートは再度洗浄され、Akt標準またはプールされた溶解物がELISAプレートに加えられ、プレートは室温で2時間培養された。ELISAプレートは洗浄され、抗ホスホ-Akt検出抗体（ビオチニル化したマウスmAb、Cell Signaling、5102）が加えられ、プレートは1.5時間室温で培

10

20

30

40

50

養された。プレートは洗浄され、そして、ストレプトアビジン - ホースラディッシュ・ペルオキシダーゼ (S A - H R P、R & D S y s t e m s、8 9 0 8 0 3) が添加され、プレートは30分間、室温で培養された。プレートは再度洗浄され、基質 (S u p e r S i g n a l E L I S A P i c o C h e m i l u m i n e s c e n t、P i e r c e / T h e r m o S c i e n t i f i c、3 7 0 6 9) が添加され、蛍光がプレートリーダーで読み取られた。p A k t 標準曲線は直線 (両対数スケール) に合わせられた。

【0402】

N R G 1 b (E G F) および N R G 1 b (E G F) _ m H S A _ A n x V の活性は図21に示される。市販野生型 N R G 1 b (E G F) と融合タンパク質の両方が、p A k t 経路を刺激する、生物活性を示した。同様に、図22は野生型および逆方向融合タンパク質、A n x V _ m H S A _ N R G 1 b (E G F) の活性を示す。これらの結果は、N R G 1 b (E G F) 活性化ドメインから m H S A および A n x V に翻訳されるように融合しても、実施例5で発現および精製された N R G 1 b (E G F) 融合タンパク質が生物活性であるのと同様に、その生物活性が無効にならなかったことを示す。

10

【0403】

B . I G F 1 融合タンパク質を用いる癌細胞での A K T 活性の刺激。

融合タンパク質、I G F 1 _ m H S A _ A n x V (配列番号 1 3 6)、I G F 1 _ m H S A _ A n x V m 1 2 3 4 (配列番号 1 3 8)、および I G F 1 _ m H S A _ B 7 s c F v (配列番号 1 5 0) は、実施例5に記載の通り作成された。野生型 I G F 1 は C a l b i o c h e m (4 0 7 2 4 0) から入手された。D U 1 4 5 細胞は、実施例8Aに記載の通り、生育され、刺激された。3個すべての I G F 1 を基にしたタンパク質融合が、D U 1 4 5 癌細胞で、野生型 I G F 1 と同様の p A k t 刺激で、生物活性を示した (図 2 3 ~ 2 4 参照)。

20

【0404】

C . I G F 1 融合タンパク質を用いる心臓細胞での A K T 活性の刺激。

融合タンパク質 I G F 1 _ m H S A _ A n x V (配列番号 1 3 6) は、実施例5に記載の通り作成された。野生型 I G F 1 は C a l b i o c h e m (4 0 7 2 4 0) から入手された。H L - 1 細胞 (W i l l i a m C . C l a y c o m b、L o u i s i a n a S t a t e U n i v e r s i t y H e a l t h S c i e n c e s C e n t e r)、成熟心筋細胞の特性をもつ心筋細胞株、はゼラチン / フィブロネクチンでプレコートされた96ウェルのプレート (B D / F a l c o n、3 5 3 0 7 2) に、10% F B S (S i g m a、1 2 1 0 3 C)、2 m M L - グルタミン (I n v i t r o g e n / G i b c o、2 5 0 3 0)、1 0 0 U / m L ペニシリン + 1 0 0 u g / m L ストレプトマイシン (I n v i t r o g e n / G i b c o、1 5 0 7 0) および 0 . 1 m M ノルエピネフリン (S i g m a、A 0 9 3 7) を含む完全培地 (C l a y c o m b 培地 (S i g m a、5 1 8 0 0 C) 中に 6 0 , 0 0 0 細胞 / ウェルで播種され、3 7 °C および 5 % の C O 2 で一晩培養された。細胞は実施例8Aに記載の通り、洗浄され、E L I S A プロトコルに供された。

30

【0405】

I G F 1 _ m H S A _ A n x V 融合タンパク質は、心臓細胞に生物活性を示し、その効力は野生型 I G F 1 に匹敵する程度であった (用量反応活性、図 2 5 を参照)。これらのデータは、半減期モジュレーターと標的化ドメインに融合された活性化ドメインが、作成でき、細胞を強力に刺激する能力を保持できることを示す。

40

【0406】

F G F 2 融合タンパク質は心臓細胞の E P K 活性を刺激する。

胚幹細胞 (E S C、P e t e r Z a n d s t r a ' s l a b a t T h e U n i v e r s i t y o f T o r o n t o により提供された) から得られた心筋細胞は、ゼラチンでプレコートされた96ウェルプレートに、3 8 . 5 X S t e m P r o - 3 4 栄養補助剤 (S t e m P r o - 3 4 培地にて提供)、2 m M L - グルタミン (I n v i t r o g e n / G i b c o、2 5 0 3 0)、5 0 U / m L ペニシリン + 5 0 u g / m L ス

50

トレプトマイシン (Invitrogen / Gibco、15070)、0.4 mM モチオグリセロール (Sigma、M6145)、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ アスコルビン酸 (Sigma、A4544)、150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ トランスフェリン (Sigma、T8158)、10 ng/mL VEGF (R&D Systems、293-VE)、150 ng/mL DKK-1 (R&D Systems、5439-DK)、および 5 ng/mL 塩基性 FGF (FGF2、PeproTech、100-18b) が補足された StemPro-34 培地 (Invitrogen / Gibco、10639) 中に、40,000 細胞/ウェルで播種され、37 °C および 5% の CO_2 で一晩培養された。刺激の 24 時間前に、増殖培地は栄養補助剤および増殖因子なしの StemPro-34 に変更した。細胞は実施例 8 A に記載の通り、刺激され、溶解された。ELISA において、96 ウェルの高結合性黒色 ELISA プレートがホスホ-Erk1 / Erk2 捕捉抗体 (R&D Systems、DYC1018) でコートされ、密封され、室温にて一晩保管された。翌日、溶解物は、ホスホ-Erk1 / Erk2 標準 (R&D Systems、DYC1018) およびホスホ-Erk1 / Erk2 検出抗体 (R&D Systems、DYC1018) が、Akt 標準と抗ホスホ-Akt 検出抗体の代わりに活性 Erk1 / Erk2 レベルを測定するために使用されたことを除いて、実施例 8 A に記載の通り、ELISA プロトコルに供された。融合タンパク質 AnxV_mHSA_FGF2 (配列番号 118) は、pERK ESC 由来心臓細胞の刺激について野生型 FGF2 と比較され、生物活性を示した (図 26)。

10

【0407】

20

実施例 9 . アポトーシスを起こした細胞で蓄積する融合タンパク質の蓄積および細胞活性の刺激

融合タンパク質が、その標的化ドメインを通して細胞に特異的に結合し、次にそれらの活性化ドメインを通して細胞のシグナル伝達経路を刺激する能力は *in vitro* で示された。使用される標的化ドメインは、ヒトアネキシン V (AnxV、配列番号 31) であった。AnxV はアポトーシスの間、外側の細胞表面に露出されるようになるホスファチジルセリンに結合できる。使用される活性化ドメインは、細胞表面で発現された IGF1 受容体に結合する IGF1 (配列番号 3) であった。いったん結合すると、IGF1 受容体は細胞内シグナル伝達を開始する。融合タンパク質は、最初に、心筋梗塞後の *in vivo* での細胞の損傷状態を模擬する、アポトーシスを起した心臓細胞に結合された。融合タンパク質結合細胞は、次いで、正常な心臓細胞における IGF1 シグナル伝達を刺激するために使用され、これは梗塞域でまたは近くで、損傷または正常な細胞の近傍のシグナル伝達を活性化する融合タンパク質の傍分泌作用を模擬した。ホスホ-Akt、IGF1 シグナルの下流標的、は ELISA によって測定された。細胞結合融合タンパク質は心臓細胞において Akt シグナル伝達を刺激できた。野生型 IGF1 は Akt シグナル伝達を誘導せず、これは、融合タンパク質のアネキシン V 標的化ドメインが、シグナル伝達を起すために重要であることを示した。同様に、AnxV_mHSA 融合タンパク質は Akt シグナル伝達を誘導せず、これは、標的化ドメイン自身がシグナル伝達に十分でなかったことを示した。まとめると、これらのデータは、標的損傷組織に特異的である能力があること、および傍分泌様形式で活性化ドメインを通じて細胞経路でシグナル伝達を行う能力があるという融合タンパク質の二重機能性を示す。この結果は、正常組織でなく損傷組織に特異的に蓄積され、活性化ドメインを通して生存または再生を調節するという融合タンパク質の治療的な役割を示す。

30

40

【0408】

第一の工程では、融合タンパク質は、アポトーシスを受けている HL1 心筋細胞におけるアネキシン V - ホスファチジルセリン結合を通して損傷細胞で蓄積できた。アポトーシス細胞死は過酸化水素 (H_2O_2) での処理からの酸化的ストレスによって誘導された。損傷細胞への融合タンパク質の結合は、 H_2O_2 処理細胞の、増殖培地に含まれる分離されたアポトーシスを起している細胞と融合タンパク質を培養することにより実施された。第二の工程では、細胞結合融合タンパク質の活性化ドメインの生物活性は、刺激をうけた

50

、細胞結合融合タンパク質がある血清飢餓心筋細胞、によって *in vitro* で評価された。刺激を停止させるために洗浄した後、刺激細胞における下流のシグナル伝達は、ホスホ - A k t (p A k t) の E L I S A により測定された。融合タンパク質によって誘導された p A k t のレベルは、市販で得られた非結合型のものの活性化ドメインならびにアネキシン V 標的化ドメインを含む融合タンパク質のものと比較された。

【 0 4 0 9 】

融合タンパク質 I G F 1 _ m H S A _ A n x V (配列番号 1 3 6) は、実施例 5 に記載の通り、発現され、洗浄された。H L - 1 細胞 (W i l l i a m C . C l a y c o m b , L o u i s i a n a S t a t e U n i v e r s i t y H e a l t h S c i e n c e s C e n t e r) 、成熟心筋細胞の特性をもつ心筋細胞株、はゼラチン / フィブ
10
ロネクチンでプレコートされた 9 6 ウェルのプレート (B D / F a l c o n , 3 5 3 0 7 2) に、1 0 % F B S (S i g m a , 1 2 1 0 3 C) 、2 m M L - グルタミン (I n v i t r o g e n / G i b c o , 2 5 0 3 0) 、1 0 0 U / m L ペニシリン + 1 0 0 μ g / m L ストレプトマイシン (I n v i t r o g e n / G i b c o , 1 5 0 7 0) および 0 . 1 m M ノルエピネフリン (S i g m a , A 0 9 3 7) を含む完全培地 (C l a y c o m b 培地 (S i g m a , 5 1 8 0 0 C) 中に 1 : 2 で播種され、3 7 および 5 % の C O 2 で培養された。翌日、細胞に、4 0 0 μ M H 2 O 2 (S i g m a , H 1 0 0 9) が補
20
足された培地 0 . 1 m L / ウェルが再供給され、3 7 および 5 % の C O 2 で 1 5 分間培養された。次に、H 2 O 2 が補足された培地を各ウェルから吸引し、完全培地に置き換え、細胞は 3 7 および 5 % の C O 2 で 2 0 ~ 2 4 時間培養された。翌日、離れた細胞を集
30
めるため、各ウェルからの培地が 9 6 - d e e p w e l l v - b o t t o m プレート (U S A S c i e n t i f i c , 1 8 9 6 - 1 1 1 0) に移された。各試料に、3 個のウェルからの培地が 9 6 - d e e p w e l l v - b o t t o m プレートの 1 個のウェルにプールされた。集められた細胞は次に、カルシウム (結合バッファー、アネキシン V - F I T C アポトーシス検出キットの成分、B D B i o s c i e n c e s , 5 5 6 5 4 7) の存在下で、融合タンパク質と、3 7 および 5 % の C O 2 で 1 5 分間培養された。融合タンパク質結合細胞は遠心分離によりペレット状にされ、P B S (S i g m a , D 8 5 3 7) で 1 回洗浄され、その後、細胞はカルシウム (結合バッファー) を含む 1 0 0 μ L / ウェルの D M E M に再懸濁された。ゼラチン / フィブロネクチンでプレコートされた 9 6
40
ウェルのプレートに播種され、あらかじめ血清飢餓とされた H L - 1 細胞は、次いで 1 0 0 μ L / ウェルの再懸濁された融合タンパク質結合細胞で 2 0 分間刺激された。刺激された細胞は、次いで、実施例 5 に記載の通り洗浄され、E L I S A プロトコルに供された。H 2 O 2 にさらされなかった正常な H L - 1 細胞も、また、4 0 μ L / ウェルの 0 . 0 2 5 % トリプシン - E D T A を使用するトリプシン処理により採取され、3 7 の培養器に置かれた。細胞分離は顕微鏡で監視され、トリプシンを非活性化するために 1 0 % F B S を加えた 1 0 0 μ L / ウェルの D M E M が加えられた。各々の試料について、3 個のウェルからのトリプシン処理細胞が 9 6 - d e e p w e l l v - b o t t o m プレートの 1 個のウェルにプールされた。細胞は冷 P B S で洗浄され、3 0 0 μ L の D M E M で再懸濁された。細胞は、次に、カルシウムの存在下で、播種され、あらかじめ血清飢餓とされた H L - 1 細胞を用いて、上記の通りの処理で、融合タンパク質と培養された。細胞は実
50
施例 8 A に記載の通り、洗浄され、E L I S A プロトコルに供された。

【 0 4 1 0 】

ホスホ - A k t レベルの増加は図 2 7 に示されているように、標的 (A n x V) および活性化 (I G F 1) ドメインの両方を含むアポトーシスに (a p o p t o t i c a l l y) 捕捉された融合タンパク質によって刺激された細胞においてのみ観察された。野生型の、非融合 I G F 1 は、おそらく、I G F 1 がアポトーシスを起こした細胞と結合せず、それゆえ捕捉されなかったため、細胞を刺激できなかった。融合タンパク質および野生型 I G F 1 の両方には、実施例 4 C に示されるように同等な活性を有し、それゆえ、捕捉された融合タンパク質によるホスホ - A k t レベルの増加は、それらの効力の違いによるものではなかった。非融合 I G F 1 は理論上はアポトーシスを起こした細胞表面に発現した I

G F 1 受容体と結合できたが、シグナル伝達を保持するための増殖因子が不十分のようであったか、増殖因子が、シグナル伝達に利用できない形で保有されていた。同様に、A n x V __ m H S A 融合タンパク質は細胞を刺激できなかった。実施例 6 に示されているように、A n x V __ m H S A 融合タンパク質はアポトーシスを起こした細胞に結合できた一方で、活性化ドメインを欠いていたので、傍分泌様の形でシグナル化はできなかった。おそらく、正常細胞は、融合タンパク質の捕捉のための、細胞表面に露出されたホスファチジルセリンを有しないため、ホスホ - A k t レベルの増加は未処理の細胞と予備混合されたいかなるタンパク質によって刺激された細胞の中に検出されなかった。同様に、正常細胞の細胞表面の I G F 1 受容体に結合することができるが、増殖因子の捕捉は、細胞を刺激するために十分ではなかった。まとめると、データは融合タンパク質の同時の標的化および活性化関数を示す。

10

【 0 4 1 1 】

実施例 1 0 . 損傷心臓組織への融合タンパク質の i n v i v o での標的化

われわれは、アポトーシスを起こしたおよび壊死した細胞で A n x V 標的化ドメインを通してホスファチジルセリンに特異的に結合する、融合タンパク質 I G F 1 __ m H S A __ A n x V (配列番号 : 1 3 6) が、I G F 1 __ m H S A __ A n x V m 1 2 3 4 (配列番号 : 1 3 8) (ホスファチジルセリンと結合しない変異体) よりも、心筋梗塞の次の損傷した心臓組織において長期間蓄積するであろうという仮説を試験した。実験的な心筋梗塞 (M I) はマウスで誘導され、そして、被験物質は静脈に注入され (I G F 1 __ m H S A __ A n x V 、 I G F 1 __ m H S A __ A n x V m 1 2 3 4 、またはビヒクルのみの対照のいずれか) 、動物は 1 2 時間 2 4 時間または 7 2 時間後に殺処分され、心臓の梗塞した、境界域、および遠隔 (無損傷の) 領域でのタンパク質の蓄積が E L I S A および免疫組織化学により観察された。免疫組織化学は、投与後 2 4 時間で、I G F 1 __ m H S A __ A n x V が梗塞の縁の境界域に局在し、一方で結合性がない変異体のいずれも梗塞、境界域、または遠隔 (正常な) 領域で見られないことを示した。E L I S A のデータは、標的タンパク質、I G F 1 __ m H S A __ A n x V 、が、結合性がない変異タンパク質 I G F 1 __ m H S A __ A n x V m 1 2 3 4 よりも、より大きい範囲および長期間心臓の梗塞域および境界域に蓄積することを示した。これらのデータは I G F 1 __ m H S A __ A n x V 、原型的な標的融合タンパク質、の、心筋梗塞に続く、損傷心臓組織に特異的に蓄積して、持続し、融合された活性化ドメインの特異的送達を可能にする、能力を示す。

20

30

【 0 4 1 2 】

実験的な心筋梗塞 (M I) は、以下で詳細に説明されるように、左冠状動脈の血管結紮でマウスに誘導された。6 0 分後に、血管結紮を除去し、心臓の再かん流を起こした。M I の 2 2 時間後、尾静脈における注射で被験物質またはビヒクル対照の投与を行った。1 群あたり 1 5 匹のマウスに以下を投与した :

群 1 : ビヒクルのみの対照

群 2 : 1 5 μ g の I G F 1 __ m H S A __ A n x V

40

群 3 : 1 5 μ g の I G F 1 __ m H S A __ A n x V m 1 2 3 4

各々の群で、5 匹のネズミがそれぞれの以下の時に殺処分された : 投与後 1 2 、 2 4 および 7 2 時間。それぞれの群 / 時点において、心臓の梗塞領域またはその境界領域における I G F 1 __ m H S A __ A n x V または I G F 1 __ m H S A __ A n x V m 1 2 3 4 に特異的な抗 H S A シグナルを特定するという目標のために、3 匹の動物が免疫組織化学のために、2 匹が E L I S A のために準備された。詳細なプロトコルは以下の通り。

【 0 4 1 3 】

動物の作業は V i v i S o u r c e I n c . , W a l t h a m M A で賃貸された実

50

験室で、B i o t r o f i x I n c . によって実施された。プロトコルが V i v i S o u r c e I A C U C により審査・承認されて、すべての動物福祉に関する事項が記述され、記録された。90匹のオスのC57/B6、12週齢のマウスが研究の7～10日前に注文された(予備研究での15匹を含む、Charles River Laboratories)。食物と水の自由な摂取が許容された。識別番号は、尾に油性マーカーを用いることによって動物に割り当てられた。動物は研究の前日に観察され、不健康に見えるものは除かれた。動物は除菌空気が 21 ± 2 および $50\% \pm 20\%$ の相対湿度で提供された部屋に収容された。部屋はオン、そして、薄明なしの12時間オンおよび12時間オフの照明/闇サイクルの自動タイマー上にあった。高品質なトウモロコシの穂軸、Shepherd's登録商標1/4、は寝床として使用され、Bio-Huts登録商標 for Mice (BioServ K3352)またはRunnel登録商標 (BioServ K3322、K3323)が各々のケージに置かれた。動物はLab Diet登録商標5001食事で給餌された。水は自由に供給された。動物はケージあたり4～6匹収容された。

【0414】

処置日に、マウスは計量され、麻酔がプレキシグラスチャンバー内で100%O₂のイソフルレンがある状態で誘導された。マウスは自己調節加温パッドの処置面に置かれた。マウスは、背面で(腹面が上にある状態で)で適所に固定され、適切な大きさのintracath(22G)を使用して気管内に挿管され、100%O₂中の1.0～2.5%のイソフルラン麻酔が維持された。麻酔の処置レベルは足指、踵、尾をつまんだ際の無反応に伴う眼瞼の反射の損失で確認された。

【0415】

胸郭(背の最も低い面から真向かいの胸骨の右側まで)を剃り、真空で毛を除去し、そして、septisolで皮膚を前処理した。皮膚切開は、肋骨に沿って、胸骨から中間の胸郭領域までの左胸部で行われた。肋骨5および6の間の肋間筋は心臓の左側で開かれ、肋骨は戻された。心臓(左室および左心房)が特定され、心嚢が開かれた。左肺は、穏やかに下方に押され、体から除去された。7-0絹縫合糸は、左冠状動脈の周りに取り付けられ、無菌ポリエチレンPE-10管の～2mmの断片上で結紮され、心臓は血管結紮の後の蒼白(青白化、虚血に関する証拠として)で観察された。縫合糸の残りの端を切り、虚血時間の60分後にPE管および絹縫合糸を切り開くことにより、血管結紮を除去した。傷部は、滅菌加温塩水湿潤ガーゼスポンジで切開面を覆うことにより、湿潤が保たれた。いったん縫合糸が取り除かれると、心臓は虚血領域の適切な再かん流を観察された。左肺は、PEEP(終末呼気圧)を用いて再膨張させられ、反対側の肋骨は6-0非吸収性の単繊維ナイロン縫合糸で閉じられた。筋層は6-0吸収性の縫合糸で閉じられ、次いで皮膚が連続的に6-0絹縫合糸での閉鎖が続いた。

【0416】

ブプレノルフィン(Bedford Labs登録商標 Lot:18655303)が鎮痛(0.05mg/kg、皮下に)のために注入され、イソフルレンが遮断され、マウスは、自発呼吸がいったん起こると抜管され、回復のために補足の加熱のある清潔なケージに置かれた。処置の後、動物は麻酔から回復するまで加熱パッド上に残された。その後、清潔なケージに戻された。その後、処置日(0日目)およびそこから少なくとも1日1回、頻繁に観察された。動物は処置前、-1日目および0日目(処置日)およびその後殺処分まで日ごとに計量された。

【0417】

適切な濃度の被験物質(上記で定義されたIGF1群1～3;エンドトキシンなしのPBS中の、ビヒクル、IGF1-mHSA-AnxV、またはIGF1-mHSA-AnxVm1234)の10μLのアリコートは、使用日まで-80で保管された。エンドトキシンなしのPBSは4で保管された。各々の被験物質アリコートは、注入の直前に解凍された。200μLのエンドトキシンなしのPBS(室温)は、被験物質に追加されて、上下に何回かのピペット操作により混合され、次いで、ヘッドスペースがない注射器

を使用して、200 μ L が尾静脈を通してMIの22 (+/-1) 時間後にマウスに注入された。

【0418】

指定された時点(投与後、12、24、または72時間)では、マウスは以下の通り安楽死させられた: 動物は深いケタミン/キシラジン麻酔に置かれた。処理群あたり3匹の動物について、開胸され、心臓が頂点で穴を開けられた。15%の約0.1 mLのKClが左室に注入され、動物は標準塩、次いで亜鉛ホルマリンでかん流固定された。心臓は、採集され、24~48時間の間、亜鉛ホルマリン中に保存され、次いで、70%のエチルアルコールに移されて、4 で保管された。そして、免疫組織学測定のためにMass Histology Servicesに試料を送付した。

10

【0419】

処理群あたり2匹の動物について、動物は生理食塩水でかん流された。心臓は分離され、左室は塩水で洗浄された。心臓は、ちょうど左右の心室まで切り取られ、図6.1に示すように、4個の断片として解剖された。断片は集められ、計量され、凍結(液体窒素中で)され、次に、ラベルされたマイクロ遠心チューブ(1チューブあたり1個の試料、それゆえ、1心臓あたり4個の試料)の中に-80 で保存され、ドライアイス上で、Silver Creek Pharmaceuticalsに輸送された。

【0420】

免疫組織化学およびELISAの対照実験のための心臓組織を得るため、いくつかの追加のマウスが、上記の処置なしで安楽死させられ、心臓が上記のように切除および洗い流され、そのいくつかにおいては、15 μ L中の2 μ gの融合タンパク質IGF1__mHSA__AnxVが直接左室壁に注入された。注入されたタンパク質のあるなしにかかわらず、心臓は免疫組織化学の調製において、上記のとおり固定された。

20

【0421】

融合タンパク質の免疫組織学検出

免疫組織化学はMass Histology Service Inc., Worcester (MA)、GLP準拠の組織病理学実験室で実施された。処理のためのそれらの標準プロトコルおよび特異的タンパク質の検出のための固定組織の染色が使用された。簡潔に、亜鉛ホルマリンで固定された心臓は、心室まで解剖されて、標準系のアルコールおよびキシレンを通して、慣習的に処理された。各心臓がパラフィンに包埋され、Leicaミクロトーム上で各々厚さ6ミクロンの断片が作成され、顕微鏡スライドに置かれた。各心臓において、8個の連続して横断する断片が作られ、スライドに置かれ、100 μ m開けて(skip)、他の8個の断片が作られ、100 μ m開けて、これが心臓の長さを通して繰り返された。

30

【0422】

各々の8セットからの2個のスライドが、1個は形態学を明らかにするためにH&Eで、他方はHSA-局在のために抗-HSAで、細胞の核を示すためにDAPI対比染色で、染色された。伝統的な過程がH&E染色に使用された。具体的に、組織は、キシレンで脱パラフィン処理されて、アルコールできれいにされ、水で水和されて、Harrisヘマトキシリンで染色された。スライドは、洗浄され、1%の水性エオシンで染色され、一連のアルコールで脱水され、一連のキシレンできれいにされて、カバースリップされた。心臓の様々なレベルの断片を代表するスライドがその後、光学顕微鏡で観察され、梗塞領域を含む断片を探した。

40

【0423】

心臓組織におけるHSA-局在において、H&Eで染色されたものに隣接した断片は、キシレンで洗浄され、アルコールできれいにされ、水で水和されて、1:200で希釈したヤギ抗ヒトアルブミン一次抗体と4Cで一晩培養され、PBSで洗浄された。そして、Alexa Fluor 594 α バ抗ヤギIgG、ヤギ抗-HSA抗体に対する蛍光標識された抗体、はその後、抗-HSA局在の検出のための二時抗体として1:400希釈で1時間37Cで使用された。スライドは、PBSで洗浄され、核視覚化のためのDAPI

50

染色も含む P r o L o n g G o l d a n t i f a d e 試薬を使用することでカバーリップされた。

【 0 4 2 4 】

陽性対照において、I G F 1 __ m H S A __ A n x V が直接注入された心臓からのスライドは、同様に抗 - H S A プロトコルを使用することで処理された。加えて、M a s s H i s t o l o g y S e r v i c e s は天然の H S A を含む人間の肝組織の試料を、第一の検出抗体のための陽性対照として染色した。陰性対照は、第一の抗 H S A 抗体を除外しながら H S A - 局在のために処理された直接注入されたマウス心臓および H S A - 局在のために通常に処理されたナイーブな心臓（融合タンパク質露出がない）を含んだ。

【 0 4 2 5 】

融合タンパク質の E L I S A 検出

心臓あたり 4 個の試料（図 2 8 ）が以下の E L I S A のために調製された。試料は、E p p e n d o r f s a f e - l o c k マイクロ遠心チューブに移され、氷上で解凍された。各チューブに、P i e r c e H a l t P r o t e a s e I n h i b i t o r C o c k t a i l （バッファーに 1 0 0 倍希釈）を、1 : 5 比の（m g 組織試料）：（u L バッファー）で含む R I P A バッファーが加えられた。少なくとも 1 0 0 u L のバッファーは各サンプルに使用された。Z R O B 0 5 および Z R O B 1 0 ビーズの 1 : 2 比のビーズ：バッファーの 5 0 / 5 0 混合物が加えられた。チューブは速度 9 に設定された B u l l e t B l e n d e r 組織ホモジナイザーに置かれ、3 分間均質化され、均質化が完全でなかった場合、繰り返された。試料は遠心分離され、そして、各試料で総タンパク量を決定するための B C A （ビシンコニン酸）タンパク質アッセイ実施するためにアリコートを取った。

【 0 4 2 6 】

酵素免疫測定法（E L I S A ）測定は標準方法を使用して行われた。具体的に、1 日目に、R e a c t i - B i n d プレートは 4 にて、5 0 u L / ウェルの、1 : 5 0 でダルベッコの P B S に希釈された抗 - H S A 被覆抗体で、一晚コーティングされた。2 日目に、ウェルは 4 回、プレート洗浄機（プログラム 6 ）を用いて P B S - T （P B S 、 0 . 0 5 % T w e e n 2 0 ）で洗浄された。非特異的結合は 2 時間室温にて 2 0 0 u L / ウェルの無タンパク質遮断バッファーで遮断され、ウェルはプレート洗浄機を用いて P B S - T （P B S 、 0 . 0 5 % T w e e n 2 0 ）で 4 回洗浄された。5 0 L / ウェル（9 6 ウェルプレート）の各々の標準曲線試料または試験試料のいずれかはウェルに加えられた。試験試料は R I P A バッファー（+ プロテアーゼ阻害剤）で 8 . 7 4 5 m g / m L の最終総タンパク質濃度に希釈された。プレートは密封され、4 で一晚培養された。3 日目に、ウェルはプレート洗浄機を用いて P B S - T で 4 回洗浄され、1 0 0 u L / ウェルの、P B S - T で 1 : 2 5 , 0 0 0 で希釈されたヤギ抗 - H S A - H R P 検出抗体がウェルごとに加えられ、室温で 3 0 分間 2 2 0 r p m の振盪台上で培養され、光から保護された。ウェルはプレート洗浄機を用いて P B S - T で 4 回洗浄された。ウェルあたり 1 0 0 u L の 1 - ステップの U l t r a T M B E L I S A 試薬が室温にて加えられ、プレートは室温にて光から保護されて 2 5 分間培養された。1 0 0 u L K L P T M B 停止試薬の添加により、反応は停止された。色は青から黄色に変化する。5 分後に、吸光度の読み取りがプレートリーダー上で A 4 5 0 の波長で行われた。融合タンパク質露出のない組織からの吸光度のためのバックグラウンド値が、上記と同じ手順を用いて作成されたナイーブな心臓の試料から得られた。バックグラウンド値は、違いを得るためにすべての試験試料の吸収値から引かれた。濃度 - 吸収関係の標準曲線はさまざまな既知量の融合タンパク質でスパイクされた試料から生成された。そして、各試験試料におけるタンパク質濃度は標準の濃度 - 吸収曲線との比較で決定された。各々の心臓試験試料からの 2 アリコートは、測定の変動を評価するために測定、これらは E L I S A データ（図 2 9 ）に含まれる標準偏差を基礎とする。

【 0 4 2 7 】

使用される融合タンパク質は、実施例 5 に記載される通りに作成された、I G F 1 __ m

10

20

30

40

50

H S A __ A n x V (標的化タンパク質)、と I G F 1 __ m H S A __ A n x V m 1 2 3 4 (結合性のない変異体) を含む。ビヒクル対照はエンドトキシンなしの P B S (S i g m a) であった。動物は注文時点で 1 2 週目の、手術の 7 ~ 1 0 日前に順応させられた雄 C 5 7 / B 6 マウスであった。免疫組織化学に使用される染料と抗体：一次抗体はアフィニティー精製されたヤギ抗ヒトアルブミン (H S A) 交差吸収抗体 (B e t h y l L a b s 0 8 0 - 2 2 9 A ロット # 3) であった；蛍光標識された二次抗体は、A l e x a F l u o r 5 9 4 ロバ抗ヤギ I g G (H + L) (I n v i t r o g e n 、 A 1 1 0 5 8) であった；D A P I がある P r o L o n g G o l d a n t i f a d e 試薬 (I n v i t r o g e n 、 P 3 6 9 3 1)。E L I S A に用いられる試薬は、R I P A L y s i s および抽出バッファー (P i e r c e 、 8 9 9 0 1)；P i e r c e H a l t P r o t e a s e I n h i b i t o r C o c k t a i l、E D T A - なし (P i e r c e 、 7 8 4 2 5)；P i e r c e B C A アッセイキット、2 3 2 2 7；R e a c t i - B i n d プレート (P i e r c e 、 1 5 0 4 1)；D u l b e c c o ' s P B S (T h e r m o 、 2 8 3 7 4)；タンパク質なしの遮断バッファー (P i e r c e 、 3 7 5 7 2)；抗 - H S A 被覆抗体 (B e t h y l l a b s a n t i b o d y A 8 0 - 2 2 9 A)；ヤギ抗 - H S A - H R P 検出抗体 (B e t h y l L a b s 、 A 8 0 - 2 2 9 P)；1 ステップ U l t r a T M B E L I S A 試薬 (T h e r m o (P i e r c e) 、 3 4 0 2 8)；K L P T M B 停止試薬 (K L P 、 5 0 - 8 5 - 0 5)；タンパク質なしの遮断バッファー (P i e r c e 、 3 7 5 7 2)；組織均質化ビーズ (t i s s u e h o m o g e n i z a t i o n b e a d s) (N e x t A d v a n c e 、 Z R O B 0 5 および Z R O B 1 0) を含んだ。動物手術に用いられる材料は、ブプレノルフィン (B e d f o r d L a b s 登録商標 ロット：1 8 6 5 5 3 0 3)、イソフルレン、ケタミン、キシラジン、亜鉛ホルマリン、および 1 5 % K C l を含んだ。

【 0 4 2 8 】

標的化されたおよび非結合変異体の融合タンパク質の E L I S A による検出は、図 2 9 に要約される。梗塞 + 境界領域で測定されたタンパク質は、投与後 3 種類の時間 (1 2、2 4、および 7 2 時間) にて、標的化 (群 2) および非結合変異体 (群 3) 融合タンパク質の各々 2 匹のマウスにおいて心臓の非梗塞領域のタンパク質と比較された。各々の心臓で、試料 A および B 1 遠隔部 (図 6 - 1 で定義されるように) で測定されたタンパク質が加えられ、心臓の非梗塞領域におけるタンパク質を示す。同様に、試料 B 1 - 梗塞部および B 2 で測定されたタンパク質が加えられ、周囲の境界領域を加えた心臓の梗塞領域におけるタンパク質を示す。

【 0 4 2 9 】

図 2 9 に示すように、I G F 1 __ m H S A __ A n x V、標的化融合タンパク質 (群 2、黒い棒) は、注入後の 1 2 および 2 4 時間後に同じ動物の心臓の遠隔領域 (群 2、灰色の棒) におけるレベルと比較して、梗塞領域において高く上昇した。7 2 時間では梗塞および非梗塞領域の両方で検出されなかった。それに比べて、非結合性変異タンパク質 I G F 1 __ m H S A __ A n x V m 1 2 3 4 (群 3、黒い棒) 1 2 時間でわずかに上昇し、2 4 時間で減少し、7 2 時間で検出されなかった。非結合性タンパク質と標的化を比較すると、1 2 および 2 4 時間の両方で、標的化 I G F 1 __ m H S A __ A n x V (2 群、黒い棒) は非結合性の I G F 1 __ m H S A __ A n x V m 1 2 3 4 (群 3、黒い棒) よりも梗塞 + 境界領域で上昇した。これらの結果は、損傷心筋細胞へ (アポトーシスを起こしたまたは壊死した心筋細胞に関するホスファチジルセリンに能動的に結合することにより) 標的化する、融合タンパク質 I G F 1 __ m H S A __ A n x V が、高濃度および非結合性変異体よりも長い時間、実験的 M I により損傷した心臓の領域に入り、維持することができることを示す。さらに、データは標的化融合タンパク質の心臓の損傷領域への特異的局在を示し、A n x V 標的化ドメインを通した標的化の有効性を示した。

【 0 4 3 0 】

投与 2 4 時間後の非結合性変異体 I G F 1 __ m H S A __ A n x V m 1 2 3 4 と比べて、免疫組織化学による H S A 含有融合タンパク質の局在も、梗塞および境界領域での I G F

10

20

30

40

50

1 __mHSA __An x V の、より大きい蓄積を示した。図 3 0 は梗塞および周囲の組織の形態学、ならびに梗塞の周囲の、梗塞の端部および境界領域での I G F 1 __mHSA __An x V に特異的な陽性染色を示す。左上：形態を示す H & E 染色。梗塞領域は、黒い曲線によって区画された縁の中央であり、生存は左上および右下である。(200 x 倍率) 右上：この領域の連続切片は H S A 含有タンパク質のために同じ倍率で染色された。赤は H S A 局在を示し；青は細胞核の D A P I 染色を示す。同じ領域の、より高い倍率の画像は、左下(400 x) および右下(600 x) に示される。損傷組織の縁(中間の厚さの矢印)での心筋細胞(細い矢印)における陽性のシグナルがある。左上および右上の白い箱は2個の隣接した6 μmスライドのほぼ同じ箇所であり、左下および右下これらの箱の近くの領域の拡大図である。

10

【0431】

比較として、図 3 1 は、非結合性変異体 I G F 1 __mHSA __An x V m 1 2 3 4 についての同じ情報を示し、それに特異的な最小の染色を示す。左上：形態を示す H & E 染色。梗塞領域は、黒い曲線によって区画された縁の上部中央である(200 x 倍率)。右上：この領域の隣接領域は H S A 含有タンパク質のために同じ倍率で染色された。赤は抗 H S A 局在を示し；青は細胞核の D A P I 染色を示す。同じ領域の、より高い倍率の画像は、左下(400 x) および右下(600 x) に示される。損傷組織の縁(中間の厚さの矢印)での心筋細胞(細い矢印)および赤血球(厚い矢印)においてバックグラウンドシグナルしかない。左上および右上の白い箱は2個の隣接した6 μmスライドのほぼ同じ箇所であり、左下および右下これらの箱の近くの領域の拡大図である。

20

【0432】

図 3 2 は抗 H S A 抗体の H S A 含有融合タンパク質への特異性を確認するために使用される対照を例示する。左上：記載された通りに I G F 1 __mHSA __An x V が直接注入されるマウス心臓の陽性対照。濃い赤は、注入された H S A 含有融合タンパク質の強い局在を示す。右上：マウス心臓の陰性対照。左上は、I G F 1 __mHSA __An x V の注入を含むが、染色が一次抗 H S A 抗体なしで続けられた同様の調製。特異的染色は全く見られなかった。左下：マウス心臓の第二の陰性対照。タンパク質は全く心臓に注入されず左上と同様に処理された。わずかな赤いバックグラウンド染色を見ることができるのみである。右下：ヒト肝臓の陽性対照。ヒト肝臓はかなりの量の H S A を生産する。抗 - H S A 抗体での染色は試料のいたるところで特異的染色を示す。すべての画像において：青い染色は、細胞核を示す D A P I 染色を示す。

30

【0433】

本明細書に記載された実施例および実施形態が例示の目的のみであり、これらを踏まえた変更の様々な改変が本出願の精神および範囲内、および付属された請求項の範囲内であることが理解されるであろう。引用された、すべての公表、特許、および特許出願全体は、すべての目的のために出典明示により本明細書に組み込まれる。

【 図 1 】

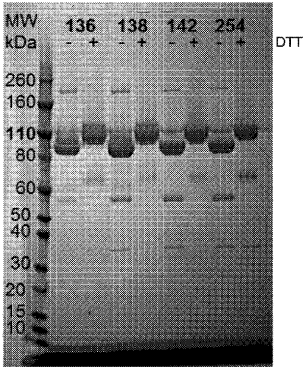


FIG. 1

【 図 2 】

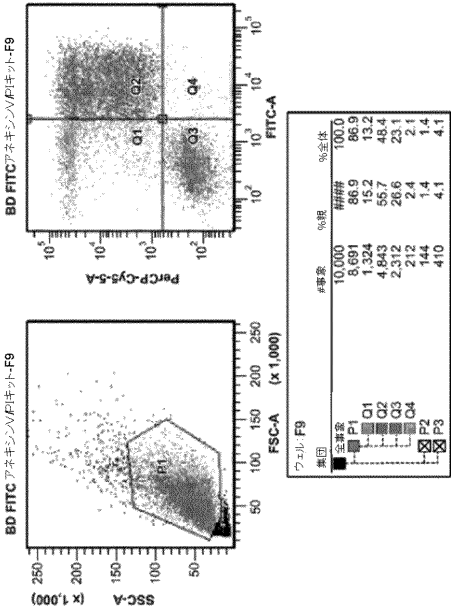


FIG. 2

【 図 3 】

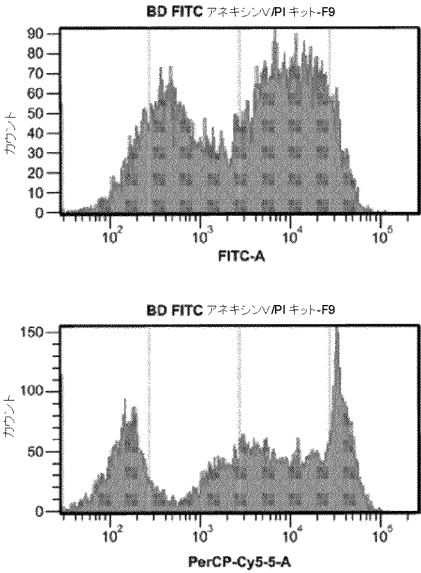


FIG. 3

【 図 4 】

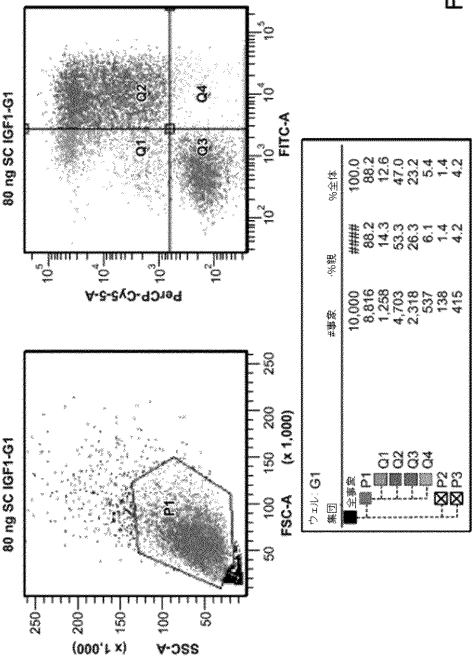
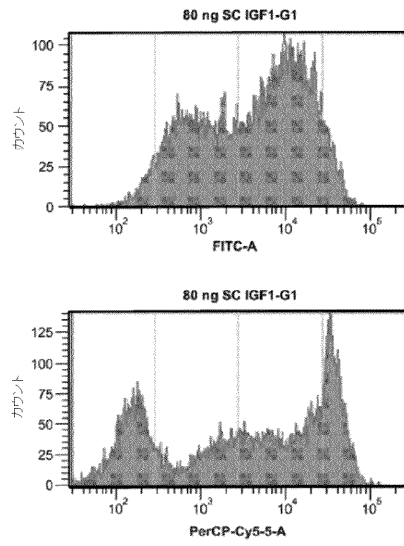
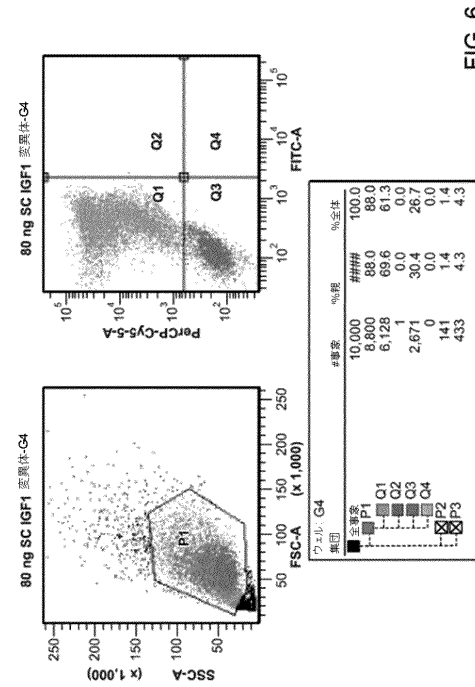


FIG. 4

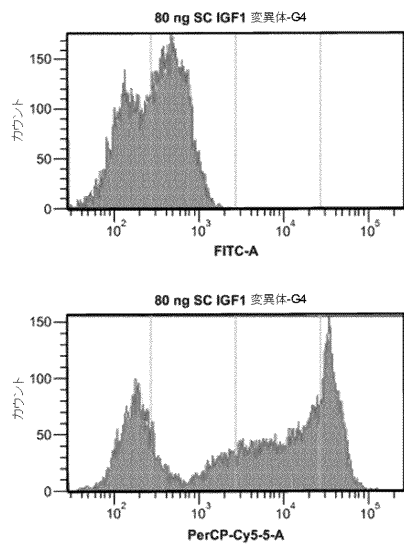
【図 5】



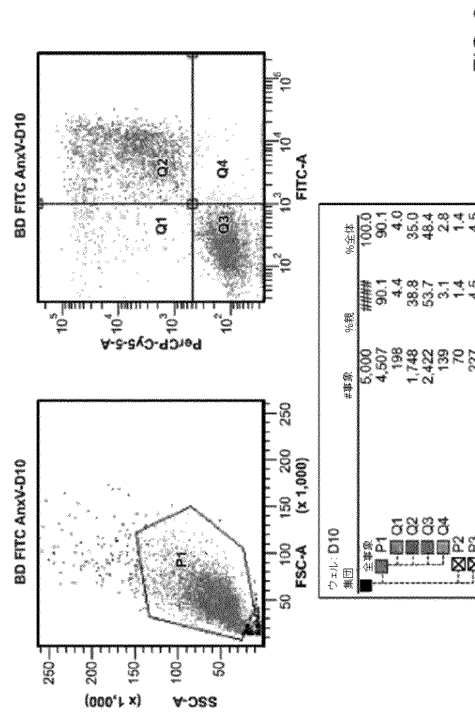
【図 6】



【図 7】



【図 8】



【図 9】

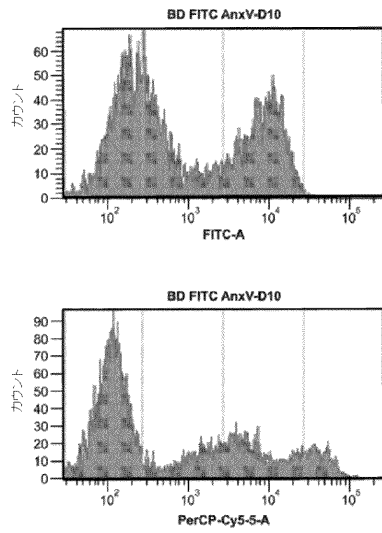


FIG. 9

【図 10】

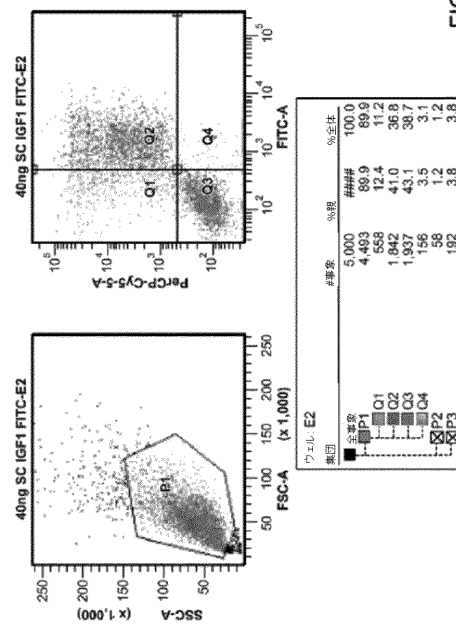


FIG. 10

【図 11】

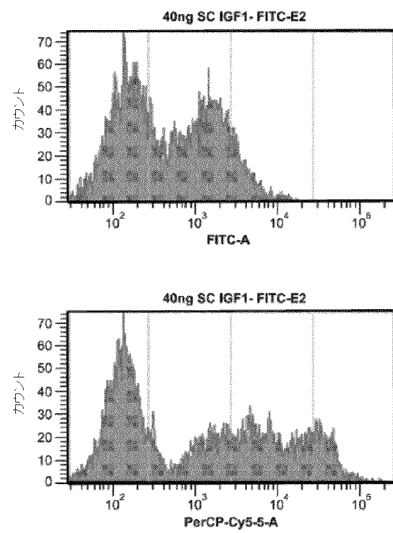


FIG. 11

【図 12】

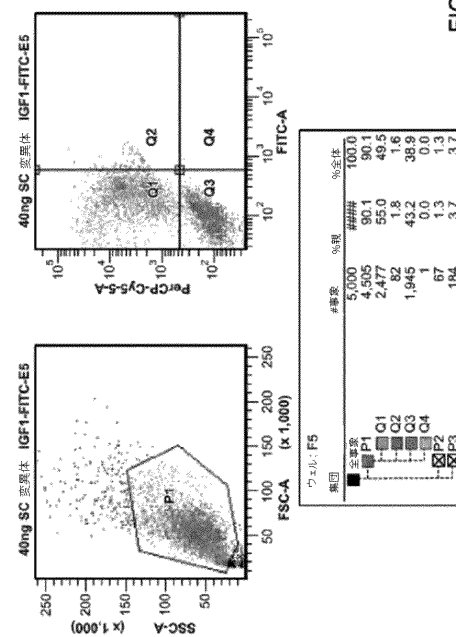
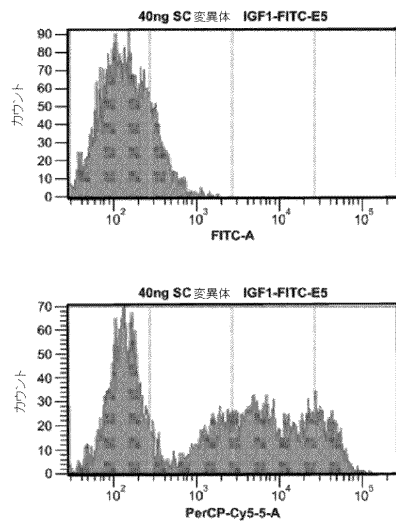
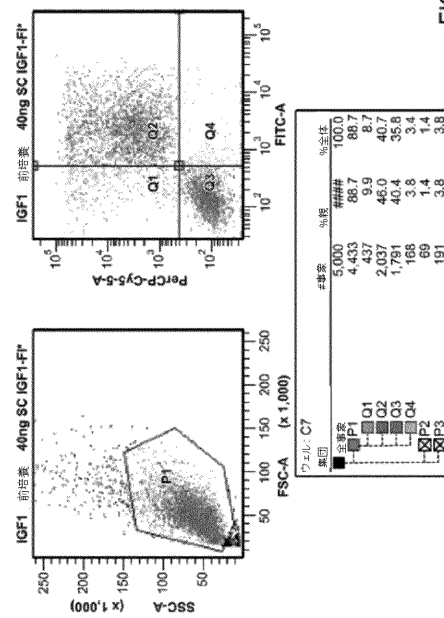


FIG. 12

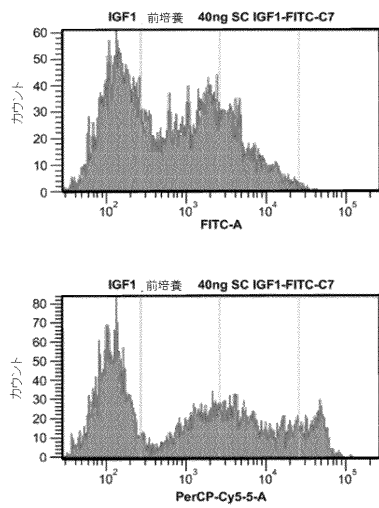
【図 13】



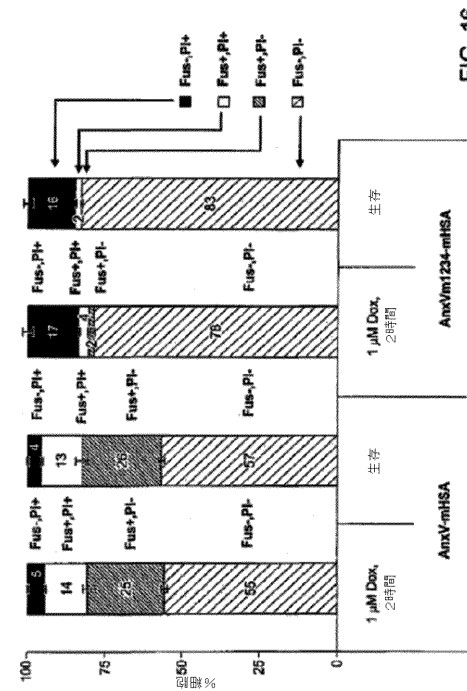
【図 14】



【図 15】

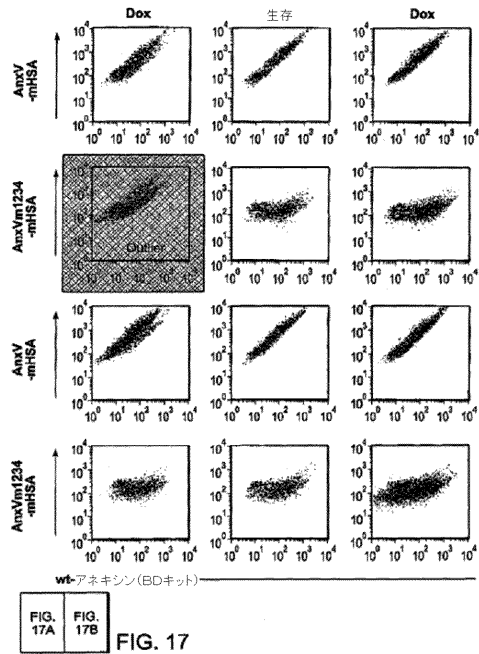


【図 16】



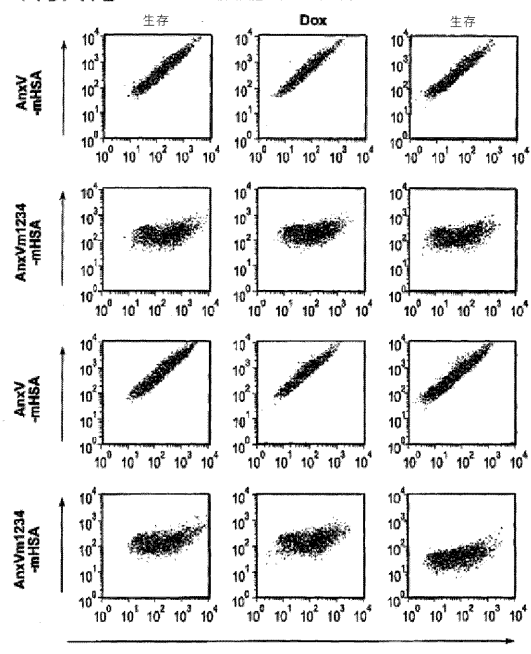
【図 17 A】

FIG. 17A 心臓細胞 (ESC由来)



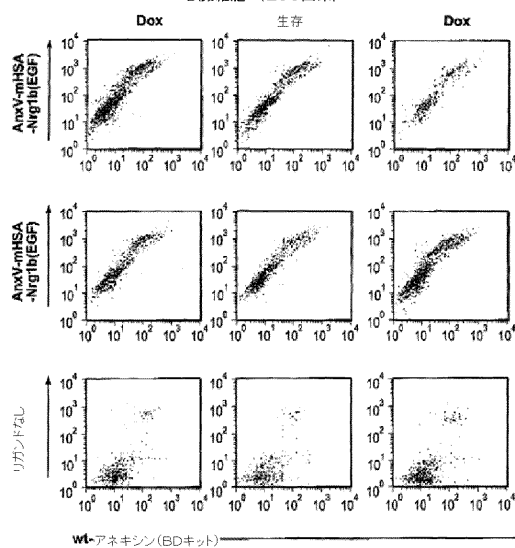
【図 17 B】

FIG. 17B 心臓細胞 (ESC由来)



【図 18 A】

FIG. 18A 心臓細胞 (ESC由来)



【図 18 B】

FIG. 18B 心臓細胞 (ESC由来)

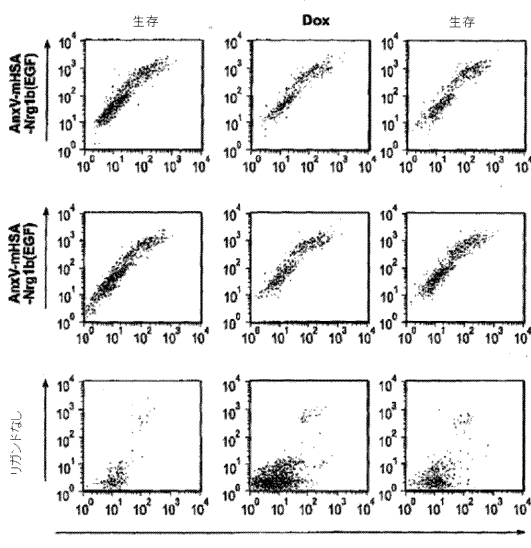


FIG. 18

【図 19】

アネキシンVまたはシナプトタグミンでのPS標的化

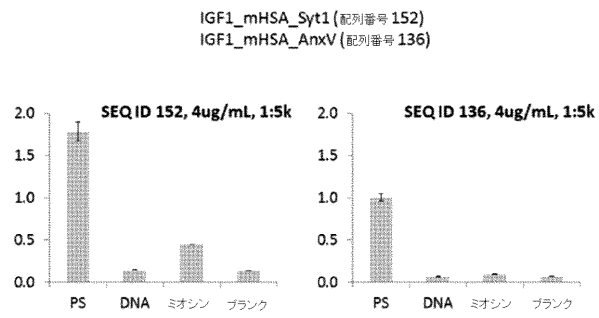


Figure 19

【図 20】

DNA標的化

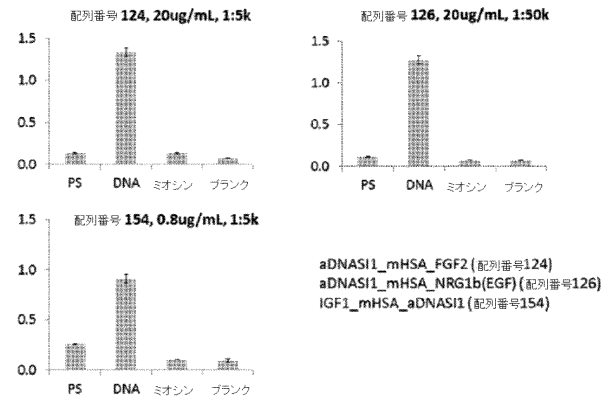


Figure 20

【図 21】

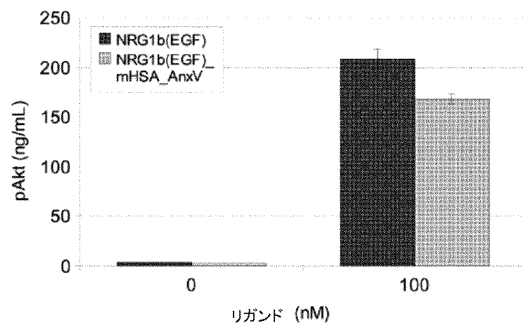


Figure 21

【図 23】

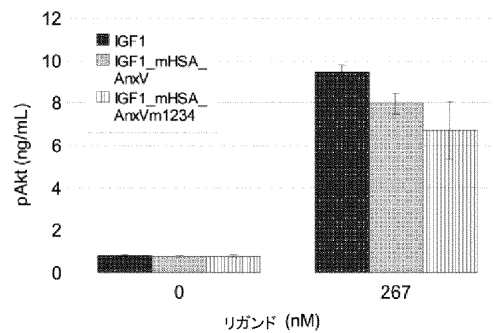


Figure 23

【図 22】

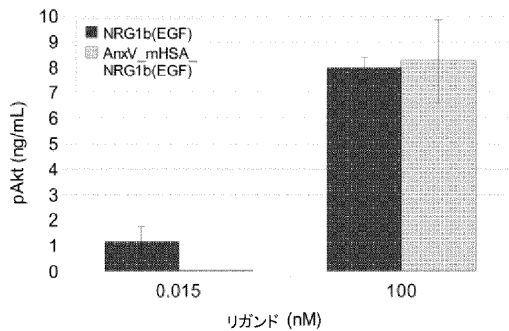


Figure 22

【図 24】

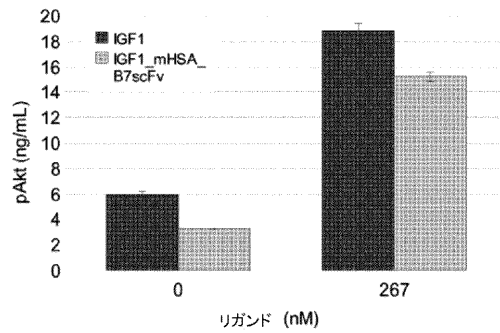


Figure 24

【図 26】

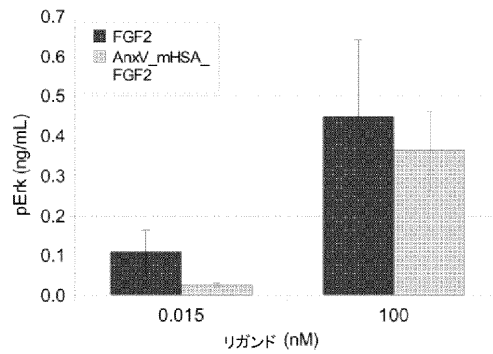


Figure 26

【図 25】

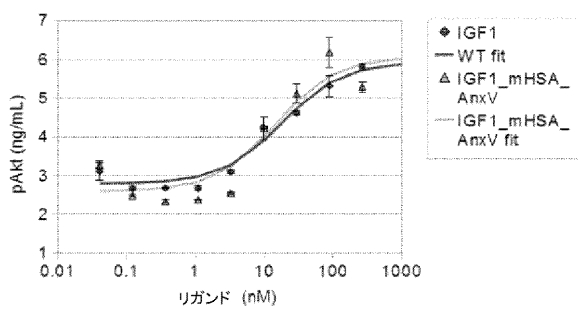


Figure 25

【図 27】

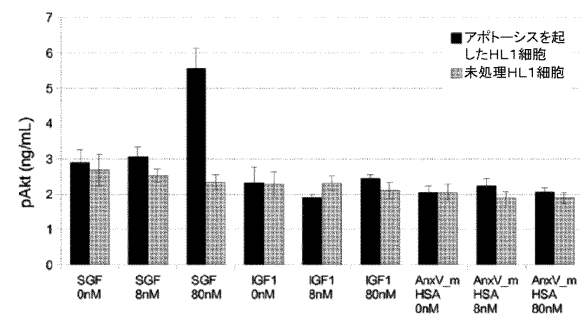


Figure 27

【図 28】

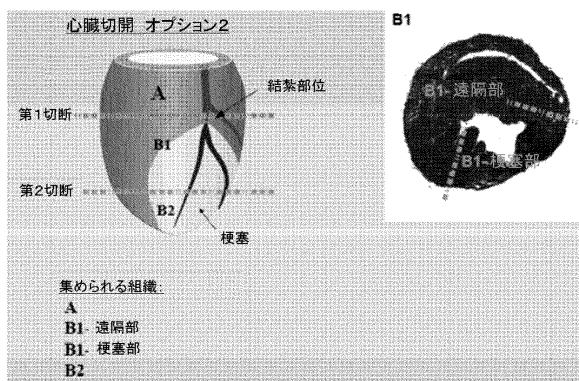


FIG. 28

【図 30】

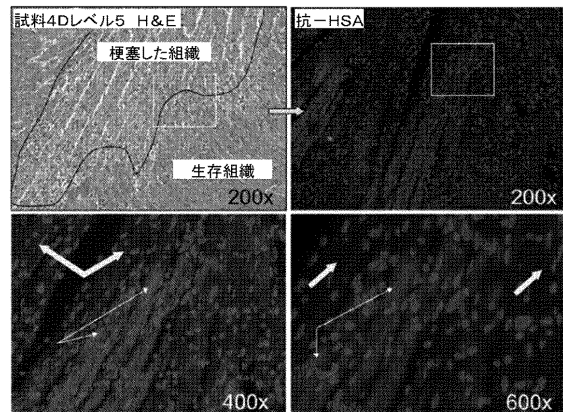


FIG. 30

【図 29】

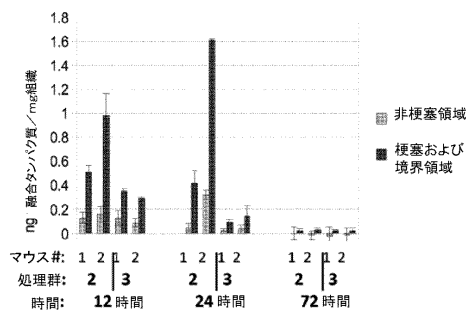


Figure 29

【図 3 1】

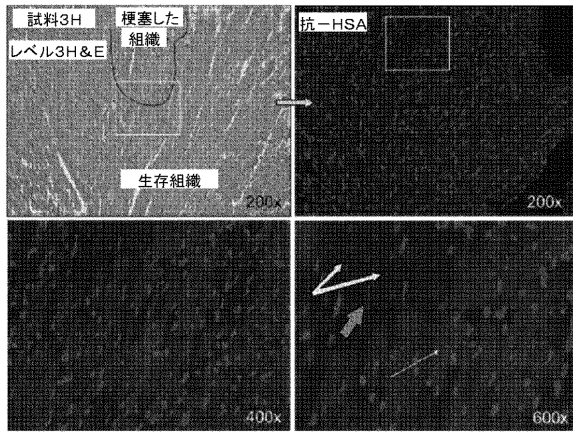


FIG. 31

【図 3 2】

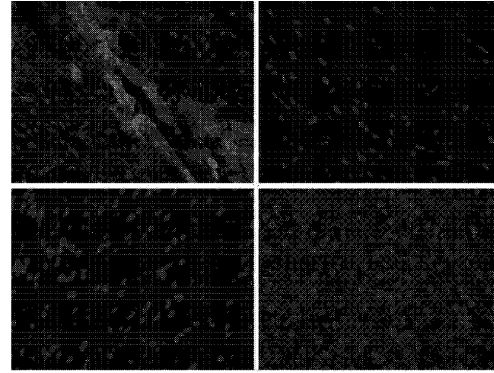


FIG. 32

【配列表】

0006200806000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
C 0 7 K 14/475 (2006.01)		C 0 7 K 14/475	
C 0 7 K 14/52 (2006.01)		C 0 7 K 14/52	
C 0 7 K 14/575 (2006.01)		C 0 7 K 14/575	
C 0 7 K 14/765 (2006.01)		C 0 7 K 14/765	
C 0 7 K 16/18 (2006.01)		C 0 7 K 16/18	
C 0 7 K 16/28 (2006.01)		C 0 7 K 16/28	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)		C 1 2 N 15/00	A

(31)優先権主張番号 13/112,907

(32)優先日 平成23年5月20日(2011.5.20)

(33)優先権主張国 米国(US)

(74)代理人 100170520

弁理士 笹倉 真奈美

(72)発明者 ウルリック・ニールセン

アメリカ合衆国02169マサチューセッツ州クインシー、トーマス・ストリート18番

(72)発明者 トーマス・ウィッカム

アメリカ合衆国01450マサチューセッツ州グロトン、ヒッコリー・レイン20番

(72)発明者 ビルギット・ショーベール

アメリカ合衆国02141マサチューセッツ州ケンブリッジ、ウィンザー・ストリート324番

(72)発明者 ブライアン・ハームズ

アメリカ合衆国02131マサチューセッツ州ロズリンデイル、ウォルター・ストリート152番、ナンバー1

(72)発明者 ブライアン・リング

アメリカ合衆国99352ワシントン州リッチランド、キャニオン・リム・コート389番

(72)発明者 マシュー・オンサム

アメリカ合衆国02130マサチューセッツ州ジャマイカ・プレイン、バイナー・ストリート90番

(72)発明者 バイロン・デラバレ

アメリカ合衆国02139マサチューセッツ州ケンブリッジ、シドニー・ストリート38番、セカンド・フロア

(72)発明者 ショーン・エム・リボウ

アメリカ合衆国94131カリフォルニア州サンフランシスコ、チャーチ・ストリート1840番

合議体

審判長 田村 明照

審判官 瀬下 浩一

審判官 山本 匡子

(56)参考文献 特表平11-504329(JP,A)

特表2010-508845(JP,A)

特表2010-516631(JP,A)

特表2008-526979(JP,A)

特開2001-95566(JP,A)

特表2007-536254(JP,A)

特表2009-504157(JP,A)

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

C07K14/00-19/00

C12N15/00

A61K35/00

A61K38/00

A61P43/00

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S / W P I D S (S T N)