

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6552636号
(P6552636)

(45) 発行日 令和1年7月31日(2019.7.31)

(24) 登録日 令和1年7月12日(2019.7.12)

| | | |
|---------------------|-----------|---------------|
| (51) Int.Cl. | F 1 | |
| C 12N 15/12 | (2006.01) | C 12 N 15/12 |
| C 07K 14/475 | (2006.01) | C 07 K 14/475 |
| A 61 P 35/00 | (2006.01) | A 61 P 35/00 |
| A 61 P 43/00 | (2006.01) | A 61 P 43/00 |
| A 61 P 37/06 | (2006.01) | A 61 P 37/06 |

請求項の数 15 (全 57 頁) 最終頁に続く

| | |
|---------------|-------------------------------|
| (21) 出願番号 | 特願2017-551176 (P2017-551176) |
| (86) (22) 出願日 | 平成28年4月1日 (2016. 4. 1) |
| (65) 公表番号 | 特表2018-511327 (P2018-511327A) |
| (43) 公表日 | 平成30年4月26日 (2018. 4. 26) |
| (86) 國際出願番号 | PCT/EP2016/057272 |
| (87) 國際公開番号 | W02016/156596 |
| (87) 國際公開日 | 平成28年10月6日 (2016. 10. 6) |
| 審査請求日 | 平成30年3月12日 (2018. 3. 12) |
| (31) 優先権主張番号 | 15162502.7 |
| (32) 優先日 | 平成27年4月2日 (2015. 4. 2) |
| (33) 優先権主張國 | 歐州特許庁 (EP) |
| (31) 優先権主張番号 | 15162511.8 |
| (32) 優先日 | 平成27年4月2日 (2015. 4. 2) |
| (33) 優先権主張國 | 歐州特許庁 (EP) |

(73) 特許権者 515146556
 モレキュラー パートナーズ アクチエン
 ゲゼルシャフト
 イス国 ツェーハー8952 チューリ
 ッヒ シュリーレン ヴァーギシュトラー
 セ 14

(74) 代理人 110000109
 特許業務法人特許事務所サイクス

(72) 発明者 バッカー タリッサ
 イス国 8903 ビルメンスドルフ
 シューレンシュトラーセ 1ペー

(72) 発明者 シュトゥンプ ミヒヤエル テー
 イス国 8954 ゲロルツヴィル ク
 ラッツシュトラーセ 6

早期審査対象出願

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 血清アルブミンに対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメイン

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

第1、第2、第3、及び第4の設計アンキリンリピートドメインを含む、組換え結合タンパク質であって、

前記第1の設計アンキリンリピートドメインが血管内皮増殖因子(VEGF-A)に対する結合特異性を有し、かつ配列番号18のアミノ酸配列に対して少なくとも90%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、

前記第2の設計アンキリンリピートドメインが肝細胞増殖因子(HGF)に対する結合特異性を有し、かつ配列番号2-6のアミノ酸配列に対して少なくとも90%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、並びに

前記第3及び第4の設計アンキリンリピートドメインがそれぞれ血清アルブミンに対する結合特異性を有し、かつ配列番号50のアミノ酸配列に対して少なくとも90%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、

前記第1、第2、第3及び第4のアンキリンリピートドメインが、N末端からC末端に向かって第3 - 第2 - 第1 - 第4の順であり、

前記組換え結合タンパク質が、HGF、VEGF-A 及び血清アルブミンに同時に結合可能である、組換え結合タンパク質。

【請求項2】

前記第1の設計アンキリンリピートドメインが、配列番号18のアミノ酸配列に対して少なくとも95%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、

前記第2の設計アンキリンリピートドメインが、配列番号26のアミノ酸配列に対して少なくとも95%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、並びに

前記第3及び第4の設計アンキリンリピートドメインがそれぞれ配列番号50のアミノ酸配列に対して少なくとも95%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項1に記載の結合タンパク質。

【請求項3】

前記第1の設計アンキリンリピートドメインが、配列番号18のアミノ酸配列に対して少なくとも98%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、

前記第2の設計アンキリンリピートドメインが、配列番号26のアミノ酸配列に対して少なくとも98%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、並びに 10

前記第3及び第4の設計アンキリンリピートドメインがそれぞれ配列番号50のアミノ酸配列に対して少なくとも98%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項1に記載の結合タンパク質。

【請求項4】

第1、第2、第3、及び第4のアンキリンリピートドメインを含む、結合タンパク質であって、

前記第1のアンキリンリピートドメインがヒトVEGF-Aに対する結合特異性を有し、かつ配列番号18のアミノ酸配列に対して少なくとも90%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、

前記第2のアンキリンリピートドメインがヒトHGFに対する結合特異性を有し、かつ配列番号26のアミノ酸配列に対して少なくとも90%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、並びに 20

前記第3及び第4のアンキリンリピートドメインがそれぞれヒト血清アルブミンに対する結合特異性を有し、かつ配列番号50のアミノ酸配列に対して少なくとも90%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、

前記第1、第2、第3及び第4のアンキリンリピートドメインが、N末端からC末端に向かって第3 - 第2 - 第1 - 第4の順であり、

前記結合タンパク質が、HGF、VEGF-A及び血清アルブミンに同時に結合可能である、結合タンパク質。

【請求項5】

前記第1のアンキリンリピートドメインが、配列番号18のアミノ酸配列に対して少なくとも95%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、

前記第2のアンキリンリピートドメインが、配列番号26のアミノ酸配列に対して少なくとも95%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、並びに

前記第3及び第4のアンキリンリピートドメインがそれぞれ配列番号50のアミノ酸配列に対して少なくとも95%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項4に記載の結合タンパク質。

【請求項6】

前記第1のアンキリンリピートドメインが配列番号18のアミノ酸配列を含み、

前記第2のアンキリンリピートドメインが配列番号26のアミノ酸配列を含み、及び/又は 40

前記第3又は第4のアンキリンリピートドメインが配列番号50のアミノ酸配列を含む、請求項4に記載の結合タンパク質。

【請求項7】

前記結合タンパク質はVEGF-AとVEGFR-2との間の結合相互作用を阻害するか、及び/又はHGFとcMetとの間の結合相互作用を阻害する、請求項4に記載の結合タンパク質。

【請求項8】

前記結合タンパク質が配列番号134のアミノ酸配列に対して少なくとも95%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項5に記載の結合タンパク質。 50

【請求項 9】

前記結合タンパク質が配列番号 1 3 4 のアミノ酸配列を含む、請求項 5 に記載の結合タンパク質。

【請求項 10】

配列番号 1 3 4 のアミノ酸配列に対して少なくとも 90 % のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む結合タンパク質であって、 HGF、 VEGF-A 及び血清アルブミンに対して結合特異性を有する、結合タンパク質。

【請求項 11】

請求項 1 から 10 の何れか一項に記載の結合タンパク質をコードする核酸。

【請求項 12】

請求項 1 から 10 の何れか一項に記載の結合タンパク質並びに薬学的に許容される担体及び / 若しくは賦形剤を含む、医薬組成物。

【請求項 13】

請求項 1 から 10 の何れか一項に記載の結合タンパク質を含む、患者の医学的状態を治療するための医薬であって、前記医学的状態が腫瘍性疾患、病的血管新生、及び / 又は炎症性疾患である、医薬。

【請求項 14】

前記医学的状態が腎癌、胃癌及び / 又は多発性骨髄腫である、請求項 1 3 に記載の医薬。

【請求項 15】

前記医学的状態が癌である、請求項 1 3 に記載の医薬。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

(関連出願の相互参照)

本出願は、欧州特許庁に 2015 年 4 月 2 日出願の欧州特許出願公開第 15162502 号の利益及び優先権を主張する。本出願はまた、欧州特許庁に 2015 年 4 月 2 日出願の欧州特許出願公開第 15162511 号の利益及び優先権を主張する。欧州特許出願公開第 15162502 号及び同第 15162511 号の内容は、全ての表、図、及び特許請求の範囲を含むその全容が、全て参照により本明細書に組み込まれ、並びに、特許協力条約の規則 4 . 18 に従った、本明細書には含まれない、特許協力条約の規則 20 . 5 (a) に言及されている明細書、特許請求の範囲若しくは図面の任意の要素又は一部の組み込みも含まれる。

【0002】

(開示の分野)

改善された保存安定性特性を呈する、新規の、血清アルブミンに対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメインが提供される。血清アルブミンに対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメインを少なくとも 2 つ含む、組み換え結合タンパク質もまた提供され、このタンパク質は、血清アルブミンに対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメインを 1 つのみ含む組み換え結合タンパク質に比べ、改善された薬物動態特性を呈する。特に、肝細胞増殖因子 (HGF) に対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメインを少なくとも 1 つ含み、血管内皮増殖因子 A (VEGF-A) に対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメインを少なくとも 1 つ含み、かつ血清アルブミンに対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメインを少なくとも 2 つ含む組み換え結合タンパク質が提供される。更に、このような設計アンキリンリピートドメイン及び / 又は組み換え結合タンパク質をコードする核酸、このような設計アンキリンリピートドメイン、組み換え結合タンパク質又は核酸を含む医薬組成物、並びにこのような設計アンキリンリピートドメイン、組み換え結合タンパク質、核酸、又は医薬組成物の疾患の治療における使用が提供される。

【背景技術】

10

20

30

40

50

【0003】

背景技術に関する以下の考察は、単に読者の本発明の理解を助けるために提供するものであり、本発明の先行技術を説明する、又は、本発明の先行技術であることを容認するものではない。

【0004】

抗体の他に、標的分子を特異的に結合させるために使用できる、新規の結合タンパク質又は結合ドメインが存在する（例えば、Binz, H. K., Amstutz, P., Plueckthun, A., Nat. Biotechnol. 23, 1257~1268, 2005）。このような、Fcを有さない結合タンパク質又は結合ドメインの新規のクラスの1つは、設計アンキリンリピートタンパク質又は設計アンキリンリピートドメイン（国際公開第2002/020565号；Binz, H. K., Amstutz, P., Kohl, A., Stumpf, M. T., Briand, C., Forrer, P., Gruetter, M. G., Plueckthun, A., Nat. Biotechnol. 21. 22, 575~582, 2004）等の、設計リピートタンパク質又は設計リピートドメインに基づいている。国際公開第2002/020565号は、アンキリンリピートタンパク質等のリピートタンパク質についてどの程度大きなライブラリーが構築され得るか、及びこれらの一般的な用途を記載している。国際公開第2012/069654号は、血清アルブミンに対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメインを含む、組み換え結合タンパク質を記載している。国際公開第2010/060748号は、VEGF-Aに対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメインを含む、組み換え結合タンパク質を記載し、また、国際公開第2011/135067号は、このようなVEGF-Aへの結合に特異的な組み換え結合タンパク質の修飾体を記載している。国際公開第2014/191574号は、HGFに対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメインを含む、組み換え結合タンパク質を記載している。これらの特許出願はいずれも、VEGF-Aに対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメインと、HGFに対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメインと、を含む、組み換え結合タンパク質については、開示していない。10
20

【0005】

例えば、FcRn再利用によってもたらされる長い全身性半減期(systemic half-life)を呈するIgG抗体とは異なり、設計アンキリンリピートドメインを含むタンパク質は、そのタンパク質が、例えば、国際公開第2012/069654号に記載の血清アルブミンに対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメイン等の、薬物動態特性を改善する構成要素を含まない限り、典型的には、迅速な薬物動態クリアランス及び短い終末相半減期を呈する。血清アルブミン結合を使用してタンパク質の薬物動態特性を改善することは、当該技術分野において周知の方法である（例えば、国際公開第9101743号；Frejd F. Y., 2012 (Kontermann, R (Ed.) 「Therapeutic proteins: strategies to modulate their plasma half-lives」, Wiley-VCH Verlag GmbH, 2012, ISBN 978-3-527-32849-9中)；Nguyen, A., Reyes, A. E. II., Zhang, M., McDonald, P., Wong, W. L., Damico, L. A., Dennis, M. S. Protein Eng. Des. Sel. 19, 291~297, 2006；国際公開第2008/096158号；同第2006/122787号；同第2011/095545号；及び同第2012/069654号を参照）。血清アルブミンに対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメインを臨床の薬物候補で使用できるようにするために、血清アルブミンに対する結合特異性を有する既知の設計アンキリンリピートドメインの保存安定性を改善する必要がある。本明細書において、改善された特性を有する、血清アルブミンに対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメインが開示される。30
40

【0006】

血清アルブミンに対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメインの結合価50

の、組み換え結合タンパク質の薬物動態特性に対する効果については精査されていなかった。アルブミン結合ドメインの知見 (Hopp, J., Horning, N., Zettlitz, K.A., Schwarz, A., Fuss, N., Mueller, D., Kontermann, R.E. Protein Eng. Des. Sel. 23, 827~834, 2010) に基づき、当業者は、血清アルブミンに対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメイン等のアルブミン結合タンパク質ドメインを2つ含む組み換え結合タンパク質が、血清アルブミンに対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメインを1つのみ含む組み換え結合タンパク質に比べ、改善された薬物動態特性を有することはないものと予想していた。驚くべきことに、発明者らは、これが事実ではないことを見出した。これにより、血清アルブミンに対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメインを少なくとも2つ含み、血清アルブミンに対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメインを1つのみ含む組み換え結合タンパク質に比べ、改善された薬物動態特性（すなわち、終末相半減期の延長、曝露の増加、クリアランスの低下、及び／又は注入量の割合の増加）を呈する、組み換え結合タンパク質が開示される。
10

【0007】

血管新生（新生血管形成）が、腫瘍の増殖及び維持において重要な役割を果たしていることは周知である (Ferrera, N., and Kerbel, R.S., Nature 438, 967~974, 2005)。したがって、血管新生の阻害、特に、血管内皮増殖因子 (VEGF) 及びその受容体を標的とすることが、現代の臨床腫瘍学における重要な鍵となっている (Hurwitz, H., Clin. Colorectal Cancer, Suppl. 2, 62~68, 2004; Escudier, B., Clin. Adv. Hematol. Oncol. 5, 530~531, 2007)。哺乳動物の VEGF ファミリーは、VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D (別名 FIGF) 及び胎盤増殖因子 (PlGF、別名 PGF) と呼ばれる5つの糖タンパク質からなる。VEGF-A は、抗血管新生療法に有効な標的であることが示されている (Weis, S.M., and Cheresh, D.A., Nat. Med. 17, 1359~1370, 2011)。VEGF-A のリガンドは、3つの構造的に類似した III 型受容体チロシンキナーゼである、特定の VEGFR-1 (別名 FLT1)、VEGFR-2 (別名 KDR) 及び VEGFR-3 (別名 FLT4) に結合し、活性化する。これまでにいくつかの血管新生阻害剤が規制当局の承認を受けており、様々な癌種において、化学療法との併用で、延長した無増悪生存期間 (PFS) 及び／又は全生存期間を示している。残念ながら、VEGF-A 阻害剤ベバシズマブ (Avastin (登録商標)) 等の VEGF / VEGFR 阻害剤による治療の過程において、耐性が不可避的に発生しており、追加の標的及び耐性経路を同時に阻害することが、より優れた臨床結果を達成するために必要であり得ることを示唆している (Kerbel, R.S., N. Engl. J. Med. 358, 2039~2049, 2008; Hurwitz, 2004, loc. cit.; Escudier, 2007, loc. cit.)。

【0008】

cMet チロシンキナーゼは、主として上皮細胞上に発現される、肝細胞増殖因子 (HGF、別名分散因子、SF) の細胞表面受容体である (Comoglio, P.M., Giordano, S., and Trusolino, L., Nat. Rev. Drug Discov. 7, 504~516, 2008)。cMet 及び HGF は、正常な成人組織では低レベルで発現されるのに対し、広範なヒトの腫瘍においては、これらの発現が上方制御されることが多く、これは、前臨床モデルにおいて、腫瘍細胞の生存、増殖、血管新生、侵襲及び転移と相關している (Rong, S., Segal, S., Anver, M., Resau, J.H., Vande Woude, G.F., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 4731~4735, 1994; Michielin, P., Mazzzone, M., Basilico, C., Cavassa, S., Sottile, A., Naldini, L., Comoglio, P.M., Cancer Cell 6, 61~73, 2004)。HGF 及び／又は cMet の発現並びにシ
40
50

グナル伝達の上方制御は、臨床における多くの腫瘍型において、予後不良及び薬剤耐性と関連することが判明している (Fasolo, A., Sessa, C., Gianni, L., Broggini, M., Ann. Oncol. 24, 14~20, 2013)。全体的に見て、これは、HGF-cMet系が、治療介入にとって重要な標的であることを示している (Comoglio, 2008 loc. cit.; Fasolo et al., 2013, loc. cit.)。HGFは、その受容体への結合により、様々な細胞種の分散、細管及び管腔の形成、上皮間葉転換、血管新生、肝再生、創傷治癒及び胎生発育といった、多数の細胞応答を媒介する。HGF/c-Metシグナル伝達経路もまた、様々な疾患において役割を果たすことが示されており、例えば、多くのヒト固形腫瘍において、腫瘍の形成、侵襲及び転移に関与している。第I相又は第II相臨床開発中の現在のHGF/cMet経路阻害剤は、cMetの細胞外ドメインを標的とするモノクローナル抗体 (mAb) (すなわちGenentech-RocheのMetMab) 又はcMetの細胞内キナーゼドメインの小分子阻害剤を含む。チバンチニブ (ArQuile (登録商標)) 及びカボザンチニブ (Cometriq (登録商標)) 等の小分子阻害剤は非常に強力であるが、mAbよりも特異性が低く、また、より高い毒性を有する可能性がある。HGF/SFに対する生物学的薬剤としては、HGFに対するヒト化mAbであるリロツムマブ (AMG102)、及びヒト化抗HGF IgG1であるフィクラツズマブ (AV-299) が挙げられる。HGF/cMet阻害剤の他の標的剤との併用は、重複性の、又は、相乗的な腫瘍の機能を有する、様々なシグナル伝達経路を同時に阻害することを目的とした、活発な研究領域である。HGF/cMetは、新たな腫瘍の血管の誘発においてVEGFと相乗的に作用する、強力な血管新生シグナルを誘発し、神経膠芽腫 (Jahangiri, A., De Lay, M., Miller, L.M., Carbonell, W.S., Hu, Y.L., Lu, K., Tom, M.W., Paquette, J., Tokuyasu, T.A., Tsao, S., Marshall, R., Perry, A., Bjorgan, K.M., Chaumeil, M.M., Ronen, S.M., Bergers, G., Aghi, M.K., Clin. Cancer Res. 19, 1773~1783, 2013) 及び腎細胞癌においてそれぞれ、Avastin (登録商標) 及びSutent (登録商標) (スニチニブ) 等の抗血管新生療法に対する耐性を誘発する場合がある。

【0009】

現在、抗VEGF受容体阻害剤等の他の標的剤との併用で研究中の、多数の抗HGF/cMet化合物があり、様々な腫瘍型において、好ましい安全性プロファイルを示している (Sharma, P.S., Sharma, R., Tyagi, T. Curr. Cancer Drug Targets. 11, 624~653, 2011)。しかしながら、このような併用療法の手法は、患者が、それぞれ安全性プロファイルが異なる、2つの別個の治療を受けなければならないことになり、これによって望ましくない毒性が高くなる場合があり、その結果、治療法の選択肢が制限されてしまう場合がある。更に、異なる治療には異なる投与計画が施される場合があり、患者にとって、投与がより煩わしいものとなりかねない。最後になるが重要なこととして、各種の薬剤を同時に投与することにより、治療及び患者のケアに関連する費用が著しく増加してしまう場合がある。

【0010】

cMet及びVEGFの二重の阻害活性を有する市販の薬物の1つはカボザンチニブ (Cometriq (登録商標)、小分子薬物) で、これは、経口の、(RET、KIT、AXL及びFLT3に加えて)cMet及びVEGFR 1~3を標的とする多特異性のチロシンキナーゼ阻害剤である。カボザンチニブは、腫瘍中のHGF及びVEGFを単剤で同時に阻害するという臨床的な手法を実証した (Yakes, F.M., Chen, J., Tan, J., Yamaguchi, K., Shi, Y., Yu, P., Qian, F., Chu, F., Bentzien, F., Cancilla, B., Orf, J., You, A., Laird, A.D., Engst, S., Lee, L., Lesch, J., Chou, Y.C., Joly, A.H., Mol. Cancer Ther. 10,

10, 2298 ~ 2308, 2011; Castellone, M. D., Carlomagno, F., Salvatore, G., Santoro, M., Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab. 22, 1023 ~ 1038, 2008)。例えば、去勢抵抗性前立腺癌において、抗HGF mAbリロツムマブは第I相試験で単剤としては有効性を示さず、カボザンチニブは第II相試験で患者において高率で抗腫瘍活性を示した(Smith, D. C., Smith, M. R., Sweeney, C., Elfiky, A. A., Logothetis, C., Corn, P. G., Vogelzang, N. J., Small, E. J., Harzstark, A. L., Gordon, M. S., Vaishampayan, U. N., Haas, N. B., Spira, A. I., Lara, P. N. Jr., Lin, C. C., Srivivas, S., Sella, A., Schoeffski, P., Scheffold, C., Weitzman, A. L., Hussain, M., J. Clin. Oncol. 31, 412 ~ 419, 2013)。しかしながら、活性は高頻度の有害事象を伴い、62%の患者において投与量の低減が必要となり、このような多面的な作用機序の安全性及び忍容性について疑問が呈された。

【0011】

VEGF-A及びHGF/cMetを同時に標的とすることにより、血管新生及び腫瘍進行を有利に阻害し得る。本明細書で前述したように、VEGF-A/VEGFR-2経路及びHGF/cMet経路のいずれにも同時に作用する現在の治療法は、非特異的で、安全性上の知見の原因となる単独療法に基づいている、又は、併用しなくてはならないいくつかの特異的な治療法を伴い、その結果、同時投与若しくは多重投与が必要となる。更に、現在の薬物のいくつかは、短い全身性半減期を呈する。したがって、VEGF-A/VEGFR-2経路及びHGF/cMet経路を阻害する、改善された薬物を提供する必要性がある。これは、抗体医薬品では、哺乳動物細胞における困難な生産が必要であることが更に障害となり、技術的に達成が困難である。本明細書では、これらの課題に対処する、組み換え結合タンパク質が提供される。いくつかの実施形態において、本明細書で提供される組み換え結合タンパク質は、VEGF-Aに対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメインを少なくとも1つ含み、HGFに対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメインを少なくとも1つ含み、かつ薬物動態特性の改善のために、血清アルブミンに対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメインを少なくとも2つ含む。

【発明の概要】

【0012】

本発明は、血清アルブミンに対する結合特異性を有する既知の設計アンキリンリピートドメインよりも改善された保存安定性を呈する、配列番号50のアミノ酸配列を含む、新規の血清アルブミンに対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメインに関する。一実施形態において、本発明は、血清アルブミンに対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメインを少なくとも2つ含む組み換え結合タンパク質に関し、上記の血清アルブミンに対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメインはそれぞれ、配列番号50を含む。一実施形態において、本発明は、第1、第2、第3、及び第4の設計アンキリンリピートドメインを含む組み換え結合タンパク質に関し、上記の第1の設計アンキリンリピートドメインはVEGF-Aに対する結合特異性を有し、かつ上記の第2の設計アンキリンリピートドメインはHGFに対する結合特異性を有し、かつ上記の第3及び第4の設計アンキリンリピートドメインはそれぞれ血清アルブミンに対する結合特異性を有し、かつアミノ酸配列50のアミノ酸配列を含む。一実施形態において、上記の組み換え結合タンパク質の上記の第1、第2、第3及び第4の設計アンキリンリピートドメインは、N末端からC末端に向かって第3 - 第2 - 第1 - 第4の順である。一実施形態において、上記の組み換え結合タンパク質の上記の第1の設計アンキリンリピートドメインは、配列番号12 ~ 21のアミノ酸配列と、配列番号12 ~ 21の最大10個のアミノ酸が任意のアミノ酸によって交換されているアミノ酸配列と、からなる群から選択される

アミノ酸配列を含み、かつ上記の組み換え結合タンパク質の上記の第2の設計アンキリンリピートドメインは、配列番号23～37のアミノ酸配列と、配列番号23～37の最大10個のアミノ酸が任意のアミノ酸によって交換されているアミノ酸配列と、からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、かつ上記の組み換え結合タンパク質の上記の第3及び第4の設計アンキリンリピートドメインはそれぞれ、配列番号50のアミノ酸配列を含み、かつ上記の設計アンキリンリピートドメインは、配列番号2～9のアミノ酸配列と、配列番号2～9の最大4個のアミノ酸が任意のアミノ酸によって交換されているアミノ酸配列と、からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むポリペプチドリンカーによって結合されている。一実施形態において、上記の組み換え結合タンパク質の上記の第1の設計アンキリンリピートドメインは、配列番号18のアミノ酸配列を含み、かつ上記の組み換え結合タンパク質の上記の第2の設計アンキリンリピートドメインは、配列番号26のアミノ酸配列を含み、かつ上記の組み換え結合タンパク質の上記の第3及び第4の設計アンキリンリピートドメインはそれぞれ、配列番号50のアミノ酸配列を含み、かつ上記の設計アンキリンリピートドメインは、配列番号9のアミノ酸配列からなるポリペプチドリンカーによって結合されている。一実施形態において、本発明は、配列番号134のアミノ酸配列と少なくとも90%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、組み換え結合タンパク質に関する。一実施形態において、本発明は、配列番号134のアミノ酸配列からなる組み換え結合タンパク質に関する。好ましい一実施形態において、本発明は、配列番号134のアミノ酸配列からなる組み換え結合タンパク質に関する。10
20

【0013】

本発明は更に、本発明の設計アンキリンリピートドメイン又は組み換え結合タンパク質のアミノ酸配列をコードする、核酸に関する。

【0014】

本発明はまた、本発明の組み換え結合タンパク質及び／若しくは設計アンキリンリピートドメイン又は核酸、並びに任意に、薬学的に許容される担体及び／若しくは賦形剤を含む、医薬組成物に関する。

【0015】

本発明はまた、本発明の医薬組成物の疾患の治療への使用にも関する。一実施形態において、本発明は、本発明の医薬組成物の癌、胃癌、又は腎癌の治療への使用に関する。30

【図面の簡単な説明】

【0016】

【図1】血清アルブミンに対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメインを含む組み換え結合タンパク質の図である。(a) 血清アルブミンに対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメインの図である。このようなアンキリンリピートドメインの例は、配列番号40～56からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する設計アンキリンリピートドメイン、特に、配列番号50のアミノ酸配列を有する設計アンキリンリピートドメインである。(b) 血清アルブミンとは別の標的に対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメインの図である。このようなアンキリンリピートドメインの例は、配列番号12～39からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する設計アンキリンリピートドメインである。(c) ポリペプチドリンカー(例えば配列番号2～9のいずれかに対応するアミノ酸配列を有するポリペプチド)の図である。(d) N末端アミノ酸配列の図である。このようなN末端アミノ酸配列の例は、例えば、配列MGS若しくはGS、又は配列番号1に対応するアミノ酸配列で例示されるポリペプチドタグである。(e) 生理活性化合物の図である。このような部分は、例えば、アゴニスト活性(例えばホルモン又は酵素)、アンタゴニスト活性(例えば受容体ドメイン又は抗体フラグメント)、若しくは毒性活性(例えば毒素)を有する、タンパク質又はタンパク質ドメインであり得る。このような部分はまた、例えば、アゴニスト活性、アンタゴニスト活性、又は毒性活性を呈する小分子化合物である場合もある。(f) ポリペプチドリンカーによって結合され、かつN末端アミノ酸配列を有する、血清アルブミンに対する結合特異性を有する設40
50

計アンキリンリピートドメイン 2 つと、血清アルブミンとは別の標的に対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメイン 1 つとを含む、本明細書において提供される組み換え結合タンパク質の図である。例えば、配列番号 7 3 ~ 8 1 のいずれかに対応するアミノ酸配列を有する組み換え結合タンパク質は、このような 3 つの設計アンキリンリピートドメインからなり、配列番号 7 3 、 7 5 、 7 8 、及び 8 0 は、図示したように、それぞれの第 3 の設計アンキリンリピートドメインに隣接する、血清アルブミンに対する結合特異性を有する 2 つの設計アンキリンリピートドメインを有する。(g) ポリペプチドリンカーによって結合され、かつ N 末端アミノ酸配列を有する、血清アルブミンに対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメインは、この図において提供される組み換え結合タンパク質の図である。血清アルブミンに対する結合特異性を有する 2 つの設計アンキリンリピートドメインは、2 つの他の設計アンキリンリピートドメインと隣接している。例えば、配列番号 9 5 ~ 1 0 7 、 1 1 0 、 1 1 6 、 1 2 2 、 1 2 9 ~ 1 3 1 、 1 3 4 ~ 1 4 4 、 1 4 9 ~ 1 7 2 、及び 1 7 5 ~ 1 7 9 のいずれか、特に配列番号 1 3 4 に対応するアミノ酸配列を有する組み換え結合タンパク質が、この図に対応する。(h) ポリペプチドリンカーによって結合され、かつ N 末端アミノ酸配列を有する、血清アルブミンに対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメイン 2 つと、血清アルブミンとは別の標的に対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメイン 2 つとを含む、本明細書において提供される組み換え結合タンパク質の図である。血清アルブミンに対する結合特異性を有する 2 つの設計アンキリンリピートドメインは、2 つの他の設計アンキリンリピートドメインの N 末端である。例えば、配列番号 1 1 2 、 1 1 9 、 1 2 4 、 1 2 8 、 1 3 2 、及び 1 3 3 のいずれかに対応するアミノ酸配列を有する組み換え結合タンパク質が、この図に対応する。(i) 血清アルブミンに対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメイン 2 つと、生理活性化合物とを含む、医薬品化合物の図である。生理活性化合物は、血清アルブミンに対する結合特異性を有する 2 つの設計アンキリンリピートドメインと、化学結合により、又は、ポリペプチドの場合にはタンパク質融合により共有結合され得る。

【図 2】配列番号 5 0 を含む組み換え結合タンパク質の改善された保存安定性を示す電気泳動の図である。 P B S 中に 1 0 m g / m L で 1 週間、それぞれ 4 (1) 、 2 5 (2) 、 4 0 (3) 、及び 6 0 (4) で保存したタンパク質 # 4 9 及び # 5 0 (実施例 4 に記載のように調製され、それぞれ配列番号 4 9 及び 5 0 に対応し、更に N 末端に配列番号 1 を有する) の S D S 1 5 % P A G E 分析である。 M : マーカー (下のバンド : 6 . 5 k D a ; タンパク質 # 5 0 の高さのバンド : 1 4 . 4 k D a ; タンパク質 # 5 0 の P A G E の場合の上のバンド : 2 1 . 5 k D a) 。

【図 3】組み換え結合タンパク質中に血清アルブミンに対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメインを 2 つ有する効果を示す、マウスの薬物動態試験のグラフ図である。マウスの薬物動態試験は、実施例 5 に記載のように、 ^m99 T c 標識タンパク質を使用して実施した。初期の測定時間ポイント (a : 4 時間 ; b ~ d : 1 時間) に対する注入量の割合 (% I D) を、経時的に示す (t ; 時間) 。使用したタンパク質は、特に明記しない限り、示した配列に加え、 N 末端 H i s タグ (配列番号 1) を含んでいた。(a) タンパク質 # 5 7 (血清アルブミンに対する結合特異性を有する単一の設計アンキリンリピートドメイン ; 配列番号 5 1 を含む、配列番号 5 7 ; 黒丸) と、タンパク質 # 6 2 及び 6 3 (血清アルブミンに対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメインを 2 つ (配列番号 5 1 を 2 回分) 含み、 G S リッチポリペプチドリンカー (配列番号 6 3 ; 黒菱) 又は P T リッチポリペプチドリンカー (配列番号 6 2 ; 黒四角) によって結合されたタンパク質) との薬物動態プロファイルの比較を示すグラフ図である。血清アルブミンに対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメインを 2 つ有することにより、血清アルブミンに対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメインを 1 つのみ含むタンパク質に比べ、 % I D が、例えば、注入後 2 4 時間 (G S + 5 7 % 、 P T + 5 9 %) 、 4 8 時間 (G S + 7 6 % 、 P T + 8 2 %) 又は 7 2 時間 (G S + 7 9 % 、 P T + 9 4 %)

)で上昇し、終末相半減期が改善する (G S + 3 8 %、P T + 4 8 %)。 (b) 配列番号 2 2 (血清アルブミンとは別の標的に対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメイン) 及び配列番号 5 1 (血清アルブミンに対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメイン) を含むタンパク質 # 6 4 (黒丸) と、配列番号 2 2 及び 2 回分の配列番号 5 1 をそれぞれ含む、タンパク質 # 7 3 (黒四角) 及びタンパク質 # 7 4 (黒菱)との薬物動態プロファイルの比較を示すグラフ図である。タンパク質 # 7 3 は、配列番号 2 2 に隣接する配列番号 5 1 を有し、タンパク質 # 7 4 は、配列番号 2 2 の N 末端に配列番号 5 1 を 2 回分有する。血清アルブミンに対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメインを 2 つ有することにより、血清アルブミンに対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメインを 1 つのみ含むタンパク質に比べ、% I D が、例えば、注入後 24 時間 (N 末端 + 6 2 %、隣接 + 8 9 %)、又は 48 時間 (N 末端 + 1 3 6 %、隣接 + 1 7 5 %) で上昇し、終末相半減期が改善する (N 末端又は隣接の両方について + 6 3 % 超)。 (c) 配列番号 1 1 (既知の結合特異性を有さない設計アンキリンリピートドメインを 2 回分) 及び配列番号 5 1 (血清アルブミンに対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメイン) を含むタンパク質 # 8 2 (黒丸) と、配列番号 1 1 (2 回分) 及び配列番号 5 1 (2 回分、N 末端) を含むタンパク質 # 1 0 9 (黒四角) との薬物動態プロファイルの比較を示すグラフ図である。血清アルブミンに対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメインを 2 つ有することにより、血清アルブミンに対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメインを 1 つのみ含むタンパク質に比べ、% I D が、例えば、注入後 24 時間 (+ 1 2 %)、又は 48 時間 (+ 3 5 %) で上昇し、終末相半減期が改善する (+ 7 1 %)。 (d) 配列番号 3 8 及び 3 9 (血清アルブミンとは別の標的に対する結合特異性をそれぞれ有する設計アンキリンリピートドメイン) 並びに配列番号 5 0 (血清アルブミンに対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメイン) を含むタンパク質 # 8 3 (黒丸) と、各配列番号 3 8、3 9 及び 5 0 (2 回分、配列番号 3 8 及び 3 9 と隣接) を含むタンパク質 # 1 1 0 (黒四角) との薬物動態プロファイルの比較を示すグラフ図である。血清アルブミンに対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメインを 2 つ有することにより、血清アルブミンに対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメインを 1 つのみ含むタンパク質に比べ、% I D が、例えば、注入後 24 時間 (+ 1 9 8 %)、48 時間 (+ 1 9 8 %)、又は 72 時間 (+ 2 2 8 %) で上昇し、終末相半減期が改善する (+ 1 9 %)。タンパク質 # 8 3 の測定値は、
定量下限に近かったことに留意されたい。

【図 4】組み換え結合タンパク質中に血清アルブミンに対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメインを 2 つ有する効果を示す、カニクイザルの薬物動態試験のグラフ図である。カニクイザルの薬物動態試験は、実施例 6 に記載のように実施した。それらのタンパク質の濃度を n M で (a)、又は、注入後 10 分の測定値に対する相対値で (b)、日数 (a) 又は時間 (b) で経時的に示す。使用したタンパク質は、特に明記しない限り、示した配列に加え、N 末端 His タグ (配列番号 1) を含んでいた。(a) タンパク質 # 5 7 (0.5 mg / kg ; 27.7 nmol / kg ; 血清アルブミンに対する結合特異性を有する単一の設計アンキリンリピートドメイン；配列番号 5 1 を含む、配列番号 5 7 ; 黒丸) と、タンパク質 # 6 2 (1.04 mg / kg ; 34.5 nmol / kg ; 血清アルブミンに対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメインを 2 つ (配列番号 5 1 を 2 回分) 含み、PT リッチポリペプチドリンカーによって結合されたタンパク質) との薬物動態プロファイルの比較を示すグラフ図である。血清アルブミンに対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメインを 2 つ有することにより、血清アルブミンに対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメインを 1 つのみ含むタンパク質に比べ、曝露が上昇し (2138 d · nmol / L 対 4676 d · nmol / L、すなわち 7 日までの計算で + 119 %)、クリアランスが低下し (0.0108 L / (d · kg) 対 0.0031 L / (d · kg)、すなわち - 71 %)、終末相半減期が改善する (4.57 d 対 9.00 d、すなわち 1 日目 ~ 7 日目の計算で + 97 %)。(b) カニクイザルに 1 mg / kg で静脈内投与したタンパク質 # 9 7 (配列番号 9 7 のアミノ酸
40
50

配列からなる組み換え結合タンパク質、黒四角) 及びタンパク質 # 134 (配列番号 134 のアミノ酸配列からなる組み換え結合タンパク質、追加の配列タグなし、黒丸) の薬物動態プロファイルのグラフ図である。タンパク質 # 134 は、タンパク質 # 97 に比べ、改善された薬物動態プロファイルを有する。

【図 5】血清アルブミンに対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメインを 2つ含む組み換え結合タンパク質 (タンパク質 # 134) の静的光散乱に連結されたサイズ排除クロマトグラフィーのクロマトグラムである。実験は、実施例 7 に記載のように、タンパク質 # 134 (配列番号 134 からなる組み換え結合タンパク質、実線)、ヒト血清アルブミン (点線)、及びこれら 2つの混合物 (破線) を使用して実施した。実験は、血清アルブミンに対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメインを 2つ (配列番号 50 を 2回分) 含むタンパク質 # 134 は、2つのヒト血清アルブミン分子と同時に結合できることを示している。
10

【図 6 a】組み換え結合タンパク質の E L I S A 分析のグラフ図である。実施例 10 に概説した、タンパク質 # 134 (配列番号 134 のアミノ酸配列からなる組み換え結合タンパク質) の各種結合 E L I S A における分析のグラフ図である。タンパク質 # 134 は、V E G F - A に対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメイン 1つと、H G F に対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメイン 1つと、血清アルブミンに対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメイン 2つと、を含み、それに応じ、これらの標的タンパク質とタンパク質 # 134 の相互作用が予想される。(a) V E G F - A の E L I S A のグラフ図である。ヒト (黒丸)、ラット (黒四角)、及びマウス (黒菱) の固定化 V E G F - A、並びにヒト V E G F - C (白逆三角)、及びヒト P D G F - A B (白丸) に対するタンパク質 # 134 の各種濃度の結合シグナルと、対応する適合阻害曲線を示す。タンパク質 # 134 は、これらの種の V E G F - A を高い親和性で結合させ、V E G F - C 及び P D G F - A B を結合させていない。
20

【図 6 b】組み換え結合タンパク質の E L I S A 分析のグラフ図である。実施例 10 に概説した、タンパク質 # 134 (配列番号 134 のアミノ酸配列からなる組み換え結合タンパク質) の各種結合 E L I S A における分析のグラフ図である。タンパク質 # 134 は、V E G F - A に対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメイン 1つと、H G F に対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメイン 1つと、血清アルブミンに対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメイン 2つと、を含み、それに応じ、これらの標的タンパク質とタンパク質 # 134 の相互作用が予想される。(b) H G F の E L I S A のグラフ図である。ヒト (黒丸)、カニクイザル (黒三角)、及びマウス (黒菱) の固定化 H G F に対するタンパク質 # 134 の各種濃度の結合シグナルと、対応する適合阻害曲線を示す。タンパク質 # 134 は、これらの種の H G F を高い親和性で結合させる。
30

【図 6 c】組み換え結合タンパク質の E L I S A 分析のグラフ図である。実施例 10 に概説した、タンパク質 # 134 (配列番号 134 のアミノ酸配列からなる組み換え結合タンパク質) の各種結合 E L I S A における分析のグラフ図である。タンパク質 # 134 は、V E G F - A に対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメイン 1つと、H G F に対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメイン 1つと、血清アルブミンに対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメイン 2つと、を含み、それに応じ、これらの標的タンパク質とタンパク質 # 134 の相互作用が予想される。(c) 血清アルブミンの E L I S A のグラフ図である。ヒト (黒丸)、カニクイザル (白逆三角)、ラット (白三角)、マウス (白四角)、及びイヌ (白菱) の固定化血清アルブミンに対するタンパク質 # 134 の各種濃度の結合シグナルと、対応する適合阻害曲線を示す。タンパク質 # 134 は、これらの種の血清アルブミンを高い親和性で結合させる。O D は、450 nm における光学密度から 620 nm における O D を差し引いたもの、c [p M] は、組み換え結合タンパク質の対数目盛りにおける濃度 (p M) である。
40

【図 7 a】V E G F - A / V E G F - R 2 及び H G F / c M e t 受容体競合アッセイのグラフ図である。実施例 11 に記載の、タンパク質 # 134 (配列番号 134 のアミノ酸配
50

列からなる組み換え結合タンパク質)の各種競合アッセイにおける分析のグラフ図である。 (a) V E G F - A / V E G F R - 2 H T R F の結合競合アッセイのグラフ図である。タンパク質#134は、V E G F - A / V E G F R - 2 の相互作用を阻害する。ベースラインを破線で示し、競合シグナルのないものは、丸印で示す。R : 665 nmのシグナル対620 nmシグナルの比、c : タンパク質#134の濃度(nM)。

【図7b】V E G F - A / V E G F - R 2 及びH G F / c M e t 受容体競合アッセイのグラフ図である。実施例11に記載の、タンパク質#134(配列番号134のアミノ酸配列からなる組み換え結合タンパク質)の各種競合アッセイにおける分析のグラフ図である。(b) H G F / c M e t 競合結合アッセイのグラフ図である。タンパク質#134は、H G F / c M e t の相互作用を阻害する。OD : 450 nmにおけるODから620 nmにおけるODを差し引いたもの、c : タンパク質#134の濃度(nM)。
10

【図7c】V E G F - A / V E G F - R 2 及びH G F / c M e t 受容体競合アッセイのグラフ図である。実施例11に記載の、タンパク質#134(配列番号134のアミノ酸配列からなる組み換え結合タンパク質)の各種競合アッセイにおける分析のグラフ図である。(c) V E G F - A の競合結合E L I S Aのグラフ図である。タンパク質#134は、V E G F - A をI C₅₀ 10 pM以上で結合させる。OD : 450 nmにおけるODから620 nmにおけるODを差し引いたもの、c : タンパク質#134の濃度(pM)。

【図8】組み換え結合タンパク質のS P R分析のグラフ図である。実施例12に記載の、P r o t e O n 装置を使用した、タンパク質#134(配列番号134のアミノ酸配列からなる組み換え結合タンパク質)によるV E G F - A 、H G F 、及びH S A の結合の分析である。ヒトH G F をバイオセンサーチップ上に固定化し、タンパク質#134、ヒトV E G F - A 、又はヒト血清アルブミンを、以下の注入スキームに従って注入した：(1)タンパク質#134 - h V E G F - A - H S A 、(2)タンパク質#134 - h V E G F - A - P B S T 、(3；点線)タンパク質#134 - P B S T - H S A 、(4)P B S T - P B S T - P B S T 、(5)P B S T - h V E G F - A - P B S T 、(6)P B S T - P B S T - H S A 。曲線1及び2は、タンパク質#134がヒトH G F 及びヒトV E G F - A を同時に結合させることができることを示している。更に、V E G F - A の結合が曲線1では飽和に達していることから、曲線1は、タンパク質#134が、ヒトH G F 、ヒトV E G F - A 及びヒト血清アルブミンを同時に結合させることができることを示している。対照の注入は、非特異的な相互作用が起こらないことを示している。R U : 共鳴単位；t : 時間(秒)。
20

【図9a】組み換え結合タンパク質の細胞増殖及び細胞遊走に対する効果を示すグラフ図である。異なる細胞分析における、タンパク質#134(配列番号134のアミノ酸配列からなる組み換え結合タンパク質)の作用を、実施例13に記載のように評価した。(a)タンパク質#134によるH U V E C の増殖の阻害を示すグラフ図である。H U V E C (3 × 10³細胞/ウェル)を、8 ng / mLのヒトV E G F - A で刺激した。H U V E C の増殖状態は、タンパク質#134の非存在下(白丸)又は上昇する濃度のタンパク質#134の存在下(黒丸)で分析した。37 及び5% CO₂における培養の3日後、B r d U を培養の最後の24時間添加することにより、阻害を定量化した。タンパク質#134は、100 ~ 150 pMの範囲のI C₅₀を呈する。エラーバーは、独立した2回の繰り返しの標準偏差を表す。OD : 450 nmにおけるODから620 nmにおけるODを差し引いたもの、c : タンパク質#134の濃度(n g / mL)。X軸は、対数目盛で示す。
30

【図9b】組み換え結合タンパク質の細胞増殖及び細胞遊走に対する効果を示すグラフ図である。異なる細胞分析における、タンパク質#134(配列番号134のアミノ酸配列からなる組み換え結合タンパク質)の作用を、実施例13に記載のように評価した。(b) A 5 4 9 細胞を用いたO r i s 細胞遊走アッセイにおけるタンパク質#134の効果のグラフ図である。タンパク質#134は、H G F 誘発細胞遊走を顕著に阻害する。H G F (500 pM、H及びD)又はP B S (N)による刺激の24時間前に、タンパク質#134(5 μM)の存在下(D)及び非存在下(H、N)で細胞を接種した。ストッパーを
40

取り外し、48時間後、カルセインによる細胞の染色後に遊走を検出及び定量化した。画像を撮影し、細胞培養皿ウェルにおける覆われていない面積を定量化した。U：8つの独立したウェルにおける覆われていない面積（ μm^2 ）、H：HGF有り、タンパク質#134無し、N：HGF無し、タンパク質#134無し、D：HGF有りかつタンパク質#134有り。

【図9c】組み換え結合タンパク質の細胞増殖及び細胞遊走に対する効果を示すグラフ図である。異なる細胞分析における、タンパク質#134（配列番号134のアミノ酸配列からなる組み換え結合タンパク質）の作用を、実施例13に記載のように評価した。（c）タンパク質#134によるA549細胞中のcMetリン酸化の阻害のグラフ図である。A549細胞を終夜飢餓させ、PBS又は上昇濃度のタンパク質#134の存在下で、1nMのヒトHGF（陰性対照についてはHGF無し）によって10分間刺激した。P-cMetをELISAによる細胞溶解物中で検出し、OD450～620を測定した。相対シグナル（%リン酸化）を、最大シグナル（HGF有り、タンパク質#134無し）及び最小シグナル（HGF無し、タンパク質#134無し）を用いて算出した。タンパク質#134は、cMetのリン酸化をIC₅₀ 1nM以上で阻害する。%P：%リン酸化、c：タンパク質#134の濃度（nM）。

【図10a】組み換え結合タンパク質のin vivo腫瘍増殖に対する効果を示すグラフ図である。タンパク質#134（配列番号134のアミノ酸配列からなる組み換え結合タンパク質；（i）VEGF-Aに対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメイン1つ、（ii）HGFに対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメイン1つ、及び（iii）血清アルブミンに対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメイン2つを含む；図1を参照）及び他の組み換え結合タンパク質の有効性を、腫瘍異種移植マウスモデルで実施例14に記載のように評価した。（a）実施例14に記載のように、タンパク質#134、タンパク質#60（配列番号60のアミノ酸配列からなり、更に配列番号1をN末端に有する組み換え結合タンパク質；HGFに対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメイン（タンパク質#134中のものと同一）1つと、血清アルブミンに対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメイン（タンパク質#134中のものと同一）1つとを含む）、又はタンパク質#61（配列番号61のアミノ酸配列からなり、更に配列番号1をN末端に有する組み換え結合タンパク質；VEGF-Aに対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメイン（タンパク質#134中のものと同一）1つと、血清アルブミンに対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメイン（タンパク質#134中のものと同一）1つとを含む）で処置した、U87Mマウスモデルの腫瘍組織における増殖細胞及び平均血管面積の定量のグラフ図である。U87M腫瘍異種移植細胞の増殖（P；増殖細胞の百分率、%pcとして測定した）の阻害に関し、タンパク質#60は、タンパク質#61と同様にわずかな阻害を呈するのに対し、タンパク質#134は、極めてより強力な効果を有する。同様に、血管増殖（A；平均血管面積の百分率、%mvaとして測定した）の阻害に関し、タンパク質#60はわずかな阻害を呈し、タンパク質#61は中程度の阻害を呈し、タンパク質#134は最も強力な効果を呈する。PBS（白いバー）、タンパク質#60（横縞模様のバー）、タンパク質#61（縦縞模様のバー）、タンパク質#134（黒いバー）。

【図10b】組み換え結合タンパク質のin vivo腫瘍増殖に対する効果を示すグラフ図である。タンパク質#134（配列番号134のアミノ酸配列からなる組み換え結合タンパク質；（i）VEGF-Aに対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメイン1つ、（ii）HGFに対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメイン1つ、及び（iii）血清アルブミンに対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメイン2つを含む；図1を参照）及び他の組み換え結合タンパク質の有効性を、腫瘍異種移植マウスモデルで実施例14に記載のように評価した。（b）患者由来の腎腫瘍異種移植マウスモデルにおける腫瘍増殖に対するタンパク質#134の効果を、ソラフェニブ及びPBSと比較したグラフ図である。モデルの詳細は、実施例14に記載する。ソラフェニブは、腫瘍増殖を予想どおり抑制する。興味深いことに、タンパク質#134は

10

20

30

40

50

、ソラフェニブのレベルを超えて腫瘍増殖を抑制し、腫瘍体積を初期レベルに制御する。V：腫瘍体積(mm^3)、d：処理の日数、白丸：媒体、黒丸：タンパク質#134(4mg/kg)、白四角：ソラフェニブ(200mg/kg)。

【図10c】組み換え結合タンパク質のin vitro腫瘍増殖に対する効果を示すグラフ図である。タンパク質#134(配列番号134のアミノ酸配列からなる組み換え結合タンパク質；(i)V E G F - Aに対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメイン1つ、(ii)H G Fに対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメイン1つ、及び(iii)血清アルブミンに対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメイン2つを含む；図1を参照)及び他の組み換え結合タンパク質の有効性を、腫瘍異種移植マウスモデルで実施例14に記載のように評価した。(c)患者由来の胃腫瘍異種移植マウスモデルにおける腫瘍増殖に対するタンパク質#134の効果を、パクリタキセルと、タンパク質#134及びパクリタキセルの併用と、比較したグラフ図である。モデルの詳細は、実施例14に記載する。パクリタキセル及びタンパク質#134は、ほぼ同レベルまで腫瘍増殖を抑制する。パクリタキセル及びタンパク質#134の併用は腫瘍増殖を更に抑制し、腫瘍体積をその初期レベルに制御する。V：腫瘍体積(mm^3)、d：処置後の日数、白丸：媒体、黒丸：タンパク質#134(4mg/kg静注)、白四角：パクリタキセル(15mg/kg静注)、白三角：タンパク質#134(4mg/kg)及びパクリタキセル(15mg/kg)。

【発明を実施するための形態】

【0017】

本発明の文脈において、用語「タンパク質」はポリペプチドを指し、ここで、ポリペプチドの少なくとも一部は、単一のポリペプチド鎖内かつ/又は複数のポリペプチド鎖間で二次、三次、又は四次構造を形成することにより、明確な三次元配列を有する、又は、とることができ。タンパク質が2つ以上のポリペプチド鎖を含む場合、個々のポリペプチド鎖は、非共有結合又は共有結合により、例えば、2つのポリペプチド間のジスルフィド結合により、結合され得る。個々に二次又は三次構造を形成することにより、明確な三次元配列を有する、又は、ととくことができるタンパク質の一部は、「タンパク質ドメイン」と呼ばれる。このようなタンパク質ドメインは、当業者に周知である。

【0018】

用語「組み換え」は、組み換えタンパク質、組み換えタンパク質ドメイン、組み換え結合タンパク質等で使用する場合、上記のポリペプチドが、当業者に周知の組み換えDNA技術の使用によって作製されることを意味する。例えば、ポリペプチドをコードする組み換えDNA分子(例えば遺伝子合成によって作製される)を細菌発現プラスミド(例えばpQE30、QIagen)、酵母発現プラスミド、哺乳動物発現プラスミド、若しくは植物発現プラスミド、又はin vitro発現を可能にするDNAにクローニングすることができる。例えば、このような組み換え細菌発現プラスミドを適切な細菌(例えば大腸菌)に挿入すると、この細菌は、この組み換えDNAによってコードされたポリペプチドを産生することができる。それに応じて産生されたポリペプチドは、組み換えポリペプチド又は組み換えタンパク質と呼ばれる。

【0019】

本発明の文脈において、用語「結合タンパク質」は、2つ以上、好ましくは3つ以上、より好ましくは4つ以上の結合ドメインを含むタンパク質を指す。好ましくは、上記の結合タンパク質は、組み換え結合タンパク質である。好ましくは、上記の結合タンパク質は、2つ以上のリピートドメインを含む。より好ましくは、上記の結合タンパク質は、3つのリピートドメインを含む。より好ましくは、上記の結合タンパク質は、4つのリピートドメインを含む。更に好ましくは、上記の結合タンパク質は、3つ以上の設計アンキリンリピートドメインを含む。更に好ましくは、上記の結合タンパク質は、4つ以上の設計アンキリンリピートドメインを含む。より好ましくは、上記の結合タンパク質は、4つの設計アンキリンリピートドメインを含む。任意に、上記の結合タンパク質は、1つ以上の生理活性化合物を含む。上記の結合タンパク質の上記の結合ドメインはそれぞれ、標的特異

10

20

30

40

50

性を有する。好ましくは、上記の結合タンパク質の上記の結合ドメインの2つ以上はそれぞれ、血清アルブミンに対する標的特異性を有する。好ましくは、上記の結合タンパク質は、少なくとも2つの異なる標的に結合する、少なくとも3つの結合ドメインを含む。より好ましくは、上記の結合タンパク質は、少なくとも3つの異なる標的に結合する、少なくとも4つの結合ドメインを含む。

【0020】

更に、任意のこのような結合タンパク質は、当業者に周知の、更なるポリペプチド（例えばポリペプチドタグ、又はポリペプチドリンカー等）を含んでもよい。

【0021】

用語「生理活性化合物」は、上記の疾患有する哺乳動物に適用した際に疾患修飾性である化合物を指す。生理活性化合物は、アンタゴニスト特性又はアゴニスト特性を有することができ、タンパク性生理活性化合物又は非タンパク性生理活性化合物であり得る。このようなタンパク性生理活性化合物は、共有結合により、例えば、本発明の結合ドメインに、標準的なDNAクローニング技術に統いてそれらの標準的な発現及び精製を用いて遺伝子融合ポリペプチドを產生させることにより、結合させることができる。非タンパク性生理活性化合物は、共有結合により、例えば、本発明の結合ドメインに、化学的手段によって、例えば、本明細書で前述したような結合ドメインのN末端又はC末端にポリペプチドリンカーを介して結合されているシステインを有するマレイミドリンカーを介してシステインチオールに結合させることにより、結合させることができる。タンパク性生理活性化合物の例は、明確な標的特異性を有する結合ドメイン（例えば、増殖因子に結合することによって増殖因子を中和する）、サイトカイン（例えばインターロイキン）、増殖因子（例えばヒト成長ホルモン）、抗体及びそれらのフラグメント、ホルモン（例えばGLP-1）、又はタンパク質性薬物である。非タンパク性生理活性化合物の例は、毒素（例えばImmunoGenのDM1）、GPCRを標的とする小分子、抗体又は非タンパク質薬物である。

10

20

【0022】

用語「結合ドメイン」は、タンパク質スキャフォールドと同一の「フォールド」（すなわち二次、三次、及び／又は四次構造）を呈し、以下に定義するような所定の特性を有するタンパク質ドメインを意味する。このような結合ドメインは、当該技術分野において既知の技術である、合理的な、又は最も一般的には、コンビナトリアルタンパク質工学の手法によって得ることができる（Binz et al., 2005, loc. cit.）。例えば、所定の特性を有する結合ドメインは、（a）以下に更に定義するようなタンパク質スキャフォールドと同一のフォールドを呈するタンパク質ドメインの多様なコレクションを提供する工程と、（b）上記の多様なコレクションをスクリーニングし、かつ／又は、上記の多様なコレクションから選択し、上記の所定の特性を有するタンパク質ドメインを少なくとも1つ得る工程と、を含む方法によって得ることができる。タンパク質ドメインの多様なコレクションは、使用されるスクリーニング系及び／又は選択系に従ういくつかの方法によって提供することができ、ファージディスプレイ又はリボソームディスプレイ等の、当業者に周知の方法の使用を含み得る。好ましくは、上記の結合ドメインは、組み換え結合ドメインである。

30

40

【0023】

用語「タンパク質スキャフォールド」は、アミノ酸の挿入、置換又は欠失を高度に許容できる露出表面積を有するタンパク質を意味する。本発明の結合ドメインの产生に使用できるタンパク質スキャフォールドの例は、単鎖Fv又はFabフラグメント等の、抗体又はそれらのフラグメント、黄色ブドウ球菌のプロテインA、オオモンシロチョウ（*Pieris brassicae*）からのビリン結合タンパク質又は他のリポカリン、アンキリンリピートタンパク質又は他のリピートタンパク質、及びヒトフィブロネクチンである。タンパク質スキャフォールドは、当業者に既知である（Binz et al., 2005, loc. cit.；Binz et al., 2004, loc. cit.）。

【0024】

50

用語「標的」は、核酸分子、ポリペプチド若しくはタンパク質、炭水化物、又は任意の他の天然に存在する分子等の個々の分子を指し、このような個々の分子の任意の一部、又はこのような分子の2つ以上の複合体を含む。標的は細胞全体若しくは組織試料であってもよい、又は、任意の非天然化合物であってもよい。好ましくは、標的は天然に存在する、若しくは、非天然のポリペプチド、又は、例えば、天然若しくは非天然のリン酸化、アセチル化、若しくはメチル化によって修飾された、化学修飾を含むポリペプチドである。本発明の特定の用途において、標的は血清アルブミン、HGF、及びVEGF-Aである。

【0025】

用語「所定の特性」は、標的への結合、標的の阻害、標的を媒介とした反応の活性化、酵素活性、及び関連の更なる特性等の特性を指す。所望の特性の種類に応じて、当業者は、所望の特性を有する結合ドメインのスクリーニング及び／又は選択を実施するためのフォーマット及び必要な工程を特定することができる。好ましくは、上記の所定の特性は、標的に特異的に結合することである。

【0026】

本発明の文脈において、用語「ポリペプチド」は、ペプチド結合によって結合された、複数、すなわち2つ以上のアミノ酸の鎖からなる分子に関する。好ましくは、ポリペプチドは、ペプチド結合によって結合された8個超のアミノ酸からなる。用語「ポリペプチド」はまた、システインのS-S架橋によって結合されたアミノ酸の複数の鎖も包含する。ポリペプチドは、当業者に周知である。

【0027】

用語「ポリペプチドタグ」は、ポリペプチド／タンパク質に結合されたアミノ酸配列を指し、ここで、上記のアミノ酸配列は、上記のポリペプチド／タンパク質の精製、検出、若しくは「標的化」（すなわち、標的部位への局在）に有用であり、又は、上記のアミノ酸配列は、ポリペプチド／タンパク質の物理化学的挙動を改善し、又は、上記のアミノ酸配列はエフェクター機能を有する。結合タンパク質の個々のポリペプチドタグは、結合タンパク質の他の部分に、直接又はポリペプチドリンクを介して結合することができる。これらのポリペプチドタグは当該技術分野で周知であり、当業者には十分に利用可能である。ポリペプチドタグの例は、小ポリペプチド配列、例えば、Hisタグ（例えば配列番号1のHisタグ）、mycタグ、FLAGタグ、若しくはStrepタグ、又は酵素（例えばアルカリホスファターゼ）等のポリペプチドであり、これらにより、上記のポリペプチド／タンパク質、又は標的化に使用できるポリペプチド（免疫グロブリン又はそれらのフラグメント等）及び／若しくはエフェクター分子として使用できるポリペプチドの検出が可能となる。

【0028】

用語「ポリペプチドリンク」は、例えば、2つのタンパク質ドメイン、ポリペプチドタグとタンパク質ドメイン、タンパク質ドメインと非タンパク質化合物若しくはポリエチレンギリコール等のポリマー、又は2つの配列タグを、結合させることができるアミノ酸配列を指す。このような更なるドメイン、タグ、非タンパク質化合物又はポリマー及びリンクは、当業者に既知である。例の一覧は、特許出願、国際公開第2002/020565号の記載に提供されている。このようなリンクの特定の例は、様々な長さのグリシン-セリンリンク及びプロリン-スレオニンリンクであり、好ましくは、上記のリンクは、2～30個のアミノ酸のアミノ酸の長さを有し、より好ましくは、上記のリンクは、2～24個のアミノ酸の長さを有する。グリシン-セリンリンクの例は、GS及び配列番号2～6で提供されるアミノ酸配列であり、プロリン-スレオニンリンクの例は、配列番号7～9のアミノ酸配列で提供される。

【0029】

特許出願、国際公開第2002/020565号及びForrer et al., 2003 (loc. cit.)は、リピートタンパク質の特徴及びリピートドメインの特徴、技術及び用途の概説を含んでいる。用語「リピートタンパク質」は、1つ以上のリピ-

10

20

30

40

50

トドメインを含むタンパク質を指す。好ましくは、リピートタンパク質は、最大6つのリピートドメインを含む。より好ましくは、リピートタンパク質は、最大5つのリピートドメインを含む。より好ましくは、リピートタンパク質は、最大4つのリピートドメインを含む。更に、上記のリピートタンパク質は、更なる非リピートタンパク質ドメイン、ポリペプチドタグ及び／又はポリペプチドリンカーを含む場合がある。リピートドメインは、本明細書で前述したような結合ドメインである場合がある。

【0030】

用語「リピートドメイン」は、2つ以上の連続したリピートモジュールを構造単位として含むタンパク質ドメインを指し、上記の構造単位は同一のフォールドを有し、堅固に積み重なり、結合疎水性コアを有する超らせん構造を形成する。構造的相同性に次いで、このようなリピートモジュールは、配列相同性を更に有する。好ましくは、リピートドメインは、N末端及び／又はC末端キャッピングリピートを更に含む。明確に説明すると、キャッピングリピートは、リピートモジュールであり得る。このようなリピートドメイン、リピートモジュール、及びキャッピングリピート、配列モチーフ、並びに構造的相同性及び配列相同性は、設計アンキリンリピートドメイン（国際公開第2002/020565号）、ロイシンリッチリピートドメイン（同第2002/020565号）、テトラトリコペプチドリピートドメイン（Main, E. R., Xiong, Y., Cocco, M. J., D'Andrea, L., Regan, L., Structure 11(5), 497~508, 2003）、及びアルマジロリピートドメイン（同第2009/040338号）の例から、当業者に周知である。このようなリピートドメインは、繰り返しアミノ酸配列を含むが、各繰り返しアミノ酸配列が個々のドメイン（例えばフィブロネクチンのFN3ドメイン）を形成できる、又は、繰り返しアミノ酸配列が構造単位ではない、すなわち、上記の繰り返しアミノ酸配列が堅固に積み重ならず、結合疎水性コアを有する超らせん構造を形成しないタンパク質とは異なることが、当業者には更に周知である。リピートモジュール若しくはリピート配列モチーフを同定及び測定する、又は、このようないリピート単位若しくはモチーフを含む関連タンパク質のファミリーを同定するための方法、例えばホモロジー検索（BLAST等）は、生物情報学の分野において十分に確立されており、当業者に周知である。

【0031】

用語「設計リピートタンパク質」及び「設計リピートドメイン」は、例えば、特許出願、国際公開第2002/020565号に説明されているような発明手順の結果として得られる、リピートタンパク質又はリピートドメインをそれぞれ指す。用語「設計」は、このようなリピートタンパク質及びリピートドメインがそれぞれ人工、合成であり、天然由来ではない特性を指す。国際公開第2002/020565号の設計リピートタンパク質又は設計リピートドメインは、設計アンキリンリピートタンパク質又は設計アンキリンリピートドメインをそれぞれ含む。したがって、本明細書の設計アンキリンリピートタンパク質は、少なくとも1つの設計アンキリンリピートドメインを含む本発明のタンパク質に対応する。更に、用語「天然由来ではない」は、上記の結合タンパク質又は上記の結合ドメインの配列が、非人工配列エントリーとして、配列データベース、例えばGenBank、EMBL-Bank又はSwiss-Protに存在しないことを意味する。これらのデータベース及び他の類似のデータベースは、当業者に周知である。本発明の組み換え結合タンパク質又は設計アンキリンリピートドメインは、天然に存在しない。

【0032】

用語「リピートモジュール」、「リピート単位」、「キャッピングリピート」、「キャッピングモジュール」、並びにリピートタンパク質及びリピートドメインに関連する更なる用語は、国際公開第2002/020565号に定義されており、これらの定義は参照により本明細書に組み込まれる。

【0033】

用語「標的にに対する結合特異性を有する」、「標的に特異的に結合する」、「標的に高い特異性で結合する」、「標的に対して特異的」又は「標的特異性」等は、結合タンパク

10

20

30

40

50

質又は結合ドメインが、大腸菌マルトース結合タンパク質（M B P）等の非関連タンパク質に結合するよりも、P B S 中で、標的に、より低い解離定数で結合する（すなわち、より高い親和性で結合する）ことを意味する。好ましくは、標的に対するP B S 中での解離定数（「K d」）は、M B Pに対する対応する解離定数よりも、少なくとも 10^2 倍、より好ましくは少なくとも 10^3 倍、より好ましくは少なくとも 10^4 倍、又はより好ましくは少なくとも 10^5 倍低い。

【0034】

タンパク質 - タンパク質間の相互作用の解離定数を測定するための方法、例えば、表面プラズモン共鳴（S P R）に基づく技術（例えば、S P R 平衡解析）又は等温滴定熱量測定（I T C）は、当業者に周知である。特定のタンパク質 - タンパク質相互作用のK d の測定値は、異なる条件下（例えば、塩濃度、p H）で測定された場合、変動し得る。したがって、K d 値の測定は、好ましくは、タンパク質の標準化溶液及びP B S 等の標準化緩衝液を使用して実施される。10

【0035】

用語「P B S」は、137 mM NaCl、10 mM リン酸塩及び2.7 mM KCl を含み、p H が7.4 であるリン酸緩衝水溶液を意味する。

【0036】

本発明の結合ドメインの文脈における用語「結合を阻害する」は、上記の結合ドメインが、その標的が別のタンパク質、典型的には標的の天然のリガンド又は別のアンタゴニストに結合するのを阻害する能力を指す。阻害の強さは、典型的には、最大半量阻害の濃度（I C₅₀）を評価することによって測定される。阻害という用語及びI C₅₀ 値の評価は、当該分野において十分に確立している。例えば、配列番号18の設計アンキリンリピートドメインは、VEGF-Aの天然のリガンドVEGF-2への結合を阻害する。20

【0037】

本発明は、血清アルブミンに対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメインと、血清アルブミンに対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメインを少なくとも2つ含む組み換え結合タンパク質と、少なくとも第1、第2、第3、及び第4の設計アンキリンリピートドメインを含む組み換え結合タンパク質とに関し、上記の第1の設計アンキリンリピートドメインはVEGF-Aに対する結合特異性を有し、かつ上記の第2の設計アンキリンリピートドメインはHGFに対する結合特異性を有し、かつ上記の第3及び第4の設計アンキリンリピートドメインはそれぞれ血清アルブミンに対する結合特異性を有する。30

【0038】

一実施形態において、本発明は、血清アルブミンに対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメインに関する。血清アルブミンに対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメインの例は、配列番号40～56に示されており（実施例もまた参照）、更なる例が、国際公開第2012/069654号に記載されている。特に、本発明は、配列番号48～50、より好ましくは配列番号49及び50、より好ましくは配列番号50の、最大10、9、8、7、6、5、4、3、2、1、又は0個のアミノ酸が任意のアミノ酸によって交換されている群から選択される、血清アルブミンに対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメインに関する。一実施形態において、本発明は、配列番号48～50の群、より好ましくは配列番号49及び50、より好ましくは配列番号50から選択される、血清アルブミンに対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメインと、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%の配列同一性を有する、血清アルブミンに対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメインに関する。一実施形態において、本発明は、配列番号48～50の群、より好ましくは配列番号49及び50、より好ましくは配列番号50から選択されるアミノ酸配列を含む、血清に対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメインに関する。一実施形態において、本発明は、配列番号48～50の群、より好ましくは配列番号49及び50、より好ましくは配列番号50から選択される40

50

アミノ酸配列からなる、選択された、血清に対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメインに関する。一実施形態において、本発明は、配列番号 50 のアミノ酸配列を含む、血清アルブミンに対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメインに関する。本発明の好ましい血清アルブミンに対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメインは、配列番号 50 である。好ましくは、上記の血清アルブミンに対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメインは、マウス、ラット、イヌ、カニクイザル、又はヒト由来の血清アルブミン、より好ましくはマウス、カニクイザル又はヒト由来の血清アルブミン、より好ましくはカニクイザル又はヒト由来の血清アルブミン、より好ましくはヒト由来の血清アルブミンを、P B S 中で、解離定数 (K d) 10^{-5} M 未満、好ましくは 10^{-6} M 未満、より好ましくは 10^{-7} M 未満で結合させる。用語「マウス血清アルブミン」は、UniProt 受入番号 P07724 を指し、用語「カニクイザル血清アルブミン」(すなわち *macaca fascicularis*) は、UniProt 受入番号 A2V9Z4 を指し、用語「ヒト血清アルブミン」は UniProt 受入番号 P02768 を指す。一実施形態において、本発明は、配列番号 51 に比べ、改善された保存安定性を呈する、配列番号 48 ~ 50 の群、より好ましくは配列番号 49 及び 50 、より好ましくは配列番号 50 から選択されるアミノ酸配列を含む、より好ましくはこれらのアミノ酸配列からなる、血清アルブミンに対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメインに関する。本発明の文脈において「改善された保存安定性」は、変性温度の中点 (すなわち 温度上昇に伴う協調的アンフォールディング (cooperative unfolding) の中点) の 0 . 5
10 、 1 、 1 . 5 、 2 、 2 . 5 、 3 、 3 . 5 、若しくは 4 の改善、及び / 又は 分解バンドの量の減少、好ましくは、40 で 1箇月間 P B S 中に 10 mg / mL で保存した後に実施するクマシーカラム SDS - PAGE によって検出される、分解物の量の少なくとも 5 % 、 10 % 、 15 % 、 20 % 、 25 % 、 30 % 、 35 % 、 40 % 、 45 % 、若しくは 50 % の減少を意味する。SDS - PAGE によって保存安定性を評価するための方法、及び蛍光測定法又は円偏光二色性を用いることによって変性の中点を測定するための方法は、当業者に周知である。一実施形態において、本発明は、配列番号 50 のアミノ酸配列を含む、より好ましくはこのアミノ酸配列からなる、血清アルブミンに対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメインに関し、配列番号 49 に比べて改善された保存安定性を示し、好ましくは、40 で 1箇月間 P B S 中に 10 mg / mL で保存した後に実施する SDS - PAGE によって検出される分解物の量が、配列番号 49 に比べ少なくとも 5 % 、 10 % 、 15 % 、 20 % 、 25 % 、 30 % 、 35 % 、 40 % 、 45 % 、又は 50 % の減少を呈する。改善された保存安定性特性を有する、設計アンキリンリピートドメイン及び組み換え結合タンパク質の例は、実施例 9 に示す。
20
30

【 0039 】

一実施形態において、本発明は、位置 78 にグルタメートを含む、配列番号 44 ~ 49 、 51 及び 52 、より好ましくは 48 、 49 、 51 、及び 52 、より好ましくは 48 及び 49 、より好ましくは 49 のアミノ酸配列からなる群から選択される、血清アルブミンに対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメインに関する。一実施形態において、本発明は、位置 78 のアスパルテートがグルタメートにより交換され、配列番号 50 に対応する、配列番号 49 に関する。配列番号 49 は、多数の潜在的な分解部位を含む。分解は、更なる潜在的な分解部位の中でも、例えば、配列番号 49 の 5 個のアスパラギン (アスパラギン - グリシンジペプチドを含む) 、 13 個のアスパルテート、又は 10 個のグリシンのいずれか 1 つの近傍で起こり得る。配列番号 49 は、多数の潜在的な酸化部位を更に含む。驚くべきことに、保存安定性に対する主な効果は、配列番号 49 の位置 78 のみを変異させることによってもたらすことができる。更に、血清アルブミンに対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートの機能は、配列番号 49 の位置 78 をアスパルテートからグルタミンに変異させても保持することができる。位置 78 にグルタメートを含む配列番号 49 からなる設計アンキリンリピートドメインは、その位置にアスパルテートを含む設計アンキリンリピートドメインに比べ、より高い保存安定性を呈する。
40
50

【 0040 】

一実施形態において、本発明は、血清アルブミンに対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメインを少なくとも2つ含む、好ましくは2つ含む、組み換え結合タンパク質に関する。本発明の好ましい組み換え結合タンパク質は、血清アルブミンに対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメインを2つ含む。このような組み換え結合タンパク質の例は、配列番号62、63、73～81、及び95～179のアミノ酸配列に示す。

【0041】

一実施形態において、本発明は、血清アルブミンに対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメインを少なくとも2つ含む、より好ましくは2つ含む組み換え結合タンパク質に関し、上記の組み換えタンパク質は、血清アルブミンに対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメインを1つのみ含む組み換え結合タンパク質に比べ、改善された薬物動態特性を呈する。本発明の実施例は、このような組み換え結合タンパク質を開示する。

【0042】

表現「血清アルブミンに対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメインを1つのみ含む組み換え結合タンパク質」は、1つ以外の全ての血清アルブミンに対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメインと対応するポリペプチドリンカーを除去することにより、血清アルブミンに対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメインの数が1つに減少されている、本発明の組み換え結合タンパク質の組成を有する、組み換え結合を意味する。好ましくは、上記の残りの1つの血清アルブミンに対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメインは、本発明の組み換え結合タンパク質中で血清アルブミンに対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメインを含んでいた位置に対応する、組み換え結合タンパク質中の位置に配置され、また、残りの1つの血清アルブミンに対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメインは、本発明の組み換え結合タンパク質中の対応する位置にあった、血清アルブミンに対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメインと同一である。例えば、配列番号85からなる組み換え結合タンパク質は、C末端の血清アルブミンに対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメイン（この場合配列番号50）及び隣接するポリペプチドリンカー（この場合配列番号9）が除去されている、配列番号95からなる組み換え結合タンパク質である。重要なことに、配列番号85の残りの血清アルブミンに対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメイン（配列番号50）はN末端であり、また、配列番号95は、同じ位置に同一の配列番号50を含む。同様に、配列番号83からなる組み換え結合タンパク質は、C末端の血清アルブミンに対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメイン（この場合配列番号50）及び隣接するポリペプチドリンカー（この場合配列番号9）が除去されている、配列番号110からなる組み換え結合タンパク質である。

【0043】

本発明における表現「改善された薬物動態特性を呈する」、「改善された薬物動態特性」、又は「薬物動態特性の改善」は、組み換え結合タンパク質の薬物動態パラメータが、比較対象のタンパク質の対応する薬物動態パラメータに比べ、改善されているという意味を有する。対応する例は、実施例5及び6、並びに図3及び4に示す。例えば、タンパク質#110（配列番号110と、更にN末端の配列番号1とからなるタンパク質）を、タンパク質#83（配列番号83と、更にN末端の配列番号1とからなるタンパク質）と、カニクイザルの薬物動態試験において比較すると、タンパク質#110は、タンパク質#83よりも高い曝露（+32%）、低下したクリアランス（-47%）及びより高い終末相半減期（+168%、1日目～6日目で算出）を有する。別の例としては、タンパク質#62（配列番号62と、更にN末端の配列番号1とからなるタンパク質）を、タンパク質#57（配列番号57と、更にN末端の配列番号1とからなるタンパク質）と、カニクイザルの薬物動態試験において比較すると、タンパク質#62は、タンパク質#57よりも高い曝露（+119%）、低下したクリアランス（-71%）及びより高い終末相半減

10

20

30

40

50

期 (+ 97%、1日目～7日目で算出)を有する。又は、タンパク質#109(配列番号109と、更にN末端の配列番号1とからなるタンパク質)を、タンパク質#82(配列番号82と、更にN末端の配列番号1とからなるタンパク質)と、カニクイザルの薬物動態試験において比較すると、タンパク質#109は、タンパク質#82よりも高い曝露(+19%)、低下したクリアランス(-37%)及びより高い終末相半減期(+55%、1日目～7日目で算出)を有する。更に別の例としては、タンパク質#97(配列番号97と、更にN末端の配列番号1とからなるタンパク質)を、タンパク質#68(配列番号68と、更にN末端の配列番号1とからなるタンパク質)と、カニクイザルの薬物動態試験において比較すると、タンパク質#97は、タンパク質#68よりも高い終末相半減期(+264%、1日目～7日目で算出)を有する。更なる例は、実施例5及び6、並びに図3及び4に示す。好ましくは、改善された薬物動態特性は、クリアランスの低下、及び/又は曝露の増加、及び/又は終末相半減期の延長である。より好ましくは、改善された薬物動態特性は、終末相半減期の延長である。一実施形態において、血清アルブミンに対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメインを少なくとも2つ含む、より好ましくは2つ含む、本発明の組み換え結合タンパク質は、血清アルブミンに対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメインを1つのみ含む組み換え結合タンパク質に比べ、少なくとも5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、150%、200%、又は250%の終末相半減期の延長、及び/又はクリアランスの低下、及び/又は曝露の増加を呈する。一実施形態において、血清アルブミンに対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメインを少なくとも2つ含む、より好ましくは2つ含む、本発明の組み換え結合タンパク質は、血清アルブミンに対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメインを1つのみ含む組み換え結合タンパク質に比べ、終末相半減期の延長、好ましくは、少なくとも5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、150%、200%、又は250%の終末相半減期の延長を呈する。

【0044】

好ましくは、クリアランス、及び/又は曝露、及び/又は終末相半減期は、哺乳動物、より好ましくはマウス及び/又はカニクイザル、より好ましくはカニクイザルで評価する。好ましくは、クリアランス、及び/又は曝露、及び/又は終末相半減期をマウスで測定する場合、評価は、注入後48時間までのデータを考慮して実施する。より好ましくは、マウスにおける終末相半減期の評価は、24時間～48時間で計算する。好ましくは、クリアランス、及び/又は曝露、及び/又は終末相半減期をカニクイザルで測定する場合、評価は、注入後7日目までのデータを考慮して実施する。より好ましくは、カニクイザルにおける終末相半減期の評価は、1日目～7日目で計算する。本発明の組み換え結合タンパク質等の薬物の用語「終末相半減期」は、擬平衡に達した後、哺乳動物に投与した薬物の血漿中濃度の半分に達するのに必要な時間を指す(例えば、マウスでは24時間～48時間で算出する、又は、カニクイザルでは1日目～7日目で算出する)。終末相半減期は、哺乳動物に投与された薬物の用量の半分を排泄するのに必要な時間とは定義されない。終末相半減期という用語は、当業者に周知である。好ましくは、薬物動態の比較は、任意の投与量、より好ましくは同等の投与量(すなわち、同一のmg/kg投与量)又は等モル投与量(すなわち、同一のmol/kg投与量)、より好ましくは等モル投与量(すなわち、同一のmol/kg投与量)、で行う。動物での同等及び/又は等モルの投与は、少なくとも20%、より好ましくは30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、又は100%の実験的な投与量のばらつきを伴うことが、当業者には理解される。好ましくは、薬物動態の測定に用いられる投与量は、0.001～1000mg/kg、より好ましくは0.01～100mg/kg、より好ましくは0.1～50mg/kg、より好ましくは0.5～10mg/kgから選択される。

【0045】

一実施形態において、血清アルブミンに対する結合特異性を有する設計アンキリンリピ

10

20

30

40

50

ートドメインを少なくとも 2 つ含む、より好ましくは 2 つ含む、本発明の組み換え結合タンパク質は、血清アルブミンに対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメインを 1 つのみ含む組み換え結合タンパク質に比べ、マウスにおいて、より高い注入量の割合を、注入後 24 時間及び / 又は 48 時間及び / 又は 72 時間で、好ましくは注入後 24 時間で、好ましくは注入後 48 時間で、より好ましくは注入後 72 時間で、より好ましくは注入後 72 時間及び 48 時間で、より好ましくは注入後 24 時間、48 時間及び 72 時間で呈する。好ましくは、マウスにおける注入量の割合は、注入後 1 時間又は 4 時間、好ましくは 1 時間の濃度測定値との比較によって算出する。一実施形態において、血清アルブミンに対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメインを少なくとも 2 つ含む、より好ましくは 2 つ含む、本発明の組み換え結合タンパク質は、血清アルブミンに対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメインを 1 つのみ含む組み換え結合タンパク質に比べ、カニクイザルにおいて、より高い注入量の割合を、注入後 4 日及び / 又は 5 日及び / 又は 6 日で、好ましくは注入後 4 日で、好ましくは注入後 5 日で、より好ましくは注入後 6 日で、より好ましくは注入後 5 及び 6 日で、より好ましくは注入後 4、5 及び 6 日で呈する。好ましくは、カニクイザルにおける注入量の割合は、注入後 10 分又は 1 時間、好ましくは 10 分の濃度測定値との比較によって算出する。注入量のより高い割合は、少なくとも 5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、150%、200%、又は 250% の投与量の増加した割合を指す。

【0046】

一実施形態において、本発明の組み換え結合タンパク質は、少なくとも 3 つの設計アンキリンリピートドメインを含み、少なくとも 2 つの設計アンキリンリピートドメインは、血清アルブミンに対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメインである。このような組み換え結合タンパク質の例は、配列番号 73～81 及び 95～179 のアミノ酸配列に示す。

【0047】

一実施形態において、組み換え結合タンパク質は、少なくとも 4 つの設計アンキリンリピートドメインを含み、少なくとも 2 つの設計アンキリンリピートドメインは、血清アルブミンに対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメインである。このような組み換え結合タンパク質の例は、配列番号 95～179 のアミノ酸配列に示す。

【0048】

一実施形態において、本発明は、血清アルブミンに対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメインを少なくとも 2 つ含む組み換え結合タンパク質に関し、上記の血清アルブミンに対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメインのそれぞれは、P B S 中で、哺乳動物由来、より好ましくはマウス、ラット、イヌ、カニクイザル、又はヒト由来の血清アルブミン、より好ましくはマウス、カニクイザル又はヒト由来の血清アルブミン、より好ましくはカニクイザル又はヒト由来の血清アルブミン、より好ましくはヒト由来の血清アルブミンに対して結合特異性を有する。

【0049】

一実施形態において、本発明は、血清アルブミンに対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメインを少なくとも 2 つ含む組み換え結合タンパク質に関し、上記の血清アルブミンに対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメインのそれぞれは、血清アルブミン、より好ましくは哺乳動物由来の血清アルブミン、より好ましくはマウス、ラット、イヌ、カニクイザル、又はヒト由来の血清アルブミン、より好ましくはマウス、カニクイザル又はヒト由来の血清アルブミン、より好ましくはカニクイザル又はヒト由来の血清アルブミン、好ましくはヒト由来の血清アルブミンを、P B S 中で、解離定数 (Kd) 10^{-5} M 未満、好ましくは 10^{-6} M 未満、より好ましくは 10^{-7} M 未満で結合させる。このような血清アルブミンに対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメインの例は、実施例 2 及び配列番号 40～56 に示す。

【0050】

10

20

30

40

50

一実施形態において、本発明は、血清アルブミンに対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメインを2つ含む組み換え結合タンパク質に関し、血清アルブミンに対する結合特異性を有する上記の2つの設計アンキリンリピートドメインは、任意の他のタンパク質ドメイン、好ましくは上記の組み換え結合タンパク質中に含まれる任意の他の設計アンキリンリピートドメインに対して任意の位置にあり、好ましくは、血清アルブミンに対する結合特異性を有する上記の2つの設計アンキリンリピートドメインは、両方が、任意の他のタンパク質ドメイン、好ましくは上記の組み換え結合タンパク質中に含まれる任意の他の設計アンキリンリピートドメインのN末端であり、又は、血清アルブミンに対する結合特異性を有する上記の2つの設計アンキリンリピートドメインは、1つが、任意の他のタンパク質ドメイン、好ましくは上記の組み換え結合タンパク質中に含まれる任意の他の設計アンキリンリピートドメインのN末端、かつ1つが同C末端であり、又は、より好ましくは、血清アルブミンに対する結合特異性を有する上記の2つの設計アンキリンリピートドメインは、1つが、任意の他のタンパク質ドメイン、好ましくは上記の組み換え結合タンパク質中に含まれる任意の他の設計アンキリンリピートドメインのN末端、かつ1つが同C末端である。好ましくは、血清アルブミンに対する結合特異性を有する上記の2つの設計アンキリンリピートドメインは、両方が、任意の他のタンパク質ドメイン、好ましくは上記の組み換え結合タンパク質中に含まれる任意の他の設計アンキリンリピートドメインのC末端であることはない。組み換え結合タンパク質内の設計アンキリンリピートドメインの異なる配列の例は、配列番号95～179に示し、実施例に記載する。配列番号134は、本発明の組み換え結合タンパク質における、血清アルブミンに対する結合特異性を有する2つの設計アンキリンリピートドメインの好ましい配列を示す。
10
20

【0051】

一実施形態において、本発明は、設計アンキリンリピートドメインを少なくとも3つ含む、好ましくは少なくとも4つ含む、より好ましくは4つ含む、組み換え結合タンパク質に関し、上記の設計アンキリンリピートドメインの少なくとも3つ、好ましくは少なくとも4つ、より好ましくは4つのうち、2つはそれぞれ血清アルブミンに対する結合特異性を有し、かつ／又は、好ましくは、上記の設計アンキリンリピートドメインの少なくとも3つ、好ましくは少なくとも4つ、より好ましくは4つは、ポリペプチドリンクによって結合されている。

【0052】

一実施形態において、本発明は、血清アルブミンに対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメインを少なくとも2つ含む組み換え結合タンパク質に関し、上記の血清アルブミンに対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメインはそれぞれ、配列番号44～52の群、好ましくは配列番号48～50、より好ましくは配列番号49及び50、より好ましくは配列番号50から選択されるいずれかのアミノ酸配列と、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%の同一性を有する。
30

【0053】

一実施形態において、本発明は、血清アルブミンに対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメインを少なくとも2つ含む組み換え結合タンパク質に関し、上記の血清アルブミンに対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメインは、配列番号44～52の群、好ましくは配列番号48～50、より好ましくは配列番号49及び50、より好ましくは配列番号50から選択されるいずれかのアミノ酸配列から選択され、かつ血清アルブミンに対する結合特異性を有する上記の2つの設計アンキリンリピートドメインのそれぞれにおいて、最大10、9、8、7、6、5、4、3、2、1又は0個のアミノ酸が、任意のアミノ酸によって交換されている。
40

【0054】

一実施形態において、本発明は、血清アルブミンに対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメインを少なくとも2つ含む組み換え結合タンパク質に関し、上記の血清アルブミンに対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメインは、配列番号
50

44～52の群、好ましくは配列番号48～50、より好ましくは配列番号49及び50、より好ましくは配列番号50から選択されるいずれかのアミノ酸配列から選択される。一実施形態において、本発明は、血清アルブミンに対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメインを少なくとも2つ含む組み換え結合タンパク質に関し、上記の血清アルブミンに対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメインはそれぞれ、配列番号50のアミノ酸配列を含む。

【0055】

一実施形態において、本発明は、血清アルブミンに対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメインを少なくとも2つ含む組み換え結合タンパク質に関し、上記の血清アルブミンに対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメインは、少なくとも70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%アミノ酸配列が同一である。一実施形態において、上記の組み換え結合タンパク質の上記の血清アルブミンに対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメインは、アミノ酸配列が同一である。例えば、配列番号130に含まれる、血清アルブミンに対する結合特異性を有する2つの設計アンキリンリピートドメインは、少なくとも95%が同一である(124個のアミノ酸上で6個の残基相違)。別の実施例において、配列番号129に含まれる、血清アルブミンに対する結合特異性を有する2つの設計アンキリンリピートドメインは、少なくとも80%が同一である(124個のアミノ酸上で24個の残基相違)。

【0056】

一実施形態において、本発明は、血清アルブミンに対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメインを少なくとも2つ含む組み換え結合タンパク質に関し、血清アルブミンに対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメインは、それぞれ1つの血清アルブミン分子を同時に結合させることができる。好ましくは、上記の血清アルブミンはヒト由来のものである。血清アルブミンに対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメインを2つ含む、本発明の組み換え結合タンパク質による、2つのヒト血清アルブミン分子の同時結合の例は、実施例7に示す。

【0057】

一実施形態において、本発明は、血清アルブミンに対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメインを少なくとも3、4、5、6、7、8、9、10個含む組み換え結合タンパク質に関する。

【0058】

一実施形態において、本発明は、設計アンキリンリピートドメインを少なくとも3つ、好ましくは少なくとも4つ含む、より好ましくは4つ含む、組み換え結合タンパク質に関し、上記の設計アンキリンリピートドメインの少なくとも2つ、より好ましくは2つは、血清アルブミン、より好ましくはヒト血清アルブミンに対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメインであり、かつ血清アルブミンに対する結合特異性を有する、上記の少なくとも2つ、より好ましくは2つの設計アンキリンリピートドメインは、好ましくは、1つが、任意の他の設計アンキリンリピートドメイン、好ましくは他の2つの設計アンキリンリピートドメインのN末端、かつ1つが同C末端であり、かつ血清アルブミンに対する結合特異性を有する、上記の少なくとも2つ、より好ましくは2つの設計アンキリンリピートドメインは、それぞれ、血清アルブミン、好ましくはヒト由来の血清アルブミンを、PBS中で、解離定数(Kd)少なくとも $10^{-5}M$ 、好ましくは $10^{-6}M$ 未満、又はより好ましくは $10^{-7}M$ 未満で結合させており、かつ上記の組み換え結合タンパク質は、終末相半減期の延長、好ましくは、血清アルブミンに対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメインを1つのみ含む組み換え結合タンパク質に比べ、少なくとも5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、又は50%延長した終末相半減期を呈し、かつ上記の少なくとも3つ、好ましくは少なくとも4つ、

より好ましくは4つの設計アンキリンリピートドメインは、ポリペプチドリンクによって結合されている。一実施形態において、上記の組み換え結合タンパク質の、血清アルブミンに対する結合特異性を有する、上記の少なくとも2つ、より好ましくは2つの設計アンキリンリピートドメインは、少なくとも70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%が同一であり、より好ましくは同一である。

【0059】

一実施形態において、本発明の組み換え結合タンパク質中に存在するタンパク質ドメイン又は設計アンキリンリピートドメインは、任意のアミノ酸配列組成のポリペプチドリンクによって結合されている。一実施形態において、本発明の組み換え結合タンパク質中に存在するタンパク質ドメイン又は設計アンキリンリピートドメインを結合させるポリペプチドリンクは、配列番号2～9、より好ましくは配列番号3～9、より好ましくは配列番号4～9、より好ましくは配列番号6又は9、より好ましくは配列番号9の、最大4、3、2、1、0個のアミノ酸が任意のアミノ酸によって交換されているアミノ酸配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。一実施形態において、上記のポリペプチドリンクは、配列番号2～9、より好ましくは配列番号3～9、より好ましくは配列番号4～9、より好ましくは配列番号6又は9、より好ましくは配列番号9のアミノ酸配列のうちのいずれかから選択されるアミノ酸配列を含む。一実施形態において、配列番号7～9の隣接するN末端GlySer及び/又は配列番号2～9の隣接するC末端GlySerは、任意に欠損している。一実施形態において、配列番号7～9は、(例えば、配列番号68及び109に存在するように)ArgSerをC末端に更に含む。一実施形態において、配列番号2～6の上記のポリペプチドリンクのC末端から2番目のアミノ酸のグリシンは、(例えば、配列番号70及び88に存在するように)アルギニンによって交換されている場合がある。一実施形態において、本発明の組み換え結合タンパク質中に存在する設計アンキリンリピートドメインを結合させるポリペプチドリンクは、配列番号2～9、より好ましくは配列番号3～9、より好ましくは配列番号4～9、より好ましくは配列番号6又は9、より好ましくは配列番号9のアミノ酸配列のいずれかから選択されるアミノ酸配列からなる。一実施形態において、本発明の組み換え結合タンパク質中に存在する上記のポリペプチドリンクは、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%が同一であり、好ましくは同一である。

【0060】

一実施形態において、本発明は、血清アルブミンに対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメインを少なくとも2つ含む組み換え結合タンパク質に関し、上記のポリペプチドリンクは、配列番号2～9、より好ましくは配列番号3～9、より好ましくは配列番号4～9、より好ましくは配列番号6又は9、より好ましくは配列番号9の、最大4、3、2、1、0個のアミノ酸が任意のアミノ酸によって交換されているアミノ酸配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、かつ上記の血清アルブミンに対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメインはそれぞれ、配列番号44～52の群、好ましくは配列番号48～50、より好ましくは配列番号49及び50、より好ましくは配列番号50から選択されるいずれかのアミノ酸配列と、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、100%の同一性を有する。

【0061】

一実施形態において、本発明は、血清アルブミンに対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメインを少なくとも2つ含む組み換え結合タンパク質に関し、上記のポ

10

20

30

40

50

リペプチドリンカーは、配列番号 6 又は 9 の、最大 4、3、2、1、0 個のアミノ酸が任意のアミノ酸によって交換されているアミノ酸配列から選択されるアミノ酸配列からなり、上記の血清アルブミンに対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメインはそれぞれ、配列番号 48 ~ 50 の群から選択されるいずれかのアミノ酸配列と、少なくとも 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、100% の同一性を有するアミノ酸配列からなる。

【 0 0 6 2 】

一実施形態において、本発明は、血清アルブミンに対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメインを少なくとも 2 つ含む組み換え結合タンパク質に関し、血清アルブミンに対する結合特異性を有する上記の少なくとも 2 つの設計アンキリンリピートドメインはそれぞれ、配列番号 50 のアミノ酸配列を含む。 10

【 0 0 6 3 】

一実施形態において、本発明は、血清アルブミンに対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメインを少なくとも 2 つ含む組み換え結合タンパク質に関し、血清アルブミンに対する結合特異性を有する上記の少なくとも 2 つの設計アンキリンリピートドメインはそれぞれ、配列番号 50 のアミノ酸配列を含み、かつ上記の組み換え結合タンパク質は、改善された保存安定性、好ましくは、40°で 1 箇月間、10 mg / mL で PBS 中に保存した後、組み換え結合タンパク質に比べ、分解物量の低下を呈し、血清アルブミンに対する結合特異性を有する上記の少なくとも 2 つの設計アンキリンリピートドメインはそれぞれ、配列番号 49 のアミノ酸配列を含み、かつ / 又は組み換え結合タンパク質に比べ、血清アルブミンに対する結合特異性を有する上記の少なくとも 2 つの設計アンキリンリピートドメインはそれぞれ、配列番号 51 のアミノ酸配列を含み、好ましくは組み換え結合タンパク質に比べ、血清アルブミンに対する結合特異性を有する上記の少なくとも 2 つの設計アンキリンリピートドメインはそれぞれ、配列番号 49 のアミノ酸配列を含む。 20

【 0 0 6 4 】

一実施形態において、本発明は、血清アルブミンに対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメインを少なくとも 2 つ含む組み換え結合タンパク質に関し、血清アルブミンに対する結合特異性を有する上記の少なくとも 2 つの設計アンキリンリピートドメインはそれぞれ、配列番号 50 のアミノ酸配列を含み、かつ上記の設計アンキリンリピートドメインは、配列番号 9 のアミノ酸配列をそれぞれ含むポリペプチドリンカーによって結合されている。 30

【 0 0 6 5 】

一実施形態において、本発明は、血清アルブミンに対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメインを少なくとも 2 つ含む組み換え結合タンパク質に関し、血清アルブミンに対する結合特異性を有する上記の少なくとも 2 つの設計アンキリンリピートドメインはそれぞれ、配列番号 50 のアミノ酸配列からなる。

【 0 0 6 6 】

一実施形態において、本発明は、血清アルブミンに対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメインを少なくとも 2 つ含む組み換え結合タンパク質に関し、血清アルブミンに対する結合特異性を有する上記の少なくとも 2 つの設計アンキリンリピートドメインはそれぞれ、配列番号 50 のアミノ酸配列からなり、かつ上記の設計アンキリンリピートドメインは、配列番号 9 のアミノ酸配列からそれなるポリペプチドリンカーによって結合されている。 40

【 0 0 6 7 】

一実施形態において、本発明は、設計アンキリンリピートドメインを 4 つ含む組み換え結合タンパク質に関し、上記の設計アンキリンリピートドメインのうちの 2 つは、血清アルブミンに対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメインであり、血清アルブミンに対する結合特異性を有する上記の 2 つの設計アンキリンリピートドメインはそれぞれ、配列番号 50 のアミノ酸配列を含み、かつ上記の設計アンキリンリピートドメイン 50

は、配列番号 9 のアミノ酸配列をそれぞれ含むポリペプチドリンカーによって結合されており、かつ上記の設計アンキリンリピートドメインは、(N 末端側から C 末端側に) 配列番号 50 - 配列番号 9 - XXX - 配列番号 9 - YYY - 配列番号 9 - 配列番号 50 (ここで、XXX 及び YYY はそれぞれ、血清アルブミンとは別の標的に対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメインを表す) で配列されている。

【 0 0 6 8 】

一実施形態において、本発明は、少なくとも第 1 、第 2 、第 3 、及び第 4 の設計アンキリンリピートドメインを含む組み換え結合タンパク質に関し、上記の第 1 の設計アンキリンリピートドメインは VEGF - A に対する結合特異性を有し、かつ上記の第 2 の設計アンキリンリピートドメインは HGF に対する結合特異性を有し、かつ上記の第 3 及び第 4 の設計アンキリンリピートドメインはそれぞれ血清アルブミンに対する結合特異性を有する。好ましくは、上記の組み換え結合タンパク質は、単一のポリペプチド鎖からなる。より好ましくは、上記の第 1 、第 2 、第 3 及び第 4 の設計アンキリンリピートドメインは、ポリペプチドリンカーによって結合されている。一実施形態において、本発明は、第 1 、第 2 、第 3 、及び第 4 の設計アンキリンリピートドメインを含む組み換え結合タンパク質に関し、上記の第 1 の設計アンキリンリピートドメインは VEGF - A に対する結合特異性を有し、かつ上記の第 2 の設計アンキリンリピートドメインは HGF に対する結合特異性を有し、かつ上記の第 3 及び第 4 の設計アンキリンリピートドメインはそれぞれ血清アルブミンに対する結合特異性を有する。このような組み換え結合タンパク質の例は、配列番号 95 ~ 108 及び 116 ~ 179 のアミノ酸配列に示す。

10

20

【 0 0 6 9 】

好ましくは、 VEGF - A に対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメインは、マウス、ラット、イヌ、ウサギ、カニクイザル、又はヒト由来の VEGF - A 、より好ましくはマウス、カニクイザル又はヒト由来の VEGF - A 、より好ましくはカニクイザル又はヒト由来の VEGF - A 、より好ましくはヒト由来の VEGF - A を結合させる。好ましくは、 VEGF - A はヒト VEGF - A 165 である。 VEGF - A に対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメインの例は本明細書に示されており (配列番号 12 ~ 21 、実施例を参照) 、更なる例が、国際公開第 2010 / 060748 号及び同第 2011 / 135067 号に記載されている。

30

【 0 0 7 0 】

好ましくは、 HGF に対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメインは、マウス、ラット、イヌ、ウサギ、カニクイザル、又はヒト由来の HGF 、より好ましくはマウス、カニクイザル又はヒト由来の HGF 、より好ましくはカニクイザル又はヒト由来の HGF 、より好ましくはヒト由来の HGF を結合させる。 HGF に対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメインの例は本明細書に示されており (配列番号 23 ~ 37 、実施例を参照) 、更なる例が、国際公開第 2014 / 191574 号に記載されている。

【 0 0 7 1 】

一実施形態において、組み換え結合タンパク質又は設計アンキリンリピートドメインは、遊離 Cys 残基がない。「遊離 Cys 残基」は、ジスルフィド結合の形成には関与しない。一実施形態において、本発明は、いかなる Cys 残基も含まない、結合タンパク質又は結合ドメインに関する。一実施形態において、設計アンキリンリピートドメイン及び / 又は組み換え結合タンパク質には、いかなるジスルフィド結合もない。例えば抗体フラグメントのジスルフィド結合が、細菌における抗体フラグメントの単純な産生を阻害することが、当業者に既知である。

40

【 0 0 7 2 】

本発明の組み換え結合タンパク質を修飾する技術は、当業者に周知である。

【 0 0 7 3 】

特に、本発明は、少なくとも第 1 、第 2 、第 3 、及び第 4 の設計アンキリンリピートドメインを含む組み換え結合タンパク質に関し、上記の第 1 の設計アンキリンリピートドメ

50

インは、 V E G F - A を、 P B S 中で、解離定数 (K d) 10^{-7} M 未満、好ましくは 10^{-8} M 未満、より好ましくは 10^{-9} M 未満、又はより好ましくは 10^{-10} M 未満で結合させ、かつ上記の第 2 の設計アンキリンリピートドメインは、 H G F を、 P B S 中で、 K d 10^{-7} M 未満、好ましくは 10^{-8} M 未満、より好ましくは 10^{-9} M 未満、又はより好ましくは 10^{-10} M 未満で結合させ、かつ上記の第 3 及び第 4 の設計アンキリンリピートドメインはそれぞれ、血清アルブミンを、 P B S 中で、 K d 10^{-5} M 未満、好ましくは 10^{-6} M 未満、又はより好ましくは 10^{-7} M 未満で結合させる。 V E G F - A に対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメイン、 H G F に対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメインの例は、本明細書に示す（配列番号 12 ~ 56 、実施例を参照）
10。

【 0074 】

更に、本発明は、少なくとも第 1 、第 2 、第 3 、及び第 4 の設計アンキリンリピートドメインを含む組み換え結合タンパク質に関し、上記の第 1 の設計アンキリンリピートドメインは、ヒト V E G F - A のヒト V E G F R - 2 への結合を、 P B S 中で、 I C₅₀ 値 10^{-7} M 未満、好ましくは 10^{-8} M 未満、より好ましくは 10^{-9} M 未満で阻害し、かつ上記の第 2 の設計アンキリンリピートドメインは、ヒト H G F のヒト c M e t への結合を、 P B S 中で、 I C₅₀ 値 10^{-7} M 未満、好ましくは 10^{-8} M 未満、より好ましくは 10^{-9} M 未満で阻害する。配列番号 12 ~ 37 から選択される設計アンキリンリピートドメインの異なる例を、実施例に示す。
20

【 0075 】

一実施形態において、本発明は、少なくとも第 1 、第 2 、第 3 、及び第 4 の設計アンキリンリピートドメインを含む組み換え結合タンパク質に関し、上記の第 1 の設計アンキリンリピートドメインは、配列番号 12 ~ 21 、より好ましくは配列番号 17 ~ 21 、より好ましくは配列番号 18 ~ 20 、より好ましくは配列番号 18 のアミノ酸配列からなる群から選択される 1 つの設計アンキリンリピートドメインと、少なくとも 90% 、 91% 、 92% 、 93% 、 94% 、 95% 、 96% 、 97% 、 98% 、 99% 、 100% のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。一実施形態において、上記の第 1 の設計アンキリンリピートドメインは、配列番号 12 ~ 21 、より好ましくは配列番号 17 ~ 21 、より好ましくは配列番号 18 ~ 20 、より好ましくは配列番号 18 の最大 10 、 9 、 8 、 7 、 6 、 5 、 4 、 3 、 2 、 1 、 0 個のアミノ酸が任意のアミノ酸によって交換されているアミノ酸配列と、からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。一実施形態において、上記の第 1 の設計アンキリンリピートドメインは、配列番号 14 ~ 21 のアミノ酸配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、個々のアミノ酸は、配列番号 14 ~ 21 のアミノ酸配列のアラインメントの同一の位置に存在する任意のアミノ酸によって置換されている。一実施形態において、上記の第 1 の設計アンキリンリピートドメインは、配列番号 12 ~ 21 、より好ましくは配列番号 17 ~ 21 、より好ましくは配列番号 18 ~ 20 、より好ましくは配列番号 18 のアミノ酸配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。一実施形態において、上記の第 1 の設計アンキリンリピートドメインは、配列番号 12 ~ 21 、より好ましくは配列番号 17 ~ 21 、より好ましくは配列番号 18 ~ 20 、より好ましくは配列番号 18 のアミノ酸配列からなる群から選択されるアミノ酸配列からなる。更に、上記の組み換え結合タンパク質の上記の第 2 の設計アンキリンリピートドメインは、配列番号 23 ~ 37 、より好ましくは配列番号 23 ~ 27 、より好ましくは配列番号 25 ~ 27 、より好ましくは配列番号 26 のアミノ酸配列からなる群から選択される 1 つの設計アンキリンリピートドメインと、少なくとも 90% 、 91% 、 92% 、 93% 、 94% 、 95% 、 96% 、 97% 、 98% 、 99% 、 100% のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を、好ましくは含む。一実施形態において、上記の第 2 の設計アンキリンリピートドメインは、配列番号 23 ~ 37 、より好ましくは配列番号 23 ~ 27 、より好ましくは配列番号 25 ~ 2
30

10

20

30

40

40

50

7、より好ましくは配列番号 2 6 のアミノ酸配列と、配列番号 2 3 ~ 3 7、より好ましくは配列番号 2 3 ~ 2 7、より好ましくは配列番号 2 5 ~ 2 7、より好ましくは配列番号 2 6 の最大 1 0、9、8、7、6、5、4、3、2、1、0 個のアミノ酸が任意のアミノ酸によって交換されているアミノ酸配列と、からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。一実施形態において、上記の第 2 の設計アンキリンリピートドメインは、配列番号 2 3 ~ 2 7 のアミノ酸配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、個々のアミノ酸は、配列番号 2 3 ~ 2 7 のアミノ酸配列のアラインメントの同一の位置に存在する任意のアミノ酸によって置換されている。一実施形態において、上記の第 2 の設計アンキリンリピートドメインは、配列番号 2 3 ~ 3 7、より好ましくは配列番号 2 3 ~ 2 7、より好ましくは配列番号 2 5 ~ 2 7、より好ましくは配列番号 2 6 のアミノ酸配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。一実施形態において、上記の第 2 の設計アンキリンリピートドメインは、配列番号 2 3 ~ 3 7、より好ましくは配列番号 2 3 ~ 2 7、より好ましくは配列番号 2 5 ~ 2 7、より好ましくは配列番号 2 6 のアミノ酸配列からなる群から選択されるアミノ酸配列からなる。一実施形態において、上記の組み換え結合タンパク質の上記の第 3 及び第 4 の設計アンキリンリピートドメインはそれぞれ、配列番号 4 0 ~ 5 6、好ましくは配列番号 4 8 ~ 5 2、より好ましくは配列番号 4 8 ~ 5 0、より好ましくは配列番号 5 0 のアミノ酸配列からなる群から選択される 1 つのアンキリンリピートドメインと、少なくとも 9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 %、1 0 0 % のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。一実施形態において、上記の第 3 及び第 4 の設計アンキリンリピートドメインはそれぞれ、配列番号 4 0 ~ 5 6、好ましくは配列番号 4 8 ~ 5 2、より好ましくは配列番号 4 8 ~ 5 0、より好ましくは配列番号 5 0 のアミノ酸配列と、配列番号 4 0 ~ 5 6、好ましくは配列番号 4 8 ~ 5 2、より好ましくは配列番号 4 8 ~ 5 0、より好ましくは配列番号 5 0 の最大 1 0、9、8、7、6、5、4、3、2、1、0 個のアミノ酸が任意の他のアミノ酸によって交換されているアミノ酸配列と、からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。一実施形態において、上記の第 3 及び第 4 の設計アンキリンリピートドメインはそれぞれ、配列番号 4 2 ~ 5 1 のアミノ酸配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、個々のアミノ酸は、配列番号 4 2 ~ 5 1 のアミノ酸配列のアラインメントの同一の位置に存在する任意のアミノ酸によって置換されている。一実施形態において、上記の第 3 及び第 4 の設計アンキリンリピートドメインはそれぞれ、配列番号 4 0 ~ 5 6、好ましくは配列番号 4 8 ~ 5 2、より好ましくは配列番号 4 8 ~ 5 0、より好ましくは配列番号 5 0 のアミノ酸配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。一実施形態において、上記の第 3 及び第 4 の設計アンキリンリピートドメインはそれぞれ、配列番号 4 0 ~ 5 6、好ましくは配列番号 4 8 ~ 5 2、より好ましくは配列番号 4 8 ~ 5 0、より好ましくは配列番号 5 0 のアミノ酸配列からなる群から選択されるアミノ酸配列からなる。一実施形態において、上記の第 3 及び第 4 の設計アンキリンリピートドメインは同一である。更にこの実施形態において、上記の設計アンキリンリピートドメインは、配列番号 2 ~ 9、より好ましくは配列番号 3 ~ 9、より好ましくは配列番号 4 ~ 9、より好ましくは配列番号 6 又は 9、より好ましくは配列番号 9 のアミノ酸配列と、配列番号 2 ~ 9、より好ましくは配列番号 3 ~ 9、より好ましくは配列番号 4 ~ 9、より好ましくは配列番号 6 又は 9、より好ましくは配列番号 9 の最大 4、3、2、1、0 個のアミノ酸が任意のアミノ酸によって交換されているアミノ酸配列と、からなる群から選択されるポリペプチドリンカーによって結合されている。一実施形態において、上記のポリペプチドリンカーは、配列番号 2 ~ 9、より好ましくは配列番号 3 ~ 9、より好ましくは配列番号 4 ~ 9、より好ましくは配列番号 6 又は 9、より好ましくは配列番号 9 のアミノ酸配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。一実施形態において、配列番号 7 ~ 9 の隣接する N 末端 G l y S e r 及び / 又は配列番号 2 ~ 9 の隣接する C 末端 G l y S e r は、任意に欠損している。一実施形態において、配列番号 7 ~ 9 は、(例えば、配列番号 9 7 及び 9 8 に存在するように) A r g S e r を C 末端に更に含む。一実施形態において、配列番号 2 ~ 6 の上記のポリペプチドリンカーの C 末端から 2 番目のアミノ酸のグリシンは、(例えば、配列番号 9 9 及び 1 0 50

0に存在するように)アルギニンによって交換されている場合がある。一実施形態において、本発明の組み換え結合タンパク質中に存在する設計アンキリンリピートドメインを結合させるポリペプチドリンカーは、配列番号2～9、より好ましくは配列番号3～9、より好ましくは配列番号4～9、より好ましくは配列番号6又は9、より好ましくは配列番号9のアミノ酸配列のいずれかから選択されるアミノ酸配列からなる。一実施形態において、本発明の組み換え結合タンパク質中に存在する上記のポリペプチドリンカーは、同一である。組み換え結合タンパク質中の、このようなポリペプチドリンカー、これらの変形、及びこのようなポリペプチドリンカーの使用の例を、実施例に示す。

【0076】

一実施形態において、本発明は少なくとも第1、第2、第3、及び第4の設計アンキリンリピートドメインを含む組み換え結合タンパク質に関し、上記の第1の設計アンキリンリピートドメインは、配列番号12～21、好ましくは配列番号17～21、より好ましくは配列番号18～20、より好ましくは配列番号18のアミノ酸配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、かつ上記の第2の設計アンキリンリピートドメインは、配列番号23～37、より好ましくは配列番号23～27、より好ましくは配列番号25～27、より好ましくは配列番号26のアミノ酸配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、かつ上記の第3及び第4の設計アンキリンリピートドメインはそれぞれ、配列番号40～56、好ましくは配列番号48～52、より好ましくは配列番号48～50、より好ましくは配列番号50のアミノ酸配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、かつ上記の設計アンキリンリピートドメインは、配列番号2～9、より好ましくは配列番号3～9、より好ましくは配列番号4～9、より好ましくは配列番号6又は9、より好ましくは配列番号9のアミノ酸配列からなる群から選択されるポリペプチドリンカーによって結合されている。10

【0077】

一実施形態において、本発明は、少なくとも第1、第2、第3、及び第4の設計アンキリンリピートドメインを含む組み換え結合タンパク質に関し、上記の第1の設計アンキリンリピートドメインはVEGF-Aに対する結合特異性を有し、かつ上記の第2の設計アンキリンリピートドメインはHGFに対する結合特異性を有し、かつ上記の第3及び第4の設計アンキリンリピートドメインはそれぞれ血清アルブミンに対する結合特異性を有し、かつ上記の設計アンキリンリピートドメインはポリペプチドリンカーによって結合されており、上記の組み換え結合タンパク質は、VEGF-A及びHGF、より好ましくはVEGF-A、HGF、及び血清アルブミン、より好ましくはヒトVEGF-A、ヒトHGF及びヒト血清アルブミンを、同時に結合させることができる。一実施形態において、上記の組み換え結合タンパク質は、2つの血清アルブミン分子、より好ましくは2つのヒト血清アルブミン分子を、同時に結合させることができる。20

【0078】

「第1の設計アンキリンリピートドメイン」、「第2の設計アンキリンリピートドメイン」、「第3の設計アンキリンリピートドメイン」、及び「第4の設計アンキリンリピートドメイン」において使用される用語「第1の」、「第2の」、「第3の」、及び任意に使用される「第4の」は、組み換え結合タンパク質内の上記の設計アンキリンリピートドメインのいかなる位置的な配列も示す、又は、含意するものではない。30

【0079】

一実施形態において、本発明は、ポリペプチドリンカーによって結合されている、少なくとも第1、第2、第3、及び第4の設計アンキリンリピートドメインを含む組み換え結合タンパク質に関する。一実施形態において、上記の第1の設計アンキリンリピートドメインは、C末端設計アンキリンリピートドメインと、他の2つの設計アンキリンリピートドメインのC末端とのN末端である。一実施形態において、HGFに対する結合特異性を有する、上記の第2の設計アンキリンリピートドメインは、N末端設計アンキリンリピートドメインと、他の2つの設計アンキリンリピートドメインのN末端とのC末端である。一実施形態において、それぞれ血清アルブミンに対する結合特異性を有する、上記の第340

及び第4の設計アンキリンリピートドメインは、1つが他の2つの設計アンキリンリピートドメインのN末端、かつ1つが同C末端であり、又は、これらは、他の2つの設計アンキリンリピートドメインのN末端であり、より好ましくは、上記の第3及び第4の設計アンキリンリピートドメインは、1つが他の2つの設計アンキリンリピートドメインのN末端、かつ1つが同C末端である。一実施形態において、上記の第3の設計アンキリンリピートドメインは、他の3つの設計アンキリンリピートドメインのN末端であり、上記の第4の設計アンキリンリピートドメインは、他の3つの設計アンキリンリピートドメインのC末端であり、上記の第2の設計アンキリンリピートドメインは、上記の第3の設計アンキリンリピートドメインのC末端及び上記の第1の設計アンキリンリピートドメインのN末端であり、かつ上記の第1の設計アンキリンリピートドメインは、上記の第2の設計アンキリンリピートドメインのC末端及び上記の第4の設計アンキリンリピートドメインのN末端である。10

【0080】

一実施形態において、本発明は、少なくとも第1、第2、第3、及び第4の設計アンキリンリピートドメインを含む組み換え結合タンパク質に関し、上記の第1の設計アンキリンリピートドメインはVEGF-Aに対する結合特異性を有し、かつ上記の第2の設計アンキリンリピートドメインはHGFに対する結合特異性を有し、かつ上記の第3及び第4の設計アンキリンリピートドメインはそれぞれ血清アルブミンに対する結合特異性を有し、かつ上記の設計アンキリンリピートドメインは、ポリペプチドリンクによって結合されている。一実施形態において、上記の第1、第2、第3及び第4の設計アンキリンリピートドメインは、(N末端からC末端に向かって)第3-第2-第1-第4、第3-第4-第2-第1、第4-第2-第1-第3、又は第4-第3-第2-第1、更により好ましくは第3-第2-第1-第4、又は第4-第2-第1-第3、より好ましくは第3-第2-第1-第4の順である。20

【0081】

一実施形態において、本発明は、少なくとも第1、第2、第3、及び第4の設計アンキリンリピートドメインを含む組み換え結合タンパク質に関し、上記の第1の設計アンキリンリピートドメインはVEGF-Aに対する結合特異性を有し、かつ上記の第2の設計アンキリンリピートドメインはHGFに対する結合特異性を有し、かつ上記の第3及び第4の設計アンキリンリピートドメインはそれぞれ血清アルブミンに対する結合特異性を有し、上記の組み換え結合タンパク質は、VEGF-A、好ましくはヒトVEGF-Aを、EC₅₀ 10⁻⁷M未満、好ましくは10⁻⁸M未満、より好ましくは10⁻⁹M未満、より好ましくは10⁻¹⁰M未満で結合させる。30

【0082】

一実施形態において、本発明は、少なくとも第1、第2、第3、及び第4の設計アンキリンリピートドメインを含む組み換え結合タンパク質に関し、上記の第3及び第4の設計アンキリンリピートドメインはそれぞれ配列番号50のアミノ酸配列を含む。一実施形態において、本発明は、少なくとも第1、第2、第3、及び第4の設計アンキリンリピートドメインを含む組み換え結合タンパク質に関し、上記の第1の設計アンキリンリピートドメインは配列番号18のアミノ酸配列を含み、かつ上記の第2の設計アンキリンリピートドメインは配列番号26のアミノ酸配列を含み、かつ上記の第3及び第4の設計アンキリンリピートドメインはそれぞれ配列番号50のアミノ酸配列を含み、かつ上記の設計アンキリンリピートドメインは、配列番号9のアミノ酸配列をそれぞれ含むポリペプチドリンクによって結合されている。40

【0083】

一実施形態において、本発明は、少なくとも第1、第2、第3、及び第4の設計アンキリンリピートドメインを含む組み換え結合タンパク質に関し、上記の第1の設計アンキリンリピートドメインは配列番号18のアミノ酸配列を含み、かつ上記の第2の設計アンキリンリピートドメインは配列番号26のアミノ酸配列を含み、かつ上記の第3及び第4の設計アンキリンリピートドメインはそれぞれ配列番号50のアミノ酸配列を含み、かつ上50

記の設計アンキリンリピートドメインは、配列番号 9 のアミノ酸配列をそれぞれ含むポリペプチドリンカーによって結合されており、かつ上記の設計アンキリンリピートドメインは、(N末端側からC末端側に)配列番号 50 - 配列番号 9 - 配列番号 26 - 配列番号 9 - 配列番号 18 - 配列番号 9 - 配列番号 50 で配列されている。

【0084】

一実施形態において、本発明は、少なくとも第1、第2、第3、及び第4の設計アンキリンリピートドメインを含む組み換え結合タンパク質に関し、上記の第1の設計アンキリンリピートドメインはVEGF-Aに対する結合特異性を有し、かつ上記の第2の設計アンキリンリピートドメインはHGFに対する結合特異性を有し、かつ上記の第3及び第4の設計アンキリンリピートドメインはそれぞれ血清アルブミンに対する結合特異性を有し、かつ上記の設計アンキリンリピートドメインは、配列番号 9 のアミノ酸配列をそれぞれ含むポリペプチドリンカーによって結合されており、かつ上記の組み換え結合タンパク質は、VEGF-A、及び/又はHGF、好ましくはVEGF-Aを、上記の設計アンキリンリピートドメインが配列番号 6 のアミノ酸配列をそれぞれ含むポリペプチドリンカーによって結合されている組み換え結合タンパク質に比べ、より低い、すなわちより良好なEC₅₀で結合させる。リンカーのEC₅₀に対する影響の例は実施例8に示し、また、用語「より低いEC₅₀」は、当業者に周知である。好ましくは、用語「より低いEC₅₀」は、1.1倍、より好ましくは1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0倍改善されたEC₅₀値を意味する。

【0085】

一実施形態において、本発明は、少なくとも第1、第2、第3、及び第4の設計アンキリンリピートドメインを含む組み換え結合タンパク質に関し、上記の第1の設計アンキリンリピートドメインはVEGF-Aに対する結合特異性を有し、かつ上記の第2の設計アンキリンリピートドメインはHGFに対する結合特異性を有し、かつ上記の第3及び第4の設計アンキリンリピートドメインはそれぞれ血清アルブミンに対する結合特異性を有し、上記の組み換え結合タンパク質は、VEGF-A、及び/又はHGF、好ましくはVEGF-Aを、血清アルブミンに対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメインを1つのみ含む組み換え結合タンパク質に比べ、より低い、すなわちより良好なEC₅₀で結合させる。例は、実施例8に示す。

【0086】

一実施形態において、本発明は、配列番号 134 ~ 179、好ましくは配列番号 134 ~ 158、より好ましくは配列番号 134 ~ 149、より好ましくは配列番号 134 ~ 140、より好ましくは配列番号 134 のアミノ酸配列からなる群から選択されるアミノ酸配列と、少なくとも 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又は 100% のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、組み換え結合タンパク質に関する。

【0087】

一実施形態において、本発明は、配列番号 134 ~ 179、好ましくは配列番号 134 ~ 158、より好ましくは配列番号 134 ~ 149、より好ましくは配列番号 134 ~ 140、より好ましくは配列番号 134 の、最大 50、49、48、47、46、45、44、43、42、41、40、39、38、37、36、35、34、33、32、31、30、29、28、27、26、25、24、23、22、21、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、1、又は 0 個のアミノ酸が任意のアミノ酸によって交換されているアミノ酸配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、組み換え結合タンパク質に関する。

【0088】

所与のアミノ酸配列と少なくとも 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又は 100% の同一性を有するアミノ酸配列を含む、設計アンキリンリピートドメイン又は組み換え結合タンパク質に関する本発明のいずれかの実施形態において、非同一アミノ酸は、設計アンキリンリピートドメイン又は組み換え

10

20

30

40

50

結合タンパク質の任意の位置に配置されてもよい。

【0089】

同様に、最大50、49、48、47、46、45、44、43、42、41、40、39、38、37、36、35、34、33、32、31、30、29、28、27、26、25、24、23、22、21、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、1、又は0個のアミノ酸が任意のアミノ酸によって交換されている、設計アンキリンリピートドメイン又は組み換え結合タンパク質に関する本発明のいずれかの実施形態において、交換されたアミノ酸は、設計アンキリンリピートドメインの任意の位置に配置されてもよい。

【0090】

一実施形態において、本発明は、配列番号134～179、好ましくは配列番号134～158、より好ましくは配列番号134～149、より好ましくは配列番号134～140、より好ましくは配列番号134のアミノ酸配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む組み換え結合タンパク質に関する。

【0091】

本発明は、特に、配列番号134のアミノ酸配列と少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、又は100%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、組み換え結合タンパク質に関する。

【0092】

一実施形態において、本発明は、配列番号134の、最大50、49、48、47、46、45、44、43、42、41、40、39、38、37、36、35、34、33、32、31、30、29、28、27、26、25、24、23、22、21、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、1、又は0個のアミノ酸が任意のアミノ酸によって交換されているアミノ酸配列を含む、組み換え結合タンパク質に関する。

【0093】

本発明は更に、特に、配列番号134のアミノ酸配列からなるアミノ酸配列を含む、組み換え結合タンパク質に関する。一実施形態において、本発明は、配列番号134のアミノ酸配列を含む組み換え結合タンパク質に関する。

【0094】

一実施形態において、本発明は、配列番号134～179、好ましくは配列番号134～158、より好ましくは配列番号134～149、より好ましくは配列番号134～140、より好ましくは配列番号134のアミノ酸配列からなる群から選択されるアミノ酸配列からなる組み換え結合タンパク質に関する。

【0095】

好ましいのは配列番号134である。好ましいのは、アミノ酸配列が配列番号134である、組み換え結合タンパク質である。好ましいのは、アミノ酸配列が配列番号134である、タンパク質である。好ましいのは、配列番号134のアミノ酸配列からなる組み換え結合タンパク質である。

【0096】

複数の特徴により、配列番号134が、本発明の好ましい組み換え結合タンパク質となる。この組み換え結合タンパク質は、それぞれが配列番号50からなる、血清アルブミンに対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメインを2つ含み、血清アルブミンに対する結合特異性を有する既知の設計アンキリンリピートドメインに比べ、改善された保存安定性の特性を示す（実施例9、図2を参照）。この組み換え結合タンパク質は、血清アルブミンに対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメインを2つ含み、驚くべきことに、改善された薬物動態特性をもたらす（実施例5及び6、図3及び4）。血清アルブミンに対する結合特異性を有する2つの設計アンキリンリピートドメインは、他の設計アンキリンリピートドメインと隣接し、最も良好な薬物動態特性が認められた（実施例6）。VEGF-A及びHGFに対する結合特異性を有する設計アンキリンリピ

10

20

30

40

50

ートドメイン、並びにこれらの構造的な配列は、化合物の活性を最大化するように選択された（実施例 8）。設計アンキリンリピートドメインは、PTリッチリンカーを使用して結合され、驚くべきことに、個々の設計アンキリンリピートドメインの活性を改善し（実施例 8）、また、驚くべきことに、薬物動態特性を改善する（実施例 5）。

【0097】

一実施形態において、本発明は、少なくとも第1、第2、第3、及び第4の設計アンキリンリピートドメインを含む組み換え結合タンパク質に関し、上記の第1の設計アンキリンリピートドメインはVEGF-Aに対する結合特異性を有し、かつ上記の第2の設計アンキリンリピートドメインはHGFに対する結合特異性を有し、かつ上記の第3及び第4の設計アンキリンリピートドメインはそれぞれ血清アルブミンに対する結合特異性を有し、かつ上記の第1、第2、第3、及び第4の設計アンキリンリピートドメインは、ポリペプチドリンクによって結合されており、かつ上記の組み換え結合タンパク質は、終末相半減期の延長、好ましくは、血清アルブミンに対する結合特異性を有する上記の第4の設計アンキリンリピートドメインを欠く組み換え結合タンパク質に比べ、少なくとも5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、又は45%の終末相半減期の延長を呈する。このような終末相半減期の延長の例を、実施例5及び6、並びに図3及び4に示す。

【0098】

一実施形態において、本発明は、本発明の設計アンキリンリピートドメイン又は組み換え結合タンパク質、より好ましくは本発明の組み換え結合タンパク質のアミノ酸配列をコードする、核酸に関する。一実施形態において、本発明は、血清アルブミンに対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメインを少なくとも2つ含む、より好ましくは2つ含む、本発明のいずれかの組み換え結合タンパク質のアミノ酸配列をコードする、核酸に関する。一実施形態において、本発明は、本発明の組み換え結合タンパク質のアミノ酸配列をコードする、核酸に関する。更に、本発明は、本発明のいずれかの核酸を含むベクターに関する。核酸は、当業者に周知である。実施例において、核酸は、本発明の設計アンキリンリピートドメイン又は組み換え結合タンパク質を、大腸菌で產生するために使用した。

【0099】

一実施形態において、本発明は、本発明の組み換え結合タンパク質及び／若しくは設計アンキリンリピートドメイン、又は本発明の組み換え結合タンパク質及び／若しくは設計アンキリンリピートドメインをコードする核酸、並びに任意に、薬学的に許容される担体及び／若しくは賦形剤を含む、医薬組成物に関する。

【0100】

一実施形態において、本発明は、組み換え結合タンパク質、又は組み換え結合タンパク質をコードする核酸、並びに任意に、薬学的に許容される担体及び／若しくは賦形剤を含む、医薬組成物に関する。

【0101】

薬学的に許容される担体及び／又は賦形剤は当業者に既知であり、下記でより詳細に説明する。更にまた、上記の、組み換え結合タンパク質及び／又は設計アンキリンリピートドメイン、及び／又は核酸のうちの1つ以上、特に組み換え結合タンパク質を含む、診断用組成物が考慮される。

【0102】

医薬組成物は、本明細書に記載のような組み換え結合タンパク質、及び／又は設計アンキリンリピートドメイン、及び／又は核酸、及び例えばRemington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, O sol, A. Ed., 1980に記載のような、薬学的に許容される担体、添加物若しくは安定剤を含む。当業者に既知の、好適な担体、添加物又は安定剤は、生理食塩水、リングル液、デキストロース溶液、ハンクス液、固定油、オレイン酸エチル、5%デキストロース生理食塩水、等張性及び化学的安定性を高める物質、緩衝液並びに保存剤である。他の好適な担体

10

20

30

40

50

としては、それ自体が、組成物を投与される個体にとって有害な抗体の產生を誘発しない任意の担体、例えば、タンパク質、ポリサッカライド、ポリ乳酸、ポリグリコール酸、ポリマー、アミノ酸及びアミノ酸コポリマーが挙げられる。医薬組成物はまた、抗癌剤若しくは抗血管新生剤、又は更なる生理活性化合物等の、追加の有効成分を含む、合剤であってもよい。

【0103】

本発明の一実施形態は、血清アルブミンに対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメインを少なくとも2つ含む、より好ましくは2つ含む、本発明の組み換え結合タンパク質の医薬組成物の製造のための使用に関し、上記の組み換え結合タンパク質は、血清アルブミンに対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメインを1つのみ含む組み換え結合タンパク質に比べ、終末相半減期の延長、好ましくは少なくとも5%、好ましくは、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、150%、200%、又は250%の終末相半減期の延長を呈する。

10

【0104】

一実施形態において、医薬組成物は、本明細書に記載のような少なくとも1つの組み換え結合タンパク質、並びに非イオン性洗剤等の洗剤、リン酸塩等の緩衝液、及びスクロース等の糖を含む。一実施形態において、このような組成物は、上記のような組み換え結合タンパク質及びPBSを含む。

20

【0105】

一実施形態において、本発明は、本発明による医薬組成物又は組み換え結合タンパク質の、疾患の治療のための使用に関する。そのため、本発明による医薬組成物又は組み換え結合タンパク質は、これらを必要とする患者に、治療有効量で投与される。投与としては、局所投与、経口投与、及び非経口投与を挙げることができる。典型的な投与経路は非経口投与である。非経口投与において、本発明の薬剤は、上記で定義したような薬学的に許容される添加物と共に、溶液、懸濁液又はエマルション等の単位用量の注射剤形で配合される。用量及び投与方法は、治療される個体及び特定の疾患によって異なる。

【0106】

更に、上記の医薬組成物又は組み換え結合タンパク質のいずれかは、疾患の治療について考慮される。

30

【0107】

本発明の医薬組成物は、例えば、非経口的投与によって投与してもよい。非経口投与において、本発明の薬剤は、上記で定義したような薬学的に許容される添加物と共に、溶液、懸濁液又はエマルション等の単位用量の注射剤形で配合される。用量及び投与方法は、治療される個体及び特定の疾患によって異なる。一実施形態において、上記の組み換え結合タンパク質又は本明細書に記載のこのよう他の医薬組成物は、静脈内投与される。非経口投与のため、組み換え結合タンパク質又は上記の医薬組成物は、ボーラス注入として又は緩徐な点滴注入により、治療有効量で注入することができる。

【0108】

一実施形態において、本発明は、医学的状態の治療方法に関し、方法は、このような治療を必要とする患者に、本発明の組み換え結合タンパク質の治療有効量を投与するステップを含む。一実施形態において、本発明は、医学的状態の治療方法に関し、方法は、このような治療を必要とする患者に、本発明の医薬組成物の治療有効量を投与するステップを含む。実施例14(図10)は、配列番号134からなる組み換え結合タンパク質の癌の治療への使用の有用性を示す。一実施形態において、本発明は、本発明による医薬組成物の、疾患の治療のための使用に関する。一実施形態において、本発明は、疾患の治療において使用するための医薬組成物に関する。

40

【0109】

「医学的状態」(又は疾患)は、不適切な血管新生を特徴とするものである場合がある。医学的状態は、過剰増殖状態である場合がある。治療に好適な医学的状態の例としては

50

、自己免疫異常、炎症性疾患、網膜症（特に増殖性網膜症）、神経変性疾患、感染、及び腫瘍性疾患が挙げられる。本明細書に記載の組み換え結合タンパク質のいずれかを、このような疾患、特に、自己免疫疾患、炎症性疾患、網膜症、及び腫瘍性疾患からなる群から選択される疾患の治療のための薬剤の調製に使用することができる。本発明は、特に、医学的状態の治療方法に関し、方法は、このような治療を必要とする患者に、本発明の組み換え結合タンパク質又は上記の医薬組成物の治療有効量を投与するステップを含む。いくつかの実施形態において、上記の医学的状態は腫瘍性疾患である。用語「腫瘍性疾患」は、本明細書で使用する場合、急速に増殖する細胞増殖又は腫瘍を特徴とする、細胞又は組織の異常な状態（state or condition）を指す。より具体的な意味合いにおいて、この用語は癌に関する。より具体的な意味合いにおいて、この用語は、腎癌及び／又は胃癌及び／又は多発性骨髄腫に関する場合がある。用語「治療有効量」は、患者において所望の効果をもたらすのに十分な量を意味する。

【0110】

特に、本発明は、本発明の医薬組成物を使用した医学的状態の治療に関し、上記の医学的状態は癌である。

【0111】

本発明の組み換え結合タンパク質又は上記の医薬組成物の癌疾患の治療のための使用はまた、当該技術分野において既知の任意の他の療法との併用とすることができます。用語「～との併用」は、本明細書で使用する場合、所与の投与計画の下で実施される共投与を指すものとする。これには、異なる化合物の同時投与及び異なる化合物の時間を変えた投与が含まれる（例えば、化合物Aを1回投与し、かつ化合物Bをその後に数回投与する、若しくは逆もまた同様、又は、両化合物を同時に投与し、かつ2つのうちの1つを後の段階でまた投与する）。

【0112】

組み換えタンパク質の、病的血管新生を含む疾患の治療への使用が、更に考慮される。用語「病的血管新生」は、いくつかの疾患状態の維持及び進行中の、血管の形成及び増殖を指す。

【0113】

更なる一実施形態において、本発明は、本発明の組み換え結合タンパク質の、医学的状態、好ましくは腫瘍性疾患、より好ましくは癌の治療に使用される薬剤の製造のための使用に関する。

【0114】

一実施形態において、本発明は、本発明の医薬組成物の、腫瘍性疾患、特に癌であり得る、医学的状態の治療に使用される薬剤の製造のための使用に関する。

【0115】

in vivo投与に使用される製剤は、無菌でなくてはならない、又は、滅菌されていなくてはならない。これは、滅菌濾過膜で濾過することにより、容易に実施される。

【0116】

本発明における単一の選択に関連した用語「からなる群から選択される」は、その特定の選択という意味合いを有する。例えば、一実施形態において、「本発明は、配列番号134のアミノ酸配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む組み換え結合タンパク質に関し」、これは、「本発明は、配列番号134のアミノ酸配列を含む組み換え結合タンパク質に関する」という意味合いを有する。

【0117】

一実施形態において、本発明は、上記のリピートドメインのいずれかを含む組み換え結合タンパク質に関する。一実施形態において、本発明は、上記の配列番号134～179のいずれかを含む組み換え結合タンパク質に関する。

【0118】

本発明は、実施例に記載の特定の実施形態に限定されない。他の供給源を使用し、下記の概要に従って処理してもよい。

10

20

30

40

50

【0119】

本明細書を通して多くの文書に言及しており、これらの文書の開示内容は、参照により本明細書に組み込まれる。

【0120】

本明細書は、「MD41211_Sequence_Listing.txt」という名前の、本明細書のアミノ酸配列一覧の多数のアミノ酸配列を参照しており、配列プロトコルのアミノ酸配列は、参照により本明細書に組み込まれる。

【実施例】**【0121】**

本明細書に開示の標準物質及び試薬の全ては当業者に既知であり、市販されている、又は、周知の技術を使用して調製することができる。 10

【0122】**材料**

化学物質はSigma-Aldrich(Switzerland)より購入した。オリゴヌクレオチドはMicrosynth(Switzerland)より購入した。特に明記しない限り、DNAポリメラーゼ、制限酵素及び緩衝液は、New England Biolabs(USA)又はThermo Fisher Scientific Fermentas(Lithuania)より購入した。クローニング及びタンパク質産生株は、大腸菌XL1-blue(Stratagene(USA))又はBL21(Novagen(USA))であった。組み換えVEGF-A(ヒト、マウス、ラット)、VEGF-C、PDGF-AB、及びHGF(ヒト、カニクイザル、マウス)は、R&D Systems(Biotechnology(Minneapolis, USA))、Peprotech(Rocky Hill, USA)、Sino Biological(Beijing, China)、ReliaTech(Wolfsburg, Germany)から入手した、又は、標準的な手順に従い、チャイニーズハムスター卵巣細胞若しくはピキアパストリスで產生し、精製した。異なる種の血清アルブミンは、Sigma-Aldrich, Innovative Research(Novi, USA)、CSL Behring(Switzerland)から入手した、又は、標準的な方法を用い、動物から直接採取した。ビオチン化したVEGF-A又はHGFは、標準的なビオチン化試薬及び方法(Thermo Fisher Scientific Inc.(USA))を使用し、ビオチン部分をタンパク質の第一級アミンにカップリングすることにより、化学的に得た。抗体は、Thermo Fisher Scientific若しくはQIAGEN(Germany)より入手した、又は、当業者に周知の手順である、標準的な免疫付与及びハイブリドーマ手順をマウス若しくはウサギにおいて使用して產生させた。細胞培養試薬は、Lonza(Switzerland)、Rochelle(Switzerland)、Thermo Fisher Scientific、及びPromocell(Germany)より購入した。 20 30

【0123】**分子生物学**

特に明記しない限り、方法は、記載の手順(Sambrook J., Fritsch E. F. 及びManiatis T., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory 1989, New York)に従い、実施する。 40

【0124】**設計アンキリンリピートドメイン、ライブラリー及び選択**

設計アンキリンリピートタンパク質ライブラリーを作製する方法、設計アンキリンリピートタンパク質ライブラリーの例、及び設計アンキリンリピートタンパク質を設計アンキリンリピートタンパク質のライブラリーから選択する方法は、記載されている(国際公開第2002/020565号、同第2010/060748号、同第2012/069654号、同第2012/069655号、同第2014/001442号、Binz e 50

t a l . 2 0 0 4 , l o c . c i t .) 。

【 0 1 2 5 】

実施例 1 : V E G F - A 、 H G F 、 又は血清アルブミンに対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメインの選択、発現、精製、及び分析

リボソームディスプレイ (B i n z e t a l . , 2 0 0 4 , l o c . c i t .) を用い、 V E G F - A 、 H G F 、 又は血清アルブミンに対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメインを、 コンビナトリアルライブラリーから、 V E G F - A に対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメインの作製については国際公開第 2 0 1 0 / 0 6 0 7 4 8 号に記載の方法により、 また、 H G F に対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメインの作製については同第 2 0 1 4 / 1 9 1 5 7 4 号に記載の方法により、 また、 血清アルブミンに対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメインの作製については同第 2 0 1 2 / 0 6 9 6 5 4 号に記載の方法により、 選択した。 選択されたクローンの、 特異的な標的 (それぞれ V E G F - A 、 H G F 、 又は血清アルブミン) 及び非特異的な標的 (例えば M B P 、 大腸菌マルトース結合タンパク質) への結合を粗抽出 E L I S A によって評価し、 それぞれ、 V E G F - A 、 H G F 、 又は血清アルブミンに対する結合特異性を有する、 何百もの設計アンキリンリピートドメインが、 それぞれの標的の各選択において、 首尾よく選択されたことが示された。 例えば、 配列番号 1 2 ~ 2 2 の設計アンキリンリピートドメインは、 V E G F - A に対する結合特異性を有するアンキリンリピートドメインのアミノ酸配列を構成し、 配列番号 2 3 ~ 3 7 の設計アンキリンリピートドメインは、 H G F に対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメインのアミノ酸配列を構成し、 配列番号 4 0 ~ 5 6 の設計アンキリンリピートドメインは、 血清アルブミンに対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメインのアミノ酸配列を構成する。

【 0 1 2 6 】

これらの V E G F - A 、 H G F 、 若しくは血清アルブミンに対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメイン、 又は既知の結合特異性を有さない陰性対照の設計アンキリンリピートドメイン (すなわちタンパク質 # 1 0 及び # 1 1) を、 タンパク質を簡便に精製するための N 末端 H i s タグを付与する p Q E (Q I A g e n (G e r m a n y)) 系の発現ベクターにクローニングした。 タンパク質は、 例えば国際公開第 2 0 1 0 / 0 6 0 7 4 8 号に記載のような、 当業者に既知の方法によって作製し、 精製した。

【 0 1 2 7 】

実施例 2 : 表面プラズモン共鳴を使用した設計アンキリンリピートドメインの特徴づけ S P R は、 P r o t e O n 装置 (B i o R a d) を使用して測定し、 測定は、 当業者に既知の標準的な手順に従って実施した。 選択されたタンパク質について測定した K d 値を、 表 1 ~ 3 に列挙する。

【 0 1 2 8 】

【表 1】

表 1 : ヒト V E G F - A に結合する設計アンキリンリピートドメインの解離定数の例

| タンパク質#* | Kd [pM] |
|---------|---------|
| 12 | 94 |
| 13 | 96 |
| 16 | 141 |

*この表のタンパク質 # 1 2 、 # 1 3 、 及び # 1 6 は、 配列番号 1 2 、 1 3 及び 1 6 の対応するアミノ酸配列、 並びに更に N 末端 H i s タグ (配列番号 1) からなる、 設計アンキリンリピートドメインを表す。

【 0 1 2 9 】

10

20

30

40

50

同様の V E G F - A の解離定数値が、タンパク質 # 1 4 、 # 1 5 、及び # 1 7 ~ # 2 2 について得られる。

【 0 1 3 0 】

【表 2 】

表 2 : ヒト HGF に結合する設計アンキリンリピートドメインの解離定数の例

| タンパク質#* | Kd[pM] | |
|---------|--------|----|
| 23 | 16 | |
| 24 | 163 | |
| 25 | 66 | 10 |
| 26 | 51 | |
| 27 | 129 | |
| 28 | 26 | |
| 29 | 25 | |

*この表のタンパク質 # 2 3 ~ # 2 9 は、配列番号 2 3 ~ 2 9 の対応するアミノ酸配列、及び更に N 末端 His タグ（配列番号 1 ）からなる、設計アンキリンリピートドメインを表す。

20

【 0 1 3 1 】

同様の HGF の解離定数値が、タンパク質 # 3 0 ~ # 3 7 について得られる。

【 0 1 3 2 】

【表 3 】

表 3 : ヒト HSA に結合する設計アンキリンリピートドメインの解離定数の例

| タンパク質#* | Kd[nM] | |
|---------|--------|----|
| 44 | 26 | |
| 45 | 13 | |
| 46 | 22 | |
| 47 | 27 | |
| 48 | 20 | |
| 49 | 15 | |
| 50 | 27 | |
| 51 | 14 | |
| 52 | 6 | 30 |
| 54 | 11 | |
| 55 | 15 | |

*この表のタンパク質 # 4 4 ~ # 5 5 は、配列番号 4 4 、 4 5 、 4 6 、 4 7 、 4 8 、 4 9 、 5 0 、 5 1 、 5 2 、 5 4 、及び 5 5 の対応するアミノ酸配列、並びに更に N 末端 His タグ（配列番号 1 ）からなる、設計アンキリンリピートドメインを表す。

40

【 0 1 3 3 】

同様のヒト血清アルブミンの解離定数値が、タンパク質 # 4 0 ~ # 4 3 、 # 5 3 、 # 5 6 、及び # 5 7 について得られる。

50

【0134】

実施例3：競合結合アッセイ及び受容体競合結合アッセイ

それぞれVEGF-A、HGF、又は血清アルブミンに対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメインの、競合アッセイによる特徴づけ。このようなアッセイは、当業者に周知である。VEGF-Aに対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメインについて、製造業者(VEGF-A QuantikineキットDVE00、R&D Systems)に従い、定量的サンドイッチ酵素免疫測定法の手法を使用した。VEGF-Aに特異的なモノクローナル抗体を、マイクロプレート上にプレコートした。VEGF-A標準物質、及びVEGF-A(20 pM)と異なる濃度のタンパク質#18、#19、又は#20との混合物をウェルに添加し、存在する全ての遊離のVEGF-A(すなわち、設計アンキリンリピートドメインに結合していない)を、固定化された抗体によって結合させる。全ての非結合の物質を洗い流した後、VEGF-Aに特異的な酵素結合ポリクローナル抗体をウェルに加える。洗浄して全ての非結合の抗体-酵素試薬を除去した後、基質溶液をウェルに加えると、最初の工程で結合されたVEGF-Aの量に比例して発色する。発色を停止し、発色の強度を測定する。このアッセイにおいて、試験した設計アンキリンリピートタンパク質は、高いVEGF-A阻害効力を示した。IC₅₀値は、Graph Pad Prismソフトウェア及び当業者に既知の標準的な手順を使用し、上記のように得られた滴定曲線から算出した。HGFに対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメインについては、cMet受容体競合アッセイを実施した。そのために、PBS中の5 nMのヒトcMet受容体を、Maxisorpプレートに4で終夜固定化した。0.05%TWEEN 20を含むPBSで洗浄した後、0.05%TWEEN 20及び0.25%カゼインを含むPBSを使用し、室温でプレートを2時間、300 rpmで振とうしてロックした。0.05%TWEEN 20を含むPBS中で、一定濃度5 nMのヒトHGFを、1000 nM~1 pMのタンパク質#23、#26、#28、及び#29(それぞれ1:4の希釈系列)と、希釈プレート上で30分間室温でブレインキュベートした。ELISAプレートを0.05%TWEENを含むPBSで洗浄した後、ブレインキュベートした試料をELISAプレートに移し、プレートを300 rpmで振とうし、室温で2時間インキュベートした。0.25%TWEENを含むPBSで洗浄した後、200 ng/mLの抗ヒトHGF抗体を、室温で1時間、300 rpmで振とうして加えた。0.05%TWEENを含むPBSで洗浄した後、100 ng/mLのHRP複合ポリクローナル抗HGF種抗体を、室温で30分間、300 rpmで振とうして加えた。検出には、1:3に希釈したBMブルーPOD(Roche)を使用した。呈色反応を15分後、1M H₂SO₄を加えて停止した。読み取りは、A620を参照波長として使用し、A450で行った。

【0135】

これらのアッセイによって得られたIC₅₀値の例を、表4及び5に示す。同様のVEGF-AのIC₅₀値が、タンパク質#12~#17、#21について得られ、同様のHGFのIC₅₀値が、タンパク質#24、#25、#27、及び#30~#37について得られる。

【0136】

10

20

30

40

【表4】

表4：設計アンキリンリピートドメインによる抗体のVEGF-A結合の阻害
(平均IC₅₀値)

| タンパク質#* | IC ₅₀ [pM] |
|---------|-----------------------|
| #18 | 13 |
| #19 | 13 |
| #20 | 4 |

*この表のタンパク質#18～#20は、配列番号18～20の対応するアミノ酸配列、
及び更にN末端Hисタグ（配列番号1）からなる、設計アンキリンリピートドメインを
表す。

10

【0137】

【表5】

表5：設計アンキリンリピートドメインによるHGFのcMetへの結合の阻害
(平均IC₅₀値)

| タンパク質#* | IC ₅₀ [pM] |
|---------|-----------------------|
| 23 | 915 |
| 26 | 623 |
| 28 | 955 |
| 29 | 1357 |

*この表のタンパク質#23、#26、#28、及び#29は、配列番号23、26、
28、及び29の対応するアミノ酸配列、並びに更にN末端Hисタグ（配列番号1）
からなる、設計アンキリンリピートドメインを表す。

30

【0138】

実施例4：組み換え結合タンパク質、特に2つ、3つ又は4つの設計アンキリンリピートドメイン、及び他のリピートタンパク質を含む組み換え結合タンパク質の作製

設計アンキリンリピートドメイン又は組み換え結合タンパク質をコードするDNAは、当業者に周知の遺伝学的方法によって作製した。配列番号58～133のアミノ酸配列の群から選択され、更に配列番号1若しくはアミノ酸GSをN末端に有する組み換え結合タンパク質、又は配列番号134～179のアミノ酸配列の群から選択された組み換え結合タンパク質、又は配列番号10～57のアミノ酸配列の群から選択され、更に配列番号1若しくはアミノ酸GSをN末端に有する設計アンキリンリピートドメインは、Quagen(Germany)のpQE発現系を使用し、標準的手法を用いて、大腸菌の細胞質中で発現した。アミノ酸GSがN末端にある場合、発現ベクターによって更にコードされたMet残基は、小さなGly残基（すなわち、配列番号134～179の位置1のアミノ酸）が開始Metに後続するため、大腸菌の細胞質中で、発現されたポリペプチドから、効率的に切断された。フレンチプレスを使用して細胞を溶解し、当業者に周知の標準的なクロマトグラフィーの手法を使用し、タンパク質を粗細胞抽出物からほぼ均質な状態に精製した。

40

【0139】

実施例5. 組み換え結合タンパク質に含まれる、血清アルブミンに対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメインの数を増やすことによる薬物動態特性の改善 - マウスの薬物動態試験

50

マウス薬物動態試験のため、実施例4に記載のように調製したタンパク質 # 5 7、# 6 2、# 6 3、# 6 4、# 6 8、# 7 3、# 7 4、# 8 2、# 8 3、# 9 7、# 1 0 9、及び# 1 1 0（配列番号 5 7、6 2、6 3、6 4、6 8、7 3、7 4、8 2、8 3、9 7、1 0 9、及び1 1 0に対応し、更に配列番号1をN末端に有するタンパク質）を、記載（Zahnd, C., Kawe, M., Stumpp, M.T., de Pasquale, C., Tamaskovic, R., Nagy-Davidescu, G., Dreier, B., Schibl, R., Binz, H.K., Waibel, R., Plueckthun, A., Cancer Res. 70, 1595~1605, 2010）のように放射活性物質で標識し、 $100 \mu\text{L}$ 中 $10 \mu\text{g}$ で、単回の静脈内ボーラス注入として、メスのBALB/cマウスの尾静脈にそれぞれ投与した。各マウスから血清試料を様々な時点で採取し、蓄積された放射能を、シンチレーションカウンターを使用して測定した。
10

【0140】

これらの実験において、血清アルブミンに対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメインを2つ含むタンパク質は、血清アルブミンに対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメインを1つのみ含む比較用の構造体に比べ、改善された薬物動態特性を一貫して呈した（図3）。例えば、血清アルブミンに対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメイン（配列番号51に加えてC末端ポリペプチドを含む、配列番号57）を1つ含むタンパク質#57と、血清アルブミンに対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメインを2つ（GSポリペプチドリンク（配列番号63）又はPTリッチポリペプチドリンク（配列番号62）によって結合された、2回分の配列番号51）含むタンパク質#62及び#63とを比較すると、血清アルブミンに対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメインを2つ有することにより、血清アルブミンに対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメインを1つのみ含むタンパク質に比べ、%IDが、例えば、注入後24時間（GS+57%、PT+59%）、48時間（GS+76%、PT+82%）又は72時間（GS+79%、PT+94%）で上昇し、終末相半減期が改善する（GS+38%、PT+48%）ことが示される（図3a）。特に、PTリッチリンク、特に配列番号9を使用することにより、薬物動態特性が改善する（図3a）。以下の3つの例は、タンパク質中に存在する、血清アルブミンに対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメインを（1つではなく）2つ有することによって薬物動態特性を改善する方法は、異なる設計アンキリンリピートドメインを含む異なるタンパク質に移行が可能であることを示している。例えば、配列番号22（血清アルブミンとは別の標的に対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメイン）及び配列番号51（血清アルブミンに対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメイン）を含むタンパク質#64の薬物動態プロファイルを、それぞれ配列番号22と、2回分の配列番号51を含むタンパク質#73及び#74（タンパク質#73は、配列番号22に隣接する配列番号51を2つ有し、タンパク質#74は、配列番号22のN末端に配列番号51を2つ有する）と比較すると、血清アルブミンに対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメインを2つ有することにより、血清アルブミンに対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメインを1つのみ含むタンパク質に比べ、%IDが、例えば、注入後24時間（N末端+62%、隣接+89%）、又は48時間（N末端+136%、隣接+175%）で上昇し、終末相半減期が改善する（N末端又は隣接の両方について+63%超）ことが示される（図3b）。同様に、配列番号11（既知の結合特異性を有さない設計アンキリンリピートドメイン）を2回分、及び配列番号51（血清アルブミンに対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメイン）を1回分含むタンパク質#82の薬物動態プロファイルを、配列番号11を2回分及び配列番号51（N末端）を2回分含むタンパク質#109と比較すると、血清アルブミンに対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメインを2つ有することにより、血清アルブミンに対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメインを1つのみ含むタンパク質に比べ、%IDが、例えば、注入後24時間（+12%）、又は48時間（+50%

35%）で上昇し、終末相半減期が改善する（+71%）ことが示される（図3c）。更に、配列番号38及び39（血清アルブミンとは別の標的に対する結合特異性をそれぞれ有する設計アンキリンリピートドメイン）、並びに配列番号50（血清アルブミンに対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメイン）を含むタンパク質#83の薬物動態プロファイルを、それぞれ配列番号38及び39、並びに2回分の配列番号50（配列番号38及び39に隣接している）を含むタンパク質#110と比較すると、血清アルブミンに対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメインを2つ有することにより、血清アルブミンに対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメインを1つのみ含むタンパク質に比べ、%IDが、例えば、注入後24時間（+198%）、48時間（+198%）、又は72時間（+228%）で上昇し、終末相半減期が改善する（+19%）ことが示される（図3d）。更に、タンパク質#97は、タンパク質#68に比べ、著しく改善された薬物動態特性を呈し、例えば、終末相半減期はそれぞれ21時間及び16時間であり、血清アルブミンに対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメインを2つ有することは、このようなドメインを1つのみ有するよりも有益であることが示された。

【0141】

これらの結果は、驚くべきことに、更に実施例6で論ずるように、血清アルブミンに対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメインを、1つではなく2つ、組み換え結合タンパク質中に使用することにより、薬物動態特性が改善することを示している。

【0142】

実施例6. 組み換え結合タンパク質に含まれる、血清アルブミンに対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメインの数を増やすことによる薬物動態特性の改善 - カニクイザルの薬物動態試験

カニクイザルの薬物動態試験のため、実施例4に記載のように調製したタンパク質#57、#62、及び#97（配列番号57、62、及び97に対応し、更に配列番号1をN末端に有するタンパク質）及びタンパク質#134（配列番号134に対応するタンパク質）を、静脈内注入により30分間、目標用量濃度0.5～100mg/kgで、カニクイザルに投与した。血液試料は、投与前と、更に選択された時点、例えば、注入の終了後（すなわち注入後）5分、10分、0.5時間、1時間、2時間、4時間、8時間、12時間、24時間、48時間、72時間、96時間、120時間及び168時間に採取した。血液試料を室温に放置し、遠心分離して血清を生成させた後、分析まで-80°で保存した。薬物動態パラメータは、当業者に周知の手順を使用して測定した。タンパク質#57、#62、#97及び#134の血清中濃度は、サンドイッチELISAにより、ウサギモノクローナル抗設計アンキリンリピートドメイン抗体を捕捉試薬として、マウスモノクローナル抗設計アンキリンリピートドメイン抗体を検出試薬として使用し、標準曲線を使用して測定した。薬物動態パラメータは、Phoenix WinNonLin（Certara（Princeton, USA））又はGraphPad Prism（GraphPad Software（La Jolla, USA））等の標準的なソフトウェア及び非コンパートメント解析等の標準的な解析を使用して測定した。得られた薬物動態プロファイルを図4に示す。血清アルブミンに対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメインを2つ含むタンパク質は、血清アルブミンに対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメインを1つのみ含む比較用の構造体に比べ、改善された薬物動態特性を一貫して呈した。例えば、血清アルブミンに対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメイン（配列番号51）を1つ含むタンパク質#57（0.5mg/kg、27.7nmol/kg）を、血清アルブミンに対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメインを2つ（PTリッヂポリペプチドリンクによって結合された2回分の配列番号51）含むタンパク質であるタンパク質#62（1.04mg/kg、34.5nmol/kg）と比較することにより、結果は、血清アルブミンに対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメインをタンパク質中に2つ有することにより、血清アルブミンに対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメインを1つの

10

20

30

40

50

み含むタンパク質に比べ、曝露が上昇し(2138 d · nmol / L 対 4676 d · nmol / L、すなわち 7 日目までの計算で +119%)、クリアランスが低下し(0.0108 L / (d · kg) 対 0.0031 L / (d · kg)、すなわち -71%)、終末相半減期が改善する(4.57 d 対 9.00 d、すなわち 1 日目 ~ 7 日目の計算で +97%)ことを示す(図 4 a)。更に、注入後 10 分の測定濃度に規準化した注入量の割合は、タンパク質 #57 をタンパク質 #62 と比較すると、4 日目(23.39% 対 57.72%、+148%)、5 日目(19.00% 対 48.41%、+155%)、及び 6 日目(18.5% 対 51.94%、+175%)に増加する。カニクイザルにおける更なる例として、タンパク質 #134(実施例 4 に記載のように作製された、配列番号 134 に対応するタンパク質)を異なる投与量で、それぞれ 10 頭(各投与量につきオス 5 頭、メス 5 頭)において試験し、終末相半減期を、WinNonLin を使用し、7 日目までの濃度値を考慮して評価した。タンパク質 #134 は、カニクイザルに 1 mg / kg で投与したとき、平均終末相半減期 4.0 日(95 時間)(1 mg / kg で終末相半減期 2.7 日(65 時間)を呈したタンパク質 #97 に比べ、+46%)、10 mg / kg で投与したとき 5.3 日(127 時間)、また、100 mg / kg で投与したとき 5.8 日(139 時間)を呈した。タンパク質 #134 のカニクイザルにおける薬物動態プロファイルを、タンパク質 #97 と比較して図 4 b に示す。実施例 5 と同様に、これらの結果は、驚くべきことに、血清アルブミンに対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメインを、1 つではなく 2 つ、組み換え結合タンパク質中に使用することにより、薬物動態特性が改善することを示している。これらの結果は、以下のように考察される。

【0143】

いかなるアルブミン結合活性もない場合、組み換え結合タンパク質は、終末相半減期が、マウスとカニクイザルの両方において分の範囲である(国際公開第 2012/069654 号を参照)。血清アルブミンに対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメインを少なくとも 1 つ含むタンパク質は、血清アルブミンに対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメインが存在していない場合よりもはるかに長い終末相半減期を示す。血清アルブミンに対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメインを 1 つ含むタンパク質の薬物動態プロファイルを、図 3 a 及び 4 a に示す。

【0144】

当該技術は、別の血清アルブミン結合タンパク質ドメインである、レンサ球菌 G タンパク質由来のアルブミン結合ドメイン(ABD)の結合価の効果を精査した試験(Hopp et al., 2010; loc. cit.)を含む。別の試験では C 末端融合ペプチドを使用しており(国際公開第 2011/095545 号)、これはタンパク質ドメインではない。ABD は、血清アルブミンに対する結合特異性を有するらせん状のタンパク質ドメインである。重要なことに、Hopp et al. 2010(loc. cit.)は、このような ABD を組み換え結合タンパク質中に 2 つ有すること(1 つを N 末端かつ 1 つを C 末端)では、ABD(C 末端)を 1 つのみ含む組み換え結合タンパク質に比べ、マウスにおいて終末相半減期を有意に改善することはない(37.9 ± 1.1 時間 対 36.4 ± 4.8 時間)。特に、注入後 24 時間及び 72 時間で、ABD を 1 つ含む組み換え結合タンパク質は、ABD を 2 つ含む組み換え結合タンパク質と同一の注入量の割合を示し、2 つの組み換え結合タンパク質の薬物動態特性が同等であることを示した。ABD に関する知見に基づき、当業者は、血清アルブミンに対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメイン等のアルブミン結合タンパク質ドメインを 2 つ含む組み換え結合タンパク質が、血清アルブミンに対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメインを 1 つのみ含む組み換え結合タンパク質に比べ、改善された薬物動態特性を有することはないものと予想していた。驚くべきことに、発明者らは、これが事実ではないことを見出した。Hopp et al.(loc. cit.)とは対照的に、血清アルブミンに対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメインを 2 つ含む組み換え結合タンパク質は、驚くべきことに、血清アルブミンに対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメインを 1 つのみ含む組み換え結合タンパク質に比べ、明らかに延長された終

末相半減期を呈した。

【0145】

これらの例は、多くの異なる知見を示している。例えば、タンパク質 # 134 の薬物動態特性はタンパク質 # 97 の薬物動態特性よりも優れ、個々の設計アンキリンリピートドメインの選択の重要性を示している。配列番号 134 は、最大の活性及び最適な薬物動態特性をもたらす構成成分からなるように選択された。更に、タンパク質 # 134 内の設計アンキリンリピートドメインの配列は、最適な薬物動態特性をもたらすように選択された。血清アルブミンに対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメイン 2 つを含む、4 つの設計アンキリンリピートドメインを含む組み換え結合タンパク質をマウス及びカニクイザルの薬物動態に関して解析した際、最も好ましい薬物動態特性が、他の 2 つの設計アンキリンリピートドメインに隣接する、血清アルブミンに対する結合特異性を有する 2 つの設計アンキリンリピートドメインを有する、組み換え結合タンパク質について認められた。
10

【0146】

この実施例の例は、血清アルブミンとは別の標的にに対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメインの異なる組み合わせを含んでいることから、薬物動態特性の改善のために、血清アルブミンに対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメインを少なくとも 2 つ使用する手法は、いくつかの設計アンキリンリピートドメインを含むタンパク質に概して適用可能であることが明らかである。
20

【0147】

実施例 7 . タンパク質 # 134 による、2 つのヒト血清アルブミン分子の同時結合
タンパク質 # 134 (配列番号 134 からなり、更に N 末端に GS を有する組み換え結合タンパク質) を、実施例 4 に記載のように調製した。タンパク質 # 134 、精製ヒト血清アルブミン (HSA) 、及びタンパク質 # 134 / HSA 混合物 (1 : 2 の化学量論比) を、多角度静的光散乱に連結したサイズ排除クロマトグラフィー (SEC - MALS) によって分析した。SEC - MALS は、表 6 のタンパク質を 30 μM (タンパク質 # 134) 又は 60 μM (HSA) の濃度で使用し、Wyatt (USA) MALS 及び屈折率検出器に連結した Agilent 1200 システム (Life Technologies , USA) において実施した (流量 : 0.6 mL / 分 ; 注入量 : 100 μL ; カラム : GE Healthcare (USA) Superdex 200 10 / 300 GL) 。タンパク質 # 134 / HSA 混合物は、注入前に 20 度 3 時間プレインキュベートした。クロマトグラムを図 5 に示す。溶出物の分子量を測定し、表 6 に示した理論的分子量と比較した。この実験のために、HSA 100 mg (CSL Behring 20 % 溶液) を、Superdex 200_26.60 カラムを A E K T A prime system (GE Healthcare ; 2.0 mL / 分、 PBS 、アイソクラティックフロー、注入量は PBS 中で 1 : 20 に希釈した HSA の 10 mL 、分画 4 mL を採取する) で使用して精製した。主ピークのピーク分画を、SEC - MALS 実験の実施に使用した。
30

【0148】

タンパク質 # 134 は 30 μM において単分散で、溶出分画は予想された分子量のタンパク質を含んでいた (図 5) 。同様に、精製 HSA は 60 μM において単分散で、溶出分画は予想された分子量のタンパク質を含んでいた (表 6) 。 30 μM のタンパク質 # 134 と 60 μM の HSA との混合物は、SEC において 2 つのピークとなった。1 つのピークは、1 : 2 (タンパク質 # 134 / HSA) の複合体に対応する分子量のタンパク質複合体を含んでおり、血清アルブミンに対する結合特異性を有する 2 つの設計アンキリンリピートドメインが同時に機能していることを示した。更に、このピークのテール部分に、1 : 1 (タンパク質 # 134 / HSA) の複合体に対応する分子量のタンパク質複合体を検出することができた。更に、遊離 HSA を検出することができた。この量がわずかであることから、主ピークが、確認された重量と理論的に一致する 2 : 1 (タンパク質 # 134 / HSA) の複合体であることは除外することができ、更に、遊離 HSA の 75 % に対
40
50

応する大きな分画が予想される。遊離タンパク質 # 134 / HSA は検出することができなかった。1 : 2 (タンパク質 # 134 / HSA) の複合体の分子量よりも大きい分子量に対応するピークは検出されなかった。SEC - MALS の測定値及び SEC - MALS の測定値に認められたばらつきは、当業者に周知である。

【0149】

【表6】

表6. タンパク質 # 134 及び HSA 並びに複合体タンパク質 # 134 / HSA の静的光散乱に連結したサイズ排除クロマトグラフィー

| ピーク | 理論的化学量論比及び分子量 | 分子量実測値 |
|------------------------|------------------------------|------------|
| HSA | 69366.6ダルトン | 63350ダルトン |
| タンパク質 # 134 | 62397.0ダルトン | 58700ダルトン |
| タンパク質 # 134 / HSA テール | 1:1, 131763.6ダルトン | 132500ダルトン |
| タンパク質 # 134 / HSA 中央 | 1:1 及び 1:2 の混合物、分子量は比によって異なる | 173700ダルトン |
| タンパク質 # 134 / HSA フロント | 1:2, 201130.2ダルトン | 197500ダルトン |

【0150】

1つの組み換え結合タンパク質による2つのヒト血清アルブミン分子の同時結合は、タンパク質 # 97 及びタンパク質 # 102、タンパク質 # 109、タンパク質 # 110 を静的光散乱に連結したサイズ排除クロマトグラフィーにおいて分析した際にも同様に認められた。

【0151】

実施例 8：リンカー組成の選択、及び血清アルブミンに対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメインの数の選択による、標的結合活性の最大化

タンパク質ドメインを結合させるポリペプチドリンカーは、当業者に周知である。 Gly - Ser リッチリンカーは、単鎖 Fv 抗体フラグメントから周知であり、ここで、 Gly - Ser リッチリンカーは、2つの Fv ポリペプチド鎖を結合させるために使用されている。各種の他のポリペプチドリンカーが存在し、例えば、抗体ヒンジ領域、又は非構造性ポリペプチド、例えば、主にアミノ酸 Ala、Glu、Lys、Pro、Ser、Thr (国際公開第 2007/103515 号) 若しくは Ala、Pro、及び Ser (同第 2008/155134 号) を含む配列が挙げられる。更に、Pro - Thr リッチリンカーが開示されている (同第 2014/191574 号)。このようなリンカーによって結合されたタンパク質ドメインの特性に対するこのようなリンカーの効果を、全てのリンカー / ドメインの組み合わせについて評価する必要がある。ポリペプチドリンカーの性質に次いで、発明者らは、驚くべきことに、血清アルブミン結合ドメインの数が、タンパク質の機能性に影響を及ぼし得ることを見出した。本発明の組み換え結合タンパク質の標的結合活性を最大化するために、Gly - Ser リッチ及び Pro - Thr リッチポリペプチドリンカーを含む組み換え結合タンパク質、並びに血清アルブミンに対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメインを1つ又は2つ含む組み換え結合タンパク質を比較した。そのために、それぞれ配列番号 1 を N 末端に更に有し、実施例 4 に記載のように調製された、タンパク質 # 69、# 71、及び # 107 を、VEGF-A 及び HGF への結合について、それぞれ、ELISA (方法については実施例 4 を参照) によって分析した。結果を表 7 に示す。タンパク質 # 69 とタンパク質 # 71 との EC₅₀ 値の比較により、Pro - Thr リッチリンカーを有する組み換え結合タンパク質は、VEGF-A (因子 2) 及び HGF (因子 1, 3) の結合に関し、それぞれ、Gly - Ser リッチリンカーを有する組み換え結合タンパク質に比べ、より強力であることが示される。タンパク質 # 69 とタンパク質 # 107 との EC₅₀ 値の比較により、血清アルブミンに対する結合

10

20

30

40

50

特異性を有する設計アンキリンリピートドメインを2つ含む組み換え結合タンパク質は、VEGF-A(因子1.4)及びHGF(因子1.1)の結合に関し、それぞれ、血清アルブミンに対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメインを1つのみ含む組み換え結合タンパク質に比べ、より強力であることが示される。これは、構造体中に2つのアルブミン結合ドメインが存在すると、分子の機能性に対して負の効果を有するという、以前の結果(Hopp et al., 2010)を考慮すると驚くべきことである。この結果は、組み換え結合タンパク質が、Pro-Thrリッチリンカーと、血清アルブミンに対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメイン2つと、Gly-Serリッチリンカーと、血清アルブミンに対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメイン1つよりも優先的に含むことを示している。

10

【0152】

【表7】

表7：異なるリンカーと異なる数の血清アルブミンに対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメインとを有する組み換え結合タンパク質のELISA分析

| タンパク質#* | リンカー | SABDの数† | EC ₅₀ [nM] | EC ₅₀ [nM] |
|---------|------|---------|-----------------------|-----------------------|
| | | | VEGF-A | HGF |
| 69 | PT | 1 | 0.102 | 0.117 |
| 71 | GS | 1 | 0.205 | 0.179 |
| 107 | PT | 2 | 0.073 | 0.107 |

*この表のタンパク質#69、#71、及び#107は、配列番号69、71、及び107の対応するアミノ酸配列、並びに更にN末端Hisタグ(配列番号1)からなる、設計アンキリンリピートドメインを表す。

†血清アルブミンに対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメインの数

【0153】

実施例9.配列番号50を使用した場合のタンパク質の安定性の改善

タンパク質#48、#49、及び#51を、これらの変性温度の中点(すなわち、温度上昇に伴う協調的アンフォールディングの中点)について、本質的には、Niesen et al. 2007(Niesen, F.H., Berglund, H., Vedadi, M., Nature Protocols 2, 2212~2221, 2007)による記載のように、タンパク質(25μL、PBS中に100μM)を蛍光染料(PBS中で1/2500に希釈したSyproオレンジ(Life Technologies)25μL)と混合し、蛍光リーダーを備えるサーマルサイクラー(CFX96 Real-Time PCR Detection System; Biorad; 0.5ごとに25秒間の保持時間の後、蛍光を読み取る)で融解曲線を測定することにより、更に特徴づけした。PBS中で、タンパク質#48は変性の中点83.5を呈し、タンパク質#49は変性の中点84.5を呈したのに対し、タンパク質#51は変性の中点79.5を呈した。

30

【0154】

最良の保存安定性特性を有する、血清アルブミンに対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメインを特定するために、タンパク質#49、#50及び#51(それぞれ配列番号49、50及び51に対応し、更に配列番号1をN末端に有する)を実施例4に記載のように調製し、試料をPBSで10mg/mLに濃縮した。続いてタンパク質#50及び#51を-80又は40で1箇月間ガラスバイアル中に保存した後、SDS15%PAGEで分析した。タンパク質#50及び#51は-80の保存で同等の安定性を示したが、40で1箇月間保存した後、タンパク質#50は、タンパク質#51に比べ、SDS15%PAGEにおいて、分解物の量が、顕著に50%超低下した。

40

50

同様に、4、25、40及び60で1週間、PBS中10mg/mLで保存したとき、タンパク質#50は、タンパク質#49に比べ、分解物量の顕著な低下を示した。特に、両方とも40又は60でそれぞれ保存したとき、タンパク質#50は、タンパク質#49に比べ、SDS 15% PAGEにおいて50%超の分解物の低下を示した(図2)。これらの知見は、タンパク質#50が、タンパク質#49及び#51に比べ、改善された保存安定性を有することを示している。同様に、タンパク質#48～#51(実施例4に記載のように作製され、配列番号48～51に対応し、更に配列番号1をN末端に有する)の保存安定性を、PBS中10mg/mLでガラスバイアル中に40で1箇月間インキュベートすることによって比較するとき、タンパク質#48～#50は、タンパク質#51に比べ、30%超の分解物の低下を呈する。

10

【0155】

これらの知見は、タンパク質#102及びタンパク質#103(配列番号102及び103に対応するアミノ酸配列からなり、両者とも更に配列番号1をN末端に有する、組み換え結合タンパク質)の保存安定性を試験することにより、裏付けられる。タンパク質#102及びタンパク質#103を実施例4に記載のように調製し、試料をPBS中で10mg/mLに濃縮し、-80又は40で1箇月間ガラスバイアル中に保存した後、標準的なサイズ排除クロマトグラフィーで分析した。タンパク質#102及び#103が-80の保存で同等の溶出プロファイルを示したのに際し、40の保存で、タンパク質#102は98.72%の単量体種を示し、タンパク質#103は100%の単量体種を示した。これは、配列番号50を組み換え結合タンパク質中に存在させることが、配列番号49を存在させるよりも、保存安定性に関してより好ましいことを示している。同様に、PBS中10mg/mLでガラスバイアル中に40で1箇月間保存した後、SDS-PAGEによって分析するとき、タンパク質#103はタンパク質#102よりも少量の分解物を呈し、配列番号49を含む組み換え結合タンパク質に比べ、配列番号50を含む組み換え結合タンパク質のより高い保存安定性が確認される。

20

【0156】

同様の結果が、実施例4に記載のように調製された、タンパク質#134をタンパク質#143又はタンパク質#150(配列番号134、143及び150にそれぞれ対応するアミノ酸配列からなる組み換え結合タンパク質)と比較するとき、得られる。PBS中に10mg/mLでガラスバイアル中に40で1箇月間保存するとき、タンパク質#134は、タンパク質#143及び#150に比べ、SDS 15% PAGEで分析するとき50%超の分解物の低下を示す。これは、配列番号50を組み換え結合タンパク質中に存在させることが、配列番号49又は配列番号51のいずれかを存在させるよりも、保存安定性に関してより好ましいことを示している。

30

【0157】

実施例10：ELISAを使用した組み換え結合タンパク質の特徴づけ

実施例4に記載のように調製した、配列番号134のアミノ酸配列からなる精製組み換え結合タンパク質を、ELISAで分析した。ウェル当たりPBS中20nMの標的(VEGF-A、HGF、又は血清アルブミン)の100μL又は50μLを、Maxisorpプレート(Nunc, Denmark)中で終夜4で固定化した。PBST(0.1%Tween 20を補充したPBS)300μLで5回洗浄した後、ウェルをPBST-C(0.25%カゼインを補充したPBST)300μLにより、Titramax 1000振とう器(Heidolph, Germany)において450rpmで室温で2時間振とうしてロックした。上記のように5回洗浄した後、PBST-C中のタンパク質#134を1ウェル当たり100μL又は50μL(100nM～0.01pMの範囲の濃度)加え、室温で1時間～2時間、450rpmで振とうしてインキュベートした。上記のように5回洗浄した後、タンパク質#134の結合を、PBST-C中のウサギ抗設計アンキリンリピートドメインモノクローナル抗体を1ウェル当たり100μL又は50μL使用し、室温で1時間、450rpmで振とうして検出した。上記のように5回洗浄した後、結合した抗設計アンキリンリピートドメイン抗体を、PBST-C中の

40

50

ヤギ抗ウサギ IgG - HRP複合体を1ウェル当たり100μL又は50μL使用し、室温で1時間、450rpmで振とうして検出した。上記のように5回洗浄した後、水中1:4で希釈したBM可溶性ブルーPOD基質(Roche, Switzerland)100μLを使用し、ELISAを実施した。反応は、5分後に1M H₂SO₄ 100μLを使用して停止した。続いて、OD(OD450nm~OD620nm)を記録した。

【0158】

ELISAの結果は、タンパク質#134が、ヒト、カニクイザル、ラット及びマウスのVEGF-Aを、同等の強さで結合させることを示している(表8及び図6a)。カニクイザルVEGF-AはヒトVEGF-Aと同等であるため、別途試験はしなかった。タンパク質#134のVEGF-C及びPDGF-ABへの結合は検出されなかった(表9及び図6a)。ヒト、カニクイザル及びマウスのHGFは、タンパク質#134により、同等の強さで結合する(20~50pMの範囲のEC₅₀値、表8及び図6b)。更に、タンパク質#134は、ヒト、カニクイザル、ラット、イヌ及びマウスの血清アルブミンを、同等の強さで結合させる(10~20pMの範囲のEC₅₀値、表8及び図6c)。タンパク質#134(すなわち配列番号134からなるタンパク質)とタンパク質#60又はタンパク質#61(すなわち、実施例4に記載のように作製され、配列番号60又は61からなり、更に配列番号1をN末端に有するタンパク質)とを比較することにより、ヒト血清アルブミンの結合について確認されたタンパク質#134のEC₅₀は、タンパク質#60又は#61について確認されたEC₅₀(それぞれ225pM又は322pM)よりも極めて良好であることが明らかとなった。

【0159】

【表8】

表8：異なる種のVEGF-A、HGF及び血清アルブミンの結合についての
タンパク質#134の見かけのEC₅₀値

| 種 | EC ₅₀ [pM]VEGF-A (95%C.I.)* | EC ₅₀ [pM]HGF (95%C.I.)* | EC ₅₀ [pM]SA (95%C.I.)* |
|--------|---|--|---------------------------------------|
| ヒト | 24(20~27) | 24(20~29) | 13(10~16) |
| マウス | 21(19~23) | 45(38~52) | 15(13~17) |
| ラット | 22(18~26) | n. a. | 17(13~21) |
| イヌ | n. a. | n. a. | 23(20~25) |
| カニクイザル | 24(20~27) [†] | 40(36~44) | 17(13~21) |

*C. I. 信頼区間、[†]ヒトVEGF-Aへの100%配列同一性、したがって、ヒトVEGF-Aについての値が列挙されている、n. a. 分析せず。

【0160】

【表9】

表9. 異なるヒトVEGF及びPDGFの結合についてのタンパク質#134の
見かけEC₅₀値

| 標的 | EC ₅₀ [pM]SA (95%C.I.)* |
|-----------|---------------------------------------|
| ヒトVEGF-A | 24(20~27) |
| ヒトVEGF-C | 結合は検出されなかった |
| ヒトPDGF-AB | 結合は検出されなかった |

*C. I. 信頼区間

10

20

30

40

50

【0161】

実施例11：競合アッセイを使用した組み換え結合タンパク質の特徴づけ

実施例4に記載のように調製した、配列番号134のアミノ酸配列からなる精製組み換え結合タンパク質を、競合ELISA及びFRETで分析した。このような競合FRET及びELISAアッセイは、当業者に周知である。タンパク質#134を、VEGF-A/VEGFR-2競合FRETアッセイにおいて測定した。そのために、タンパク質#134及びビオチン化VEGF-A165(Re liate ch、#300-076 Bi-L)を、0.2%BSA及び0.01%Tweenを含むPBS(PBST-BSA)中の8倍濃度の保存液として調製した。8倍濃度のタンパク質#134の5μLと8倍濃度のビオチン化VEGF-A165の5μLとの競合混合液を、室温で1時間プレインキュベートした(競合混合液)。並行して、ストレプトアビシン-Tb(ストレプトアビシン-ルミ4-テルビウムクリプテートドナー、Cis bio #610SATLB)5μL及びPAb抗h IgG-de(D2抱合型ヤギ抗ヒトIgG、Cis bio #61HF CDAA)5μLを、PBST-BSA緩衝液500μLに加え、20分間インキュベートした(2倍試薬)。1ウェル当たり2倍試薬10μLを384ウェルのHTRF白色プレート(Thermo Fisher Scientific Inc.)に分注し、4倍濃度のhVEGF-R2-Fc融合物(Re liate ch #SFC-008)を1ウェル当たり5μL加えた。続いて、プレインキュベートした競合混合液5μLをウェルに加えた。蛍光リーダーを使用した蛍光の読み取り前に、完全な反応混合物を暗所、室温で1時間インキュベートした。最終混合液は、10nM可溶性VEGF-R2-Fc融合物、10nMビオチン化VEGF-A、及び各種濃度のタンパク質#134を含んでいた。読み取りは、A665nm及びA595nmの波長について行った(励起340nm)。アッセイの結果を図7aに示す。このアッセイにおいて、タンパク質#134は、VEGF-A/VEGFR-2の相互作用をIC₅₀値0.6nMで阻害する。タンパク質#134を、実施例3に記載のように、HGF/cMet競合ELISA実験によって更に測定した。アッセイの結果を図7bに示す。このアッセイにおいて、タンパク質#134は、HGF/cMetの相互作用をIC₅₀値0.92nMで阻害する。タンパク質#134を、実施例3に記載のように、VEGF-A競合ELISA実験によって更に測定した。結果を図7cに示す。このアッセイにおいて、タンパク質#134は、VEGFの結合を、1桁のpMの範囲のIC₅₀値(IC₅₀4.5pM)で阻害する。

【0162】

実施例12：表面プラズモン共鳴を使用した組み換え結合タンパク質の同時標的結合の特徴づけ

SPRを、実施例2の記載と同様に、以下の設定で測定した。2700RUのヒトHGFを、センサーチップ上に固定化した。続いて、100nMのタンパク質#134又はPBSTを180秒間注入した後、PBSTで360秒間洗浄した。これに続き、100nMのヒトVEGF-A又はPBSTを180秒間注入し(飽和に達する)、続いてPBSTで360秒間洗浄した。最後に、100nMのヒト血清アルブミン又はPBSTを180秒間注入した後、PBSTで600秒間洗浄した。得られたシグナルを図8に示す。結果は、タンパク質#134が、HGF、VEGF-A、及び血清アルブミンを結合できることを示している。更に、結果は、タンパク質#134が、HGF及びVEGF-A、並びにHGF、VEGF-A、及び血清アルブミンを同時に結合できることを示している。

【0163】

実施例13：細胞培養中の組み換え結合タンパク質の特徴づけ

実施例4に記載のように調製した、配列番号134のアミノ酸配列からなる精製組み換え結合タンパク質を、更に当業者に周知の細胞アッセイ、例えばHUVEC増殖アッセイによってVEGF-Aの阻害を評価し、また、A549細胞遊走アッセイ及びcMetリン酸化アッセイの両方によってHGFの阻害を評価した。

【0164】

VEGF-Aによって誘発されるHUVECの増殖の阻害は、HUVEC増殖アッセイ

10

20

30

40

50

において、増加するタンパク質 # 134 濃度を滴定することによって測定した。ヒト V E G F - A は、8 ng / mL の濃度（増殖アッセイによる測定で EC₈₀ に対応する）で使用した。タンパク質 # 134 を、200 ng / mL ~ 0.195 ng / mL で滴定した。細胞を 50 μL のアッセイ培地に接種した。タンパク質の希釈溶液（アッセイ培地中）は、希釈プレートで 1 : 2 倍の系列希釈によって調製し、濃度は最終濃度の 4 倍であった。タンパク質 # 134 の希釈溶液を、4 倍濃度の V E G F - A (32 ng / mL、最終 8 ng / mL) と 1 : 1 の比で混合した。混合液の 50 μL を細胞に 72 時間加えた。細胞増殖を、複製 DNA 中の BrdU の取り込み、又は WST - 1 を使用した代謝活性のモニタリングのいずれかによって測定した。結果を図 9 a に示す。タンパク質 # 134 は、IC₅₀ 5.7 ng / mL (91.35 pM) を呈することを示している。

【0165】

HGF / cMet 相互作用の阻害は、タンパク質 # 134 を Orlis 細胞遊走アッセイ (Platypus Technologies (USA)) を使用して測定した。アッセイは、製造業者の手順書に従って実施した。簡潔に説明すると、細胞を、100,000 の A549 細胞と共に、無血清 D M E M に接種した。細胞は 24 時間後に付着し、また、培地をアッセイ培地 (D M E M で、0.5 nM HGF を含むもの及び含まないもの、5 μM のタンパク質を含むもの及び含まないもの) に交換した。HGF 及び中和タンパク質を、細胞に加える前に室温で 1 時間プレインキュベートした。Orlis (登録商標) ストッパーを取り外した。続いてアッセイ系を 48 時間インキュベートし、細胞遊走を可能とした。細胞をカルセイン (2.5 ng / mL) で 40 分間染色し、画像を撮影した。遊走領域を、反転顕微鏡 Olympus 及びそのソフトウェア CellSens Dimension を使用して測定した。遊走面積は、遊走前のウェルの覆われていない面積から、それぞれの試料ウェルの覆われていない面積を差し引くことにより、覆われた面積として算出した。覆われていない面積は細胞を含まない面積であり、ソフトウェアの処理フォルダ中の直径関数 (diameter function) を使用して測定した。結果を図 9 b に示す。タンパク質 # 134 が、HGF によって誘発される A549 細胞の細胞遊走を抑制できることを示している。

【0166】

タンパク質 # 134 による cMet のリン酸化の阻害は、A549 細胞及び Duo Sert P - cMet - ELISA (RnD Systems) を使用して測定した。細胞を、96 ウェルプレート中の完全培地に、ウェル当たり 200,000 個接種した。24 時間後に、培地を無血清培地に交換した。細胞を更に 24 時間インキュベートし、タンパク質 # 134 の存在下又は不在下、1 nM ヒト HGF (又は陰性対照については PBS) で刺激した。HGF 及びタンパク質 # 134 を、細胞に加える前に、室温で少なくとも 30 分間プレインキュベートした。細胞を室温で 10 分間刺激した。刺激は、手順書に従い、細胞上清を (はじいて) 除去し、また、細胞溶解緩衝液を加えることによって停止した。細胞溶解物は、ELISA の実験まで -20° で保存した。結果を図 9 c に示す。タンパク質 # 134 が、HGF によって媒介される cMet リン酸化を、IC₅₀ 184 pM で抑制できることを示している。

【0167】

実施例 14：組み換え結合タンパク質の in vivo 腫瘍増殖に対する効果

U87 MG 異種移植マウスモデルを使用し、V E G F - A に対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメインを、HGF に対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメインと合わせて有する効果を、これらを別個に有する場合と比較して評価した。配列番号 134 (それぞれ配列番号 50 のアミノ酸からなる、血清アルブミンに対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメインを 2 つ含み、配列番号 18 からなる、V E G F - A に対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメインを 1 つ含み、かつ配列番号 26 のアミノ酸からなる、HGF に対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメインを 1 つ含む) からなるタンパク質 # 134、配列番号 61 (配列番号 50 のアミノ酸からなる、血清アルブミンに対する結合特異性を有する設計アンキリ

10

20

30

40

50

ンリピートドメインを1つ含み、かつ配列番号18のアミノ酸からなる、VEGF-Aに対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメインを1つ含む)からなり、更に配列番号1をN末端に有するタンパク質#61、又は配列番号60(配列番号50のアミノ酸からなる、血清アルブミンに対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメインを1つ含み、かつ配列番号26のアミノ酸からなる、HGFに対する結合特異性を有する設計アンキリンリピートドメインを1つ含む)からなり、更に配列番号1をN末端に有するタンパク質#60を、実施例4に記載のように調製した。in vivoの分析のために、マウス1匹当たり 2×10^6 個のU87MG細胞を、メスのNMRInu/nuマウス(Harlan)の右側腹部に皮下移植し、マウスを、それぞれ同等の腫瘍体積を有する群に分類した。29日目及び32日目に、マウスをPBS又は4mg/kgのタンパク質の静注で処置した。35日目に腫瘍を採取し、低温凍結した。処置の当日ごとに、以下の式を使用して各腫瘍の腫瘍体積を測定した: 体積 = (幅)² × 長さ / 2。体重測定によると、4つの処置群の間に有意差は認められなかった。続いて腫瘍断面を、Ki67に対する抗体(ab66155、Abcam(U.K.))を使用して染色し、標準的なIHCの方法を使用して増殖を定量し、又は、CD-31に対する抗体(BD550274、BD Biosciences(USA))を使用して染色し、標準的なIHCの方法を使用して血管新生を定量した。増殖細胞のパーセンテージ及び平均血管面積のパーセンテージを、ソフトウェアImageJを使用して測定した。結果を図10aに示す。予想どおり、PBSに比べ、タンパク質#60及びタンパク質#61は増殖を阻害し、また、タンパク質#60(わずかに)及びタンパク質#61は血管新生を阻害する。しかしながら、タンパク質#134をもたらす2つの組み合わせは、増殖と血管新生の両方の阻害が向上する。これは、抗VEGF-A活性と抗HGF活性との組み合わせが、良好な有効性の鍵となることを示している。

【0168】

タンパク質#134を、2つの患者由来の異種移植マウスモデル、胃癌モデル及び腎癌モデルにおいて、更に特徴づけした。患者由来の腫瘍異種移植マウスモデルは、当業者に周知である。タンパク質#134は、実施例4に記載のように調製した。

【0169】

腎癌患者由来の異種移植マウスモデルについては、外科検体からの腎細胞癌検体を、NMRInu/nuマウスに皮下移植し、安定な増殖パターンが確立するまで、3~5回継代培養した。腫瘍は、ドナーマウスから取り出した後、直径4~5mmのフラグメントに切断し、NMRInu/nuマウスに皮下移植した。固形腫瘍増殖の開始が明確となった時点で、マウスを3匹ずつの群に無作為に割り付け、被験物質を以下のように、それぞれ1つの動物群に投与した: PBSを10mL/kgで1週間に3回、3週間静注投与し、タンパク質#134を4mg/kgで1週間に3回、3週間静脈投与し、ソラフェニブを1日に200mg/kgで21日間経口投与した。腫瘍体積を、処置の開始日、並びに3、7、10、14、18、及び21日目に、上記のように評価した。結果を図10bに示す。このモデルにおいて、タンパク質#134は、腎細胞癌の治療に対する現在の標準治療であるソラフェニブよりも有効である。

【0170】

胃癌患者由来の異種移植マウスモデルについては、外科検体からの胃癌検体を、NMRInu/nuマウスに移植し、安定な増殖パターンが確立するまで、3~5回継代培養した。腫瘍は、ドナーマウスから取り出した後、直径4~5mmのフラグメントに切断し、NMRInu/nuマウスに皮下移植した。固形腫瘍増殖の開始が明確となった時点で、マウスを8匹ずつの群に無作為に割り付け、被験物質を以下のように、それぞれ1つの動物群に投与した: PBSを10mL/kgで0、3、6、9、12、15、及び18日目に静脈投与し、タンパク質#134を4mL/kgで0、3、6、9、12、15、及び18日目に静脈投与し、パクリタキセルを15mg/kgで0、7、及び14日目に静脈投与し、タンパク質#134及びパクリタキセルを、それぞれ、4mg/kgで0、3、6、9、12、15、及び18日目、15mg/kgで0、7、及び14日目に静脈

10

20

30

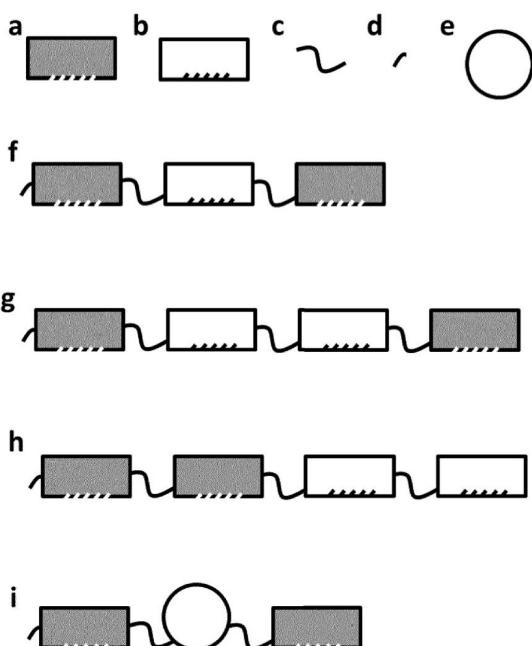
40

50

投与した。腫瘍体積を、処置の開始日、並びに 2、6、13、16、及び 20 日目に、上記のように評価した。結果を図 10c に示す。このモデルにおいて、タンパク質 #134 は、少なくともパクリタキセルと同様に有効であり、これら 2 つの併用は、個々の構成要素よりも顕著に有効であった。

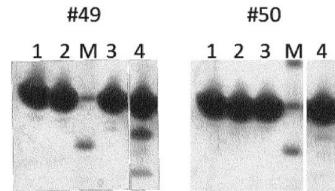
【図 1】

図1



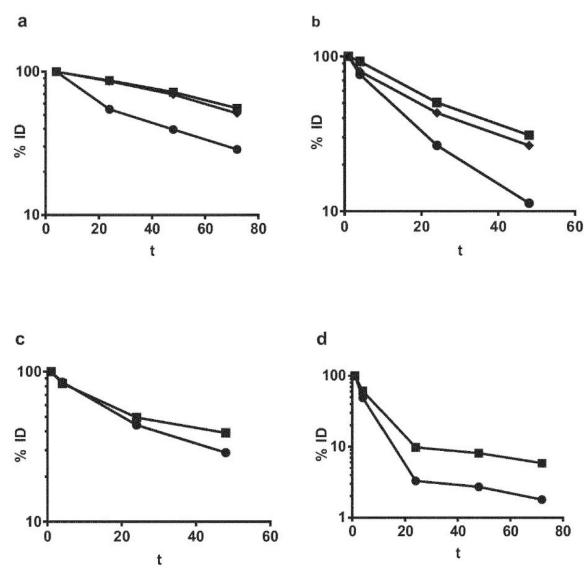
【図 2】

図2



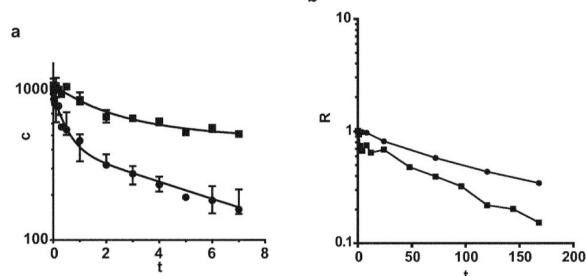
【図 3】

図3



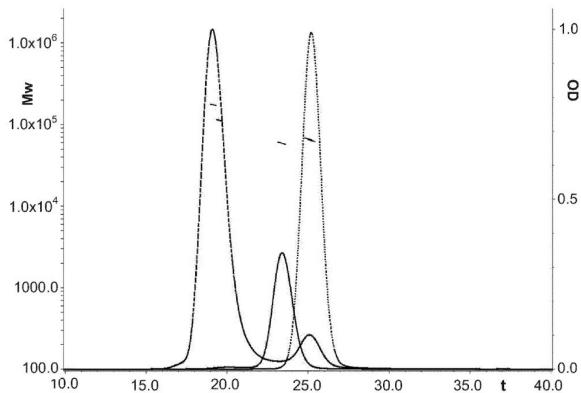
【図4】

図4



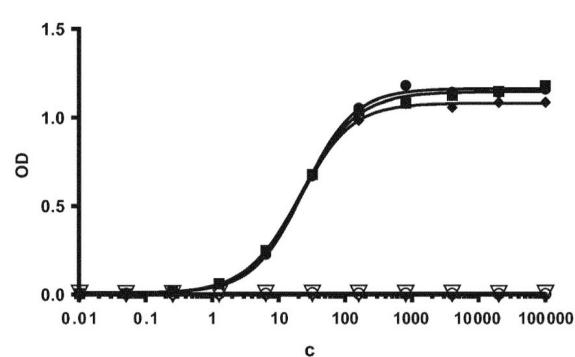
【図5】

図5



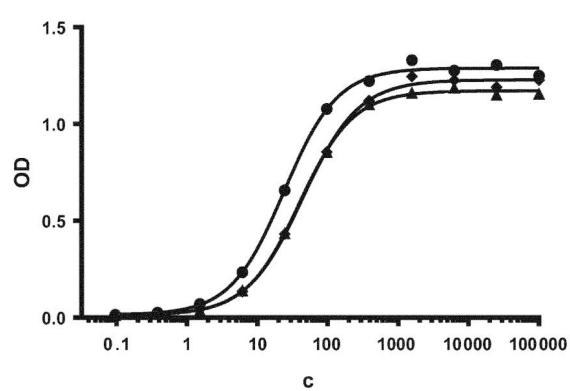
【図6 a】

図6a



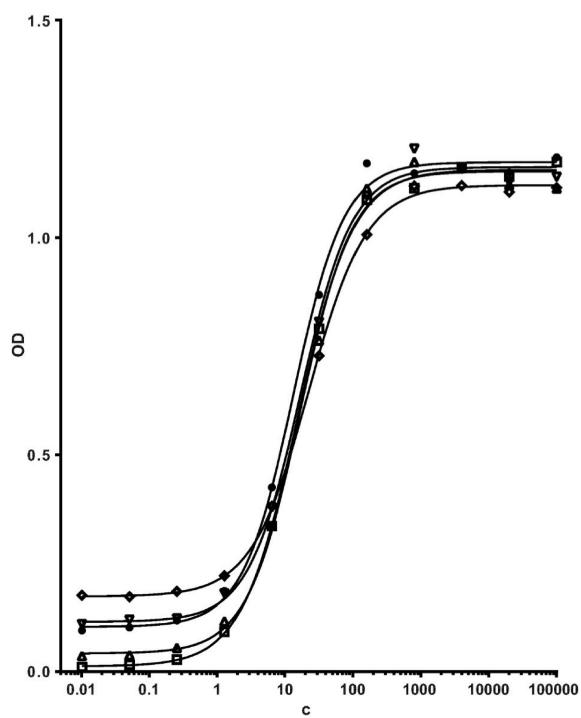
【図6 b】

図6b



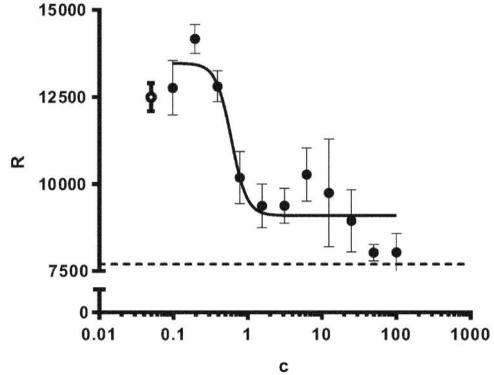
【図6 c】

図6c



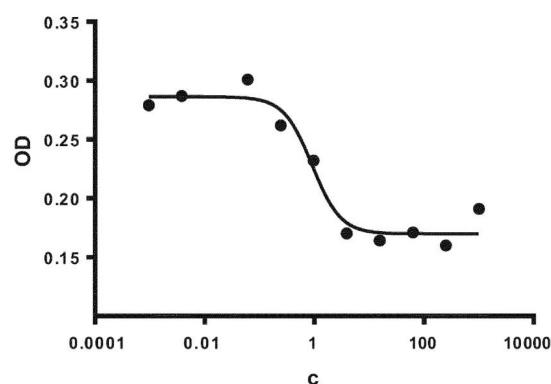
【図7 a】

図7a



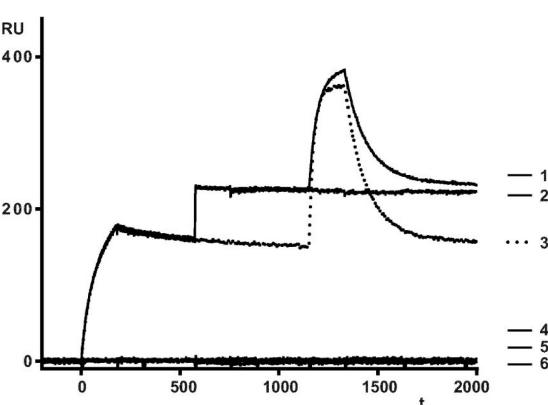
【図7b】

図7b



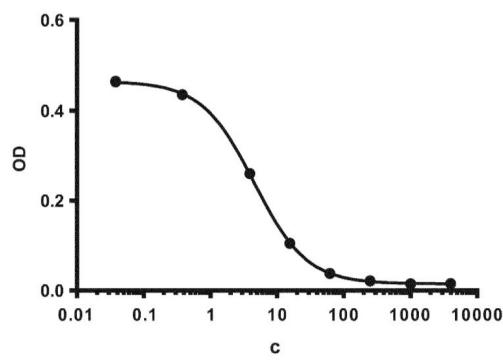
【図8】

図8



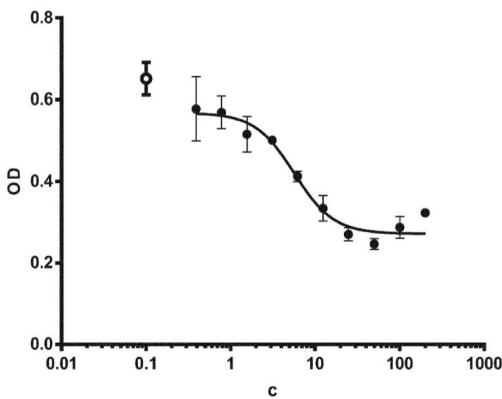
【図7c】

図7c



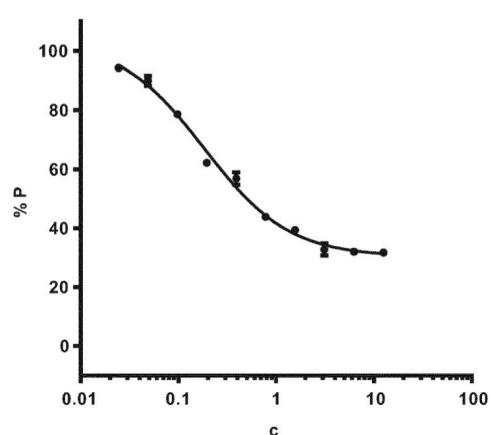
【図9a】

図9a



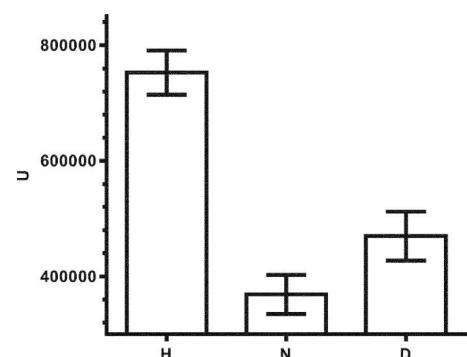
【図9c】

図9c



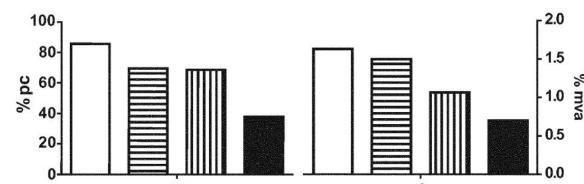
【図9b】

図9b



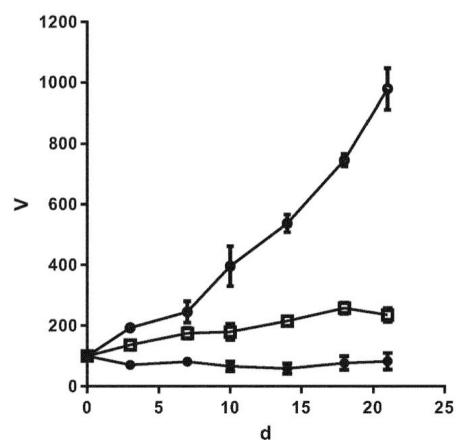
【図10a】

図10a



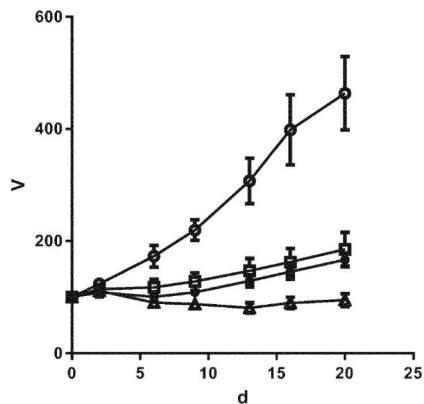
【図 10 b】

図10b



【図 10 c】

図10c



【配列表】

0006552636000001.app

 フロントページの続き

| (51)Int.Cl. | | F I |
|-------------|-------|-------------------------|
| A 6 1 P | 29/00 | (2006.01) A 6 1 P 29/00 |
| A 6 1 P | 27/02 | (2006.01) A 6 1 P 27/02 |
| A 6 1 P | 9/10 | (2006.01) A 6 1 P 9/10 |
| A 6 1 P | 25/28 | (2006.01) A 6 1 P 25/28 |
| A 6 1 P | 31/00 | (2006.01) A 6 1 P 31/00 |
| A 6 1 K | 38/02 | (2006.01) A 6 1 K 38/02 |

- (72)発明者 ビンツ ハンス カスパル
スイス国 6 3 0 0 ツーク リュッシーラインシュトラーセ 5 2
- (72)発明者 フィリップス ダグラス
スイス国 5 4 0 0 バーデン オイレンヴェーク 3 7
- (72)発明者 ドラド イグナシオ
スイス国 4 3 1 0 ラインフェルデン バスラーシュトラーセ 4 2
- (72)発明者 フォーラー パトリック
スイス国 6 3 0 0 ツーク ゲートヒルトシュトラーセ 2
- (72)発明者 メルツ フリー・デル ヴェー
ドイツ連邦共和国 7 9 5 8 5 シュタイネン アム フンメルベルク 1 0
- (72)発明者 ゾンダーエッガー イーヴォ
スイス国 8 9 0 2 ウルドルフ イム バウレンアッケル 9
- (72)発明者 シュタイナー ダニエル
スイス国 8 9 6 5 ベリコン ツインメライヴェーク 1 8
- (72)発明者 ガロッティ ゲオルギエヴァ マヤ
スイス国 8 9 0 7 ヴェットシュヴィル アム アルビス ニーダーヴェーク 3 6
- (72)発明者 アブラム サリバ ヨハン
スイス国 1 0 0 5 ローザンヌ シュマン デュ カルヴェール 1 9

審査官 星 功介

- (56)参考文献 国際公開第2 0 1 4 / 1 9 1 5 7 4 (WO , A 1)
国際公開第2 0 1 0 / 0 6 0 7 4 8 (WO , A 1)
国際公開第2 0 1 1 / 1 3 5 0 6 7 (WO , A 1)
国際公開第2 0 1 2 / 0 6 9 6 5 4 (WO , A 1)
特表2 0 1 4 - 5 0 1 7 2 5 (JP , A)

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)

C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0
C 0 7 K 1 4 / 0 0 - 1 4 / 8 2 5

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)
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)