

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5823870号  
(P5823870)

(45) 発行日 平成27年11月25日(2015.11.25)

(24) 登録日 平成27年10月16日(2015.10.16)

|                         |                     |
|-------------------------|---------------------|
| (51) Int.Cl.            | F I                 |
| C O 7 K 14/78 (2006.01) | C O 7 K 14/78 Z N A |
| C O 7 K 19/00 (2006.01) | C O 7 K 19/00       |
| C O 7 K 16/28 (2006.01) | C O 7 K 16/28       |
| C O 7 K 17/08 (2006.01) | C O 7 K 17/08       |
| C O 7 K 16/46 (2006.01) | C O 7 K 16/46       |

請求項の数 14 (全 156 頁) 最終頁に続く

|               |                               |           |                                     |
|---------------|-------------------------------|-----------|-------------------------------------|
| (21) 出願番号     | 特願2011-537719 (P2011-537719)  | (73) 特許権者 | 391015708                           |
| (86) (22) 出願日 | 平成21年11月24日(2009.11.24)       |           | ブリストル・マイヤーズ スクイブ カン                 |
| (65) 公表番号     | 特表2012-509900 (P2012-509900A) |           | パニー                                 |
| (43) 公表日      | 平成24年4月26日(2012.4.26)         |           | B R I S T O L - M Y E R S S Q U I B |
| (86) 国際出願番号   | PCT/US2009/065765             |           | B C O M P A N Y                     |
| (87) 国際公開番号   | W02010/060095                 |           | アメリカ合衆国08543ニュージャージー                |
| (87) 国際公開日    | 平成22年5月27日(2010.5.27)         |           | 州プリンストン、ルート206アンド・                  |
| 審査請求日         | 平成24年11月20日(2012.11.20)       |           | プロビンス・ライン・ロード                       |
| (31) 優先権主張番号  | 61/200,282                    | (74) 代理人  | 100081422                           |
| (32) 優先日      | 平成20年11月26日(2008.11.26)       |           | 弁理士 田中 光雄                           |
| (33) 優先権主張国   | 米国 (US)                       | (74) 代理人  | 100084146                           |
| (31) 優先権主張番号  | 61/178,279                    |           | 弁理士 山崎 宏                            |
| (32) 優先日      | 平成21年5月14日(2009.5.14)         | (74) 代理人  | 100122301                           |
| (33) 優先権主張国   | 米国 (US)                       |           | 弁理士 富田 憲史                           |

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 二重特異性EGFR／IGF1R結合分子

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

100 nM未満のKDでEGFRを結合する第10フィブロネクチンIII型ドメイン(10Fn3)に共有結合または非共有結合した、100 nM未満のKDでIGF1Rを結合する10Fn3を含む抗体様タンパク質二量体であって、ここに、

該IGF1R結合10Fn3は、アミノ酸配列SWSARLKVAR(配列番号45)を有するBCループ、アミノ酸配列PKNVYT(配列番号47)を有するDEループ、およびアミノ酸配列TRFRDYQP(配列番号49)を有するFGループを含み、

該EGFR結合10Fn3は、アミノ酸配列SWWAPVDRYQ(配列番号115)を有するBCループ、アミノ酸配列PRDVYT(配列番号116)を有するDEループ、およびアミノ酸配列TDYKPHADGPHITYHESP(配列番号117)を有するFGループを含む、抗体様タンパク質二量体。

【請求項2】

IGF1R結合10Fn3が、配列番号3のアミノ酸配列を含み、EGFR結合10Fn3が、配列番号112のアミノ酸配列を含む、請求項1記載の抗体様タンパク質二量体。

【請求項3】

IGF1R結合10Fn3が、ポリペプチドリンカーまたはポリエチレングリコール成分を介してEGFR結合10Fn3に共有結合している、請求項1または2記載の抗体様タンパク質二量体。

10

20

## 【請求項 4】

配列番号 1 2 6 ～ 1 3 2 のいずれか 1 つに対して同一のアミノ酸配列を含む、請求項 3 記載の抗体様タンパク質二量体。

## 【請求項 5】

1 0 0 n M 未満の K D で E G F R を結合する第 1 0 フィブロネクチン I I I 型ドメイン ( <sup>1 0</sup> F n 3 ) を含む抗体様タンパク質であって、該 E G F R 結合 <sup>1 0</sup> F n 3 が、アミノ酸配列 S W W A P V D R Y Q (配列番号 1 1 5) を有する B C ループ、アミノ酸配列 P R D V Y T (配列番号 1 1 6) を有する D E ループ、およびアミノ酸配列 T D Y K P H A D G P H T Y H E S P (配列番号 1 1 7) を有する F G ループを含む、抗体様タンパク質。

## 【請求項 6】

第 2 の第 1 0 フィブロネクチン I I I 型ドメイン ( <sup>1 0</sup> F n 3 ) をさらに含む、請求項 5 記載の抗体様タンパク質。

## 【請求項 7】

第 2 の <sup>1 0</sup> F n 3 が I G F - I R に結合する、請求項 6 記載の抗体様タンパク質。

## 【請求項 8】

第 2 の <sup>1 0</sup> F n 3 がポリペプチドリンカーまたはポリエチレングリコール成分を介して E G F R 結合 <sup>1 0</sup> F n 3 に共有結合している、請求項 6 または 7 記載の抗体様タンパク質。

## 【請求項 9】

請求項 1 から 8 のいずれか一項に記載の抗体様タンパク質二量体または抗体様タンパク質を含む、薬学的に許容できる組成物。

## 【請求項 1 0】

過剰増殖障害を治療するための医薬の製造における請求項 1 から 8 のいずれか一項に記載の抗体様タンパク質二量体または抗体様タンパク質の使用。

## 【請求項 1 1】

配列番号 9、1 0、7 8、7 9、8 0、8 1、9 6、9 7、2 1 7、E、E I、E I D、E S、E C、E G S、および E G C から選択されるアミノ酸配列を含む 1 ～ 2 0 アミノ酸の C 末端テールをさらに含む、請求項 1 から 8 のいずれか一項に記載の抗体様タンパク質二量体または抗体様タンパク質。

## 【請求項 1 2】

ポリオキシアルキレン成分、糖、F c、F c 断片、トランスフェリン、血清アルブミン、血清アルブミン結合タンパク質、および血清免疫グロブリン結合タンパク質からなる群から選択される 1 以上の薬物動態 ( P K ) 成分をさらに含む、請求項 1 から 8 のいずれか一項に記載の抗体様タンパク質二量体または抗体様タンパク質。

## 【請求項 1 3】

ポリオキシアルキレン成分がポリエチレングリコールである、請求項 1 2 記載の抗体様タンパク質二量体または抗体様タンパク質。

## 【請求項 1 4】

糖がシアル酸である、請求項 1 2 記載の抗体様タンパク質二量体または抗体様タンパク質。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0 0 0 1】

配列表

本願は、E F S - W e b を介して提出されており、これによってその全体が参照によって組み込まれる配列表を含有する。2 0 0 9 年 1 1 月 2 3 日に作成された上述の A S C I I コピーは、C O T H 5 2 W O . t x t という名であり、サイズが 5 5 2、5 2 9 バイトである。

## 【0 0 0 2】

関連出願の相互参照

10

20

30

40

50

本出願は、2008年11月24日に提出された米国仮特許出願第61/200,164号；2008年11月26日に提出された米国仮特許出願第61/200,282号；2009年4月17日に提出された米国仮特許出願第61/212,966号；2009年5月14日に提出された米国仮特許出願第61/178,279号；および2009年7月21日に提出された米国仮特許出願第61/227,330号の利益を主張し、これらの出願は、それらの全体が参照によってこれによって組み込まれる。

#### 【0003】

本発明は、診断的、研究的小および治療的応用における使用のためのEGFR結合ドメインならびにEGFR結合ドメインおよび別個のIGFIR結合ドメインを含む二重特異性分子に関する。本発明は、さらに、かかるタンパク質を含む細胞、かかるタンパク質またはその断片をコードするポリヌクレオチド、および該革新的なタンパク質をコードするポリヌクレオチドを含むベクターに関する。例示的なEGFR結合ドメインおよび二重特異性分子は、第10フィブロネクチンIII型ドメインを基礎とする抗体様タンパク質二量体を包含する。

#### 【背景技術】

#### 【0004】

##### 序論

受容体チロシンキナーゼシグナリングの活性化は、癌の進展の中心となる[たとえばGrimberg A. Cancer Biol Ther. 2003 2(6):630-5およびMendelsohn J. J Clin Oncol. 2003 21(14):2787-99を参照されたい]。受容体チロシンキナーゼは、細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン、および細胞内チロシンキナーゼドメインを含む保存されたドメイン構造を有する。細胞外ドメインは、ポリペプチド増殖因子または細胞膜結合分子などのリガンドに結合することができる。典型的には、リガンド結合または受容体チロシンキナーゼのリガンド結合誘導性二量体化により、受容体の細胞内触媒チロシンキナーゼドメインおよびそれに続くシグナル伝達が活性化される。

#### 【0005】

受容体チロシンキナーゼの例は、ERBB受容体(たとえばEGFR、ERBB2、ERBB3、ERBB4)、エリスロポエチン産生肝細胞(EPH)受容体、線維芽細胞増殖因子(FGF)受容体(たとえばFGFR1、FGFR2、FGFR3、FGFR4、FGFR5)、血小板由来増殖因子(PDGF)受容体(たとえばPDGFR-A、PDGFR-B)、血管内皮増殖因子(VEGF)受容体(たとえばVEGFR1/FLT1、VEGFR2/FLK1、VEGF3)、免疫グロブリン様ドメインおよびEGF様ドメインを有するチロシンキナーゼ(TIE)受容体、インスリン様増殖因子(IGF)受容体(たとえばINS-R、IGFIR、IR-R)、ジスコイジンドメイン(DD)受容体、c-Met(MET)の受容体、マクロファージ刺激1受容体としても知られているRON(recepteur d'origine nantais)、Flt3関連チロシンキナーゼ3(Flt3)、コロニー刺激因子1(CSF1)受容体、接着関連キナーゼ受容体(たとえばAx1)、c-kit(KIT)の受容体、およびインスリン受容体関連(IRR)受容体を含むが、これらに限定されない。

#### 【0006】

受容体チロシンキナーゼの阻害は、ある種のヒト悪性腫瘍のための有効な治療戦略として現われた(概説については、Roussidis AE, In Vivo. 2002 16(6):459-69を参照されたい)。

#### 【発明の概要】

#### 【発明が解決しようとする課題】

#### 【0007】

標的単独療法は、初めのうちは、癌を治療するのに有効であり得るが、おそらく他のシグナリングカスケードのアップレギュレーションの結果として、しばしば治療抵抗性が後続しうる(たとえばNahta R et al., Breast Cancer Res. 2006 8(6):215およびHorn L et al., Clin Lung Cancer. 2007 8:S68-73を参照されたい)。したがって、改善された癌

10

20

30

40

50

治療法を開発する必要性が存在する。

【課題を解決するための手段】

【0008】

一態様において、本出願は、新規な配列を有するEGFR結合第10フィブロネクチンIII型ドメイン ( $^{10}Fn3$ ) を提供する。コンセンサス配列を有するEGFR結合  $^{10}Fn3$  もまた、提供される。そのようなEGFR結合  $^{10}Fn3$  は、単量体であってもよいまたは融合タンパク質の一部として含まれてもよい。

【0009】

他の態様において、本出願は、本明細書において「E/I結合剤」と呼ばれる、EGFRおよびIGFIRを結合する二重特異性分子を提供する。本発明によって包含されるE/I結合剤は、二重特異性抗体、およびリガンド結合スキフォールドタンパク質（たとえば、テンダミスタット、アフィボディ (affibody)、フィブロネクチンIII型ドメイン、アンチカリン (anticalin)、テトラネクチン、およびアンキリン) の二量体を含む。単一のポリペプチド鎖として構築する場合、E/I結合剤は、任意の向きで、たとえばN末端からC末端にE-I配置またはI-E配置のいずれで構築してもよい。

【0010】

一態様において、IGFIR結合  $^{10}Fn3$  に共有結合または非共有結合したEGFR結合  $^{10}Fn3$  を含む抗体様タンパク質二量体が提供される。 $^{10}Fn3$  は、500nm未満の $K_D$ でそれらの標的 (EGFRまたはIGFIR) を結合する。個々の  $^{10}Fn3$  のそれぞれは、独立して、配列番号32に対して少なくとも70、80、85、90、95、98、または100%同一のアミノ酸配列を有し、nは1~20の整数であり、oは1~20の整数であり、pは1~40の整数である。いくつかの実施形態において、nは8~12の整数であり、oは4~8の整数であり、pは4~28の整数である。いくつかの実施形態において、nは10であり、oは6であり、pは12である。

【0011】

いくつかの実施形態において、抗体様タンパク質二量体は、ポリペプチドリンカーまたはポリエチレングリコール基を介してEGFR結合  $^{10}Fn3$  に共有結合したIGFIR結合  $^{10}Fn3$  を含む。いくつかの実施形態において、抗体様タンパク質二量体は、配列番号20~31、53~58、87~92、98~105、118~133、149~154、164~169、179~184、192~197、205~210、および211~216のいずれか1つに対して少なくとも80、90、95、または100%同一のアミノ酸配列を含む。

【0012】

いくつかの実施形態において、E/I結合剤は、配列番号20~31、53~58、87~92、98~105、118~133、149~154、164~169、179~184、192~197、205~210、および211~216のいずれか1つを有するアミノ酸配列を含み、ここに、(i) EGFR結合  $^{10}Fn3$  および/またはIGFIR結合  $^{10}Fn3$  は、配列番号1の対応するスキフォールドアミノ酸に比べて、約0~20、0~15、0~10、0~8、0~6、0~5、0~4、0~3、0~2、または0~1個の置換、保存的置換、欠失、または付加を有する  $^{10}Fn3$  スキフォールドを含み、および/または(ii) EGFR結合  $^{10}Fn3$  は、配列番号5~8、52、66~68、106~108、112~114、140~142、155~157、170~172、182、185~187、198~200、または219~327のいずれか1つの対応するループ配列に比べて、約0~15、0~10、0~8、0~6、0~5、0~4、0~3、0~2、または0~1個の置換、保存的置換、欠失、または付加を有し、および/またはIGFIR結合  $^{10}Fn3$  は、配列番号3の対応するループ配列に比べて、約0~15、0~10、0~8、0~6、0~5、0~4、0~3、0~2、または0~1個の置換、保存的置換、欠失、または追加を有する。

【0013】

10

20

30

40

50

一態様において、本明細書において記載される抗体様タンパク質二量体および薬学的に許容できるキャリアを含む薬学的に許容できる組成物が提供され、該組成物は本質的に発熱物質を含まない。

#### 【0014】

さらなる態様において、対象において、癌などの過剰増殖障害を治療するための方法であって、本明細書において記載される抗体様タンパク質二量体を含む薬学的に許容できる組成物の治療有効量をその必要性のある対象に投与することを含む方法が提供される。

#### 【0015】

他の態様において、本出願は、本明細書において記載される抗体様タンパク質二量体をコードする核酸を提供する。さらに、本明細書において記載される抗体様二量体をコードする核酸を含むベクターが提供される。適したベクターは、たとえば発現ベクターを含む。さらに、本明細書において記載される抗体様タンパク質二量体をコードする核酸を含む核酸、ベクター、または発現ベクターを含む宿主細胞が提供される。適した宿主細胞は、原核生物および真核生物の宿主細胞を含む。例示的な原核細胞は、大腸菌 (*E. coli*) などの細菌細胞である。例示的な真核細胞は、CHO細胞などの哺乳動物細胞である。さらに、本明細書において記載される抗体様タンパク質二量体を産生するための方法であって、該抗体様タンパク質二量体をコードする核酸を含む核酸、ベクター、または発現ベクターを含む宿主細胞を培養し、発現された抗体様タンパク質二量体を培養物から回収することを含む方法が提供される。

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0016】

【図1】I1-GS10-E2のSDS-PAGE分析。I1-GS10-E2が発現され、HisTrapクロマトグラフィーカラムによって精製されたHMS174 (DE3) 細菌細胞ペレットの溶解からの試料を4~12% NuPAGEミニゲル上に流し、Sypro-Orangeによって染色し、STORMイメージャーによって可視化した。Mark12分子量スタンダード (レーン1) ; 溶解物-可溶性 (レーン2) ; 溶解物-不溶性 (レーン3) ; HisTrapロード (レーン4) ; HisTrap非結合 (レーン5) ; プールHisTrap溶出物 (レーン6) ; 50mM NaOAc、150mM NaCl、pH4.5の中に透析 (レーン7) ; PBSの中に透析 (レーン8) ; Tris、150mM NaCl、pH8.5の中に透析 (レーン9)。

【図2】A. 中規模精製I1-GS10-E2のSECの分析。PBS、pH7.4の中に透析した、22μgのHisTrap精製I1-GS10-E2を、100mM NaPO<sub>4</sub>、100mM NaSO<sub>4</sub>、150mM NaCl、pH6.8の移動相と共にSuperdex 200 10/30 SECカラム (GE Healthcare) 上に装填し、A280を使用して測定した。I1-GS10-E2は、球状ゲル濾過標準物質 (BioRad) に対して約24.6kDaの分子量範囲で単一の単量体種として主に溶出された。B. E2-GS10-I1のSEC分析。

【図3】A. T<sub>m</sub>を決定するために、PBS中の中規模精製I1-GS10-E2の示差走査熱量測定 (DSC) を行った。1mg/mL溶液のI1-GS10-E2を、3atm圧力下で毎分1度の速度で5℃~95℃までスキャンした。データは、PBS緩衝液の対照の実行に対して分析した。B. E2-GS10-I1のDSC。

【図4】H292細胞におけるIGFR活性の阻害。細胞は、100ng/mLのIGF-1および100ng/mLのEGFを用いて刺激し、●I1、□E1、または△E1-GS10-I1のHTPP調製物を用いて処理した。チロシン1131上でのIGFIRのリン酸化は、ELISAによって決定した。

【図5】H292細胞におけるEGFR活性の阻害。細胞は、100ng/mLのIGF-1および100ng/mLのEGFを用いて刺激し、●I1、□E1、または△E1-GS10-I1のHTPP調製物を用いて処理した。チロシン1068上でのEGFRのリン酸化は、ELISAによって決定した。

【図6】H292細胞におけるAKTリン酸化の阻害。細胞は、100ng/mLのIG

10

20

30

40

50

F-1 および 100 ng/mL の EGF を用いて刺激し、● I 1、□ E 1、または △ E 1-GS10-I 1 の HTPP 調製物を用いて処理した。セリン 473 上での AKT のリン酸化は、ELISA によって決定した。

【図 7】RH41 細胞増殖の阻害。細胞は、● I 1、□ E 1、または △ E 1-GS10-I 1 の HTPP 調製物を用いて処理し、増殖の阻害パーセントを決定した。

【図 8】H292 細胞増殖の阻害。細胞は、● I 1、□ E 1、または △ E 1-GS10-I 1 の HTPP 調製物を用いて処理し、増殖の阻害パーセントを決定した。

【図 9】単離 EGF R モノネクチン (mononection)、PEG を追加していない、C 末端位置にセリンを有する E/I<sup>10</sup>Fn3 ベースの結合剤、および 40 kDa 分岐 PEG にコンジュゲートした、C 末端位置にシステインを有する E/I<sup>10</sup>Fn3 ベースの結合剤についての細胞ベースの機能的アッセイにおける IC50 値を要約する。代表的なデータを示す。

10

【図 10】N 末端および C 末端位置において E2 を有する PEG 化 E/I<sup>10</sup>Fn3 ベースの結合剤のイムノブロット分析。両方のコンストラクトが EGF R の阻害について H292 細胞アッセイにおいて同等の活性を示すにもかかわらず、C 末端位置に E2 を有する E/I<sup>10</sup>Fn3 ベースの結合剤は、EGF R を分解せず、N 末端位置に E2 を有する E/I<sup>10</sup>Fn3 ベースの結合剤は、分解した。両方のコンストラクトは、この細胞系において IGF R 分解が非常に弱いまたはそれを全く示さない。β-アクチンは、すべてのレーンにわたって使用量が等しいことを示すために含めた。EGF R、ERK、および Shc のリン酸化状態もまた、検査した。

20

【図 11】H292 細胞における EGF 刺激 EGF R リン酸化の阻害。両方のコンストラクトは、EGF R の阻害について H292 細胞アッセイにおいて同等の活性を示した。E2-GS10-I 1 (PEG を有する) (○)、I 1-GS10-E 2 (PEG を有する) (□)、パニツムマブ (-----)。

【図 12】腫瘍異種移植片研究の結果。図 12 A: H292 ヒト腫瘍異種移植片モデルにおける症状発現前抗腫瘍活性。8 匹のマウスの群から計算した平均腫瘍サイズを、対照動物 (■)、100 mg/kg で投与した E3-GS10-I 1 (w/PEG) (○)、100 mg/kg で投与した E2-GS10-I 1 (PEG を有する) (□)、1 mg/マウス (△) または 0.1 mg/マウス (▽) で投与したパニツムマブについて、mg で示す。X 軸上の文字 a は、E/I 結合剤の投与を示し、p は、パニツムマブの投与を示す。図 12 B: 平均体重変化を研究の経過にわたってそれぞれの群について示す。記号は図 12 A の説明文において記載されるとおりとする。

30

【図 13】H292 NSCLC 腫瘍異種移植片モデルにおける薬力学的効果。示される分析物のレベルは、実施例 12 において記載されるように腫瘍溶解物において決定した。

(A) ホスホ (phosph) EGF R、(B) ホスホ ErbB2、(C) ホスホ IGF R、および (D) 全 EGF R。チェック模様の棒 = パニツムマブ、空の棒 = E2-GS10-I 1 (PEG を有する)、斜線を引いた棒 = E3-GS10-I 1 (PEG を有する)。

【図 14】MCF7 親細胞と比較した MCF7r 細胞のウェスタンブロット分析。

【図 15】ヌードマウスにおける MCF7 (パネル A) および MCF7r (パネル B) ヒト腫瘍異種移植片研究。平均腫瘍サイズは、群当たり 8 匹のマウスから計算した両方の研究について示す。

40

【図 16】ヌードマウスにおける GEO ヒト腫瘍異種移植片研究。

【図 17】ヌードマウスにおける H292 ヒト腫瘍異種移植片研究。

【図 18】H292 NSCLC 細胞を用いるコロニー形成アッセイ。A. 代表的なデータを単一のプレートから示す。B. 1 つの E/I<sup>10</sup>Fn3 ベースの結合剤由来の IC50 は、トリプリケートの測定値から計算した誤差バーと共に示す。

【図 19】エピトープマッピングアッセイ。様々な EGF R 結合抗体についてのエピトープ結合の位置をパネル A 中に示す。抗体については、実施例 18、表 11 に記載する。表 11 の左の列は、パネル A において示される、番号を付けた抗体と関連する個々の抗 EGF

50

FR抗体についての番号を提供する。パネルBは、実施例18において記載される例示的なエピトープマッピングアッセイを示す。

【図20】PBS中1mg/mlのタンパク質濃度で15～95℃のスキャン範囲で測定し、55.2℃のT<sub>m</sub>測定値をもたらした、E/I<sup>10</sup>Fn3ベースの結合剤、ペグ化I1-GS10-E5のDSC分析。

【図21】ELISAによって測定されるH292細胞におけるAKTリン酸化の阻害についてのE/I<sup>10</sup>Fn3ベースの結合剤の評価。ペグ化I1-GS10-E5 (○) は、ペグ化I1のみ (■) またはペグ化E5のみ (▲) よりもIGF1刺激AKTリン酸化の遮断について強力であった。

【図22】H292細胞における細胞増殖の阻害についてのE/I<sup>10</sup>Fn3ベースの結合剤の評価。ペグ化I1-GS10-E5 (□) は、ペグ化I1のみ (▲) よりも強力であり、ペグ化E5のみ (●) では、H292細胞の増殖の阻害について弱い効果しか有していなかった。アッセイはトリプリケートで実行した。代表的なデータを示す。

【図23】RH41細胞における細胞増殖の阻害についてのE/I<sup>10</sup>Fn3ベースの結合剤の評価。ペグ化I1-GS10-E5 (□) は、ペグ化I1のみ (▲) よりもわずかに強力であり、ペグ化E5のみ (●) またはパニツムマブ (点線) は、RH41細胞の増殖の阻害についてほとんど効果を有していなかった。アッセイはトリプリケートで実行した。代表的なデータを示す。

【図24】<sup>10</sup>Fn3ベースの結合剤 (ペグ化) によるリガンド刺激シグナリングの阻害。DiFi (パネルA)、H292 (パネルB)、またはBxPC3 (パネルC) 細胞における受容体活性化および細胞シグナリングに対するE/I<sup>10</sup>Fn3ベースの結合剤 (ペグ化I1-GS10-E5) の効果。細胞は、血清を欠乏させ、EGF、IGF1、またはEGF+IGF1の組合せを用いる刺激の前に1μM<sup>10</sup>Fn3ベースの結合剤を用いて2時間処理した。GAPDHは、すべてのレーンにおいて使用量が等しいことを示すためにプローブした。

【図25】<sup>10</sup>Fn3ベースの結合剤 (非ペグ化) によるH292細胞におけるリガンド刺激シグナリングの阻害。H292細胞における受容体活性化および細胞シグナリングに対するE/I<sup>10</sup>Fn3ベースの結合剤 (E2-GS10-I1) の効果。細胞は、血清を欠乏させ、EGF、IGF1、またはEGF+IGF1の組合せを用いる刺激の前に1μM<sup>10</sup>Fn3ベースの結合剤を用いて2時間処理した。GAPDHは、すべてのレーンにおいて使用量が等しいことを示すためにプローブした。

【図26】E/I<sup>10</sup>Fn3ベースの結合剤を用いる競合結合研究。A. EGFR<sup>10</sup>Fn3ベースの結合剤は、EGFRへのEGFR抗体の結合について競合しない。EGFR<sup>10</sup>Fn3ベースの結合剤の最初の注入は、チップの表面上のEGFRへの結合を示す。等量のセツキシマブ、パニツムマブ、またはニモツズマブと混合したEGFR<sup>10</sup>Fn3ベースの結合剤の第2の注入は、EGFR<sup>10</sup>Fn3ベースの結合剤によるEGFRへの抗体の結合についての競合を示さない。B. E/I<sup>10</sup>Fn3ベースの結合剤は、EGFRおよびIGF-IRを同時に結合することができる。E/I<sup>10</sup>Fn3ベースの結合剤の最初の注入は、チップ表面上に固定されたEGFRへの結合を示す。E/I<sup>10</sup>Fn3ベースの結合剤可溶性IGF-IRの第2の注入は、固定されたE/I<sup>10</sup>Fn3ベースの結合剤の他端へのsIGF-IRの結合を示す。

【図27】異種移植片研究の最後の投与の4時間後のTGFα血漿レベル。表24中に記載されるBxPC3 (パネルA)、GEO (パネルB)、およびH441 (パネルC) 異種移植片研究由来の処理の終了時に採取した血漿試料は、TGFαの循環レベルについて分析した。

【図28】ペグ化I1-GS10-E5の投薬後の腫瘍を有していないヌードマウスにおけるTGFαおよびIGF1の血漿レベル。腫瘍を有していないマウスに、ペグ化I1-GS10-E5<sup>10</sup>Fn3ベースの結合剤の単一用量を与え、TGFα (パネルA) およびIGF1 (パネルB) の循環レベルについて分析した。

【図29】パニツムマブと比較した、E/I<sup>10</sup>Fn3ベースの結合剤を使用するH2

10

20

30

40

50

9 2 異種移植片研究。H 2 9 2 異種移植片は、未処理 (■) もしくは図中に記載される個々のコンストラクトと共に、P B S 中で処方した  $^{10}\text{F n 3}$  ベースの結合剤を 1 週当たり 3 回投薬した、または  $1\text{ mg} / \text{マウス}$  (○) もしくは  $0.1\text{ mg} / \text{マウス}$  (□) でパニツムマブを 3 日ごとに i. p. 投薬した。 $^{10}\text{F n 3}$  ベースの結合剤およびパニツムマブ (▲) の実際の投与を、 $^{10}\text{F n 3}$  ベースの結合剤の投与を示す三角より下の X 軸に最も近いパニツムマブの投与と共に X 軸上に示す。図 2 9 A は、4 3 日目までの測定値を示す。図 2 9 B は、2 7 日目までの測定値を示す。

【図 3 0】マウスにおけるペグ化 E 2 - G S 1 0 - I 1 の薬物動態パラメータープロファイル。

【図 3 1】様々な E / I  $^{10}\text{F n 3}$  ベースの結合剤における、 $100\text{ mg} / \text{kg}$  および  $10\text{ mg} / \text{kg}$  I P ならびに  $10\text{ mg} / \text{kg}$  および  $64\text{ mg} / \text{kg}$  S C での半減期の比較。

【図 3 2】R H 4 1 モデルにおけるペグ化 E 2 - G S 1 0 - I 1 の抗腫瘍効能。

【図 3 3】腫瘍における薬力学的エンドポイントの測定。処理の終了時に、腫瘍は、最終投与の 4 時間後に D i F i 異種移植片モデル (パネル A) および H 2 9 2 異種移植片モデル (パネル B) から摘出し、ホスホ E G F R、ホスホ I G F R、全 E G F R、および全 I G F R のレベルについて検査した。等量の総タンパク質量溶解物を、ゲルのそれぞれのレーンの中に装填し、プロットもまた、すべてのレーンにわたって使用量が等しいことを示すために、G A P D H を用いてプローブした。

【図 3 4】抗 E G F R 結合剤 6 7 9 F 0 9 の配列 (配列番号 4 9 0)。変えたループ残基に下線を引く。

【図 3 5】B C ループ配列分析 I。E G F R 結合配列由来の B C ループにおけるそれぞれの位置のアミノ酸の頻度。W e b L o g o を使用して生成された画像 (Crooks GE, Hon G, Chandonia JM, Brenner SE. WebLogo: A sequence logo generator. Genome Research, 14:1188-1190, 2004)。

【図 3 6】D E ループ配列分析 I。E G F R 結合配列由来の D E ループにおけるそれぞれの位置のアミノ酸の頻度 (2 6 3 の特有の D E ループ配列を分析した)。

【図 3 7】F G ループ (1 0 アミノ酸長) 配列分析 I。1 0 アミノ酸長 F G ループを有する E G F R 結合配列由来の F G ループにおけるそれぞれの位置のアミノ酸の頻度 (2 2 8 の特有の 1 0 アミノ酸長 F G ループを分析した)。

【図 3 8】F G ループ (1 5 アミノ酸長) 配列分析 I。1 5 アミノ酸長 F G ループを有する E G F R 結合配列由来の F G ループにおけるそれぞれの位置のアミノ酸の頻度 (3 4 9 の特有の 1 5 アミノ酸長 F G ループを分析した)。

【図 3 9】B C ループ配列分析 I I。すべての「強力な」配列由来の B C ループにおけるそれぞれの位置のアミノ酸の頻度 (8 5 の特有の B C ループ配列を分析した)。

【図 4 0】D E ループ配列分析 I I。すべての「強力な」配列由来の D E ループにおけるそれぞれの位置のアミノ酸の頻度 (6 0 の特有の D E ループ配列を分析した)。

【図 4 1】F G ループ (1 0 アミノ酸長) 配列分析 I I。1 0 アミノ酸長 F G ループを有するすべての「強力な」配列由来の F G ループにおけるそれぞれの位置のアミノ酸の頻度 (6 の特有の 1 0 アミノ酸長 F G ループを分析した)。

【図 4 2】F G ループ (1 5 アミノ酸長) 配列分析 I I。1 5 アミノ酸長 F G ループを有するすべての「強力な」配列由来の F G ループにおけるそれぞれの位置のアミノ酸の頻度 (6 5 の特有の 1 5 アミノ酸長 F G ループを分析した)。

【図 4 3】実施例 2 2 において記載される E / I  $^{10}\text{F n 3}$  ベースの結合剤の様々な特徴を概説する表。

【図 4 4】実施例 3 0 において記載される E / I  $^{10}\text{F n 3}$  ベースの結合剤の様々な薬物動態パラメーターを概説する表。

【図 4 5】実施例 3 2 において記載される E 単量体のアミノ酸配列。それぞれの配列における B C、D E、および F G ループに下線を引く。

【図 4 6】I 1 コア (配列番号 6 5)、E 1 コア (配列番号 6 6)、E 2 コア (配列番号

10

20

30

40

50

67)、E3コア(配列番号68)、E4コア(配列番号108)、E5コア(配列番号114)、E85コア(配列番号141)、E90コア(配列番号156)、E96コア(配列番号171)、E105コア(配列番号186)およびE112コア(配列番号199)との野生型コア配列(配列番号1のアミノ酸9~94)のアライメント。野生型配列におけるBC、DE、およびFGループを太字で示し、下線を引く。IおよびEのコアについて野生型と比較して実際に変化させたアミノ酸残基を太字で示し、下線を引く。

【図47】EおよびI単体の核酸配列。別段の定めがない限り、ヌクレオチド配列は、N+10 N末端伸長、Serテール、およびhisタグを有する単体をコードする。

【図48】E/I<sup>10</sup>Fn3ベースの結合剤の核酸配列。すべてのヌクレオチド配列は、コンストラクトにおける第1の単体上にN+10 N末端伸長ならびにコンストラクトにおける第2の単体上にCysテールおよびhisタグを有するE/I<sup>10</sup>Fn3ベースの結合剤をコードする。GS10は、配列番号11であり、GSGCGS8は、配列番号218であり、GSGCは、配列番号489である。

【発明を実施するための形態】

【0017】

定義

本明細書において使用されるように、以下の用語および語句は、下記に説明される意味を有するものとする。他に定義されない限り、本明細書において使用されるすべての技術用語および科学用語は、当業者に共通して理解されるものと同じ意味を有する。

【0018】

単数形「1つの(a)」、「1つの(an)」、および「その(the)」は、文脈が他に明確に指示しない限り、複数の指示内容を含む。

【0019】

用語「～を含む(comprise)」および「～を含む(comprising)」は、すべてを含む、オープンな意味で使用され、追加の要素が含まれてもよいことを意味する。

【0020】

用語「～を含む(including)」は、「～を含むが、これらに限定されない」を意味するために使用される。「～を含む」および「～を含むが、これらに限定されない」は、区別なく使用される。

【0021】

用語「抗体様タンパク質」は、「免疫グロブリン様フォールド」を有する非免疫グロブリンタンパク質を指す、つまり、構造上、一組のベータストランドまたはベータ様ストランドに組織化され、ベータシートを形成する約80~150のアミノ酸残基を含み、ベータストランドまたはベータ様ストランドは、介在するループ部分によって結合される。ベータシートは、ベータストランドまたはベータ様ストランドを結合するループから構成される2つの「面」を生成しながら、抗体様タンパク質の安定したコアを形成する。本明細書において記載されるように、これらのループは、特化したリガンド結合部位を生成するために変えることができ、そのような変異は、タンパク質の全体的な安定性を破壊することなく起こすことができる。そのような抗体様タンパク質の例は、「フィブロネクチンベースのスキヤフォールドタンパク質」であり、これによって、フィブロネクチンIII型ドメイン(Fn3)をベースとするポリペプチドが意味される。一態様において、抗体様タンパク質は、第10フィブロネクチンIII型ドメイン(<sup>10</sup>Fn3)をベースとする。

【0022】

「ポリペプチド」によって、長さ、翻訳後修飾、または機能にかかわらず、2つ以上のアミノ酸の任意の配列を意味する。「ポリペプチド」、「ペプチド」、および「タンパク質」は、本明細書において区別なく使用される。

【0023】

本明細書における「アミノ酸配列同一性パーセント(%)」は、配列同一性の一部とし

10

20

30

40

50

てのいかなる保存的置換をも考慮せず、配列をアライメントし、必要であれば、最大の配列同一性パーセントを達成するためにギャップを導入した後に、選択された配列中のアミノ酸残基と同一である、候補配列中のアミノ酸残基の百分率として定義される。アミノ酸配列同一性パーセントを決定する目的のためのアライメントは、当技術分野における技術の範囲内にある様々な方法で、たとえば、BLAST、BLAST-2、ALIGN、ALIGN-2、またはMegalign (DNASTAR) ソフトウェアなどの公的に入手可能なコンピューターソフトウェアを使用して達成することができる。当業者らは、比較されている完全長の配列に関する最大のアライメントを達成するために必要とされる任意のアルゴリズムを含む、アライメントを評価するための適切なパラメーターを決定することができる。しかしながら、本明細書における目的のために、アミノ酸配列同一性%の値は、配列比較コンピュータープログラムALIGN-2を使用することによって、下記に記載されるように得られる。ALIGN-2配列比較コンピュータープログラムは、Genentech, Inc. によって著作され、ユーザードキュメンテーションと共に、米国著作権局、Washington D. C.、20559に提出されており、ここで、それは、米国著作権登録番号TXU510087の下で登録されており、Genentech, Inc.、South San Francisco, Calif. によって公的に入手可能である。ALIGN-2プログラムは、UNIXオペレーティングシステム、好ましくはデジタルUNIX V4.0D上での使用のためにコンパイルするべきである。すべての配列比較パラメーターは、ALIGN-2プログラムによって設定されており、変わらない。

10

20

#### 【0024】

本明細書における目的のために、所与のアミノ酸配列Bに対する所与のアミノ酸配列Aのアミノ酸配列同一性%は（別法では、所与のアミノ酸配列Bに対する一定のアミノ酸配列同一性%を有するまたは含む所与のアミノ酸配列Aと表現することができる）、以下のように計算される： $100 \times \text{分数} X / Y$ 、Xは、そのプログラムのAおよびBのアライメントにおいて配列アライメントプログラムALIGN-2によって同一のマッチとしてスコア化されたアミノ酸残基の数であり、Yは、B中のアミノ酸残基の総数である。アミノ酸配列Aの長さがアミノ酸配列Bの長さとは等しくない場合、Bに対するAのアミノ酸配列同一性%は、Aに対するBのアミノ酸配列同一性%とは等しくないであろうということが十分に理解されるであろう。

30

#### 【0025】

用語「治療有効量」は、哺乳動物における疾患または障害を治療するのに有効な薬剤の量を指す。癌の場合には、薬剤の治療有効量は、癌細胞の数を低下させてもよい；腫瘍サイズを低下させてもよい；周辺の器官への癌細胞浸潤を阻害してもよい（つまり、ある程度まで遅らせ、好ましくは停止させてもよい）；腫瘍転移を阻害してもよい（つまり、ある程度まで遅らせ、好ましくは停止させてもよい）；腫瘍増殖をある程度まで阻害してもよい；および／または障害と関連する1つもしくは複数の症状ある程度まで軽減してもよい。薬剤が既存の癌細胞の増殖を予防してもよいおよび／またはそれらを死滅させてもよい程度まで、それは、細胞増殖抑制性および／または細胞毒性であってもよい。癌療法については、インビボ (in vivo) における効能は、たとえば、疾患進行までの時間 (TTP) を評価することおよび／または奏効率 (RR) を決定することによって測定することができる。

40

#### 【0026】

アミノ酸配列または化合物の半減期は、たとえば、自然のメカニズムによる配列もしくは化合物の分解および／または配列もしくは化合物のクリアランスもしくは隔離 (sequestration) により、ポリペプチドの血清濃度がインビボにおいて50%低下するのにかかる時間として一般に定義することができる。半減期は、薬物動態分析によってなどのように、当技術分野において知られている任意の方法において決定することができる。たとえばM Gibaldi & D Perron "Pharmacokinetics", published by Marcel Dekker, 2nd Rev. edition (1982)を参照されたい。

50

## 【0027】

用語「E/I 結合剤」は、EGFR 結合ドメインおよび別個のIGFIRR 結合ドメインを含む二重特異性分子を指す。2つのドメインは、共有結合または非共有結合されていてもよい。例示的なE/I 結合剤は、EGFR 結合<sup>10</sup>Fn3およびIGFIRR 結合<sup>10</sup>Fn3を含む抗体様二量体、つまりE/I<sup>10</sup>Fn3ベースの結合剤である。

## 【0028】

## 概要

上皮増殖因子受容体(EGFR)およびインスリン様増殖因子受容体(IGFR)は、いくつかのタイプのヒト癌の腫瘍形成において重要な役割を果たす。どちらかの受容体の阻害は、症状発現前のモデルにおいて、および臨床的に、腫瘍増殖を有効に低下させる。EGFR経路が遮断されると、インビトロ(in vitro)腫瘍モデルでの増殖を駆動するためにIGFR経路への転換が誘発される。そのため、両方の受容体の遮断は、経路転換を抑えることによって、どちらかの経路のみを遮断することによって優れた効能を同時に達成するかもしれない。例示的な実施形態において、E/I 結合剤の活性は、E/I 結合剤の単量体の構成成分と比較して相乗的である。

10

## 【0029】

本明細書は、とりわけ、本明細書において「E/I 結合剤」と呼ばれる、EGFRおよびIGFIRRに結合する二重特異性分子を記載する。出願人は、そのような二重特異性分子が、対応する単一特異的結合剤よりも大きな効力で癌モデル細胞系の増殖を阻害することを見出した(たとえば、実施例9および図8を参照されたい)。

20

## 【0030】

E/I 結合剤は、多数の治療上の適用において、特に癌の治療において有用となるであろう。治療上の適用に加えて、E/I 結合剤は、EGFRおよび/またはIGFIRRを検出することが望ましい任意の状況において使用され得る。

## 【0031】

E/I 結合剤は、EGFR 結合ドメインおよび別個のIGFIRR 結合ドメインを有する。典型的な結合ドメインは、抗体を含み、そのため、二重特異性抗体は、E/I 結合剤として機能するように生成され得る。相補的な対のV<sub>H</sub>領域およびV<sub>L</sub>領域を含む二重特異性抗体は、当技術分野において知られている。これらの二重特異性抗体は、2対のV<sub>H</sub>およびV<sub>L</sub>を含み、それぞれのV<sub>H</sub>/V<sub>L</sub>対は、単一の抗原に結合する(たとえばHu et al., Cancer Res. 1996 56:3055-306; Neri et al., J. Mol. Biol. 1995 246:367-373; Atwell et al., Mol. Immunol. 1996 33:1301-1312; およびCarter et al., Protein Sci. 1997 6:781-788を参照されたい)。例示的な二重特異性抗体は、二重特異性抗体(dibody)、つまり、2つの抗原結合部位を有する小さな抗体断片であり、この断片は、同じポリペプチド鎖中の軽鎖可変ドメインに結合した重鎖可変ドメインを含む(Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1993 90: 6444-6448)。

30

## 【0032】

E/I 結合剤はまた、リガンド結合スキヤフォールドタンパク質の二量体を包含する。スキヤフォールドタンパク質は、文献においてよく記載されており、たとえば、テンダミスタット、アフィボディ(affibody)、フィブロネクチン(fibronectin) III型ドメイン、アンチカリン、テトラネクチン、およびアンキリンを含む。E/I 結合剤を生成するために使用され得る追加のスキヤフォールドタンパク質は、Binz et al., Nature Biotech 23:1257-1268 (2005)において概説されている。スキヤフォールドタンパク質は、三次元構造を決定し、安定化するのに重要な、強固なコア構造または「フレームワーク」を基礎とする。スキヤフォールドの固定残基または保存残基の間に、リガンド結合を改変するために無作為化することができるループ、表面、またはキャビティーなどの可変領域が位置する。標的分子への特異的な結合を提供するために、多くの様々なアミノ酸が、固定スキヤフォールド残基の間の可変領域中に提供される。

40

## 【0033】

例示的なリガンド結合スキヤフォールドタンパク質は、フィブロネクチン III型ドメ

50

イン (Fn3) をベースとする。フィブロネクチンは、細胞外マトリックスの形成および細胞間相互作用において本質的な役割を果たす、大きなタンパク質であり、それは、小さなドメインの3つの型 (I型、II型、およびIII型) の多数のリピートから成る。

#### 【0034】

Fn3は、小さく、単量体で、可溶性で、かつ安定している。それは、ジスルフィド結合を欠き、そのため、還元条件下で安定である。Fn3の全体的な構造は、免疫グロブリンフォールドに類似している。Fn3ドメインは、N末端からC末端の順に、ベータまたはベータ様ストランド、A；ループ、AB；ベータまたはベータ様ストランド、B；ループ、BC；ベータまたはベータ様ストランド、C；ループ、CD；ベータまたはベータ様ストランド、D；ループ、DE；ベータまたはベータ様ストランド、E；ループ、EF；ベータまたはベータ様ストランド、F；ループ、FG；およびベータまたはベータ様ストランド、Gを含む。該7つの逆平行β-ストランドは、ベータまたはベータ様ストランドを結合するループから構成される2つの「面」を生成しながら、安定したコアを形成する2つのベータシートとして配置される。ループAB、CD、およびEFは一方の面に位置し、ループBC、DE、およびFGは反対の面に位置する。ループAB、BC、CD、DE、EF、およびFGのいずれかまたはすべてが、リガンド結合に関与してもよい。Fn3には少なくとも15の異なるモジュールがあり、分子の間の配列相同性は低い、それらはすべて、三次構造において高い類似性を共有する。

#### 【0035】

アドネクチン (Adnectins<sup>TM</sup> (登録商標)) (Adnexus、Bristol-Myers Squibb R&D Company) は、第10フィブロネクチンIII型ドメイン、つまり、Fn3の第10モジュール (<sup>10</sup>Fn3) をベースとするリガンド結合スキフォールドタンパク質である。天然に存在するヒト<sup>10</sup>Fn3のアミノ酸配列は、配列番号1において記載される。

#### 【化1】

VSDVPRDLEVVAATPTSLLSWDAPAVTVRYYRITYG  
ETGGNSPVQEF TVPGSKST ATISGLKPGVDYTITVY  
AVTGRGDSPASSKPI SIN YRT (配列番号1) (BC、FG、およびDEループを強調する)

配列番号1において、ABループは残基15～16に相当し、BCループは残基21～30に相当し、CDループは残基39～45に相当し、DEループは残基51～56に相当し、EFループは残基60～66に相当し、FGループは残基76～87に相当する。(Xu et al., Chemistry & Biology 2002 9:933-942)。BC、DE、およびFGループは分子の一方の面に沿って整列し、AB、CD、およびEFループは分子の反対の面に沿って整列する。配列番号1において、ベータストランドAは残基9～14に相当し、ベータストランドBは残基17～20に相当し、ベータストランドCは残基31～38に相当し、ベータストランドDは残基46～50に相当し、ベータストランドEは残基57～59に相当し、ベータストランドFは残基67～75に相当し、ベータストランドGは残基88～94に相当する。ストランドは、対応するループを通して互いに結合しており、たとえば、ストランドAおよびBは、ストランドA、ループAB、ストランドBという構成でループABを介して結合している、などである。疎水性コアの形成に関与する残基(「コアアミノ酸残基」)は、配列番号1の以下のアミノ酸:L8、V10、A13、L18、I20、W22、Y32、I34、Y36、F48、V50、A57、I59、L62、Y68、I70、V72、A74、I88、I90、およびY92に対応するアミノ酸を含み、ここに、コアアミノ酸残基は、1文字アミノ酸コード、次いで、配列番号1内でのそれらの位置によって表わされる。たとえば、Dickinson et al., J. Mol. Biol. 236: 1079-1092 (1994)を参照されたい。

#### 【0036】

上記に記載されるように、配列番号1の残基21～30、51～56、および76～87に対応するアミノ酸残基は、BC、DE、およびFGループをそれぞれ定める。しかしながら、IGF-IRまたはEGFRなどの所望の標的に対する強い親和性を有する<sup>10</sup>F<sub>n</sub>3結合剤を達成するために、ループ領域内のすべての残基を修飾する必要があるとは限らないことを理解されたい。たとえば、本明細書において記載される多くの実施例において、配列番号1のアミノ酸23～30、52～55、および77～86に対応する残基だけが、高親和性<sup>10</sup>F<sub>n</sub>3結合剤を産生するために修飾された（図46を参照されたい）。したがって、ある実施形態において、BCループは、配列番号1の残基23～30に対応するアミノ酸によって定められてもよく、DEループは、配列番号1の残基52～55に対応するアミノ酸によって定められてもよく、FGループは、配列番号1の残基77～86に対応するアミノ酸によって定められてもよい。

10

#### 【0037】

<sup>10</sup>F<sub>n</sub>3は、抗体、特に抗体の可変領域と、構造的かつ機能的に類似している。<sup>10</sup>F<sub>n</sub>3ドメインは、「抗体模倣物」または「抗体様タンパク質」として記載されていてもよいが、それらには、従来の抗体を越える多くの利点がある。特に、それらは、抗体と比較して、より良好なフォールディングおよび熱安定性の特性を示し、それらは、ある種の条件下でふさわしいフォールディングを妨害または予防することが知られているジスルフィド結合を欠く。例示的なE/I<sup>10</sup>F<sub>n</sub>3ベースの結合剤は、T<sub>m</sub>の平均～50℃で主に単量体である。

#### 【0038】

20

<sup>10</sup>F<sub>n</sub>3のBC、DE、およびFGループは、免疫グロブリン由来の相補性決定領域(CDR)と類似している。これらのループ領域中のアミノ酸配列の改変は、<sup>10</sup>F<sub>n</sub>3の結合特異性を変化させる。CDR様ループ以外のタンパク質配列は、免疫グロブリン由来のフレームワーク領域に類似しており、<sup>10</sup>F<sub>n</sub>3の構造のコンフォメーションにおいて役割を果たす。<sup>10</sup>F<sub>n</sub>3のフレームワーク様領域中の改変は、構造のコンフォメーションがリガンド結合を破壊するほど改変されない程度まで許容可能である。<sup>10</sup>F<sub>n</sub>3リガンド特異的結合剤を生成するための方法は、高親和性TNFα結合剤を開示するPCT公開WO00/034787、WO01/64942、およびWO02/032925、高親和性VEGFR2結合剤を開示するPCT公開WO2008/097497、ならびに高親和性IGFIR結合剤を開示するPCT公開WO2008/066752において記載されている。<sup>10</sup>F<sub>n</sub>3結合剤および結合剤を選択するための方法について議論する追加の参考文献は、PCT公開WO98/056915、WO02/081497、およびWO2008/031098ならびに米国特許出願公開第2003186385号を含む。

30

#### 【0039】

<sup>10</sup>F<sub>n</sub>3スキファールドをベースとする抗体様タンパク質は、配列：  
VSDVPRDLEVVAAATPTSLLI(X)<sub>n</sub>YYRITYGETGGNSPVQ  
EFTV(X)<sub>o</sub>ATISGLKPGVDYTI TVYAV(X)<sub>p</sub>ISINYRT（配列番号32）によって一般に定めることができ、ここに、nは1～20の整数であり、oは1～20の整数であり、pは1～40の整数である。BC、DE、およびFGループは、それぞれ、(X)<sub>n</sub>、(X)<sub>o</sub>、および(X)<sub>p</sub>によって表わされる。

40

#### 【0040】

<sup>10</sup>F<sub>n</sub>3、一般に、配列番号1の番号1に対応するアミノ酸残基から始まる。しかしながら、アミノ酸欠失を有するドメインもまた、本発明によって包含される。いくつかの実施形態において、配列番号1の最初の8つのアミノ酸に対応するアミノ酸残基は、欠失している。また、付加配列をN末端またはC末端に付加してもよい。たとえば、付加的なMG配列は、<sup>10</sup>F<sub>n</sub>3のN末端に配置され得る。通常、Mは切断され、N末端にGが残るであろう。いくつかの実施形態において、配列、たとえばEIDKPSQ（配列番号9）、EIDKPCQ（配列番号10）、EGSGS（配列番号96）、またはEGSGC（配列番号97）は、<sup>10</sup>F<sub>n</sub>3ドメインのC末端に配置され得る。

50

## 【0041】

$^{10}\text{Fn}3$ 、つまり「 $^{10}\text{Fn}3$  スキャフォールド」の非リガンド結合配列は、 $^{10}\text{Fn}3$  がリガンド結合機能および／または構造安定性を保持するという条件で、改変され得る。いくつかの実施形態において、Asp7、Glu9、およびAsp23のうちの1つまたは複数は、たとえば、非負荷電アミノ酸残基（たとえばAsn、Lysなど）などの他のアミノ酸と交換される。これらの変異は、野生型形態と比較して、中性pHにて、変異体 $^{10}\text{Fn}3$ のより大きな安定性を促進する効果を有することが報告された（PCT公開WO02/04523を参照されたい）。有益なまたは中間的な $^{10}\text{Fn}3$  スキャフォールドにおける様々な追加の改変が開示されている。たとえばBatori et al., Protein Eng. 2002 15(12):1015-20; Koide et al., Biochemistry 2001 40(34):10326-33を参照されたい。

10

## 【0042】

$^{10}\text{Fn}3$  スキャフォールドは、1つまたは複数の保存的置換によって修飾され得る。 $^{10}\text{Fn}3$  スキャフォールド中の5%、10%、20%、またはさらに30%以上ものアミノ酸が、リガンドに対する $^{10}\text{Fn}3$ の親和性を実質的に改変することなく、保存的置換によって改変され得る。たとえば、スキャフォールド修飾は、好ましくは、リガンドに対する $^{10}\text{Fn}3$ 結合剤の結合親和性を100分の1、50分の1、25分の1、10分の1、5分の1、または2分の1未満まで低下させる。かかる変化は、インビボにおいて $^{10}\text{Fn}3$ の免疫原性を改変する場合があります、免疫原性が減少する場合には、かかる変化は望ましいであろう。本明細書において使用される場合、「保存的置換基」は、対応する参照残基に物理的または機能的に類似している残基である。すなわち、保存的置換基およびその参照残基は、同様のサイズ、形状、電荷、共有結合もしくは水素結合を形成する能力を含む化学的特性などを有する。好ましい保存的置換は、Dayhoff et al., Atlas of Protein Sequence and Structure 5:345-352 (1978 & Supp.)において承認された点突然変異について定義された基準を満たすものである。保存的置換の例は、以下のグループ内での置換である：(a) バリン、グリシン；(b) グリシン、アラニン；(c) バリン、イソロイシン、ロイシン；(d) アスパラギン酸、グルタミン酸；(e) アスパラギン、グルタミン；(f) セリン、トレオニン；(g) リジン、アルギニン、メチオニン；および(h) フェニルアラニン、チロシン。

20

## 【0043】

## E 結合剤

一態様において、本開示は、EGFR結合 $^{10}\text{Fn}3$ ドメインを含む抗体様タンパク質を提供する。ある実施形態において、EGFR結合 $^{10}\text{Fn}3$ は、融合タンパク質または多量体の一部として提供され得る。たとえば、EGFR結合 $^{10}\text{Fn}3$ は、少なくとも1つの第2の $^{10}\text{Fn}3$ 結合ドメインに共有結合または非共有結合され得る。第2の $^{10}\text{Fn}3$ 結合ドメインは、EGFRまたは異なる標的に結合してもよい。例示的な実施形態において、EGFR結合 $^{10}\text{Fn}3$ は、IGF-IR結合 $^{10}\text{Fn}3$ に共有結合または非共有結合され得る。

30

## 【0044】

例示的な実施形態において、本明細書において記載されるEGFR結合 $^{10}\text{Fn}3$ タンパク質は、500 nM、100 nM、50 nM、10 nM、1 nM、500 pM、100 pM、100 pM、50 pM、または10 pM未満の $K_D$ でEGFRに結合する。

40

## 【0045】

例示的な実施形態において、EGFR結合 $^{10}\text{Fn}3$ タンパク質のBCループは、配列番号1のアミノ酸23～30に相当し、EGFR結合 $^{10}\text{Fn}3$ タンパク質のDEループは、配列番号1のアミノ酸52～55に相当し、EGFR結合 $^{10}\text{Fn}3$ タンパク質のFGループは、配列番号1のアミノ酸77～86に相当する。

## 【0046】

一実施形態において、本発明は、配列番号1のアミノ酸29および30に対応する位置にYQを有するBCループを含むEGFR結合 $^{10}\text{Fn}3$ を提供する。

50

## 【0047】

他の実施形態において、本発明は、配列番号1のアミノ酸29および30に対応する位置にYQを有するBCループならびに15アミノ酸長であるFGループ、たとえば、配列番号1のアミノ酸77～86に対応する残基の間の5アミノ酸の挿入により長さが5アミノ酸伸長したFGループを含むEGFR結合<sup>10</sup>Fn3を提供する。

## 【0048】

他の実施形態において、本発明は、配列番号1のアミノ酸29および30に対応する位置にYQを有するBCループならびに配列番号1のアミノ酸54に対応する位置にV、I、L、M、またはA残基を有するDEループを含むEGFR結合<sup>10</sup>Fn3を提供する。

## 【0049】

他の実施形態において、本発明は、配列番号1のアミノ酸29および30に対応する位置にYQを有するBCループ、配列番号1のアミノ酸54に対応する位置にV、I、L、M、またはA残基を有するDEループ、ならびに15アミノ酸長であるFGループ、たとえば、配列番号1のアミノ酸77～86に対応する残基の間の5アミノ酸の挿入により長さが5アミノ酸、伸長したFGループを含むEGFR結合<sup>10</sup>Fn3を提供する。

## 【0050】

他の実施形態において、本発明は、配列番号1のアミノ酸29および30に対応する位置にYQを有するBCループならびに配列番号1のアミノ酸77に対応する位置にDまたはNを含むFGループを含むEGFR結合<sup>10</sup>Fn3を提供する。

## 【0051】

他の実施形態において、本発明は、配列番号1のアミノ酸29および30に対応する位置にYQを有するBCループ、ならびに(i)15アミノ酸長であり(たとえば、配列番号1のアミノ酸77～86に対応する残基の間の5アミノ酸の挿入により長さが5アミノ酸伸長したFGループ)、かつ(ii)配列番号1のアミノ酸77に対応する位置にDまたはNを含むFGループを含むEGFR結合<sup>10</sup>Fn3を提供する。

## 【0052】

他の実施形態において、本発明は、配列番号1のアミノ酸54に対応する位置にV、I、L、M、またはA残基を含むDEループおよび配列番号1のアミノ酸77に対応する位置にDまたはNを含むFGループを含むEGFR結合<sup>10</sup>Fn3を提供する。

## 【0053】

他の実施形態において、本発明は、配列番号1のアミノ酸54に対応する位置にV、I、L、M、またはA残基を含むDEループ、ならびに(i)15アミノ酸長であり(たとえば、配列番号1のアミノ酸77～86に対応する残基の間の5アミノ酸の挿入により長さが5アミノ酸伸長したFGループ)、かつ(ii)配列番号1のアミノ酸77に対応する位置にDまたはNを含むFGループを含むEGFR結合<sup>10</sup>Fn3を提供する。

## 【0054】

他の実施形態において、本発明は、配列番号1のアミノ酸29および30に対応する位置にYQを有するBCループ、配列番号1のアミノ酸54に対応する位置にV、I、L、M、またはA残基を含むDEループ、ならびに配列番号1のアミノ酸77に対応する位置にDまたはNを含むFGループを含むEGFR結合<sup>10</sup>Fn3を提供する。

## 【0055】

他の実施形態において、本発明は、配列番号1のアミノ酸29および30に対応する位置にYQを有するBCループ、配列番号1のアミノ酸54に対応する位置にV、I、L、M、またはA残基を含むDEループ、ならびに(i)15アミノ酸長であり(たとえば、配列番号1のアミノ酸77～86に対応する残基の間の5アミノ酸の挿入により長さが5アミノ酸伸長したFGループ)、かつ(ii)配列番号1のアミノ酸77に対応する位置にDまたはNを含むFGループを含むEGFR結合<sup>10</sup>Fn3を提供する。

## 【0056】

他の実施形態において、本発明は、アミノ酸配列XXXXXXXXYQを含むBCループ、アミノ酸配列XX(V/I/L/M/A)Xを含むDEループ、およびアミノ酸配列(D

10

20

30

40

50

／N)  $X_n$ を含むFGループを含み、ここに、Xは任意のアミノ酸であり、nは9～14のアミノ酸である、EGFR結合<sup>10</sup>Fn3を提供する。例示的な実施形態において、nは14アミノ酸である。

#### 【0057】

他の実施形態において、本発明は、アミノ酸配列XXXXXXXXYQを含む配列番号1のアミノ酸23～30に対応するBCループ、アミノ酸配列XX(V/I/L/M/A)Xを含む配列番号1のアミノ酸52～55に対応するDEループ、およびアミノ酸配列(D/N) $X_n$ を含む配列番号1のアミノ酸77～86に対応するFGループを含み、ここに、Xは任意のアミノ酸であり、nは9～14のアミノ酸である、EGFR結合<sup>10</sup>Fn3を提供する。例示的な実施形態において、nは14アミノ酸である。

10

#### 【0058】

他の実施形態において、本発明は、アミノ酸配列XXXXXXXXYQを含むBCループ、アミノ酸配列XX(V/I/L/M/A)Xを含むDEループ、および

i.

(D/N)(Y/M)(Y/A/M)(Y/H/F)(K/Q/V)(E/P/R)(Y/T/K)X(E/Y/Q)(Y/G/H)および

ii.

D(Y/F/W)(Y/F/K)(N/D/P)(P/H/L)(A/T/V)(T/D/S)(H/Y/G)(E/P/V)(Y/H)(T/K/I)(Y/F)(H/N/Q)(T/Q/E)(T/S/I)

20

から選択されるアミノ酸配列を含むFGループを含み、ここに、Xは任意のアミノ酸である、EGFR結合<sup>10</sup>Fn3を提供する。

#### 【0059】

他の実施形態において、本発明は、アミノ酸配列XXXXXXXXYQを含むBCループ、アミノ酸配列(G/Y/H)(D/M/G)(V/L/I)Xを含むDEループ、およびアミノ酸配列(D/N)(Y/M)(Y/A/M)(Y/H/F)(K/Q/V)(E/P/R)(Y/T/K)X(E/Y/Q)(Y/G/H)を含むFGループを含み、ここに、Xは任意のアミノ酸である、EGFR結合<sup>10</sup>Fn3を提供する。

#### 【0060】

他の実施形態において、本発明は、アミノ酸配列XXXXXXXXYQを含むBCループ、アミノ酸配列(G/Y/H)(D/M/G)(V/L/I)Xを含むDEループ、およびアミノ酸配列D(Y/F/W)(Y/F/K)(N/D/P)(P/H/L)(A/T/V)(T/D/S)(H/Y/G)(E/P/V)(Y/H)(T/K/I)(Y/F)(H/N/Q)(T/Q/E)(T/S/I)を含むFGループを含み、ここに、Xは任意のアミノ酸である、EGFR結合<sup>10</sup>Fn3を提供する。

30

#### 【0061】

他の実施形態において、本発明は、アミノ酸配列XXXXXXXXYQを含むBCループ、アミノ酸配列XX(V/I/L/M/A)Xを含むDEループ、および

i. DY(A/Y)GKPYXEY(配列番号473)；

ii. DY(A/Y)Y(K/R/Q/T)PYXEY(配列番号474)；

40

iii. (D/N)Y(A/Y)(Y/F)(K/R/Q/T)EYXE(Y/H)(配列番号475)；

iv. DYY(H/Y)X(R/K)X(E/T)YX(配列番号476)；

v. DYY(H/Y)(K/H/Q)(R/K)T(E/T)Y(G/P)(配列番号477)；

vi. (D/N)MMHV(E/D)YXEY(配列番号478)；

vii. DYMHHXXYXEY(配列番号479)；および

viii. D(M/Y)YHX(K/R)X(V/I/L/M)YG(配列番号480)；

から選択されるアミノ酸配列を含むFGループを含み、ここに、Xは任意のアミノ酸であ

50

る、EGFR結合<sup>10</sup>Fn3を提供する。

【0062】

他の実施形態において、本発明は、アミノ酸配列XXXXXXXXYQを含むBCループ、アミノ酸配列XX(V/I/L/M/A)Xを含むDEループ、および

i. D(Y/F)(Y/F)NPXTHEYXYXXX(配列番号481)；

ii. D(Y/F)(Y/F)D(P/L)X(T/S)HXYXYXXX(配列番号482)；および

iii. D(Y/F)(K/R)PHXDGPH(T/I)YXE(S/Y)(配列番号483)；

から選択されるアミノ酸配列を含むFGループを含み、ここに、Xは任意のアミノ酸である、EGFR結合<sup>10</sup>Fn3を提供する。

10

【0063】

他の実施形態において、本発明は、アミノ酸配列XXXXXXXXYQを含むBCループ、アミノ酸配列XX(V/I/L/M/A)Xを含むDEループ、およびアミノ酸配列(D/N)(M/Y)(M/A/W)(H/F/Y)(V/K)EY(A/Q/R/S/T)E(Y/H/D)を含むFGループを含み、ここに、Xは任意のアミノ酸である、EGFR結合<sup>10</sup>Fn3を提供する。

【0064】

他の実施形態において、本発明は、アミノ酸配列XXXXXXXXYQを含むBCループ、アミノ酸配列XX(V/I/L/M/A)Xを含むDEループ、およびアミノ酸配列D(Y/F/W)(Y/F/K)(N/P/D)(P/H/L)X(T/D/S)(H/G/Y)(E/P/Y)(Y/H)XYXXXを含むFGループを含み、ここに、Xは任意のアミノ酸である、EGFR結合<sup>10</sup>Fn3を提供する。

20

【0065】

様々な実施形態において、EGFR結合<sup>10</sup>Fn3のDEループは、配列(G/Y/H)(D/M/G)(V/L/I)Xを含んでいてもよい。

【0066】

他の実施形態において、本発明は、

i. D(Y/F)(Y/F)NPXTHEYXYXXX(配列番号481)；

ii. D(Y/F)(Y/F)D(P/L)X(T/S)HXYXYXXX(配列番号482)；および

iii. D(Y/F)(K/R)PHXDGPH(T/I)YXE(S/Y)(配列番号483)；

から選択されるアミノ酸配列を含むFGループを含み、ここに、Xは任意のアミノ酸である、EGFR結合<sup>10</sup>Fn3を提供する。

30

【0067】

ある実施形態において、EGFR結合<sup>10</sup>Fn3は、上記に提供されるコンセンサス配列のいずれかを含む、ただし、EGFR結合<sup>10</sup>Fn3は、1つまたは複数の以下の配列を含まないことを条件とする。

i. VSDVPRDLEVVAATPTSLLSWQVPRPMYQRYRITYGETGGNSPVQEFTVPGGVRTATISGLKPGVDYTITVYAVTDYMHSEYRQYPISINYRT(配列番号484)、および

ii. VSDVPRDLEVVAATPTSLLSWQVPRPMYQYYRITYGETGGNSPVQEFTVPGGVRTATISGLKPGVDYTITVYAVTDYMHSEYRQYPISINYRT(配列番号485)、および

iii. VSDVPRDLEVVAATPTSLLSWQVPRPMYQRYRITYGETGGNSPVQEFTVPGGVRTATISGLKPGVDYTITVYAVTDYMHSEYRQYPISINYRTEIDKPCQ(配列番号486)。

40

【0068】

ある実施形態において、上記に提供されるコンセンサス配列のうちの1つを含むEGF

50

R結合<sup>10</sup>F<sub>n</sub>3は、配列番号1に対して少なくとも40%、50%、60%、70%、75%、または80%の同一性を有する。ある実施形態において、上記に提供されるコンセンサス配列のうちの1つを含むEGFR結合<sup>10</sup>F<sub>n</sub>3の全体的な構造は、免疫グロブリンフォールドに類似している。ある実施形態において、上記に提供されるコンセンサス配列のうちの1つを含むEGFR結合<sup>10</sup>F<sub>n</sub>3は、スキヤフォールドのコアアミノ酸残基をさらに含む。ある実施形態において、上記に提供されるコンセンサス配列のうちの1つを含むEGFR結合<sup>10</sup>F<sub>n</sub>3は、配列番号5～8、52、66～68、106～108、112～114、140～142、155～157、170～172、182、185～187、198～200、または219～327のいずれか1つに対して、少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、または99%の同一性を有する。ある実施形態において、上記に提供されるコンセンサス配列のうちの1つを含むEGFR結合<sup>10</sup>F<sub>n</sub>3は、配列番号5～8、52、66～68、106～108、112～114、140～142、155～157、170～172、182、185～187、198～200、または219～327のいずれか1つの、配列番号1のE9～配列番号1のT94に対応するアミノ酸残基のアミノ酸配列に対して、少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、または99%の同一性を有する。ある実施形態において、上記に提供されるコンセンサス配列のうちの1つを含むEGFR結合<sup>10</sup>F<sub>n</sub>3は、配列番号1のスキヤフォールドアミノ酸残基に比べて、約0～20、0～15、0～10、0～8、0～6、0～5、0～4、0～3、0～2、または0～1個の置換、保存的置換、欠失、または付加を有する<sup>10</sup>F<sub>n</sub>3スキヤフォールドを含む。

#### 【0069】

ある実施形態において、本発明は、配列番号219～327のいずれか1つのアミノ酸23～30において記載されるアミノ酸配列を有するBCループ、アミノ酸52～55において記載されるアミノ酸配列を有するDEループ、およびアミノ酸77～86において記載されるアミノ酸配列を有するFGループを含むEGFR結合<sup>10</sup>F<sub>n</sub>3を提供する。ある実施形態において、本発明は、配列番号219～327のいずれか1つのアミノ酸21～30において記載されるアミノ酸配列を有するBCループ、アミノ酸51～56において記載されるアミノ酸配列を有するDEループ、およびアミノ酸76～87において記載されるアミノ酸配列を有するFGループを含むEGFR結合<sup>10</sup>F<sub>n</sub>3を提供する。ある実施形態において、本発明は、配列番号219～327のいずれか1つに対して少なくとも60%、75%、80%、85%、90%、95%、または98%同一のアミノ酸配列を含むEGFR結合<sup>10</sup>F<sub>n</sub>3を提供する。

#### 【0070】

一実施形態において、500nM未満のK<sub>D</sub>でEGFRを結合する第10フィブロネクチンIII型ドメイン(<sup>10</sup>F<sub>n</sub>3)を含む抗体様タンパク質が提供され、これは、配列番号5のアミノ酸21～30において記載されるアミノ酸配列を有するBCループ、配列番号5のアミノ酸51～56において記載されるアミノ酸配列を有するDEループ、および配列番号5のアミノ酸76～92において記載されるアミノ酸配列を有するFGループを含む。いくつかの実施形態において、EGFR結合<sup>10</sup>F<sub>n</sub>3は、アミノ酸配列X<sub>g</sub>DSGRGSYQX<sub>h</sub>(配列番号40)を有するBCループ、アミノ酸配列X<sub>i</sub>GPVHX<sub>j</sub>(配列番号42)を有するDEループ、およびアミノ酸配列X<sub>k</sub>DHKPHADGPHTYHEX<sub>l</sub>(配列番号44)を有するFGループを含み、ここに、Xは任意のアミノ酸であり、g、h、i、j、k、およびlは、0～5から独立して選択される整数である。いくつかの実施形態において、EGFR結合<sup>10</sup>F<sub>n</sub>3は、アミノ酸配列SWDSGRGSYQ(配列番号39)を有するBCループ、アミノ酸配列PGPVHT(配列番号41)を有するDEループ、およびアミノ酸配列TDHKPHADGPHTYHESP(配列番号43)を有するFGループを含む。いくつかの実施形態において、EGFR結合<sup>10</sup>F<sub>n</sub>3は、配列番号5または6に対して少なくとも80%、90%、95%、または100%同一のアミノ酸配列を有する。

## 【0071】

一実施形態において、500 nM未満の $K_D$ でEGFRを結合する第10フィブロネクチンIII型ドメイン ( $^{10}Fn3$ ) を含む抗体様タンパク質が提供され、これは、配列番号7のアミノ酸21～30において記載されるアミノ酸配列を有するBCループ、配列番号7のアミノ酸51～56において記載されるアミノ酸配列を有するDEループ、および配列番号7のアミノ酸76～87において記載されるアミノ酸配列を有するFGループを含む。いくつかの実施形態において、EGFR結合 $^{10}Fn3$ は、アミノ酸配列 $X_mVAGAE DYQX_n$  (配列番号34) を有するBCループ、アミノ酸配列 $X_oHDLVX_p$  (配列番号36) を有するDEループ、およびアミノ酸配列 $X_qDMMHVEYTEHX_r$  (配列番号38) を有するFGループを含み、ここに、Xは任意のアミノ酸であり、m、n、o、p、q、およびrは、0～5から独立して選択される整数である。いくつかの実施形態において、EGFR結合 $^{10}Fn3$ は、アミノ酸配列SWVAGAE DYQ (配列番号33) を有するBCループ、アミノ酸配列PHDLVT (配列番号35) を有するDEループ、およびアミノ酸配列TDMMHVEYTEHP (配列番号37) を有するFGループを含む。いくつかの実施形態において、EGFR結合 $^{10}Fn3$ は、配列番号7または8に対して少なくとも80、90、95、または100%同一のアミノ酸配列を有する。

10

## 【0072】

一実施形態において、500 nM未満の $K_D$ でEGFRを結合する第10フィブロネクチンIII型ドメイン ( $^{10}Fn3$ ) を含む抗体様タンパク質が提供され、これは、配列番号82のアミノ酸23～30において記載されるアミノ酸配列を有するBCループ、配列番号82のアミノ酸51～55において記載されるアミノ酸配列を有するDEループ、および配列番号82のアミノ酸76～86において記載されるアミノ酸配列を有するFGループを含む。いくつかの実施形態において、EGFR結合 $^{10}Fn3$ は、アミノ酸配列 $X_sLPGKLRYQX_t$  (配列番号60) を有するBCループ、アミノ酸配列 $X_uHDLRX_w$  (配列番号62) を有するDEループ、およびアミノ酸配列 $X_yNMMHVEYSEYX_z$  (配列番号64) を有するFGループを含み、ここに、Xは任意のアミノ酸であり、s、t、u、w、y、およびzは、0～5から独立して選択される整数である。いくつかの実施形態において、EGFR結合 $^{10}Fn3$ は、アミノ酸配列LPGKLRYQ (配列番号59の残基3～13) を有するBCループ、アミノ酸配列PHDLR (配列番号61の残基1～5) を有するDEループ、およびアミノ酸配列TNMMHVEYSEY (配列番号63の残基1～11) を有するFGループを含む。いくつかの実施形態において、EGFR結合 $^{10}Fn3$ は、配列番号52または82に対して少なくとも80、90、95、または100%同一のアミノ酸配列を有する。

20

30

## 【0073】

一実施形態において、500 nM未満の $K_D$ でEGFRを結合する第10フィブロネクチンIII型ドメイン ( $^{10}Fn3$ ) を含む抗体様タンパク質が提供され、これは、配列番号106のアミノ酸23～30において記載されるアミノ酸配列を有するBCループ、配列番号106のアミノ酸51～55において記載されるアミノ酸配列を有するDEループ、および配列番号106のアミノ酸76～86において記載されるアミノ酸配列を有するFGループを含む。いくつかの実施形態において、EGFR結合 $^{10}Fn3$ は、アミノ酸配列 $X_gHERDGS RQX_h$  (配列番号134) を有するBCループ、アミノ酸配列 $X_iGGVRX_j$  (配列番号135) を有するDEループ、およびアミノ酸配列 $X_kDYFNPTTHEYIYQT TX_l$  (配列番号136) を有するFGループを含み、ここに、Xは任意のアミノ酸であり、g、h、i、j、k、およびlは、0～5から独立して選択される整数である。いくつかの実施形態において、EGFR結合 $^{10}Fn3$ は、アミノ酸配列SWHERDGS RQ (配列番号109) を有するBCループ、アミノ酸配列PGGVRT (配列番号110) を有するDEループ、およびアミノ酸配列TDYFNPTTHEYIYQTTP (配列番号111) を有するFGループを含む。いくつかの実施形態において、EGFR結合 $^{10}Fn3$ は、配列番号106～108のいずれか1つに対して

40

50

少なくとも80、90、95、または100%同一のアミノ酸配列を有する。

【0074】

一実施形態において、500 nM未満の $K_D$ でEGFRを結合する第10フィブロネクチンIII型ドメイン ( $^{10}Fn3$ ) を含む抗体様タンパク質が提供され、これは、配列番号112のアミノ酸23~30において記載されるアミノ酸配列を有するBCループ、配列番号112のアミノ酸51~55において記載されるアミノ酸配列を有するDEループ、および配列番号112のアミノ酸76~86において記載されるアミノ酸配列を有するFGループを含む。いくつかの実施形態において、EGFR結合 $^{10}Fn3$ は、アミノ酸配列 $X_gWAPVDRYQX_h$  (配列番号137) を有するBCループ、アミノ酸配列 $X_iRDVYX_j$  (配列番号138) を有するDEループ、およびアミノ酸配列 $X_kDYKPHADGPHTYHESX_l$  (配列番号139) を有するFGループを含み、ここに、Xは任意のアミノ酸であり、g、h、i、j、k、およびlは、0~5から独立して選択される整数である。いくつかの実施形態において、EGFR結合 $^{10}Fn3$ は、アミノ酸配列SWWAPVDRYQ (配列番号115) を有するBCループ、アミノ酸配列PRDVYT (配列番号116) を有するDEループ、およびアミノ酸配列TDYKPHADGPHTYHESP (配列番号117) を有するFGループを含む。いくつかの実施形態において、EGFR結合 $^{10}Fn3$ は、配列番号112~114のいずれか1つに対して少なくとも80、90、95、または100%同一のアミノ酸配列を有する。

10

【0075】

一実施形態において、500 nM未満の $K_D$ でEGFRを結合する第10フィブロネクチンIII型ドメイン ( $^{10}Fn3$ ) を含む抗体様タンパク質が提供され、これは、配列番号141のアミノ酸13~22において記載されるアミノ酸配列を有するBCループ、配列番号141のアミノ酸43~48において記載されるアミノ酸配列を有するDEループ、および配列番号141のアミノ酸68~84において記載されるアミノ酸配列を有するFGループを含む。いくつかの実施形態において、EGFR結合 $^{10}Fn3$ は、アミノ酸配列 $X_gTQGSTHYQX_h$  (配列番号146) を有するBCループ、アミノ酸配列 $X_iGMVYX_j$  (配列番号147) を有するDEループ、およびアミノ酸配列 $X_kDYFDRSTHEYKYRTTX_l$  (配列番号148) を有するFGループを含み、ここに、Xは任意のアミノ酸であり、g、h、i、j、k、およびlは、0~5から独立して選択される整数である。いくつかの実施形態において、EGFR結合 $^{10}Fn3$ は、アミノ酸配列SWTQGSTHYQ (配列番号143) を有するBCループ、アミノ酸配列PGMVYT (配列番号144) を有するDEループ、およびアミノ酸配列TDYFDRSTHEYKYRTTP (配列番号145) を有するFGループを含む。いくつかの実施形態において、EGFR結合 $^{10}Fn3$ は、配列番号140~142のいずれか1つに対して少なくとも80、90、95、または100%同一のアミノ酸配列を有する。

20

30

【0076】

一実施形態において、500 nM未満の $K_D$ でEGFRを結合する第10フィブロネクチンIII型ドメイン ( $^{10}Fn3$ ) を含む抗体様タンパク質が提供され、これは、配列番号156のアミノ酸13~22において記載されるアミノ酸配列を有するBCループ、配列番号156のアミノ酸43~48において記載されるアミノ酸配列を有するDEループ、および配列番号156のアミノ酸68~84において記載されるアミノ酸配列を有するFGループを含む。いくつかの実施形態において、EGFR結合 $^{10}Fn3$ は、アミノ酸配列 $X_gYWEGLPYQX_h$  (配列番号161) を有するBCループ、アミノ酸配列 $X_iRDVNX_j$  (配列番号162) を有するDEループ、およびアミノ酸配列 $X_kDWNPDTHEYIYHTIX_l$  (配列番号163) を有するFGループを含み、ここに、Xは任意のアミノ酸であり、g、h、i、j、k、およびlは、0~5から独立して選択される整数である。いくつかの実施形態において、EGFR結合 $^{10}Fn3$ は、アミノ酸配列SWYWEGLPYQ (配列番号158) を有するBCループ、アミノ酸配列PRDVNT (配列番号159) を有するDEループ、およびアミノ酸配列TDWYNPDTHEYIYHTIP (配列番号160) を有するFGループを含む。いくつかの実施形態

40

50

において、EGFR結合<sup>10</sup>Fn3は、配列番号155～157のいずれか1つに対して少なくとも80、90、95、または100%同一のアミノ酸配列を有する。

#### 【0077】

一実施形態において、500nM未満のK<sub>D</sub>でEGFRを結合する第10フィブロネクチンIII型ドメイン(<sup>10</sup>Fn3)を含む抗体様タンパク質が提供され、これは、配列番号171のアミノ酸13～22において記載されるアミノ酸配列を有するBCループ、配列番号171のアミノ酸43～48において記載されるアミノ酸配列を有するDEループ、および配列番号171のアミノ酸68～84において記載されるアミノ酸配列を有するFGループを含む。いくつかの実施形態において、EGFR結合<sup>10</sup>Fn3は、アミノ酸配列X<sub>g</sub>ASNRGTYQX<sub>h</sub>(配列番号176)を有するBCループ、アミノ酸配列X<sub>i</sub>GGV SX<sub>j</sub>(配列番号177)を有するDEループ、およびアミノ酸配列X<sub>k</sub>DAFNPTTHEYNYFTTX<sub>l</sub>(配列番号178)を有するFGループを含み、ここに、Xは任意のアミノ酸であり、g、h、i、j、k、およびlは、0～5から独立して選択される整数である。いくつかの実施形態において、EGFR結合<sup>10</sup>Fn3は、アミノ酸配列SWASNRGTYQ(配列番号173)を有するBCループ、アミノ酸配列PGGVST(配列番号174)を有するDEループ、およびアミノ酸配列TDAFNPTTHEYNYFTTP(配列番号175)を有するFGループを含む。いくつかの実施形態において、EGFR結合<sup>10</sup>Fn3は、配列番号170～172のいずれか1つに対して少なくとも80、90、95、または100%同一のアミノ酸配列を有する。

#### 【0078】

一実施形態において、500nM未満のK<sub>D</sub>でEGFRを結合する第10フィブロネクチンIII型ドメイン(<sup>10</sup>Fn3)を含む抗体様タンパク質が提供され、これは、配列番号186のアミノ酸13～22において記載されるアミノ酸配列を有するBCループ、配列番号186のアミノ酸43～48において記載されるアミノ酸配列を有するDEループ、および配列番号186のアミノ酸68～84において記載されるアミノ酸配列を有するFGループを含む。いくつかの実施形態において、EGFR結合<sup>10</sup>Fn3は、アミノ酸配列X<sub>g</sub>DAPTSRYQX<sub>h</sub>(配列番号190)を有するBCループ、アミノ酸配列X<sub>i</sub>GGLSX<sub>j</sub>(配列番号191)を有するDEループ、およびアミノ酸配列X<sub>k</sub>DYKPHADGPHTYHESX<sub>l</sub>(配列番号139)を有するFGループを含み、ここに、Xは任意のアミノ酸であり、g、h、i、j、k、およびlは、0～5から独立して選択される整数である。いくつかの実施形態において、EGFR結合<sup>10</sup>Fn3は、アミノ酸配列SWDAPTSRYQ(配列番号188)を有するBCループ、アミノ酸配列PGGLST(配列番号189)を有するDEループ、およびアミノ酸配列TDYKPHADGPHTYHESP(配列番号117)を有するFGループを含む。いくつかの実施形態において、EGFR結合<sup>10</sup>Fn3は、配列番号185～187のいずれか1つに対して少なくとも80、90、95、または100%同一のアミノ酸配列を有する。

#### 【0079】

一実施形態において、500nM未満のK<sub>D</sub>でEGFRを結合する第10フィブロネクチンIII型ドメイン(<sup>10</sup>Fn3)を含む抗体様タンパク質が提供され、これは、配列番号199のアミノ酸13～22において記載されるアミノ酸配列を有するBCループ、配列番号199のアミノ酸43～48において記載されるアミノ酸配列を有するDEループ、および配列番号199のアミノ酸68～84において記載されるアミノ酸配列を有するFGループを含む。いくつかの実施形態において、EGFR結合<sup>10</sup>Fn3は、アミノ酸配列X<sub>g</sub>DAGAVTYQX<sub>h</sub>(配列番号203)を有するBCループ、アミノ酸配列X<sub>i</sub>GGVRX<sub>j</sub>(配列番号135)を有するDEループ、およびアミノ酸配列X<sub>k</sub>DYKPHADGPHTYHEYX<sub>l</sub>(配列番号204)を有するFGループを含み、ここに、Xは任意のアミノ酸であり、g、h、i、j、k、およびlは、0～5から独立して選択される整数である。いくつかの実施形態において、EGFR結合<sup>10</sup>Fn3は、アミノ酸配列SWDAGAVTYQ(配列番号201)を有するBCループ、アミノ酸配列PGGVRT(配列番号110)を有するDEループ、およびアミノ酸配列TDYKPHADG

10

20

30

40

50

PHTYHEYP（配列番号202）を有するFGループを含む。いくつかの実施形態において、EGFR結合<sup>10</sup>Fn3は、配列番号198～200のいずれか1つに対して少なくとも80、90、95、または100%同一のアミノ酸配列を有する。

#### 【0080】

ある実施形態において、EGFR結合<sup>10</sup>Fn3ドメインは、EGF-IR結合<sup>10</sup>Fn3ドメインに共有結合または非共有結合される。例示的な実施形態において、IGF-IR結合<sup>10</sup>Fn3は、配列番号3のアミノ酸21～30において記載されるアミノ酸配列を有するBCループ、配列番号3のアミノ酸51～56において記載されるアミノ酸配列を有するDEループ、および配列番号3のアミノ酸76～83において記載されるアミノ酸配列を有するFGループを含んでいてもよい。いくつかの実施形態において、IGF-IR結合<sup>10</sup>Fn3は、アミノ酸配列X<sub>a</sub>SARLKVA X<sub>b</sub>（配列番号46）を有するBCループ、アミノ酸配列X<sub>c</sub>KNVY X<sub>d</sub>（配列番号48）を有するDEループ、およびアミノ酸配列X<sub>e</sub>RFRDYQ X<sub>f</sub>（配列番号50）を有するFGループを含み、ここに、Xは任意のアミノ酸であり、a、b、c、d、e、f、g、h、i、j、k、およびlは、0～5から独立して選択される整数であるか、またはaは2であり、b～fは1であるか、またはa～fはゼロである。いくつかの実施形態において、IGF-IR結合<sup>10</sup>Fn3は、配列番号3に対して少なくとも80、90、95、98、99、または100%同一のアミノ酸配列を有する。ある実施形態において、IGF-IR結合<sup>10</sup>Fn3は、配列番号1のスキファールドアミノ酸残基に比べて、0～20、0～15、0～10、0～8、0～6、0～5、0～4、0～3、0～2、または0～1あたりの置換、保存的置換、欠失、または追加を有する<sup>10</sup>Fn3スキファールドを含む。ある実施形態において、IGF-IR結合<sup>10</sup>Fn3は、配列番号3の対応するループ配列に比べて、約0～15、0～10、0～8、0～6、0～5、0～4、0～3、0～2、または0～1個の置換、保存的置換、欠失、または付加を有する。

#### 【0081】

##### <sup>10</sup>Fn3 E/I結合剤

本開示の一態様は、抗体様タンパク質多量体から構築されたE/I結合剤を提供する。いくつかの実施形態において、抗体様タンパク質多量体は、少なくとも1つのIGFIR結合<sup>10</sup>Fn3に共有結合または非共有結合した少なくとも1つのEGFR結合<sup>10</sup>Fn3を含む。ある実施形態において、本明細書において記載されるE/I結合剤は、単一のポリペプチド鎖として構築されてもよく、ここに、EサブユニットおよびIサブユニットは、どちらかの向き、たとえばN末端からC末端にE-Iの向きまたはI-Eの向きをしていてもよい。

#### 【0082】

本開示は、一部、ポリペプチドリンカーを介して結合した複数の<sup>10</sup>Fn3が、互いに独立して正しくフォールドし、高親和性結合を保持し、それぞれのドメインがその機能特性を保持するという驚くべき知見に関する（たとえば実施例5～10を参照されたい）。さらに、これらのE/I<sup>10</sup>Fn3ベースの結合剤は、低度の凝集および高い融解温度（T<sub>m</sub>）などの望ましい生物物理的特性を示す（たとえば実施例4を参照されたい）。これらの実施例は、様々なE/I<sup>10</sup>Fn3ベースの結合剤を特徴づける。例示的なIGFIR結合<sup>10</sup>Fn3は、配列番号4において記載される。例示的なEGFR結合<sup>10</sup>Fn3は、配列番号6、8、52、107、113、140、155、170、185、および198において記載される。

#### 【0083】

いくつかの実施形態において、E/I結合剤は、配列番号1において示されるヒト<sup>10</sup>Fn3ドメインに対して少なくとも40、50、60、70、または80%同一のアミノ酸配列を独立して有するEGFR結合<sup>10</sup>Fn3およびIGFIR結合<sup>10</sup>Fn3を含む。変異性の多くが、一般に、1つまたは複数のループ中に生じるであろう。

#### 【0084】

いくつかの実施形態において、E/I結合剤は、配列番号32に対して少なくとも70

、80、85、90、95、98、または100%同一のアミノ酸配列を独立して有するEGFR結合<sup>10</sup>Fn3およびIGFIR結合<sup>10</sup>Fn3を含み、ここに、nは1~20の整数であり、oは1~20の整数であり、pは1~40の整数である。いくつかの実施形態において、nは8~12の整数であり、oは4~8の整数であり、pは4~28の整数である。いくつかの実施形態において、nは10であり、oは6であり、pは12である。

#### 【0085】

いくつかの実施形態において、本開示は、ヒト<sup>10</sup>Fn3の対応するループの配列に比べて改変したアミノ酸配列を有するループBC、DE、およびFGから選択される少なくとも1つのループを有する<sup>10</sup>Fn3の多量体を提供する。「改変した」によって、鑄型配列（対応するヒトフィブロネクチンドメイン）に比べて1つまたは複数のアミノ酸配列改変を意味し、アミノ酸付加、欠失、および置換を含む。アミノ酸配列の改変は、一般に核酸コード配列の意図的、盲目的、または自発的な配列変異を通して達成されてもよく、任意の技術、たとえばPCR、エラープロードPCR、または化学的DNA合成によって生じてもよい。いくつかの実施形態において、アミノ酸配列は、天然に存在するアミノ酸で置換する、または該アミノ酸を付加することによって改変される。

10

#### 【0086】

いくつかの実施形態において、BC、DE、およびFGから選択される1つまたは複数のループは、対応するヒトフィブロネクチンループに比べて長さを伸長してもよく、または短縮してもよい。特に、ヒト<sup>10</sup>Fn3のFGループは、12残基長であるのに対して、抗体重鎖中の対応するループは、4~28残基の範囲である。そのため、抗原結合を最適化するために、<sup>10</sup>Fn3のFGループの長さは、抗原結合において最大限の柔軟性および親和性を得るために、長さおよび配列が改変され得る。

20

#### 【0087】

<sup>10</sup>Fn3分子のいくつかの実施形態において、改変されたBCループは、10までのアミノ酸置換、9までのアミノ酸欠失、10までのアミノ酸挿入、または置換、欠失、もしくは挿入の組合せを有する。いくつかの実施形態において、改変されたDEループは、6までのアミノ酸置換、5までのアミノ酸欠失、14までのアミノ酸挿入、または置換および欠失もしくは挿入の組合せを有する。いくつかの実施形態において、FGループは、12までのアミノ酸置換、11までのアミノ酸欠失、28までのアミノ酸挿入、または置換および欠失もしくは挿入の組合せを有する。

30

#### 【0088】

天然に存在する<sup>10</sup>Fn3は、FGループ中に「アルギニン-グリシン-アスパラギン酸」（RGD）インテグリン結合モチーフを含む。<sup>10</sup>Fn3の好ましい多量体は、RGDインテグリン結合モチーフを欠く。

#### 【0089】

いくつかの実施形態において、E/I結合剤は、b)配列番号3のアミノ酸21~30において記載されるアミノ酸配列を有するBCループ、配列番号3のアミノ酸51~56において記載されるアミノ酸配列を有するDEループ、および配列番号3のアミノ酸76~83において記載されるアミノ酸配列を有するFGループを含むIGFIR結合<sup>10</sup>Fn3に共有結合または非共有結合した、a)配列番号5のアミノ酸21~30において記載されるアミノ酸配列を有するBCループ、配列番号5のアミノ酸51~56において記載されるアミノ酸配列を有するDEループ、および配列番号5のアミノ酸76~92において記載されるアミノ酸配列を有するFGループを含むEGFR結合<sup>10</sup>Fn3を含む抗体様タンパク質二量体である。いくつかの実施形態において、EGFR結合<sup>10</sup>Fn3は、配列番号5に対して少なくとも80、90、95、98、99、または100%同一のアミノ酸配列を有する。いくつかの実施形態において、IGFIR結合<sup>10</sup>Fn3は、配列番号3に対して少なくとも80、90、95、98、99、または100%同一のアミノ酸配列を有する。いくつかの実施形態において、E/I結合剤は、配列番号20、21、23、24、90、92、101、または103に対して少なくとも80、85、90

40

50

、 95、98、99、または100%同一のアミノ酸配列を含む。

【0090】

いくつかの実施形態において、E/I結合剤は、b)配列番号3のアミノ酸21~30において記載されるアミノ酸配列を有するBCループ、配列番号3のアミノ酸51~56において記載されるアミノ酸配列を有するDEループ、および配列番号3のアミノ酸76~83において記載されるアミノ酸配列を有するFGループを含むIGFIR結合<sup>10</sup>Fn3に共有結合または非共有結合した、a)配列番号7のアミノ酸21~30において記載されるアミノ酸配列を有するBCループ、配列番号7のアミノ酸51~56において記載されるアミノ酸配列を有するDEループ、および配列番号7のアミノ酸76~87において記載されるアミノ酸配列を有するFGループを含むEGFR結合<sup>10</sup>Fn3を含む抗体様タンパク質二量体である。いくつかの実施形態において、EGFR結合<sup>10</sup>Fn3は、配列番号7に対して少なくとも80、90、95、98、または100%同一のアミノ酸配列を有する。いくつかの実施形態において、IGFIR結合<sup>10</sup>Fn3は、配列番号3に対して少なくとも80、90、95、98、または100%同一のアミノ酸配列を有する。いくつかの実施形態において、E/I結合剤は、配列番号26、27、29、30、89、91、100、または102に対して少なくとも80、85、90、95、98、または100%同一のアミノ酸配列を含む。

10

【0091】

いくつかの実施形態において、E/I結合剤は、b)配列番号3のアミノ酸21~30において記載されるアミノ酸配列を有するBCループ、配列番号3のアミノ酸51~56において記載されるアミノ酸配列を有するDEループ、および配列番号3のアミノ酸76~83において記載されるアミノ酸配列を有するFGループを含むIGFIR結合<sup>10</sup>Fn3に共有結合または非共有結合した、a)配列番号82アミノ酸21~30において記載されるアミノ酸配列を有するBCループ、配列番号82のアミノ酸51~56において記載されるアミノ酸配列を有するDEループ、および配列番号82のアミノ酸76~87において記載されるアミノ酸配列を有するFGループを含むEGFR結合<sup>10</sup>Fn3を含む抗体様タンパク質二量体である。いくつかの実施形態において、EGFR結合<sup>10</sup>Fn3は、配列番号82に対して少なくとも80、90、95、98、または100%同一のアミノ酸配列を有する。いくつかの実施形態において、IGFIR結合<sup>10</sup>Fn3は、配列番号3に対して少なくとも80、90、95、98、または100%同一のアミノ酸配列を有する。いくつかの実施形態において、E/I結合剤は、配列番号53、54、87、88、98、99、104、または105に対して少なくとも80、85、90、95、98、または100%同一のアミノ酸配列を含む。

20

30

【0092】

いくつかの実施形態において、E/I結合剤は、b)配列番号3のアミノ酸21~30において記載されるアミノ酸配列を有するBCループ、配列番号3のアミノ酸51~56において記載されるアミノ酸配列を有するDEループ、および配列番号3のアミノ酸76~83において記載されるアミノ酸配列を有するFGループを含むIGFIR結合<sup>10</sup>Fn3に共有結合または非共有結合した、a)配列番号106のアミノ酸21~30において記載されるアミノ酸配列を有するBCループ、配列番号106のアミノ酸51~56において記載されるアミノ酸配列を有するDEループ、および配列番号106のアミノ酸76~92において記載されるアミノ酸配列を有するFGループを含むEGFR結合<sup>10</sup>Fn3を含む抗体様タンパク質二量体である。いくつかの実施形態において、EGFR結合<sup>10</sup>Fn3は、配列番号106に対して少なくとも80、90、95、98、または100%同一のアミノ酸配列を有する。いくつかの実施形態において、IGFIR結合<sup>10</sup>Fn3は、配列番号3に対して少なくとも80、90、95、98、または100%同一のアミノ酸配列を有する。いくつかの実施形態において、E/I結合剤は、配列番号118~125に対して少なくとも80、85、90、95、98、または100%同一のアミノ酸配列を含む。

40

【0093】

50

いくつかの実施形態において、E/I結合剤は、b)配列番号3のアミノ酸21～30において記載されるアミノ酸配列を有するBCループ、配列番号3のアミノ酸51～56において記載されるアミノ酸配列を有するDEループ、および配列番号3のアミノ酸76～83において記載されるアミノ酸配列を有するFGループを含むIGFIR結合<sup>10</sup>Fn3に共有結合または非共有結合した、a)配列番号112のアミノ酸21～30において記載されるアミノ酸配列を有するBCループ、配列番号112のアミノ酸51～56において記載されるアミノ酸配列を有するDEループ、および配列番号112のアミノ酸76～92において記載されるアミノ酸配列を有するFGループを含むEGFR結合<sup>10</sup>Fn3を含む抗体様タンパク質二量体である。いくつかの実施形態において、EGFR結合<sup>10</sup>Fn3は、配列番号112に対して少なくとも80、90、95、98、または100%同一のアミノ酸配列を有する。いくつかの実施形態において、IGFIR結合<sup>10</sup>Fn3は、配列番号3に対して少なくとも80、90、95、98、または100%同一のアミノ酸配列を有する。いくつかの実施形態において、E/I結合剤は、配列番号126～133に対して少なくとも80、85、90、95、98、または100%同一のアミノ酸配列を含む。

10

**【0094】**

いくつかの実施形態において、E/I結合剤は、b)配列番号3のアミノ酸21～30において記載されるアミノ酸配列を有するBCループ、配列番号3のアミノ酸51～56において記載されるアミノ酸配列を有するDEループ、および配列番号3のアミノ酸76～83において記載されるアミノ酸配列を有するFGループを含むIGFIR結合<sup>10</sup>Fn3に共有結合または非共有結合した、a)配列番号141のアミノ酸13～22において記載されるアミノ酸配列を有するBCループ、配列番号141のアミノ酸43～48において記載されるアミノ酸配列を有するDEループ、および配列番号141のアミノ酸68～84において記載されるアミノ酸配列を有するFGループを含むEGFR結合<sup>10</sup>Fn3を含む抗体様タンパク質二量体である。いくつかの実施形態において、EGFR結合<sup>10</sup>Fn3は、配列番号140、141、142、または300に対して少なくとも80、90、95、98、または100%同一のアミノ酸配列を有する。いくつかの実施形態において、IGFIR結合<sup>10</sup>Fn3は、配列番号3に対して少なくとも80、90、95、98、または100%同一のアミノ酸配列を有する。いくつかの実施形態において、E/I結合剤は、配列番号149～154に対して少なくとも80、85、90、95、98、または100%同一のアミノ酸配列を含む。

20

30

**【0095】**

いくつかの実施形態において、E/I結合剤は、b)配列番号3のアミノ酸21～30において記載されるアミノ酸配列を有するBCループ、配列番号3のアミノ酸51～56において記載されるアミノ酸配列を有するDEループ、および配列番号3のアミノ酸76～83において記載されるアミノ酸配列を有するFGループを含むIGFIR結合<sup>10</sup>Fn3に共有結合または非共有結合した、a)配列番号156のアミノ酸13～22において記載されるアミノ酸配列を有するBCループ、配列番号156のアミノ酸43～48において記載されるアミノ酸配列を有するDEループ、および配列番号156のアミノ酸68～84において記載されるアミノ酸配列を有するFGループを含むEGFR結合<sup>10</sup>Fn3を含む抗体様タンパク質二量体である。いくつかの実施形態において、EGFR結合<sup>10</sup>Fn3は、配列番号155、156、157、または305に対して少なくとも80、90、95、98、または100%同一のアミノ酸配列を有する。いくつかの実施形態において、IGFIR結合<sup>10</sup>Fn3は、配列番号3に対して少なくとも80、90、95、98、または100%同一のアミノ酸配列を有する。いくつかの実施形態において、E/I結合剤は、配列番号158～166に対して少なくとも80、85、90、95、98、または100%同一のアミノ酸配列を含む。

40

**【0096】**

いくつかの実施形態において、E/I結合剤は、b)配列番号3のアミノ酸21～30において記載されるアミノ酸配列を有するBCループ、配列番号3のアミノ酸51～56

50

において記載されるアミノ酸配列を有するDEループ、および配列番号3のアミノ酸76～83において記載されるアミノ酸配列を有するFGループを含むIGFIR結合<sup>10</sup>Fn3に共有結合または非共有結合した、a)配列番号171のアミノ酸13～22において記載されるアミノ酸配列を有するBCループ、配列番号171のアミノ酸43～48において記載されるアミノ酸配列を有するDEループ、および配列番号171のアミノ酸68～84において記載されるアミノ酸配列を有するFGループを含むEGFR結合<sup>10</sup>Fn3を含む抗体様タンパク質二量体である。いくつかの実施形態において、EGFR結合<sup>10</sup>Fn3は、配列番号170、171、172、または311に対して少なくとも80、90、95、98、または100%同一のアミノ酸配列を有する。いくつかの実施形態において、IGFIR結合<sup>10</sup>Fn3は、配列番号3に対して少なくとも80、90、95、98、または100%同一のアミノ酸配列を有する。いくつかの実施形態において、E/I結合剤は、配列番号179～184に対して少なくとも80、85、90、95、98、または100%同一のアミノ酸配列を含む。

#### 【0097】

いくつかの実施形態において、E/I結合剤は、b)配列番号3のアミノ酸21～30において記載されるアミノ酸配列を有するBCループ、配列番号3のアミノ酸51～56において記載されるアミノ酸配列を有するDEループ、および配列番号3のアミノ酸76～83において記載されるアミノ酸配列を有するFGループを含むIGFIR結合<sup>10</sup>Fn3に共有結合または非共有結合した、a)配列番号186のアミノ酸13～22において記載されるアミノ酸配列を有するBCループ、配列番号186のアミノ酸43～48において記載されるアミノ酸配列を有するDEループ、および配列番号186のアミノ酸68～84において記載されるアミノ酸配列を有するFGループを含むEGFR結合<sup>10</sup>Fn3を含む抗体様タンパク質二量体である。いくつかの実施形態において、EGFR結合<sup>10</sup>Fn3は、配列番号185、186、187、または320に対して少なくとも80、90、95、98、または100%同一のアミノ酸配列を有する。いくつかの実施形態において、IGFIR結合<sup>10</sup>Fn3は、配列番号3に対して少なくとも80、90、95、98、または100%同一のアミノ酸配列を有する。いくつかの実施形態において、E/I結合剤は、配列番号192～197に対して少なくとも80、85、90、95、98、または100%同一のアミノ酸配列を含む。

#### 【0098】

いくつかの実施形態において、E/I結合剤は、b)配列番号3のアミノ酸21～30において記載されるアミノ酸配列を有するBCループ、配列番号3のアミノ酸51～56において記載されるアミノ酸配列を有するDEループ、および配列番号3のアミノ酸76～83において記載されるアミノ酸配列を有するFGループを含むIGFIR結合<sup>10</sup>Fn3に共有結合または非共有結合した、a)配列番号199のアミノ酸13～22において記載されるアミノ酸配列を有するBCループ、配列番号199のアミノ酸43～48において記載されるアミノ酸配列を有するDEループ、および配列番号199のアミノ酸68～84において記載されるアミノ酸配列を有するFGループを含むEGFR結合<sup>10</sup>Fn3を含む抗体様タンパク質二量体である。いくつかの実施形態において、EGFR結合<sup>10</sup>Fn3は、配列番号198、199、200、または327に対して少なくとも80、90、95、98、または100%同一のアミノ酸配列を有する。いくつかの実施形態において、IGFIR結合<sup>10</sup>Fn3は、配列番号3に対して少なくとも80、90、95、98、または100%同一のアミノ酸配列を有する。いくつかの実施形態において、E/I結合剤は、配列番号205～210に対して少なくとも80、85、90、95、98、または100%同一のアミノ酸配列を含む。

#### 【0099】

いくつかの実施形態において、E/I結合剤は、アミノ酸配列X<sub>g</sub>DSGRGSYQX<sub>h</sub>(配列番号40)を有するBCループ、アミノ酸配列X<sub>i</sub>GPVHX<sub>j</sub>(配列番号42)を有するDEループ、およびアミノ酸配列X<sub>k</sub>DHKPHADGPHTYHEx<sub>l</sub>(配列番号44)を有するFGループを含むEGFR結合<sup>10</sup>Fn3に共有結合または非共有

10

20

30

40

50

結合した、アミノ酸配列  $X_a$  S A R L K V A  $X_b$  (配列番号 46) を有する B C ループ、アミノ酸配列  $X_c$  K N V Y  $X_d$  (配列番号 48) を有する D E ループ、およびアミノ酸配列  $X_e$  R F R D Y Q  $X_f$  (配列番号 50) を有する F G ループを含む I G F I R 結合<sup>10</sup> F n 3 を含む抗体様タンパク質二量体であり、ここに、X は任意のアミノ酸であり、a、b、c、d、e、f、g、h、i、j、k、および l は、0～5 から独立して選択される整数である。いくつかの実施形態において、a、g、および l は、2 であり、b～f および i～k は、1 であり、h はゼロである。いくつかの実施形態において、a～l はゼロである。

#### 【0100】

いくつかの実施形態において、E/I 結合剤は、アミノ酸配列 S W D S G R G S Y Q (配列番号 39) を有する B C ループ、アミノ酸配列 P G P V H T (配列番号 41) を有する D E ループ、およびアミノ酸配列 T D H K P H A D G P H T Y H E S P (配列番号 43) を有する F G ループを含む E G F R 結合<sup>10</sup> F n 3 に共有結合または非共有結合した、アミノ酸配列 S W S A R L K V A R (配列番号 45) を有する B C ループ、アミノ酸配列 P K N V Y T (配列番号 47) を有する D E ループ、およびアミノ酸配列 T R F R D Y Q P (配列番号 49) を有する F G ループを含む I G F I R 結合<sup>10</sup> F n 3 を含む抗体様タンパク質二量体である。

#### 【0101】

いくつかの実施形態において、E/I 結合剤は、アミノ酸配列  $X_m$  V A G A E D Y Q  $X_n$  (配列番号 34) を有する B C ループ、アミノ酸配列  $X_o$  H D L V  $X_p$  (配列番号 36) を有する D E ループ、およびアミノ酸配列  $X_q$  D M M H V E Y T E H  $X_r$  (配列番号 38) を有する F G ループを含む E G F R 結合<sup>10</sup> F n 3 に共有結合または非共有結合した、アミノ酸配列  $X_a$  S A R L K V A  $X_b$  (配列番号 46) を有する B C ループ、アミノ酸配列  $X_c$  K N V Y  $X_d$  (配列番号 48) を有する D E ループ、およびアミノ酸配列  $X_e$  R F R D Y Q  $X_f$  (配列番号 50) を有する F G ループを含む I G F I R 結合<sup>10</sup> F n 3 を含む抗体様タンパク質二量体であり、ここに、X は任意のアミノ酸であり、a、b、c、d、e、f、m、n、o、p、q、および r は、0～5 から独立して選択される整数である。いくつかの実施形態において、a および m は、2 であり、b～f および o～r は、1 であり、n はゼロである。いくつかの実施形態において、a～f および m～r はゼロである。

#### 【0102】

いくつかの実施形態において、E/I 結合剤は、アミノ酸配列 S W V A G A E D Y Q (配列番号 33) を有する B C ループ、アミノ酸配列 P H D L V T (配列番号 35) を有する D E ループ、およびアミノ酸配列 T D M M H V E Y T E H P (配列番号 37) を有する F G ループを含む E G F R 結合<sup>10</sup> F n 3 に共有結合または非共有結合した、アミノ酸配列 S W S A R L K V A R (配列番号 45) を有する B C ループ、アミノ酸配列 P K N V Y T (配列番号 47) を有する D E ループ、およびアミノ酸配列 T R F R D Y Q P (配列番号 49) を有する F G ループを含む I G F I R 結合<sup>10</sup> F n 3 を含む抗体様タンパク質二量体である。

#### 【0103】

いくつかの実施形態において、E/I 結合剤は、アミノ酸配列  $X_s$  L P G K L R Y Q  $X_t$  (配列番号 60) を有する B C ループ、アミノ酸配列  $X_u$  H D L R  $X_w$  (配列番号 62) を有する D E ループ、およびアミノ酸配列  $X_y$  N M M H V E Y S E Y  $X_z$  (配列番号 64) を有する F G ループを含む E G F R 結合<sup>10</sup> F n 3 に共有結合または非共有結合した、アミノ酸配列  $X_a$  S A R L K V A  $X_b$  (配列番号 46) を有する B C ループ、アミノ酸配列  $X_c$  K N V Y  $X_d$  (配列番号 48) を有する D E ループ、およびアミノ酸配列  $X_e$  R F R D Y Q  $X_f$  (配列番号 50) を有する F G ループを含む I G F I R 結合<sup>10</sup> F n 3 を含む抗体様タンパク質二量体であり、ここに、X は任意のアミノ酸であり、a、b、c、d、e、f、s、t、u、w、y、および z は、0～5 から独立して選択される整数である。いくつかの実施形態において、a および s は、2 であり、b～f、u、w、y および

10

20

30

40

50

z は、1 であり、t はゼロである。いくつかの実施形態において、a ~ f、s ~ u、w、y および z はゼロである。

【0104】

いくつかの実施形態において、E/I 結合剤は、アミノ酸配列 SWLPGLRYQ (配列番号 59) を有する BC ループ、アミノ酸配列 PHDLRT (配列番号 61) を有する DE ループ、およびアミノ酸配列 TNMMHVEYSEYP (配列番号 63) を有する FG ループを含む EGFR 結合<sup>10</sup>Fn3 に共有結合または非共有結合した、アミノ酸配列 SWSARLKVAR (配列番号 45) を有する BC ループ、アミノ酸配列 PKNVYT (配列番号 47) を有する DE ループ、およびアミノ酸配列 TRFRDYQP (配列番号 49) を有する FG ループを含む IGFI R 結合<sup>10</sup>Fn3 を含む抗体様タンパク質二量体である。

10

【0105】

いくつかの実施形態において、E/I 結合剤は、アミノ酸配列 X<sub>g</sub>HERDGS RQX<sub>h</sub> (配列番号 134) を有する BC ループ、アミノ酸配列 X<sub>i</sub>GGVRX<sub>j</sub> (配列番号 135) を有する DE ループ、およびアミノ酸配列 X<sub>k</sub>DYFNPTTHEYIYQT TX<sub>l</sub> (配列番号 136) を有する FG ループを含む EGFR 結合<sup>10</sup>Fn3 に共有結合または非共有結合した、アミノ酸配列 X<sub>a</sub>SARLKVA X<sub>b</sub> (配列番号 46) を有する BC ループ、アミノ酸配列 X<sub>c</sub>KNVYX<sub>d</sub> (配列番号 48) を有する DE ループ、およびアミノ酸配列 X<sub>e</sub>RFRDYQX<sub>f</sub> (配列番号 50) を有する FG ループを含む IGFI R 結合<sup>10</sup>Fn3 を含む抗体様タンパク質二量体であり、ここに、X は任意のアミノ酸であり、a、b、c、d、e、f、g、h、i、j、k、および l は、0 ~ 5 から独立して選択される整数である。いくつかの実施形態において、a および g は、2 であり、b ~ f および i ~ l は、1 であり、h はゼロである。いくつかの実施形態において、a ~ l はゼロである。

20

【0106】

いくつかの実施形態において、E/I 結合剤は、アミノ酸配列 SWHERDGS RQ (配列番号 109) を有する BC ループ、アミノ酸配列 PGGVRT (配列番号 110) を有する DE ループ、およびアミノ酸配列 TDYFNPTTHEYIYQT TP (配列番号 111) を有する FG ループを含む EGFR 結合<sup>10</sup>Fn3 に共有結合または非共有結合した、アミノ酸配列 SWSARLKVAR (配列番号 45) を有する BC ループ、アミノ酸配列 PKNVYT (配列番号 47) を有する DE ループ、およびアミノ酸配列 TRFRDYQP (配列番号 49) を有する FG ループを含む IGFI R 結合<sup>10</sup>Fn3 を含む抗体様タンパク質二量体である。

30

【0107】

いくつかの実施形態において、E/I 結合剤は、アミノ酸配列 X<sub>g</sub>WAPVDRYQX<sub>h</sub> (配列番号 137) を有する BC ループ、アミノ酸配列 X<sub>i</sub>RDVYX<sub>j</sub> (配列番号 138) を有する DE ループ、およびアミノ酸配列 X<sub>k</sub>DYKPHADGPHTYHESX<sub>l</sub> (配列番号 139) を有する FG ループを含む EGFR 結合<sup>10</sup>Fn3 に共有結合または非共有結合した、アミノ酸配列 X<sub>a</sub>SARLKVA X<sub>b</sub> (配列番号 46) を有する BC ループ、アミノ酸配列 X<sub>c</sub>KNVYX<sub>d</sub> (配列番号 48) を有する DE ループ、およびアミノ酸配列 X<sub>e</sub>RFRDYQX<sub>f</sub> (配列番号 50) を有する FG ループを含む IGFI R 結合<sup>10</sup>Fn3 を含む抗体様タンパク質二量体であり、ここに、X は任意のアミノ酸であり、a、b、c、d、e、f、g、h、i、j、k、および l は、0 ~ 5 から独立して選択される整数である。いくつかの実施形態において、a および g は、2 であり、b ~ f および i ~ l は、1 であり、h はゼロである。いくつかの実施形態において、a ~ l はゼロである。

40

【0108】

いくつかの実施形態において、E/I 結合剤は、アミノ酸配列 SWWAPVDRYQ (配列番号 115) を有する BC ループ、アミノ酸配列 PRDVYT (配列番号 116) を有する DE ループ、およびアミノ酸配列 TDYKPHADGPHTYHESP (配列番号

50

117) を有するFGループを含むEGFR結合<sup>10</sup>Fn3に共有結合または非共有結合した、アミノ酸配列SWSARLKVAR (配列番号45) を有するBCループ、アミノ酸配列PKNVYT (配列番号47) を有するDEループ、およびアミノ酸配列TRFRDYQP (配列番号49) を有するFGループを含むIGFIR結合<sup>10</sup>Fn3を含む抗体様タンパク質二量体である。

#### 【0109】

いくつかの実施形態において、E/I結合剤は、アミノ酸配列X<sub>g</sub>TQGSTHYQX<sub>h</sub> (配列番号146) を有するBCループ、アミノ酸配列X<sub>i</sub>GMVYX<sub>j</sub> (配列番号147) を有するDEループ、およびアミノ酸配列X<sub>k</sub>DYFDRSTHEYKYRTTX<sub>l</sub> (配列番号148) を有するFGループを含むEGFR結合<sup>10</sup>Fn3に共有結合または非共有結合した、アミノ酸配列X<sub>a</sub>SARLKVAX<sub>b</sub> (配列番号46) を有するBCループ、アミノ酸配列X<sub>c</sub>KNVYX<sub>d</sub> (配列番号48) を有するDEループ、およびアミノ酸配列X<sub>e</sub>RFRDYQX<sub>f</sub> (配列番号50) を有するFGループを含むIGFIR結合<sup>10</sup>Fn3を含む抗体様タンパク質二量体であり、ここに、Xは任意のアミノ酸であり、a、b、c、d、e、f、g、h、i、j、k、およびlは、0～5から独立して選択される整数である。いくつかの実施形態において、aおよびgは、2であり、b～fおよびi～lは、1であり、hはゼロである。いくつかの実施形態において、a～lはゼロである。

10

#### 【0110】

いくつかの実施形態において、E/I結合剤は、アミノ酸配列SWTQGSTHYQ (配列番号143) を有するBCループ、アミノ酸配列PGMVYT (配列番号144) を有するDEループ、およびアミノ酸配列TDYFDRSTHEYKYRTTP (配列番号145) を有するFGループを含むEGFR結合<sup>10</sup>Fn3に共有結合または非共有結合した、アミノ酸配列SWSARLKVAR (配列番号45) を有するBCループ、アミノ酸配列PKNVYT (配列番号47) を有するDEループ、およびアミノ酸配列TRFRDYQP (配列番号49) を有するFGループを含むIGFIR結合<sup>10</sup>Fn3を含む抗体様タンパク質二量体である。

20

#### 【0111】

いくつかの実施形態において、E/I結合剤は、アミノ酸配列X<sub>g</sub>YWEGLPYQX<sub>h</sub> (配列番号161) を有するBCループ、アミノ酸配列X<sub>i</sub>RDVNX<sub>j</sub> (配列番号162) を有するDEループ、およびアミノ酸配列X<sub>k</sub>DWYNPDTHEYIYHTIX<sub>l</sub> (配列番号163) を有するFGループを含むEGFR結合<sup>10</sup>Fn3に共有結合または非共有結合した、アミノ酸配列X<sub>a</sub>SARLKVAX<sub>b</sub> (配列番号46) を有するBCループ、アミノ酸配列X<sub>c</sub>KNVYX<sub>d</sub> (配列番号48) を有するDEループ、およびアミノ酸配列X<sub>e</sub>RFRDYQX<sub>f</sub> (配列番号50) を有するFGループを含むIGFIR結合<sup>10</sup>Fn3を含む抗体様タンパク質二量体であり、ここに、Xは任意のアミノ酸であり、a、b、c、d、e、f、g、h、i、j、k、およびlは、0～5から独立して選択される整数である。いくつかの実施形態において、aおよびgは、2であり、b～fおよびi～lは、1であり、hはゼロである。いくつかの実施形態において、a～lはゼロである。

30

40

#### 【0112】

いくつかの実施形態において、E/I結合剤は、アミノ酸配列SWYWEGLPYQ (配列番号158) を有するBCループ、アミノ酸配列PRDVNT (配列番号159) を有するDEループ、およびアミノ酸配列TDWYNPDTHEYIYHTIP (配列番号160) を有するFGループを含むEGFR結合<sup>10</sup>Fn3に共有結合または非共有結合した、アミノ酸配列SWSARLKVAR (配列番号45) を有するBCループ、アミノ酸配列PKNVYT (配列番号47) を有するDEループ、およびアミノ酸配列TRFRDYQP (配列番号49) を有するFGループを含むIGFIR結合<sup>10</sup>Fn3を含む抗体様タンパク質二量体である。

#### 【0113】

50

いくつかの実施形態において、E/I結合剤は、アミノ酸配列 $X_g$  A S N R G T Y Q  $X_h$  (配列番号176)を有するBCループ、アミノ酸配列 $X_i$  G G V S  $X_j$  (配列番号177)を有するDEループ、およびアミノ酸配列 $X_k$  D A F N P T T H E Y N Y F T T  $X_l$  (配列番号178)を有するFGループを含むEGFR結合 $^{10}Fn3$ に共有結合または非共有結合した、アミノ酸配列 $X_a$  S A R L K V A  $X_b$  (配列番号46)を有するBCループ、アミノ酸配列 $X_c$  K N V Y  $X_d$  (配列番号48)を有するDEループ、およびアミノ酸配列 $X_e$  R F R D Y Q  $X_f$  (配列番号50)を有するFGループを含むIGFIR結合 $^{10}Fn3$ を含む抗体様タンパク質二量体であり、ここに、Xは任意のアミノ酸であり、a、b、c、d、e、f、g、h、i、j、k、およびlは、0~5から独立して選択される整数である。いくつかの実施形態において、aおよびgは、2であり、b~fおよびi~lは、1であり、hはゼロである。いくつかの実施形態において、a~lはゼロである。

10

**【0114】**

いくつかの実施形態において、E/I結合剤は、アミノ酸配列S W A S N R G T Y Q (配列番号173)を有するBCループ、アミノ酸配列P G G V S T (配列番号174)を有するDEループ、およびアミノ酸配列T D A F N P T T H E Y N Y F T T P (配列番号175)を有するFGループを含むEGFR結合 $^{10}Fn3$ に共有結合または非共有結合した、アミノ酸配列S W S A R L K V A R (配列番号45)を有するBCループ、アミノ酸配列P K N V Y T (配列番号47)を有するDEループ、およびアミノ酸配列T R F R D Y Q P (配列番号49)を有するFGループを含むIGFIR結合 $^{10}Fn3$ を含む抗体様タンパク質二量体である。

20

**【0115】**

いくつかの実施形態において、E/I結合剤は、アミノ酸配列 $X_g$  D A P T S R Y Q  $X_h$  (配列番号190)を有するBCループ、アミノ酸配列 $X_i$  G G L S  $X_j$  (配列番号191)を有するDEループ、およびアミノ酸配列 $X_k$  D Y K P H A D G P H T Y H E S  $X_l$  (配列番号139)を有するFGループを含むEGFR結合 $^{10}Fn3$ に共有結合または非共有結合した、アミノ酸配列 $X_a$  S A R L K V A  $X_b$  (配列番号46)を有するBCループ、アミノ酸配列 $X_c$  K N V Y  $X_d$  (配列番号48)を有するDEループ、およびアミノ酸配列 $X_e$  R F R D Y Q  $X_f$  (配列番号50)を有するFGループを含むIGFIR結合 $^{10}Fn3$ を含む抗体様タンパク質二量体であり、ここに、Xは任意のアミノ酸であり、a、b、c、d、e、f、g、h、i、j、k、およびlは、0~5から独立して選択される整数である。いくつかの実施形態において、aおよびgは、2であり、b~fおよびi~lは、1であり、hはゼロである。いくつかの実施形態において、a~lはゼロである。

30

**【0116】**

いくつかの実施形態において、E/I結合剤は、アミノ酸配列S W D A P T S R Y Q (配列番号188)を有するBCループ、アミノ酸配列P G G L S T (配列番号189)を有するDEループ、およびアミノ酸配列T D Y K P H A D G P H T Y H E S P (配列番号117)を有するFGループを含むEGFR結合 $^{10}Fn3$ に共有結合または非共有結合した、アミノ酸配列S W S A R L K V A R (配列番号45)を有するBCループ、アミノ酸配列P K N V Y T (配列番号47)を有するDEループ、およびアミノ酸配列T R F R D Y Q P (配列番号49)を有するFGループを含むIGFIR結合 $^{10}Fn3$ を含む抗体様タンパク質二量体である。

40

**【0117】**

いくつかの実施形態において、E/I結合剤は、アミノ酸配列 $X_g$  D A G A V T Y Q  $X_h$  (配列番号203)を有するBCループ、アミノ酸配列 $X_i$  G G V R  $X_j$  (配列番号135)を有するDEループ、およびアミノ酸配列 $X_k$  D Y K P H A D G P H T Y H E Y  $X_l$  (配列番号204)を有するFGループを含むEGFR結合 $^{10}Fn3$ に共有結合または非共有結合した、アミノ酸配列 $X_a$  S A R L K V A  $X_b$  (配列番号46)を有するBCループ、アミノ酸配列 $X_c$  K N V Y  $X_d$  (配列番号48)を有するDEループ、およびアミ

50

ノ酸配列  $X_e R F R D Y Q X_f$  (配列番号 50) を有する F G ループを含む I G F I R 結合  $^{10} F n 3$  を含む抗体様タンパク質二量体であり、ここに、X は任意のアミノ酸であり、a、b、c、d、e、f、g、h、i、j、k、および l は、0～5 から独立して選択される整数である。いくつかの実施形態において、a および g は、2 であり、b～f および i～l は、1 であり、h はゼロである。いくつかの実施形態において、a～l はゼロである。

#### 【0118】

いくつかの実施形態において、E/I 結合剤は、アミノ酸配列 S W D A G A V T Y Q (配列番号 201) を有する B C ループ、アミノ酸配列 P G G V R T (配列番号 110) を有する D E ループ、およびアミノ酸配列 T D Y K P H A D G P H T Y H E Y P (配列番号 202) を有する F G ループを含む E G F R 結合  $^{10} F n 3$  に共有結合または非共有結合した、アミノ酸配列 S W S A R L K V A R (配列番号 45) を有する B C ループ、アミノ酸配列 P K N V Y T (配列番号 47) を有する D E ループ、およびアミノ酸配列 T R F R D Y Q P (配列番号 49) を有する F G ループを含む I G F I R 結合  $^{10} F n 3$  を含む抗体様タンパク質二量体である。

#### 【0119】

いくつかの実施形態において、E/I 結合剤は、b) 配列番号 219～327 のいずれか 1 つにおいて記載される、B C、D E、および F G ループを含む E G F R 結合  $^{10} F n 3$  に共有結合または非共有結合した、a) 配列番号 3 のアミノ酸 23～29 において記載されるアミノ酸配列を有する B C ループ、配列番号 3 のアミノ酸 52～55 において記載されるアミノ酸配列を有する D E ループ、および配列番号 3 のアミノ酸 77～82 において記載されるアミノ酸配列を有する F G ループを含む I G F I R 結合  $^{10} F n 3$  を含む抗体様タンパク質二量体である (たとえば図 45 を参照されたい。それぞれの E G F R 結合  $^{10} F n 3$  の B C、D E、および F G ループ配列には下線を引く)。いくつかの実施形態において、E/I 結合剤は、b) 配列番号 5～8、52、66～68、106～108、112～114、140～142、155～157、170～172、182、185～187、198～200、または 219～327 のいずれか 1 つの、配列番号 1 のアミノ酸残基 23～30 に対応するアミノ酸において記載されるアミノ酸配列を有する B C ループ、配列番号 5～8、52、66～68、106～108、112～114、140～142、155～157、170～172、182、185～187、198～200、または 219～327 のいずれか 1 つの、配列番号 1 のアミノ酸残基 52～55 に対応するアミノ酸において記載されるアミノ酸配列を有する D E ループ、および配列番号 15～8、52、66～68、106～108、112～114、140～142、155～157、170～172、182、185～187、198～200、または 219～327 のアミノ酸残基 77～86 に対応するアミノ酸において記載されるアミノ酸配列を有する F G ループを含む E G F R 結合  $^{10} F n 3$  に共有結合または非共有結合した、a) 配列番号 3 のアミノ酸 23～29 において記載されるアミノ酸配列を有する B C ループ、配列番号 3 のアミノ酸 52～55 において記載されるアミノ酸配列を有する D E ループ、および配列番号 3 のアミノ酸 77～82 において記載されるアミノ酸配列を有する F G ループを含む I G F I R 結合  $^{10} F n 3$  を含む抗体様タンパク質二量体である。いくつかの実施形態において、抗体様タンパク質二量体の E G F R 結合  $^{10} F n 3$  は、配列番号 5～8、52、66～68、106～108、112～114、140～142、155～157、170～172、182、185～187、198～200、または 219～327 のいずれか 1 つの、配列番号 1 の E 9～配列番号 1 の T 94 に対応するアミノ酸残基のアミノ酸配列に対して少なくとも 80、90、95、または 100% 同一のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態において、抗体様タンパク質二量体の I G F I R 結合  $^{10} F n 3$  は、配列番号 3 の、配列番号 1 の E 9～配列番号 1 の T 94 に対応するアミノ酸残基のアミノ酸配列に対して少なくとも 80、90、95、98、99、または 100% 同一のアミノ酸配列を有する。いくつかの実施形態において、E/I 結合剤は、配列番号 20～31、53～58、87～92、98～105、118～133、149～154、164～

10

20

30

40

50

169、179～184、192～197、205～210、および211～216のいずれか1つに対して少なくとも80、85、90、95、98、99、または100%同一のアミノ酸配列を含む。

【0120】

好ましくは、本明細書において定義されるXは、天然に存在するアミノ酸である。

【0121】

ある実施形態において、本明細書において記載されるE結合剤またはE/I結合剤のEおよび/もしくはI単量体は、配列番号1のセリン62またはセリン91に対応する位置に、SerからCysへのアミノ酸置換を含有してもよい。

【0122】

ある態様において、本開示は、EGFR結合を仲介する短いペプチド配列を提供する。そのような配列の例は、配列番号5、7、82、106、112、141、156、171、186および199由来のBC、DE、およびFGループに相当するアミノ酸残基を含む。そのような配列の他の例は、配列番号219～327由来のBC、DE、およびFGループに相当するアミノ酸残基を含む。いくつかの実施形態において、ペプチドは、500nM、100nM、50nM、5nMまたはそれ以下より低い解離定数( $K_D$ )でそれぞれのリガンドに結合する。そのような配列は、単離形態でまたは免疫グロブリンもしくは免疫グロブリン様ドメインなどの特定のタンパク質構造の中に挿入された場合にリガンド結合を仲介する。

【0123】

一実施形態において、抗体様タンパク質二量体は、構造A-B-Cを有するポリペプチドを含み、ここに、Aは、EGFRに結合する $^{10}$ Fn3ドメインを含む、それから本質的に成る、またはそれから成るポリペプチドであり、Bは、ポリペプチドリンカーであり、Cは、IGF-IRに結合する $^{10}$ Fn3ドメインを含む、それから本質的に成る、それから成るポリペプチドである。他の実施形態において、抗体様タンパク質二量体は、構造A-B-Cを有するポリペプチドを含み、ここに、Aは、IGF-IRに結合する $^{10}$ Fn3ドメインを含む、それから本質的に成る、またはそれから成るポリペプチドであり、Bは、ポリペプチドリンカーであり、Cは、EGFRに結合する $^{10}$ Fn3ドメインを含む、それから本質的に成る、それから成るポリペプチドである。構造A-B-Cを有する抗体様タンパク質二量体の特定の例は、(i)配列番号20～31、53～58、87～92、98～105、118～133、149～154、164～169、179～184、192～197、205～210、および211～216のいずれか1つにおいて記載されるアミノ酸配列を有するポリペプチドまたは(ii)配列番号20～31、53～58、87～92、98～105、118～133、149～154、164～169、179～184、192～197、205～210、および211～216において記載されるアミノ酸配列のいずれか1つに対して少なくとも85%、90%、95%、97%、98%、または99%同一のアミノ酸配列を含むポリペプチドを含むポリペプチドである。

【0124】

ある実施形態において、A領域またはC領域は、EGFRに結合する $^{10}$ Fn3ドメインを含むポリペプチドであり、 $^{10}$ Fn3ドメインは、N末端からC末端に構造：ベータストランドA、ループAB、ベータストランドB、ループBC、ベータストランドC、ループCD、ベータストランドD、ループDE、ベータストランドE、ループEF、ベータストランドF、ループFG、ベータストランドGを有し、(i)BCループは、配列番号33もしくは34のアミノ酸配列を有し、DEループは、配列番号35もしくは36のアミノ酸配列を有し、FGループは、配列番号37もしくは38のアミノ酸配列を有し、(ii)BCループは、配列番号39もしくは40のアミノ酸配列を有し、DEループは、配列番号41もしくは42のアミノ酸配列を有し、FGループは、配列番号43もしくは44のアミノ酸配列を有し、(iii)BCループは、配列番号59もしくは60のアミノ酸配列を有し、DEループは、配列番号61もしくは62のアミノ酸配列を有し、FG

ループは、配列番号 63 もしくは 64 のアミノ酸配列を有し、(iv) BC ループは、配列番号 109 もしくは 134 のアミノ酸配列を有し、DE ループは、配列番号 110 もしくは 135 のアミノ酸配列を有し、FG ループは、配列番号 111 もしくは 136 のアミノ酸配列を有し、(v) BC ループは、配列番号 115 もしくは 137 のアミノ酸配列を有し、DE ループは、配列番号 116 もしくは 138 のアミノ酸配列を有し、FG ループは、配列番号 117 もしくは 139 のアミノ酸配列を有し、(vi) BC ループは、配列番号 143 もしくは 146 のアミノ酸配列を有し、DE ループは、配列番号 144 もしくは 147 のアミノ酸配列を有し、FG ループは、配列番号 145 もしくは 148 のアミノ酸配列を有し、(vii) BC ループは、配列番号 158 もしくは 161 のアミノ酸配列を有し、DE ループは、配列番号 159 もしくは 162 のアミノ酸配列を有し、FG ループは、配列番号 160 もしくは 163 のアミノ酸配列を有し、(viii) BC ループは、配列番号 173 もしくは 176 のアミノ酸配列を有し、DE ループは、配列番号 174 もしくは 177 のアミノ酸配列を有し、FG ループは、配列番号 175 もしくは 178 のアミノ酸配列を有し、(ix) BC ループは、配列番号 188 もしくは 190 のアミノ酸配列を有し、DE ループは、配列番号 189 もしくは 191 のアミノ酸配列を有し、FG ループは、配列番号 117 もしくは 139 のアミノ酸配列を有し、(x) BC ループは、配列番号 201 もしくは 203 のアミノ酸配列を有し、DE ループは、配列番号 110 もしくは 135 のアミノ酸配列を有し、FG ループは、配列番号 202 もしくは 204 のアミノ酸配列を有し、または (xi) BC、DE、および FG ループは、配列番号 219 ~ 327 のいずれか 1 つにおいて記載されるアミノ酸配列を有し（たとえば図 45 を参照されたい。配列番号 219 ~ 327 のそれぞれの BC、DE、および FG ループには下線を引く）、<sup>10</sup>Fn3 ドメインは、フォールドして、抗体重鎖可変領域様構造になり、ポリペプチドは、100 nM 未満の K<sub>D</sub> で EGFR に結合する。EGFR に結合する <sup>10</sup>Fn3 ドメインは、好ましくは、フォールドして、7 つのベータストランドが互いに包み合う 2 つのベータシートの間分布して、安定したコアを形成し、ベータストランドが溶媒に曝露されている 6 つのループによって結合された構造になる。例示的な実施形態において、<sup>10</sup>Fn3 ドメインは、80 ~ 150 アミノ酸長である。

10

20

**【0125】**

例示的な実施形態において、A 領域または C 領域は、下記に示される配列番号 83 ~ 85 および 466 ~ 472 から成る群から選択される配列を有する、100 nM 未満の K<sub>D</sub> で EGFR に結合する <sup>10</sup>Fn3 ドメインである。

30

## 【化 2】

E V V A A T X<sub>n1</sub> S L L I X<sub>a1</sub> S W V A G A E D Y Q X<sub>a2</sub> Y Y R I T Y G E X<sub>n2</sub> Q E F T V X<sub>a3</sub>  
P H D L V T X<sub>a4</sub> A T I X<sub>n3</sub> D Y T I T V Y A V X<sub>a5</sub> T D M M H V E Y T E H P X<sub>a6</sub> I S I N Y R  
T ( 配列番号 8 3 ) ;

E V V A A T X<sub>n1</sub> S L L I X<sub>a1</sub> S W D S G R G S Y Q X<sub>a2</sub> Y Y R I T Y G E X<sub>n2</sub> Q E F T V X<sub>a3</sub>  
P G P V H T X<sub>a4</sub> A T I X<sub>n3</sub> D Y T I T V Y A V X<sub>a5</sub> T D H K P H A D G P H T Y H E S P X<sub>a6</sub> I  
S I N Y R T ( 配列番号 8 4 ) ; または

E V V A A T X<sub>n1</sub> S L L I X<sub>a1</sub> S W L P G K L R Y Q X<sub>a2</sub> Y Y R I T Y G E X<sub>n2</sub> Q E F T V X<sub>a3</sub>  
P H D L R T X<sub>a4</sub> A T I X<sub>n3</sub> D Y T I T V Y A V X<sub>a5</sub> T N M M H V E Y S E Y P X<sub>a6</sub> I S I N Y R  
T ( 配列番号 8 5 ) 。

10

E V V A A T X<sub>n1</sub> S L L I X<sub>a1</sub> S W H E R D G S R Q X<sub>a2</sub> Y Y R I T Y G E X<sub>n2</sub> Q E F T V X<sub>a3</sub>  
P G G V R T X<sub>a4</sub> A T I X<sub>n3</sub> D Y T I T V Y A V X<sub>a5</sub> T D Y F N P T T H E Y I Y Q T T P X<sub>a6</sub> I  
S I N Y R T ( 配列番号 4 6 6 ) 。

E V V A A T X<sub>n1</sub> S L L I X<sub>a1</sub> S W W A P V D R Y Q X<sub>a2</sub> Y Y R I T Y G E X<sub>n2</sub> Q E F T V X<sub>a3</sub>  
P R D V Y T X<sub>a4</sub> A T I X<sub>n3</sub> D Y T I T V Y A V X<sub>a5</sub> T D Y K P H A D G P H T Y H E S P X<sub>a6</sub> I  
S I N Y R T ( 配列番号 4 6 7 ) 。

E V V A A T X<sub>n1</sub> S L L I X<sub>a1</sub> S W T Q G S T H Y Q X<sub>a2</sub> Y Y R I T Y G E X<sub>n2</sub> Q E F T V X<sub>a3</sub>  
P G M V Y T X<sub>a4</sub> A T I X<sub>n3</sub> D Y T I T V Y A V X<sub>a5</sub> T D Y F D R S T H E Y K Y R T T P X<sub>a6</sub> I  
S I N Y R T ( 配列番号 4 6 8 ) 。

20

E V V A A T X<sub>n1</sub> S L L I X<sub>a1</sub> S W Y W E G L P Y Q X<sub>a2</sub> Y Y R I T Y G E X<sub>n2</sub> Q E F T V X<sub>a3</sub>  
P R D V N T X<sub>a4</sub> A T I X<sub>n3</sub> D Y T I T V Y A V X<sub>a5</sub> T D W Y N P D T H E Y I Y H T I P X<sub>a6</sub> I  
S I N Y R T ( 配列番号 4 6 9 ) 。

E V V A A T X<sub>n1</sub> S L L I X<sub>a1</sub> S W A S N R G T Y Q X<sub>a2</sub> Y Y R I T Y G E X<sub>n2</sub> Q E F T V X<sub>a3</sub>  
P G G V S T X<sub>a4</sub> A T I X<sub>n3</sub> D Y T I T V Y A V X<sub>a5</sub> T D A F N P T T H E Y N Y F T T P X<sub>a6</sub> I  
S I N Y R T ( 配列番号 4 7 0 ) 。

E V V A A T X<sub>n1</sub> S L L I X<sub>a1</sub> S W D A P T S R Y Q X<sub>a2</sub> Y Y R I T Y G E X<sub>n2</sub> Q E F T V X<sub>a3</sub>  
P G G L S T X<sub>a4</sub> A T I X<sub>n3</sub> D Y T I T V Y A V X<sub>a5</sub> T D Y K P H A D G P H T Y H E S P X<sub>a6</sub> I  
S I N Y R T ( 配列番号 4 7 1 ) 。

E V V A A T X<sub>n1</sub> S L L I X<sub>a1</sub> S W D A G A V T Y Q X<sub>a2</sub> Y Y R I T Y G E X<sub>n2</sub> Q E F T V X<sub>a3</sub>  
P G G V R T X<sub>a4</sub> A T I X<sub>n3</sub> D Y T I T V Y A V X<sub>a5</sub> T D Y K P H A D G P H T Y H E Y P X<sub>a6</sub> I  
S I N Y R T ( 配列番号 4 7 2 ) 。

30

## 【0 1 2 6】

配列番号 8 3～8 5 および 4 6 6～4 7 2 において、B C、D E、および F G ループは、太字で示される固定配列を有し、または太字で示される配列に対して少なくとも 7 5 %、8 0 %、8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 7 %、9 8 %、もしくは 9 9 % 同一の配列を有し、A B ループは、X<sub>n1</sub> によって表わされ、C D は、X<sub>n2</sub> によって表わされ、E F ループは、X<sub>n3</sub> によって表わされ、ベータストランド A～G には、下線を引く。X は、任意のアミノ酸を表わし、X に後続する下付き文字は、アミノ酸の数の整数を表わす。特に、n 1 は、約 1～1 5、2～1 5、1～1 0、2～1 0、1～8、2～8、1～5、2～5、1～4、2～4、1～3、2～3、または 1～2 個のアミノ酸であってもよく、n 2 および n 3 は、それぞれ、独立して、約 2～2 0、2～1 5、2～1 0、2～8、5～2 0、5～1 5、5～1 0、5～8、6～2 0、6～1 5、6～1 0、6～8、2～7、5～7、または 6～7 個のアミノ酸であってもよく、a 1～a 6 は、それぞれ、独立して、約 0～1 0、0～5、1～1 0、1～5、または 2～5 のアミノ酸を含んでもよい。好ましい実施形態において、n 1 は 2 アミノ酸であり、n 2 は 7 アミノ酸であり、n 3 は 7 アミノ酸であり、a 1～a 6 は 0 アミノ酸である。ベータストランドの配列は、配列番号 1 において示される対応するアミノ酸に比べて、7 つのスキファールド領域すべてにわたって、約 0～1 0、0～8、0～6、0～5、0～4、0～3、0～2、または 0～1 個の

40

50

置換、欠失、または付加を有していてもよい。例示的な実施形態において、ベータストランドの配列は、配列番号1において示される対応するアミノ酸に比べて、7つのスキップ領域すべてにわたって、約0～10、0～8、0～6、0～5、0～4、0～3、0～2、または0～1個の保存的置換を有していてもよい。ある実施形態において、コアアミノ酸残基は、固定されており、任意の置換、保存的置換、欠失、または付加は、コアアミノ酸残基以外の残基で生じる。ある実施形態において、EGFR結合剤は、以下のアミノ酸配列のうちの1つによって表わされる。

### 【化3】

EVVAATPTSLLISWVAGAEDYQYYRITYGETGGNSPVQEFTVPHDL  
VTATISGLKPGVDYTITVYAVTDMMHVEYTEHPISINYRT (配列番号66) ;

10

EVVAATPTSLLISWDSGRGSYQYYRITYGETGGNSPVQEFTVPGPV  
HTATISGLKPGVDYTITVYAVTDHKPHADGPHTYHESPISINYRT (配列番号67) ;

EVVAATPTSLLISWLPGKLRQYYRITYGETGGNSPVQEFTVPHDL  
RTATISGLKPGVDYTITVYAVTNMMHVEYSEYPISINYRT (配列番号68) ;

EVVAATPTSLLISWHERDGSRQYYRITYGETGGNSPVQEFTVPGGV  
RTATISGLKPGVDYTITVYAVTDYFNPTTHEYIYQTTPISINYRT (配列番号108) ; または

20

EVVAATPTSLLISWWAPVDRYQYYRITYGETGGNSPVQEFTVPRDV  
YTATISGLKPGVDYTITVYAVTDYKPHADGPHTYHESPISINYRT (配列番号114) 。

EVVAATPTSLLISWTQGSTHYQYYRITYGETGGNSPVQEFTVPGMV  
YTATISGLKPGVDYTITVYAVTDYFDRSTHEYKYRTTPISINYRT (配列番号141)

EVVAATPTSLLISWYWEGLPYQYYRITYGETGGNSPVQEFTVPRDV  
NTATISGLKPGVDYTITVYAVTDWYNPDTHEYIYHTIPISINYRT (配列番号156)

EVVAATPTSLLISWASNRGTYQYYRITYGETGGNSPVQEFTVPGGV  
STATISGLKPGVDYTITVYAVTDAFNPTTHEYNYFTTPISINYRT (配列番号171)

30

EVVAATPTSLLISWDAPTSRYQYYRITYGETGGNSPVQEFTVPGGL  
STATISGLKPGVDYTITVYAVTDYKPHADGPHTYHESPISINYRT (配列番号186)

E112

EVVAATPTSLLISWDAGAVTYQYYRITYGETGGNSPVQEFTVPGGV  
RTATISGLKPGVDYTITVYAVTDYKPHADGPHTYHEYPISINYRT (配列番号199)

40

### 【0127】

配列番号66～68、108、114、141、156、171、186、および199において、BC、DE、およびFGループの配列は、太字で示される固定配列を有し、または太字で示される配列に対して少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一の配列を有し、下線を引いた残りの配列（たとえば7つのベータストランドならびにAB、CD、およびEFループの配列）は、配列番号66～68、108、114、141、156、171、186、および199において示される対応するアミノ酸に比べて、約0～20、0～15、0～10、0～8、0～6、0～5、0～4、0～3、0～2、または0～1個の置換、保存的置換、欠失、または付加を有する。ある実施形態において、コアアミノ酸残基は、固定されており、任意の置

50

換、保存的置換、欠失、または付加は、コアアミノ酸残基以外の残基で生じる。EGFRに結合する<sup>10</sup>F<sub>n</sub>3ドメインは、所望により、1～20、1～15、1～10、1～8、1～5、1～4、1～3、1～2、または1アミノ酸長のN末端伸長を含んでいてもよい。例示的なN末端伸長（1文字アミノ酸コードによって表わされる）は、M、MG、G、MGVSDVPRDL（配列番号69）、GVSDVPRDL（配列番号70）、およびVSDVPRDL（配列番号71）または配列番号69、70、もしくは71のいずれか1つのN末端切断型を含む。他の適したN末端伸長は、たとえば、X<sub>n</sub>SDVPRDL（配列番号72）、X<sub>n</sub>DVPRDL（配列番号73）、X<sub>n</sub>VPRDL（配列番号74）、X<sub>n</sub>PRDL（配列番号75）、X<sub>n</sub>RDL（配列番号76）、X<sub>n</sub>DL（配列番号77）、またはX<sub>n</sub>Lを含み、n=0、1、または2アミノ酸であり、n=1である場合、XはMetまたはGlyであり、n=2である場合、XはMet-Glyである。EGFRに結合する<sup>10</sup>F<sub>n</sub>3ドメインは、所望により、C末端テールを含んでいてもよい。例示的なC末端テールは、1～20、1～15、1～10、1～8、1～5、1～4、1～3、1～2、または1アミノ酸長のポリペプチドを含む。C末端テールの特定の例は、EIDKPSQ（配列番号9）、EIDKPCQ（配列番号10）、およびEIDK（配列番号78）を含む。他の実施形態において、適したC末端テールは、たとえば、以下のアミノ酸配列（1文字アミノ酸コードによって表わされる）：E、EI、EID、EIDKP（配列番号79）、EIDKPS（配列番号80）、またはEIDKPC（配列番号81）のうちの1つを含む、配列番号9、10、または78のC末端切断型断片であってもよい。他の適したC末端テールは、たとえば、ES、EC、EGS、EGC、EGSGS（配列番号96）、EGSGC（配列番号97）、またはEIEK（配列番号217）を含む。ある実施形態において、EGFRに結合する<sup>10</sup>F<sub>n</sub>3ドメインは、N末端伸長およびC末端テールの両方を含む。例示的な実施形態において、A領域は、GlyまたはMet-Glyで始まるN末端伸長およびシステイン残基を含有していないC末端伸長を含み、B領域は、Metで始まらないN末端伸長およびシステイン残基を含むC末端伸長を含む。EGFRに結合する<sup>10</sup>F<sub>n</sub>3ドメインの特定の例は、(i) 配列番号5～8、52、66～68、82～85、106～108、112～114、140～142、155～157、170～172、185～187、198～200、および219～327のいずれか1つにおいて記載されるアミノ酸配列を有するポリペプチドまたは(ii) 配列番号5～8、52、66～68、82～85、106～108、112～114、140～142、155～157、170～172、185～187、198～200、および219～327のいずれか1つにおいて記載されるアミノ酸配列に対して少なくとも85%、90%、95%、97%、98%、または99%同一のアミノ酸配列を含むポリペプチドを含むポリペプチドである。

#### 【0128】

ある実施形態において、A領域またはC領域は、IGF-IRに結合する<sup>10</sup>F<sub>n</sub>3ドメインを含むポリペプチドであり、<sup>10</sup>F<sub>n</sub>3ドメインは、N末端からC末端に構造：ベータストランドA、ループAB、ベータストランドB、ループBC、ベータストランドC、ループCD、ベータストランドD、ループDE、ベータストランドE、ループEF、ベータストランドF、ループFG、ベータストランドGを有し、BCループは、配列番号45または46のアミノ酸配列を有し、DEループは、配列番号47もしくは48のアミノ酸配列を有し、FGループは、配列番号49もしくは50のアミノ酸配列を有し、<sup>10</sup>F<sub>n</sub>3ドメインは、フォールドして、抗体重鎖可変領域様構造になり、ポリペプチドは、100nM未満のK<sub>D</sub>でIGF-IRに結合する。IGF-IRに結合する<sup>10</sup>F<sub>n</sub>3ドメインは、好ましくは、フォールドして、7つのベータストランドが互いに包み合う2つのベータシートの中に分布して、安定したコアを形成し、ベータストランドが溶媒に曝露されている6つのループによって結合された構造になる。例示的な実施形態において、<sup>10</sup>F<sub>n</sub>3ドメインは、80～150アミノ酸長である。

#### 【0129】

例示的な実施形態において、A領域またはC領域は、下記に示される配列を有する、1

10

20

30

40

50

0.0 nM未満の $K_D$ でIGF-IRに結合する $^{10}F_n3$ ドメインである。

【化4】

E V V A A T X<sub>n1</sub> S L L I X<sub>a1</sub> S W S A R L K V A R X<sub>a2</sub> Y Y R I T Y G E X  
n2 Q E F T V X<sub>a3</sub> P K N V Y T X<sub>a4</sub> A T I X<sub>n3</sub> D Y T I T V Y A V X<sub>a5</sub> T R  
F R D Y Q P X<sub>a6</sub> I S I N Y R T (配列番号86)

【0130】

配列番号86において、BC、DE、およびFGループは、太字で示される固定配列を有しまたは太字で示される配列に対して少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一の配列を有し、ABループは、X<sub>n1</sub>によって表わされ、CDループは、X<sub>n2</sub>によって表わされ、EFループは、X<sub>n3</sub>によって表わされ、ベータストランドA～Gには、下線を引く。Xは、任意のアミノ酸を表わし、Xに後続する下付文字は、アミノ酸の数の整数を表わす。特に、n1は、約1～15、2～15、1～10、2～10、1～8、2～8、1～5、2～5、1～4、2～4、1～3、2～3、または1～2個のアミノ酸であってもよく、n2およびn3は、それぞれ、独立して、約2～20、2～15、2～10、2～8、5～20、5～15、5～10、5～8、6～20、6～15、6～10、6～8、2～7、5～7、または6～7個のアミノ酸であってもよく、a1～a6は、それぞれ、独立して、0～10、0～5、1～10、1～5、または2～5個ののアミノ酸を含んでもよい。好ましい実施形態において、n1は2アミノ酸であり、n2は7アミノ酸であり、n3は7アミノ酸であり、a1～a6は0アミノ酸である。ベータストランドの配列は、配列番号1において示される対応するアミノ酸に比べて、7つのスキフォールド領域すべてにわたって、約0～10、0～8、0～6、0～5、0～4、0～3、0～2、または0～1個の置換、欠失、または付加を有していてもよい。例示的な実施形態において、ベータストランドの配列は、配列番号1において示される対応するアミノ酸に比べて、7つのスキフォールド領域すべてにわたって、約0～10、0～8、0～6、0～5、0～4、0～3、0～2、または0～1個の保存的置換を有していてもよい。ある実施形態において、コアアミノ酸残基は、固定されており、任意の置換、保存的置換、欠失、または付加は、コアアミノ酸残基以外の残基で生じる。ある実施形態において、IGF-IR結合剤は、以下のアミノ酸配列によって表わされる。

【化5】

E V V A A T P T S L L I S W S A R L K V A R Y Y R I T Y G E T G G N S P  
V Q E F T V P K N V Y T A T I S G L K P G V D Y T I T V Y A V T R F R D  
Y Q P I S I N Y R T (配列番号65)

【0131】

配列番号65において、BC、DE、およびFGループの配列は、太字で示される固定配列を有し、または太字で示される配列に対して少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一の配列を有し、下線を引いた残りの配列（たとえば7つのベータストランドならびにAB、CD、およびEFループの配列）は、配列番号65において示される対応するアミノ酸に比べて、約0～20、0～15、0～10、0～8、0～6、0～5、0～4、0～3、0～2、または0～1個の置換、保存的置換、欠失、または付加を有する。ある実施形態において、コアアミノ酸残基は、固定されており、任意の置換、保存的置換、欠失、または付加は、コアアミノ酸残基以外の残基で生じる。IGF-IRに結合する $^{10}F_n3$ ドメインは、所望により、1～20、1～15、1～10、1～8、1～5、1～4、1～3、1～2、または1アミノ酸長のN末端伸長を含んでもよい。例示的なN末端伸長（1文字アミノ酸コードによって表わされる）は、M、MG、G、MGVSDVPRDL（配列番号69）、GVSDVPRDL（配列番号70）、およびVSDVPRDL（配列番号71）または配列番号69、70、もしくは71のいずれか1つのN末端切断型を含む。他の適したN末端伸長は、

たとえば、 $X_n$ SDVPRDL（配列番号72）、 $X_n$ DVPRDL（配列番号73）、 $X_n$ VPRDL（配列番号74）、 $X_n$ PRDL（配列番号75）、 $X_n$ RDL（配列番号76）、 $X_n$ DL（配列番号77）、または $X_n$ Lを含み、 $n=0$ 、1、または2アミノ酸であり、 $n=1$ である場合、 $X$ はMetまたはGlyであり、 $n=2$ である場合、 $X$ はMet-Glyである。IGF-IRに結合する $^{10}$ F $n$ 3ドメインは、所望により、C末端テールを含んでいてもよい。例示的なC末端テールは、1~20、1~15、1~10、1~8、1~5、1~4、1~3、1~2、または1アミノ酸長であるポリペプチドを含む。C末端テールの特定の例は、EIDKPSQ（配列番号9）、EIDKPCQ（配列番号10）、およびEIDK（配列番号78）を含む。他の実施形態において、適したC末端テールは、たとえば、以下のアミノ酸配列（1文字アミノ酸コードによって表わされる）：E、EI、EID、EIDKP（配列番号79）、EIDKPS（配列番号80）、またはEIDKPC（配列番号81）のうちの1つを含む、配列番号9、10、または78のC末端切断型断片であってもよい。他の適したC末端テールは、たとえば、ES、EC、EGS、EGC、EGSGS（配列番号96）、EGSGC（配列番号97）、またはEIEK（配列番号217）を含む。ある実施形態において、IGF-IRに結合する $^{10}$ F $n$ 3ドメインは、N末端伸長およびC末端テールの両方を含む。例示的な実施形態において、A領域は、GlyまたはMet-Glyで始まるN末端伸長およびシステイン残基を含有していないC末端伸長を含み、B領域は、Metで始まらないN末端伸長およびシステイン残基を含むC末端伸長を含む。IGF-IRに結合する $^{10}$ F $n$ 3ドメインの特定の例は、(i) 配列番号3、4、65、もしくは86のいずれか1つにおいて記載されるアミノ酸配列を有するポリペプチドまたは(ii) 配列番号3、4、65、もしくは86のいずれか1つにおいて記載されるアミノ酸配列に対して少なくとも85%、90%、95%、97%、98%、もしくは99%同一のアミノ酸配列を含むポリペプチドを含むポリペプチドである。

#### 【0132】

B領域は、本明細書においてさらに記載されるリンカーである。例示的な実施形態において、B領域は、ポリペプチドリinkerである。例示的なポリペプチドリinkerは、1~20、1~15、1~10、1~8、1~5、1~4、1~3、または1~2アミノ酸を有するポリペプチドを含む。適したポリペプチドリinkerの特定の例は、本明細書においてさらに記載され、たとえば、配列番号11~19、51、93~95、および218から成る群から選択される配列を有するリンカーを含む。ある実施形態において、リンカーは、本明細書において記載されるC末端テールポリペプチド、本明細書において記載されるN末端伸長ポリペプチド、またはその組合せであってもよい。

#### 【0133】

一実施形態において、抗体様タンパク質二量体は、構造 $X_1-A-X_2-B-X_3-C-X_4$ を有するポリペプチドを含み、 $X_1$ は、任意のN末端伸長であり、Aは、EGFRに結合する $^{10}$ F $n$ 3ドメインであり、 $X_2$ は、任意のC末端テールであり、Bは、ポリペプチドリinkerであり、 $X_3$ は、任意のN末端伸長であり、Cは、IGF-IRに結合する $^{10}$ F $n$ 3ドメインであり、 $X_4$ は、任意のC末端テールである。他の実施形態において、抗体様タンパク質二量体は、構造 $X_1-A-X_2-B-X_3-C-X_4$ を有するポリペプチドを含み、 $X_1$ は、任意のN末端伸長であり、Aは、IGF-IRに結合する $^{10}$ F $n$ 3ドメインであり、 $X_2$ は、任意のC末端テールであり、Bは、ポリペプチドリinkerであり、 $X_3$ は、任意のN末端伸長であり、Cは、EGFRに結合する $^{10}$ F $n$ 3ドメインであり、 $X_4$ は、任意のC末端テールである。適したN末端伸長およびC末端テールの特定の例は、上記に記載される。ある実施形態において、1つまたは複数の $X_1$ 、 $X_2$ 、B、 $X_3$ 、または $X_4$ は、システイン残基またはリジン残基などのペグ化に適したアミノ酸残基を含んでいてもよい。例示的な実施形態において、 $X_4$ は、システイン残基またはリジン残基などのペグ化に適した少なくとも1つのアミノ酸を含む。適したポリペプチドリinkerの特定の例は、下記にさらに記載される。構造 $X_1-A-X_2-B-X_3-C-X_4$ を有する抗体様タンパク質二量体の特定の例は、(i) 配列番号20~31、5

【 0 1 3 4 】

【 0 1 3 5 】

【 0 1 3 6 】

本開示は、グリシン-セリンベースのリンカー、グリシン-プロリンベースのリンカー、およびアミノ酸配列 P S T S T S T (配列番号 12) を有するリンカーを含む、これらの必要条件を満たす多くの適したリンカーを提供する。本明細書において記載される例は、ポリペプチドリンカーを介して結合される F n 3 ドメインがそれらの標的結合機能を保持することを実証する。いくつかの実施形態において、リンカーは、グリシン-セリンベースのリンカーである。これらのリンカーは、グリシン残基およびセリン残基を含み、8~50、10~30、および10~20アミノ酸長であってもよい。例として、アミノ酸配列 G S G S G S G S G S G S G S G S G S G S (配列番号 11)、G S G S G S G S G S (配列番号 13)、G G G G S G G G G S G G G G S (配列番号 14)、G G G G S G G G G S G G G G S G G G G S (配列番号 15)、G G G G S G G G G S G G G G S (配列番号 16)、または G G G G S G G G G S G G G S G (配列番号 17) を有するリンカーを含む。いくつかの実施形態において、リンカーは、グリシン-プロリンベースのリンカーである。これらのリンカーは、グリシン残基およびプロリン残基を含み、3~30、10~30、および3~20アミノ酸長であってもよい。例として、アミノ酸配列 G P G P G P G (配列番号 18)、G P G P G P G P G P G (配列番号 19)、および G P G (配列番号 51) を有するリンカーを含む。いくつかの実施形態において、リンカーは、プロリン-アラニンベースのリンカーである。これらのリンカーは、プロリン残基およびアラニン残基を含み、3および30、10および30、3~20、ならびに6~18アミノ酸長であってもよい。そのようなリンカーの例は、配列番号 93、94、および95を含む。最適なリンカー長およびアミノ酸組成は、当技術分野においてよく知られている方法により、ルーチ的な実験法によって決定され

得ることが意図される。

#### 【0137】

いくつかの実施形態において、抗体様タンパク質の多量体は、血液または標的組織中のプロテアーゼによって切断可能なプロテアーゼ部位を有するポリペプチドリンカーを介して結合される。そのような実施形態は、より良好なデリバリーまたは治療上の特性またはそのようなタンパク質を別々に産生することと比較してより効率的な産生のために、2つ以上の治療用タンパク質を放出するために使用することができる。

#### 【0138】

追加のリンカーまたはスペーサー、たとえば配列番号9および10は、Fn3ドメインおよびポリペプチドリンカーの間のFn3ドメインのC末端に導入され得る。追加のリンカーまたはスペーサーは、Fn3ドメインおよびポリペプチドリンカーの間のFn3ドメインのN末端に導入され得る。

10

#### 【0139】

いくつかの実施形態において、抗体様タンパク質の多量体は、直接または多量体リンカーを介して間接的に結合される。多量体リンカーは、1つまたは複数の以下の特徴を有するタンパク質を生成するためにそれぞれのタンパク質成分の間の距離を最適に変えるために使用することができる：1) 対象のタンパク質に結合する場合の、1つまたは複数のタンパク質ドメインの結合の立体障害の低下または増加2) タンパク質安定性または可溶性の増加、3) タンパク質凝集の減少、および4) タンパク質の全体的なアビディティ (avidity) または親和性の増加。

20

#### 【0140】

いくつかの実施形態において、抗体様タンパク質の多量体は、多量体の糖などの生体適合性ポリマーを介して結合される。多量体の糖は、血液または標的組織中の酵素によって切断可能な酵素切断部位を含むことができる。そのような実施形態は、より良好なデリバリーまたは治療上の特性またはそのようなタンパク質を別々に産生することと比較してより効率的な産生のために、2つ以上の治療用タンパク質を放出するために使用することができる。

#### 【0141】

いくつかの実施形態において、抗体様タンパク質の多量体は、ポリオキシアルキレン、特にポリエチレングリコール (PEG) 成分を介して結合される。抗体様タンパク質は、配列番号10、81、97、または218において記載されるリンカーなどのシステイン含有リンカーを含んでいてもよい。PEGは、リンカー配列中のシステイン成分にコンジュゲートされ、2つのドメインを作動可能に結合してもよい。

30

#### 【0142】

##### 薬物動態成分

一態様において、本開示は、薬物動態 (PK) 成分をさらに含むE結合剤およびE/I結合剤を提供する。いくつかの実施形態において、E/I結合剤は、抗体様タンパク質の多量体、特に、EGFR結合<sup>10</sup>Fn3およびIGFIR結合<sup>10</sup>Fn3の二量体である。改善された薬物動態は、認知された治療上の必要性に従って評価され得る。多くの場合、おそらくタンパク質が投薬の後、血清において利用可能なまま残る時間を増加させることによって、生物学的利用能を増加させることおよび/または服用の間の時間を増加させることは望ましい。いくつかの実例において、タンパク質の血清濃度の継続を長い間にわたって改善する (たとえば、投与直後のおよび次の投与直前のタンパク質の血清濃度中の差異を減少させる) ことは望ましい。E結合剤およびE/I結合剤は、哺乳動物 (たとえばマウス、ラット、またはヒト) における該ポリペプチドのクリアランス速度を、未修飾ポリペプチドに比べて3分の1よりも大きく低下させる成分に結合され得る。改善された薬物動態についての他の手段は、血清半減期を含んでいてもよく、これは、アルファ相およびベータ相に分けられることが多い。いずれかまたは両方の相は、適切な成分の付加によって著しく改善され得る。

40

#### 【0143】

50

血液からのタンパク質のクリアランスを遅らせる傾向がある成分は、ポリオキシアルキレン成分（たとえばポリエチレングリコール）；糖（たとえばシアル酸）；および耐容性がよいタンパク質成分（たとえばFc、Fc断片、トランスフェリン、または血清アルブミン）を含む。

#### 【0144】

いくつかの実施形態において、PK成分は、米国特許出願公開第2007/0178082号および第2007/0269422号において記載されるものなどの血清アルブミン結合タンパク質である。

#### 【0145】

いくつかの実施形態において、PK成分は、米国特許公開第2007/0178082号において記載されるものなどの血清免疫グロブリン結合タンパク質である。

10

#### 【0146】

いくつかの実施形態において、PK成分は、ポリエチレングリコール（PEG）である。

#### 【0147】

PK修飾抗体様タンパク質多量体の血清クリアランス速度は、未修飾E/I結合剤のクリアランス速度に比べて、約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、またはさらに90%減少されうる。PK修飾多量体は、未修飾多量体の半減期に比べて増強された半減期（ $t_{1/2}$ ）を有していてもよい。PK結合ポリペプチドの半減期は、未修飾多量体の半減期に比べて、少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、125%、150%、175%、200%、250%、300%、400%、もしくは500%またはさらに1000%増強され得る。いくつかの実施形態において、多量体半減期は、緩衝生理食塩水中でまたは血清中でどのように、インビトロにおいて決定される。他の実施形態において、多量体半減期は、血清または動物の他の体液中の多量体の半減期などのインビボ半減期である。

20

#### 【0148】

いくつかの実施形態において、PK成分は、少なくとも1つのジスルフィド結合、ペプチド結合、ポリペプチド、多量体の糖、またはポリエチレングリコール成分を介して抗体様タンパク質多量体に結合される。例示的なポリペプチドリンカーは、PSTSTST（配列番号12）、EIDKPSQ（配列番号9）、およびGSGSGSGSGS（配列番号13）などのGSリンカー、ならびにその多量体を含む。

30

#### 【0149】

結合／スクリーニング

本開示は、E結合剤およびE/I結合剤、特に、EGFR結合<sup>10</sup>Fn3およびIGFIR結合<sup>10</sup>Fn3の二量体などの抗体様タンパク質多量体を提供する。EGFRまたはIGFIRへの結合は、平衡定数（たとえば解離、 $K_D$ ）の点からおよび反応速度定数（たとえば、 $on$ 速度定数、 $k_{on}$ および $off$ 速度定数、 $k_{off}$ ）の点から評価され得る。いくつかの実施形態において、抗体様タンパク質単量体または多量体は、500nM、100nM、50nM、5nMまたはそれ以下より小さい $K_D$ でEGFRに結合するであろう。いくつかの実施形態において、抗体様タンパク質多量体は、500nM、100nM、50nM、5nMまたはそれ以下より小さい $K_D$ でIGFIRに結合するであろう。 $k_{off}$ が十分に低いか、または $k_{on}$ が十分に高い場合には、より高い $K_D$ 値が許容され得る。

40

#### 【0150】

E結合剤およびE/I結合剤は、EGFRの細胞外ドメイン、特に、EGFRのリガンド結合ドメインを含む、EGFRの任意の部分に結合してもよい。EGFRへのE結合剤およびE/I結合剤の結合は、TGF- $\alpha$ およびEGFを含む1つもしくは複数のリガンドとのEGFRの相互作用を破壊し、および／または受容体二量体化を破壊しうる。いくつかの実施形態において、E結合剤およびE/I結合剤は、EGFRへの結合について抗EGFR抗体と競合する。抗EGFR抗体は、パニツムマブ（Amgen）、ニモ

50

ツズマブ (Y M Biosciences)、ザルツムマブ (Genmab)、EMD 72000 (Merck KGaA)、およびセツキシマブ (ImClone Systems) を含む任意の知られている抗 EGF R 抗体から選択され得る。

#### 【0151】

いくつかの実施形態において、E 結合剤および E / I 結合剤は、EGF R の下流のシグナリングを阻害する。EGF R リガンド結合は、EGF R または他の HER ファミリーメンバーとのホモまたはヘテロ二量体受容体二量体化を導く。二量体化は、受容体自己リン酸化を促進し、次いで、いくつかのシグナリング経路の活性化を導く。

#### 【0152】

E / I 結合剤は、IGF I R の細胞外ドメイン、特に、IGF I R のリガンド結合ドメインを含む、IGF I R の任意の部分に結合してもよい。IGF I R への E / I 結合剤の結合は、1 つもしくは複数のリガンド、たとえば IGF - I および IGF - I I との IGF I R の相互作用を破壊し、および / または受容体ヘテロ四量体のアセンブリーを破壊する。いくつかの実施形態において、E / I 結合剤は、IGF I R への結合について抗 IGF I R 抗体と競合する。抗 IGF I R 抗体は、任意の知られている抗 IGF I R 抗体から選択され得る。

#### 【0153】

いくつかの実施形態において、E / I 結合剤は、IGF I R の下流のシグナリングを阻害する。IGF - I 受容体は、2 つのタイプのサブユニットから成る：アルファサブユニット（完全に細胞外のものであり、リガンド結合において機能する 130 ~ 135 kDa タンパク質）ならびにベータサブユニット（膜貫通ドメインおよび細胞質ドメインを有する 95 kDa 膜貫通タンパク質）。IGF I R は、一本鎖レセプター前駆体ポリペプチドとして最初に合成され、グリコシル化、タンパク分解性の切断、および共有結合によって処理されて、2 つのアルファサブユニットおよび 2 つのベータサブユニットを含む成熟 460 kDa ヘテロ四量体に会合する。ベータサブユニット（複数可）は、リガンド活性化チロシンキナーゼ活性を有する。

#### 【0154】

EGF R および IGF I R の受容体シグナリングは、MEK のリン酸化を含む MAP K 経路を独立して活性化する。他の活性化経路は、AKT のリン酸化を含むホスファチジルイノシトール 3 - キナーゼ (PI 3 K) 経路である。受容体シグナリングは、核に伝達され、様々な転写因子の活性化をもたらす。

#### 【0155】

スクリーニングアッセイは、E 結合剤および E / I 結合剤を同定し、特徴づけるために設計され得る。表面プラズモン共鳴および ELISA などの結合アッセイならびに活性化されたシグナリング経路を検出するアッセイは、当技術分野においてよく知られており、たとえば実施例 5 を参照されたい。EGF R および IGF I R のリン酸化され、活性化されたアイソフォームに特異的に結合する多くの市販品を含む様々な抗体が生産されてきており、たとえば実施例 6 および 7 を参照されたい。下流シグナリング事象はまた、AKT リン酸化のレベルを測定することによってなどのように、受容体阻害の指標として使用されてもよく、たとえば実施例 8 を参照されたい。細胞増殖アッセイもまた、EGF R シグナリングおよび IGF I R シグナリングに対する候補 E / I 結合剤の結合および阻害能を特徴づけるための有用な方法であり、たとえば実施例 9 を参照されたい。

#### 【0156】

##### ポリマーコンジュゲーション

生体適合性ポリマーへのコンジュゲーションは、抗体様タンパク質多量体を結合し、および / または該タンパク質の薬物動態を改善するために使用され得る。ポリマーの固有感、サイズ、および構造は、活性における許容できない減少を伴うことなく多量体の循環半減期を改善または多量体の抗原性を減少させるように選択される。

#### 【0157】

本発明において有用なポリマーの例は、ポリエチレングリコール (PEG) などのポリ

10

20

30

40

50

(アルキレングリコール)を含むが、これらに限定されない。ポリマーは、特定の構造に限定されず、線状（たとえばアルコキシ PEG もしくは二官能性 PEG）、または分岐、枝分かれ、マルチアーム（たとえば、ポリオールコアに結合した PEG）、および樹状などのように非線状とすることができる。

#### 【0158】

典型的に、PEG および他の水溶性ポリマー（つまりポリマー試薬）は、ポリペプチド上の所望の部位に結合するのに適切な、適した活性基を用いて活性化される。したがって、ポリマー試薬は、ポリペプチドとの反応のための反応基を有するであろう。代表的なポリマー試薬および活性成分にこれらのポリマーをコンジュゲートするための方法は、当技術分野においてよく知られており、Zalipsky, S., et al., "Use of Functionalized Poly(Ethylene Glycols) for Modification of Polypeptides" in Polyethylene Glycol Chemistry: Biotechnical and Biomedical Applications, J. M. Harris, Plenus Press, New York (1992) および Zalipsky (1995) Advanced Drug Reviews 16: 157-182 においてさらに記載されている。

10

#### 【0159】

典型的に、該ポリマーの重量平均分子量は、約 100 ダルトン～約 150,000 ダルトンである。生体適合性ポリマーについての例示的な重量平均分子量は、約 20,000 ダルトン、約 40,000 ダルトン、約 60,000 ダルトン、および約 80,000 ダルトンを含む。前述のいずれかの総分子量を有する生体適合性ポリマーの分岐バージョンもまた、使用することができる。

20

#### 【0160】

いくつかの実施形態において、該ポリマーは、PEG である。PEG は、市販で入手可能な、よく知られている水溶性ポリマーであるまたは当技術分野においてよく知られている方法によるエチレングリコールの開環重合によって調製することができる (Sandler and Karo, Polymer Synthesis, Academic Press, New York, Vol. 3, pages 138-161)。用語「PEG」は、PEG のサイズまたはその末端の修飾を考慮せずに、任意のポリエチレングリコール分子を包含するように広く使用され、式： $X-O(CH_2CH_2O)_n-H$  によって表わすことができ、 $n$  は 20～2300 であり、 $X$  は、 $H$  または末端の修飾、たとえば  $C_1 \sim C_4$  アルキルである。PEG は、結合反応に必要な、分子の化学合成に由来する、または分子の部分の最適な距離のためのスペーサーとして作用する化学基をさらに含有することができる。さらに、そのような PEG は、ともに結合される 1 つまたは複数の PEG 側鎖から成り得る。1 つを超える PEG 鎖を有する PEG は、マルチアーム PEG または分岐 PEG と呼ばれる。分岐 PEG は、たとえば、欧州特許出願公開第 473084 A 号 および 米国特許第 5,932,462 号 において記載されている。

30

#### 【0161】

ポリペプチドへのポリマー分子の共有結合を達成するために、ポリマー分子のヒドロキシル末端基は、活性化形態で、つまり反応性官能基を伴って提供されなければならない。適切に活性化されたポリマー分子は、たとえば Nektar Therapeutics, Inc., Huntsville, Ala., USA; PolyMASC Pharmaceuticals plc, UK; または SunBio Corporation, Anyang City, South Korea から市販で入手可能である。別法として、ポリマー分子は、当技術分野において知られている従来の方法によって、たとえば WO 90/13540 において開示されるように活性化することができる。活性化 PEG ポリマーの特定の例は、以下の線状 PEG: NHS-PEG, SPA-PEG, SSPA-PEG, SBA-PEG, SS-PEG, SSA-PEG, SC-PEG, SG-PEG, SCM-PEG, NOR-PEG, BTC-PEG, EPOX-PEG, NCO-PEG, NPC-PEG, CDI-PEG, ALD-PEG, TRES-PEG, VS-PEG, OPSS-PEG, IODO-PEG、および MAL-PEG ならびに PEG2-NHS、PEG2-MAL などの分岐 PEG ならびにこれらの両方が参照によって本明細書

40

50

において組み込まれる米国特許第 5, 9 3 2, 4 6 2 号および米国特許第 5, 6 4 3, 5 7 5 号において開示されるものを含む。

#### 【0162】

いくつかの実施形態において、PEG分子が抗体様タンパク質多量体上のシステイン残基にコンジュゲートされる場合、システイン残基は、タンパク質に天然のものであるのに対して、他の実施形態において、1つまたは複数のシステイン残基は、タンパク質の中に操作されたものである。システイン残基を生成するために、タンパク質コード配列の中に変異を導入してもよい。これは、たとえば、1つまたは複数のアミノ酸残基をシステインに変異させることによって達成され得る。システイン残基に変異させるための好ましいアミノ酸は、セリン、トレオニン、アラニン、および他の親水性残基を含む。好ましくは、システインに変異させられることとなる残基は、表面に曝露した残基である。一次配列またはタンパク質に基づいて残基の表面露出度 (surface accessibility) を予測するためのアルゴリズムが当技術分野においてよく知られている。別法では、結合ポリペプチドの設計および作製の基礎となるフレームワークの結晶構造が解明されていることを考えれば (Himanen et al., Nature. (2001) 20-27;414(6866):933-8を参照されたい)、表面残基は、結合ポリペプチドのアミノ酸配列を比較することによって予測され得、したがって、表面に曝露した残基が同定される。いくつかの実施形態において、システイン残基は、抗体様タンパク質多量体の中のN末端および／もしくはC末端にもしくはその近くに、またはループ領域内に導入される。システイン残基のペグ化は、たとえばPEG-マレイミド、PEG-ビニルスルホン、PEG-ヨードアセトアミド、またはPEG-オルトピリジル (orthopyridyl) ジスルフィドを使用して実行され得る。

10

20

#### 【0163】

いくつかの実施形態において、ペグ化抗体様タンパク質多量体は、N末端アミノ酸のアルファアミノ基に共有結合したPEG分子を含む。部位特異的N末端還元的アミノ化が、Pepinsky et al., (2001) JPET, 297,1059および米国特許第 5, 8 2 4, 7 8 4 号において記載されている。他の利用可能な求核アミノ基を利用するタンパク質の還元的アミノ化のためのPEG-アルデヒドの使用が、米国特許第 4, 0 0 2, 5 3 1 号において、Wieder et al., (1979) J. Biol. Chem. 254,12579において、およびChamow et al., (1994) Bioconjugate Chem. 5, 133において記載されている。

30

#### 【0164】

他の実施形態において、ペグ化抗体様タンパク質多量体は、リンカーに共有結合した1つまたは複数のPEG分子を含み、これは、次いで、結合ポリペプチドのN末端のアミノ酸残基のアルファアミノ基に結合される。そのようなアプローチは、米国特許出願公開第 2 0 0 2 / 0 0 4 4 9 2 1 号およびPCT公開WO 9 4 / 0 1 4 5 1 において開示されている。

#### 【0165】

いくつかの実施形態において、抗体様タンパク質多量体は、C末端でペグ化されている。タンパク質は、C末端アジド-メチオニンの導入およびそれに続くシュタウディンガー反応を介するメチル-PEG-トリアリールホスフィン化合物のコンジュゲーションによって、C末端でペグ化され得る。該C末端コンジュゲーション方法は、Cazalis et al., C-Terminal Site-Specific PEGylation of a Truncated Thrombomodulin Mutant with Retention of Full Bioactivity, Bioconj Chem. 2004; 15(5):1005-1009.において記載されている。

40

#### 【0166】

サイズ排除 (たとえばゲル濾過) クロマトグラフィーおよびイオン交換クロマトグラフィーなどの当技術分野において知られている従来の分離および精製技術は、ペグ化抗体様タンパク質多量体を精製するために使用することができる。産物はまた、SDS-PAGEを使用して分離され得る。分離され得る産物は、モノ、ジ、トリ、ポリ、および非ペグ化結合ポリペプチドならびに遊離PEGを含む。モノPEGコンジュゲートの百分率は、

50

組成物中のモノPEGの百分率を増加させるために、溶出ピークのあたりのより広範囲の画分をプールすることによってコントロールすることができる。約90パーセントのモノPEGコンジュゲートは、収量および活性の良好なバランスを表わす。

#### 【0167】

いくつかの実施形態において、ペグ化抗体様タンパク質多量体は、好ましくは、未修飾タンパク質と関連する生物学的活性の少なくとも約25%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%、または100%を保持するであろう。いくつかの実施形態において、生物学的活性は、 $K_D$ 、 $k_{on}$ 、または $k_{off}$ によって評価される場合、EGFRおよびIGFIRに結合するためのその能力を指す。いくつかの実施形態において、ペグ化抗体様タンパク質多量体は、非ペグ化タンパク質に比べて、EGFRおよび／またはIGFIRへの結合における増加を示す。

10

#### 【0168】

結合ポリペプチドの脱免疫化

E結合剤およびE/I結合剤、特に、EGFR結合<sup>10</sup>Fn3およびIGFIR結合<sup>10</sup>Fn3の二量体などの抗体様タンパク質多量体のアミノ酸配列は、1つまたは複数のB細胞エпитープまたはT細胞エпитープを排除するために改変され得る。タンパク質またはタンパク質の多量体は、所与の種に対してそれを非免疫原性にするか、またはそれほど免疫原性ではなくするために脱免疫化され得る。脱免疫化は、タンパク質に対する構造の改変を通して達成することができる。当業者らに知られている任意の脱免疫化技術を使用することができ、たとえば、その開示の全体が本明細書において組み込まれるWO00/34317を参照されたい。

20

#### 【0169】

一実施形態において、E結合剤およびE/I結合剤の配列は、MHCクラスII結合モチーフの存在について分析することができる。たとえば、比較は、たとえば、[site.washington.edu/au/worldwide-web](http://site.washington.edu/au/worldwide-web)上の「モチーフ」データベースを検索することによってなどのように、MHC結合モチーフのデータベースを用いて実行され得る。別法として、MHCクラスII結合ペプチドは、Altuvia et al. [J. Mol. Biol. 249 244-250 (1995)] によって考案されたものなどの計算スレッディング法 (computational threading method) を使用して同定されてもよく、それによって、ポリペプチド由来の連続する重複するペプチドは、MHCクラスIIタンパク質に対するそれらの結合エネルギーについて試験されている。計算結合予測アルゴリズムは、iTope (商標)、Tepitope、SYFPEITHI、Epimatrix (EpiVax)、およびMHCpredを含む。MHCクラスII結合ペプチドの同定を支援するために、両親媒性およびRothbardモチーフならびにカテプシンBおよび他の処理酵素についての切断部位などの、提示するのに成功したペプチドに関する関連する配列特徴を検索することができる。

30

#### 【0170】

可能性のある (たとえばヒト) T細胞エпитープを同定したならば、これらのエпитープは、次いで、T細胞エпитープを排除するために必要とされるように、1つまたは複数のアミノ酸の改変によって排除される。通常、これは、T細胞エпитープ自体のうちの1つまたは複数のアミノ酸の改変を含むであろう。これは、タンパク質の一次構造の点から、エпитープに隣接するアミノ酸、または一次構造において隣接しないが、該分子の二次構造において隣接するアミノ酸を改変することを含むことができる。意図される通常の改変は、アミノ酸置換となるであろうが、ある状況において、アミノ酸付加または欠失が適当な場合もある。すべての改変は、組換えDNA技術によって達成することができ、最終の分子は、たとえば十分に確立された方法によって、組換え宿主からの発現によって調製され得るが、タンパク質化学の使用または分子の改変の他の手段もまた、使用され得る。

40

#### 【0171】

一旦、同定されたT細胞エпитープが除去されたならば、新しいT細胞エпитープが生成されていないことを確実にするために、脱免疫化配列を再分析してもよく、それらが存

50

在する場合、該エピトープ（複数可）を欠失させることができる。

#### 【0172】

計算上同定されたすべてのT細胞エピトープを除去する必要があるとは限らない。当業者は、特定のエピトープの「強度」、またはより正確に言えば、潜在的な免疫原性の有意性を十分に理解するであろう。様々な計算方法は、可能性のあるエピトープについてのスコアを生成する。当業者は、高スコアのエピトープだけが除去される必要がありうることを認識するであろう。当業者はまた、可能性のあるエピトープの除去およびタンパク質の結合親和性の維持の間にバランスがあることを認識するであろう。そのため、1つの戦略は、タンパク質の中に連続して置換を導入し、次いで、抗原結合および免疫原性について試験することである。

10

#### 【0173】

一態様において、脱免疫化タンパク質は、ヒト対象におけるその本来のタンパク質よりも免疫原性ではない（より正確に言えば低下したHAM A 応答を誘導する）。免疫原性を決定するためのアッセイは、十分に、当業者の知識の範囲内にある。免疫応答を決定するための当技術分野において認識される方法は、特定の対象においてまたは臨床試験の間にHAM A 応答をモニターするために実行することができる。脱免疫化タンパク質を投与された対象は、上述の療法の適用の開始時および適用の全体にわたって、免疫原性評価を行うことができる。HAM A 応答は、たとえば、表面プラズモン共鳴技術（B I A c o r e）および／または固相E L I S A分析を含む当業者に知られている方法を使用して、対象由来の血清試料中の脱免疫化タンパク質に対する抗体を検出することによって測定される。

20

#### 【0174】

追加の修飾

ある実施形態において、E結合剤およびE/I結合剤、特に、E G F R結合<sup>10</sup> F n 3およびI G F I R結合<sup>10</sup> F n 3の二量体などの抗体様タンパク質多量体は、翻訳後修飾をさらに含んでもよい。例示的な翻訳後タンパク質修飾は、リン酸化、アセチル化、メチル化、A D P-リボシル化、ユビキチン化、グリコシル化、カルボニル化、S U M O化、ビオチン化、あるいはポリペプチド側鎖または疎水基の付加を含む。その結果として、修飾されたE結合剤およびE/I結合剤は、脂質、多糖類または単糖類、およびホスフェートなどの非アミノ酸エレメントを含有していてもよい。グリコシル化の好ましい形態は、シアリル化であり、これは、ポリペプチドに1つまたは複数のシアル酸成分をコンジュゲートする。シアル酸成分は、タンパク質の可能性のある免疫原性をも低下させながら、可溶性および血清半減期を改善する。たとえばRaju et al. Biochemistry. 2001 Jul 31; 40(30):8868-76を参照されたい。E結合剤またはE/I結合剤の機能性に対するそのような非アミノ酸エレメントの効果は、E G F Rシグナリング機能およびI G F I Rシグナリング機能におけるそのアンタゴナイズする役割について試験され得る。

30

#### 【0175】

いくつかの実施形態において、E結合剤およびE/I結合剤は、抗原依存性細胞媒介性細胞傷害（A D C C）および／または補体依存性細胞障害（C D C）を増強するために修飾される。いくつかの実施形態において、E/I結合剤は、F c領域をさらに含む、E G F R結合<sup>10</sup> F n 3およびI G F I R結合<sup>10</sup> F n 3の二量体である。いくつかの実施形態において、F c領域は、A D C CまたはC D Cを増強する変異体である。F c領域変異体は、位置256、290、298、312、326、330、333、334、360、378、または430を含む1つまたは複数のアミノ酸位置にアミノ酸修飾（たとえば置換）を含むヒトF c領域配列（たとえばヒトI g G 1、I g G 2、I g G 3、またはI g G 4 F c領域）を含んでもよく、F c領域中の残基のナンバリングは、K a b a tにおけるようなE Uインデックスのナンバリングである。

40

#### 【0176】

ベクター&ポリヌクレオチドの実施形態

50

本明細書において記載されるタンパク質のいずれかをコードする核酸配列もまた、本開示において含まれる。当業者らによって十分に理解されるように、3番目の塩基の縮重のために、ほとんどすべてのアミノ酸は、コードヌクレオチド配列における1つを超えるトリプレットコドンによって表わすことができる。さらに、軽微な塩基対変化は、コードされたアミノ酸配列における保存的置換をもたらしうるが、遺伝子産物の生物学的活性を実質的に改変するとは予想されない。そのため、本明細書において記載されるタンパク質をコードする核酸配列は、配列がわずかに修飾されるが、なお各遺伝子産物をコードする。

#### 【0177】

本明細書において記載されるE/I結合剤をコードする例示的な核酸は、配列番号442～465を有する核酸または配列番号442～465のいずれか1つに対して少なくとも80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%、もしくは100%同一の配列を有する核酸を含む。遺伝暗号中の縮重により配列番号442～465において記載される核酸と異なる単離核酸もまた、本発明の範囲内である。配列番号328に対して少なくとも80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%、もしくは100%同一のヌクレオチド配列によってコードされるI単量体を含むE/I結合剤および/または配列番号329～441もしくは495のいずれか1つに対して少なくとも80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%、もしくは100%同一のヌクレオチド配列によってコードされるE単量体を含むE/I結合剤もまた提供される。配列番号329～441または495のいずれか1つに対して少なくとも80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%、または100%同一のヌクレオチド配列によってコードされるE結合剤もまた提供される。ある実施形態において、E/I結合剤、E単量体、またはI単量体をコードするヌクレオチド配列は、6×Hisタグ（配列番号487）をコードする配列を含有していない。

#### 【0178】

本明細書において開示される様々なタンパク質またはポリペプチドのいずれかをコードする核酸は、化学的に合成され得る。コドン使用頻度は、細胞における発現を改善するように選択され得る。そのようなコドン使用頻度は、選択される細胞型に依存するであろう。特殊なコドン使用頻度パターンは、大腸菌および他の細菌ならびに哺乳動物細胞、植物細胞、酵母細胞、および昆虫細胞について明らかにされている。たとえばMayfield et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 2003 100(2):438-42; Sinclair et al. Protein Expr Purif. 2002 (1):96-105; Connell ND. Curr Opin Biotechnol. 2001 (5):446-9; Makrides et al. Microbiol Rev. 1996 60(3):512-38; およびSharp et al. Yeast. 1991 7(7):657-78を参照されたい。

#### 【0179】

核酸操作のための一般的な技術は、当業者の範囲内にあり、また、たとえば、参照によって本明細書において組み込まれるSambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Vols. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2 ed., 1989またはF. Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology (Green Publishing and Wiley-Interscience: New York, 1987)および定期的な最新版においても記載されている。タンパク質をコードするDNAは、哺乳動物、ウイルス、または昆虫の遺伝子に由来する適した転写調節エレメントまたは翻訳調節エレメントに作動可能に結合される。そのような調節エレメントは、転写プロモーター、転写をコントロールするための任意のオペレーター配列、適したmRNAリボソーム結合部位をコードする配列、ならびに転写および翻訳の終結をコントロールする配列を含む。複製開始点によって通常与えられる、宿主において複製するための能力、および形質転換体の認識を容易にするための選択遺伝子がさらに組み込まれる。適した調節エレメントは、当技術分野においてよく知られている。

#### 【0180】

本明細書において記載されるタンパク質は、異種ポリペプチドとの融合タンパク質として産生されてもよく、該異種ポリペプチドは、好ましくは、シグナル配列または成熟タン

パク質もしくはポリペプチドのN末端に特異的な切断部位を有する他のポリペプチドである。選択される異種シグナル配列は、好ましくは、宿主細胞によって認識され、プロセシングされる（つまりシグナルペプチダーゼによって切断される）配列である。天然のシグナル配列を認識せず、プロセシングを行わない原核生物の宿主細胞については、シグナル配列は、たとえば、アルカリホスファターゼ、ペニシリナーゼ、l p p、または耐熱性毒素 I I リーダーからなる群から選択される原核生物のシグナル配列によって置換される。酵母分泌については、天然シグナル配列は、たとえば酵母インベルターゼリーダー、ファクターリーダー（サッカロミセス（*Saccharomyces*）およびクリベロミセス（*Kluyveromyces*）のアルファファクターリーダーを含む）、もしくは酸性ホスファターゼリーダー、*C. アルビカンス*（*C. albicans*）グルコアミラーゼリーダー、または P C T 公開第 W O 9 0 / 1 3 6 4 6 において記載されるシグナルによって置換され得る。哺乳動物細胞発現において、哺乳動物シグナル配列およびウイルス分泌リーダー、たとえば単純ヘルペス g D シグナルが利用可能である。そのような前駆体領域のための D N A は、該タンパク質をコードする D N A に対し、リーディング・フレーム内にライゲーションされ得る。

#### 【0181】

真核生物の宿主細胞（たとえば酵母、菌類、昆虫、植物、動物、ヒト、または他の多細胞生物由来の有核細胞）において使用される発現ベクターはまた、転写の終結および m R N A の安定化に必要な配列をも含有するであろう。そのような配列は、一般に、真核生物またはウイルスの D N A または c D N A の 5 ' 非翻訳領域および時々、3 ' 非翻訳領域から入手可能である。これらの領域は、多価抗体をコードする m R N A の非翻訳部分においてポリアデニル化断片として転写されたヌクレオチドセグメントを含有する。ある有用な転写終結構成成分は、ウシ成長ホルモンポリアデニル化領域である。P C T 公開 W O 9 4 / 1 1 0 2 6 およびそこに開示される発現ベクターを参照されたい。

#### 【0182】

組換え D N A はまた、タンパク質を精製するのに有用でありうる任意のタイプのタンパク質タグ配列を含むこともできる。タンパク質タグの例は、ヒスチジンタグ、F L A G タグ、m y c タグ、H A タグ、または G S T タグを含むが、これらに限定されない。細菌、真菌、酵母、および哺乳動物細胞宿主での使用のための適切なクローニングベクターおよび発現ベクターは、Cloning Vectors: A Laboratory Manual, (Elsevier, New York, 1985) において見つけることができ、関連する開示は、参照によってこれによって組み込まれる。

#### 【0183】

発現コンストラクトは、当業者に明白であるように、宿主細胞に適切な方法を使用して宿主細胞の中に導入される。エレクトロポレーション；塩化カルシウム、塩化ルビジウム、リン酸カルシウム、D E A Eーデキストラン、または他の物質を使用するトランスフェクション；微粒子銃；リポフェクション；および感染（ベクターは感染性作用物質である）を含むが、これらに限定されない宿主細胞の中に核酸を導入するための様々な方法は、当技術分野において知られている。

#### 【0184】

適した宿主細胞は、原核生物、酵母、哺乳動物細胞、または細菌細胞を含む。適した細菌は、グラム陰性菌またはグラム陽性菌、たとえば大腸菌またはバチルス（*Bacillus*）種を含む。好ましくは、*S. セレビシエ*（*Cerevisiae*）などのサッカロミセス（*Saccharomyces*）種由来の酵母もまた、ポリペプチドの産生に使用され得る。様々な哺乳動物または昆虫細胞培養系もまた、組換えタンパク質を発現するために用いることができる。昆虫細胞における異種タンパク質の産生のためのバキュロウイルス（*Baculovirus*）系は、Luckow and Summers, (Bio/Technology, 6:47, 1988) によって概説されている。ある事例において、グリコシル化のためになどのように脊椎動物細胞においてタンパク質を産生することが望ましく、また、培養（組織培養）における脊椎動物細胞の増殖は、ルーチン的な手順になっている。適した哺乳動物宿主細胞系

の例は、内皮細胞、C O S - 7 サル腎培養細胞、C V - 1、L細胞、C 1 2 7、3 T 3、チャイニーズハムスター卵巣（C H O）、ヒト胎児由来腎臓細胞、H e L a、2 9 3、2 9 3 T、およびB H Kの細胞系を含む。多数の適用のために、本明細書において記載されるタンパク質多量体の小さなサイズは、大腸菌を好ましい発現方法にするであろう。

#### 【0185】

タンパク質産生

宿主細胞は、タンパク質産生のために、本明細書において記載される発現ベクターまたはクローニングベクターを用いて形質転換され、プロモーターの誘発、形質転換体の選択、または所望の配列をコードする遺伝子の増幅のために、適宜、修飾された従来の栄養培地中で培養される。

10

#### 【0186】

本発明のタンパク質を産生するために使用される宿主細胞は、様々な培地中で培養され得る。Ham's F10 (Sigma)、最小必須培地 [(MEM)、Sigma]、RPMI-1640 (Sigma)、およびダルベッコ修飾イーグル培地 [(DMEM)、Sigma]などの市販で入手可能な培地は、宿主細胞を培養するのに適している。さらに、Ham et al., Meth. Enz. 58:44 (1979)、Barnes et al., Anal. Biochem. 102:255 (1980)、米国特許第4,767,704号；第4,657,866号；第4,927,762号；第4,560,655号；もしくは第5,122,469号；WO90/03430；WO87/00195；または米国再発行特許第30,985号において記載されている培地のいずれも、培養基として宿主細胞に使用され得る。これらの培地のいずれも、必要に応じて、ホルモンおよび／または他の増殖因子（インスリン、トランスフェリン、または上皮増殖因子など）、塩（塩化ナトリウム、カルシウム、マグネシウム、およびリン酸塩など）、緩衝液（HEPESなど）、ヌクレオチド（アデノシンおよびチミジンなど）、抗生物質（GENTAMYCIN（登録商標）薬剤など）、微量元素（マイクロモルの範囲の最終濃度で通常存在する無機化合物として定義される）、ならびにグルコースまたは等価なエネルギー源が補足され得る。任意の他の必要な補足物もまた、当業者らに知られているであろう適切な濃度で含まれていてもよい。温度、pH、およびその他同種のものなどの培養条件は、発現のために選択された宿主細胞で以前に使用されたものであり、当業者に明白であろう。

20

#### 【0187】

本明細書において開示されるタンパク質はまた、細胞翻訳系を使用して産生することもできる。そのような目的のために、タンパク質をコードする核酸は、mRNAを産生するためにインビトロ転写を可能にするように、かつ利用されている特定の無細胞系においてmRNAの無細胞翻訳を可能にするように修飾されなければならない。例示的な真核細胞を含まない翻訳系には、たとえば、哺乳動物または酵母細胞を含まない翻訳系があり、例示的な原核細胞を含まない翻訳系には、たとえば、細菌細胞を含まない翻訳系がある。

30

#### 【0188】

本明細書において開示されるタンパク質はまた、化学合成によっても産生することもできる（たとえば、Solid Phase Peptide Synthesis, 2nd ed., 1984, The Pierce Chemical Co., Rockford, ILにおいて記載されている方法によって）。タンパク質に対する修飾もまた、化学合成によって生じることができる。

40

#### 【0189】

本明細書において開示されるタンパク質は、タンパク質化学の分野において一般に知られている、タンパク質のための単離／精製法によって精製することができる。非限定的な例は、抽出、再結晶、塩析（たとえば硫酸アンモニウムもしくは硫酸ナトリウムを用いて）、遠心分離、透析、限外濾過、吸着クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、順相クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、ゲル濾過、ゲル浸透クロマトグラフィー、親和性クロマトグラフィー、電気泳動、向流分配、またはこれらの任意の組合せを含む。精製の後に、タンパク質は、濾過および透析を含むが、これらに限定されない当技術分野に知られている様々な方法のいずれかによって

50

、異なる緩衝液中に交換および／または濃縮され得る。

#### 【0190】

精製タンパク質は、好ましくは少なくとも85%純粋、より好ましくは少なくとも95%純粋、および最も好ましくは少なくとも98%純粋である。純度の厳密な数値に関係なく、タンパク質は、医薬品としての使用に十分に純粋である。

#### 【0191】

画像化、診断的、および他の応用

本明細書において記載されるE結合剤は、検出可能に標識することができ、画像化または診断的応用のために、EGFRを発現する細胞と接触させるために使用することができる。本明細書において記載されるE/I結合剤は、検出可能に標識することができ、画像化または診断的応用のために、EGFRおよび／またはIGFIRを発現する細胞と接触させるために使用することができる。Hunter, et al., Nature 144:945 (1962); David, et al., Biochemistry 13:1014 (1974); Pain, et al., J. Immunol. Meth. 40:219 (1981); およびNygren, J. Histochem. and Cytochem. 30:407 (1982)によって記載されている方法を含む、検出可能な成分にタンパク質をコンジュゲートするための当技術分野において知られている任意の方法が用いられうる。

#### 【0192】

ある実施形態において、本明細書において記載されるE結合剤およびE/I結合剤は、検出することができる標識にさらに結合される（たとえば、標識は、放射性同位体、蛍光化合物、酵素、または酵素補因子とすることができる）。標識は、鉄キレートなどの放射性重金属、ガドリニウムもしくはマンガンの放射性キレート、酸素、窒素、鉄、炭素、もしくはガリウムのポジトロン放射体、 $^{43}\text{K}$ 、 $^{52}\text{Fe}$ 、 $^{57}\text{Co}$ 、 $^{67}\text{Cu}$ 、 $^{67}\text{Ga}$ 、 $^{68}\text{Ga}$ 、 $^{123}\text{I}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^{132}\text{I}$ 、または $^{99}\text{Tc}$ などの放射性作用物質であってもよい。そのような成分に付着されたE結合剤またはE/I結合剤は、造影剤として使用されてもよく、ヒトなどの哺乳動物において診断上の使用のために有効量で投与され、次いで、造影剤の局在化および蓄積が検出される。造影剤の局在化および蓄積は、ラジオシンチグラフィ、核磁気共鳴画像法、計算断層像法、またはポジトロン放出断層撮影によって検出され得る。当業者に明らかなように、投与されることとなる放射性同位体の量は、放射性同位体に依存する。当業者らは、活性成分として使用される所与の放射性核種の比活性およびエネルギーに基づいて、投与されることとなる造影剤の量を容易に処方することができる。

#### 【0193】

E結合剤およびE/I結合剤はまた、親和性精製作用物質としても有用である。このプロセスにおいて、タンパク質は、当技術分野においてよく知られている方法を使用して、Sephadex樹脂または濾紙などの適した支持体上に固定される。タンパク質は、競合結合アッセイ、直接および間接的サンドイッチアッセイ、ならびに免疫沈降アッセイなどの任意の知られているアッセイ方法において用いることができる (Zola, Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, pp. 147-158 (CRC Press, Inc., 1987))。

#### 【0194】

E結合剤は、試料中のEGFRを検出するための方法において有用である。E/I結合剤もまた、試料中のEGFRおよび／またはIGFIRを検出するための方法においても有用である。試料は、多くの場合、生検材料、特に、腫瘍、腫瘍の疑いのある生検材料などの生物学的試料となるであろう。試料は、ヒトまたは他の哺乳動物由来のものであってもよい。E結合剤またはE/I結合剤は、放射性成分、蛍光成分、色素成分、化学発光成分、またはハプテン成分などの標識成分を用いて標識されてもよく、固体支持体上に固定され得る。検出は、たとえば、ラジオグラフィ、免疫学的アッセイ、蛍光検出、質量分析法、または表面プラズモン共鳴などの、当技術分野において知られている任意の技術を使用して実行され得る。

#### 【0195】

治療的／インビボでの使用

本明細書において記載される E 結合剤はまた、E G F R 生物学的活性の阻害に応答する状態を治療するための方法においても有用である。本明細書において記載される E / I 結合剤は、E G F R および / または I G F I R の生物学的活性の阻害に応答する状態を治療するための方法においても有用である。E G F R および I G F I R は、増殖、接着、および遊走ならびに分化を含む様々な細胞活性のシグナル伝達経路に、直接または間接的に関与する。

#### 【0196】

一態様において、本出願は、E 結合剤または E / I 結合剤の治療有効量を用いて過剰増殖障害に罹患した対象を治療するための方法を提供する。特に、E 結合剤および E / I 結合剤は、腫瘍および / または腫瘍転移の治療および / または予防処置に有用である。例示的な実施形態において、E / I 結合剤は、E G F R 結合  $^{10}$  F n 3 および I G F I R 結合  $^{10}$  F n 3 の二量体などの抗体様タンパク質多量体である。

10

#### 【0197】

いくつかの実施形態において、E 結合剤または E / I 結合剤を含む医薬組成物は、脳腫瘍、泌尿生殖器管の腫瘍、リンパ系の腫瘍、胃腫瘍、喉頭の腫瘍、単球性白血病、肺腺癌、小細胞肺癌、膀胱癌、多形性膠芽腫、および乳癌を含むが、これらに限定されない腫瘍または扁平上皮癌、膀胱癌、胃癌、肝臓癌、腎臓癌、結腸直腸癌、乳がん、頭部癌、頸部癌、食道癌、婦人科の癌、甲状腺癌、リンパ腫、慢性白血病、および急性白血病を含むが、これらに限定されない癌疾患に罹患した対象に投与される。

20

#### 【0198】

E 結合剤または E / I 結合剤は、単独で、または化学療法、放射線療法、免疫療法、外科的処置、もしくはこれらの任意の組合せなどの 1 つもしくは複数の追加の療法と組み合わせ投与することができる。長期療法は、本明細書において記載されるように、他の治療戦略との関連において、アジュバント療法と同じように、等しく可能である。投与のための技術および投薬量は、特異的なポリペプチドのタイプおよび治療されている特異的な状態に依存して変わるが、当業者によって容易に決定することができる。

#### 【0199】

E / I 結合剤と共に使用され得る追加の作用物質

本出願の一態様は、E 結合剤または E / I 結合剤および細胞毒剤などの追加の治療剤の組合せを提供する。いくつかの実施形態において、E 結合剤または E / I 結合剤は、細胞毒剤に結合される。そのような実施形態は、適宜、インビトロまたはインビボにおける方法によって調製することができる。インビトロにおける方法は、システイン残基およびリジン残基へのコンジュゲーションなどの当技術分野において十分に知られているコンジュゲーション化学を含む。細胞毒剤をポリペプチドに結合するために、結合基または反応基が使用される。適した結合基は、当技術分野においてよく知られており、ジスルフィド基、チオエーテル基、酸不安定基、感光基、ペプチダーゼ不安定基 (peptidase labile group)、およびエステラーゼ不安定基 (esterase labile group) を含む。細胞毒剤はまた、血清アルブミンなどの仲介キャリア分子を通して E 結合剤または E / I 結合剤に結合することもできる。

30

#### 【0200】

E 結合剤または E / I 結合剤に結合され得る例示的な細胞毒剤は、マイタンシノイド、タキサン、CC-1065 の類似体、細菌毒素、植物毒素、リシン、アブリン、リボヌクレアーゼ (RNアーゼ)、DNアーゼ I、プロテアーゼ、ブドウ球菌腸毒素 A、アメリカヤマゴボウ抗ウイルスタンパク質、ゲロニン、ジフテリア菌毒素、シュードモナス (Pseudomonas) 外毒素、シュードモナス内毒素、ランピマーゼ (Ranpimase) (Rap)、Rap (N69Q)、メトトレザト、ダウノルビシン、ドキソルビシン、ビンクリスチン、ビンブラスチン、メルファラン、マイトマイシン C、クロラムブチル、およびカリチエアミシン (calicheamicin) を含む。

40

#### 【0201】

他の治療法または組成物において、E 結合剤または E / I 結合剤は、1 つまたは複数の

50

追加の治療剤と共に投与されるか、または連続して投与される。適した治療剤は、癌治療剤などの細胞毒または細胞分裂阻害剤を含むが、これらに限定されない。

#### 【0202】

癌治療剤は、患者に対する最小限の影響を有しながら、癌細胞を死滅させるまたはその増殖を制限しようとする作用物質である。したがって、そのような作用物質は、健常な宿主細胞との癌細胞特性の任意の差異（たとえば代謝、血管新生、または細胞表面抗原提示）を活用してもよい。癌治療効能の改善のためにE/I結合剤と組み合わせることができる治療剤は、ドキソルビシン、エピルビシン、シクロホスファミド、トラスツズマブ、カペシタビン、タモキシフェン、トレミフェン、レトロゾール、アナストロゾール、フルベストラント、エキセメスタン、ゴセレリン、オキサリプラチン、カルボプラチン、シスプラチン、デキサメタゾン、アンチド、ベパシズマブ、5-フルオロウラシル、ロイコボリン、レバミソール、イリノテカン、エトポシド、トポテカン、ゲムシタビン、ビノレルビン、エストラムスチン、ミトキサントロン、アバレリックス、ゾレドロネート、ストレプトゾシン、リツキシマブ、イダルビシン、ブスルファン、クロラムブシル、フルダラビン、イマチニブ、シタラビン、イブリツモマブ、トシツモマブ、インターフェロンアルファ-2b、メルファラン (melphalam)、ボルテゾミブ、アルトレタミン、アスパラギナーゼ、ゲフィチニブ、エルロチニブ (erlonitib)、抗EGF受容体抗体（たとえばセツキシマブまたはパニツムマブ (panitumab)）、イクサベピロン、エポチロンまたはその誘導体、白金作用物質（カルボプラチン、オキサリプラチン、シスプラチンなど）、タキサン（パクリタキセル、ドセタセルなど）、およびカンプトテシンなどの、腫瘍の診療において使用される種々の作用物質を含む（参考文献：Cancer, Principles & Practice of Oncology, DeVita, V. T., Hellman, S., Rosenberg, S. A., 6th edition, Lippincott-Raven, Philadelphia, 2001）。

#### 【0203】

治療処方および投与様式

本出願は、EGFRおよび／またはIGFIRの生物学的活性の阻害に応答する状態を治療するための方法を提供する。投与のための技術および投薬量は、特定のポリペプチドのタイプおよび治療されている特定の状態に依存して変わるが、当業者によって容易に決定することができる。一般に、規制当局は、治療薬として使用されることとなるタンパク質試薬が、受け入れられる程度に低レベルの発熱物質を有するように処方されることを要求する。したがって、治療製剤は、一般に、適切な規制当局（たとえばFDA）によって決定されるように、それらが実質的に発熱物質がないまたは少なくとも、許容できるレベル以下の発熱物質を含有するという点で、他の処方と区別されるであろう。

#### 【0204】

いくつかの実施形態において、E結合剤およびE/I結合剤は、哺乳動物、特にヒトに対して薬学的に許容できるものである。「薬学的に許容できる」ポリペプチドは、有意な有害な医学的結果を伴うことなく動物に投与されるポリペプチドを指す。薬学的に許容できるE結合剤およびE/I結合剤の例は、インテグリン結合ドメイン (RGD) を欠く<sup>10</sup>Fn3ドメインおよび本質的に内毒素がないか、または非常に低い内毒素レベルを有する<sup>10</sup>Fn3ドメインを含む。

#### 【0205】

治療組成物は、単位剤形で、薬学的に許容できる希釈剤、キャリア、または賦形剤と共に投与され得る。投与は、非限定的な例として、非経口（たとえば静脈内、皮下）、経口、または局所的であってもよい。さらに、ネイキッドDNAデリバリー、組換え遺伝子およびベクター、患者の細胞のエキスビボ (ex vivo) 操作を含む細胞ベースのデリバリー、ならびにその他同種のものを含む、E結合剤またはE/I結合剤をコードする核酸を使用する任意の遺伝子療法技術が用いられてもよい。

#### 【0206】

組成物は、経口投与のために丸剤、錠剤、カプセル剤、液体、もしくは徐放性錠剤；静脈内、皮下、もしくは非経口投与のために液体；または局部投与のためにゲル剤、ローシ

10

20

30

40

50

ョン剤、軟膏、クリーム、またはポリマービヒクルもしくは他の徐放性ビヒクル形態を取ることができる。

【0207】

たとえば、処方を作製するための当技術分野においてよく知られている方法は、"Remington: The Science and Practice of Pharmacy" (20th ed., ed. A.R. Gennaro AR., 2000, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA)において見出される。非経口投与のための処方、たとえば、賦形剤、滅菌水、生理食塩水、ポリエチレングリコールなどのポリアルキレングリコール、植物起源の油、または水素添加ナフタレン (n a p t h a l e n e) を含有していてもよい。生体適合性で生分解性のラクチドポリマー、ラクチド／グリコリドコポリマー、またはポリオキシエチレンーポリオキシプロピレンコポリマーは、化合物の放出をコントロールするために使用され得る。ナノ粒子製剤（たとえば生分解性ナノ粒子、固体脂質ナノ粒子、リポソーム）は、化合物の体内分布をコントロールするために使用され得る。他の可能性として有用な非経口デリバリー系は、エチレン酢酸ビニルコポリマー粒子、浸透性ポンプ、植込み型注入系、およびリポソームを含む。処方における化合物の濃度は、投与されることとなる薬剤の投薬量および投与のルートを含む多くの因子に依存して変わる。

10

【0208】

該ポリペプチドは、所望により、医薬品産業において一般に使用される無毒な酸付加塩または金属複合物などの薬学的に許容できる塩として投与され得る。酸付加塩の例は、酢酸、乳酸、パモ酸、マレイン酸、クエン酸、リンゴ酸、アスコルビン酸、コハク酸、安息香酸、パルミチン酸、コルク酸、サリチル酸、酒石酸、メタンスルホン酸、トルエンスルホン酸、もしくはトリフルオロ酢酸、またはその他同種のものなどの有機酸；タンニン酸、カルボキシメチルセルロース、またはその他同種のものなどのポリマー酸；および塩酸、臭化水素酸、硫酸リン酸、またはその他同種のものなどの無機酸を含む。金属複合物は、亜鉛、鉄、およびその他同種のものを含む。一実施例において、ポリペプチドは、熱安定性を増加させるために酢酸ナトリウムの存在下において製剤される。

20

【0209】

経口的な使用のための処方、無毒な薬学的に許容できる賦形剤を有する混合物において活性成分（複数可）を含有する錠剤を含む。これらの賦形剤は、たとえば不活性希釈剤または充填剤（たとえばスクロースおよびソルビトール）、潤滑剤、流動化剤、ならびに癒着防止剤（たとえばステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸亜鉛、ステアリン酸、シリカ、水素添加植物油、または滑石）であってもよい。

30

【0210】

経口的な使用のための処方または咀嚼錠としてまたは活性成分が不活性固体希釈剤と混合される硬カプセルとしてまたは活性成分が水媒体もしくは油媒体と混合される軟カプセルとして提供され得る。

【0211】

治療有効用量は、投与目的の治療効果をもたらす用量を指す。厳密な用量は、治療されることとなる障害に依存し、既知の技術を使用して当業者によって確定されうる。一般に、E結合剤またはE/I結合剤は、1日当たり約0.01  $\mu\text{g}/\text{kg}$  ～約50  $\text{mg}/\text{kg}$ 、好ましくは1日当たり0.01  $\text{mg}/\text{kg}$  ～約30  $\text{mg}/\text{kg}$ 、最も好ましくは1日当たり0.1  $\text{mg}/\text{kg}$  ～約20  $\text{mg}/\text{kg}$  で投与される。ポリペプチドは、毎日（たとえば毎日1回、2回、3回、もしくは4回）与えられてもよく、またはそれほど頻繁でなくてもよい（たとえば1日おきに、毎週1回もしくは2回、または毎月）。さらに、当技術分野において知られているように、年齢ならびに体重、健康状態、性別、食事、投与の時間、薬物相互作用、および疾患の重症度についての調整が必要な場合もあり、当業者らによってルーチン的な実験法を用いて確定されるであろう。

40

【実施例】

【0212】

ここで概して記載されている本発明は、単に、本発明のある態様および実施形態の説明

50

の目的のために含まれ、決して、本発明を限定するようには意図されない以下の実施例に対する参照によってより容易に理解されるであろう。

【0 2 1 3】

配列の概要

本出願において参照される配列の多くは、下記の表において概説される。別段の定めがない限り、N末端伸長は、一重下線を用いて示され、C末端テールは、二重下線を用いて示され、リンカー配列は、太字で示される。

【0 2 1 4】

【表 1 - 1】

| 配列番号 | 記載                                                                                    | 配列                                                                                                                                                  |
|------|---------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1    | WTヒト <sup>10</sup> F <sub>n</sub> 3ドメイン                                               | VSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAVT<br>VRYRITYGETGGNSPVQEFTVPGSKST<br>ATISGLKPGVDYTITVYAVTGRGDSPASS<br>KPISINYRT                                           |
| 2    | インテグリン結合モチーフを除去した変異体ヒト <sup>10</sup> F <sub>n</sub> 3(RGDをSGEに変化させた;配列番号1からの変化に下線を引く) | VSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAVT<br>VRYRITYGETGGNSPVQEFTVPGSKST<br>ATISGLKPGVDYTITVYAVTGSGESPASS<br>KPISINYRT                                           |
| 3    | N末端伸長(N+8)を有し、テールを有していないI1 IGF-IR単量体                                                  | <u>VSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSARLKV</u><br>ARYRITYGETGGNSPVQEFTVPKNVYT<br>ATISGLKPGVDYTITVYAVTRFRDYQPIS<br>INYRT                                        |
| 4    | N末端伸長(N+10)およびHisタグを有するSerテールを有するI1 IGF-IR単量体                                         | <u>MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSARL</u><br>KVARYRITYGETGGNSPVQEFTVPKNV<br>YTATISGLKPGVDYTITVYAVTRFRDYQ<br>PISINYRTE <u>IDKPSQH</u> HHHHH                |
| 5    | N末端伸長(N+8)を有し、テールを有していないE2 EGFR単量体                                                    | <u>VSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDSGRGS</u><br>YQYYRITYGETGGNSPVQEFTVPGPVHT<br>ATISGLKPGVDYTITVYAVTDHKPHADG<br>PHTYHESPISINYRT                              |
| 6    | N末端伸長(N+10)およびhisタグを有するSerテールを有するE2 EGFR単量体                                           | <u>MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDSGR</u><br>GSYQYYRITYGETGGNSPVQEFTVPGPV<br>HTATISGLKPGVDYTITVYAVTDHKPHA<br>DGPHTYHESPISINYRTE <u>IDKPSQH</u> HHHHH<br>H |
| 7    | N末端伸長(N+8)を有し、テールを有していないE1 EGFR単量体                                                    | <u>VSDVPRDLEVVAATPTSLLISWVAGAED</u><br>YQYYRITYGETGGNSPVQEFTVPHDLVT<br>ATISGLKPGVDYTITVYAVTDMMHVEY<br>TEHPISINYRT                                   |

10

20

30

40

【 0 2 1 5 】

【表 1 - 2】

|    |                                                                                                                               |                                                                                                                                                                                                                                                             |
|----|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 8  | N末端伸長(N+10)およびhisタグを有するSerテールを有するE1 EGFR単量体                                                                                   | MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWVAG<br>AEDYQYYRITYGETGGNSPVQEFTVPHD<br>LVTATISGLKPGVDYTITVYAVTDMMH<br>VEYTEHPISINYRTEIDKPSQH HHHHHH                                                                                                                                 |
| 9  | Serテール                                                                                                                        | EIDKPSQ                                                                                                                                                                                                                                                     |
| 10 | Cysテール                                                                                                                        | EIDKPCQ                                                                                                                                                                                                                                                     |
| 11 | (GS) <sub>10</sub> リンカー                                                                                                       | GSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGS                                                                                                                                                                                                                                      |
| 12 | Fnベースのリンカー                                                                                                                    | PSTSTST                                                                                                                                                                                                                                                     |
| 13 | (GS) <sub>5</sub> リンカー                                                                                                        | GSGSGSGSGS                                                                                                                                                                                                                                                  |
| 14 | (GGGGS) <sub>3</sub> リンカー                                                                                                     | GGGGS GGGGS GGGGS                                                                                                                                                                                                                                           |
| 15 | (GGGGS) <sub>4</sub> リンカー                                                                                                     | GGGGS GGGGS GGGGS GGGGS                                                                                                                                                                                                                                     |
| 16 | (GGGGS) <sub>5</sub> リンカー                                                                                                     | GGGGS GGGGS GGGGS GGGGS GGGGS                                                                                                                                                                                                                               |
| 17 | G <sub>4</sub> SG <sub>4</sub> SG <sub>3</sub> SGリンカー                                                                         | GGGGS GGGGS GGGSG                                                                                                                                                                                                                                           |
| 18 | リンカー                                                                                                                          | GP GPGPG                                                                                                                                                                                                                                                    |
| 19 | リンカー                                                                                                                          | GP GPGPGPGPG                                                                                                                                                                                                                                                |
| 20 | I1-GS10-E2:E2[N末端伸長(N+8)を有し、テールを有していない]に対してGS <sub>10</sub> リンカー(GS10は配列番号11である)を介して融合されたI1[N末端伸長(N+8)および短いテールを有する]を有するI/E直列型 | VSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSARLKV<br>ARYYRITYGETGGNSPVQEFTVPKNVYT<br>ATISGLKPGVDYTITVYAVTRFRDYQPIS<br>INYRTEIDK GSGSGSGSGSGSGSGSGSG<br>SVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDSGRG<br>SYQYYRITYGETGGNSPVQEFTVPGPVH<br>TATISGLKPGVDYTITVYAVTDHKPHAD<br>GPHTYHESPISINYRT          |
| 21 | I1-GS10-E2:E2[N末端伸長(N+8)およびSerテールを有する]に対してGS <sub>10</sub> リンカー(GS10は配列番号11である)を介して融合されたI1[N末端伸長(N+10)および短いテールを有する]を有するI/E直列型 | MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSARL<br>KVARYYRITYGETGGNSPVQEFTVPKNV<br>YTATISGLKPGVDYTITVYAVTRFRDYQ<br>PISINYRTEIDK GSGSGSGSGSGSGSGSG<br>SGSVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDSG<br>RGSYQYYRITYGETGGNSPVQEFTVPGP<br>VHTATISGLKPGVDYTITVYAVTDHKPH<br>ADGPHTYHESPISINYRTEIDKPSQ |

【表 1 - 3】

|    |                                                                                                                                        |                                                                                                                                                                                                                                                                                   |    |
|----|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 22 | I1-GS10-E2:E2[N末端伸長(N+8)およびhisタグを有するSerテールを有する]に対してGS <sub>10</sub> リンカー(GS10は配列番号11である)を介して融合された[N末端伸長(N+10)および短いテールを有する]を有するI/E直列型I1 | MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSARL<br>KVARYYRITYGETGGNSPVQEFTVPKNV<br>YTATISGLKPGVDYTITVYAVTRFRDYQ<br>PISINYRTEIDK <b>SGSGSGSGSGSGSGSG</b><br><b>SGSVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDSG</b><br>RGSYQYYRITYGETGGNSPVQEFTVPGP<br>VHTATISGLKPGVDYTITVYAVTDHKPH<br>ADGPHTYHESPISINYRTEIDKPSQH<br>HH   | 10 |
| 23 | E2-GS10-I1:I1[N末端伸長(N+8)およびSerテールを有する]に対してGS <sub>10</sub> リンカー(GS10は配列番号11である)を介して融合されたE2[N末端伸長(N+8)および短いテールを有する]を有するE/I直列型           | VSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDSGRGS<br>YQYYRITYGETGGNSPVQEFTVPGPVHT<br>ATISGLKPGVDYTITVYAVTDHKPHADG<br>PHTYHESPISINYRTEIDK <b>SGSGSGSGSGS</b><br><b>GSGSGSGSGSVSDVPRDLEVVAATPTSL</b><br>LLISWSARLKVARYYRITYGETGGNSPVQ<br>EFTVPKNVYTATISGLKPGVDYTITVYA<br>VTRFRDYQPISINYRTEIDKPSQ         | 20 |
| 24 | E2-GS10-I1:I1[N末端伸長(N+8)およびSerテールを有する]に対してGS <sub>10</sub> リンカー(GS10は配列番号11である)を介して融合されたE2[N末端伸長(N+10)および短いテールを有する]を有するE/I直列型          | MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDSGR<br>GSYQYYRITYGETGGNSPVQEFTVPGPV<br>HTATISGLKPGVDYTITVYAVTDHKPHA<br>DGPHTYHESPISINYRTEIDK <b>SGSGSGSGS</b><br><b>GSGSGSGSGSGSVSDVPRDLEVVAATPT</b><br>SLLISWSARLKVARYYRITYGETGGNSP<br>VQEFTVPKNVYTATISGLKPGVDYTITV<br>YAVTRFRDYQPISINYRTEIDKPSQ        | 30 |
| 25 | E2-GS10-I1:I1[N末端伸長(N+8)およびhisタグを有するSerテールを有する]に対してGS <sub>10</sub> リンカー(GS10は配列番号11である)を介して融合されたE2[N末端伸長(N+10)および短いテールを有する]を有するE/I直列型 | MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDSGR<br>GSYQYYRITYGETGGNSPVQEFTVPGPV<br>HTATISGLKPGVDYTITVYAVTDHKPHA<br>DGPHTYHESPISINYRTEIDK <b>SGSGSGSGS</b><br><b>GSGSGSGSGSGSVSDVPRDLEVVAATPT</b><br>SLLISWSARLKVARYYRITYGETGGNSP<br>VQEFTVPKNVYTATISGLKPGVDYTITV<br>YAVTRFRDYQPISINYRTEIDKPSQH<br>HH | 40 |

【表 1 - 4】

|    |                                                                                                                                        |                                                                                                                                                                                                                                                                             |
|----|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 26 | I1-GS10-E1:E1[N末端伸長(N+8)を有し、テールを有していない]に対してGS <sub>10</sub> リンカー(GS10は配列番号11である)を介して融合されたI1[N末端伸長(N+8)および短いテールを有する]を有するI/E直列型          | VSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSARLKV<br>ARYYRITYGETGGNSPVQEFTVPKNVYT<br>ATISGLKPGVDYTITVYAVTRFRDYQPIS<br>INRYRTEIDK <b>SGSGSGSGSGSGSGSGSG</b><br>SVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWVAGAE<br>DYQYYRITYGETGGNSPVQEFTVPHDLV<br>TATISGLKPGVDYTITVYAVTDMMHVE<br>YTEHPISINYRT                        |
| 27 | I1-GS10-E1:E1[N末端伸長(N+8)およびSerテールを有する]に対してGS <sub>10</sub> リンカー(GS10は配列番号11である)を介して融合されたI1[N末端伸長(N+10)および短いテールを有する]を有するI/E直列型          | MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSARL<br>KVARYYRITYGETGGNSPVQEFTVPKNV<br>YTATISGLKPGVDYTITVYAVTRFRDYQ<br>PISINRYRTEIDK <b>SGSGSGSGSGSGSGSGSG</b><br>SGSVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWVAG<br>AEDYQYYRITYGETGGNSPVQEFTVPHD<br>LVTATISGLKPGVDYTITVYAVTDMMH<br>VEYTEHPISINRYRTEIDKPSQ            |
| 28 | I1-GS10-E1:E1[N末端伸長(N+8)およびhisタグを有するSerテールを有する]に対してGS <sub>10</sub> リンカー(GS10は配列番号11である)を介して融合されたI1[N末端伸長(N+10)および短いテールを有する]を有するI/E直列型 | MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSARL<br>KVARYYRITYGETGGNSPVQEFTVPKNV<br>YTATISGLKPGVDYTITVYAVTRFRDYQ<br>PISINRYRTEIDK <b>SGSGSGSGSGSGSGSGSG</b><br>SGSVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWVAG<br>AEDYQYYRITYGETGGNSPVQEFTVPHD<br>LVTATISGLKPGVDYTITVYAVTDMMH<br>VEYTEHPISINRYRTEIDKPSQH H H H H H |
| 29 | E1-GS10-I1:I1[N末端伸長(N+8)を有し、テールを有していない]に対してGS <sub>10</sub> リンカー(GS10は配列番号11である)を介して融合されたE1[N末端伸長(N+8)および短いテールを有する]を有するE/I直列型          | VSDVPRDLEVVAATPTSLLISWVAGAE<br>YQYYRITYGETGGNSPVQEFTVPHDLVT<br>ATISGLKPGVDYTITVYAVTDMMHVEY<br>TEHPISINRYRTEIDK <b>SGSGSGSGSGSGSGSG</b><br>SGSGSGSVSDVPRDLEVVAATPTSLLISW<br>SARLKVARYYRITYGETGGNSPVQEFTV<br>PKNVYTATISGLKPGVDYTITVYAVTRF<br>RDYQPISINYRT                     |

10

20

30

40

【表 1 - 5】

|    |                                                                                                                                                                        |                                                                                                                                                                                                                                                                   |
|----|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 30 | E1-GS10-I1:I1[N末端伸長(N+8)およびSerテールを有する]に対してGS <sub>10</sub> リンカー(GS10は配列番号11である)を介して融合されたE1[N末端伸長(N+10)および短いテールを有する]を有するE/I直列型                                          | MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWVAG<br>AEDYQYYRITYGETGGNSPVQEFTVPHD<br>LVTATISGLKPGVDYTITVYAVTDMMH<br>VEYTEHPISINYRTEIDKSGSGSGSGSGSG<br>SGSGSGSGSVSDVPRDLEVVAATPTSLLI<br>SWSARLKVARYYRITYGETGGNSPVQEF<br>TVPKNVYTATISGLKPGVDYTITVYAVT<br>RFRDYQPISINYRTEIDKPSQ            |
| 31 | E1-GS10-I1:I1[N末端伸長(N+8)およびhisタグを有するSerテールを有する]に対してGS <sub>10</sub> リンカー(GS10は配列番号11である)を介して融合されたE1[N末端伸長(N+10)および短いテールを有する]を有するE/I直列型                                 | MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWVAG<br>AEDYQYYRITYGETGGNSPVQEFTVPHD<br>LVTATISGLKPGVDYTITVYAVTDMMH<br>VEYTEHPISINYRTEIDKSGSGSGSGSGSG<br>SGSGSGSGSVSDVPRDLEVVAATPTSLLI<br>SWSARLKVARYYRITYGETGGNSPVQEF<br>TVPKNVYTATISGLKPGVDYTITVYAVT<br>RFRDYQPISINYRTEIDKPSQH H H H H H |
| 32 | <sup>10</sup> F <sub>n</sub> 3スキヤフォールド、ここに、BC、DE、およびFGループは、(X) <sub>n</sub> 、(X) <sub>o</sub> 、および(X) <sub>p</sub> によってそれぞれ表わされ、nは1~20の整数であり、oは1~20の整数であり、pは1~40の整数である | VSDVPRDLEVVAATPTSLLI<br>(X) <sub>n</sub> YYRITYGETGGNSPVQEFTV(X) <sub>o</sub> ATIS<br>GLKPGVDYTITVYAV(X) <sub>p</sub> ISINYRT                                                                                                                                     |
| 33 | EGFR結合剤E1由来のBCループ配列                                                                                                                                                    | SWVAGAEDYQ                                                                                                                                                                                                                                                        |
| 34 | EGFR結合剤E1由来のBCループ配列、ここに、Xは任意のアミノ酸であり、mおよびnは0~5のアミノ酸から独立して選択される                                                                                                         | X <sub>m</sub> VAGAEDYQX <sub>n</sub>                                                                                                                                                                                                                             |
| 35 | EGFR結合剤E1由来のDEループ配列                                                                                                                                                    | PHDLVT                                                                                                                                                                                                                                                            |

10

20

30

40

【表 1 - 6】

|    |                                                                                 |                                              |
|----|---------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------|
| 36 | EGFR結合剤E1由来のDEルー<br>プ配列、ここに、Xは任意のア<br>ミノ酸であり、oおよびpは、0<br>～5のアミノ酸から独立して選<br>択される | X <sub>o</sub> HDLVX <sub>p</sub>            |
| 37 | EGFR結合剤E1由来のFGルー<br>プ配列                                                         | TDMMHVEYTEHP                                 |
| 38 | EGFR結合剤E1由来のFGルー<br>プ配列、ここに、Xは任意のア<br>ミノ酸であり、qおよびrは、0<br>～5のアミノ酸から独立して選<br>択される | X <sub>q</sub> DMMHVEYTEHX <sub>r</sub>      |
| 39 | EGFR結合剤E2由来のBCルー<br>プ配列                                                         | SWDSGRGSYQ                                   |
| 40 | EGFR結合剤E2由来のBCルー<br>プ配列、ここに、Xは任意のア<br>ミノ酸であり、gおよびhは、0<br>～5のアミノ酸から独立して選<br>択される | X <sub>g</sub> DSGRGSYQX <sub>h</sub>        |
| 41 | EGFR結合剤E2由来のDEルー<br>プ配列                                                         | PGPVHT                                       |
| 42 | EGFR結合剤E2由来のDEルー<br>プ配列、ここに、Xは任意のア<br>ミノ酸であり、iおよびjは、0<br>～5のアミノ酸から独立して選<br>択される | X <sub>i</sub> GPVHX <sub>j</sub>            |
| 43 | EGFR結合剤E2由来のFGルー<br>プ配列                                                         | TDHKPHADGPHTYHESP                            |
| 44 | EGFR結合剤E2由来のFGルー<br>プ配列、Xは任意のアミノ酸で<br>あり、kおよびlは、0～5のアミ<br>ノ酸から独立して選択される         | X <sub>k</sub> DHKPHADGPHTYHESX <sub>l</sub> |

10

20

30

40

【 0 2 2 0 】

【表 1 - 7】

|    |                                                                                                                                        |                                                                                                                                                                                                                                                            |
|----|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 45 | IGF-IR結合剤II由来のBCループ配列                                                                                                                  | SWSARLKVAR                                                                                                                                                                                                                                                 |
| 46 | IGF-IR結合剤II由来のBCループ配列、Xは任意のアミノ酸であり、aおよびbは、0～5のアミノ酸から独立して選択される                                                                          | X <sub>a</sub> SARLKVAX <sub>b</sub>                                                                                                                                                                                                                       |
| 47 | IGF-IR結合剤II由来のDEループ配列                                                                                                                  | PKNVYT                                                                                                                                                                                                                                                     |
| 48 | IGF-IR結合剤II由来のDEループ配列、Xは任意のアミノ酸であり、cおよびdは、0～5のアミノ酸から独立して選択される                                                                          | X <sub>c</sub> KNVYX <sub>d</sub>                                                                                                                                                                                                                          |
| 49 | IGF-IR結合剤II由来のFGループ配列                                                                                                                  | TRFRDYQP                                                                                                                                                                                                                                                   |
| 50 | IGF-IR結合剤II由来のFGループ配列、Xは任意のアミノ酸であり、eおよびfは、0～5のアミノ酸から独立して選択される                                                                          | X <sub>e</sub> RFRDYQX <sub>f</sub>                                                                                                                                                                                                                        |
| 51 | リンカー                                                                                                                                   | GPG                                                                                                                                                                                                                                                        |
| 52 | N末端伸長(N+10)、Serテール、およびhisタグを有するE3 EGFR単量体                                                                                              | MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWLPGK<br>LRYQYYRITYGETGGNSPVQEFTVPHDL<br>RTATISGLKPGVDYTITVYAVTNMMHV<br>EYSEYPISINYRTEIDKPSQH HHHHHH                                                                                                                                |
| 53 | E3-GS10-I1:I1[N末端伸長(N+8)およびhisタグを有するCysテールを有する]に対してGS <sub>10</sub> リンカー(GS10は配列番号I1である)を介して融合されたE3[N末端伸長(N+10)および短いテールを有する]を有するE/I直列型 | MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWLPGK<br>LRYQYYRITYGETGGNSPVQEFTVPHDL<br>RTATISGLKPGVDYTITVYAVTNMMHV<br>EYSEYPISINYRTEIDKSGSGSGSGSGS<br>SGSGSGSVSDVPRDLEVVAATPTSLLIS<br>WSARLKVARYRITYGETGGNSPVQEFT<br>VPKNVYTATISGLKPGVDYTITVYAVTR<br>FRDYQPISINYRTEIDKPCQH HHHHHH |

【 0 2 2 1 】

【表 1 - 8】

|    |                                                                                                                                            |                                                                                                                                                                                                                                                                       |
|----|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 54 | I1-GS10-E3:E3[N末端伸長(N+8)<br>およびhisタグを有するCysテールを有する]に対してGS <sub>10</sub> リンカー(GS10は配列番号11である)を介して融合されたI1[N末端伸長(N+10)および短いテールを有する]を有するI/E直列型 | MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSARL<br>KVARYYRITYGETGGNSPVQEFTVPKNV<br>YTATISGLKPGVDYTITVYAVTRFRDYQ<br>PISINYRTEIDKSGSGSGSGSGSGSGSG<br>SGSVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWLP<br>KLRVQYYRITYGETGGNSPVQEFTVPHD<br>LRTATISGLKPGVDYTITVYAVTNMMH<br>VEYSEYPISINYRTEIDKPCQH HHHHHH           |
| 55 | E1-GS10-I1:I1[N末端伸長(N+8)<br>およびhisタグを有するCysテールを有する]に対してGS <sub>10</sub> リンカー(GS10は配列番号11である)を介して融合されたE1[N末端伸長(N+10)および短いテールを有する]を有するE/I直列型 | MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWVAG<br>AEDYQYYRITYGETGGNSPVQEFTVPHD<br>LVTATISGLKPGVDYTITVYAVTDMMH<br>VEYTEHPISINYRTEIDKSGSGSGSGSGSG<br>SGSGSGSGSVSDVPRDLEVVAATPTSLLI<br>SWSARLKVARYYRITYGETGGNSPVQEF<br>TVPKNVYTATISGLKPGVDYTITVYAVT<br>RFRDYQPISINYRTEIDKPCQH HHHHHH        |
| 56 | E2-GS10-I1:I1[N末端伸長(N+8)<br>およびhisタグを有するCysテールを有する]に対してGS <sub>10</sub> リンカー(GS10は配列番号11である)を介して融合されたE2[N末端伸長(N+10)および短いテールを有する]を有するE/I直列型 | MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDSGR<br>GSYQYYRITYGETGGNSPVQEFTVPGPV<br>HTATISGLKPGVDYTITVYAVTDHKPHA<br>DGPHTYHESPISINYRTEIDKSGSGSGSG<br>SGSGSGSGSGSVSDVPRDLEVVAATPT<br>SLLISWSARLKVARYYRITYGETGGNSP<br>VQEFTVPKNVYTATISGLKPGVDYTITV<br>YAVTRFRDYQPISINYRTEIDKPCQH HHHH<br>HH |
| 57 | I1-GS10-E1:E1[N末端伸長(N+8)<br>およびhisタグを有するCysテールを有する]に対してGS <sub>10</sub> リンカー(GS10は配列番号11である)を介して融合されたI1[N末端伸長(N+10)および短いテールを有する]を有するI/E直列型 | MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSARL<br>KVARYYRITYGETGGNSPVQEFTVPKNV<br>YTATISGLKPGVDYTITVYAVTRFRDYQ<br>PISINYRTEIDKSGSGSGSGSGSGSGSG<br>SGSVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWVAG<br>AEDYQYYRITYGETGGNSPVQEFTVPHD<br>LVTATISGLKPGVDYTITVYAVTDMMH<br>VEYTEHPISINYRTEIDKPCQH HHHHHH          |

10

20

30

40

【表 1 - 9】

|    |                                                                                                                                        |                                                                                                                                                                                                                                                                    |
|----|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 58 | II-GS10-E2:E2[N末端伸長(N+8)およびhisタグを有するCysテールを有する]に対してGS <sub>10</sub> リンカー(GS10は配列番号11である)を介して融合されたII[N末端伸長(N+10)および短いテールを有する]を有するI/E直列型 | MGVSDVPRDLEVVAAATPTSLLISWSARL<br>KVARYYRITYGETGGNSPVQEFTVPKNV<br>YTATISGLKPGVDYTITVYAVTRFRDYQ<br>PISINYRTEIDKSGSGSGSGSGSGSGSG<br>SGSVSDVPRDLEVVAAATPTSLLISWDSG<br>RGSYQYYRITYGETGGNSPVQEFTVPGP<br>VHTATISGLKPGVDYTITVYAVTDHKPH<br>ADGPHTYHESPISINYRTEIDKPCQH<br>HH |
| 59 | EGFR結合剤E3由来のBCループ配列                                                                                                                    | SWLPGKLRYQ                                                                                                                                                                                                                                                         |
| 60 | EGFR結合剤E3由来のBCループ配列、Xは任意のアミノ酸であり、sおよびtは、0～5のアミノ酸から独立して選択される                                                                            | X <sub>s</sub> LPGKLRYQX <sub>t</sub>                                                                                                                                                                                                                              |
| 61 | EGFR結合剤E3由来のDEループ配列                                                                                                                    | PHDLRT                                                                                                                                                                                                                                                             |
| 62 | EGFR結合剤E3由来のDEループ配列、Xは任意のアミノ酸であり、uおよびwは、0～5のアミノ酸から独立して選択される                                                                            | X <sub>u</sub> HDLRX <sub>w</sub>                                                                                                                                                                                                                                  |
| 63 | EGFR結合剤E3由来のFGループ配列                                                                                                                    | TNMMHVEYSEYP                                                                                                                                                                                                                                                       |
| 64 | EGFR結合剤E3由来のDEループ配列、Xは任意のアミノ酸であり、yおよびzは、0～5のアミノ酸から独立して選択される                                                                            | X <sub>y</sub> NMMHVEYSEYX <sub>z</sub>                                                                                                                                                                                                                            |
| 65 | II IGF-IR単量体コア配列:N末端伸長もC末端テールも有していないII                                                                                                 | EVVAATPTSLLISWSARLKVARYYRITY<br>GETGGNSPVQEFTVPKNVYTATISGLKP<br>GVDYTITVYAVTRFRDYQPISINYRT                                                                                                                                                                         |

10

20

30

40

【表 1 - 1 0】

|    |                                                                                            |                                                                                                        |
|----|--------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 66 | E1 EGFR単量体コア配列:N末端伸長もC末端テールも有していないE1                                                       | EVVAATPTSLLISWVAGAEDYQYYRITY<br>GETGGNSPVQEFTVPHDLVTATISGLKP<br>GVDTITVYAVTDMMHVEYTEHPISINY<br>RT      |
| 67 | E2 EGFR単量体コア配列:N末端伸長もC末端テールも有していないE2                                                       | EVVAATPTSLLISWDSGRGSYQYYRITY<br>GETGGNSPVQEFTVPGPVHTATISGLKP<br>GVDTITVYAVTDHKPHADGPHTYHES<br>PISINYRT |
| 68 | E3 EGFR単量体コア配列:N末端伸長もC末端テールも有していない配列番号82                                                   | EVVAATPTSLLISWLPGKLRQYYRITY<br>GETGGNSPVQEFTVPHDLRTATISGLKP<br>GVDTITVYAVTNMMHVEYSEYPISINY<br>RT       |
| 69 | 例示的なN末端伸長(N+10)                                                                            | MGVSDVPRDL                                                                                             |
| 70 | 例示的なN末端伸長                                                                                  | GVSDVPRDL                                                                                              |
| 71 | 例示的なN末端伸長(N+8)                                                                             | VSDVPRDL                                                                                               |
| 72 | 例示的なN末端伸長、Xは任意のアミノ酸であり、nは0、1、または2であり、好ましくは、n=1である場合、Xは、MetまたはGlyであり、n=2である場合、Xは、Met-Glyである | X <sub>n</sub> SDVPRDL                                                                                 |
| 73 | 例示的なN末端伸長、Xは任意のアミノ酸であり、nは0、1、または2であり、好ましくは、n=1である場合、Xは、MetまたはGlyであり、n=2である場合、Xは、Met-Glyである | X <sub>n</sub> DVPRDL                                                                                  |

【 0 2 2 4 】

10

20

30

40

【表 1 - 1 1】

|    |                                                                                            |                                                                                                                    |
|----|--------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 74 | 例示的なN末端伸長、Xは任意のアミノ酸であり、nは0、1、または2であり、好ましくは、n=1である場合、Xは、MetまたはGlyであり、n=2である場合、Xは、Met-Glyである | X <sub>n</sub> VPRDL                                                                                               |
| 75 | 例示的なN末端伸長、Xは任意のアミノ酸であり、nは0、1、または2であり、好ましくは、n=1である場合、Xは、MetまたはGlyであり、n=2である場合、Xは、Met-Glyである | X <sub>n</sub> PRDL                                                                                                |
| 76 | 例示的なN末端伸長、Xは任意のアミノ酸であり、nは0、1、または2であり、好ましくは、n=1である場合、Xは、MetまたはGlyであり、n=2である場合、Xは、Met-Glyである | X <sub>n</sub> RDL                                                                                                 |
| 77 | 例示的なN末端伸長、Xは任意のアミノ酸であり、nは0、1、または2であり、好ましくは、n=1である場合、Xは、MetまたはGlyであり、n=2である場合、Xは、Met-Glyである | X <sub>n</sub> DL                                                                                                  |
| 78 | 短いテール                                                                                      | EIDK                                                                                                               |
| 79 | 例示的なC末端テール                                                                                 | EIDKP                                                                                                              |
| 80 | 例示的なC末端テール                                                                                 | EIDKPS                                                                                                             |
| 81 | 例示的なC末端テール                                                                                 | EIDKPC                                                                                                             |
| 82 | N末端伸長(N+8)を有し、テールを有していないE3 EGFR単量体                                                         | <u>VSDVPRD</u> LEVVAATPTSLISWLP GKLR<br>YQYYRITYGETGGNSPVQEFTVPHDLRT<br>ATISGLKPGVDYTITVYAVTNMMHVEY<br>SEYPISINYRT |

【表 1 - 1 2】

|    |                                                                                                                              |                                                                                                                                                                                                                                                                                 |    |
|----|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 87 | E3-GS10-I1:I1[N末端伸長(N+8)およびCysテールを有する]に対してGS <sub>10</sub> リンカー(GS10は配列番号11である)を介して融合されたE3[N末端伸長(N+8)および短いテールを有する]を有するE/I直列型 | VSDVPRDLEVVAATPTSLLISWLPGLR<br>YQYYRITYGETGGNSPVQEFTVPHDLRT<br>ATISGLKPGVDYTITVYAVTNMMHVEY<br>SEYPISINYRTEIDK <b>GSGSGSGSGSGSGS</b><br><b>GSGSGSVSDVPRDLEVVAATPTSLLISW</b><br>SARLKVARYYRITYGETGGNSPVQEFTV<br>PKNVYTATISGLKPGVDYTITVYAVTRF<br>RDYQPISINYRTEIDK <b>PCQ</b>       | 10 |
| 88 | I1-GS10-E3:E3[N末端伸長(N+8)およびCysテールを有する]に対してGS <sub>10</sub> リンカー(GS10は配列番号11である)を介して融合されたI1[N末端伸長(N+8)および短いテールを有する]を有するI/E直列型 | VSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSARLKV<br>ARYYRITYGETGGNSPVQEFTVPKNVYT<br>ATISGLKPGVDYTITVYAVTRFRDYQPIS<br>INYRTEIDK <b>GSGSGSGSGSGSGSGSGSG</b><br><b>SVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWLPGL</b><br>RYQYYRITYGETGGNSPVQEFTVPHDLR<br>TATISGLKPGVDYTITVYAVTNMMHVE<br>YSEYPISINYRTEIDK <b>PCQ</b>       | 20 |
| 89 | E1-GS10-I1:I1[N末端伸長(N+8)およびCysテールを有する]に対してGS <sub>10</sub> リンカー(GS10は配列番号11である)を介して融合されたE1[N末端伸長(N+8)および短いテールを有する]を有するE/I直列型 | VSDVPRDLEVVAATPTSLLISWVAGAED<br>YQYYRITYGETGGNSPVQEFTVPHDLVT<br>ATISGLKPGVDYTITVYAVTDMMHVEY<br>TEHPISINYRTEIDK <b>GSGSGSGSGSGSGS</b><br><b>GSGSGSVSDVPRDLEVVAATPTSLLISW</b><br>SARLKVARYYRITYGETGGNSPVQEFTV<br>PKNVYTATISGLKPGVDYTITVYAVTRF<br>RDYQPISINYRTEIDK <b>PCQ</b>      | 30 |
| 90 | E2-GS10-I1:I1[N末端伸長(N+8)およびCysテールを有する]に対してGS <sub>10</sub> リンカー(GS10は配列番号11である)を介して融合されたE2[N末端伸長(N+8)および短いテールを有する]を有するE/I直列型 | VSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDSGRGS<br>YQYYRITYGETGGNSPVQEFTVPGPVHT<br>ATISGLKPGVDYTITVYAVTDHKPHADG<br>PHTYHESPISINYRTEIDK <b>GSGSGSGSGS</b><br><b>GSGSGSGSGSVSDVPRDLEVVAATPTS</b><br>LLISWSARLKVARYYRITYGETGGNSPVQ<br>EFTVPKNVYTATISGLKPGVDYTITVYA<br>VTRFRDYQPISINYRTEIDK <b>PCQ</b> | 40 |

【表 1 - 1 3】

|    |                                                                                                                                                                                                     |                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
|----|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 91 | I1-GS10-E1:E1[N末端伸長(N+8)およびCysテールを有する]に対してGS <sub>10</sub> リンカー(GS10は配列番号11である)を介して融合されたI1[N末端伸長(N+8)および短いテールを有する]を有するI/E直列型                                                                        | <u>VSDVPRD</u> LEVVAATPTSLLISWSARLKV<br>ARYYRITYGETGGNSPVQEFTVPKNVYT<br>ATISGLKPGVDYTITVYAVTRFRDYQPIS<br>INYRTE <u>IDK</u> GSGSGSGSGSGSGSGSGSG<br>SVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWVAGAE<br>DYQYYRITYGETGGNSPVQEFTVPHDLV<br>TATISGLKPGVDYTITVYAVTDMMHVE<br>YTEHPISINYRTE <u>IDKPCQ</u>        |
| 92 | I1-GS10-E2:E2[N末端伸長(N+8)およびCysテールを有する]に対してGS <sub>10</sub> リンカー(GS10は配列番号11である)を介して融合されたI1[N末端伸長(N+8)および短いテールを有する]を有するI/E直列型                                                                        | <u>VSDVPRD</u> LEVVAATPTSLLISWSARLKV<br>ARYYRITYGETGGNSPVQEFTVPKNVYT<br>ATISGLKPGVDYTITVYAVTRFRDYQPIS<br>INYRTE <u>IDK</u> GSGSGSGSGSGSGSGSGSGSG<br>SVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDSGRG<br>SYQYYRITYGETGGNSPVQEFTVPGPVH<br>TATISGLKPGVDYTITVYAVTDHKPHAD<br>GPHTYHESPISINYRTE <u>IDKPCQ</u> |
| 93 | PA3リンカー                                                                                                                                                                                             | PAPAPA                                                                                                                                                                                                                                                                              |
| 94 | PA6リンカー                                                                                                                                                                                             | PAPAPAPAPAPA                                                                                                                                                                                                                                                                        |
| 95 | PA9リンカー                                                                                                                                                                                             | PAPAPAPAPAPAPAPAPA                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| 96 | 修飾Serテール                                                                                                                                                                                            | EGSGS                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| 97 | 修飾Cysテール                                                                                                                                                                                            | EGSGC                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| 98 | E3-(PA) <sub>n</sub> -I1:I1[N末端伸長(N+8)および修飾Serテールまたは修飾Cysテールを有する]に対して(PA) <sub>n</sub> リンカー((PA) <sub>n</sub> は配列番号488である)を介して融合されたE3[N末端伸長(N+8)およびEテールを有する]を有するE/I直列型、n=3、6、または9であり、X=SerまたはCysである | <u>VSDVPRD</u> LEVVAATPTSLLISWLPGLR<br>YQYYRITYGETGGNSPVQEFTVPHDLRT<br>ATISGLKPGVDYTITVYAVTNMMHVEY<br>SEYPISINYRTE(PA) <sub>n</sub> <u>VSDVPRD</u> LEVVA<br>TPTSLLISWSARLKVARYYRITYGETGG<br>NSPVQEFTVPKNVYTATISGLKPGVDYTI<br>TVYAVTRFRDYQPISINYRTE <u>EGSGX</u>                     |

10

20

30

40

【表 1 - 1 4】

|     |                                                                                                                                                                                                     |                                                                                                                                                                                                                                                            |
|-----|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 99  | I1-(PA) <sub>n</sub> -E3:E3[N末端伸長(N+8)および修飾Serテールまたは修飾Cysテールを有する]に対して(PA) <sub>n</sub> リンカー[(PA) <sub>n</sub> は配列番号488である]を介して融合されたI1[N末端伸長(N+8)およびEテールを有する]を有するI/E直列型、n=3、6、または9であり、X=SerまたはCysである | <u>VSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSARLKV</u><br>ARYYRITYGETGGNSPVQEFTVPKNVYT<br>ATISGLKPGVDYTITVYAVTRFRDYPIS<br>INYRTE(PA) <sub>n</sub> <u>VSDVPRDLEVVAATPTSLL</u><br>ISWLPGLRYQYYRITYGETGGNSPVQE<br>FTVPHDLRTATISGLKPGVDYTITVYAVT<br>NMMHVEYSEYPISINYRTEGSGX       |
| 100 | E1-(PA) <sub>n</sub> -I1:I1[N末端伸長(N+8)および修飾Serテールまたは修飾Cysテールを有する]に対して(PA) <sub>n</sub> リンカー[(PA) <sub>n</sub> は配列番号488である]を介して融合されたE1[N末端伸長(N+8)およびEテールを有する]を有するE/I直列型、n=3、6、または9であり、X=SerまたはCysである | <u>VSDVPRDLEVVAATPTSLLISWVAGAED</u><br>YQYYRITYGETGGNSPVQEFTVPHDLVT<br>ATISGLKPGVDYTITVYAVTDMMHVEY<br>TEHPISINYRTE(PA) <sub>n</sub> <u>VSDVPRDLEVVA</u><br>TPTSLLISWSARLKVARYYRITYGETGG<br>NSPVQEFTVPKNVYTATISGLKPGVDYTI<br>TVYAVTRFRDYPISINYRTEGSGX       |
| 101 | E2-(PA) <sub>n</sub> -I1:I1[N末端伸長(N+8)および修飾Serテールまたは修飾Cysテールを有する]に対して(PA) <sub>n</sub> リンカー[(PA) <sub>n</sub> は配列番号488である]を介して融合されたE2[N末端伸長(N+8)およびEテールを有する]を有するE/I直列型、n=3、6、または9であり、X=SerまたはCysである | <u>VSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDSGRGS</u><br>YQYYRITYGETGGNSPVQEFTVPGPVHT<br>ATISGLKPGVDYTITVYAVTDHKPHADG<br>PHTYHESPISINYRTE(PA) <sub>n</sub> <u>VSDVPRDLEV</u><br>VAATPTSLLISWSARLKVARYYRITYGE<br>TGGNSPVQEFTVPKNVYTATISGLKPGV<br>DYTITVYAVTRFRDYPISINYRTEGSGX |

10

20

30

【 0 2 2 8 】

【表 1 - 1 5】

|     |                                                                                                                                                                                                     |                                                                                                                                                                                                                                                                            |
|-----|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 102 | I1-(PA) <sub>n</sub> -E1:E1[N末端伸長(N+8)および修飾Serテールまたは修飾Cysテールを有する]に対して(PA) <sub>n</sub> リンカー[(PA) <sub>n</sub> は配列番号488である]を介して融合されたI1[N末端伸長(N+8)およびEテールを有する]を有するI/E直列型、n=3、6、または9であり、X=SerまたはCysである | <u>VSDVPRD</u> LEVVAATPTSLLISWSARLKV<br>ARYYRITYGETGGNSPVQEFTVPKNVYT<br>ATISGLKPGVDYTITVYAVTRFRDYQPIS<br>INYRTE(PA) <sub>n</sub> <u>VSDVPRD</u> LEVVAATPTSLL<br>ISWVAGAEDYQYYRITYGETGGNSPVQE<br>FTVPHDLVTATISGLKPGVDYTITVYAV<br>TDMMHVEYTEHPISINYRTEGSGX                   |
| 103 | I1-(PA) <sub>n</sub> -E2:E2[N末端伸長(N+8)および修飾Serテールまたは修飾Cysテールを有する]に対して(PA) <sub>n</sub> リンカー[(PA) <sub>n</sub> は配列番号488である]を介して融合されたI1[N末端伸長(N+8)およびEテールを有する]を有するI/E直列型、n=3、6、または9であり、X=SerまたはCysである | <u>VSDVPRD</u> LEVVAATPTSLLISWSARLKV<br>ARYYRITYGETGGNSPVQEFTVPKNVYT<br>ATISGLKPGVDYTITVYAVTRFRDYQPIS<br>INYRTE(PA) <sub>n</sub> <u>VSDVPRD</u> LEVVAATPTSLL<br>ISWDSGRGSYQYYRITYGETGGNSPVQE<br>FTVPGPVHTATISGLKPGVDYTITVYAVT<br>DHKPHADGPHTYHESPISINYRTEGSGX              |
| 104 | E3-GS10-I1:I1[N末端伸長(N+8)およびSerテールを有する]に対してGS <sub>10</sub> リンカー(GS10は配列番号11である)を介して融合されたE3[N末端伸長(N+8)および短いテールを有する]を有するE/I直列型                                                                        | <u>VSDVPRD</u> LEVVAATPTSLLISWLPGLR<br>YQYYRITYGETGGNSPVQEFTVPHDLRT<br>ATISGLKPGVDYTITVYAVTNMMHVEY<br>SEYPISINYRTEIDK <b>GSGSGSGSGSGSGS</b><br><b>GSGSGSVSDVPRD</b> LEVVAATPTSLLISW<br>SARLKVARYYRITYGETGGNSPVQEFTV<br>PKNVYTATISGLKPGVDYTITVYAVTRF<br>RDYQPISINYRTEIDKPSQ |
| 105 | I1-GS10-E3:E3[N末端伸長(N+8)およびSerテールを有する]に対してGS <sub>10</sub> リンカー(GS10は配列番号11である)を介して融合されたI1[N末端伸長(N+8)および短いテールを有する]を有するI/E直列型                                                                        | <u>VSDVPRD</u> LEVVAATPTSLLISWSARLKV<br>ARYYRITYGETGGNSPVQEFTVPKNVYT<br>ATISGLKPGVDYTITVYAVTRFRDYQPIS<br>INYRTEIDK <b>GSGSGSGSGSGSGSGSGSG</b><br><b>SVSDVPRD</b> LEVVAATPTSLLISWLPGL<br>RYQYYRITYGETGGNSPVQEFTVPHDLR<br>TATISGLKPGVDYTITVYAVTNMMHVE<br>YSEYPISINYRTEIDKPSQ |

10

20

30

40

【表 1 - 1 6】

|     |                                                                                                |                                                                                                                                         |
|-----|------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 106 | N末端伸長(N+8)を有し、テールを有していないE4 EGFR単量体                                                             | <u>VSDVPRDLEVVAATPTSLLISWHERDGS</u><br>RQYYRITYGETGGNSPVQEFTVPGGVRT<br>ATISGLKPGVDYTITVYAVTDYFNPTTH<br>EYIYQTTPI SINYRT                 |
| 107 | N末端伸長(N+10)およびHisタグを有するSerを有するE4 EGFR単量体                                                       | <u>MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWHERD</u><br>GSRQYYRITYGETGGNSPVQEFTVPGGV<br>RTATISGLKPGVDYTITVYAVTDYFNPTT<br>HEYIYQTTPI SINYRTEIDKPSQH HHHHH |
| 108 | E4 EGFR単量体コア配列:N末端伸長もC末端テールも有していないE4                                                           | EVVAATPTSLLISWHERD GSRQYYRITY<br>GETGGNSPVQEFTVPGGVRTATISGLKP<br>GVDYTITVYAVTDYFNPTTHEYIYQTTPI<br>SINYRT                                |
| 109 | EGFR結合剤E4由来のBCループ配列                                                                            | SWHERD GSRQ                                                                                                                             |
| 110 | EGFR結合剤E4由来のDEループ配列                                                                            | PGGVRT                                                                                                                                  |
| 111 | EGFR結合剤E4由来のFGループ配列                                                                            | TDYFNPTTHEYIYQTTPI                                                                                                                      |
| 112 | N末端伸長(N+8)を有し、テールを有していないE5 EGFR単量体                                                             | <u>VSDVPRDLEVVAATPTSLLISWWAPVDR</u><br>YQYYRITYGETGGNSPVQEFTVPRDVYT<br>ATISGLKPGVDYTITVYAVTDYKPHADG<br>PHTYHESPISINYRT                  |
| 113 | N末端伸長(N+10)および修飾Serテールまたは修飾Cysテールを有するE5 EGFR単量体、<br>X=SerまたはCys;所望により6×Hisタグ(配列番号487)を含んでいてもよい | <u>MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWWAP</u><br>VDRYQYYRITYGETGGNSPVQEFTVPRD<br>VYTATISGLKPGVDYTITVYAVTDYKPH<br>ADGPHTYHESPISINYRTEIDKPXQ         |

10

20

30

40

【 0 2 3 0 】

【表 1 - 1 7】

|     |                                                                                                                                                                                      |                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
|-----|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 114 | E5 EGFR単量体コア配列:N末端伸長もC末端テールも有していないE5                                                                                                                                                 | EVVAATPTSLLISWWAPVDRYQYYRITY<br>GETGGNSPVQEFTVPRDVYTATISGLKP<br>GVDYTITVYAVTDYKPHADGPHTYHES<br>PISINYRT                                                                                                                                                                                                    |
| 115 | EGFR結合剤E5由来のBCループ配列                                                                                                                                                                  | SWWAPVDRYQ                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| 116 | EGFR結合剤E5由来のDEループ配列                                                                                                                                                                  | PRDVYT                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| 117 | EGFR結合剤E5由来のFGループ配列                                                                                                                                                                  | TDYKPHADGPHTYHESP                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| 118 | E4-GS10-I1:I1[N末端伸長(N+8)を有し、テールを有していない]に対してGS <sub>10</sub> リンカー(GS10は配列番号11である)を介して融合されたE4[N末端伸長(N+8)および短いテールを有する]を有するE/I直列型                                                        | <u>VSDVPRD</u> LEVVAATPTSLLISWHERDGS<br>RQYYRITYGETGGNSPVQEFTVPGGVRT<br>ATISGLKPGVDYTITVYAVTDYFNPTTH<br>EYIYQTTPIISINYRTE <u>IDK</u> <b>GSGSGSGSGS</b><br><b>GSGSGSGSGS</b> <u>VSDVPRD</u> LEVVAATPTSL<br>LISWSARLKVARYYRITYGETGGNSPVQ<br>EFTVPKNVYTATISGLKPGVDYTITVYA<br>VTRFRDYQPISINYRT                 |
| 119 | E4-GS10-I1:I1[N末端伸長(N+8)および修飾Serテールまたは修飾Cysテールを有する]に対してGS <sub>10</sub> リンカー(GS10は配列番号11である)を介して融合されたE4[N末端伸長(N+8)および短いテールを有する]を有するE/I直列型、X=SerまたはCys;所望により6×Hisタグ(配列番号487)を含んでいてもよい | <u>VSDVPRD</u> LEVVAATPTSLLISWHERDGS<br>RQYYRITYGETGGNSPVQEFTVPGGVRT<br>ATISGLKPGVDYTITVYAVTDYFNPTTH<br>EYIYQTTPIISINYRTE <u>IDK</u> <b>GSGSGSGSGS</b><br><b>GSGSGSGSGS</b> <u>VSDVPRD</u> LEVVAATPTSL<br>LISWSARLKVARYYRITYGETGGNSPVQ<br>EFTVPKNVYTATISGLKPGVDYTITVYA<br>VTRFRDYQPISINYRTE <u>IDK</u> PXQ |

10

20

30

40

【表 1 - 1 8】

|     |                                                                                                                                                                                                                                  |                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
|-----|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 120 | E4-GS10-I1:I1[N末端伸長(N+8)およびhisタグを有するCysテールを有する]に対してGS <sub>10</sub> リンカー(GS10は配列番号11である)を介して融合されたE4[N末端伸長(N+10)および短いテールを有する]を有するE/I直列型                                                                                           | MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWHERD<br>GSRQYYRITYGETGGNSPVQEFTVPGGV<br>RTATISGLKPGVDYTITVYAVTDYFNPTT<br>HEYIYQTTIPISINYRTEIDK <b>GSGSGSGSG</b><br><b>S</b> GSGSGSGSGSVSDVPRDLEVVAATPTS<br>LLISWSARLKVARYYRITYGETGGNSPV<br>QEFTVPKNVYTATISGLKPGVDYTITVY<br>AVTRFRDYQPISINYRTEIDKPCQH HHHH<br>H |
| 121 | E4-(PA) <sub>n</sub> -I1:I1[N末端伸長(N+8)および修飾Serテールまたは修飾Cysテールを有する]に対して(PA) <sub>n</sub> リンカー[(PA) <sub>n</sub> は配列番号488である]を介して融合されたE4[N末端伸長(N+8)およびEテールを有する]を有するE/I直列型、n=3、6、または9であり、X=SerまたはCysである;所望により6×Hisタグ(配列番号487)を含んでもよい | VSDVPRDLEVVAATPTSLLISWHERDGS<br>RQYYRITYGETGGNSPVQEFTVPGGVRT<br>ATISGLKPGVDYTITVYAVTDYFNPTTH<br>EYIYQTTIPISINYRTE(PA) <sub>n</sub> VSDVPRDLEV<br>VAATPTSLLISWSARLKVARYYRITYGE<br>TGGNSPVQEFTVPKNVYTATISGLKPGV<br>DYTITVYAVTRFRDYQPISINYRTEIDKP<br>CQH HHHHHH                           |
| 122 | I1-GS10-E4:E4[N末端伸長(N+8)を有し、テールを有していない]に対してGS <sub>10</sub> リンカー(GS10は配列番号11である)を介して融合されたI1[N末端伸長(N+8)および短いテールを有する]を有するI/E直列型                                                                                                    | VSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSARLKV<br>ARYYRITYGETGGNSPVQEFTVPKNVYT<br>ATISGLKPGVDYTITVYAVTRFRDYQPIS<br>INYRTEIDK <b>GSGSGSGSGSGSGSGSGSG</b><br><b>S</b> VSDVPRDLEVVAATPTSLLISWHERDG<br>SRQYYRITYGETGGNSPVQEFTVPGGVR<br>TATISGLKPGVDYTITVYAVTDYFNPTT<br>HEYIYQTTIPISINYRT                     |

10

20

30

【表 1 - 1 9】

|     |                                                                                                                                                                                                                                    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
|-----|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 123 | I1-GS10-E4:E4[N末端伸長(N+8)および修飾Serテールまたは修飾Cysテールを有する]に対してGS <sub>10</sub> リンカー(GS10は配列番号11である)を介して融合されたI1[N末端伸長(N+8)および短いテールを有する]を有するI/E直列型、X=SerまたはCys;所望により6×Hisタグ(配列番号487)を含んでいてもよい                                               | VSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSARLKV<br>ARYYRITYGETGGNSPVQEFTVPKNVYT<br>ATISGLKPGVDYTITVYAVTRFRDYQPIS<br>IN <del>YRTEIDK</del> SGSGSGSGSGSGSGSGSGSG<br>SVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWHERDG<br>SRQYYRITYGETGGNSPVQEFTVPGGVR<br>TATISGLKPGVDYTITVYAVTDYFNPTT<br>HEYIYQTTPI <del>SIN</del> YRTEIDK <del>PXQ</del>            |
| 124 | I1-GS10-E4:E4[N末端伸長(N+8)およびhisタグを有するCysテールを有する]に対してGS <sub>10</sub> リンカー(GS10は配列番号11である)を介して融合されたI1[N末端伸長(N+10)および短いテールを有する]を有するI/E直列型                                                                                             | MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSARL<br>KVARYYRITYGETGGNSPVQEFTVPKNV<br>YTATISGLKPGVDYTITVYAVTRFRDYQ<br>PISIN <del>YRTEIDK</del> SGSGSGSGSGSGSGSGSG<br>SGSVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWHER<br>DGSRQYYRITYGETGGNSPVQEFTVPGG<br>VRTATISGLKPGVDYTITVYAVTDYFNP<br>TTHEYIYQTTPI <del>SIN</del> YRTEIDKPCQH <del>HH</del><br>HH |
| 125 | I1-(PA) <sub>n</sub> -E4:E4[N末端伸長(N+8)および修飾Serテールまたは修飾Cysテールを有する]に対して(PA) <sub>n</sub> リンカー[(PA) <sub>n</sub> は配列番号488である]を介して融合されたI1[N末端伸長(N+8)およびEテールを有する]を有するI/E直列型、n=3、6、または9であり、X=SerまたはCysである;所望により6×Hisタグ(配列番号487)を含んでいてもよい | VSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSARLKV<br>ARYYRITYGETGGNSPVQEFTVPKNVYT<br>ATISGLKPGVDYTITVYAVTRFRDYQPIS<br>IN <del>YRTE</del> (PA) <sub>n</sub> VSDVPRDLEVVAATPTSLL<br>ISWHERDGSRQYYRITYGETGGNSPVQE<br>FTVPGGVRTATISGLKPGVDYTITVYAV<br>TDYFNPTTHEYIYQTTPI <del>SIN</del> YRTEIDK <del>PX</del><br><del>Q</del>       |

10

20

30

40

【表 1 - 2 0】

|     |                                                                                                                                                                         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
|-----|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 126 | E5-GS10-I1:I1[N末端伸長(N+8)を有し、テールを有していない]に対してGS <sub>10</sub> リンカー(GS10は配列番号11である)を介して融合されたE5[N末端伸長(N+8)および短いテールを有する]を有するE/I直列型                                           | <u>VSDVPRD</u> LEVVAATPTSLLISWWAPVDR<br>YQYYRITYGETGGNSPVQEFTVPRDVYT<br>ATISGLKPGVDYTITVYAVTDYKPHADG<br>PHTYHESPISINYRTEIDK <b>GSGSGSGSGS</b><br><b>GSGSGSGSGSVSDVPRD</b> LEVVAATPTSL<br>LISWSARLKVARYYRITYGETGGNSPVQ<br>EFTVPKNVYTATISGLKPGVDYTITVYA<br>VTRFRDYQPISINYRT                           |
| 127 | E5-GS10-I1:I1[N末端伸長(N+8)および修飾Serテールまたは修飾Cysテールを有する]に対してGS10リンカー(GS10は配列番号11である)を介して融合されたE5[N末端伸長(N+8)および短いテールを有する]を有するE/I直列型、X=SerまたはCys;所望により6×Hisタグ(配列番号487)を含んでいてもよい | <u>VSDVPRD</u> LEVVAATPTSLLISWWAPVDR<br>YQYYRITYGETGGNSPVQEFTVPRDVYT<br>ATISGLKPGVDYTITVYAVTDYKPHADG<br>PHTYHESPISINYRTEIDK <b>GSGSGSGSGS</b><br><b>GSGSGSGSGSVSDVPRD</b> LEVVAATPTSL<br>LISWSARLKVARYYRITYGETGGNSPVQ<br>EFTVPKNVYTATISGLKPGVDYTITVYA<br>VTRFRDYQPISINYRTEIDK <b>XPXQ</b>           |
| 128 | E5-GS10-I1:I1[N末端伸長(N+8)およびhisタグを有するCysテールを有する]に対してGS10リンカー(GS10は配列番号11である)を介して融合されたE5[N末端伸長(N+10)および短いテールを有する]を有するE/I直列型                                               | <u>MGVSDVPRD</u> LEVVAATPTSLLISWWAP<br>VDRYQYYRITYGETGGNSPVQEFTVPRD<br>VYTATISGLKPGVDYTITVYAVTDYKPH<br>ADGPHTYHESPISINYRTEIDK <b>GSGSGSG</b><br><b>SGSGSGSGSGSVSDVPRD</b> LEVVAATP<br>TSLLISWSARLKVARYYRITYGETGGNS<br>PVQEFTVPKNVYTATISGLKPGVDYTITV<br>YAVTRFRDYQPISINYRTEIDK <b>PCQH</b> HHH<br>HH |

10

20

30

【 0 2 3 4】

【表 1 - 2 1】

|     |                                                                                                                                                                                                                                    |                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
|-----|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 129 | E5-(PA) <sub>n</sub> -I1:I1[N末端伸長(N+8)および修飾Serテールまたは修飾Cysテールを有する]に対して(PA) <sub>n</sub> リンカー[(PA) <sub>n</sub> は配列番号488である]を介して融合されたE5[N末端伸長(N+8)およびEテールを有する]を有するE/I直列型、n=3、6、または9であり、X=SerまたはCysである;所望により6×Hisタグ(配列番号487)を含んでいてもよい | <u>VSDVPRDLEVVAATPTSLLISWWAPVDR</u><br>YQYYRITYGETGGNSPVQEFTVPRDVYT<br>ATISGLKPGVDYTITVYAVTDYKPHADG<br>PHTYHESPISINYRTE(PA) <sub>n</sub> <u>VSDVPRDLEV</u><br>VAATPTSLLISWSARLKVARYYRITYGE<br>TGGNSPVQEFTVPKNVYTATISGLKPGV<br>DYTITVYAVTRFRDYQPISINYRTEIDKP<br><u>XQ</u>                     |
| 130 | I1-GS10-E5:E5[N末端伸長(N+8)を有し、テールを有していない]に対してGS10リンカー(GS10は配列番号11である)を介して融合されたI1[N末端伸長(N+8)および短いテールを有する]を有するI/E直列型                                                                                                                   | <u>VSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSARLKV</u><br>ARYYRITYGETGGNSPVQEFTVPKNVYT<br>ATISGLKPGVDYTITVYAVTRFRDYQPIS<br>INYRTEIDKGS <del>SGSGSGSGSGSGSGSGSG</del><br><u>SVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWWAPVD</u><br>RYQYYRITYGETGGNSPVQEFTVPRDVY<br>TATISGLKPGVDYTITVYAVTDYKPHAD<br>GPHTYHESPISINYRT                 |
| 131 | I1-GS10-E5:E5[N末端伸長(N+8)および修飾Serテールまたは修飾Cysテールを有する]に対してGS10リンカー(GS10は配列番号11である)を介して融合されたI1[N末端伸長(N+8)および短いテールを有する]を有するI/E直列型、X=SerまたはCys;所望により6×Hisタグ(配列番号487)を含んでいてもよい                                                            | <u>VSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSARLKV</u><br>ARYYRITYGETGGNSPVQEFTVPKNVYT<br>ATISGLKPGVDYTITVYAVTRFRDYQPIS<br>INYRTEIDKGS <del>SGSGSGSGSGSGSGSGSG</del><br><u>SVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWWAPVD</u><br>RYQYYRITYGETGGNSPVQEFTVPRDVY<br>TATISGLKPGVDYTITVYAVTDYKPHAD<br>GPHTYHESPISINYRTEIDKP <u>XPQ</u> |

10

20

30

【表 1 - 2 2】

|     |                                                                                                                                                                                                                                    |                                                                                                                                                                                                                                                                  |
|-----|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 132 | I1-GS10-E5:E5[N末端伸長(N+8)およびHisタグを有するCysテールを有する]に対してGS10リンカー(GS10は配列番号11である)を介して融合されたI1[N末端伸長(N+10)および短いテールを有する]を有するI/E直列型                                                                                                          | MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSARL<br>KVARYYRITYGETGGNSPVQEFTVPKNV<br>YTATISGLKPGVDYTITVYAVTRFRDYQ<br>PISINYRTEIDKSGSGSGSGSGSGSGSG<br>SGSVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWWAP<br>VDRYQYYRITYGETGGNSPVQEFTVPRD<br>VYTATISGLKPGVDYTITVYAVTDYKPH<br>ADGPHTYHESPISINYRTEIDKPCQH<br>HH |
| 133 | I1-(PA) <sub>n</sub> -E5:E5[N末端伸長(N+8)および修飾Serテールまたは修飾Cysテールを有する]に対して(PA) <sub>n</sub> リンカー[(PA) <sub>n</sub> は配列番号488である]を介して融合されたI1[N末端伸長(N+8)およびEテールを有する]を有するI/E直列型、n=3、6、または9であり、X=SerまたはCysである;所望により6×Hisタグ(配列番号487)を含んでいてもよい | MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSARL<br>KVARYYRITYGETGGNSPVQEFTVPKNV<br>YTATISGLKPGVDYTITVYAVTRFRDYQ<br>PISINYRTE(PA) <sub>n</sub> VSDVPRDLEVVAATPTS<br>LLISWWAPVDRYQYYRITYGETGGNSPV<br>QEFTVPRDVYTATISGLKPGVDYTITVY<br>AVTDYKPHADGPHTYHESPISINYRTEID<br>KXPXQ           |
| 134 | EGFR結合剤E4由来のBCループ配列、Xは任意のアミノ酸であり、gおよびhは、0～5のアミノ酸から独立して選択される                                                                                                                                                                        | X <sub>g</sub> HERDGSRQX <sub>h</sub>                                                                                                                                                                                                                            |
| 135 | EGFR結合剤E4由来のDEループ配列、Xは任意のアミノ酸であり、iおよびjは、0～5のアミノ酸から独立して選択される                                                                                                                                                                        | X <sub>i</sub> GGVRX <sub>j</sub>                                                                                                                                                                                                                                |
| 136 | EGFR結合剤E4由来のFGループ配列、Xは任意のアミノ酸であり、kおよびlは、0～5のアミノ酸から独立して選択される                                                                                                                                                                        | X <sub>k</sub> DYFNPTTHEYIYQTTX <sub>l</sub>                                                                                                                                                                                                                     |

10

20

30

40

【表 1 - 2 3】

|     |                                                                                                                                                                                                 |                                                                                                                                      |
|-----|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 137 | EGFR結合剤E5由来のBCループ配列、Xは任意のアミノ酸であり、gおよびhは、0～5のアミノ酸から独立して選択される                                                                                                                                     | X <sub>g</sub> WAPVDRYQX <sub>h</sub>                                                                                                |
| 138 | EGFR結合剤E5由来のDEループ配列、Xは任意のアミノ酸であり、iおよびjは、0～5のアミノ酸から独立して選択される                                                                                                                                     | X <sub>i</sub> RDVYX <sub>j</sub>                                                                                                    |
| 139 | EGFR結合剤E5由来のFGループ配列、Xは任意のアミノ酸であり、kおよびlは、0～5のアミノ酸から独立して選択される                                                                                                                                     | X <sub>k</sub> DYKPHADGPHTYHESX <sub>l</sub>                                                                                         |
| 140 | N末端伸長(N+10)およびhisタグを有するSerテールを有するE85 EGFR単量体                                                                                                                                                    | MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWTQGS<br>THYQYYRITYGETGGNSPVQEFTVPGM<br>VYTATISGLKPGVDYTITVYAVTDYFDR<br>STHEYKYRTTPISINYRTEIDKPSQH<br>HHHH    |
| 141 | E85 EGFR単量体コア:N末端伸長もC末端テールも有していないE85単量体                                                                                                                                                         | EVVAATPTSLLISWTQGSTHYQYYRITY<br>GETGGNSPVQEFTVPGMVYTATISGLK<br>PGVDYTITVYAVTDYFDRSTHEYKYRTTP<br>ISINYRT                              |
| 142 | E85 EGFR単量体、X <sub>1</sub> は、配列番号69～77から成る群から選択され、X <sub>2</sub> は、配列番号9、10、または78～81から成る群から選択され、例示的な実施形態において、X <sub>1</sub> は、配列番号69または71であり、X <sub>2</sub> は、配列番号9または10である;所望によりhisタグを含んでいてもよい | X <sub>1</sub> EVVAATPTSLLISWTQGSTHYQYYRIT<br>YGETGGNSPVQEFTVPGMVYTATISGLK<br>PGVDYTITVYAVTDYFDRSTHEYKYRTT<br>PISINYRTX <sub>2</sub> |
| 143 | EGFR結合剤E85由来のBCループ配列                                                                                                                                                                            | SWTQGSTHYQ                                                                                                                           |

【 0 2 3 7】

10

20

30

40

【表 1 - 2 4】

|     |                                                                                                                                                                    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
|-----|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 144 | EGFR結合剤E85由来のDEルー<br>ブ配列                                                                                                                                           | PGMVYT                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| 145 | EGFR結合剤E85由来のFGルー<br>ブ配列                                                                                                                                           | TDYFDRSTHEYKYRTTP                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
| 146 | EGFR結合剤E85由来のBCルー<br>ブ配列、Xは任意のアミノ酸で<br>あり、gおよびhは、0～5のア<br>ミノ酸から独立して選択され<br>る                                                                                       | X <sub>g</sub> TQGSTHYQX <sub>h</sub>                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| 147 | EGFR結合剤E85由来のDEルー<br>ブ配列、Xは任意のアミノ酸で<br>あり、iおよびjは、0～5のア<br>ミノ酸から独立して選択される                                                                                           | X <sub>i</sub> GMVYX <sub>j</sub>                                                                                                                                                                                                                                                                              |
| 148 | EGFR結合剤E85由来のFGルー<br>ブ配列、Xは任意のアミノ酸で<br>あり、kおよびlは、0～5のア<br>ミノ酸から独立して選択される                                                                                           | X <sub>k</sub> DYFDRSTHEYKYRTTX <sub>l</sub>                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| 149 | E85-GS10-I1:I1(N末端伸長<br>(N+8)および6×Hisタグ(配列番<br>号487)を有するCysテールを有<br>する)に対してGS10リンカー<br>(GS10は配列番号11である)を介<br>して融合されたE85[N末端伸長<br>(N+10)および短いテールを有す<br>る]を有するE/I直列型 | <u>MGVSDVPRD</u> LEVVAATPTSLLISWTQGS<br>THYQYYRITYGETGGNSPVQEFTVPGM<br>VYTATISGLKPGVDYTITVYAVTDYFDR<br>STHEYKYRTTPISINYRTE <u>IDK</u> <b>GSGSGSG</b><br><b>SGSGSGSGSGSGSVSDVPRDLEVVAATP<br/>TSLLISWSARLKVARYYRITYGETGGNS<br/>PVQEFTVPKNVYTATISGLKPGVDYTITV<br/>YAVTRFRDYQPISINYRTE<u>IDKPCQH</u>HHH<br/>HH</b> |

10

20

30

【 0 2 3 8】

【表 1 - 2 5】

|     |                                                                                                                                                                                                                                   |                                                                                                                                                                                                                                                                 |
|-----|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 150 | E85-GS10-IIコア、X <sub>1</sub> は、任意であり、存在する場合、配列番号69～77から成る群から選択され、X <sub>2</sub> は、任意であり、存在する場合、配列番号9、10、または78～81から成る群から選択され、n=3、6、または9であり、例示的な実施形態において、X <sub>1</sub> は配列番号69または71であり、X <sub>2</sub> は配列番号9または10である               | X <sub>1</sub> EVVAATPTSLLISWTQGSTHYQYYRITYGETGGNSPVQEFTVPGMVYTATISGLKPGVDYTITVYAVTDYFDRSTHEYKYRTTPISINYRTEIDKGS <del>SGSGSGSGSGSGSGSGSGSVSDVPRD</del> LEVVAATPTSLLISWSARLKVARYYRITYGETGGNSPVQEFTVPKNVYTATISGLKPGVDYTITVYAVTRFRDYPISINYRTX <sub>2</sub>         |
| 151 | E85-(PA) <sub>n</sub> -IIコア、X <sub>1</sub> は、任意であり、存在する場合、配列番号69～77から成る群から選択され、X <sub>2</sub> は、任意であり、存在する場合、配列番号9、10、または78～81から成る群から選択され、n=3、6、または9であり、例示的な実施形態において、X <sub>1</sub> は配列番号69または71であり、X <sub>2</sub> は配列番号9または10である | X <sub>1</sub> EVVAATPTSLLISWTQGSTHYQYYRITYGETGGNSPVQEFTVPGMVYTATISGLKPGVDYTITVYAVTDYFDRSTHEYKYRTTPISINYRTE(PA) <sub>n</sub> VSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSARLKVARYYRITYGETGGNSPVQEFTVPKNVYTATISGLKPGVDYTITVYAVTRFRDYPISINYRTX <sub>2</sub>                            |
| 152 | II-GS10-E85:E85[N末端伸長(N+8)および6×Hisタグ(配列番号487)を有するCysテールを有する]に対してGS <sub>10</sub> リンカー(GS10は配列番号11である)を介して融合されたII[N末端伸長(N+10)および短いテールを有する]を有するI/E直列型                                                                               | MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSARLKVARYYRITYGETGGNSPVQEFTVPKNVYTATISGLKPGVDYTITVYAVTRFRDYPISINYRTEIDKGS <del>SGSGSGSGSGSGSGSGSGSVSDVPRD</del> LEVVAATPTSLLISWTQGSTHYQYYRITYGETGGNSPVQEFTVPGMVYTATISGLKPGVDYTITVYAVTDYFDRSTHEYKYRTTPISINYRTEIDKPCQH <del>HHHH</del> HH |

10

20

30

40

【表 1 - 2 6】

|     |                                                                                                                                                                                                       |                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
|-----|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 153 | II-GS10-E85コア、 $X_1$ は、任意であり、存在する場合、配列番号69～77から成る群から選択され、 $X_2$ は、任意であり、存在する場合、配列番号9、10、または78～81から成る群から選択され、 $n=3$ 、6、または9であり、例示的な実施形態において、 $X_1$ は配列番号69または71であり、 $X_2$ は配列番号9または10である               | <u><math>X_1</math></u> EVVAATPTSLLISWSARLKVARYYYRITYGETGGNSPVQEFTVPKNVYTATISGLKPGVDYTITVYAVTRFRDYPISINYRTE <u>I</u><br><u>DKGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSVSDVP</u><br><u>RD</u> LEVVAATPTSLLISWTQGSTHYQYYRITYGETGGNSPVQEFTVPGMVYTATISGLKPGVDYTITVYAVTDYFDRSTHEYKYRTTPISINYRT <u><math>X_2</math></u> |
| 154 | II-(PA) <sub>n</sub> -E85コア、 $X_1$ は、任意であり、存在する場合、配列番号69～77から成る群から選択され、 $X_2$ は、任意であり、存在する場合、配列番号9、10、または78～81から成る群から選択され、 $n=3$ 、6、または9であり、例示的な実施形態において、 $X_1$ は配列番号69または71であり、 $X_2$ は配列番号9または10である | <u><math>X_1</math></u> EVVAATPTSLLISWSARLKVARYYYRITYGETGGNSPVQEFTVPKNVYTATISGLKPGVDYTITVYAVTRFRDYPISINYRTE( <u>PA</u> ) <sub>n</sub> <u>VSDVPRD</u> LEVVAATPTSLLISWTQGSTHYQYYRITYGETGGNSPVQEFTVPGMVYTATISGLKPGVDYTITVYAVTDYFDRSTHEYKYRTTPISINYRT <u><math>X_2</math></u>                    |
| 155 | N末端伸長(N+10)およびhisタグを有するSerテールを有するE90 EGFR単量体                                                                                                                                                          | <u>MGVSDVPRD</u> LEVVAATPTSLLISWYWEGLPYQYYRITYGETGGNSPVQEFTVPRDVNTATISGLKPGVDYTITVYAVTDWYNPDTHEYIYHTIPISINYRTE <u>IDKPSQH</u> HHHHH                                                                                                                                                          |
| 156 | E90 EGFR単量体コア:N末端伸長もC末端テールも有していないE90単量体                                                                                                                                                               | EVVAATPTSLLISWYWEGLPYQYYRITYGETGGNSPVQEFTVPRDVNTATISGLKPGVDYTITVYAVTDWYNPDTHEYIYHTIPISINYRT                                                                                                                                                                                                  |

10

20

30

40

【 0 2 4 0 】

【表 1 - 2 7】

|     |                                                                                                                                                                 |                                                                                                         |
|-----|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 157 | E90 EGFR単量体、 $X_1$ は、配列番号69～77から成る群から選択され、 $X_2$ は、配列番号9、10、または78～81から成る群から選択され、例示的な実施形態において、 $X_1$ は、配列番号69または71であり、 $X_2$ は、配列番号9または10である;所望によりhisタグを含んでいてもよい | $X_1$ EVVAATPTSLLISWYWEGLPYQYYRITYGETGGNSPVQEFTVPRDVNTATISGLKPGVDYTITVYAVTDWYNPDTHEYIYHTIPISINYRT $X_2$ |
| 158 | EGFR結合剤E90由来のBCループ配列                                                                                                                                            | SWYWEGLPYQ                                                                                              |
| 159 | EGFR結合剤E90由来のDEループ配列                                                                                                                                            | PRDVNT                                                                                                  |
| 160 | EGFR結合剤E90由来のFGループ配列                                                                                                                                            | TDWYNPDTHEYIYHTIP                                                                                       |
| 161 | EGFR結合剤E90由来のBCループ配列、Xは任意のアミノ酸であり、gおよびhは、0～5のアミノ酸から独立して選択される                                                                                                    | $X_g$ YWEGLPYQ $X_h$                                                                                    |
| 162 | EGFR結合剤E90由来のDEループ配列、Xは任意のアミノ酸であり、iおよびjは、0～5のアミノ酸から独立して選択される                                                                                                    | $X_i$ RDVNX $X_j$                                                                                       |
| 163 | EGFR結合剤E90由来のFGループ配列、Xは任意のアミノ酸であり、kおよびlは、0～5のアミノ酸から独立して選択される                                                                                                    | $X_k$ DWYNPDTHEYIYHTI $X_l$                                                                             |

10

20

30

40

【 0 2 4 1】

【表 1 - 2 8】

|     |                                                                                                                                                                                                                                   |                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
|-----|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 164 | E90-GS10-II:11[N末端伸長 (N+8)および6×Hisタグ(配列番号487)を有するCysテールを有する]に対してGS <sub>10</sub> リンカー (GS10は配列番号11である)を介して融合されたE90[N末端伸長 (N+10)および短いテールを有する]を有するE/I直列型                                                                            | MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWYWE<br>GLPYQYYRITYGETGGNSPVQEFTVPRD<br>VNTATISGLKPGVDYTITVYAVTDWYNP<br>DTHEYIYHTIPISINYRTEIDK <b>GSGSGSGS</b><br><b>GSGSGSGSGSGSVSDVPRDLEVVAATPT</b><br>SLLISWSARLKVARYYRITYGETGGNSP<br>VQEFTVPKNVYTATISGLKPGVDYTITV<br>YAVTRFRDYPISINYRTEIDKPCQH<br>HHHH     |
| 165 | E90-GS10-IIコア、X <sub>1</sub> は、任意であり、存在する場合、配列番号69～77から成る群から選択され、X <sub>2</sub> は、任意であり、存在する場合、配列番号9、10、または78～81から成る群から選択され、n=3、6、または9であり、例示的な実施形態において、X <sub>1</sub> は配列番号69または71であり、X <sub>2</sub> は配列番号9または10である               | X <sub>1</sub> EVVAATPTSLLISWYWEGLPYQYYRIT<br>YGETGGNSPVQEFTVPRDVNTATISGLK<br>PGVDYTITVYAVTDWYNPDTHEYIYHTI<br>PISINYRTEIDK <b>GSGSGSGSGSGSGSGSG</b><br><b>SGSVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSAR</b><br>LKVARYYRITYGETGGNSPVQEFTVPKN<br>VYTATISGLKPGVDYTITVYAVTRFRDY<br>QPISINYRTX <sub>2</sub> |
| 166 | E90-(PA) <sub>n</sub> -IIコア、X <sub>1</sub> は、任意であり、存在する場合、配列番号69～77から成る群から選択され、X <sub>2</sub> は、任意であり、存在する場合、配列番号9、10、または78～81から成る群から選択され、n=3、6、または9であり、例示的な実施形態において、X <sub>1</sub> は配列番号69または71であり、X <sub>2</sub> は配列番号9または10である | X <sub>1</sub> EVVAATPTSLLISWYWEGLPYQYYRIT<br>YGETGGNSPVQEFTVPRDVNTATISGLK<br>PGVDYTITVYAVTDWYNPDTHEYIYHTI<br>PISINYRTE(PA) <sub>n</sub> VSDVPRDLEVVAATPTS<br>LLISWSARLKVARYYRITYGETGGNSPV<br>QEFTVPKNVYTATISGLKPGVDYTITVY<br>AVTRFRDYPISINYRTX <sub>2</sub>                          |

10

20

30

40

【表 1 - 2 9】

|     |                                                                                                                                                                                                                                   |                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
|-----|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 167 | II-GS10-E90:E90[N末端伸長(N+8)および6×Hisタグ(配列番号487)を有するCysテールを有する]に対してGS <sub>10</sub> リンカー(GS10は配列番号11である)を介して融合されたII[N末端伸長(N+10)および短いテールを有する]を有するI/E直列型                                                                               | MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSARLK<br>KVARYYRITYGETGGNSPVQEFTVPKNV<br>YTATISGLKPGVDYTITVYAVTRFRDYQ<br>PISINYRTEIDKGS <del>SGSGSGSGSGSGSG</del><br>SGSVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWYWE<br>GLPYQYYRITYGETGGNSPVQEFTVPRD<br>VNTATISGLKPGVDYTITVYAVTDWYNP<br>DTHEYIYHTIPISINYRTEIDKPCQH <del>HHHH</del><br>H |
| 168 | II-GS10-E90コア、X <sub>1</sub> は、任意であり、存在する場合、配列番号69～77から成る群から選択され、X <sub>2</sub> は、任意であり、存在する場合、配列番号9、10、または78～81から成る群から選択され、n=3、6、または9であり、例示的な実施形態において、X <sub>1</sub> は配列番号69または71であり、X <sub>2</sub> は配列番号9または10である               | X <sub>1</sub> EVVAATPTSLLISWSARLKVARYYRIT<br>YGETGGNSPVQEFTVPKNVYTATISGLK<br>PGVDYTITVYAVTRFRDYQPISINYRTEI<br>DKGS <del>SGSGSGSGSGSGSGSGSGSVSDVP</del><br>RDLEVVAATPTSLLISWYWEGLPYQYY<br>RITYGETGGNSPVQEFTVPRDVNTATISG<br>LKPGVDYTITVYAVTDWYNPDTHEYIY<br>HTIPISINYRTX <sub>2</sub>          |
| 169 | II-(PA) <sub>n</sub> -E90コア、X <sub>1</sub> は、任意であり、存在する場合、配列番号69～77から成る群から選択され、X <sub>2</sub> は、任意であり、存在する場合、配列番号9、10、または78～81から成る群から選択され、n=3、6、または9であり、例示的な実施形態において、X <sub>1</sub> は配列番号69または71であり、X <sub>2</sub> は配列番号9または10である | X <sub>1</sub> EVVAATPTSLLISWSARLKVARYYRIT<br>YGETGGNSPVQEFTVPKNVYTATISGLK<br>PGVDYTITVYAVTRFRDYQPISINYRTEI<br>(PA) <sub>n</sub> VSDVPRDLEVVAATPTSLLISWYWE<br>GLPYQYYRITYGETGGNSPVQEFTVPRD<br>VNTATISGLKPGVDYTITVYAVTDWYNP<br>DTHEYIYHTIPISINYRTX <sub>2</sub>                               |
| 170 | N末端伸長(N+10)およびhisタグを有するSerテールを有するE96 EGFR単量体                                                                                                                                                                                      | MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWASNR<br>GTYYRITYGETGGNSPVQEFTVPGGV<br>STATISGLKPGVDYTITVYAVTDAFNPTT<br>HEYNYFTTIPISINYRTEIDKPSQH <del>HHHH</del><br>HH                                                                                                                                               |

10

20

30

40

【表 1 - 3 0】

|     |                                                                                                                                                                                                                                     |                                                                                                                                      |
|-----|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 171 | E96 EGFR単量体コア:N末端伸<br>長もC末端テールも有してい<br>ないE96単量体                                                                                                                                                                                     | EVVAATPTSLLISWASNRGTYQYYRITY<br>GETGGNSPVQEFTVPGGVSTATISGLKP<br>GVDYTITVYAVTDAFNPTTHEYNYFTTP<br>ISINYRT                              |
| 172 | E96 EGFR単量体、X <sub>1</sub> は、配列<br>番号69～77から成る群から選<br>択され、X <sub>2</sub> は、配列番号9、<br>10、または78～81から成る群<br>から選択され、例示的な実施<br>形態において、X <sub>1</sub> は、配列番<br>号69または71であり、X <sub>2</sub> は、<br>配列番号9または10である;所望<br>によりhisタグを含んでいても<br>よい | X <sub>1</sub> EVVAATPTSLLISWASNRGTYQYYRIT<br>YGETGGNSPVQEFTVPGGVSTATISGLK<br>PGVDYTITVYAVTDAFNPTTHEYNYFTT<br>PISINYRTX <sub>2</sub> |
| 173 | EGFR結合剤E96由来のBCルー<br>プ配列                                                                                                                                                                                                            | SWASNRGTYQ                                                                                                                           |
| 174 | EGFR結合剤E96由来のDEルー<br>プ配列                                                                                                                                                                                                            | PGGVST                                                                                                                               |
| 175 | EGFR結合剤E96由来のFGルー<br>プ配列                                                                                                                                                                                                            | TDAFNPTTHEYNYFTTP                                                                                                                    |
| 176 | EGFR結合剤E96由来のBCルー<br>プ配列、Xは任意のアミノ酸で<br>あり、gおよびhは、0～5のア<br>ミノ酸から独立して選択され<br>る                                                                                                                                                        | X <sub>g</sub> ASNRGTYQX <sub>h</sub>                                                                                                |
| 177 | EGFR結合剤E96由来のDEルー<br>プ配列、Xは任意のアミノ酸で<br>あり、iおよびjは、0～5のアミ<br>ノ酸から独立して選択される                                                                                                                                                            | X <sub>i</sub> GGVSX <sub>j</sub>                                                                                                    |
| 178 | EGFR結合剤E96由来のFGルー<br>プ配列、Xは任意のアミノ酸で<br>あり、kおよびlは、0～5のアミ<br>ノ酸から独立して選択される                                                                                                                                                            | X <sub>k</sub> DAFNPTTHEYNYFTTX <sub>l</sub>                                                                                         |

【表 1 - 3 1】

|     |                                                                                                                                                                                                                                   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |              |
|-----|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|
| 179 | E96-GS10-I1:I1[N末端伸長(N+8)および6×Hisタグ(配列番号487)を有するCysテールを有する]に対してGS <sub>10</sub> リンカー(GS10は配列番号11である)を介して融合されたE96[N末端伸長(N+10)および短いテールを有する]を有するE/I直列型                                                                               | MGVSDVPRD <u>LEVVAATPTS</u> LLISWASNR<br>GTYYRITYGETGGNSPVQEFTVPGGV<br>STATISGLKPGVDYTITVYAVTDAFNPTT<br>HEYNYFTTPISINYRTE <u>IDK</u> <b>GSGSGSGSG</b><br><b>S</b> <b>GSGSGSGSGSVSDVPRD</b> <u>LEVVAATPTS</u><br>LLISWSARLKVARYYRITYGETGGNSPV<br>QEFTVPKNVYTATISGLKPGVDYTITVY<br>AVTRFRDYPISINYRTE <u>IDKPCQH</u> HHHH<br>H  | 10           |
| 180 | E96-GS10-I1コア、X <sub>1</sub> は、任意であり、存在する場合、配列番号69～77から成る群から選択され、X <sub>2</sub> は、任意であり、存在する場合、配列番号9、10、または78～81から成る群から選択され、n=3、6、または9であり、例示的な実施形態において、X <sub>1</sub> は配列番号69または71であり、X <sub>2</sub> は配列番号9または10である               | <u>X<sub>1</sub></u> EVVAATPTSLLISWASNRGTYYRIT<br>YGETGGNSPVQEFTVPGGVSTATISGLK<br>PGVDYTITVYAVTDAFNPTTHEYNYFTT<br>PISINYRTE <u>IDK</u> <b>GSGSGSGSGSGSGSGSG</b><br><b>S</b> <b>GSGSVSDVPRD</b> <u>LEVVAATPTS</u> LLISWSAR<br>LKVARYYRITYGETGGNSPVQEFTVPKN<br>VYTATISGLKPGVDYTITVYAVTRFRDY<br>QPISINYRT <u>X<sub>2</sub></u> | 20           |
| 181 | E96-(PA) <sub>n</sub> -I1コア、X <sub>1</sub> は、任意であり、存在する場合、配列番号69～77から成る群から選択され、X <sub>2</sub> は、任意であり、存在する場合、配列番号9、10、または78～81から成る群から選択され、n=3、6、または9であり、例示的な実施形態において、X <sub>1</sub> は配列番号69または71であり、X <sub>2</sub> は配列番号9または10である | <u>X<sub>1</sub></u> EVVAATPTSLLISWASNRGTYYRIT<br>YGETGGNSPVQEFTVPGGVSTATISGLK<br>PGVDYTITVYAVTDAFNPTTHEYNYFTT<br>PISINYRTE <u>(PA)<sub>n</sub>VSDVPRD</u> LEVVAATPTS<br>LLISWSARLKVARYYRITYGETGGNSPV<br>QEFTVPKNVYTATISGLKPGVDYTITVY<br>AVTRFRDYPISINYRT <u>X<sub>2</sub></u>                                              | 30<br><br>40 |

【表 1 - 3 2】

|     |                                                                                                                                                                                                                                   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
|-----|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 182 | I1-GS10-E96:E96[N末端伸長(N+8)および6×Hisタグ(配列番号487)を有するCysテールを有する]に対してGS <sub>10</sub> リンカー(GS10は配列番号11である)を介して融合されたI1[N末端伸長(N+10)および短いテールを有する]を有するI/E直列型                                                                               | MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSARL<br>KVARYYRITYGETGGNSPVQEFTVPKNV<br>YTATISGLKPGVDYTITVYAVTRFRDYQ<br>PISINYRTEIDKGS <del>SGSGSGSGSGSGSG</del><br>SGSVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWASN<br>RGTYQYYRITYGETGGNSPVQEFTVPGG<br>VSTATISGLKPGVDYTITVYAVTDAFNPT<br>THEYNYFTTPISINYRTEIDKPCQH <del>HHHH</del><br>H    |
| 183 | I1-GS10-E96コア、X <sub>1</sub> は、任意であり、存在する場合、配列番号69～77から成る群から選択され、X <sub>2</sub> は、任意であり、存在する場合、配列番号9、10、または78～81から成る群から選択され、n=3、6、または9であり、例示的な実施形態において、X <sub>1</sub> は配列番号69または71であり、X <sub>2</sub> は配列番号9または10である               | X <sub>1</sub> EVVAATPTSLLISWSARLKVARYYRIT<br>YGETGGNSPVQEFTVPKNVYTATISGLK<br>PGVDYTITVYAVTRFRDYQPISINYRTEI<br>D <del>K</del> GS <del>SGSGSGSGSGSGSGSGSVSDVP</del><br>RDLEVVAATPTSLLISWASNRGTYQYYR<br>ITYGETGGNSPVQEFTVPGGVSTATISGL<br>KPGVDYTITVYAVTDAFNPTTHEYNYFT<br>TPISINYRTX <sub>2</sub> |
| 184 | I1-(PA) <sub>n</sub> -E96コア、X <sub>1</sub> は、任意であり、存在する場合、配列番号69～77から成る群から選択され、X <sub>2</sub> は、任意であり、存在する場合、配列番号9、10、または78～81から成る群から選択され、n=3、6、または9であり、例示的な実施形態において、X <sub>1</sub> は配列番号69または71であり、X <sub>2</sub> は配列番号9または10である | X <sub>1</sub> EVVAATPTSLLISWSARLKVARYYRIT<br>YGETGGNSPVQEFTVPKNVYTATISGLK<br>PGVDYTITVYAVTRFRDYQPISINYRTE(<br>PA) <sub>n</sub> VSDVPRDLEVVAATPTSLLISWASN<br>RGTYQYYRITYGETGGNSPVQEFTVPGG<br>VSTATISGLKPGVDYTITVYAVTDAFNPT<br>THEYNYFTTPISINYRTX <sub>2</sub>                                  |

10

20

30

40

【 0 2 4 6 】

【表 1 - 3 3】

|     |                                                                                                                                                                                                  |                                                                                                                          |
|-----|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 185 | N末端伸長(N+10)およびhisタグを有するSerテールを有するE105 EGFR単量体                                                                                                                                                    | MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPTSRYQYYRITYGETGGNSPVQEFTVPGGLSTATISGLKPGVDYTITVYAVTDYKPHADGPHTYHESPISINYRTEIDKPSQH HHHHHH     |
| 186 | E105 EGFR単量体コア:N末端伸長もC末端テールも有していないE105単量体                                                                                                                                                        | EVVAATPTSLLISWDAPTSRYQYYRITYGETGGNSPVQEFTVPGGLSTATISGLKPGVDYTITVYAVTDYKPHADGPHTYHESPISINYRT                              |
| 187 | E105 EGFR単量体、X <sub>1</sub> は、配列番号69～77から成る群から選択され、X <sub>2</sub> は、配列番号9、10、または78～81から成る群から選択され、例示的な実施形態において、X <sub>1</sub> は、配列番号69または71であり、X <sub>2</sub> は、配列番号9または10である;所望によりhisタグを含んでいてもよい | X <sub>1</sub> EVVAATPTSLLISWDAPTSRYQYYRITYGETGGNSPVQEFTVPGGLSTATISGLKPGVDYTITVYAVTDYKPHADGPHTYHESPISINYRTX <sub>2</sub> |
| 188 | EGFR結合剤E105由来のBCループ配列                                                                                                                                                                            | SWDAPTSRYQ                                                                                                               |
| 189 | EGFR結合剤E105由来のDEループ配列                                                                                                                                                                            | PGGLST                                                                                                                   |
| 117 | EGFR結合剤E105由来のFGループ配列                                                                                                                                                                            | TDYKPHADGPHTYHESP                                                                                                        |
| 190 | EGFR結合剤E105由来のBCループ配列、Xは任意のアミノ酸であり、gおよびhは、0～5のアミノ酸から独立して選択される                                                                                                                                    | X <sub>g</sub> DAPTSRYQX <sub>h</sub>                                                                                    |

10

20

30

40

【 0 2 4 7 】

【表 1 - 3 4】

|     |                                                                                                                                                                                                                      |                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |              |
|-----|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|
| 191 | EGFR結合剤E105由来のDEループ配列、Xは任意のアミノ酸であり、iおよびjは、0～5のアミノ酸から独立して選択される                                                                                                                                                        | $X_iGGLSX_j$                                                                                                                                                                                                                                                                                         |              |
| 139 | EGFR結合剤E105由来のFGループ配列、Xは任意のアミノ酸であり、kおよびlは、0～5のアミノ酸から独立して選択される                                                                                                                                                        | $X_kDYKPHADGPHTYHESX_l$                                                                                                                                                                                                                                                                              | 10           |
| 192 | E105-GS10-I1:I1[N末端伸長(N+8)および6×Hisタグ(配列番号487)を有するCysテールを有する]に対してGS <sub>10</sub> リンカー(GS10は配列番号11である)を介して融合されたE105[N末端伸長(N+10)および短いテールを有する]を有するE/I直列型                                                                | <u>MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPT</u><br>SRYQYYRITYGETGGNSPVQEFTVPGGL<br>STATISGLKPGVDYTITVYAVTDYKPHA<br>DGPHTYHESPISINYRTEIDK <u>GSGSGSGS</u><br><u>GSGSGSGSGSGSVSDVPRDLEVVAATPT</u><br>SLLISWSARLKVARYYRITYGETGGNSP<br>VQEFTVPKNVYTATISGLKPGVDYTITV<br>YAVTRFRDYPISINYRTEIDKPCQH <del>HH</del><br>HH | 20           |
| 193 | E105-GS10-I1コア、X <sub>1</sub> は、任意であり、存在する場合、配列番号69～77から成る群から選択され、X <sub>2</sub> は、任意であり、存在する場合、配列番号9、10、または78～81から成る群から選択され、n=3、6、または9であり、例示的な実施形態において、X <sub>1</sub> は配列番号69または71であり、X <sub>2</sub> は配列番号9または10である | <u>X<sub>1</sub></u> EVVAATPTSLLISWDAPTSRYQYYRIT<br>YGETGGNSPVQEFTVPGGLSTATISGLKPG<br>VDYTITVYAVTDYKPHADGPHTYHES<br>PISINYRTEIDK <u>GSGSGSGSGSGSGSGSG</u><br><u>SGSVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSAR</u><br>LKVARYYRITYGETGGNSPVQEFTVPKN<br>VYTATISGLKPGVDYTITVYAVTRFRDY<br>QPISINYRT <u>X<sub>2</sub></u>   | 30<br><br>40 |

【 0 2 4 8 】

【表 1 - 3 5】

|     |                                                                                                                                                                                                                                    |                                                                                                                                                                                                                                                             |
|-----|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 194 | E105-(PA) <sub>n</sub> -I1コア、X <sub>1</sub> は、任意であり、存在する場合、配列番号69～77から成る群から選択され、X <sub>2</sub> は、任意であり、存在する場合、配列番号9、10、または78～81から成る群から選択され、n=3、6、または9であり、例示的な実施形態において、X <sub>1</sub> は配列番号69または71であり、X <sub>2</sub> は配列番号9または10である | <u>X</u> <sub>1</sub> EVVAATPTSLLISWDAPTSRYQYYRITYGETGGNSPVQEFTVPGG LSTATISGLKPGVDYTITVYAVTDYKPHADGPHTYHESPISINYRTE(PA) <sub>n</sub> VSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSARLKVARYYYRITYGETGGNSPVQEFTVPKNVYTATISGLKPGVDYTITVYAVTRFRDYPISINYRT <u>X</u> <sub>2</sub>       |
| 195 | I1-GS10-E105:E105[N末端伸長(N+8)および6×Hisタグ(配列番号487)を有するCysテールを有する]に対してGS <sub>10</sub> リンカー(GS10は配列番号11である)を介して融合されたI1[N末端伸長(N+10)および短いテールを有する]を有するI/E直列型                                                                              | MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSARLKVARYYYRITYGETGGNSPVQEFTVPKNVYTATISGLKPGVDYTITVYAVTRFRDYPISINYRTEIDKGS GSGSGSGSGSGSGSGSGSVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPTSRYQYYRITYGETGGNSPVQEFTVPGG LSTATISGLKPGVDYTITVYAVTDYKPHADGPHTYHESPISINYRTEIDKPCQH HHHHH                     |
| 196 | I1-GS10-E105コア、X <sub>1</sub> は、任意であり、存在する場合、配列番号69～77から成る群から選択され、X <sub>2</sub> は、任意であり、存在する場合、配列番号9、10、または78～81から成る群から選択され、n=3、6、または9であり、例示的な実施形態において、X <sub>1</sub> は配列番号69または71であり、X <sub>2</sub> は配列番号9または10である               | <u>X</u> <sub>1</sub> EVVAATPTSLLISWSARLKVARYYYRITYGETGGNSPVQEFTVPKNVYTATISGLKPGVDYTITVYAVTRFRDYPISINYRTEIDKGS GSGSGSGSGSGSGSGSGSVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPTSRYQYYRITYGETGGNSPVQEFTVPGG LSTATISGLKPGVDYTITVYAVTDYKPHADGPHTYHESPISINYRT <u>X</u> <sub>2</sub> |

10

20

30

40

【表 1 - 3 6】

|     |                                                                                                                                                                                                                                    |                                                                                                                                                                                                                                                            |
|-----|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 197 | II-(PA) <sub>n</sub> -E105コア、X <sub>1</sub> は、任意であり、存在する場合、配列番号69～77から成る群から選択され、X <sub>2</sub> は、任意であり、存在する場合、配列番号9、10、または78～81から成る群から選択され、n=3、6、または9であり、例示的な実施形態において、X <sub>1</sub> は配列番号69または71であり、X <sub>2</sub> は配列番号9または10である | <u>X<sub>1</sub></u> EVVAATPTSLLISWSARLKVARYYRITYGETGGNSPVQEFTVPKNVYTATISGLKPGVDYTITVYAVTRFRDYQPISINYRTE(PA) <sub>n</sub> <u>VSDVPRD</u> LEVVAATPTSLLISWDAPTSRYQYYRITYGETGGNSPVQEFTVPGGLSTATISGLKPGVDYTITVYAVTDYKPHADGPHTYHESPISINYRT <u>X<sub>2</sub></u> |
| 198 | N末端伸長(N+10)およびhisタグを有するSerテールを有するE112 EGFR単量体                                                                                                                                                                                      | <u>MGVSDVPRD</u> LEVVAATPTSLLISWDAGAVTYQYYRITYGETGGNSPVQEFTVPGGVRTATISGLKPGVDYTITVYAVTDYKPHADGPHTYHEYPISINYRTE <u>IDKPSQH</u> HHHH                                                                                                                         |
| 199 | E112 EGFR単量体コア:N末端伸長もC末端テールも有していないE112単量体                                                                                                                                                                                          | EVVAATPTSLLISWDAGAVTYQYYRITYGETGGNSPVQEFTVPGGVRTATISGLKPGVDYTITVYAVTDYKPHADGPHTYHEYPISINYRT                                                                                                                                                                |
| 200 | E112 EGFR単量体、X <sub>1</sub> は、配列番号69～77から成る群から選択され、X <sub>2</sub> は、配列番号9、10、または78～81から成る群から選択され、例示的な実施形態において、X <sub>1</sub> は、配列番号69または71であり、X <sub>2</sub> は、配列番号9または10である;所望によりhisタグを含んでいてもよい                                   | <u>X<sub>1</sub></u> EVVAATPTSLLISWDAGAVTYQYYRITYGETGGNSPVQEFTVPGGVRTATISGLKPGVDYTITVYAVTDYKPHADGPHTYHEYPISINYRT <u>X<sub>2</sub></u>                                                                                                                      |
| 201 | EGFR結合剤E112由来のBCループ配列                                                                                                                                                                                                              | SWDAGAVTYQ                                                                                                                                                                                                                                                 |
| 110 | EGFR結合剤E112由来のDEループ配列                                                                                                                                                                                                              | PGGVRT                                                                                                                                                                                                                                                     |

10

20

30

40

【表 1 - 3 7】

|     |                                                                                                                                                       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
|-----|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 202 | EGFR結合剤E112由来のFGループ配列                                                                                                                                 | TDYKPHADGPHTYHEYP                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
| 203 | EGFR結合剤E112由来のBCループ配列、Xは任意のアミノ酸であり、gおよびhは、0～5のアミノ酸から独立して選択される                                                                                         | $X_gDAGAVTYQX_h$                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| 135 | EGFR結合剤E112由来のDEループ配列、Xは任意のアミノ酸であり、iおよびjは、0～5のアミノ酸から独立して選択される                                                                                         | $X_iGGVRX_j$                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| 204 | EGFR結合剤E112由来のFGループ配列、Xは任意のアミノ酸であり、kおよびlは、0～5のアミノ酸から独立して選択される                                                                                         | $X_kDYKPHADGPHTYHEYX_l$                                                                                                                                                                                                                                                                              |
| 205 | E112-GS10-I1:I1[N末端伸長(N+8)および6×Hisタグ(配列番号487)を有するCysテールを有する]に対してGS <sub>10</sub> リンカー(GS10は配列番号11である)を介して融合されたE112[N末端伸長(N+10)および短いテールを有する]を有するE/I直列型 | <u>MGVSDVPRD</u> LEVVAATPTSLISWDAG<br>AVTYQYYRITYGETGGNSPVQEFTVPGG<br>VRTATISGLKPGVDYTITVYAVTDYKPH<br>ADGPHTYHEYPISINYRTEIDK <b>SGSGSGSG</b><br><b>SGSGSGSGSGSGSVSDVPRD</b> LEVVAATP<br>TSLISWSARLKVARYYRITYGETGGNS<br>PVQEFTVPKNVYTATISGLKPGVDYTITV<br>YAVTRFRDYQPISINYRTEIDK <b>PCQH</b> HHH<br>HH |

10

20

30

【 0 2 5 1 】

【表 1 - 3 8】

|     |                                                                                                                                                                                                                                    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |              |
|-----|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|
| 206 | E112-GS10-I1コア、X <sub>1</sub> は、任意であり、存在する場合、配列番号69～77から成る群から選択され、X <sub>2</sub> は、任意であり、存在する場合、配列番号9、10、または78～81から成る群から選択され、n=3、6、または9であり、例示的な実施形態において、X <sub>1</sub> は配列番号69または71であり、X <sub>2</sub> は配列番号9または10である               | <u>X<sub>1</sub></u> EVVAATPTSLLISWDAGAVTYQYYRI<br>TYGETGGNSPVQEFTVPGGVRTATISGL<br>KPGVDYTITVYAVTDYKPHADGPHTYH<br>EYPISINYRTE <u>IDK</u> SGSGSGSGSGSGSGSG<br>SGSGSVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWS<br>ARLKVARYYYRITYGETGGNSPVQEFTVP<br>KNVYTATISGLKPGVDYTITVYAVTRFR<br>DYQPISINYRT <u>X<sub>2</sub></u>  | 10           |
| 207 | E112-(PA) <sub>n</sub> -I1コア、X <sub>1</sub> は、任意であり、存在する場合、配列番号69～77から成る群から選択され、X <sub>2</sub> は、任意であり、存在する場合、配列番号9、10、または78～81から成る群から選択され、n=3、6、または9であり、例示的な実施形態において、X <sub>1</sub> は配列番号69または71であり、X <sub>2</sub> は配列番号9または10である | <u>X<sub>1</sub></u> EVVAATPTSLLISWDAGAVTYQYYRI<br>TYGETGGNSPVQEFTVPGGVRTATISGL<br>KPGVDYTITVYAVTDYKPHADGPHTYH<br>EYPISINYRTE <u>(PA)<sub>n</sub></u> VSDVPRDLEVVAAT<br>PTSLLISWSARLKVARYYYRITYGETGGN<br>SPVQEFTVPKNVYTATISGLKPGVDYTIT<br>VYAVTRFRDYQPISINYRT <u>X<sub>2</sub></u>              | 20           |
| 208 | I1-GS10-E112:E112[N末端伸長(N+8)および6×Hisタグ(配列番号487)を有するCysテールを有する]に対してGS <sub>10</sub> リンカー(GS10は配列番号11である)を介して融合されたI1[N末端伸長(N+10)および短いテールを有する]を有するI/E直列型                                                                              | <u>MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSARL</u><br>KVARYYYRITYGETGGNSPVQEFTVPKNV<br>YTATISGLKPGVDYTITVYAVTRFRDYQ<br>PISINYRTE <u>IDK</u> SGSGSGSGSGSGSGSGSG<br>SGSVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAG<br>AVTYQYYRITYGETGGNSPVQEFTVPGG<br>VRTATISGLKPGVDYTITVYAVTDYKPH<br>ADGPHTYHEYPISINYRTE <u>IDKPCQH</u> HHH<br>HH | 30<br><br>40 |

【表 1 - 3 9】

|     |                                                                                                                                                                                                        |                                                                                                                                                                                                                                                        |
|-----|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 209 | II-GS10-E112コア、 $X_1$ は、任意であり、存在する場合、配列番号69～77から成る群から選択され、 $X_2$ は、任意であり、存在する場合、配列番号9、10、または78～81から成る群から選択され、 $n=3$ 、6、または9であり、例示的な実施形態において、 $X_1$ は配列番号69または71であり、 $X_2$ は配列番号9または10である               | $X_1$ EVVAATPTSLLISWSARLKVARYYRITYGETGGNSPVQEFTVPKNVYTATISGLKPGVDYTITVYAVTRFRDYQPISINYRTEI <u>DKGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSVSDVPRD</u> LEVVAATPTSLLISWDAGAVTYQYYRITYGETGGNSPVQEFTVPGGVRTATISGLKPGVDYTITVYAVTDYKPHADGPHTYHEYPISINYRT <u>X</u> <sub>2</sub>     |
| 210 | II-(PA) <sub>n</sub> -E112コア、 $X_1$ は、任意であり、存在する場合、配列番号69～77から成る群から選択され、 $X_2$ は、任意であり、存在する場合、配列番号9、10、または78～81から成る群から選択され、 $n=3$ 、6、または9であり、例示的な実施形態において、 $X_1$ は配列番号69または71であり、 $X_2$ は配列番号9または10である | $X_1$ EVVAATPTSLLISWSARLKVARYYRITYGETGGNSPVQEFTVPKNVYTATISGLKPGVDYTITVYAVTRFRDYQPISINYRTE( <u>PA</u> ) <sub>n</sub> <u>VSDVPRD</u> LEVVAATPTSLLISWDAGAVTYQYYRITYGETGGNSPVQEFTVPGGVRTATISGLKPGVDYTITVYAVTDYKPHADGPHTYHEYPISINYRT <u>X</u> <sub>2</sub>  |
| 211 | II-GSGCGS8-E5:E5[N末端伸長(N+8)および任意の6×Hisタグ(配列番号487)を有するEテールを有する]に対してGSGCGS8リンカー(GSGCGS8は配列番号218である)を介して融合されたII[N末端伸長(N+10)および修飾された短いテールを有する]を有するI/E直列型                                                   | <u>MGVSDVPRD</u> LEVVAATPTSLLISWSARLKVARYYRITYGETGGNSPVQEFTVPKNVYTATISGLKPGVDYTITVYAVTRFRDYQPISINYRTEI <u>EKGSGCGSGSGSGSGSGSGSVSDVPRD</u> LEVVAATPTSLLISWWAPVDRYQYYRITYGETGGNSPVQEFTVPRDVYTATISGLKPGVDYTITVYAVTDYKPHADGPHTYHESPISINYRTE <u>HHHHHHH</u> |

10

20

30

40

【表 1 - 4 0】

|     |                                                                                                                                                                                                        |                                                                                                                                                                                                                                                                          |                                  |
|-----|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------|
| 212 | I1-GS10-E5-GSGC:E5[N末端伸長(N+8)および任意の6×Hisタグ(配列番号487)を有する修飾Cysテールを有する]に対してGS <sub>10</sub> リンカー(GS10は配列番号11である)を介して融合されたI1[N末端伸長(N+10)および修飾された短いテールを有する]を有するI/E直列型                                       | MGVSDVPRDLEVVAAATPTSLLISWSARL<br>KVARYYRITYGETGGNSPVQEFTVPKNV<br>YTATISGLKPGVDYTITVYAVTRFRDYQ<br>PISINYRTEIEKGSGSGSGSGSGSGSGSG<br>SGSVSDVPRDLEVVAAATPTSLLISWWAP<br>VDRYQYYRITYGETGGNSPVQEFTVPRD<br>VYTATISGLKPGVDYTITVYAVTDYKPH<br>ADGPHTYHESPISINYRTEGSGCHHHHH<br>H     | 10                               |
| 213 | I1(S62C)-GS10-E5:E5[N末端伸長(N+8)および任意の6×Hisタグ(配列番号487)を有するEテールを有する]に対してGS <sub>10</sub> リンカー(GS10は配列番号11である)を介して融合されたI1(N末端伸長(N+10)、S62C置換(囲み)、および修飾された短いテールを有する)を有するI/E直列型;位置62は、配列番号1の位置62に対応するアミノ酸を指す | MGVSDVPRDLEVVAAATPTSLLISWSARL<br>KVARYYRITYGETGGNSPVQEFTVPKNV<br>YTATI[ <u>C</u> ]GLKPGVDYTITVYAVTRFRDYQ<br>PISINYRTEIEKGSGSGSGSGSGSGSGSG<br>SGSVSDVPRDLEVVAAATPTSLLISWWAP<br>VDRYQYYRITYGETGGNSPVQEFTVPRD<br>VYTATISGLKPGVDYTITVYAVTDYKPH<br>ADGPHTYHESPISINYRTEHHHHHHH | 20                               |
| 214 | I1-GS10-E5(S62C):E5[N末端伸長(N+8)、S62C置換(囲み)、および任意の6×Hisタグ(配列番号487)を有するEテールを有する]に対してGS <sub>10</sub> リンカー(GS10は配列番号11である)を介して融合されたI1[N末端伸長(N+10)および修飾された短いテールを有する]を有するI/E直列型;位置62は、配列番号1の位置62に対応するアミノ酸を指す | MGVSDVPRDLEVVAAATPTSLLISWSARL<br>KVARYYRITYGETGGNSPVQEFTVPKNV<br>YTATISGLKPGVDYTITVYAVTRFRDYQ<br>PISINYRTEIEKGSGSGSGSGSGSGSGSG<br>SGSVSDVPRDLEVVAAATPTSLLISWWAP<br>VDRYQYYRITYGETGGNSPVQEFTVPRD<br>VYTATI[ <u>C</u> ]GLKPGVDYTITVYAVTDYKPH<br>ADGPHTYHESPISINYRTEHHHHHHH | 30<br><br><br><br><br><br><br>40 |

【 0 2 5 4】

|     |                                                                                                                                                                                                        |                                                                                                                                                                                                                                                                          |
|-----|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 215 | I1(S91C)-GS10-E5:E5[N末端伸長(N+8)および任意の6×Hisタグ(配列番号487)を有するEテールを有する]に対してGS <sub>10</sub> リンカー(GS10は配列番号11である)を介して融合されたI1(N末端伸長(N+10)、S91C置換(囲み)、および修飾された短いテールを有する)を有するI/E直列型;位置91は、配列番号1の位置91に対応するアミノ酸を指す | MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSARL<br>KVARYYRITYGETGGNSPVQEFTVPKNV<br>YTATISGLKPGVDYTITVYAVTRFRDYQ<br>PI□INyrTEIEKGS <del>SGSGSGSGSGSGSGSG</del><br>SGSVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWWAP<br>VDRYQYYRITYGETGGNSPVQEFTVPRD<br>VYTATISGLKPGVDYTITVYAVTDYKPH<br>ADGPHTYHESPISINyrTEHHHHHHH |
| 216 | I1-GS10-E5(S91C):E5(N末端伸長(N+8)、S91C置換(囲み)、および任意の6×Hisタグ(配列番号487)を有するEテールを有する)に対してGS <sub>10</sub> リンカー(GS10は配列番号11である)を介して融合されたI1[N末端伸長(N+10)および修飾された短いテールを有する]を有するI/E直列型;位置91は、配列番号1の位置91に対応するアミノ酸を指す | MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSARL<br>KVARYYRITYGETGGNSPVQEFTVPKNV<br>YTATISGLKPGVDYTITVYAVTRFRDYQ<br>PISINyrTEIEKGS <del>SGSGSGSGSGSGSGSG</del><br>SGSVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWWAP<br>VDRYQYYRITYGETGGNSPVQEFTVPRD<br>VYTATISGLKPGVDYTITVYAVTDYKPH<br>ADGPHTYHESPI□INyrTEHHHHHHH |
| 217 | 修飾された短いテール                                                                                                                                                                                             | EIEK                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| 218 | GSGCGS8リンカー                                                                                                                                                                                            | GSGCGSGSGSGSGSGSGSGSGS                                                                                                                                                                                                                                                   |

## 实施例 1

In Cell Westernアッセイは、IGF1R<sup>10</sup>Fn3結合剤と結合してE/I結合剤を構築することができるものを同定するために、EGFR活性を阻害する能力について様々な単一の<sup>10</sup>Fn3クローンをスクリーニングするために開発された。In Cell Westernアッセイはまた、特定のE/I<sup>10</sup>Fn3結合剤の相対的な効力をスクリーニングし、決定するためにも使用された。2つのIn Cell Westernアッセイは、1)EGF刺激EGFRリン酸化の阻害または2)EGF刺激ERKリン酸化の阻害を測定するために開発された。細胞は、A431類表皮癌細胞またはFaDu頭頸部癌細胞について24,000細胞/ウェルで、ポリD-リジンで被覆された96ウェルマイクロタイタープレート(Becton Dickinson、Franklin Lakes、NJ)中に細胞を播種し、一晚接着させた。細胞を1回洗浄し、次いで、無血清培地中で24時間インキュベートした。次に、<sup>10</sup>Fn3ベースの結合剤の段階希釈液を細胞にアプライし、2~3時間インキュベートした後、100ng/ml

30

50

EGFで10分間刺激した。刺激後、3.7%ホルムアルデヒドを含有するPBS中で20分間細胞を固定し、次いで、15分間、0.1%triton-X-100を含有するPBS中で透過処理した。細胞は、Odysseyブロッカー(Li-Cor Biosciences、Lincoln、Nebraska)中で1時間ブロックし、チロシン1068上でリン酸化されたEGFR(Cell Signaling、Beverly、MA)およびβ-アクチン(Sigma、St. Louis、MO)またはpERK(チロシン202/トレオニン204上でリン酸化されたMAPキナーゼ)および全ERK(Santa Cruz Biotechnology、Santa Cruz、CA)を検出するために、抗体と共にインキュベートした。0.1%tween-20を含有するPBS中での3回の洗浄の後に、二次抗体を追加した(Invitrogen、Carlsbad、CA or Rockland、Gilbertsville、PA)。細胞は、0.1%tween-20を含有するPBS中で3回洗浄し、Li-Cor Odyssey赤外線画像システム(Li-Cor Biosciences、Lincoln、Nebraska)上で画像処理した。それぞれのクローンを3連または4連でアッセイし、値は、pEGFRアッセイについてはβ-アクチンおよびpERKアッセイについては全ERKに対して標準化した。IC50値は、バックグラウンドを差し引いた最大シグナルの阻害パーセントについての線形回帰分析から計算した。

10

#### 【0256】

結果として、EGFRの活性を阻害する能力を持つ様々な<sup>10</sup>Fn3クローンがもたらされ、ある種の特異的なE/I<sup>10</sup>Fn3結合剤が図9において示される例に類似する活性を有したことが示された。

20

#### 【0257】

##### 実施例2

##### <sup>10</sup>Fn3ベースの結合剤の発現

E/I結合剤は、グリシン-セリンリンカーを使用してEGFR結合<sup>10</sup>Fn3をIGFIR結合<sup>10</sup>Fn3に共有結合し、それによって、それぞれの<sup>10</sup>Fn3ドメインが異なる標的に結合する<sup>10</sup>Fn3二量体を生成することによって製造した。IGFIR結合<sup>10</sup>Fn3(I1)は、PCT公開WO 2008/066752において配列番号226として以前に記載されている。新規な2つのEGFR結合<sup>10</sup>Fn3(E2およびE1)は、PCT公開WO 2008/066752において記載されるように、EGFR-Fc(R&D Systems、Minneapolis、MN)に対する結合剤について、RNA-タンパク質融合ライブラリーをスクリーニングすることによって同定した。以下の実施例は、様々なHisタグつきE/I<sup>10</sup>Fn3ベースの結合剤(非ペグ化): E2-GS10-I1(配列番号25)、E1-GS10-I1(配列番号31)、I1-GS10-E1(配列番号28)、およびI1-GS10-E2(配列番号22)を使用する結果を記載する。

30

#### 【0258】

以下の実施例はまた、以下のペグ化HisタグつきE/I<sup>10</sup>Fn3ベースの結合剤: E1-GS10-I1(配列番号55)、E2-GS10-I1(配列番号56)、E3-GS10-I1(配列番号53)、I1-GS10-E1(配列番号57)、I1-GS10-E2(配列番号58)、I1-GS10-E3(配列番号54)、E4-GS10-I1(配列番号120)、I1-GS10-E4(配列番号124)、E5-GS10-I1(配列番号128)、I1-GS10-E5(配列番号132)、E85-GS10-I1(配列番号149)、I1-GS10-E85(配列番号152)、E90-GS10-I1(配列番号164)、E96-GS10-I1(配列番号179)、E105-GS10-I1(配列番号192)、I1-GS10-E105(配列番号195)、E112-GS10-I1(配列番号205)、I1-GS10-E112(配列番号208)、I1-GSGCGS8-E5(配列番号211)、I1-GS10-E5-GSGC(配列番号212)、I1(S62C)-GS10-E5(配列番号213)、I1-GS10-E5(S62C)(配列番号214)、I1(S91C)-GS10-

40

50

E 5（配列番号 2 1 5）、および I 1 - G S 1 0 - E 5（S 9 1 C）（配列番号 2 1 6）を用いる結果を記載する。

#### 【0 2 5 9】

実施例はまた、H i s タグつき I G F R I R<sup>1 0</sup> F n 3 ベースの結合剤、I 1（配列番号 4）ならびに 1 0 種の H i s タグつき E G F R<sup>1 0</sup> F n 3 ベースの結合剤、E 2（配列番号 6）、E 1（配列番号 8）、E 3（配列番号 5 2）、E 4（配列番号 1 0 7）、E 5（配列番号 1 1 3、X = S e r および C 末端に H i s タグを有する）、ペグ化 E 5（配列番号 1 1 3、X = C y s および C 末端に H i s タグを有する）、E 8 5（配列番号 1 4 0）、E 9 0（配列番号 1 5 5）、E 9 6（配列番号 1 7 0）、E 1 0 5（配列番号 1 8 5）、ならびに E 1 1 2（配列番号 1 9 8）を使用する結果をも記載する。実施例 3 2 はまた、図 4 5 において説明され、C 末端に H i s タグを含む配列を有する様々な E 単量体をも記載する。

10

#### 【0 2 6 0】

様々な<sup>1 0</sup> F n 3 ベースの結合剤は、ハイスループットタンパク質産生プロセス（H T P P）を使用して精製した。選択した結合剤を、H i s<sub>6</sub> タグ（配列番号 4 8 7）融合体を生成するために p E T 9 d ベクターの中にクローニングした。DNA を、大腸菌 H M S 1 7 4（D E 3）の中に形質転換し、細胞は、2 4 ウェルフォーマット中に 5 0 μ g / m L カナマイシンを含有する 5 m l L B 培地中に接種し、3 7 ° C で一晩、成長させた。新鮮な 5 m l L B 培地（5 0 μ g / m L カナマイシン）培養物は、一晩培養物から 2 0 0 μ l を吸引し、適切なウェルの中にそれを分注することによって、誘発性発現のために調製した。培養物は、A<sub>6 0 0</sub> 0. 6 ~ 0. 9 まで 3 7 ° C で成長させた。1 m M イソプロピル-β-チオガラクトシド（I P T G）を用いる誘発の後に、培養物は、3 0 ° C でさらに 6 時間成長させ、4 ° C で 3 2 2 0 x g で 1 0 分間の遠心分離によって採取した。細胞ペレットは 8 0 ° C で凍結させた。

20

#### 【0 2 6 1】

細胞ペレット（2 4 ウェルフォーマット中）は、4 5 0 μ l の溶解緩衝液（5 0 m M N a H<sub>2</sub> P O<sub>4</sub>、0. 5 M N a C l、1 x C o m p l e t e（登録商標）プロテアーゼ阻害剤カクテル- E D T A なし（R o c h e）、1 m M P M S F、1 0 m M C H A P S、4 0 m M イミダゾール、1 m g / m l リゾチーム、3 0 μ g / m l D N アーゼ、2 μ g / m l アプロチニン（a p r o t o n i n）、p H 8. 0）中での再懸濁によって溶解し、1 時間室温で振盪した。溶解物は、清澄化し、9 6 ウェル 6 5 0 μ l キャッチプレートが取り付けられた 9 6 ウェル W h a t m a n G F / D U n i f i l t e r の中への移動によって、9 6 ウェルフォーマット中に再度載せ、2 0 0 x g で 5 分間、遠心分離した。清澄化した溶解物は、平衡緩衝液（5 0 m M N a H<sub>2</sub> P O<sub>4</sub>、0. 5 M N a C l、1 0 m M C H A P S、4 0 m M イミダゾール、p H 8. 0）を用いて平衡化した 9 6 ウェル N i キレートプレートに移し、5 分間インキュベートした。非結合物質は、吸引によって除去した。樹脂は、洗浄緩衝液 # 1（5 0 m M N a H<sub>2</sub> P O<sub>4</sub>、0. 5 M N a C l、5 m M C H A P S、4 0 m M イミダゾール、p H 8. 0）を用いて 2 x 0. 3 m l / ウェルで洗浄し、それぞれの洗浄液は、吸引によって除去した。次に、樹脂は、P B S を用いて 3 x 0. 3 m l / ウェルで洗浄し、それぞれの洗浄液は、吸引によって除去した。溶出前に、それぞれのウェルは、5 0 μ l 溶出緩衝液（P B S + 2 0 m M E D T A）を用いて洗浄し、5 分間インキュベートし、洗浄液は、吸引によって廃棄した。タンパク質は、それぞれのウェルに溶出緩衝液をさらに 1 0 0 μ l アプライすることによって溶出した。室温での 3 0 分間のインキュベーションの後に、プレート（複数可）は、2 0 0 x g で 5 分間遠心分離し、溶出タンパク質は、N i プレートの底面に装着した 5 μ l の 0. 5 M M g C l<sub>2</sub> を含有する 9 6 ウェルキャッチプレート中に収集した。溶出タンパク質は、タンパク質標準物質として配列番号 2 を用いて、B C A タンパク質アッセイを使用して定量した。

30

40

#### 【0 2 6 2】

H T P P により、可溶性形態で発現され、細菌細胞質ゾルの可溶性画分から精製された

50

活性な<sup>10</sup>F n 3 ベースの結合剤がもたらされた。図1は、E/I<sup>10</sup>F n 3 ベースの結合剤のうちの1つに由来する例示的なSDS-PAGE分析を示す。100mM NaPO<sub>4</sub>、100mM NaSO<sub>4</sub>、150mM NaCl、pH6.8 (GE Healthcare) の移動相中のSuperdex 200 5/150 GL上でのSEC分析は、主に単量体のタンパク質を示した(実施例4を参照されたい)。

#### 【0263】

さらに、選択した<sup>10</sup>F n 3 ベースの結合剤の中規模発現および精製を実行した。His<sub>6</sub> タグ(配列番号487)に融合された選択した結合剤は、pET9dベクターまたはpET29ベクターの中にクローニングし、大腸菌HMS174 (DE3) 細胞またはBL212 (DE3) (EMD Biosciences, San Diego, CA) 細胞中で発現させた。20mlの接種培養物(単一の平板培養コロニーから生成)は、50μg/mLカナマイシンを含有する1リットルのLB培地に接種するために使用した。培養物は、A<sub>600</sub> 0.6~1.0まで37℃で成長させた。1mMイソプロピルーβ-チオガラクトシド(IPTG)を用いる誘発の後に、培養物は、30℃にさらに6時間成長させた。別法では、発現は、自己誘発培地(「ONE」培地、EMD Biosciences, San Diego, CA)を用いる37℃での最初の増殖の後に、18℃で実行した。細胞ペレットは、4℃、≥10,000xgでの30分間の遠心分離によって採取し、80℃で凍結させた。細胞ペレットは、氷上で、Ultra-turraxホモジナイザーを使用して、25mLの溶解緩衝液(20mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、0.5M NaCl、1×Complete(登録商標)プロテアーゼ阻害剤カクテル-EDTAなし(Roche)、pH7.4)中に再懸濁した。細胞溶解は、モデルM-110S Microfluidizer(Microfluidics)を使用して、高圧ホモジナイゼーション(≥18,000psi)によって達成した。可溶性画分は、4℃、23,300xgでの30分間の遠心分離によって分離した。上清は、0.45μmフィルターを介して清澄化した。清澄化した溶解物は、20mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、0.5M NaCl、pH7.4を用いてあらかじめ平衡化したHisTrapカラム(GE)上に装填した。次いで、カラムは、25カラム容量の20mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、0.5M NaCl、pH7.4、その後続いて、20カラム容量の20mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、0.5M NaCl、25mMイミダゾール、pH7.4、および次いで、35カラム容量の20mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、0.5M NaCl、40mMイミダゾール、pH7.4を用いて洗浄した。タンパク質は、15カラム容量の20mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、0.5M NaCl、500mMイミダゾール、pH7.4を用いて溶出し、画分は、A<sub>280</sub>の吸光度に基づいてプールし、1×PBS、50mM Tris、150mM NaCl、pH8.5または50mM NaOAc、150mM NaCl、pH4.5に対して透析した。いかなる沈殿物も、0.22μmで濾過することによって除去した。

#### 【0264】

中規模発現および精製により、可溶性形態で発現され、細菌細胞質ゾルの可溶性画分から精製された、高度に純粋で活性のタンパク質がもたらされた。100mM NaPO<sub>4</sub>、100mM NaSO<sub>4</sub>、150mM NaCl、pH6.8 (GE Healthcare) の移動相中のSuperdex 200 10/30 GL上でのSEC分析は、主に単量体のタンパク質を示した(実施例4を参照されたい)。

#### 【0265】

##### 実施例3

E/I<sup>10</sup>F n 3 ベースの結合剤のペグ化

E/I<sup>10</sup>F n 3 ベースの結合剤などの多価フィブロネクチンベースのスクフォールドタンパク質は、様々なサイズおよびタイプのPEGを用いてペグ化することができる。ペグ化を可能にするために、典型的には、該タンパク質は、アミノ酸(典型的にはセリン)のシステインへの単一点突然変異によって、C末端の近くで修飾される。単一のシステイン残基でのタンパク質のペグ化は、誘導体化PEG試薬をタンパク質溶液と組み合わせ、インキュベートすることによって、様々なマレイミド誘導体化PEG形態とのコンジ

ュゲーションを通して達成される。ペグ化コンジュゲーション反応の進行および確認は、ペグ化タンパク質から非ペグ化タンパク質を分離するSDS-PAGEおよび／またはSE-HPLC法によって確認することができる。

#### 【0266】

たとえば、コンストラクトE2-GS10-I1（配列番号25）は、位置221にあったセリンをシステインと交換することによってペグ化される。次いで、結果として生じるコンストラクト、配列番号56は、マレイミド誘導体化40kDa分岐PEG（NOF America Corporation、White Plains、NY）とコンジュゲートされた。誘導体化PEG試薬は、溶液中で該タンパク質コンストラクトと混合され、室温で反応が完了するまで、典型的に30分間、または4℃で一晩、pH7.40でインキュベートした。pHは、50 NaOAc、150mM NaCl緩衝液の中への透析またはサイズ排除カラムクロマトグラフィーを使用する急速な脱塩によってpH4.5またはpH5.0まで低下させた。次いで、ペグ化反応由来の産物および過剰反応物質の混合物を、より低いpHで陽イオン交換クロマトグラフィーカラム上に装填し、150mM～1M NaClの勾配を用いて溶出した。ペグ化を確認するための研究もまた、上記の段落において記載されるように行った。コンジュゲーションは、タンパク質のHisタグつきまたはHisタグなしバージョンを用いて実行することができる。

#### 【0267】

大腸菌内毒素混入を試料中で減らす必要がある場合、別々にまたは互いに関連して使用される2つの方法を用いた。第1に、典型的に、0.5% Triton X-100を補足した5カラム容量のNaOAc緩衝液、次いで、Triton X-100を含有しない20カラム容量（またはそれ以上）の同じ緩衝液を用いて、陽イオン交換カラムを洗浄した。さらに、またはこの手順の代わりに、該タンパク質を、Sartorius Sartobind（登録商標）Qフィルター（Sartorius Stedim Biotech Bohemia、New York）に非常にゆっくりと通過させた。

#### 【0268】

2つのE/I<sup>10</sup>Fn3ベースの結合剤、E2-GS10-I1-cys（hisを有する）（配列番号56）およびE3-GS10-I1-Cys（hisを有する）（配列番号53）は、代替手順を使用してペグ化した。E2-GS10-I1-cys（hisを有する）またはE3-GS10-I1-Cys（hisを有する）をコードするT7ポリメラーゼ（polymerase）駆動pET29プラスミドを含有するBL21（DE3）大腸菌細胞の5mlの接種培養物を、単一の平板培養コロニーから生成し、50μg/mLカナマイシンを含有する1リットルの自己誘発培地（「ONE」培地、EMD Biosciences、San Diego、CA）に接種するために使用した。発現は、37℃での最初の増殖の後に18℃で実行し、4℃、約10,000xgでの10分間の遠心分離によって採取した。細胞ペレットは80℃で凍結させた。細胞ペレットは、10mLの溶解緩衝液（20mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、0.5M NaCl、5mMイミダゾール（Imidazole）、pH7.4）中で再懸濁し、Avestinホモジナイザーを使用して機械的に溶解した。可溶性画分は、4℃、23,300xgでの15分間の遠心分離によって分離した。上清は、デカントし、ペレットは、4M～6M 塩酸グアニジン（GdnHCl）を補足した溶解緩衝液（上記）中で可溶化にした。次いで、可溶化したタンパク質は、GdnHClを補足した溶解緩衝液を用いてあらかじめ平衡化した、適切なサイズのNiNTAカラム（Qiagen、Inc.）上で精製した。次いで、該カラムは、5～10カラム容量の同じ緩衝液を用いて洗浄し、その後、300mMイミダゾールを補足した同じ緩衝液を用いて溶出した。対象のタンパク質を含有するカラムから溶出した画分は、2～3mg/mLタンパク質に希釈し、次いで、1.2～1.5モル過剰の固体NEM-PEG（40kDa分岐または他）と組み合わせた。混合物は、室温で30分間または反応が完了するまで反応させた。次いで、全反応容量を透析バッグ（5,000Da分子量カットオフ）の中に入れ、混合物を透析リフォールディングプロセスに付した。たとえば、このプロセスは、50mM NaOAc、150mM Na

10

20

30

40

50

C1、pH4.5に対する2回の10～16時間の500：1（緩衝液：透析液）の透析交換から成ってもよい。この手順由来の透析液は、適切にフォールドしたペグ化物質および過剰反応物質を含有する。ペグ化反応由来の産物および過剰反応物質の混合物は、陽イオン交換クロマトグラフィーカラム（SP SpharoseまたはResource S、GE Healthcare）上にそれらを装填する前に、遠心分離または濾過を介して清澄化した。カラムは、NaOAcバックグラウンド緩衝液中で150mM～1M NaClの勾配を用いて展開した。ペグ化を確認するための研究は、上記に記載されるように行った。

#### 【0269】

#### 実施例4

##### <sup>10</sup>F n3ベースの結合剤の生物物理的特徴づけ

標準のサイズ排除クロマトグラフィー（SEC）を、HTPPおよび中規模プロセスから精製したタンパク質について実行した（HTPPについては0.1～1μgのタンパク質、中規模については10～50ug）。HTPP由来物質のSECは、Superdex 200 5/150カラム（GE Healthcare）を使用して、または中規模の物質についてはSuperdex 200 10/30カラム（GE Healthcare）上で、A<sub>214</sub>nmおよびA<sub>280</sub>nmでのUV検出ならびに蛍光検出（励起＝280nmおよび放射＝350nm）を用いるAgilent 1100または1200 HPLCシステム上で実行した。該SECカラムの適切な流速にて、100mM硫酸ナトリウム、100mMリン酸ナトリウム、150mM塩化ナトリウム、pH6.8の緩衝液を用いた。ゲル濾過標準物質（Bio-Rad Laboratories、Hercules, CA）を分子量較正のために使用した。

#### 【0270】

HTPP精製<sup>10</sup>F n3ベースの結合剤のSECについての結果は、主に、単量体のタンパク質、および球状ゲル濾過標準物質（BioRad）に対する約25kDaの範囲の溶出を示した。

#### 【0271】

中規模の精製<sup>10</sup>F n3ベースの結合剤のSECについての結果は、主に単量体のタンパク質および球状ゲル濾過標準物質（BioRad）に対して約25kDaの範囲の溶出を示した。図2は、E/I<sup>10</sup>F n3ベースの結合剤（図2AにおいてI1-GS10-E2および図2BにおいてE2-GS10-I1）についての例示的なSECプロファイルを示す。

#### 【0272】

選択した中規模の<sup>10</sup>F n3ベースの結合剤は、LC-MSによってさらに分析した（Waters Q-TOF API質量分析計と接続したWaters（water's）2695液体クロマトグラフィーHPLCシステム、Waters Corporation、Milford, MA）。試料は、HPLCグレード水を用いて約0.5mg/mlまで希釈した。希釈した試料の約5μlを、Jupiter C18カラム（カタログ番号00G-4053-80、Phenomenex）に注入した。緩衝液A：HPLCグレード水中、0.02%TFA+0.08%ギ酸。緩衝液B：HPLCグレードアセトニトリル中、0.02%TFA+0.08%ギ酸。試料は、流速0.2ml/分で勾配（表1）を用いて溶出した。

#### 【0273】

10

20

30

40

## 【表 2】

表 1

| 時間    | %A | B% |
|-------|----|----|
| 0     | 95 | 5  |
| 5.00  | 75 | 25 |
| 25.00 | 55 | 45 |
| 30.00 | 5  | 95 |
| 32.00 | 95 | 5  |
| 45.00 | 95 | 5  |

10

## 【0274】

HPLC 溶出液は、約 1 : 1 の比に分割し、半分は UV 検出器におよび他の半分は質量分析計に送った。質量分析計は、以下の機器設定を有した：キャピラリー電圧 3.5 kV、コーン電圧 40、ソース温度 80℃、脱溶媒和温度 250℃、脱溶媒和ガスフロー 450、および多チャンネル光検出器電圧 2200。生のスペクトルは、MaxEn1 (Waters Corporation) を用いてデコンボリュートした。

## 【0275】

LC-MS によって測定される I1-GS10-E2 (配列番号 22) の分子量は、24,445 ダルトンであり、これは、アミノ酸組成から計算した分子量から 1 ダルトンの範囲内にある。これは、該タンパク質が正確なアミノ酸組成を有し、N 末端メチオニンがプロセッシングされることを示す。タンパク質上に他の翻訳後修飾はない。

20

## 【0276】

中規模の I1-GS10-E2 の示差走査熱量測定 (DSC) 分析は、 $T_m$  を決定するために実行した。1 mg/ml 溶液は、3 気圧の圧力下で毎分 1 度の速度で 5℃～95℃まで温度を上昇させることによって、N-DSC II 熱量計 (Calorimetry Sciences Corp) においてスキャンした。データは、Origin ソフトウェア (Origin Lab Corp) を使用し、ベストフィットを使用して適切な緩衝液の対照の実行に対して分析した。このアッセイの結果は、E/I 結合剤が 50.69℃の  $T_m$  を有することを実証する (図 3A を参照されたい)。同じ方法を使用して、E2-GS10-I1 (Peg を有する) の  $T_m$  は、50.72℃であることが決定され、E2-GS10-I1 (Peg なし) の  $T_m$  は、56.82℃であることが決定された (図 3B を参照されたい)。

30

## 【0277】

## 実施例 5

## 結合親和性の測定

表面プラズモン共鳴 (BIAcore) 分析は、捕捉された EGFR-Fc および IGF1R-Fc を使用して、off 速度および/または結合親和性を決定するために、溶液相の  $^{10}$ Fn3 ベースの結合剤について実行した。ヒト IGF1R (アミノ酸 1～932) の細胞外ドメインは、ヒト IgG1 のヒンジおよび定常領域を含有する哺乳動物発現ベクターの中にクローニングした。プラスミドの一時的なトランスフェクションにより、融合タンパク質、IGF1R-Fc が産生され、続いて、これをプロテイン A クロマトグラフィーによって精製した。組換えヒト EGFR-Fc (ヒト Fc に融合されたヒト EGFR の細胞外ドメインのアミノ酸 1～645) は、R&D systems (Minneapolis, MN) から購入した。IGF1R-Fc は、固定プロテイン A 上に捕捉したが、EGFR-Fc は、固定抗ヒト抗体上に捕捉した。

40

## 【0278】

典型的な実験において、抗ヒト IgG は、メーカーの推奨 (GE Healthcare, Piscataway, NJ) に従って、CM5 チップのフローセル 1 および 2 上に固定した。EGFR-Fc (50 nM) を、フローセル 2 (Fc2) に 2 分間、5 uL で

50

注入した。3M  $MgCl_2$  の2回の30秒間の注入を、抗ヒトIgG表面からの結合EGFR-Fcの再生のために使用した。プロテインAは、アセテートpH4.5中で80  $\mu g/mL$ に希釈し、CM5チップ表面のフローセル3および4上に $\sim 3000 RU$ まで固定した。約1300RUのIGF1R-Fcを、Fc4上に捕捉させた。50mMグリシンpH1.5の2回の30秒間の注入は、試料の間で表面を再生するために使用した。

【0279】

100nM $\sim$ 1nMのHTPP精製タンパク質（3つのデータポイントを収集）または300nM $\sim$ 0.05nMの中規模の精製タンパク質（11のデータポイントを収集）の濃度系列を、EGFR-FcまたはIGF1R-Fcへの結合について評価した。センサグラムは、それぞれの濃度で得、速度定数 $k_a$  ( $k_{on}$ ) および $k_d$  ( $k_{off}$ ) を決定するためにBiacore T100評価ソフトウェア、バージョン1.1.1 (GE healthcare/Biacore) を使用して評価した。HTPP評価のために、オフ速度は3ポイントの曲線からフィットさせた。親和性 $K_D$ は、速度定数 $k_{off}/k_{on}$ の比から計算した。

【0280】

EGFR- $^{10}Fn3$  ベースの結合剤は、HER2-Fcを捕捉するために抗ヒトIgGを使用して、類似するフォーマットにおいて特異性について評価した。 $^{10}Fn3$  ベースの結合剤は、強い結合がEGFR-Fcについて見られた条件下で、捕捉HER2-Fcへの識別可能な結合を全く示さなかった。

【0281】

表2において示されるように、E/I- $^{10}Fn3$  ベースの結合剤の両方のドメインは、機能的であり、それぞれの標的に対するそれらの結合特性を保持している。表2において示されるoff速度は、中規模物質由来のものであり、HTPP物質を用いて得られた定質的な結果に類似している。

【0282】

10

20

【表 3】

| 表2: <sup>10</sup> F <sub>n</sub> 3ベースの結合剤についての結合定数の概要 |            |                      |                      |                     |
|-------------------------------------------------------|------------|----------------------|----------------------|---------------------|
| 標的                                                    | タンパク質      | ka (1/Ms)            | kd (1/s)             | K <sub>D</sub> (nM) |
| EGFR-Fc                                               | E1         | 1.19E+05<br>1.43E+05 | 1.18E-03<br>1.89E-03 | 9.92<br>13.2        |
|                                                       | E1-GS10-I1 | 6.29E+04<br>3.82E+04 | 4.74E-04<br>3.89E-04 | 7.53<br>10.17       |
|                                                       | I1-GS10-E1 | 1.26E+05<br>4.13E+04 | 6.03E-04<br>4.25E-04 | 4.8<br>10.28        |
|                                                       | E2         | 3.73E+05<br>3.27E+05 | 2.72E-04<br>3.2E-04  | 0.73<br>0.98        |
|                                                       | E2-GS10-I1 | 3.93E+05<br>3.75E+05 | 1.75E-04<br>1.67E-04 | 0.45<br>0.45        |
|                                                       | I1-GS10-E2 | 6.47E+05<br>3.90E+05 | 1.42E-04<br>1.14E-04 | 0.22<br>0.29        |
|                                                       | E3         | 2.83E+05             | 3.98E-04             | 3.4<br>1.4          |
|                                                       | E3-GS10-I1 | 3.49E+05             | 2.29E-04             | 0.66                |
|                                                       | I1-GS10-E3 | 1.17E+05             | 2.91E-04             | 2.48                |
|                                                       |            |                      |                      |                     |
| IGF1R-Fc                                              | I1         | 3.84E+06             | 4.34E-04             | 0.11                |
|                                                       | E1-GS10-I1 | 5.13E+05             | 3.38E-04             | 0.66                |
|                                                       | I1-GS10-E1 | 1.47E+06             | 3.98E-04             | 0.27                |
|                                                       | E2-GS10-I1 | 1.24E+06             | 3.95E-04             | 0.32                |
|                                                       | I1-GS10-E2 | 3.82E+06             | 4.79E-04             | 0.13                |
|                                                       | E3-GS10-I1 | 1.8E+06              | 2.09E-04             | 0.12                |
|                                                       | I1-GS10-E3 | 1.37E+06             | 4.54E-05             | 0.03                |

## 【0283】

## 実施例 6

H292細胞におけるIGFR活性の阻害

E/I<sup>10</sup>F<sub>n</sub>3ベースの結合剤がチロシン1131上でのIGF1Rのリン酸化を阻害する能力は、インビトロアッセイにおいてH292細胞を使用して決定した。手短かに言えば、 $65 \times 10^3$  H292細胞は、10mM Hepes pH7.4および10%ウシ胎児血清を含有するRPMI-1640培養培地中、96ウェルマイクロプレート（BiocoatポリD-リシンコート96ウェルプレート、カタログ#356640、Becton Dickinson、Franklin Lakes、NJ）中で培養した。細胞は、37℃、5%CO<sub>2</sub>で24時間、接着させた。翌日、細胞は、ウェル当たり200マイクロリットルの無血清RPMI-1640を用いて1回洗浄し、ウェル当たり100μLの無血清RPMI-1640中で一晩インキュベートした。HTPP物質の段階希釈液を追加し、細胞をさらに3時間インキュベートした。細胞は、37℃で10分間、100ng/mlのIGF-1（カタログ#500-P11、PeproTech、Rocky Hill、NJ）を用いて刺激した。培地をプレートから捨て、100μLの細胞溶解緩衝液（Cell Signalingカタログ#9803、Beverly、MA）をそれぞれのウェルに追加した。細胞は、15分間、室温でインキュベートし、溶解させ、溶解物は、ホスホIGFR ELISA（カタログ#7302、Cell Signaling、Beverly、MA）に移した。ELISAを実行するためにメーカーの手順に従った。

## 【0284】

図4において示されるように、HisタグつきE1-GS10-I1は、単離IGF1R結合剤、I1 ( $IC_{50} = 0.018 \mu M$ )と同程度の効力でIGF1RのIGF1刺激リン酸化を阻害した ( $IC_{50} = 0.004 \mu M$ )。EGFR結合剤、E1のみでは、IGF1Rリン酸化に対してほとんど効果を有していなかった ( $IC_{50} > 3.5 \mu M$ )。図9において示されるように、さらなるE/I結合剤は、試験したいくつかのペグ化E/I結合剤を含めて、 $0.1 nM \sim 19 nM$ の範囲の $IC_{50}$ でIGF1R刺激リン酸化を阻害する能力を示した。特に、ペグ化E/I結合剤E1-GS10-I1およびI1-GS10-E1については、pIGFRの阻害は、 $0.9 nM$ および $4 nM$ でそれぞれ示された。ペグ化E/I結合剤E2-GS10-I1およびI1-GS10-E2については、pIGFRの阻害は、 $0.3 nM$ および $0.8 nM$ でそれぞれ示された。

10

## 【0285】

## 実施例7

H292細胞におけるEGFR活性の阻害

E/I<sup>10</sup>Fn3ベースの結合剤がチロシン1068上でのEGFRのリン酸化を阻害する能力は、インビトロアッセイにおいてH292細胞を使用して決定した。アッセイは、細胞を $100 ng/ml$ のEGF (カタログ#236-EG-200、R & D Systems、Minneapolis、MN)を用いて刺激したという点を除いて実施例6において記載されるように実行し、ホスホEGFR ELISAを実行した (カタログ#7240、Cell Signaling、Beverly、MA)。ELISAを実行するためにメーカーの手順に従った。

20

## 【0286】

図5において示されるように、HisタグつきE1-GS10-I1は、単離EGFR結合剤、E1 ( $IC_{50} = 0.007 \mu M$ )と同程度の効力でEGFRのEGF刺激リン酸化を阻害した ( $IC_{50} = 0.020 \mu M$ )。IGF1R結合剤、I1のみでは、EGFRリン酸化に対してほとんど効果を有していなかった ( $IC_{50} > 6.21 \mu M$ )。図9において示されるように、さらなるE/I結合剤は、試験したいくつかのペグ化E/I結合剤を含めて、 $7 nM \sim 127 nM$ の範囲の $IC_{50}$ でEGF刺激リン酸化を阻害する能力を示した。特に、ペグ化E2-GS10-I1およびI1-GS10-E2については、pEGFRの阻害は、 $32 nM$ および $47 nM$ でそれぞれ示された。類似するデータは、ペグ化E/I結合剤E2-GS10-I1およびI1-GS10-E2について図1

30

## 【0287】

## 実施例8

H292細胞におけるEGF+IGF1誘発pAKTの阻害

E/I<sup>10</sup>Fn3ベースの結合剤がセリン473上でのAKTのリン酸化を阻害する能力は、インビトロアッセイにおいてH292細胞を使用して決定した。アッセイは、細胞を上記に記載されるようにEGFおよびIGF1の両方を用いて同時に刺激し、溶解物をホスホAKT ELISA (カタログ#7160、Cell Signaling、Beverly、MA)を用いて分析したという点を除いて、実施例6において記載されるように実行した。ELISAを実行するためにメーカーの手順に従った。

40

## 【0288】

EGFRおよびIGF1Rでのシグナル伝達は、PI3K-AKTシグナリング経路の中に送られ、AKTのリン酸化を刺激する。図6において示されるように、E1-GS10-I1は、H292細胞においてAKTのEGFおよびIGF1刺激リン酸化を阻害した。E/I<sup>10</sup>Fn3ベースの結合剤は、IGF1R結合剤、I1単独 ( $IC_{50} = 0.031 \mu M$ )よりもAKT活性化を遮断するその能力がわずかにより強力であった ( $IC_{50} = 0.004 \mu M$ )。EGFR結合剤、E1は、両方のリガンドによってAKT活性化を遮断するその能力においてわずかな活性を示した ( $IC_{50} = 1.28 \mu M$ )。図9において示されるように、さらなるE/I結合剤は、試験したいくつかのペグ化E/I結合剤を含めて、 $0.1 nM \sim 26 nM$ の範囲の $IC_{50}$ でAKTのEGFおよびI

50

G F 1 刺激リン酸化を阻害する能力を示した。

#### 【0289】

##### 実施例9

R H 4 1 細胞および H 2 9 2 細胞における細胞増殖の阻害

E / I <sup>10</sup> F n 3 ベースの結合剤は、増殖を E G F R シグナリングに依存する H 2 9 2 非小細胞肺癌細胞系、または増殖を I G F 1 R シグナリングに依存する R H 4 1 ユーイング肉腫細胞系において、抗増殖性活性について評価した。結合剤の抗増殖性活性は、C y Q u a n t N F 蛍光染色（カタログ# C 3 5 0 0 6、I n v i t r o g e n、C a r l s b a d、C A）を用いて細胞内 D N A を染色することによって単層培養において評価した。手短かに言えば、 $2 \times 10^3$  H 2 9 2 または  $5 \times 10^3$  R H 4 1 細胞は、10 m M H e p e s p H 7. 4 および 10 % ウシ胎児血清を含有する R P M I - 1 6 4 0 培 10  
養培地中、96 ウェルマイクロプレート（V i e w P l a t e s 96 F カタログ# 6 0 0 5 2 2 5、P e r k i n - E l m e r、W a l t h a m、M A）の中に播種し、37 °C、5 % C O <sub>2</sub> で 24 時間、接着させた。細胞は、対数増殖単層として維持され、アッセイの過程の間、コンフルエンスに達することなく、アッセイ期間中、対数増殖期にとどまった。播種から 24 時間後に、中規模物質の段階希釈液を追加し、細胞をさらに 72 時間インキュベートした。このインキュベーションの後に、細胞を C y Q u a n t N F 試薬を用いて処理し、37 °C で 1 時間、細胞内 D N A の中に色素を組み込ませた。全 D N A は、C y t o F l u o r 4 0 0 0 機器（A p p l i e d B i o s y s t e m s、F r a m i n g h a m、M A）で 485 nm の励起および 530 nm の放射で蛍光を読み取るこ 20  
とによって定量した。細胞を薬剤に曝露した全時間は 72 時間であった。アッセイの性能および再現性を確認するために、標準化合物を各実験に含ませた。試験化合物による阻害のパーセントの線形回帰分析は、I C <sub>50</sub> 値を決定するために使用した。

#### 【0290】

図7において示されるように、R H 4 1 細胞において、H i s タグつき E 1 - G S 1 0 - I 1 は、I G F R 結合剤、I 1（I C <sub>50</sub> = 0. 028 u M）と同程度の効力（I C <sub>50</sub> = 0. 009 u M）で増殖を阻害した。E G F R 結合剤、E 1 は、単独では、この細胞系における増殖に対してほとんど効果を有していなかった（I C <sub>50</sub> > 12. 5 u M）。

#### 【0291】

図8において示されるように、H 2 9 2 細胞において、H i s タグつき E 2 - G S 1 0 - I 1 は、I G F R 結合剤、I 1（I C <sub>50</sub> = 0. 699 u M）または E G F R 結合剤、E 2（I C <sub>50</sub> = 0. 553 u M）よりも大きな効力（I C <sub>50</sub> = 0. 329 u M）で増殖を阻害した。E 単量体および I 単量体についての I C <sub>50</sub> 値については、下記の表4を参照されたい。

#### 【0292】

##### 実施例10

競合的 E G F リガンド結合アッセイ

E / I 結合剤 E 1 - G S 1 0 - I 1、I 1 - G S 1 0 - E 1、E 2 - G S 1 0 - I 1、および I 1 - G S 1 0 - E 2（H T P P 物質）は、A 4 3 1 細胞において E G F リガンド結合細胞ベースの競合アッセイにおいて試験し、E G F R <sup>10</sup> F n 3 ベースの結合剤 E 1 および E 2（中規模物質）と比較した。A 4 3 1 細胞は、D M E M + 10 % F B S 中で 96 ウェルプレート中、15000 細胞／ウェルで播種し、48 時間インキュベートした。細胞は、飢餓培地（D M E M + 0. 1 % B S A）を用いて洗浄し、1 時間飢餓培地中でインキュベートした。飢餓培地を除去し、飢餓培地中で希釈した <sup>10</sup> F n 3 ベースの結合剤と交換し、細胞は、37 °C で 30 分間、プレインキュベートし、タンパク質が細胞表面上の E G F 受容体に結合することを可能にした。飢餓培地中で希釈した、10 n M 最終濃度のユウロピウム（E u）標識 E G F（P e r k i n E l m e r、B o s t o n、M A）をプレインキュベートした細胞に追加し、プレートは、暗中で 4 °C で 3 時間インキュベートした。プレートは、冷 P B S を用いて 2 回洗浄し、50 u l / ウェルの E n h a n c e m e n t 溶液（P e r k i n E l m e r、B o s t o n、M A）をプレートに追加し 50

、37℃で1時間インキュベートした。プレートは、Flexstation II (Molecular Devices) 上で読み取った。データは、Softmax plusソフトウェアを用いてプロットし、IC50値、つまり、Eu-EGFリガンドの50%を細胞表面上のEGF受容体に結合させないようにするのに必要とされる<sup>10</sup>Fn3ベースの結合剤の濃度を計算した。

#### 【0293】

E2-GS10-I1、I1-GS10-E2、E1-GS10-I1、およびI1-GS10-E1と比較したE2およびE1についての結果を表3に概説する。このデータは、E/I<sup>10</sup>Fn3ベースの結合剤が、EGFR<sup>10</sup>Fn3ベースの結合剤に類似する効力で、A431細胞上のEGFR受容体へのEGFの結合と競合し、それを阻害す

10

#### 【0294】

##### 【表4】

表3: A431細胞表面上のEGFRに対するEGF結合の阻害についてのIC50値の概要

| タンパク質      | IC50 (nM) |
|------------|-----------|
| E2         | 7         |
| E1         | 14        |
| E2-GS10-I1 | 1.8       |
| I1-GS10-E2 | 1.4       |
| E1-GS10-I1 | 14.6      |
| I1-GS10-E1 | 7         |

20

#### 【0295】

##### 実施例11

細胞ベースのアッセイにおける活性化およびシグナリング活性

様々なE/I<sup>10</sup>Fn3ベースの結合剤の標的効果を、イムノブロットングによってDiFi結腸癌細胞において評価した。細胞は、それぞれの25cm<sup>2</sup>フラスコ中に4×10<sup>5</sup>細胞で接種し、5%CO<sub>2</sub>中で37℃で一晩インキュベートした。翌日、処理を開始し、細胞は、1.5~120時間までの様々な時間、さらにインキュベートした。次いで、細胞は、HNTG (50mM Hepes、150mM NaCl、0.5% Triton-X-100、8%グリセロール、2mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>、1.5mM MgCl<sub>2</sub>、プロテアーゼ阻害剤AEBSFを含有する1mM EDTA、アプロチニン、ロイペプチン、ベスタチン、ペプスタチン-A、およびE64) 中で溶解し、総タンパク質量をBCAタンパク質アッセイを用いて定量した (Pierce、Waltham、MA)。全EGFR、全IGF1R、およびEGFR、MAPキナーゼタンパク質ERK1/2アイソフォームのリン酸化状態のレベルを、20マイクログラムの総タンパク質量のSDS-PAGE分析、その後続く、ニトロセルロースへのタンパク質の転写および特異的な抗体を用いるイムノブロットングによって検出した。プロットはまた、それぞれの試料の使用量が等しいことを示すためにβ-アクチンを用いてプローブした。

30

40

#### 【0296】

ペグ化E/I<sup>10</sup>Fn3ベースの結合剤E1-GS10-I1 (配列番号55)、E2-GS10-I1 (配列番号56)、およびE3-GS10-I1 (配列番号53)は、このアッセイにおいてEGFRを分解する能力を示した。さらに、E3-GS10-I1 (配列番号53)については、IGF1Rの分解もまた観察された。ペグ化結合剤E2-GS10-I1についてのEGFR分解に対する効果を、シグナリング分子に対する他の効果と同様に、図10に示す。さらに、結合剤E2-GS10-I1の非ペグ化バージョンは、類似するEGFR分解を示した (データ示さず)。図10は、ペグ化結合剤I1

50

－G S 1 0－E 2について、E G F R分解がなかったことを示す。下記の表4は、E単量体の様々な特性を概説する。

【0297】

【表5】

表4. E単量体の特性の概要

| EGFR |                       |                  |                      |                 |                   |
|------|-----------------------|------------------|----------------------|-----------------|-------------------|
| 単量体  | BIAcore<br>KD<br>IC50 | EGF結合の<br>中和IC50 | pEGFRの阻<br>害<br>IC50 | pERKの阻害<br>IC50 | H292増殖<br>の阻害IC50 |
| E1   | 14.6 nM               | 0.53 nM          | 18 nM                | 17 nM           | 18 nM             |
| E2   | 1.4 nM                | 1.46 nM          | 20 nM                | 40 nM           | 30 nM             |
| E3   | 0.72 nM               | 0.87 nM          | 11 nM                | 97 nM           | 26 nM             |

【0298】

#### 実施例12

ヌードマウスにおいて成長させたH292腫瘍異種移植片に対するある種のE/I<sup>10</sup>Fn3ベースの結合剤の評価

ペグ化E/I結合剤E2－G S 1 0－I 1およびE3－G S 1 0－I 1ならびにモノクローナル抗体パニツムマブを、H292腫瘍異種移植片モデルにおいて評価した。インビボモデルについては、パニツムマブは、市販の薬剤として得、E/I結合剤は上記に記載されるように精製した。すべてのE/I結合剤のインビトロ活性は、動物への投与前に、H292細胞におけるEGF刺激pEGFRアッセイおよびIGF1刺激pIGFRアッセイにおいて各末端の機能性を試験することによって、確認した。E/I結合剤は、実験の初めにリン酸緩衝生理食塩水（PBS）中で希釈し、それぞれの研究の期間、2～4℃で保存した。両方の化合物は、500μl／注射／マウスの全容量でi.p.投与し、投与前に室温に平衡化した。

【0299】

マウスおよび腫瘍増殖。5～6週齢のメス無胸腺（ヌード）マウスを、Harlan Sprague-Dawley Co.（Indianapolis, IN）から得、腫瘍増殖試験または薬剤効能試験にそれらを使用する前に約3週間隔離した。動物に飼料および水を適宜提供した。動物の世話は、AAALACおよびBristol-Myers Squibbのガイドラインに合わせて実行した。腫瘍は、ヌードマウスへの皮下（s.c.）移植によって増殖させた。腫瘍の継代は、約2～4週ごとに行った。

【0300】

インビボ抗腫瘍試験。推定腫瘍重量は、式：腫瘍重量（mg）＝（w<sup>2</sup>＊l）／2を使用して計算し、式中、w＝幅およびl＝mmでの長さとする。抗腫瘍活性は、腫瘍増殖阻害％（TGI）の点から評価し、＞50％のTGI％は、活性であると見なした。相対的腫瘍増殖阻害％はTGI％＝〔（C<sub>t</sub>－T<sub>t</sub>）／（C<sub>t</sub>－C<sub>0</sub>）〕＊100として計算し、式中、C<sub>t</sub>＝腫瘍移植後の日数の時間tでの対照マウスの中央腫瘍重量、T<sub>t</sub>＝時間tでの処理マウスの中央腫瘍重量、C<sub>0</sub>＝時間0での対照マウスの中央腫瘍重量とする。TGI％値は、1.5腫瘍量倍加時間の後に開始して様々な時点で計算し、可能な場合には3腫瘍量倍加時間（TVDT）の期間にわたって維持した。ここで、TVDT＝対照腫瘍が標的サイズに達する中央時間（日）－対照腫瘍が標的サイズの半分に達する中央時間（日）とする。治癒したマウスの定義は、処理後10TVDTを超えて評価した場合に、腫瘍が検出できなかった、または＜35mgであったマウスとした。最大の治療効果をもたらした化合物の用量は、最適用量（OD）と称した。薬剤毒性に起因する死亡が1匹を超えた処理群（典型的に8匹のマウス）は、過度に毒性の処理を受けたと見なし、それらのデータは抗腫瘍活性の評価において使用しなかった。最大耐用量（MTD）は、過度の毒性（つまり1匹を超える死亡）が生じた直下の用量レベルとして定義する。腫瘍が標的サ

イズに達する前に死にかけている処理マウスは、薬剤毒性で死亡したと見なした。データの統計評価は、G e h a n の一般化ウイルコクソン検定を使用して実行した (Gehan, EA, A Generalized Wilcoxon Test for Comparing Arbitrarily Slightly-Censored Samples, Biometrika 52:203-223, 1965)。

#### 【0301】

腫瘍における薬力学的エンドポイントの測定。腫瘍は、未処理マウスまたは薬剤処理マウスから採取し、液体窒素中でスナップ凍結した。試料を量り、1 mg の組織について 10  $\mu$  l の溶解緩衝液 (50 mM H e p e s、150 mM N a C l、0.5% t r i t o n-X-100、8%グリセロール、2 mM N a<sub>3</sub> V O<sub>4</sub>、1.5 mM M g C l<sub>2</sub>、15 ml 緩衝液当たり完全ミニプロテアーゼ阻害剤タブレット S i g m a # S 8 8 2 0 およびホスファターゼ阻害剤カクテル S i g m a # P 5 7 2 6 を含有する 1 mM E D T A) 中でホモジナイズした。組織は、2本のメスを用いて 100 mm ペトリ皿中で分割し、F a l c o n # 2 0 5 9 ポリプロピレン丸底チューブに移し、30秒間、手持ち型ホモジナイザーを用いてばらした。ホモジネートは、1.5 ml エッペンドルフチューブに移し、微量遠心管中で2分間 15000 x g で遠心分離した。清澄化した上清を、新しいチューブに移し、総タンパク質量濃度は、P i e r c e B C A タンパク質アッセイを用いて決定した (P i e r c e B i o t e c h n o l o g y)。試料は、イムノブロットイングによって、または M e s o s c a l e M S D S e c t o r I m a g e r 6000 マルチスポットアッセイシステム (M e s o S c a l e D i s c o v e r y、G a i t h e r s b u r g、MD) においてメーカーによって推奨されるように分析した。

#### 【0302】

ペグ化 E/I 結合剤 E 2-G S 1 0-I 1 および E 3-G S 1 0-I 1 は、無胸腺マウスにおける H 2 9 2 N S C L C において試験した。腫瘍は、1 mm<sup>3</sup> H 2 9 2 腫瘍断片を用いて後方の側腹部中に皮下移植し、腫瘍移植後の6日目に処理を開始する前に 50 ~ 150 mg のサイズまで確立させた。ペグ化 E/I 結合剤は、抗腫瘍活性を評価するために T I W X 3 スケジュールに基づいて 100 mg/kg の用量で i. p. 投与した。パニツムマブは市販の薬剤として得、Q 3 D X 5 スケジュールに基づいて 1 mg/マウスの最適用量およびより低用量の 0.1 mg/マウスで i. p. 投与した。8匹のマウスの群から計算した平均腫瘍サイズを図 12 A に示す。パニツムマブの 1 mg/マウスおよび 0.1 mg/マウスの用量は、両方とも、それぞれ 101% および 100% の値を有する T G I % によって活性となり、これらの値は、対照動物とは有意に異なった (p = 0.0002、表 5)。ペグ化 E 2-G S 1 0-I 1 もまた、96% (p = 0.0005) の値を有する T G I % によって有意に活性となった。ペグ化 E 3-G S 1 0-I 1 は、対照群とは統計的に異ならない 31% の T G I % 値を有し、本研究において活性とならなかった (p = 0.416)。投薬後分析は、約 3 分の 2 のペグ化 E 3-G S 1 0-I 1 が凝集したことを示し (あるバッチについては 66.64% 凝集/33.36% 単量体および他のバッチについては 72.53% 凝集/27.47% 単量体)、これは、このアッセイにおけるペグ化 E 3-G S 1 0-I 1 の不十分な活性を説明することができた。対照的に、ペグ化 E 2-G S 1 0-I 1 は、投薬後研究においてわずかな百分率の凝集のみを示した (1.79% 凝集/98.21% 単量体)。

#### 【0303】

処理はすべて、研究の経過にわたって処理に関連する死亡または過度の体重減少はなく、十分に耐性であった。臨床観察は、毒性の証拠を示さず、治療過程にわたる平均体重変化は許容できる範囲内にあった (図 12 B)。

#### 【0304】

## 【表 6】

表5. H292ヒト腫瘍異種移植片研究の結果

| 群 | 化合物                    | スケジュー<br>ル、ルー<br>ト          | 用量<br>(mg/kg) | 平均体<br>重変化<br>(g) | %TGI | TGI%に<br>ついての<br>p値 | TGI%<br>によ<br>る結<br>果 |
|---|------------------------|-----------------------------|---------------|-------------------|------|---------------------|-----------------------|
| 1 | 対照<br>(未処理)            | ---                         | ---           | 5.3               | ---  | 1.0                 | ---                   |
| 2 | パニツム<br>マブ             | q3dx5;<br>6 ip <sup>a</sup> | 1mg/マウス       | 9.6               | 101  | 0.0002              | A                     |
| 3 | パニツム<br>マブ             | q3dx5;<br>6 ip <sup>a</sup> | 0.1mg/マウス     | 6.3               | 100  | 0.0002              | A                     |
| 4 | E2-GS10-I1<br>(w/ PEG) | TIWx3;<br>6 ip <sup>a</sup> | 100           | -0.1              | 94   | 0.0005              | A                     |
| 5 | E3-GS10-I1<br>(w/ PEG) | TIWx3;<br>6 ip <sup>a</sup> | 100           | 9.5               | 28   | 0.416               | I                     |

<sup>a</sup>ビヒクルはリン酸緩衝生理食塩水とした。使用される略語は以下のとおりとする:ip、腹腔内ルート;TGI%、 $TGI\% = [(C_t - T_t) / (C_t - C_0)] \times 100$ として計算した相対的腫瘍増殖阻害%、式中、 $C_t$ =腫瘍移植後の日数の時間tでの対照マウスの中央腫瘍重量、 $T_t$ =時間tでの処理マウスの中央腫瘍重量、 $C_0$ =時間0での対照マウスの中央腫瘍重量とする。TGI%値は、12日目および20日目の平均阻害として2つの時点で計算した。結果、>50%の統計的に有意なTGI%値をもたらした場合、処理レジメンは、活性であると見なした;q3dx5;6、化合物は腫瘍移植後の6日目にスタートして5回の服用について3日ごとに投与した;TIWx3;6、化合物は、腫瘍移植後の6日目にスタートして3週間、1週当たり3回投与した。p値は、群当たり8つの測定値を用いる両側対応検定 (two tailed paired analysis) において対照群に比べて20日目に計算した。TGI%による結果、A=活性およびI=不活性。

## 【0305】

H292腫瘍研究からの薬力学的エンドポイント。未処理対照群、パニツムマブ処理群、およびE/I結合剤処理群由来の腫瘍の試料は、標的抑制を示すであろうリン酸化EGFR、Erbb2、およびIGFRのレベルについて分析した。腫瘍はまた、EGF受容体分解が生じたかどうかを決定するために、全EGFRのレベルについて分析した。20日目に、最終処理を施し、腫瘍は、投薬の1時間後に2匹の動物、投薬の4時間後に3匹の動物、および投薬の24時間後に3匹の動物から摘出した。すべての処理は、リン酸化EGFRおよびErbb2の著しい抑制を示したが、リン酸化IGFRの基本レベルが低すぎたので、本研究において差異を識別することができなかった(図13)。すべての処理は、全EGFRの量の低下を示し、受容体の分解が生じたことを示した。

## 【0306】

## 実施例13

IGF1R阻害剤に対して抵抗性のMCF7細胞の選択および特徴づけ

MCF7細胞(American Type Culture Collection、カタログ番号HTB-22、Manassas、VA)は、5%CO<sub>2</sub>の存在下において、37℃で、10mM hepesおよび10%FBSを含有するRPMI培地中で培養した。小分子IGF1R阻害剤BMS-754807を培養培地に追加し、細胞が、200mM BMS-754807の存在下において継続的な増殖を示すまで、濃度は、10か月の期間にわたって段階的な増分で増加させた。抵抗性細胞は、MCF7rと呼び、

BMS-754807についてのIC50は、以前に記載されるように(Carboni et al., Cancer Res. 69: 161-170 (2009)) 実行した増殖アッセイにおいて測定された場合、親MCF7細胞についての120 nMと比較して、1239 nMであった。次いで、該薬剤を培養培地から除去し、残存性のBMS-754807をすべて除去するために、MCF7 r細胞をさらに20日または60日間、完全培地中で継代した。イムノブロッティングによるMCF7 r細胞の分析により、EGFRが、親MCF7細胞と比較して、抵抗性細胞中で有意に過剰表現されることが明らかにされた(図14)。さらに、MCF7細胞およびMCF7 r細胞を血清欠乏にさせ、次いで、7分間、EGFを用いて刺激した場合、リン酸化EGFRは、親MCF7細胞において検出することができなかったが(おそらく低いレベルのEGFRにより)、MCF7 r細胞において強く可視的であった。IGFリガンドを用いて刺激した、血清を欠乏させた細胞において、リン酸化IGFRは、親MCF7細胞において見られたが、MCF7 r細胞中に存在するわずかに高いレベルの全IGFRにもかかわらず、pIGFRはほとんど観察されなかった。これは、抵抗性MCF7 r細胞におけるIGFRがIGF1刺激に応じてIGFRを活性化する能力を失ったことを示す(図14)。EGF刺激に応じたMAPキナーゼ経路の活性化は、pERK活性化によって測定されるようにMCF7 r細胞においてより強かった。

#### 【0307】

##### 実施例14

MCF7異種移植片およびMCF7 r異種移植片における抗腫瘍研究

MCF7 r細胞は、T75フラスコ中で増大させ、遠心分離によって単離した。生存細胞数は、Vi-CELL XR(Beckman Coulter、Fullerton、CA)を用いてトリパンプルー排除法によって測定し、 $5 \times 10^6$  生存細胞/mlまでPBS中に再懸濁し、0.2 mlの容量で無胸腺マウスの後方の側腹部中に皮下移植した。MCF7腫瘍増殖およびMCF7 r腫瘍増殖のために、すべてのマウスに、17- $\beta$ -エストラジオール(Innovative Research of America、Sarasota、FL、カタログ番号NE-121)の0.25 mgの90日間放出ペレットを補足した。腫瘍は、それらを切除した場合に500~1000 mgの中央サイズに達するまで増殖させ、1 mm<sup>3</sup> 断片を新しい無胸腺マウスの後方の側腹部中に再移植した。腫瘍は、腫瘍量倍加時間および生着率をそれぞれの継代についてモニターした少なくとも4ラウンドの増殖を通して、マウスにおける連続的のトロッカー継代(serial trocar passage)によって固形腫瘍増殖に適合させた。増殖特徴は、異種移植片が信頼できる再生可能なモデルとして役立つのに許容できる特性を示すかどうかを決定するために観察された。MCF7 r腫瘍型は、許容できる生着率および倍加時間を示し、そのため、異種移植片モデルとしての使用のための基準を満たした。MCF7親腫瘍モデルは、同じ技術を使用して、以前に確立された。MCF7親異種移植片については、1 mm<sup>3</sup> 腫瘍断片を、後方の側腹部中に皮下移植し、腫瘍移植後13日目の処理の開始前に、50~150 mgのサイズまで確立させた。セツキシマブは市販の薬剤として得、Q3DX5スケジュールに基づいて1 mg/マウスのその最適用量および低用量の0.1 mg/マウスでi. p. 投与した(13、16、19、22、25日目に用量を投与)。8匹のマウスの群から計算した平均腫瘍サイズを図15Aに示す。MCF7異種移植片モデルにおいて、セツキシマブの1 mg/マウスまたは0.1 mg/マウスの用量のいずれも、それぞれ-9%および3.2%の値を有するTGI%によって活性とならず、腫瘍サイズは、対照群とは統計的に異なっていなかった(表6)。

#### 【0308】

MCF7 r抵抗性異種移植片については、1 mm<sup>3</sup> 腫瘍断片を、後方の側腹部中に皮下移植し、腫瘍移植後の6日目に処理を開始する前に50~150 mgのサイズまで確立させた。セツキシマブは市販の薬剤として得、Q3DX5スケジュールに基づいて1 mg/マウスのその最適用量および低用量の0.1 mg/マウスでi. p. 投与した(6、9、12、15、18日目に用量を投与)。8匹のマウスの群から計算した平均腫瘍サイズを図15Bに示す。MCF7 r異種移植片モデルにおいて、セツキシマブの用量は、それぞ

れ105%および75%の値を有するTGI%によって活性となった。高用量のセツキシマブは、100%を超えるTGI値を有し、これは、処理の開始時のスタートサイズ未満まで腫瘍退縮を引き起こしたことを示す。両方の用量は、対照群と比較して、腫瘍サイズにおける統計的有意差をもたらした(表7)。

【0309】

【表7】

表6. MCF7ヒト乳癌腫瘍異種移植片研究の結果

| 群 | 化合物     | スケジュール、ルート                   | 用量(mg/マウス) | %TGI | TGI%についてのp値 | TGI%による結果 |
|---|---------|------------------------------|------------|------|-------------|-----------|
| 1 | 対照(未処理) | ---                          | ---        | ---  | 1.0         | ---       |
| 2 | セツキシマブ  | q3dx5;<br>13 ip <sup>a</sup> | 1mg/マウス    | -9   | 0.223       | I         |
| 3 | セツキシマブ  | q3dx5;<br>13 ip <sup>a</sup> | 0.1mg/マウス  | 3.2  | 0.220       | I         |

10

<sup>a</sup>ビヒクルはリン酸緩衝生理食塩水とした。使用される略語は以下のとおりとする:ip、腹腔内ルート;TGI%、 $TGI\% = [(C_t - T_t) / (C_t C_0)] \times 100$ として計算した相対的腫瘍増殖阻害%、式中、 $C_t$ =腫瘍移植後の日数の時間tでの対照マウスの中央腫瘍重量、 $T_t$ =時間tでの処理マウスの中央腫瘍重量、 $C_0$ =時間0での対照マウスの中央腫瘍重量とする。TGI%値は、20、24、および27日目の平均阻害として3つの時点で計算した。結果、>50%の統計的に有意なTGI%値をもたらした場合、処理レジメンは、活性であると見なした;q3dx5;13、化合物は腫瘍移植後の13日目にスタートして6回の服用について3日ごとに投与した;p値は、群当たり8つの測定値を用いる両側対応検定において対照群に比べて24日目に計算した。TGI%による結果、A=活性およびI=不活性。

【0310】

【表8】

表7. MCF7rヒト乳癌腫瘍異種移植片研究の結果

| 群 | 化合物     | スケジュール、ルート                  | 用量(mg/kg) | %TGI | TGI%についてのp値 | TGI%による結果 |
|---|---------|-----------------------------|-----------|------|-------------|-----------|
| 1 | 対照(未処理) | ---                         | ---       | ---  | 1.0         | ---       |
| 2 | セツキシマブ  | q3dx5;<br>6 ip <sup>a</sup> | 1mg/マウス   | 105  | 0.001       | A         |
| 3 | セツキシマブ  | q3dx5;<br>6 ip <sup>a</sup> | 0.1mg/マウス | 75   | 0.024       | A         |

20

30

表6の脚注を参照されたい。p値は、群当たり8つの測定値を用いる両側対応検定において対照群に比べて19日目に計算した。

【0311】

実施例15

GEO異種移植片における抗腫瘍研究

GEO腫瘍は、無胸腺マウスの後方の側腹部中に1mm<sup>3</sup>腫瘍断片を皮下移植すること

40

50

によって確立し、腫瘍移植後18日目の処理の開始前に、50～150mgのサイズまで達することを可能にした。セツキシマブは、Q3DX5スケジュールに基づいて0.25mg/マウスでip投与した(18、21、24、27、30日目に用量を投与した)。IGFRキナーゼ阻害剤BMS-754807は、QDX21スケジュールに基づいて25mg/kgで投与した。8匹のマウスの群から計算した平均腫瘍サイズを図16に示す。セツキシマブは、67%のTGI%値を有する0.25mg/マウスで活性となった。BMS-754807は、80%のTGI%により活性となり、2つの組合せは、94%のTGI%により、どちらかの作用物質のみよりも、相当に活性となった(表8)。すべての処理群は、26日目に対照群とは統計的に異なっていた(表8)。

【0312】

【表9】

表8. GEOヒト結腸癌腫瘍異種移植片研究の結果

| 群 | セツキシマブ                 |            | BMS-754807            |           | %TGI | p値  | TGI%による結果 | 相乗効果 |
|---|------------------------|------------|-----------------------|-----------|------|-----|-----------|------|
|   | スケジュール、ルート             | 用量(mg/マウス) | スケジュール、ルート            | 用量(mg/kg) |      |     |           |      |
| 1 | 対照(未処理)                | ---        | ---                   | ---       | ---  | --- | ---       | ---  |
| 2 | q3dx5;6ip <sup>a</sup> | 0.25mg/マウス | ---                   | ---       | 80   | --- | A         | ---  |
| 3 | ---                    | ---        | qdx21;18 <sub>b</sub> | 25        | 67   | --- | A         | ---  |
| 4 | q3dx5;6ip <sup>a</sup> | 0.25mg/マウス | qdx21;18 <sub>b</sub> | 25        | 94   | --- | A         | あり   |

<sup>a</sup>セツキシマブのためのビヒクルは、リン酸緩衝生理食塩水とした。BMS-754807のためのビヒクルは、50%ポリエチレングリコール400、50%水とした。使用する略語は、表6において記載されるとおりとし、相乗効果は、それ自体、示される組合せにおいて、どちらかの作用物質よりもよい、統計的に有意な活性として定義される。TGI%による結果、A=活性およびI=不活性。

【0313】

実施例16

H292異種移植片における抗腫瘍研究

H292細胞は、1mm<sup>3</sup>断片として無胸腺マウスの後方の側腹部中に皮下移植し、腫瘍移植後の12日目に処理を開始する前に50～150mgのサイズまで確立させた。セツキシマブは、Q3DX5スケジュールに基づいて0.1mg/マウスでip投与した。MAB391は、IGF1Rに対する抗体(R&D Systems、Minneapolis、MN、カタログ番号MAB391)であり、BIWX3スケジュールに基づいて40mg/kgの用量で投与した。8匹のマウスの群から計算した平均腫瘍サイズを図17に示す。セツキシマブは、95.1%のTGI%値により0.1mg/マウスで活性となり、MAB391は、10.5%のTGI%値により40mg/kgで不活性となった(表9)。セツキシマブおよびMAB391の組合せを投与したマウスは、109.2%のTGI%値を示し、組合せの群において腫瘍退縮を示した(表9)。投与を停止した後、腫瘍は、セツキシマブおよびMAB391の組合せにより処理された群におけるよりも、セツキシマブ処理群においてより急速に再増殖した(図17)。

【0314】

【表10】

表9. H292ヒトNSCLC腫瘍異種移植片研究の結果

| 群 | セツキシマブ                   |             | MAB391                |            |       |     |           |      |
|---|--------------------------|-------------|-----------------------|------------|-------|-----|-----------|------|
|   | スケジュール、ルート               | 用量 (mg/マウス) | スケジュール、ルート            | 用量 (mg/kg) | %TGI  | p値  | TGI%による結果 | 相乗効果 |
| 1 | 対照(未処理)                  | ---         | ---                   | ---        | ---   | --- | ---       | ---  |
| 2 | q3dx5;12 ip <sup>a</sup> | 0.1 mg/マウス  | ---                   | ---        | 95.1  |     | A         | ---  |
| 3 | ---                      | ---         | BIWx3;12 <sup>a</sup> | 40         | 10.5  |     | I         | ---  |
| 4 | q3dx5;12 ip <sup>a</sup> | 0.1 mg/マウス  | BIWx3;12 <sup>a</sup> | 40         | 109.2 |     | A         | あり   |

<sup>a</sup>セツキシマブおよびMAB391のためのビヒクルは、リン酸緩衝生理食塩水とした。使用する略語は、表6および8において記載されるとおりとする。

【0315】

実施例17

コロニー形成アッセイ

H292細胞のコロニー形成を阻害するための能力に対する試験化合物の効果を決定するために、400の細胞を、完全培地中、24ウェルプレート（Becton-Dickinson、Franklin Lakes、NJ、カタログ番号351143）の中に接種し、一晩、接着させた。翌日、培地を除去し、2%FBSを含有する培地と交換した。試験化合物は、2%FBSを含有する培地の中に希釈し、段階希釈において細胞に加えた。細胞は、14日間、37℃でインキュベートした。14日後に、培地を廃棄し、ウェルを2ml PBSを用いて1回すすいだ。細胞は、20分間、0.5ml クーマシー染色溶液（Bio-Rad、Hercules、CA、カタログ番号161-0436）を用いて染色した。染色液は吸引し、ウェルは、1×脱染溶液クーマシーR-250（Bio-Rad、カタログ番号161-0438）を用いて素速く洗浄した。ウェル当たり1mlの水を用いる最終のすすぎを実行し、プレートを逆さにし、乾した。（少なくとも）50以上の細胞から成るコロニーは、低拡大倍率（10×～20×）下で目によってカウントした。すべての試料は、3連で試験し、IC50値は、対照の阻害パーセントの線形回帰から計算した。ペグ化E/I結合剤についての代表的な結果を図18に示し、様々なE/I<sup>10</sup>Fn3ベースの結合剤、単一特異的IGF1R<sup>10</sup>Fn3ベースの結合剤、およびEGFR抗体についてのIC50値を表10に示す。

【0316】

## 【表 1 1】

表10. コロニー形成アッセイにおける様々なE/I<sup>10</sup>Fn3ベースの結合剤、単一特異的IGF1R<sup>10</sup>Fn3ベースの結合剤、およびEGFR抗体のIC<sub>50</sub>値

| 試料                   | IC50 (nM) |
|----------------------|-----------|
| E4-GS10-I1 (Pegを有する) | 5         |
| I1-GS10-E5 (Pegを有する) | 1         |
| I1-GS10-E4           | 6         |
| E2-GS10-I1 (Pegを有する) | 560       |
| I1単量体(Pegを有する)       | 15,510    |
| パニツムマブ               | 140       |

10

## 【0317】

## 実施例 18

## エピトープマッピングアッセイ

20

エピトープマッピングアッセイは、EGFR細胞外ドメイン上の結合部位が様々な文献の報告によっておおよそ知られている市販の抗体を利用して開発された。このアッセイにおいて使用する抗体は、表11に挙げ、図19Aは、抗体がEGFR上のおよその結合ドメインにどのように局在化するかを示す。アッセイは、以前に記載したIn Cell

Westernアッセイの変形であり、EGFRを発現するA431細胞または他の細胞と共にプレインキュベートしたEGFR<sup>10</sup>Fn3ベースの結合剤の、表11に挙げたパネル由来の検出抗体の結合を遮断する能力を評価する。アッセイは、以下のように実行した：対数増殖のA431細胞をトリプシン処理によって採取し、100μl/ウェルの全容量において、24,000細胞/ウェルで96ウェルプレート中に接種した。翌日、培地を捨て、冷DMEMベースの培地中で希釈したEGFR<sup>10</sup>Fn3ベースの結合剤をプレートに追加し、EGFRのインターナライゼーション (internalization) を予防するために4℃で1時間、結合させた。結合後、細胞は、0.2ml PBS+0.1% Tween-20を用いて洗浄し、室温でPBS+3.7%ホルムアルデヒド中で20分間、固定した。細胞は、室温で1時間、0.2mlのOdysseyブロッキング緩衝液中でブロックした。次に、一次抗体を、ウェル当たり50μlのOdysseyブロッカー中で希釈し、室温で1~2時間インキュベートした。一次抗体は、プレートを逆にするによって捨て、それぞれのウェルは、200μlのPBS+0.1% tween-20を用いて3×洗浄した。二次抗体は、In Cell Westernアッセイにおいて使用した同じ二次抗体とし、検出している抗体の種類に適切であった。これらの二次抗体は、Odysseyブロッカー+0.2% Tween-20中で希釈し (1

30

40

。

50

【0318】

【表12】

表11. EGFRの細胞外ドメインに対する市販の抗体

|    | クロー<br>ーン | 供給者および<br>カタログ#                                      | 種類       | 結合           | エピトープ                                                 | 結合モ<br>チーフ |
|----|-----------|------------------------------------------------------|----------|--------------|-------------------------------------------------------|------------|
| 1  |           | Abcam ab38165                                        | Rab      | h            | ペプチドAA 42-58                                          | 線状         |
| 2  | E234      | Abcam ab32198                                        | Rab      | h、mu、<br>rat | ペプチドAA 40-80 (No ICC)                                 | 線状         |
| 3  | N-20      | Santa Cruz#31155                                     | ヤギIgG    | h            | AA 110-160                                            | 線状         |
| 4  | ICR10     | Abcam ab231<br>Santa Cruz #57095                     | ラットIgG2a | h(HN5)       | AA 124-176 <sup>b</sup> 、中和 <sup>e</sup>              | conf       |
| 5  | EGFR1     | Abcam ab30<br>Chemicon MA B88910<br>Labvision MS-311 | Mu IgG1  | h(A431)      | AA 176-294、中和 <sup>b</sup><br>ab30&MAB88910@(1 mg/ml) | conf       |
| 6  | 199.12    | Labvision MS-396-P                                   | Mu IgG2a | h            | AA 124-176、非中和 <sup>b</sup>                           | conf       |
| 7  | LA22      | Upstate 05-104                                       | Mu IgG2a | h(A431)      | AA 351-364、中和 <sup>a</sup>                            | 線状         |
| 8  |           | Abcam ab15669                                        | Rab      | Mu、rat       | ペプチドAA376-394 <sup>d</sup>                            | 線状         |
| 9  | 225       | Sigma E2156<br>Labvision MS-269-P                    | Mu IgG1  | h(A431)      | AA 294-475、中和 <sup>b、c</sup>                          | conf       |
| 10 | 528       | Abcam ab3103<br>Santa Cruz#120<br>Labvision MS-268-P | Mu IgG2a | h(A431)      | AA 294-475、中和 <sup>b、c</sup>                          | conf       |
| 11 | B1D8      | Labvision MS-666-P                                   | Mu IgG2a | h(A431)      | AA 294-475 <sup>b</sup>                               | conf       |
| 12 | LA1       | Upstate 05-101                                       | Mu IgG1  | h            | 中和                                                    |            |
| 13 | H11       | Labvision MS-316-P                                   | Mu IgG1  | h            | AA 294-475、非中和 <sup>b</sup>                           | 線状         |
| 14 | 111.6     | Labvision MS-378-P<br>Imgenex IMG-80179              | Mu IgG1  | h            | AA 294-475、中和 <sup>b</sup>                            | 線状         |
| 15 | 29.1      | Sigma E2760<br>Abcam ab10414                         | Mu IgG1  | h(A431)      | 外部炭水化物非中和                                             |            |

略語:conf:高次構造的に特異的なエピトープ;線状:高次構造と無関係のエピトープ。<sup>a</sup>JBC 264(1989)17469 Ala351-Asp364、<sup>b</sup>J Immunological Methods 287(2004)147、<sup>c</sup>Mol Biol

10

20

30

40

50

Med1(1983)511、<sup>d</sup>マウスEGFR[FKGDSFTRTPPLDPRELEI(配列番号491)]に対するペプチドに対して産生される、<sup>e</sup>Int J Oncol 4(1994)277。<sup>f</sup>[EEKKVCQGTSNKLTQLGTFEDHFLSLQRMFNCEVVLGNLEITYVQRNYDLSFLKTIQEVAGYVLIALNTVERIPLNLQIIRGNMYYENSYALAVLSNY(配列番号492)]、<sup>g</sup>Ile-Gln-Cys-Ala-His-Tyr-Ile-Asp-Gly-Pro-His-Cys(配列番号493)(アミノ酸580~591)。<sup>h</sup>Cancer Cell 7(2005)301。

### 【0319】

様々なアプローチを使用して、発明者らは、EGFR単量体E3がEGFRのドメインIに結合することを確認した。他のE単量体が様々な実験において類似する特性を有するので、他のE単量体もまた、EGFRのドメインIに結合すると考えられる。

### 【0320】

#### 実施例19

##### I単量体の特性

可溶性フィブロネクチンベースのスキファールドタンパク質のBIAcore分析

標的に結合するI単量体の反応速度は、BIAcore 2000または3000バイオセンサー(Pharmacia Biosensor)を使用して測定した。捕獲アッセイは、IGF-IR-Fc融合体を利用して開発した。類似する試薬は、Forbesらによって記載されている(Forbes et al. 2002, European J. Biochemistry, 269, 961-968)。ヒトIGF-IR(アミノ酸1~932)の細胞外ドメインは、ヒトIgG1のヒンジおよび定常領域を含有する哺乳動物発現ベクターの中にクローニングした。プラスミドの一時的なトランスフェクションにより融合タンパク質、IGF-IR-Fcを生産し、これを、続いて、プロテインAクロマトグラフィーによって精製し、アミンカップリングによってBiasensor CM5チップ上に固定したプロテインA上に捕捉した。動態分析は、プロテインA上でのIGF-IR-Fcの捕獲、その後続く、溶液中のフィブロネクチンベースのスキファールドタンパク質の注入およびグリシンpH2.0によるプロテインA表面の再生を含んだ。センサーグラムは、それぞれの濃度で得、速度定数 $k_a$ ( $k_{on}$ )および $k_d$ ( $k_{off}$ )を決定するために、プログラムBiaevaluation、BIA Evaluation 2.0(BIAcore)を使用して評価した。解離定数( $K_D$ )は、速度定数 $k_{off}/k_{on}$ の比から計算した。典型的に、精製フィブロネクチンベースのスキファールドタンパク質の濃度系列(2uM~0uM)は、プロテインAに捕捉されたヒトIGF-IR-Fc融合タンパク質への結合について評価した。

### 【0321】

ヒトインスリン受容体への結合を決定する実験のために、組換えヒトインスリン受容体(IR)および組換えヒトVEGF-R2-Fcは、Biacore(Uppsala, Sweden)によって推奨される標準の手順に従って、アミン基結合によってCM5 Biasensorチップに直接結合した。手短かに言えば、フローセル2および3上に、アセテート4.5中で希釈した60ug/mLのIRを、8300RUのレベルまで結合/固定し、アセテート5.0中で希釈した11.9ug/mLのVEGF-R2-Fcを、9700RUのレベルまで固定した。ブランク参照表面はFC1上で調製した。IRまたはVEGF-R2-Fcへの特異的な結合は、ブランク参照フローセル1に対して観察された結合を差し引くことによって計算した。フィブロネクチンベースのスキファールドタンパク質は、HBS-EP(10mM Hepes, 150mM NaCl, 3mM EDTA, 0.05% Surfactant P20)中で10uMまで希釈し、25℃で、フローセルに対して3分間、20uL/分で注入し、解離を10分間、観察した。

### 【0322】

#### 細胞ベースの受容体遮断アッセイ

ヒト乳がんMCF-7(ATCC, Manassas, VA)は、10%ウシ胎児血清(Hyclone, Logan, UT)を含有するRPMI 1640(Invitrogen, Carlsbad, CA)中、ウェル当たり50,000細胞の濃度で24ウェ

10

20

30

40

50

ルプレートに播種した。翌日、細胞は、0.1% BSA (Sigma, St. Louis, MO) を含有する RPMI 1640 から成る結合緩衝液中で洗浄し、次いで、IGF-IR 拮抗剤を含有する 200  $\mu$ L 結合緩衝液において氷上で30分間、プレインキュベートした。プレインキュベーション期間の後に、約 60000 カウント毎分に等しい 40 pM [ $^{125}$ I] IGF-I (Perkin Elmer, Wellesley, MA) をそれぞれのウェルに追加し、緩やかに攪拌しながら氷上でさらに3時間インキュベートした。次いで、ウェルは、0.1% BSA を含有する氷冷 PBS を用いて洗浄した。細胞は、0.1% SDS + 0.5 N NaOH から成る 500  $\mu$ L 緩衝液を用いて溶解した。溶解物の放射能は、Wallac 1470 Gamma Counter (Perkin Elmer, Wellesley, MA) を使用して測定し、データは、Sigma Plot (Systat Software, Point Richmond, CA) を使用して分析した。

### 【0323】

#### pIGFR アッセイ

Fc に融合されたフィブロネクチンベースのスクャフォールドタンパク質は、Rh41 ヒト横紋筋肉腫細胞における IGF-1R リン酸化を阻害する能力について評価された。ウェスタンブロットは、I 単量体が Rh41 ヒト横紋筋肉腫細胞において IGF-1R リン酸化を阻害する能力を評価するために用いた。細胞は、IGF-I、IGF-II、インスリンリガンド (50 ng/ml) を用いて刺激し、または無刺激 (NS) とし、次いで、様々な濃度の I 単量体を用いて処理した。膜は、リン酸特異的抗体を用いてプローブした。

### 【0324】

Rh41 における細胞の増殖 (ヒト横紋筋肉腫および H929 ヒト多発性骨髄腫)

増殖は、試薬に対する 72 時間の曝露の後の DNA の中への [ $^3$ H] -チミジンの取り込みによって評価した。Rh41 細胞は、96 ウェルマイクロタイタープレート中、3500 細胞/ウェルの密度で播種し、24 時間後、それらを一連の I 単量体濃度に対して曝露した。37  $^{\circ}$ C でのインキュベーションの 72 時間後、細胞は、3 時間、4  $\mu$ Ci/ml [ $^3$ H] チミジン (Amersham Pharmacia Biotech, UK) を用いてパルスし、トリプシン処理し、UniFilter-96、GF/B プレート (Perkin Elmer, Boston, MA) 上に採取し、シンチレーションは、Top Count NXT (Packard, CT) 上で測定した。結果は、未処理対照細胞の細胞増殖に対して 50% 細胞増殖を阻害するために必要とされる薬剤濃度である IC50 として表現する。データは、示される標準偏差と共に、3 連のウェルの平均を表わす。

### 【0325】

I 単量体の特徴づけの結果は、下記の表 12 中に示す。

### 【0326】

#### 【表 13】

表 12. I 単量体の特性

| IGFR |                       |                       |                       |                        |
|------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|------------------------|
| 単量体  | BIAcore<br>KD<br>IC50 | IGF 結合の<br>中和<br>IC50 | pIGFR の阻<br>害<br>IC50 | RH41 増殖の<br>阻害<br>IC50 |
| I1   | 0.11 nM               | 8 nM                  | 0.2 nM                | 28 nM                  |

### 【0327】

#### 実施例 20

単一特異的および二重特異性 EGFR および IGF-IR の  $^{10}$ Fn3 ベースの結合剤のさらなる特徴

EGFR または IGF-IR を結合した  $^{10}$ Fn3 ベースの結合剤を、タンパク質がそ

10

20

30

40

50

のコード核酸配列に共有結合されるmRNAディスプレイの生化学的な選択技術を使用して同定した。受容体が1～10 nMの濃度で提示される場合にIGF-IRまたはEGFRを結合する<sup>10</sup>F n 3ベースのタンパク質-mRNA融合体の集団を、大腸菌の中にクロニングし、<sup>10</sup>F n 3ベースのタンパク質として発現させた。EGFRまたはIGF-IRシグナリングを遮断し、適した生物物理的特性を有した標的結合剤のサブセットを同定した(表13)。これらの最初のクローンは、標的結合親和性、およびますます低い標的濃度でのさらなるmRNAの選択を有する細胞の効力、およびより低い解離速度定数の選択について最適化した。選択手順の間に得られたIC<sub>50</sub>値は、9～304 nMの範囲であり、二重特異性<sup>10</sup>F n 3ベースの結合剤の構築のために広範囲の効力の値から分子を選ぶ機会があることを示す。EGFR<sup>10</sup>F n 3ベースの結合剤は、EGFRおよびERK、EGFR活性化の下流シグナリング分子のリン酸化の遮断についてIn Cell Westernスクリーニングアッセイによって試験した(方法は実施例1に類似)。類似している研究を最適化IGF-IR結合剤で実行した。最適化EGFR結合クローン(E3、E1、およびE2)は、インビトロにおいてp42/p44のY1068上でのEGFRリン酸化およびY204上でのERKの下流のリン酸化を阻害し、IC<sub>50</sub>値は9～40 nMの範囲であり、効力は、親EGFRクローンよりも100倍以上高かった(表13、方法は実施例1に類似)。

#### 【0328】

I1は、0.11 nMのK<sub>D</sub>値でIGF-IRに結合し、0.2 nMのIC<sub>50</sub>でIGF-IR刺激IGF-IRリン酸化を阻害した(表13、方法は実施例6に類似)。最適化されたIGF-IRおよびEGFR単ドメイン<sup>10</sup>F n 3ベースの結合剤は、サイズ排除クロマトグラフィーに基づいて>95%単量体であり、融解温度>56℃を有し(表13、方法は実施例4に類似)、Epimatrix(6つのループのうちの5つについて<7)、T細胞エピトープマッピングのためのマトリックススペースのアルゴリズムから予測されるように、最小限の免疫原性の可能性を示した[De Groot AS, Moise L (2007) Prediction of immunogenicity for therapeutic proteins: state of the art. Curr Opin Drug Discovery Devel 10:332-340]。<sup>10</sup>F n 3ベースの結合剤E1、E2、およびE3は、さらなる開発のために選択し、Biacoreアッセイから決定されるように0.7～10 nMの範囲のEGFR結合定数を有した(表13、方法は実施例5に類似)。これらの<sup>10</sup>F n 3ベースの結合剤のEGFR結合は、ユウロピウム標識EGFを使用する置換アッセイによって測定されるように、EGFRに対するEGF結合について競合的であった(表13)(方法は実施例10に類似)。同様に、IGF-IRに対するIGF-IR結合は、I1によって阻害された(表13、方法は実施例19に類似)。

#### 【0329】

二重特異性<sup>10</sup>F n 3ベースの結合剤の生物物理的特徴づけ。選択されたE/I<sup>10</sup>F n 3ベースの結合剤のT<sub>m</sub>値は、49～58℃の範囲であり、それらのSECプロファイルは、タンパク質が>90%単量体であることを示した(表14、方法は実施例4に類似)。単一特異的<sup>10</sup>F n 3ベースの結合剤およびE/I<sup>10</sup>F n 3ベースの結合剤は、同等の結合親和性を示したが、単ドメイン<sup>10</sup>F n 3ベースの結合剤と一緒に結合した場合、T<sub>m</sub>値はわずかに減少した(表13および14)。インビボ適用のために血清半減期を増加させるために、E/I<sup>10</sup>F n 3ベースの結合剤は、40 kDa分岐PEGを用いてペグ化した(方法は実施例3に類似)。E/I<sup>10</sup>F n 3ベースの結合剤のペグ化は、結合速度定数の減少により、非ペグ化コンストラクトに比べて結合親和性の10～20倍の低下をもたらしたが、T<sub>m</sub>を減少させなかった。さらに、ペグ化は、細胞においてEGFR/IGF-IRリン酸化の阻害を著しく低下させなかった。ペグ化E-Iの配向(ここに、EGFR結合剤はN末端にあり、IGF1RはC末端にある)は、I-Eの配向と比較して、ELISAによって、EGFRおよびIGF-IRのリン酸化の阻害についてわずかに低いIC<sub>50</sub>値を示した。K<sub>D</sub>値および生物学的活性における小さな差異がペグ化E-I配向対I-E配向の間で見出されたが、一貫した傾向はなかった。

#### 【0330】

## 【表 1 4】

表13. E/I <sup>10</sup>F<sub>n</sub>3ベースの結合剤の構築に関連する単一特異的<sup>10</sup>F<sub>n</sub>3ベースの結合剤の特性

| 名称  | T <sub>m</sub><br>°C | SEC<br>単量<br>体% | EGFR<br>KD<br>nM | IGF-<br>IR<br>KD<br>nM | A431<br>pEGFR<br>IC <sub>50</sub> 、nM | A431<br>pERK<br>IC <sub>50</sub> 、nM | H292<br>pEGFR<br>IC <sub>50</sub> 、nM | H292<br>pIGF-<br>IR<br>IC <sub>50</sub> 、nM | 競合EGFR/I<br>GF-IR IC <sub>50</sub><br>、nM |
|-----|----------------------|-----------------|------------------|------------------------|---------------------------------------|--------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------------|-------------------------------------------|
| E-親 | 56                   | ND              | 42.5             |                        | 2580                                  | 2370                                 | 1148 ± 21                             | ND                                          | 29 ± 12.73                                |
| E3  | 60                   | >80             | 3.4              | NA                     | 15 ± 8                                | 11 ± 7                               | 22 ± 1                                | >7000                                       | 4.75 ± 1.77                               |
| E1  | 64                   | >95             | 9.92             | NA                     | 24 ± 7                                | 13 ± 3                               | 9 ± 2                                 | >3400                                       | 15.9 ± 2.97                               |
| E2  | 72                   | >95             | 0.7              | NA                     | 38 ± 15                               | 40 ± 9                               | 31 ± 1                                | >3400                                       | 9.4 ± 3.68                                |
| I-親 | ND                   | ND              | NA               | 1.8                    | ND                                    | ND                                   | ND                                    | ND                                          | 13**                                      |
| I1  | 61.5                 | >95             | >6210            | 0.11                   | NA                                    | NA                                   | NA                                    | 0.2                                         | 8**                                       |

ND、行わず;NA、適用可能でない;SEC、サイズ排除クロマトグラフィー。\*A431細胞におけるEGFRおよびERKのリン酸化レベルについてのIC<sub>50</sub>値は、In Cell Westernアッセイ(ICW)によって決定した。H292細胞におけるEGFRおよびIGF-IRのリン酸化レベルは、酵素結合抗体免疫吸着アッセイ(ELISA)によって決定した。

\*\* IGF-IR結合についての競合。標準偏差は3~6回の実験からのものとする。

【0 3 3 1】

## 【表 1 5】

表14. E/I <sup>10</sup>F<sub>n</sub>3ベースの結合剤の特性

| 名称                 | T <sub>m</sub><br>°C | EGFR<br>K <sub>D</sub> nM | IGF-I<br>R K <sub>D</sub><br>nM | H292<br>pEGF<br>R<br>IC <sub>50</sub> 、<br>nM | H29<br>2<br>pIGF<br>-IR<br>IC <sub>50</sub><br>、<br>nM | A431<br>pERK<br>IC <sub>50</sub> 、n<br>M | A431<br>pEG<br>FR<br>IC <sub>50</sub> 、nM | EGF-EGFR競<br>合 IC <sub>50</sub> 、nM |
|--------------------|----------------------|---------------------------|---------------------------------|-----------------------------------------------|--------------------------------------------------------|------------------------------------------|-------------------------------------------|-------------------------------------|
| E3-GS10-I<br>1     | 52                   | 0.7                       | 0.1                             | 7                                             | 6                                                      | 12                                       | 14                                        | 25 ± 6.5                            |
| E3-GS10-I<br>1-PEG | 52.5                 | 10.4                      | 0.74                            | 10                                            | 6                                                      | 40                                       | 42                                        | 80.5 ± 12.02                        |
| E1-GS10-I<br>1     | 48                   | 3.8                       | 0.8                             | 30                                            | 1                                                      | 51                                       | 36                                        | 51                                  |
| E1-GS10-I<br>1-PEG | 49                   | 57.9                      | 2.4                             | 123                                           | 4                                                      | 295                                      | 297                                       | 396 ± 223                           |
| E2-GS10-I<br>1     | 56                   | 0.5                       | 0.2                             | 8                                             | 0.1                                                    | 20                                       | 19                                        | 2.1 ± 0.57                          |
| E2-GS10-I<br>1-PEG | 57.5                 | 10.1                      | 1.17                            | 32                                            | 0.3                                                    | 78                                       | 77                                        | 56.5 ± 24.5                         |
| I1-GS10-E<br>2-PEG | 60                   | 3.6                       | 0.46                            | 47                                            | 0.8                                                    | 118                                      | 97                                        | 128 ± 4.95                          |

10

20

T<sub>m</sub>測定値は、サーマルスキャニングフルロメトリー(thermal scanning flurometry)からのものとする。K<sub>D</sub>値は、チップ上に吸着した組換えEGFRドメインまたは組換えIGF-IRドメインを使用するBiacore結合アッセイからのものとする。In Cell Westernアッセイ(ICW)は、EI-直列型が、A431細胞におけるEGFRまたはERKのリン酸化を阻害する能力を決定するために行った。酵素結合抗体免疫吸着アッセイ(ELISA)は、H292細胞におけるEGFRまたはI

30

## 【0 3 3 2】

## 実施例 2 1

E/I <sup>1 0</sup> F n 3 ベースの結合剤の種交差反応性

ペグ化E/I <sup>1 0</sup> F n 3 ベースの結合剤は、表面プラズモン共鳴(BIACORE)分析を使用してマウス、ラット、およびサル由来のEGFRに対するそれらの結合親和性について分析した(実施例5と同一の方法)。マウスEGFRはR&D systems(Minneapolis、MN)から購入し、ラットEGFRは社内で産生し、サルEGFRはKEMP(Frederick、MD)から購入した。

## 【0 3 3 3】

40

表15中に示されるように、すべてのペグ化E/I <sup>1 0</sup> F n 3 ベースの結合剤は、低ナノモル親和性でマウス、ラット、およびサルのEGFRに結合したことから、すべてのペグ化E/I結合剤がヒト、マウス、ラット、およびサルのEGFRと交差反応性であることを示す。

## 【0 3 3 4】

【表 1 6】

表15

| 分析物                   | KD (nM)<br>(マウスEGFR) | KD (nM)<br>(ラットEGFR) | KD (nM)<br>(サルEGFR) |
|-----------------------|----------------------|----------------------|---------------------|
| I1-GS10-E105<br>(ペグ化) | 2.7                  | 2.9                  | 4.4                 |
| I1-GS10-E5<br>(ペグ化)   | 3.4                  | 3.6                  | 5.1                 |
| I1-GS10-E4<br>(ペグ化)   | 5.5                  | 3.7                  | 3.9                 |
| E4-GS10-I1<br>(ペグ化)   | 6.9                  | 5.6                  | 5.7                 |
| E2-GS10-I1<br>(ペグ化)   | 9.6                  | 9.6                  | 18.0                |
| I1-GS10-E85<br>(ペグ化)  | 13.9                 | 10.7                 | 7.0                 |

10

## 【0 3 3 5】

## 実施例 2 2

さらなる E / I<sup>1 0</sup> F n 3 ベースの結合剤の特徴づけ

20

図 4 3 は、さらなる E / I<sup>1 0</sup> F n 3 ベースの結合剤の様々な特徴を要約する。

## 【0 3 3 6】

ペグ化 E / I<sup>1 0</sup> F n 3 ベースの結合剤は、実施例 1 において先に記載される方法を使用して、A 4 3 1 における、E G F に誘発される E G F R および E R K のリン酸化の阻害を決定するために試験した。結果は、ペグ化 E / I<sup>1 0</sup> F n 3 ベースの結合剤が、1 2 n M ~ 2 9 7 n M の I C<sub>50</sub> の範囲で E G F に誘発される E G F R リン酸化、1 2 n M ~ 2 9 5 n M の I C<sub>50</sub> の範囲で E R K のリン酸化を阻害することを実証した（図 4 3、列 a および b）。

## 【0 3 3 7】

ペグ化 E / I<sup>1 0</sup> F n 3 ベースの結合剤が I G F R および E G F R の活性を阻害する能力もまた、実施例 6 および 7 において先に記載される方法を使用して H 2 9 2 細胞において検査した。結果は、ペグ化 E / I<sup>1 0</sup> F n 3 ベースの結合剤が、0 . 2 n M ~ 6 n M の I C<sub>50</sub> の範囲で I G F R 活性を阻害し（図 4 3、列 d）、1 . 3 n M ~ 1 2 3 n M の I C<sub>50</sub> の範囲で E G F R 活性を阻害した（図 4 3、列 c）ことを示した。

30

## 【0 3 3 8】

ペグ化 E / I<sup>1 0</sup> F n 3 ベースの結合剤は、それらが、表 1 6 の列 e および f において示されるように、D i f i 細胞において、E G F R および I G F R の分解を誘発することができるかどうかを決定するために試験した。細胞は、1 u M のペグ化 E / I<sup>1 0</sup> F n 3 ベースの結合剤を用いて処理し、7 時間でスタートし、1 2 0 時間で終了する時点で採取し、E G F R および I G F R のレベルは、ウェスタンブロット分析によって決定した。分解の強度は、直列型がその受容体を分解したが、分解が維持されず、受容体発現が時間的経過の間に再現したことを示す（+）、または直列型が受容体を分解し、時間的経過の全体にわたってその分解を維持したことを示す（++）としてスコア化した。結果（図 4 3、列 e および f）は、ペグ化 E / I<sup>1 0</sup> F n 3 ベースの結合剤が様々なパターンの E G F R および I G F R の分解；I G F R のみの分解、E G F R および I G F R の両方の分解、またはいずれの受容体も分解しない、を示すことを実証した。どの試験した直列型も、E G F R のみを分解する能力を示さなかった。

40

## 【0 3 3 9】

E G F R および I G F R に対するペグ化 E / I<sup>1 0</sup> F n 3 ベースの結合剤の結合親和性は、実施例 5 において先に記載されるように表面プラズモン共鳴（B I A c o r e）

50

分析によって評価した。結果は、ペグ化 E/I<sup>10</sup>F n 3 ベースの結合剤が、3.35 nM~57.9 nM の間の範囲の親和性で EGF R に結合し、0.37 nM~2.43 nM の間の範囲の親和性で IGF1 R に結合することを実証した (図 4 3、列 g および h)。

#### 【0340】

ペグ化 E/I<sup>10</sup>F n 3 ベースの結合剤は、実施例 10 において先に記載される方法を使用して、A431 細胞の表面上の EGF R への EGF 結合の遮断についてのそれらの効力を決定するために試験した。ペグ化 E/I<sup>10</sup>F n 3 ベースの結合剤は、19.5 nM~238 nM の範囲の IC<sub>50</sub> で A431 細胞への EGF 結合を遮断した (図 4 3、列 i)。

10

#### 【0341】

ペグ化 E/I<sup>10</sup>F n 3 ベースの結合剤は、実施例 17 において記載される方法を使用して、H292 細胞のコロニー形成を阻害するそれらの能力について評価した。図 4 3、列 j において示されるように、ペグ化 E/I<sup>10</sup>F n 3 ベースの結合剤は、1 nM~560 nM の範囲の IC<sub>50</sub> 値でコロニー形成を阻害し、試験した 4 つのペグ化 E/I<sup>10</sup>F n 3 ベースの結合剤のうちの 3 つは、抗 EGF R モノクローナル抗体パニツムマブよりも 23~140 倍強力であった。4 番目のペグ化 E/I<sup>10</sup>F n 3 ベースの結合剤は、パニツムマブほど強力でなく、パニツムマブの 4 分の 1 であった。ペグ化 I1 単量体は、IC<sub>50</sub> > 15 μM で H292 においてコロニー形成を阻害するのにわずかにのみ活性であり、これは、H292 細胞増殖が IGF1 R シグナリングではなく EGF R シグナリングによって主に駆動されるからであると予想される。

20

#### 【0342】

融解温度は、DSC (実施例 4 において先に記載される) または熱色素溶解方法論 (thermal dye melt methodology) によってペグ化 E/I<sup>10</sup>F n 3 ベースの結合剤について評価した。熱色素溶解評価については、ペグ化 E/I<sup>10</sup>F n 3 ベースの結合剤は、50 mM NaAc 緩衝液 pH 4.5 中で 0.2 mg/mL まで希釈した。それぞれの試料に、0.5 % の色素の最終濃度に向けて、DMSO 緩衝液中における 200 × Sypro Orange 1 μl をスパイクした。それぞれの試料を、96 ウェルトレイの中に装填し、5 μl のシリコンオイルを用いてコートした。トレイは、1,000 RPM で回転させ、Bio-Rad CFX96 システムに装填し、下記方法を選択した: 10 分間 25 °C + 15 分間にわたり 0.5 °C ずつ増やして 25 °C~95 °C プレート読み取り + プレート読み取り。データ分析は、CFX ソフトウェアを用いて変曲点について実行した。図 4 3、k 列中に示されるように、すべてのペグ化 E/I<sup>10</sup>F n 3 ベースの結合剤は、49~62.5 °C の範囲で、類似する T<sub>m</sub> 測定値を有した。ペグ化 E/I<sup>10</sup>F n 3 ベースの結合剤についての T<sub>m</sub> 測定値は、濃度に無関係であり、試験したすべての濃度で一貫したままであった。PBS 中 1 mg/mL のタンパク質濃度で 15~95 °C の走査範囲で測定した例示的な結合剤、ペグ化 I1-GS10-E5 の DSC 分析は、図 20 中に示されるように 55.2 °C の T<sub>m</sub> 測定値をもたらした。

30

#### 【0343】

サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) は、実施例 4 において先に記載されるようにペグ化 E/I<sup>10</sup>F n 3 ベースの結合剤に対して実行した。SEC の分析は、図 4 3 (表の列 l) 中に示されるようにペグ化 E/I<sup>10</sup>F n 3 ベースの結合剤のすべてが > 95 % 単量体であることを明らかにした。

40

#### 【0344】

##### 実施例 23

選択されたアミノ酸変化を有する E/I<sup>10</sup>F n 3 ベースの結合剤、ペグ化 I1-GS10-E5 の生化学的および生物物理的特性

ペグ化 I1-GS10-E5 は、6 HIS タグ (配列番号 487) なしで、かつさらにリンカー領域に対する様々な改変を用いて構築した。さらに、全体的な変化をすべてのコンストラクトに対して成し、第 1 の単量体の C 末端テールは、アスパラギン酸からグルタ

50

ミン酸（DからE）への単一の点変化を有した。いくつかのクローンは、代替ペグ化部位をもたらすために、選択したセリン残基をシステインに（SからCに）変異させて作製した。該分子の生化学的および生物物理的特性に対するこれらの変化の効果を比較し、表17中に概説する。pEGFRの阻害を測定するための方法は、実施例7において記載されており、pIGFRについては実施例6に、pERKについては実施例1において、Tmについては実施例4において、EGFRおよびIGFRのKDについては実施例5において記載されている。結合反応速度の詳細な分析もまた、これらのクローンに対して実行し、表18および19中に提示する（実施例5において記載されるものに類似している方法を使用）。

【0345】

【表17】

表17

| クローン名称                           | pEGFR<br>IC50<br>(nM) | pIGFR<br>IC50<br>(nM) | pERK<br>IC50<br>(nM) | Tm<br>(°C) | EGFR<br>KD<br>(nM) | IGFR<br>KD<br>(nM) | SEC単<br>量体% |
|----------------------------------|-----------------------|-----------------------|----------------------|------------|--------------------|--------------------|-------------|
| ペグ化I1-GS10-E5                    | 28                    | 2.2                   | 12                   | 56         | 2.7                | 0.25               | 96          |
| ペグ化I1-GS10-E5 <sup>(1)</sup>     | 30                    | 1.2                   | 11                   | 56.8       | 粘着性 <sup>(9)</sup> | 0.23               | 94.1        |
| I1-GSGCGS8-E5 <sup>(3)</sup>     | 19.8                  | 1.4                   | 8                    | 54.8       | 4                  | 0.29               | 95.2        |
| I1-GS10-E5-GSGC <sup>(4)</sup>   | 28.7                  | 1.2                   | 19                   | 55         | 1.4                | 0.25               | 92.7        |
| I1 (S62C)-GS10-E5 <sup>(5)</sup> | 21                    | 1.9                   | 10                   | 55.5       | 8.7                | 0.7                | 97.45       |
| I1-GS10-E5 (S62C) <sup>(6)</sup> | 68.4                  | 2.2                   | 30                   | 56         | 1.7                | 0.26               | 96.12       |
| I1 (S91C)-GS10-E5 <sup>(7)</sup> | 22.7                  | 6.2                   | 15                   | 52         | 17                 | 7.16               | 95.98       |
| I1-GS10-E5(S91C) <sup>(8)</sup>  | 22.6                  | 2.1                   | 29                   | 50.5       | 17.9               | 0.28               | 93.39       |

(1)Hisタグはこのコンストラクトに使用しなかった。(2)全体的な変化をペグ化I1-GS10-E5のすべての代替コンストラクトに対して成し、第1の単量体のC末端テールは、アスパラギン酸からグルタミン酸(DからE)への単一の点変化を有した。(3)GSGC(配列番号489)およびGS8(配列番号494)を用いてE5に結合させたI1単量体。(4)E5のテールにGSGC(配列番号489)を有する、GS10を用いてE5に結合させたI1。(5) GS10を用いてE5に結合させたI1、ここにI1は位置62でセリンからシステインへの単一の点変化を有する。(6) GS10を用いてE5に結合させたI1、ここにE5は位置62でセリンからシステインへの単一の点変化を有する。(7)GS10を用いてE5に結合させたI1、ここにI1は位置91でセリンからシステインへの単一の点変化を有する。(8)GS10を用いてE5に結合させたI1、ここにE5は位置91でセリンからシステインへの単一の点変化を有する。(9)このコンストラクトは フローセルへの非特異

【0346】

## 【表 18】

表18. 改変ペグ化I1-GS10-E5クローンのEGFR645-FcへのBiacore結合

| 種類                              | Ka<br>(1/Ms)                                     | Kd<br>(1/s)         | Kd<br>(nm)     | Δ ka<br>(倍数) | Δ kd<br>(倍数) | Δ Kd<br>(倍数) |
|---------------------------------|--------------------------------------------------|---------------------|----------------|--------------|--------------|--------------|
| ペグ化I1-GS10-E5                   | 2.93 ±<br>0.67 E+04                              | 7.24 ±<br>3.14 E-05 | 2.69 ±<br>1.53 | ---          | ---          | ---          |
| ペグ化I1-GS10-E5                   | 2.27E+04                                         | 1.49E-04            | 6.6            | 0.8          | 0.5          | 0.4          |
| ペグ化I1-GS10-E5 <sup>(1)</sup>    | より高い分析物濃度(600nM、200nMでの参照細胞表面への非特異的結合は動態値測定を妨げた) |                     |                |              |              |              |
| 代替クローン <sup>(2)</sup>           |                                                  |                     |                |              |              |              |
| I1-GSGCGS8-E5 <sup>(3)</sup>    | 2.94E+04                                         | 1.18E-04            | 4.0            | 1.0          | 0.6          | 0.7          |
| I1-GS10-E5-GSGC <sup>(4)</sup>  | 3.34E+04                                         | 4.52E-05            | 1.4            | 1.1          | 1.6          | 2.0          |
| I1(S62C)-GS10-E5 <sup>(5)</sup> | 2.28E+04                                         | 1.99E-04            | 8.7            | 0.8          | 0.4          | 0.3          |
| I1-GS10-E5(S62C) <sup>(6)</sup> | 1.78E+04                                         | 3.04E-05            | 1.7            | 0.6          | 2.4          | 1.6          |
| I1(S91C)-GS10-E5 <sup>(7)</sup> | 1.96E+04                                         | 3.34E-04            | 17.0           | 0.7          | 0.2          | 0.2          |
| I1-GS10-E5(S91C) <sup>(8)</sup> | 1.08E+04                                         | 1.93E-04            | 17.9           | 0.4          | 0.4          | 0.2          |

(1)Hisタグはこのコンストラクトに使用しなかった。(2)全体的な変化をペグ化I1-GS10-E5のすべての代替コンストラクトに対して成し、第1の単量体のC末端テールは、アスパラギン酸からグルタミン酸(DからE)への単一の点変化を有した。(3)GSGC(配列番号489)およびGS8(配列番号494)を用いてE5に結合させたI1単量体。(4)E5のテールにGSGC(配列番号489)を有する、GS10を用いてE5に結合させたI1。(5)GS10を用いてE5に結合させたI1、ここにI1は位置62でセリンからシステインへの単一の点変化を有する。(6) GS10を用いてE5に結合させたI1、ここにE5は位置62でセリンからシステインへの単一の点変化を有する。(7)GS10を用いてE5に結合させたI1、ここにI1は位置91でセリンからシステインへの単一の点変化を有する。(8) GS10を用いてE5に結合させたI1、ここにE5は位置91でセリンからシステインへの単一の点変化を有する。

【0347】

## 【表 19】

表19. 改変ペグ化I1-GS10-E5クローンのIGF1R-FcへのBiacore結合

| 種類                              | ka (1/Ms)             | kd (1/s)              | Kd (nm)       | Δ ka<br>(倍数) | Δ kd<br>(倍数) | Δ Kd<br>(倍数) |
|---------------------------------|-----------------------|-----------------------|---------------|--------------|--------------|--------------|
| ペグ化I1-GS10-E5                   | 1.04 ± 0.04<br>E+06   | 2.62 ± 0.21<br>E-04   | 0.25 ± 0.01   | ---          | ---          | ---          |
| ペグ化I1-GS10-E5                   | 1.10E+06              | 2.78E-04              | 0.25          | 1.1          | 0.9          | 1.0          |
| ペグ化I1-GS10-E5 <sup>(1)</sup>    | 1.28E+06、<br>1.22E+06 | 2.88E-04、<br>2.76E-04 | 0.22、<br>0.23 | 1.2          | 0.9          | 1.1          |
| 代替クローン <sup>(2)</sup>           |                       |                       |               |              |              |              |
| I1-GSGCGS8-E5 <sup>(3)</sup>    | 8.52E+05              | 2.45E-04              | 0.29          | 0.8          | 1.1          | 0.9          |
| I1-GS10-E5-GSGC <sup>(4)</sup>  | 1.07E+06              | 2.65E-04              | 0.25          | 1.0          | 1.0          | 1.0          |
| I1(S62C)-GS10-E5 <sup>(5)</sup> | 3.34E+05              | 2.34E-04              | 0.70          | 0.3          | 1.1          | 0.4          |
| I1-GS10-E5(S62C) <sup>(6)</sup> | 1.07E+06              | 2.79E-04              | 0.26          | 1.0          | 0.9          | 1.0          |
| I1(S91C)-GS10-E5 <sup>(7)</sup> | 8.22E+04              | 5.89E-04              | 7.16          | 0.1          | 0.4          | 0.04         |
| I1-GS10-E5(S91C) <sup>(8)</sup> | 9.86E+05              | 2.81E-04              | 0.28          | 0.9          | 0.9          | 0.9          |

(1)Hisタグはこのコンストラクトに使用しなかった。(2)全体的な変化をペグ化I1-GS10-E5のすべての代替コンストラクトに対して成し、第1の単量体のC末端テールは、アスパラ

ギン酸からグルタミン酸(DからE)への単一の点変化を有した。(3)GSGC(配列番号489)およびGS8(配列番号494)を用いてE5に結合させたI1単量体。(4)E5のテールにGSGC(配列番号489)を有する、GS10を用いてE5に結合させたI1。(5) GS10を用いてE5に結合させたI1、ここにI1は位置62でセリンからシステインへの単一の点変化を有する。(6) GS10を用いてE5に結合させたI1、ここにE5は位置62でセリンからシステインへの単一の点変化を有する。(7) GS10を用いてE5に結合させたI1、ここにI1は位置91でセリンからシステインへの単一の点変化を有する。(8) GS10を用いてE5に結合させたI1、ここにE5は位置91でセリンからシステインへの単一の点変化を有する。

#### 【0348】

##### 実施例24

EGFRおよびIGFRの共有下流シグナリング経路の阻害

下流シグナリング経路の阻害は、実施例8において先に記載されるものに同一のpAKT ELISAを用いて分析した。この研究の結果は、ペグ化I1-GS10-E5が、H292細胞におけるIGF1刺激AKT活性化の遮断にて、ペグ化I1単独よりも強力であることを実証する。ペグ化E5、EGFR単一特異的結合剤のみでは、IGF1刺激によるAKTの活性化を効率的に予防しなかった(図21)。

#### 【0349】

##### 実施例25

<sup>10</sup>Fn3ベースの結合剤およびコンパレーター(comparator)抗体による細胞増殖の阻害

H292およびRH41の細胞増殖実験は、実施例9において記載されるように行った。EGFR単一特異的<sup>10</sup>Fn3ベースの結合剤、ペグ化E5は、0.016 μMのIC50値でH292細胞の増殖を阻害した。IGFR単一特異的<sup>10</sup>Fn3ベースの結合剤、ペグ化I1は、>8.4 μMのIC50値を有したが、E/I<sup>10</sup>Fn3ベースの結合剤ペグ化I1-GS10-E5は、0.006 μMのIC50値でわずかにより強力であった(図22)。H292細胞系は、肺癌起源のものであり、IGFRおよびEGFRの阻害に対して感受性であった[(Akashi Y, et al. (2008) Enhancement of the antitumor activity of ionising radiation by nimotuzumab, a humanised monoclonal antibody to the epidermal growth factor receptor, in non-small cell lung cancer cell lines of differing epidermal growth factor receptor status. Br. J. Cancer 98:749-755およびBuck E, et al. (2008) Feedback mechanisms promote cooperativity for small molecule inhibitors of epidermal and insulin-like growth factor receptors. Cancer Res. 68:8322-8332.)]。対照的に、ペグ化I1-GS10-E5結合剤およびペグ化I1結合剤のみでは、RH41細胞の増殖を阻害した(IC50値は、それぞれ、0.0002および0.0004 μMであった、図23)。これは、RH41が、IGFRシグナリングによって主に駆動されることが知られている小児横紋筋肉腫細胞系であり[(Huang F, et al. (2009). The mechanisms of differential sensitivity to an insulin-like growth factor-1 receptor inhibitor (BMS-536924) and rationale for combining with EGFR/HER2 inhibitors. Cancer Res. 69:161-170)]、したがって、EGFR遮断に対して感受性でないからであると予想された。

#### 【0350】

##### 実施例26

ペグ化および非ペグ化<sup>10</sup>Fn3ベースの結合剤によるインビトロ受容体活性化および下流シグナリングの阻害

EGFR/IGFRシグナリングの動態およびペグ化I1-GS10-E5によるその阻害を理解するために、Difi、H292、またはBxPC3細胞は、血清を欠乏させ、1 μMまたは0.1 μMのペグ化E5、ペグ化I1、もしくはペグ化I1-GS10-E5またはビヒクル対照に2時間曝露し、次いで、10分間、EGF、IGF-I、またはEGF+IGF-Iを用いて刺激した。

#### 【0351】

細胞は、インビトロにおいて培養し、一晚、血清を欠乏させ、次いで、 $10^6$  Fn3 ベースの結合剤に2時間曝露した後、 $100\text{ ng/ml}$ のEGFまたはIGFを用いて刺激した。細胞溶解物は、溶解緩衝液(1% Triton X-100、5%グリセロール、 $0.15\text{ M NaCl}$ 、 $20\text{ mM Tris-HCl}$  pH7.6、Completeプロテアーゼ阻害剤カクテルタブレット [Roche, Indianapolis, IN]、およびホスファターゼ阻害剤カクテル2 [Sigma-Aldrich Corp.] )中で調製した。溶解物( $30\text{ }\mu\text{g}$ )は、SDS-PAGEによって分解し、膜に転写し、0.1% Tween 20を有するOdysseyブロッッキング緩衝液(LI-COR Biosciences, Lincoln, NE)中で、ホスホEGFRおよび全EGFR (Santa Cruz Biotechnology, Carlsbad, CA)、ホスホAKT (Ser473)、ホスホp44/42 MAPK (Thr202/Tyr204) (Cell Signaling Technology, Beverly, MA)、または全アクチン (Chemicon International, Temecula, CA) に対する抗体を用いてイムノプロットした。膜は、適切な二次抗体と共にインキュベートした。タンパク質の可視化は、LI-COR Biosciences Odyssey 赤外線画像システムを使用して実行した。

#### 【0352】

図24中で示されるように、リン酸化EGFR、IGF-IR、およびAKTの基本レベルは、血清廃除後ほとんど検出不可能であった。DiFi細胞において、ペグ化I1-GS10-E5もペグ化E5 (単一特異的EGFR結合剤)も、EGF刺激EGFRリン酸化を完全に抑制することができない。H292細胞およびBxPC3細胞において、ペグ化I1-GS10-E5およびペグ化E5の両方によってEGFRリン酸化が強く阻害されている。DiFi細胞およびBxPC3細胞において、ペグ化I1-GS10-E5は、ペグ化I1 (単一特異的IGFR結合剤) 単独よりもIGF刺激IGFRリン酸化を遮断する。H292細胞において、EGFRが遮断される場合に限り、IGF刺激はEGFRを交差活性化する。ペグ化I1-GS10-E5は、DiFiにおいてEGF刺激pAKTを阻害し、EGF刺激H292においてpAKTを増加させ、BxPC3においてEGFはpAKTを活性化しなかった。DiFi、H292、およびBxPC3細胞において、ペグ化I1-GS10-E5は、個々のペグ化E5およびペグ化I1単独よりもIGF刺激pIGFRを阻害した。ペグ化I1-GS10-E5は、DiFi、H292、またはBxPC3において、EGF刺激pERKに対する効果を、あったとしてもほとんど有していなかった。IGF刺激は、検査したあらゆる細胞系においてpERKを誘発しなかった。

#### 【0353】

非ペグ化 $10^6$  Fn3 ベースの結合剤を用いる他の実験において、H292細胞は、血清を欠乏させ、 $1\text{ }\mu\text{M}$ 非ペグ化単一特異的EGFR結合剤E2、IGFR結合剤I1、もしくはE2-GS10-I1またはビヒクル対照に1時間曝露し、次いで、10分間、EGF、IGF-I、またはEGF+IGF-Iを用いて刺激した。リン酸化EGFR、IGFR、およびAKTの基本レベルは、血清廃除後ほとんど検出不可能だった(図25)。EGFを用いる刺激は、EGFRリン酸化を誘発したが、IGFRをトランス活性化しなかった。EGFRリン酸化は、E2およびE2-GS10-I1によって遮断されたが、I1によって遮断されなかった。同様に、IGF-Iを用いる刺激は、IGFRの強いリン酸化を誘発し、それは、I1およびE2-GS10-I1によって遮断されたが、E2によって遮断されなかった。EGF刺激は、わずかにのみAKTリン酸化を増加させたが、IGF-IまたはEGF+IGF-Iは、AKTのリン酸化を強く誘発し、それは、I1およびE2-GS10-I1の両方によって基本レベルまで抑制された。IGF-IおよびEGFの組合せは、どちらかの単独の増殖因子よりも、AKTリン酸化を大きく誘発した。E2は、EGFおよびIGF-Iの組合せによって誘発されたpAKTを部分的に低下させた。しかしながら、I1は、pAKTにおいて最も劇的な低下を示し、このことは、EGF+IGF-Iを用いる刺激がIGFR経路を通しての強いAKTリン酸化を

導いたことを示唆する。驚いたことに、E2によるEGFR経路の遮断、次いでEGFRリガンドでの刺激は、おそらくAKTのEGFR非依存性の活性化の結果として、AKTのリン酸化を実際に増加させた((Dobashi Y, et al. (2009) EGFR-dependent and independent activation of Akt/mTOR cascade in bone and soft tissue tumors. Mod Pathol (Epub Ahead of Print))。これらの結果は、EGFR経路およびIGFR経路の間の複雑なクロストークならびにフィードバックメカニズムを示す。

#### 【0354】

##### 実施例27

E/I<sup>10</sup>Fn3ベースの結合剤を用いる競合結合研究

Biacore競合実験については、EGFR-Fc(Naアセテート pH5.0中 3μg/mL)は、300RUの表面密度まで、標準EDC/NHSAミドカップリング化学反応を使用して、Biacore CM5チップ表面上に固定した。EGFR抗体は、市販の薬剤として得、EGFR-Fcへの結合についての単一特異的EGFR結合剤E2および抗体の間の競合は、450nM E2(30μL/分、200秒の接触時間)、直後に450nM E2のみ、または450nM E2および450nMセツキシマブ、パニツムマブ、もしくはニモツズマブの混合物(30μL/分、200秒間の接触時間)を結合することによって評価した。表面は、30μL/分の流速で50mM NaOHの2回の10秒間のパルスを使用して、サイクルの間に再生するのに成功した。E2の最初の注入は、チップの表面上のEGFRへの結合を示す。等量のセツキシマブ、パニツムマブ、またはニモツズマブと混合したE2の第2の注入は、E2による、EGFRへの抗体の結合についての競合を示さない(図26A)。

#### 【0355】

表面プラズモン共鳴(BIACore)分析は、E/I<sup>10</sup>Fn3ベースの結合剤による、捕捉EGFR-Fcおよび溶液相IGF1Rの同時の結合を示すために利用した。組換えヒトEGFR-Fc(ヒトFcに融合されたヒトEGFRの細胞外ドメインのアミノ酸1~645)は、R&D systems(Minneapolis、MN)から購入した。組換えIGF1R(タンパク分解性で切断し、ジスルフィド結合したヒトIGF1Rプロペプチドのアミノ酸1~932)は、R&D systems(Minneapolis、MN)から購入した。同時の結合を明らかにするために、抗ヒトIgGは、メーカーの推奨(GE Healthcare、Piscataway、NJ)に従って、CM5チップのフローセル1および2上に固定した。EGFR-Fc(50nM)は、2分間、10ul/分でフローセル2上に捕捉した。EGFR-FcへのE/I<sup>10</sup>Fn3ベースの結合剤の結合は、2分間、10ul/分で両方のフローセルに対してI<sup>10</sup>Fn3ベースのタンパク質試料(100nM)を注入することによって達成した。EGFR-FcおよびIGF1Rの同時の結合は、続いて2分間、30ul/分で両方のフローセルに対してIGF1R(0, 100nM)を注入することによってプローブした。複合体の解離は、300秒間モニターした。3M MgCl<sub>2</sub>の2回の30秒間の注入を、抗ヒトIgG表面からの結合複合体の再生のために使用した。Biacore T100 Evaluation Software、バージョン2.0.1(GE healthcare/Biacore)は、センサーグラムをオーバーレイし、エアースパイクを除去するために利用した。図26Bにおいて示されるように、E/I<sup>10</sup>Fn3ベースの結合剤の両方のドメインは、機能的であり、EGFR-FcおよびIGF1Rに同時に結合することができる。

#### 【0356】

HERファミリー受容体へのペグ化E2-GS10-I1の結合特異性は、実施例5において記載されるようにBiacoreによって評価した。HER-2-Fc、HER-3-Fc、およびHER-4-Fc(R&D Systems)は、抗ヒトIgGを用いてCM5チップの表面上に捕捉した。ペグ化E2-GS10-I1は、強い結合がEGFR-Fc(HER-1)について見られた条件下で、他のHERファミリーメンバーへのいかなる識別可能結合も示さなかった(表20)。

【0357】

【表20】

表20. HERファミリーの受容体の細胞外ドメインへのペグ化E2-GS10-I1の結合親和性

| 名称            | EGFR-Fc $K_D$<br>、nM* | HER-2-Fc $K_D$<br>、nM | HER-3-Fc $K_D$<br>、nM | HER-4-Fc $K_D$<br>、nM |
|---------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| ペグ化E2-GS10-I1 | 10.1                  | >1000                 | >1000                 | >1000                 |

【0358】

10

## 実施例28

## 血漿バイオマーカーの測定

可溶性バイオマーカーTGF $\alpha$ およびmIGF1のレベルは、異種移植片研究の終了時にマウス血漿において、または処理後の様々な時間に腫瘍を有していないマウスにおいて測定された。血液は、抗凝固薬としてEDTAを含有するチューブの中に末端心穿刺（terminal cardiac puncture）によって得た。血漿は、4℃で10分間、1300xgで血液を遠心分離し、個別のチューブに清澄化した上清を移すことによって調製した。メーカー（R&D Systems、Minneapolis、MN）によって推奨されるようにELISAアッセイを用いて、TGF $\alpha$ レベルは、0.1mlの血漿中で測定し、mIGF1レベルは、0.02mlの血漿中で測定した。TGF $\alpha$ の血漿レベルは、ペグ化I1-GS10-E5またはペグ化単一特異的EGFR結合剤E5を用いて処理したマウスにおいて増加したが、セツキシマブでは増加しなかった（図27A～C）。このTGF $\alpha$ は、ヒト腫瘍から分泌されることができ、または内因的なマウスTGF $\alpha$ を表わすこともある。ヒトおよびマウスのTGF $\alpha$ の間の高い相同性（93%のアミノ酸同一性）により、ELISAは、マウスTGF $\alpha$ と交差反応しうる。さらに、移植腫瘍によって分泌されたヒトTGF $\alpha$ は、マウスEGFRに結合することができる。ペグ化I1-GS10-E5およびペグ化E5がヒトおよびマウスのEGFRの両方を結合することができるので、すべての宿主および腫瘍EGFR結合部位は、これらの $^{10}$ Fn3ベースの結合剤によって遮断されるが、セツキシマブは、マウスEGFRを結合しない。これらの $^{10}$ Fn3ベースの結合剤が内因的なマウスTGF $\alpha$ の増加を引き起こすかどうか、およびELISAがマウスTGF $\alpha$ と交差反応するかどうかを決定するために、腫瘍を有していないヌードマウスに、100mg/kgでペグ化I1-GS10-E5を投薬し、血漿試料を服用の4、24、48、72時間後に採取した。マウスTGF $\alpha$ の増加は、実際、72時間以上持続することが観察された（図28A）。非腫瘍マウス由来の血漿試料もまた、マウス特異的ELISAを用いて、mIGF1について試験し、該リガンドの増加も観察された（図28B）。

20

30

【0359】

## 実施例29

様々なE/I $^{10}$ Fn3ベースの結合剤についてのインビボヒト腫瘍異種移植片研究の結果

40

いくつかのE/I $^{10}$ Fn3ベースの結合剤は、相対的活性の差異を確かめることができるように、先に使用したよりも低用量で一对一のH292 NSCLC研究において評価した（実施例12において記載される方法）。0.625mg/マウスの単一の用量でのE/I $^{10}$ Fn3ベースの結合剤 ペグ化E2-GS10-I1、ペグ化E4-GS10-I1、ペグ化I1-GS10-E5、ペグ化I1-GS10-E85、ペグ化I1-GS10-E4、ペグ化I1-GS10-E105ならびに2つの用量（1mg/マウスおよび0.1mg/マウス）でのパニツムマブの効能を比較した。

【0360】

この研究において評価したパニツムマブおよびすべてのE/I $^{10}$ Fn3ベースの結合剤の両方の用量は、腫瘍増殖阻害（TGI）エンドポイントまで活性であった。投薬フ

50

エーズの間に、ペグ化E4-GS10-I1、ペグ化I1-GS10-E5、ペグ化I1-GS10-E4、およびパニツムマブはすべて、腫瘍退縮を引き起こしたが（表21、100%を超えるTGI値）、ペグ化E2-GS10-I1、ペグ化I1-GS10-E85、およびペグ化I1-GS10-E105は、腫瘍増殖阻害を引き起こした（表21、100%までのTGI値）。対照群と比較した場合、活性の差異は統計的に有意であった。すべての処理は、研究の経過にわたって処理に関連する死亡または過度の体重減少はなく、十分に耐性であった。E/I<sup>10</sup>Fn3ベースの結合剤およびパニツムマブの効能の比較は、下記の表21および図29中に提示する。図29Aにおいて、43日目までの測定値は、投薬を停止した後の腫瘍の再増殖のパターンを示す。図29Bは、27日目までの測定値を示し、Y軸は、処理群の間の活性の相対的差異を示すために拡大する。

【0361】

【表21】

表21. H292 NSCLC研究におけるインビボ抗腫瘍活性

| 群 | 化合物             | スケジュール、ルート               | 用量(mg/kg)   | 平均体重変化(g) | %TGI | TGI%についてのp値 | TGI%による結果 |
|---|-----------------|--------------------------|-------------|-----------|------|-------------|-----------|
| 1 | 対照(未処理)         | ---                      | ---         | 3.36      | ---  | 1.0         | ---       |
| 2 | パニツムマブ          | q3dx5; 6 ip <sup>a</sup> | 1mg/マウス     | 5.19      | 107  | 0.0023      | A         |
| 3 | パニツムマブ          | q3dx5; 6 ip <sup>a</sup> | 0.1mg/マウス   | 5.9       | 105  | 0.0029      | A         |
| 4 | ペグ化E2-GS10-I1   | TIWX3; 6 ip <sup>a</sup> | 0.625mg/マウス | -1.4      | 93   | 0.0067      | A         |
| 5 | ペグ化E4-GS10-I1   | TIWX3; 6 ip <sup>a</sup> | 0.625mg/マウス | -0.23     | 105  | 0.0023      | A         |
| 6 | ペグ化I1-GS10-E5   | TIWX3; 6 ip <sup>a</sup> | 0.625mg/マウス | -2.92     | 103  | 0.0033      | A         |
| 7 | ペグ化I1-GS10-E85  | TIWX3; 6 ip <sup>a</sup> | 0.625mg/マウス | 1.08      | 86   | 0.0114      | A         |
| 8 | ペグ化I1-GS10-E4   | TIWX3; 6 ip <sup>a</sup> | 0.625mg/マウス | -1.21     | 103  | 0.0034      | A         |
| 9 | ペグ化I1-GS10-E105 | TIWX3; 6 ip <sup>a</sup> | 0.625mg/マウス | -1.54     | 95   | 0.0035      | A         |

<sup>a</sup> ビヒクルはリン酸緩衝生理食塩水とした。使用される略語は以下のとおりとする: ip、腹腔内ルート; TGI%,  $TGI\% = [(C_t - T_t) / (C_t C_0)] \times 100$  として計算した相対的腫瘍増殖阻害%, 式中、 $C_t$ =腫瘍移植後の日数の時間tでの対照マウスの中央腫瘍重量、 $T_t$ =時間tでの処理マウスの中央腫瘍重量、 $C_0$ =時間0での対照マウスの中央腫瘍重量とする。TGI%値は、20日目、24日目、および27日目の平均阻害として2つの時点で計算した。結果、>50%の統計的に有意なTGI%値をもたらした場合、処理レジメンは、活性であると見なした; q3dx5; 6、化合物は腫瘍移植後の6日目にスタートして6回の服用について3日ごとに投与した; 6オン/1オフ;

6、化合物は6日間1日1回投与し、次いで、1日間は未処理とし、このレジメンは腫瘍移植後6日目にスタートした。p値は、群当たり8つの測定値を用いる両側対応検定において対照群に比べて20日目に計算した。

#### 【0362】

さらに、インビボ研究は、実施例12において記載される方法を使用して、様々な異種移植片モデルにおいて、下記の選択したE/I<sup>10</sup>Fn3ベースの結合剤を用いて実行した。様々な異種移植片モデルの種類は以下のとおりである：H292は非小細胞肺癌（NSCLC）であり、より詳細に実施例12において記載されている；MCF7乳癌は、実施例14において記載されている；GEO結腸癌は、実施例15において記載されている。DiFiヒト結腸癌は、高レベルの活性化EGFRを発現し、また、IGFRをも発現する；RH41は、IGFRシグナリングによって主に駆動されることが知られている小児横紋筋肉腫細胞系であり [(Huang F, et al. (2009). The mechanisms of differential sensitivity to an insulin-like growth factor-1 receptor inhibitor (BMS-536924) and rationale for combining with EGFR/HER2 inhibitors. Cancer Res. 69:161-170)]、したがって、EGFR遮断に対して感受性でない；Cal27は、高レベルのEGFRおよび中程度のレベルのIGFRを発現するヒト頭頸部癌である；BxPC3は、ヒト膵臓癌である；H441は、NSCLCである。

#### 【0363】

選択したE/I<sup>10</sup>Fn3ベースの結合剤の効能の比較を表22中に示す。これらの効能研究において、すべてのE/I<sup>10</sup>Fn3ベースの結合剤は、パニツムマブに対する等しい活性を示し、すべての処理により、100%を超えるTGI%値によって示されるように、それらのスタートサイズ未満にH292腫瘍を退縮させることができた。DiFi研究において、パニツムマブは、1mg/マウスの用量で腫瘍を退縮し、0.1mg/マウスの用量で活性であったが、ペグ化I1-GS10-E5が腫瘍増殖のいくつかの阻害を示した（TGI = 43.8%）が、すべてのE/I<sup>10</sup>Fn3ベースの結合剤は、不活性であった。RH41研究において、パニツムマブは、どちらかの用量でも活性ではなく、ペグ化E2コンストラクトは、活性ではなかったが、E/I<sup>10</sup>Fn3ベースの結合剤およびペグ化I1コンストラクトはすべて活性であった。図32は、代表的なコンストラクト ペグ化E2-GS10-I1についてのRH41モデルにおける抗腫瘍効能を示す（データはまた表23中でも示される）。Cal27研究において、パニツムマブは、1mg/マウスの用量で腫瘍を退縮し、0.1mg/マウスの用量で活性であったが、E/I<sup>10</sup>Fn3ベースの結合剤のなかでは、ペグ化I1-GS10-E5 E/I<sup>10</sup>Fn3コンストラクトのみが活性であった。

#### 【0364】

相乗効果を評価するために設計したペグ化I1-GS10-E5ならびに個々のI1およびE5の構成成分を用いるヒト腫瘍異種移植片研究の結果を表23中に提示する。これらの組合せ（相乗効果）の研究は、E/I<sup>10</sup>Fn3ベースの結合剤の個々の部分（つまりペグ化IGFRおよびEGFR単一特異的バージョン）が含まれるように組み立てた、そのため、単離末端の寄与以上の抗腫瘍効果を識別することができた。MCF7研究において、ペグ化I1は、活性ではなかったが、ペグ化E5、（ペグ化E5+ペグ化I1）、およびペグ化I1-GS10-E5クローンはすべて活性であり、類似する活性を示し、このことは、すべての抗腫瘍活性がおそらくEGFRの阻害から生じ、IGFR経路の遮断はいかなる増強をももたらさなかったことを意味する。セツキシマブは1mg/マウスの用量で腫瘍を退縮し、0.1mg/マウスの用量で活性ではなかった。BMS-754807もまた、活性ではなく、このことは、小分子阻害剤を用いるIGFR経路の遮断は、このモデルにおいて効能をもたらさなかったことを示す。

#### 【0365】

BxPC3研究において、ペグ化I1は、活性ではなかったが、ペグ化E5および（ペグ化E5+ペグ化I1）クローンは、活性であった（それぞれTGI = 61.2%および68.8%）。ペグ化I1-GS10-E5クローンは、該クローンを構成する個々の部

分よりも活性であり（TGI = 78 %）、差異は、両側対応 t 検定によって統計的に有意であり、このことは、該モデルにおいて相乗的な活性を有することを示す。セツキシマブは、研究したすべての用量で活性であったが、IGFR 阻害において、ペグ化 I 1 とそれを組み合わせることによる追加は、相乗効果をもたらさなかった。

【0366】

GEO 研究において、ペグ化 I 1 は、活性ではなかったが、ペグ化 E 5 および（ペグ化 E 5 + ペグ化 I 1）およびペグ化 I 1 - GS10 - E 5 クローンは、活性であった（それぞれ TGI = 83.5 %、92.1、および 92.1 %）。このモデルにおいて EGF R および IGF R の阻害を相互に組み合わせることによってもたらされたいくつかの増強があったかもしれないが、差異は、ペグ化 E 5 単独ほど有意に効果的ではなかった。セツキシマブは、研究した両方の用量で活性であったが、IGFR 阻害において、ペグ化 I 1 と組み合わせることによる追加は、相乗効果をもたらさなかった。

10

【0367】

H441 研究において、ペグ化 I 1 およびペグ化 E 5 は、単独で活性でなかったが、（ペグ化 E 5 + ペグ化 I 1）は活性であった（TGI = 54.5 %）。ペグ化 I 1 - GS10 - E 5 クローンは、該クローンを構成する個々の部分よりも活性であったが（TGI = 69.2 %）、差異は統計的に有意ではなく、このことは、該モデルにおいて活性の増強をもたらしたが、相乗効果をもたらさなかったことを示す。セツキシマブは 1 mg / マウスの用量で活性であり、0.1 mg / マウスの用量で活性ではなかった。IGFR 阻害において、ペグ化 I 1 とそれを組み合わせることによる追加は、このモデルにおいていかなる増強をももたらさなかった。

20

【0368】

【表 2 2 - 1】

表22. 選択したE1/1<sup>10</sup>F<sub>n</sub>3ベースの結合剤のインビボにおける結果

| 群                   | 化合物           | スケジュー<br>ル              | 用量(mg/kg) <sup>a</sup> | 平均体重変<br>化(g) | %TGI  | TGI%につ<br>いてのp値 | TGI%によ<br>る結果 |
|---------------------|---------------|-------------------------|------------------------|---------------|-------|-----------------|---------------|
| H292研究におけるインビボ抗腫瘍活性 |               |                         |                        |               |       |                 |               |
| 1                   | 対照(未処理)       | ---                     | ---                    | 5.7           | ---   | 1.0             | ---           |
| 2                   | パニツムマブ        | Q3dx5;6 ip <sup>a</sup> | 1mg/マウス                | 5.0           | 104   | 0.0006          | A             |
| 3                   | パニツムマブ        | Q3dx5;6 ip <sup>a</sup> | 0.1mg/マウス              | 1.5           | 102   | 0.0005          | A             |
| 4                   | ペグ化E4-GS10-II | TIWX3;6                 | 2mg/マウス                | -4.86         | 105   | 0.0004          | A             |
| 5                   | ペグ化I1-GS10-E5 | TIWX3;6                 | 2mg/マウス                | -10.0         | 102   | 0.0006          | A             |
| 6                   | ペグ化I1-GS10-E4 | TIWX3;6                 | 2mg/マウス                | -1.41         | 105   | 0.0005          | A             |
| DiFi研究におけるインビボ抗腫瘍活性 |               |                         |                        |               |       |                 |               |
| 1                   | 対照(未処理)       | ---                     | ---                    | -0.5          | ---   | 1.0             | ---           |
| 2                   | パニツムマブ        | Q3dx5;6 ip <sup>a</sup> | 1mg/マウス                | 5.3           | 109.7 | 0.006           | A             |
| 3                   | パニツムマブ        | Q3dx5;6 ip <sup>a</sup> | 0.1mg/マウス              | 2.6           | 99.9  | 0.005           | A             |
| 4                   | ペグ化E4-GS10-II | TIWX3;6                 | 3mg/マウス                | -10.8         | -1.1  | 0.815           | I             |
| 5                   | ペグ化I1-GS10-E5 | TIWX3;6                 | 3mg/マウス                | -16.4         | 43.8  | 0.310           | I             |
| 6                   | ペグ化I1-GS10-E4 | TIWX3;6                 | 3mg/マウス                | -8.5          | 1.4   | 0.977           | I             |
| RH41研究におけるインビボ抗腫瘍活性 |               |                         |                        |               |       |                 |               |
| 1                   | 対照(未処理)       | ---                     | ---                    | 7.2           | ---   | 1.0             | ---           |
| 2                   | パニツムマブ        | q3dx5;6 ip <sup>a</sup> | 1mg/マウス                | 10.7          | 16.5  | 0.721           | I             |
| 3                   | パニツムマブ        | q3dx5;6 ip <sup>a</sup> | 0.1mg/マウス              | 8.6           | 38.4  | 0.563           | I             |
| 4                   | ペグ化E4-GS10-II | TIWX3;6                 | 2.5mg/マウス              | -5.3          | 72.7  | 0.02            | A             |
| 5                   | ペグ化I1-GS10-E5 | TIWX3;6                 | 2.5mg/マウス              | -7.8          | 68    | 0.019           | A             |
| 6                   | ペグ化I1-GS10-E4 | TIWX3;6                 | 2.5mg/マウス              | -2.9          | 64.5  | 0.018           | A             |
| 7                   | 対照(未処理)       | ---                     | ---                    | 12.3          | ---   | 1.0             | ---           |
| 8                   | ペグ化E2-GS10-II | TIWX3;18                | 2.5mg/マウス              | -1.8          | 58.6  | 0.044           | A             |
| 9                   | ペグ化E2         | TIWX3;18                | 1.25mg/マウス             | 5.9           | 20.2  | 0.530           | I             |
| 10                  | ペグ化I1         | TIWX3;18                | 1.25mg/マウス             | 7.1           | 58.6  | 0.025           | A             |

【0 3 6 9】

10

20

30

40

【表22-2】

| 群                    | 化合物           | スケジュール                  | 用量(mg/kg) <sup>a</sup> | 平均体重変化(g) | %TGI  | TGI%についてのp値 | TGI%による結果 |
|----------------------|---------------|-------------------------|------------------------|-----------|-------|-------------|-----------|
| Cal27研究におけるインビボ抗腫瘍活性 |               |                         |                        |           |       |             |           |
| 1                    | 対照(未処理)       | ---                     | ---                    | 9.4       | ---   | 1.0         | ---       |
| 2                    | パニツムマブ        | q3dx5;6 ip <sup>a</sup> | 1mg/マウス                | 6.1       | 109.8 | 0.0006      | A         |
| 3                    | パニツムマブ        | q3dx5;6 ip <sup>a</sup> | 0.1mg/マウス              | 5.8       | 72.9  | 0.003       | A         |
| 4                    | ペグ化E4-GS10-I1 | TIWX3;6                 | 2mg/マウス                | -1.2      | -11.4 | 0.587       | I         |
| 5                    | ペグ化I1-GS10-E5 | TIWX3;6                 | 2mg/マウス                | -11.6     | 57.6  | 0.037       | A         |
| 6                    | ペグ化I1-GS10-E4 | TIWX3;6                 | 2mg/マウス                | -2.2      | -9.2  | 0.177       | I         |

<sup>a</sup> ビヒクルはすべての処理についてリン酸緩衝生理食塩水とした。使用される略語は以下のとおりとする:ip、腹腔内ルート;po、経口ルート;TGI%、 $TGI\%=[(C_t-T_t)/(C_t-C_0)]\times 100$ として計算した相対的腫瘍増殖阻害%、式中、Ct=腫瘍移植後の日数の時間tでの対照マウスの中央腫瘍重量、Tt=時間tでの処理マウスの中央腫瘍重量、C0=時間0での対照マウスの中央腫瘍重量とする。TGI%値は、群1～6についてはH292については19および23日目に、DiFiについては39および41日目に、RH41については34および37日目に、群7～10については35、36、および39日目に、Cal27については18および20日目に平均阻害として2つの時点で計算した。結果、>50%の統計的に有意なTGI%値をもたした場合、処理レジメンは、活性であると見なした;q3dx5;6 化合物は腫瘍移植後の6日目にスタートして6回の服用について3日ごとに投与した;TIWX3;6、化合物は3週間1週当たり3回投与し、このレジメンは腫瘍移植後6日目にスタートした。p値は、群当たり8つの測定値を用いる両側対応検定において対照群に比べて、群1～6についてはH292については23日目、DiFiについては39日目、RH41については37日目に、群7～10については39日目に、Cal27については20日目に計算した。

【表 2 3 - 1】

表23. <sup>10</sup>F<sub>n</sub>3 ペースの結合剤およびコンパレーターを用いるインビボ実験の概要

| 群                    | 化合物                                     | スケジュール             | 用量(mg/kg) <sup>a</sup>     | 平均体重変化(g) | %TGI  | TGI%についてのp値 | TGI%による結果 |
|----------------------|-----------------------------------------|--------------------|----------------------------|-----------|-------|-------------|-----------|
| MCF7r研究におけるインビボ抗腫瘍活性 |                                         |                    |                            |           |       |             |           |
| 1                    | 対照(未処理)                                 | ---                | ---                        | 6.1       | ---   | 1.0         | ---       |
| 2                    | ペグ化II <sup>a</sup>                      | TIWX3;7            | 50mg/kg, ip                | 17.1      | -40.8 | 0.195       | I         |
| 3                    | ペグ化E5 <sup>a</sup>                      | TIWX3;7            | 50mg/kg, ip                | 5.1       | 75.8  | 0.007       | A         |
| 4                    | ペグ化E5 <sup>a</sup> + ペグ化II <sup>a</sup> | TIWX3;7            | 50mg/kg, ip                | -3.0      | 81.8  | <0.0001     | A         |
| 5                    | ペグ化II-GS10-E5 <sup>a</sup>              | TIWX3;7            | 100mg/kg, ip               | -4.5      | 78    | 0.009       | A         |
| 6                    | セツキシマブ <sup>a</sup>                     | Q3DX5;7            | 1mg/マウス, ip                | 11.7      | 105.4 | 0.0009      | A         |
| 7                    | セツキシマブ <sup>a</sup>                     | Q3DX5;7            | 0.1mg/マウス, ip              | 7.5       | 34.3  | 0.031       | I         |
| 8                    | BMS-754807 <sup>b</sup>                 | QDX14;7            | 50mg/kg, po                | -4.0      | 44.5  | 0.146       | I         |
| BxPC3研究におけるインビボ抗腫瘍活性 |                                         |                    |                            |           |       |             |           |
| 1                    | 対照(未処理)                                 | ---                | ---                        | 3.1       | ---   | 1.0         | ---       |
| 2                    | ペグ化II                                   | TIWX3;9            | 50mg/kg, ip                | 4.3       | 14.3  | 0.315       | I         |
| 3                    | ペグ化E5                                   | TIWX3;9            | 50mg/kg, ip                | -5.3      | 61.2  | 0.0003      | A         |
| 4                    | ペグ化E5 + ペグ化II                           | TIWX3;9            | 50mg/kg, ip                | -4.9      | 68.8  | 0.0019      | A         |
| 5                    | ペグ化II-GS10-E5                           | TIWX3;9            | 100mg/kg, ip               | -14.0     | 78.0  | 0.0002      | A         |
| 6                    | セツキシマブ                                  | Q3DX5;9            | 1mg/マウス, ip                | 5.2       | 62.6  | 0.0026      | A         |
| 7                    | セツキシマブ                                  | Q3DX5;9            | 0.25mg/マウス, ip             | 2.5       | 62.8  | 0.0005      | A         |
| 8                    | セツキシマブ + ペグ化II                          | Q3DX5;9<br>TIWX3;9 | 1mg/マウス, ip<br>50mg/kg, ip | 3.6       | 62.1  | 0.0005      | A         |
| GEO研究におけるインビボ抗腫瘍活性   |                                         |                    |                            |           |       |             |           |
| 1                    | 対照(未処理)                                 | ---                | ---                        | 7.5       | ---   | 1.0         | ---       |
| 2                    | ペグ化II                                   | TIWX3;9            | 50mg/kg, ip                | -7.2      | 26.8  | 0.594       | I         |
| 3                    | ペグ化E5                                   | TIWX3;9            | 50mg/kg, ip                | 9.7       | 83.5  | 0.0028      | A         |
| 4                    | ペグ化E5 + ペグ化II                           | TIWX3;9            | 50mg/kg, ip                | 5.4       | 92.1  | 0.0005      | A         |
| 5                    | ペグ化II-GS10-E5                           | TIWX3;9            | 100mg/kg, ip               | -7.3      | 92.1  | 0.0006      | A         |

【0 3 7 1】

10

20

30

40

【表 2 3 - 2】

| 群                   | 化合物            | スケジュール             | 用量(mg/kg) <sup>a</sup>   | 平均体重変化(g) | %TGI | TGI%についてのp値 | TGI%による結果 |
|---------------------|----------------|--------------------|--------------------------|-----------|------|-------------|-----------|
| 6                   | セツキシマブ         | Q3DX5;9            | 1mg/マウス、ip               | 7.7       | 91.8 | 0.0008      | A         |
| 7                   | セツキシマブ         | Q3DX5;9            | 0.25mg/マウス、ip            | 7.8       | 92.0 | 0.0007      | A         |
| 8                   | セツキシマブ + ペグ化II | Q3DX5;9<br>TIWX3;9 | 1mg/マウス、ip<br>50mg/kg、ip | 7.1       | 91.3 | 0.0006      | A         |
| H441研究におけるインビボ抗腫瘍活性 |                |                    |                          |           |      |             |           |
| 1                   | 対照(未処理)        | ---                | ---                      | 12.4      | ---  | 1.0         | ---       |
| 2                   | ペグ化II          | TIWX3;9            | 50mg/kg、ip               | 11.5      | 30.8 | 0.701       | I         |
| 3                   | ペグ化E5          | TIWX3;9            | 50mg/kg、ip               | -8.8      | 43.1 | 0.292       | I         |
| 4                   | ペグ化E5 + ペグ化II  | TIWX3;9            | 50mg/kg、ip               | -0.8      | 54.5 | 0.011       | A         |
| 5                   | ペグ化II-GS10-E5  | TIWX3;9            | 100mg/kg、ip              | -3.9      | 69.2 | 0.022       | A         |
| 6                   | セツキシマブ         | Q3DX5;9            | 1mg/マウス、ip               | 12.6      | 65.2 | 0.002       | A         |
| 7                   | セツキシマブ         | Q3DX5;9            | 0.25mg/マウス、ip            | 13.7      | 43.9 | 0.110       | I         |
| 8                   | セツキシマブ + ペグ化II | Q3DX5;9<br>TIWX3;9 | 1mg/マウス、ip<br>50mg/kg、ip | 10.2      | 66.7 | 0.060       | I         |

<sup>a</sup> ビヒクルはすべての処理についてリン酸緩衝生理食塩水とした。使用される略語は以下のとおりとする: ip、腹腔内ルート; po、経口ルート; TGI%、 $TGI\% = [(C_t - T_t) / (C_t - C_0)] \times 100$  として計算した相対的腫瘍増殖阻害%、式中、Ct=腫瘍移植後の日の時間tでの対照マウスの中央腫瘍重量、Tt=時間tでの処理マウスの中央腫瘍重量、C0=時間0での対照マウスの中央腫瘍重量とする。TGI%値は、MCF7rについては22および26日目、BxPC3については23および27日目、GEOについては29および31日目、H441については17日目に平均阻害として2つの時点で計算した。結果、>50%の統計的に有意なTGI%値をもたらした場合、処理レジメンは、活性であると見なした; q3dx5;6、化合物は腫瘍移植後の6日目にスタートして6回の服用について3日ごとに投与した; TIWX3;6、化合物は3週間1週当たり3回投与し、このレジメンは腫瘍移植後6日目にスタートした。p値は、群当たり8つの測定値を用いる両側対応検定において対照群に比べて、MCF7rについては26日目、BxPC3については27日目、GEOについては29日目、H441については17日目に計算した。

## 【0372】

## 実施例 30

マウスにおける様々な E / I<sup>10</sup>Fn3 ベースの結合剤の薬物動態プロファイル

ペグ化 E / I<sup>10</sup>Fn3 ベースの結合剤、E2-GS10-I1 の薬物動態プロファイルは、腹腔内注射を介してマウスにおいて評価した。用量群当たり 3 匹のヌードマウス

10

20

30

40

50

に、10および100mg/kg、ipでPBS中で処方したE2-GS10-I1を投薬し、血漿試料は、投薬前、投薬の0.5、2、4、8、12、24、48、72、96、144、および168時間後に、クエン酸リン酸デキストロース溶液中に収集した。血漿試料は、血漿試料中のペグ化E/I<sup>10</sup>Fn3ベースの結合剤を検出し、定量するために開発された定量的電気化学発光（ECL）アッセイを使用して、ペグ化E2-GS10-I1 Fn3ベースの結合剤レベルについて評価した。このアッセイにおいて、血漿試料中のペグ化E/I<sup>10</sup>Fn3ベースの結合剤の捕獲を可能にするために、EGFR結合領域への特異性を有するマウスモノクローナル抗体をMeso Scale Discoveryプレートに4℃で一晩吸着させた。血漿試料はプレートに追加し、1時間22℃でインキュベートした。捕捉されたペグ化E/I<sup>10</sup>Fn3ベースの結合剤は、SULFO-TAGと結合したヤギ抗ウサギ抗体と混合したE/I<sup>10</sup>Fn3ベースの結合剤のスクフォールド領域に対して特異的なウサギポリクローナル抗体によって検出した。非結合SULFO-TAG試薬を除去するために洗浄した後に、読み取り緩衝液（read buffer）を追加し、ECL検出を使用した。血漿試料中のペグ化E2-GS10-I1のレベルは、ペグ化E2-GS10-I1 Fn3ベースの結合剤の標準曲線の4パラメーターフィットに対する比較に基づいて計算した。

#### 【0373】

10または100mg/kgのペグ化E2-GS10-I1を腹腔内（ip）投与したマウスは、約200および1700μg/mLのピークレベルをそれぞれもたらし、用量に比例する薬物動態を示した（図30）。図30についての薬物動態パラメーターは、下記の節において記載されるものに類似する方法で計算した（「T<sub>1/2</sub>」は「HL<sub>lambda\_z</sub>」と交換可能であり、AUCは「AUC<sub>INF\_obs</sub>」と交換可能であることに注意されたい）。マウスにおけるペグ化E2-GS10-I1の半減期は、15.75±1.52時間であった（図30）。これらの薬物動態パラメーターに基づいて、ヒト腫瘍異種移植片研究における、毎週3回（TIW）の100mg/kgの投与は、インビトロにおけるIC<sub>50</sub>値よりも10～100倍高い薬剤レベルを維持することができた。

#### 【0374】

さらなる薬物動態実験を、いくつかのペグ化E/I<sup>10</sup>Fn3ベースの結合剤に対して行い、マウスに、10または100mg/kgを腹腔内に（ip）、ペグ化I1-GS10-E5については10または64mg/kgを皮下に（sc）投与し、上記のように血漿を収集および分析して、ペグ化E/I<sup>10</sup>Fn3ベースの結合剤のレベルを測定した。これらの様々なE/I<sup>10</sup>Fn3ベースの結合剤の薬物動態パラメーターは、血漿（血清）濃度 対 時間データの非コンパートメント解析によって得た。WinNonlinソフトウェア（バージョン5.1、Pharsight Corp. Mountain View CA）は、終末相半減期（HL<sub>lambda\_z</sub>）、最高血中濃度（C<sub>max</sub>）、0時間から無限時間までの曲線下面積（AUC<sub>INF\_obs</sub>）、クリアランス（CL<sub>F\_obs</sub>）、終末相に基づく分布容積（V<sub>z\_F\_obs</sub>）、および無限時間までの平均滞留時間（MRT<sub>INF\_obs</sub>）を計算するために使用した。結果は、ペグ化E/I<sup>10</sup>Fn3ベースの結合剤についての半減期が、図44および図31中に示されるように、12.1～20.9時間であったことを示した。

#### 【0375】

##### 実施例31

##### 薬力学

試料は、研究の終了時に表22中に記載されるH292およびDiFi異種移植片モデルから採取し、EGFRおよびIGFRタンパク質の全レベルならびにリン酸化EGFRおよびIGFRの分析のために実施例12における「腫瘍における薬力学的エンドポイントの測定」で概説されるように処理した。ペグ化I1-GS10-E5およびパニツムマブの標的効果は、実施例11において記載されるようにイムノプロットすることによって評価した。図33Aにおいて、全EGFR、pEGFR、および全IGFRのレベルは、

D i F i 異種移植片モデルの終了時に未処理腫瘍よりもペグ化 I 1 - G S 1 0 - E 5 処理腫瘍においてより低かった。図 3 3 B において、p E G F R のレベルは、パニツムマブおよびペグ化 I 1 - G S 1 0 - E 5 を用いて処理した腫瘍においてより低かった。全 E G F R のレベルは、パニツムマブ処理腫瘍においてではなくペグ化 I 1 - G S 1 0 - E 5 処理腫瘍においてのみ、より低かった。全 I G F R のレベルは、両方のペグ化 I 1 - G S 1 0 - E 5 処理腫瘍および一方のパニツムマブ処理腫瘍においてより低かったが、他方は低くなかった。これらのモデルにおける p I G F R の量は低すぎたので、処理後に検出することができなかった。イムノブロットは、タンパク質の負荷量が等しいことを明らかにするために、G A P D H を用いてプローブした。

【0376】

10

### 実施例 3 2

E G F R<sup>1 0</sup> F n 3 ベースの結合剤最適化およびコンセンサス配列分析

<sup>1 0</sup> F n 3 ベースの結合剤 6 7 9 F 0 9 ( P C T W O 2 0 0 9 / 1 0 2 4 2 1 において記載される) (図 3 4) は、E G F R 外部ドメイン - F c 融合タンパク質 ( R & D S y s t e m s ) に対する結合剤として同定した。結合活性は、E G F R - F c を用いてコートしたビーズおよびそれらの核酸コード配列に結合した <sup>1 0</sup> F n 3 ベースの結合剤を使用して選択した [たとえば Xu et al., Directed Evolution of High-Affinity Antibody Mimics Using mRNA Display, Chem. Biol. 9: 933-942 (2002) を参照されたい]。B C、D E、および F G ループにおいてアミノ酸配列に対する改変を有する親 E G F R 結合剤 6 7 9 F 0 9 のより強力な変異体もまた、同定した。

20

【0377】

配列分析 I : E G F R に対する高親和性結合について選択したすべての <sup>1 0</sup> F n 3 ベースの結合剤

E G F R に対する強い親和性を特徴づけた配列パターンを示すために、すべての特有の E G F R 結合配列 ( 1 0 4 4 ) をいくつかの方法を使用して分析した。最初に、該配列は、ループ中のそれぞれの位置のアミノ酸の頻度によって分析した (図 3 5 ~ 3 8 )。それぞれのループについての特有の配列のみを分析した。

【0378】

上記の配列分析から、以下の広範囲の配列モチーフが特徴づけられた：

配列モチーフ # 1

30

( a ) B C ループ：位置 7 ~ 8 における「Y Q」(つまり、配列番号 1 の位置 2 9 および 3 0 に対応する)

( b ) D E ループ：位置 3 における脂肪族残基 (「V / I / L / M / A」)(つまり、配列番号 1 の位置 5 4 に対応する)

( c ) F G ループ：位置 1 における「D / N」(つまり、配列番号 1 の位置 7 7 に対応する)

【0379】

分析した 1 0 4 4 の配列は、1 つを除きすべてが、F G ループ配列パターン ( c ) に従う。分析したすべての特有の配列のうち、9 0 % は、B C ループについてのパターン ( a ) に従い、9 5 % は、D E ループについてのパターン ( b ) に従う。分析した配列は、4 つを除きすべてが、3 つの上記のパターンのうちの少なくとも 2 つに従う。さらに、1 5 アミノ酸 F G ループ長は、注目すべき配列特徴である。

40

【0380】

上記に特徴づけた広範囲の配列モチーフ # 1 に加えて、図 3 5 ~ 3 8 におけるデータは、それぞれの位置の優勢な残基に基づいて第 2 の配列モチーフを特徴づけるために使用した。残基は、最も頻繁なアミノ酸の上位 3 つの合計が 5 0 % を超えた場合、このモチーフ中に含めた。

配列モチーフ # 2

( a ) B C ループ：X X X X X X Y Q (モチーフ # 1 と同じ)、X は任意のアミノ酸とする

50

(b) DEループ: (G/Y/H) (D/M/G) (V/L/I) X、Xは任意のアミノ酸とする

(c) FGループ、10アミノ酸長:

(D/N) (Y/M) (Y/A/M) (Y/H/F) (K/Q/V) (E/P/R) (Y/T/K) X (E/Y/Q) (Y/G/H)、ここで、Xは任意のアミノ酸とする

(d) FGループ、15アミノ酸長:

D (Y/F/W) (Y/F/K) (N/D/P) (P/H/L) (A/T/V) (T/D/S) (H/Y/G) (E/P/V) (Y/H) (T/K/I) (Y/F) (H/N/Q) (T/Q/E) (T/S/I)

【0381】

配列モチーフ#1および#2を特徴づけるために使用した分析法は、ループ内のそれぞれの残基位置を別々に評価する。ループ内の複数の残基にわたるあらゆる配列モチーフを示すために、<sup>10</sup>F<sub>n</sub>3ベースの結合剤はさらなる分析に付した。該分析において、ループ配列は、ClustalWを使用してアライメントした(Thompson JD et al. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Research 22: 4673-4680, 1994)。このアライメントから、配列のファミリーは、手動の検査を使用してグループ化した。BCおよびDEのループについては、配列モチーフ#1および#2に類似している配列パターンが観察された。しかしながら、さらなる配列モチーフを10および15アミノ酸長のFGループについて特徴づけることができた。

配列モチーフ#3

(a) FGループ、10アミノ酸長

(1) DY (A/Y) GKPYXEY (配列番号473)、Xは任意のアミノ酸とする

(2) DY (A/Y) Y (K/R/Q/T) PYXEY (配列番号474)、Xは任意のアミノ酸とする

(3) (D/N) Y (A/Y) (Y/F) (K/R/Q/T) EYXE (Y/H) (配列番号475)、Xは任意のアミノ酸とする

(4) DYY (H/Y) X (R/K) X (E/T) YX (配列番号476)、Xは任意のアミノ酸とする

(5) DYY (H/Y) (K/H/Q) (R/K) T (E/T) Y (G/P) (配列番号477)

(6) (D/N) MMHV (E/D) YXEY (配列番号478)、Xは任意のアミノ酸とする

(7) DYMHHXXYXEY (配列番号479) (679F09のFGループと同様)、Xは任意のアミノ酸とする

(8) D (M/Y) YHX (K/R) X (V/I/L/M) YG (配列番号480)、Xは任意のアミノ酸とする

(b) FGループ、15アミノ酸長

(1) D (Y/F) (Y/F) NPXTHEYXYXXX (配列番号481)、Xは任意のアミノ酸とする

(2) D (Y/F) (Y/F) D (P/L) X (T/S) HXYXYXXX (配列番号482)、Xは任意のアミノ酸とする

(3) D (Y/F) (K/R) PHXDGPH (T/I) YXE (S/Y) (配列番号483)、Xは任意のアミノ酸とする

【0382】

配列分析II: EGFRリン酸化のより強力な阻害を示す<sup>10</sup>F<sub>n</sub>3ベースの結合剤

他の全体的な配列分析は、細胞ベースのアッセイにおいて最も強力な活性を示した<sup>10</sup>F<sub>n</sub>3ベースの結合剤のサブセットに対して実行した(配列分析Iとは対照的に、これらは、Profusionを通してEGFRに対する高親和性結合について選択したすべて

10

20

30

40

50

の結合剤に対して実行した)。結合剤の多くが、単一ポイントでの細胞ベースのアッセイによって実行したのみであったので、100 nMの一定濃度で75%を超えるEGFRリン酸化の阻害を示した結合剤がこの分析中に含まれた。所与の濃度での阻害パーセントは、 $\text{阻害\%} = 100 \times \text{濃度} / (\text{濃度} + \text{IC50})$ により、IC50に関係がある。

#### 【0383】

通常、IC50は、様々な濃度での阻害%についてデータをフィットさせることによって計算する。しかしながら、単一のデータポイントのみがそれぞれの結合剤について入手可能であることを考慮すれば、IC50を計算するためにこの単一のデータポイントを使用することは不適当である。そのため、単一の濃度ポイントでのEGFRシグナリングの阻害パーセントは、結合剤の効力の近似値として使用した。結合剤は100 nMの濃度で75%の阻害を示しうるが、濃度を増加させると、該クローンはより高い濃度で100%の阻害を示すであろう。阻害%は、IC50に反比例する；つまり、阻害%が高いほど、IC50は低くなり、結合剤はより強力になる。結合剤が100 nMの濃度で75%の阻害を示した場合、発明者らは、これを配列分析IIのための「強力な」結合剤と見なした。しかしながら、100 nM濃度で75%未満の阻害を示した結合剤は、大部分、EGFRにまだ結合し、EGFRシグナリングに対してまだ効果を有する。たとえば抗EGFRモノクローナル抗体ニモツズマブ (Friedlander E et al. ErbB-directed immunotherapy: antibodies in current practice and promising new agents. Immunol Lett 116: 126-140, 2008) については、治療薬として現在開発中であるが、それは、EGFRリン酸化アッセイにおいて100 nM濃度で<5%の阻害を示す(データ示さず)。アッセイしたすべての「強力な」結合剤の配列および100 nM濃度でのEGFRリン酸化のそれらの阻害%を図45中に示す。

#### 【0384】

100 nM濃度で>75%の阻害を示した特有の<sup>10</sup>Fn3ベースの結合剤の総数は、111であった。先のように、最初に、配列は、ループ中のそれぞれの位置のアミノ酸の頻度によって分析した(図39~42)。これらの結合剤は、Profusionの間にEGFRに対する高親和性結合について選択されたすべての結合剤のサブセットであるので、それらはまた、配列モチーフ#1に従う(上記を参照されたい)。分析したすべての「強力な」配列は、FGループ配列パターン(位置1において「D/N」)に従う。すべての分析した特有の「強力な」配列のうち、93%は、BCループ(位置7~8において「YQ」)についてのパターンに従い、98%は、DEループ(位置3において脂肪族残基(「V/I/L/M/A」))についてのパターンに従う。分析したすべての「強力な」配列は、3つのパターンの配列モチーフ#1のうちの少なくとも2つに従う。

#### 【0385】

注目すべきことに、15アミノ酸FGループ長もまた、「最も強力な」結合剤において高度に表わされるようである。15アミノ酸長FGループは、EGFRに対する高親和性結合について選択されたすべての結合剤のうちのわずか55%にしか相当しないが(配列分析I)、15アミノ酸FGループは、100 nM濃度でEGFRリン酸化の>50%の阻害を有する結合剤の86%に相当し、>75%の阻害を有する結合剤の91%に相当する(配列分析IIにおける「強力な」結合剤)。そのため、より長い15アミノ酸のFGループは、より大きな効力と関連する配列パターンであるようである。

#### 【0386】

分析した111の「強力な」配列のうち、10のみが10アミノ酸長FGループを含有し、それらのうちの6つは特有である。そのため、単一配列モチーフは、あらゆる「強力な」10アミノ酸FGループ配列を包含し得る。配列モチーフ#4は、これらの6つの配列に基づいて特徴づけた。

配列モチーフ#4

FGループ、10アミノ酸長、「強力な」結合剤

(D/N) (M/Y) (M/A/W) (H/F/Y) (V/K) EY (A/Q/R/S/T) E (Y/H/D)

## 【0387】

15アミノ酸FGループを有する「強力な」結合剤の配列分析はまた、どの残基位置が最も保存されているかをさらに明らかにし、配列モチーフ#5を特徴づけることを可能にした。この配列モチーフ中の「X」は、優勢な3つのアミノ酸がない位置を示す。

配列モチーフ#5

FGループ、15アミノ酸長、「強力な」結合剤

D(Y/F/W)(Y/F/K)(N/P/D)(P/H/L)X(T/D/S)(H/G/Y)(E/P/Y)(Y/H)XYXXX、

Xは任意のアミノ酸とする

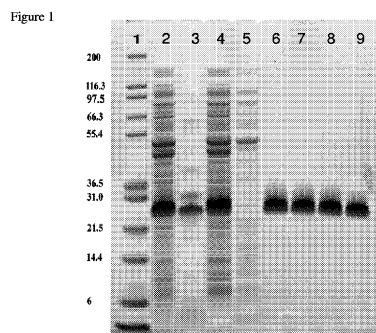
## 【0388】

分析したすべてのEGFR結合剤は、親679F09の子孫であり、配列「ファミリー」を構成する、つまり、それらはすべて前述の配列モチーフによる配列に関係がある。結合剤の679F09ファミリーの様々なメンバーは、T51Iスキファールド変異に耐性があり、結合活性を保持することができる。そのため、EGFRに対する高親和性結合を有する結合剤をさらにもたらすために、T51Iスキファールド変異は、前述の配列モチーフのいずれかと組み合わせることができた。

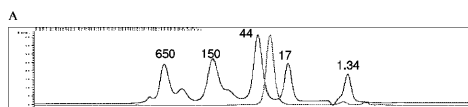
## 【0389】

最後に、構造または機能に対してほとんど効果がないか、または全く効果がないタンパク質配列の中に類似する特性を有するアミノ酸を置換することができることが多いことに注意されたい。これは、実際、同様に<sup>10</sup>F<sub>n</sub>3ベースの結合剤についての場合であり、ループまたはスキファールド領域における保存的アミノ酸置換は、EGFRに結合する結合剤をなおもたらすことができる。たとえば、結合剤E98のFGループの第2の位置における「H」の「Y」への置換は、結合剤E99をもたらし、両方の結合剤は、EGFRリン酸化を阻害する際に類似する効力を示す(図45)。

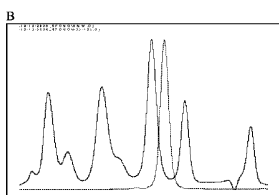
## 【図1】



## 【図2A】

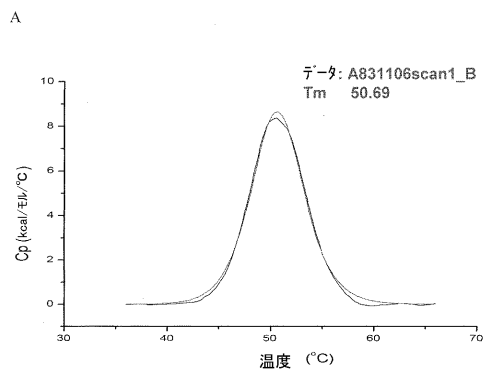


## 【図2B】

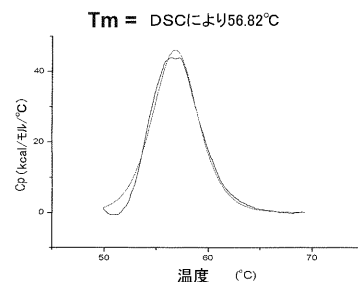


## 【図3】

Figure 3

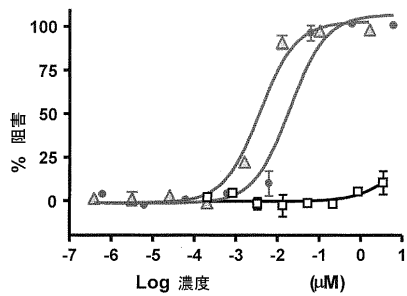


B



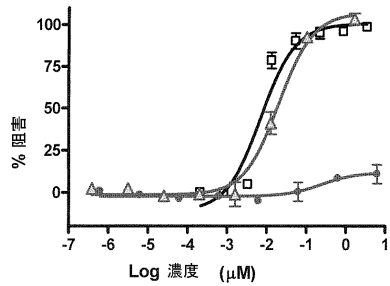
【図 4】

Figure 4



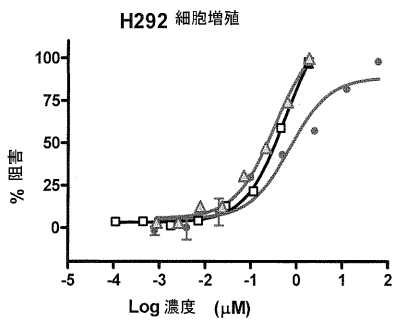
【図 5】

Figure 5



【図 8】

Figure 8



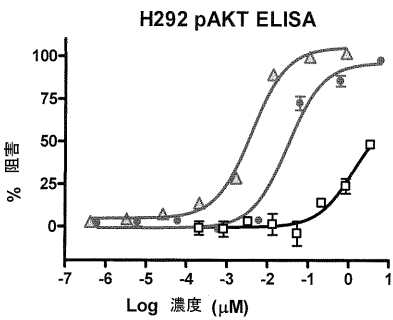
【図 9】

Figure 9

| 細胞ベースのアッセイにおける活性の概要 |                             |                            |                            |                           |                          |
|---------------------|-----------------------------|----------------------------|----------------------------|---------------------------|--------------------------|
| 名称                  | H292<br>pEGFR<br>ELISA (nM) | H292<br>pGFR<br>ELISA (nM) | H292<br>pAKT<br>ELISA (nM) | A431<br>pEGFR<br>ICW (nM) | A431<br>pERK<br>ICW (nM) |
| E1                  | 8                           | ---                        | ---                        | 24                        | 13                       |
| E1-GS10-11 (ペグ化)    | 123                         | 4                          | 5                          | 297                       | 295                      |
| E1-GS10-11          | 30                          | 1                          | 1                          | 36                        | 51                       |
| H-GS10-E1 (ペグ化)     | 127                         | 0.9                        | 0.8                        | 302                       | 300                      |
| H-GS10-E1           | 42                          | 1                          | 1                          | 93                        | 99                       |
| E2                  | 31                          | ---                        | ---                        | 38                        | 40                       |
| E2-GS10-11 (ペグ化)    | 32                          | 0.3                        | 0.6                        | 77                        | 76                       |
| E2-GS10-11          | 8                           | 0.1                        | 0.1                        | 19                        | 20                       |
| H-GS10-E2 (ペグ化)     | 47                          | 0.8                        | 0.6                        | 97                        | 118                      |
| H-GS10-E2           | 8                           | 0.1                        | 0.1                        | 11                        | 15                       |
| E3                  | 21                          | ---                        | ---                        | 14                        | 11                       |
| E3-GS10-11 (ペグ化)    | 10                          | 6                          | 4                          | 42                        | 40                       |
| E3-GS10-11          | 7                           | 6                          | 3                          | 14                        | 12                       |
| H-GS10-E3 (ペグ化)     | 46                          | 2                          | 2                          | 47                        | 50                       |
| H-GS10-E3           | 25                          | 19                         | 26                         | 47                        | 42                       |

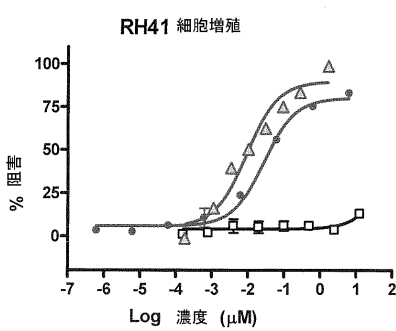
【図 6】

Figure 6



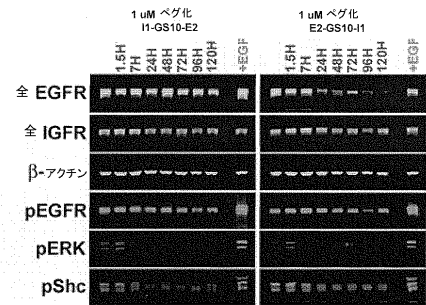
【図 7】

Figure 7



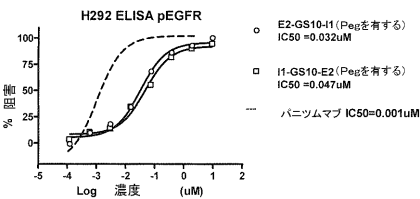
【図 10】

Figure 10



【図 11】

Figure 11



【図 12】

Figure 12A

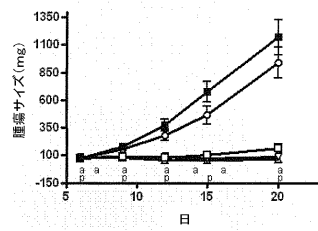
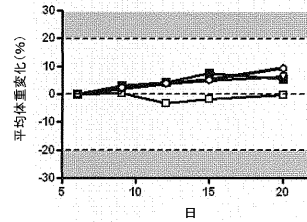
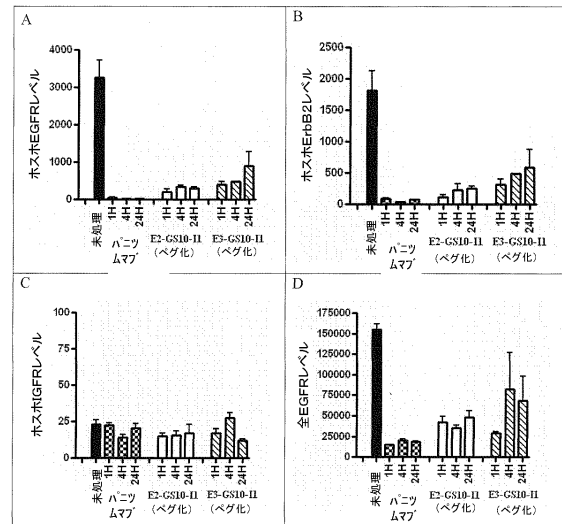


Figure 12B



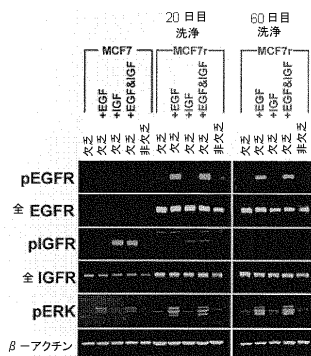
【図 13】

Figure 13



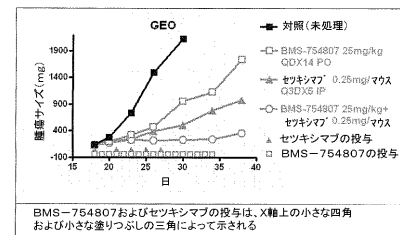
【図 14】

Figure 14



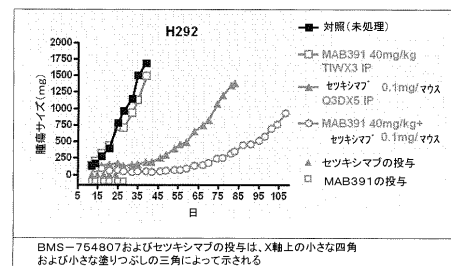
【図 16】

Figure 16



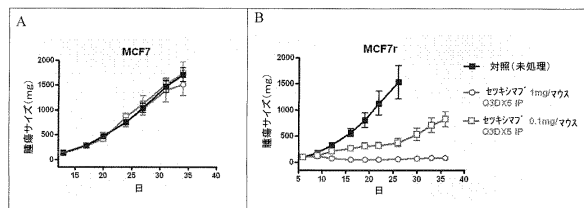
【図 17】

Figure 17



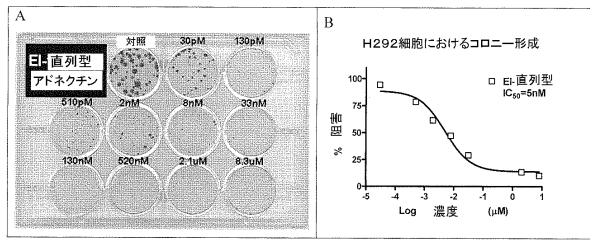
【図 15】

Figure 15



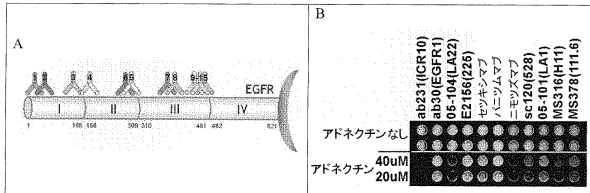
【図 18】

Figure 18



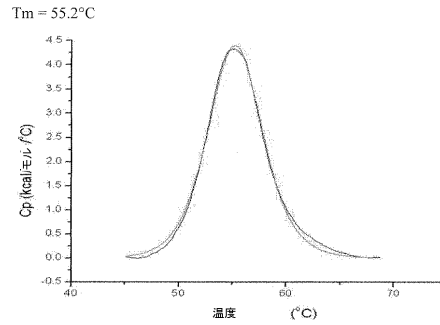
【図 19】

Figure 19



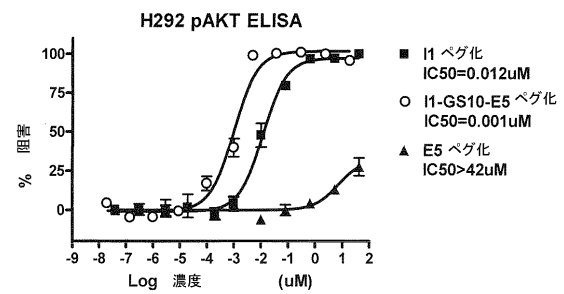
【図 20】

Figure 20



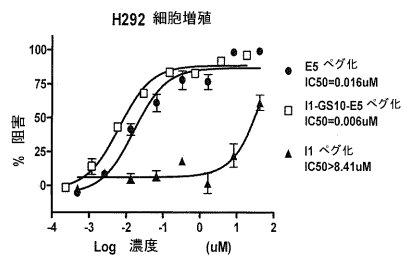
【図 21】

Figure 21



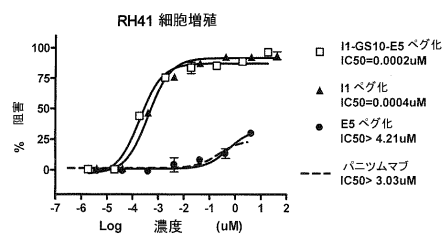
【図 22】

Figure 22



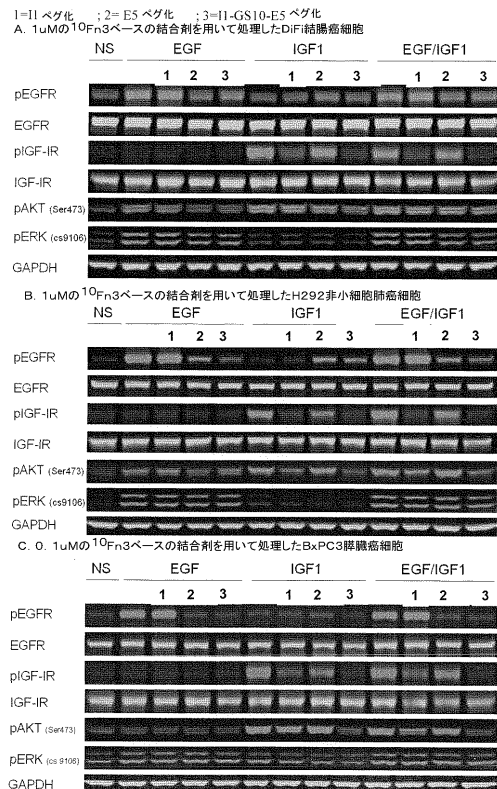
【図 23】

Figure 23



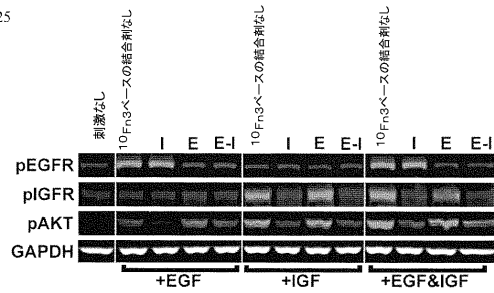
【図 24】

Figure 24



【図 25】

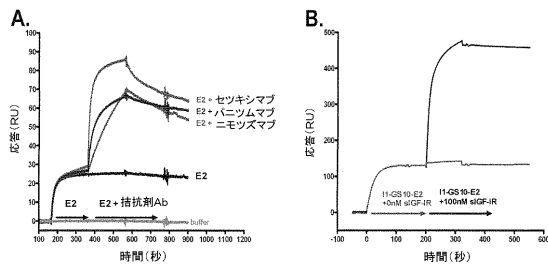
Figure 25



略語は以下のとおりとする：I=11 (非ベグ化)；E=E2 (非ベグ化)；  
E-I=E2-GS10-11 (非ベグ化)

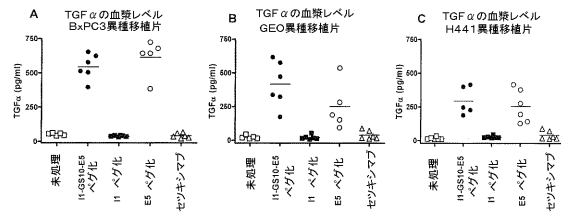
【図 26】

Figure 26



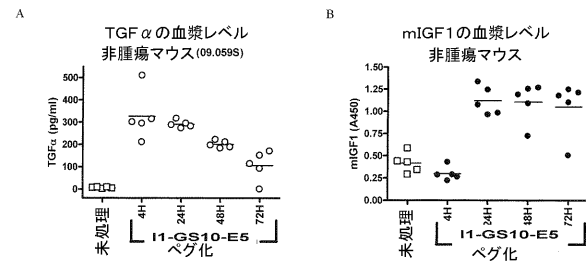
【図 27】

Figure 27



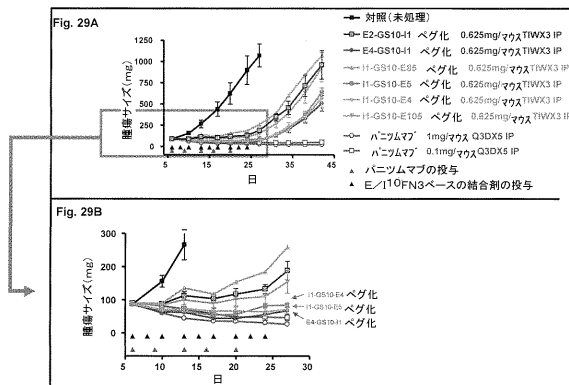
【図 28】

Figure 28



【図 29】

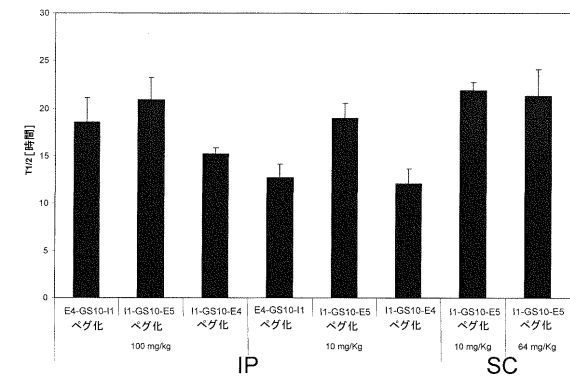
Figure 29



研究 (09年4月14日)に移植し、投薬を開始した(09年4月20日)に50~150mmのサイズの  
範囲に達した

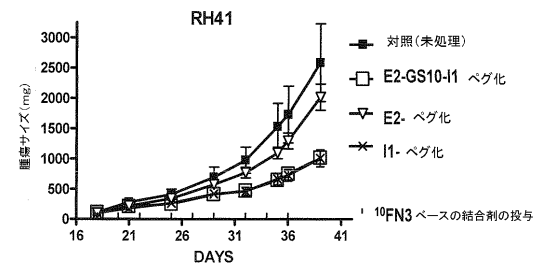
【図 31】

Figure 31



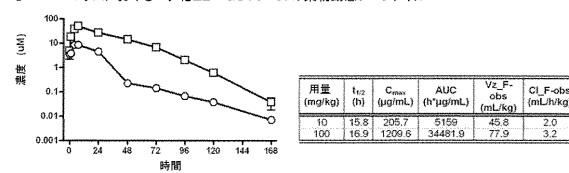
【図 32】

Figure 32



【図 30】

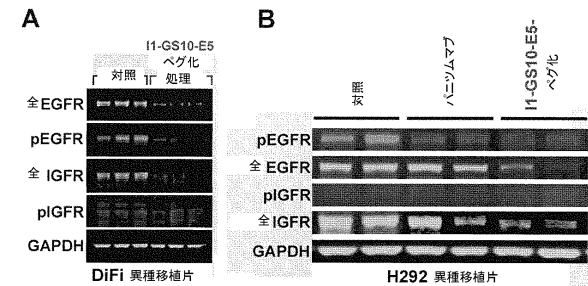
Figure 30. マウスにおけるベグ化E2-GS10-11の薬物動態プロフィール



ipルートによって100mg/kg(□)および10mg/kg(○)でこのコンストラクトを投与した後の  
ベグ化E2-GS10-11血漿レベル

【図 3 3】

Figure 33



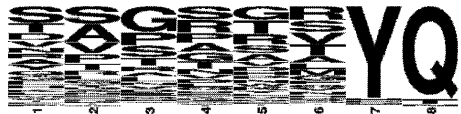
【図 3 4】

Figure 34

BC ループ DE ループ  
MGVSDVPRDLEVAATPTSLISWQVFRPMYQYRITYGETGGNSPVQEFVPGGVRTATISGL  
FG ループ  
KEGVDYITVYAVTDYMHSEYRQYPISINRYTEIDKPSQHHHHHH

【図 3 5】

Figure 35



【図 3 6】

Figure 36



【図 3 7】

Figure 37



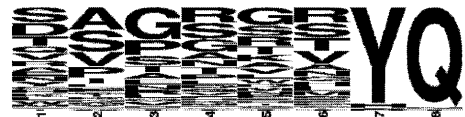
【図 3 8】

Figure 38



【図 3 9】

Figure 39



【図 4 0】

Figure 40



【図 4 1】

Figure 41



【図 4 2】

Figure 42



【図 4 3】

|                               | a     | b     | c      | d        | e   | f   | g    | h    | i     | j      | k    | l    |
|-------------------------------|-------|-------|--------|----------|-----|-----|------|------|-------|--------|------|------|
| ADP<br>pEGFR<br>ICW<br>(nmol) | 297   | 295   | 123    | 4        | +   | +   | 57.9 | 2.43 | 238   | ---    | 49   | >95% |
| E1-GS10-E5<br>ベグ化             | 42    | 40    | 10     | 6        | ++  | ++  | 10.4 | 0.74 | 89    | ---    | 52.5 | >95% |
| E2-GS10-E5<br>ベグ化             | 77    | 78    | 32     | 0.3      | --- | (-) | 10.1 | 1.17 | 25    | 560    | 57.5 | >95% |
| E4-GS10-E5<br>ベグ化             | 124.0 | 124.2 | 134.05 | 0.44±0.2 | (-) | (-) | 4.77 | 0.77 | 19.5  | 5      | 55.5 | >95% |
| E5-GS10-E5<br>ベグ化             | 61.1  | 54.21 | 10.1   | 0.4      | (-) | (-) | 24.2 | 0.96 | 43.8  | ---    | 55   | >95% |
| E8-GS10-E5<br>ベグ化             | 15.0  | 154.2 | 4.1    | 0.3      | (-) | +   | 4.76 | 0.75 | 65.9  | ---    | 54.5 | >95% |
| E9-GS10-E5<br>ベグ化             | 65.0  | 65.9  | 10.1   | 0.4      | --- | --- | 13.5 | 1.5  | 69.1  | ---    | 55.5 | >95% |
| E10-GS10-E5<br>ベグ化            | 56.0  | 61.6  | 15.4   | 0.5      | ++  | ++  | 9.28 | 1.35 | 75    | ---    | 49.5 | >95% |
| E105-GS10-E5<br>ベグ化           | 54.33 | 49.17 | 16.6   | 0.5      | --- | --- | 7.65 | 1.19 | 93.8  | ---    | 56.5 | >95% |
| E106-GS10-E5<br>ベグ化           | 22.15 | 23.4  | 8.3    | 0.44±0.1 | +   | ++  | 7.66 | 0.4  | 150.8 | 1      | 56   | >95% |
| E11-GS10-E5<br>ベグ化            | 12.4  | 13.1  | 4.1    | 0.2      | (-) | (-) | 5.97 | 0.43 | 37.8  | ---    | 58   | >95% |
| E11-GS10-E105<br>ベグ化          | 53.9  | 48.3  | 13.3   | 0.5±0.2  | ++  | ++  | 4.28 | 0.37 | 61.2  | ---    | 59.5 | >95% |
| E11-GS10-E112<br>ベグ化          | 116   | 94    | 16     | 0.3      | --- | --- | 3.35 | 0.38 | 104.3 | ---    | 62.5 | >95% |
| セツホシマツ<br>ベグ化                 | 514   | 9.1   | 5.3    | ---      | ++  | --- | 0.39 | ---  | ---   | 770    | ---  | ---  |
| ハニシムマブ<br>ベグ化                 | 644   | 5.2   | 5.2    | ---      | --- | --- | 0.05 | ---  | 24.4  | 140    | ---  | ---  |
| ニモシマツマブ<br>ベグ化                | >3    | >3    | >3     | ---      | +   | --- | ---  | ---  | 13.6  | ---    | 13.6 | ---  |
| 11                            | ---   | ---   | ---    | 0.44±0.2 | --- | (-) | ---  | 0.11 | ---   | 15.510 | 65.3 | >95% |

Figure 43

【図 4 4】

| 用量            | 分子 | HL_Lamb<br>da_2 (hr) | Cmax<br>(ug/mL) | AUCINF_obs<br>(hr*ug/mL) | Cl_F_obs<br>(mL/hr/kg) | Vz_F_obs<br>(mL/kg) | MRTINF_obs<br>(hr) |
|---------------|----|----------------------|-----------------|--------------------------|------------------------|---------------------|--------------------|
|               |    |                      |                 |                          |                        |                     |                    |
| 100<br>mg/kg  | 平均 | 1.8                  | 3               | 2581.3                   | 3                      | 3                   | 3                  |
|               | SD | 0.6                  | 0.7             | 2581.3                   | 3                      | 3                   | 3                  |
|               | 最小 | 2.0                  | 75.7            | 2058.7                   | 0.5                    | 126.3               | 32.0               |
|               | 最大 | 16.6                 | 434.2           | 18924.8                  | 4.4                    | 122.4               | 31.8               |
|               | 平均 | 21.5                 | 573.0           | 22932.3                  | 5.3                    | 132.2               | 35.6               |
|               | SD | 14.0                 | 14.3            | 9                        | 9                      | 9                   | 9                  |
|               | 最小 | 1.0                  | 14.3            | 9                        | 9                      | 9                   | 9                  |
|               | 最大 | 20.9                 | 719.5           | 22750.1                  | 3.9                    | 117.4               | 33.0               |
|               | 平均 | 2.3                  | 90.4            | 2582.3                   | 0.4                    | 4.1                 | 2.2                |
|               | SD | 0.6                  | 0.7             | 2581.3                   | 3                      | 3                   | 3                  |
| 1000<br>mg/kg | 平均 | 23.9                 | 633.4           | 22062.3                  | 4.4                    | 122.4               | 35.6               |
|               | SD | 11.0                 | 12.6            | 11.6                     | 11.1                   | 13.5                | 6.7                |
|               | 最小 | 3                    | 75.7            | 2058.7                   | 0.5                    | 126.3               | 32.0               |
|               | 最大 | 14.6                 | 533.9           | 25411.7                  | 3.2                    | 70.3                | 52.4               |
|               | 平均 | 15.9                 | 930.4           | 30560.0                  | 3.9                    | 88.1                | 35.5               |
|               | SD | 4.1                  | 26.8            | 9.8                      | 10.0                   | 8.6                 | 5.9                |
|               | 最小 | 1.0                  | 14.3            | 9                        | 9                      | 9                   | 9                  |
|               | 最大 | 12.7                 | 67.2            | 1721.2                   | 6.0                    | 108.4               | 19.6               |
|               | 平均 | 1.4                  | 12.9            | 336.7                    | 1.3                    | 15.1                | 0.9                |
|               | SD | 11.0                 | 52.5            | 1338.0                   | 5.1                    | 95.5                | 18.7               |
| 1000mg        | 平均 | 11.0                 | 19.2            | 10.6                     | 21.8                   | 15.9                | 4.8                |
|               | SD | 2                    | 2               | 2                        | 2                      | 2                   | 2                  |
|               | 最小 | 19.0                 | 80.9            | 2345.6                   | 4.4                    | 118.7               | 25.7               |
|               | 最大 | 17.9                 | 78.7            | 972.4                    | 3.7                    | 106.6               | 20.3               |
|               | 平均 | 20.1                 | 83.2            | 2717.8                   | 5.1                    | 138.8               | 24.1               |
|               | SD | 8.2                  | 3.9             | 22.4                     | 22.4                   | 14.4                | 2.5                |
|               | 最小 | 12.1                 | 65.2            | 185.1                    | 1.6                    | 66.5                | 10.9               |
|               | 最大 | 1.6                  | 15.4            | 426.2                    | 1.1                    | 9.7                 | 0.9                |
|               | 平均 | 10.7                 | 99.6            | 1871.1                   | 4.3                    | 85.0                | 18.6               |
|               | SD | 13.6                 | 17.2            | 25.0                     | 24.0                   | 104.1               | 20.4               |

Figure 44

【図 4 5 - 1】

| 配列番号 | 結合剤 | 100mMでの阻害率 % | 7ミ/酸配列                                                                                                                                  |
|------|-----|--------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 219  | E6  | 80.0         | MGVSDVPRDLVAAATPFTSLLSISWQVPRMXYRITYGETGNSPVQEFVPGVHTATISGLKPGVDYITIVAVTDYK<br>PHADGHTHYHESPIINRYTEIDKFSQ<br>NEATHEKYHQFTISINRYTEIDKFSQ |
| 220  | E7  | 89.4         | MGVSDVPRDLVAAATPFTSLLSISWQVPRMXYRITYGETGNSPVQEFVPGVHTATISGLKPGVDYITIVAVTDYK<br>PHADGHTHYHESPIINRYTEIDKFSQ<br>NEATHEKYHQFTISINRYTEIDKFSQ |
| 221  | E8  | 92.4         | MGVSDVPRDLVAAATPFTSLLSISWQVPRMXYRITYGETGNSPVQEFVPGVHTATISGLKPGVDYITIVAVTDYK<br>PHADGHTHYHESPIINRYTEIDKFSQ<br>NEATHEKYHQFTISINRYTEIDKFSQ |
| 222  | E9  | 77.3         | MGVSDVPRDLVAAATPFTSLLSISWQVPRMXYRITYGETGNSPVQEFVPGVHTATISGLKPGVDYITIVAVTDYK<br>PHADGHTHYHESPIINRYTEIDKFSQ<br>NEATHEKYHQFTISINRYTEIDKFSQ |
| 223  | E10 | 84.7         | MGVSDVPRDLVAAATPFTSLLSISWQVPRMXYRITYGETGNSPVQEFVPGVHTATISGLKPGVDYITIVAVTDYK<br>PHADGHTHYHESPIINRYTEIDKFSQ<br>NEATHEKYHQFTISINRYTEIDKFSQ |
| 224  | E11 | 83.7         | MGVSDVPRDLVAAATPFTSLLSISWQVPRMXYRITYGETGNSPVQEFVPGVHTATISGLKPGVDYITIVAVTDYK<br>PHADGHTHYHESPIINRYTEIDKFSQ<br>NEATHEKYHQFTISINRYTEIDKFSQ |
| 225  | E12 | 76.5         | MGVSDVPRDLVAAATPFTSLLSISWQVPRMXYRITYGETGNSPVQEFVPGVHTATISGLKPGVDYITIVAVTDYK<br>PHADGHTHYHESPIINRYTEIDKFSQ<br>NEATHEKYHQFTISINRYTEIDKFSQ |
| 226  | E13 | 86.7         | MGVSDVPRDLVAAATPFTSLLSISWQVPRMXYRITYGETGNSPVQEFVPGVHTATISGLKPGVDYITIVAVTDYK<br>PHADGHTHYHESPIINRYTEIDKFSQ<br>NEATHEKYHQFTISINRYTEIDKFSQ |
| 227  | E14 | 80.4         | MGVSDVPRDLVAAATPFTSLLSISWQVPRMXYRITYGETGNSPVQEFVPGVHTATISGLKPGVDYITIVAVTDYK<br>PHADGHTHYHESPIINRYTEIDKFSQ<br>NEATHEKYHQFTISINRYTEIDKFSQ |
| 228  | E15 | 88.8         | MGVSDVPRDLVAAATPFTSLLSISWQVPRMXYRITYGETGNSPVQEFVPGVHTATISGLKPGVDYITIVAVTDYK<br>PHADGHTHYHESPIINRYTEIDKFSQ<br>NEATHEKYHQFTISINRYTEIDKFSQ |
| 229  | E16 | 97.7         | MGVSDVPRDLVAAATPFTSLLSISWQVPRMXYRITYGETGNSPVQEFVPGVHTATISGLKPGVDYITIVAVTDYK<br>PHADGHTHYHESPIINRYTEIDKFSQ<br>NEATHEKYHQFTISINRYTEIDKFSQ |
| 230  | E3  | 87.5         | MGVSDVPRDLVAAATPFTSLLSISWQVPRMXYRITYGETGNSPVQEFVPGVHTATISGLKPGVDYITIVAVTDYK<br>PHADGHTHYHESPIINRYTEIDKFSQ<br>NEATHEKYHQFTISINRYTEIDKFSQ |
| 231  | E1  | 85.9         | MGVSDVPRDLVAAATPFTSLLSISWQVPRMXYRITYGETGNSPVQEFVPGVHTATISGLKPGVDYITIVAVTDYK<br>PHADGHTHYHESPIINRYTEIDKFSQ<br>NEATHEKYHQFTISINRYTEIDKFSQ |
| 232  | E17 | 75.5         | MGVSDVPRDLVAAATPFTSLLSISWQVPRMXYRITYGETGNSPVQEFVPGVHTATISGLKPGVDYITIVAVTDYK<br>PHADGHTHYHESPIINRYTEIDKFSQ<br>NEATHEKYHQFTISINRYTEIDKFSQ |

Figure 45

【図 4 5 - 2】

| 配列番号 | 結合剤 | 100mMでの阻害率 % | 7ミ/酸配列                                                                                                                                  |
|------|-----|--------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 233  | E18 | 91.1         | MGVSDVPRDLVAAATPFTSLLSISWQVPRMXYRITYGETGNSPVQEFVPGVHTATISGLKPGVDYITIVAVTDYK<br>PHADGHTHYHESPIINRYTEIDKFSQ<br>NEATHEKYHQFTISINRYTEIDKFSQ |
| 234  | E19 | 84.6         | MGVSDVPRDLVAAATPFTSLLSISWQVPRMXYRITYGETGNSPVQEFVPGVHTATISGLKPGVDYITIVAVTDYK<br>PHADGHTHYHESPIINRYTEIDKFSQ<br>NEATHEKYHQFTISINRYTEIDKFSQ |
| 235  | E20 | 80.2         | MGVSDVPRDLVAAATPFTSLLSISWQVPRMXYRITYGETGNSPVQEFVPGVHTATISGLKPGVDYITIVAVTDYK<br>PHADGHTHYHESPIINRYTEIDKFSQ<br>NEATHEKYHQFTISINRYTEIDKFSQ |
| 236  | E2  | 80.5         | MGVSDVPRDLVAAATPFTSLLSISWQVPRMXYRITYGETGNSPVQEFVPGVHTATISGLKPGVDYITIVAVTDYK<br>PHADGHTHYHESPIINRYTEIDKFSQ<br>NEATHEKYHQFTISINRYTEIDKFSQ |
| 237  | E22 | 83.7         | MGVSDVPRDLVAAATPFTSLLSISWQVPRMXYRITYGETGNSPVQEFVPGVHTATISGLKPGVDYITIVAVTDYK<br>PHADGHTHYHESPIINRYTEIDKFSQ<br>NEATHEKYHQFTISINRYTEIDKFSQ |
| 238  | E23 | 81.1         | MGVSDVPRDLVAAATPFTSLLSISWQVPRMXYRITYGETGNSPVQEFVPGVHTATISGLKPGVDYITIVAVTDYK<br>PHADGHTHYHESPIINRYTEIDKFSQ<br>NEATHEKYHQFTISINRYTEIDKFSQ |
| 239  | E24 | 90.3         | MGVSDVPRDLVAAATPFTSLLSISWQVPRMXYRITYGETGNSPVQEFVPGVHTATISGLKPGVDYITIVAVTDYK<br>PHADGHTHYHESPIINRYTEIDKFSQ<br>NEATHEKYHQFTISINRYTEIDKFSQ |
| 240  | E25 | 77.1         | MGVSDVPRDLVAAATPFTSLLSISWQVPRMXYRITYGETGNSPVQEFVPGVHTATISGLKPGVDYITIVAVTDYK<br>PHADGHTHYHESPIINRYTEIDKFSQ<br>NEATHEKYHQFTISINRYTEIDKFSQ |
| 241  | E26 | 75.4         | MGVSDVPRDLVAAATPFTSLLSISWQVPRMXYRITYGETGNSPVQEFVPGVHTATISGLKPGVDYITIVAVTDYK<br>PHADGHTHYHESPIINRYTEIDKFSQ<br>NEATHEKYHQFTISINRYTEIDKFSQ |
| 242  | E27 | 94.6         | MGVSDVPRDLVAAATPFTSLLSISWQVPRMXYRITYGETGNSPVQEFVPGVHTATISGLKPGVDYITIVAVTDYK<br>PHADGHTHYHESPIINRYTEIDKFSQ<br>NEATHEKYHQFTISINRYTEIDKFSQ |
| 243  | E28 | 85.3         | MGVSDVPRDLVAAATPFTSLLSISWQVPRMXYRITYGETGNSPVQEFVPGVHTATISGLKPGVDYITIVAVTDYK<br>PHADGHTHYHESPIINRYTEIDKFSQ<br>NEATHEKYHQFTISINRYTEIDKFSQ |
| 244  | E29 | 87.9         | MGVSDVPRDLVAAATPFTSLLSISWQVPRMXYRITYGETGNSPVQEFVPGVHTATISGLKPGVDYITIVAVTDYK<br>PHADGHTHYHESPIINRYTEIDKFSQ<br>NEATHEKYHQFTISINRYTEIDKFSQ |
| 245  | E30 | 87.3         | MGVSDVPRDLVAAATPFTSLLSISWQVPRMXYRITYGETGNSPVQEFVPGVHTATISGLKPGVDYITIVAVTDYK<br>PHADGHTHYHESPIINRYTEIDKFSQ<br>NEATHEKYHQFTISINRYTEIDKFSQ |
| 246  | E31 | 75.8         | MGVSDVPRDLVAAATPFTSLLSISWQVPRMXYRITYGETGNSPVQEFVPGVHTATISGLKPGVDYITIVAVTDYK<br>PHADGHTHYHESPIINRYTEIDKFSQ<br>NEATHEKYHQFTISINRYTEIDKFSQ |

Figure 45 つづき

【図 4 5 - 3】

| 配列番号 | 結合剤 | 100mMでの阻害率 % | 7ミ/酸配列                                                                                                                                  |
|------|-----|--------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 247  | E32 | 86.0         | MGVSDVPRDLVAAATPFTSLLSISWQVPRMXYRITYGETGNSPVQEFVPGVHTATISGLKPGVDYITIVAVTDYK<br>PHADGHTHYHESPIINRYTEIDKFSQ<br>NEATHEKYHQFTISINRYTEIDKFSQ |
| 248  | E33 | 75.8         | MGVSDVPRDLVAAATPFTSLLSISWQVPRMXYRITYGETGNSPVQEFVPGVHTATISGLKPGVDYITIVAVTDYK<br>PHADGHTHYHESPIINRYTEIDKFSQ<br>NEATHEKYHQFTISINRYTEIDKFSQ |
| 249  | E34 | 80.4         | MGVSDVPRDLVAAATPFTSLLSISWQVPRMXYRITYGETGNSPVQEFVPGVHTATISGLKPGVDYITIVAVTDYK<br>PHADGHTHYHESPIINRYTEIDKFSQ<br>NEATHEKYHQFTISINRYTEIDKFSQ |
| 250  | E35 | 90.2         | MGVSDVPRDLVAAATPFTSLLSISWQVPRMXYRITYGETGNSPVQEFVPGVHTATISGLKPGVDYITIVAVTDYK<br>PHADGHTHYHESPIINRYTEIDKFSQ<br>NEATHEKYHQFTISINRYTEIDKFSQ |
| 251  | E36 | 81.3         | MGVSDVPRDLVAAATPFTSLLSISWQVPRMXYRITYGETGNSPVQEFVPGVHTATISGLKPGVDYITIVAVTDYK<br>PHADGHTHYHESPIINRYTEIDKFSQ<br>NEATHEKYHQFTISINRYTEIDKFSQ |
| 252  | E37 | 80.8         | MGVSDVPRDLVAAATPFTSLLSISWQVPRMXYRITYGETGNSPVQEFVPGVHTATISGLKPGVDYITIVAVTDYK<br>PHADGHTHYHESPIINRYTEIDKFSQ<br>NEATHEKYHQFTISINRYTEIDKFSQ |
| 253  | E38 | 89.8         | MGVSDVPRDLVAAATPFTSLLSISWQVPRMXYRITYGETGNSPVQEFVPGVHTATISGLKPGVDYITIVAVTDYK<br>PHADGHTHYHESPIINRYTEIDKFSQ<br>NEATHEKYHQFTISINRYTEIDKFSQ |
| 254  | E39 | 76.7         | MGVSDVPRDLVAAATPFTSLLSISWQVPRMXYRITYGETGNSPVQEFVPGVHTATISGLKPGVDYITIVAVTDYK<br>PHADGHTHYHESPIINRYTEIDKFSQ<br>NEATHEKYHQFTISINRYTEIDKFSQ |
| 255  | E40 | 89.6         | MGVSDVPRDLVAAATPFTSLLSISWQVPRMXYRITYGETGNSPVQEFVPGVHTATISGLKPGVDYITIVAVTDYK<br>PHADGHTHYHESPIINRYTEIDKFSQ<br>NEATHEKYHQFTISINRYTEIDKFSQ |
| 256  | E41 | 75.2         | MGVSDVPRDLVAAATPFTSLLSISWQVPRMXYRITYGETGNSPVQEFVPGVHTATISGLKPGVDYITIVAVTDYK<br>PHADGHTHYHESPIINRYTEIDKFSQ<br>NEATHEKYHQFTISINRYTEIDKFSQ |
| 257  | E42 | 77.3         | MGVSDVPRDLVAAATPFTSLLSISWQVPRMXYRITYGETGNSPVQEFVPGVHTATISGLKPGVDYITIVAVTDYK<br>PHADGHTHYHESPIINRYTEIDKFSQ<br>NEATHEKYHQFTISINRYTEIDKFSQ |
| 258  | E43 | 75.0         | MGVSDVPRDLVAAATPFTSLLSISWQVPRMXYRITYGETGNSPVQEFVPGVHTATISGLKPGVDYITIVAVTDYK<br>PHADGHTHYHESPIINRYTEIDKFSQ<br>NEATHEKYHQFTISINRYTEIDKFSQ |
| 259  | E44 | 83.3         | MGVSDVPRDLVAAATPFTSLLSISWQVPRMXYRITYGETGNSPVQEFVPGVHTATISGLKPGVDYITIVAVTDYK<br>PHADGHTHYHESPIINRYTEIDKFSQ<br>NEATHEKYHQFTISINRYTEIDKFSQ |
| 260  | E45 | 80.4         | MGVSDVPRDLVAAATPFTSLLSISWQVPRMXYRITYGETGNSPVQEFVPGVHTATISGLKPGVDYITIVAVTDYK<br>PHADGHTHYHESPIINRYTEIDKFSQ<br>NEATHEKYHQFTISINRYTEIDKFSQ |

Figure 45 つづき

【図 45 - 4】

Figure 45 つづき

| 配列番号            | 結合率 | 100nMでの阻害率 % | 7nM/濃配列                                                                                                    |
|-----------------|-----|--------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 261             | E46 | 77.0         | MGVSDVPRDLEVAAPPTSLISWASGSLQYVRIITYGETGNSPQVEFTVPGVATATISGLKPGVDYTTTAAVTDYK<br>EFDGHIYQAFPIISINRTEIDKFSQ   |
| 262             | E47 | 76.9         | MGVSDVPRDLEVAAPPTSLISWAFASQDQYVRIITYGETGNSPQVEFTVPGQVPTATISGLKPGVDYTTTAAVTDYK<br>NPATHEYKHQPIISINRTEIDKFSQ |
| 263             | E48 | 88.6         | MGVSDVPRDLEVAAPPTSLISWASATAXQYVRIITYGETGNSPQVEFTVPGVATATISGLKPGVDYTTTAAVTDYK<br>NWATHEYKHQPIISINRTEIDKFSQ  |
| 264             | E49 | 83.5         | MGVSDVPRDLEVAAPPTSLISWASGSLQYVRIITYGETGNSPQVEFTVPGQVPTATISGLKPGVDYTTTAAVTDYK<br>NEPHEIYKHQPIISINRTEIDKFSQ  |
| 265             | E50 | 77.4         | MGVSDVPRDLEVAAPPTSLISWVGLSVQYVRIITYGETGNSPQVEFTVPGWSTATISGLKPGVDYTTTAAVTDYK<br>PHADGHEIYKHQPIISINRTEIDKFSQ |
| 266             | E51 | 82.8         | MGVSDVPRDLEVAAPPTSLISWASGSLQYVRIITYGETGNSPQVEFTVPGVATATISGLKPGVDYTTTAAVTDYK<br>NPATHEYKHQPIISINRTEIDKFSQ   |
| 267             | E52 | 75.3         | MGVSDVPRDLEVAAPPTSLISWQVFRWQYVRIITYGETGNSPQVEFTVPGVATATISGLKPGVDYTTTAAVTDYK<br>EFTGREDPIQVPIISINRTEIDKFSQ  |
| 268             | E53 | 79.8         | MGVSDVPRDLEVAAPPTSLISWASGSLQYVRIITYGETGNSPQVEFTVPGVATATISGLKPGVDYTTTAAVTDYK<br>NPATHEYKHQPIISINRTEIDKFSQ   |
| 113,ここに X = Ser | E5  | 99.1         | MGVSDVPRDLEVAAPPTSLISWASGSLQYVRIITYGETGNSPQVEFTVPGVATATISGLKPGVDYTTTAAVTDYK<br>PHADGHEIYKHQPIISINRTEIDKFSQ |
| 269             | E54 | 76.1         | MGVSDVPRDLEVAAPPTSLISWASGSLQYVRIITYGETGNSPQVEFTVPGVATATISGLKPGVDYTTTAAVTDYK<br>NEPHEIYKHQPIISINRTEIDKFSQ   |
| 270             | E55 | 99.1         | MGVSDVPRDLEVAAPPTSLISWASGSLQYVRIITYGETGNSPQVEFTVPGVATATISGLKPGVDYTTTAAVTDYK<br>NPATHEYKHQPIISINRTEIDKFSQ   |
| 271             | E56 | 84.2         | MGVSDVPRDLEVAAPPTSLISWASGSLQYVRIITYGETGNSPQVEFTVPGVATATISGLKPGVDYTTTAAVTDYK<br>NPATHEYKHQPIISINRTEIDKFSQ   |
| 272             | E57 | 75.5         | MGVSDVPRDLEVAAPPTSLISWASGSLQYVRIITYGETGNSPQVEFTVPGVATATISGLKPGVDYTTTAAVTDYK<br>NEPHEIYKHQPIISINRTEIDKFSQ   |
| 273             | E58 | 79.7         | MGVSDVPRDLEVAAPPTSLISWASGSLQYVRIITYGETGNSPQVEFTVPGVATATISGLKPGVDYTTTAAVTDYK<br>NEPHEIYKHQPIISINRTEIDKFSQ   |

Figure 45 つづき

| 配列番号 | 結合率 | 100nMでの阻害率 % | 7nM/濃配列                                                                                                    |
|------|-----|--------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 274  | E59 | 76.3         | MGVSDVPRDLEVAAPPTSLISWASGSLQYVRIITYGETGNSPQVEFTVPGVATATISGLKPGVDYTTTAAVTDYK<br>NPATHEYKHQPIISINRTEIDKFSQ   |
| 275  | E60 | 100.0        | MGVSDVPRDLEVAAPPTSLISWASGSLQYVRIITYGETGNSPQVEFTVPGVATATISGLKPGVDYTTTAAVTDYK<br>PHADGHEIYKHQPIISINRTEIDKFSQ |
| 276  | E61 | 79.8         | MGVSDVPRDLEVAAPPTSLISWASGSLQYVRIITYGETGNSPQVEFTVPGVATATISGLKPGVDYTTTAAVTDYK<br>NPATHEYKHQPIISINRTEIDKFSQ   |
| 277  | E62 | 78.9         | MGVSDVPRDLEVAAPPTSLISWASGSLQYVRIITYGETGNSPQVEFTVPGVATATISGLKPGVDYTTTAAVTDYK<br>NPATHEYKHQPIISINRTEIDKFSQ   |
| 278  | E63 | 76.2         | MGVSDVPRDLEVAAPPTSLISWASGSLQYVRIITYGETGNSPQVEFTVPGVATATISGLKPGVDYTTTAAVTDYK<br>DEPHEIYKHQPIISINRTEIDKFSQ   |
| 279  | E64 | 78.2         | MGVSDVPRDLEVAAPPTSLISWASGSLQYVRIITYGETGNSPQVEFTVPGVATATISGLKPGVDYTTTAAVTDYK<br>NPATHEYKHQPIISINRTEIDKFSQ   |
| 280  | E65 | 80.7         | MGVSDVPRDLEVAAPPTSLISWASGSLQYVRIITYGETGNSPQVEFTVPGVATATISGLKPGVDYTTTAAVTDYK<br>NPATHEYKHQPIISINRTEIDKFSQ   |
| 281  | E66 | 75.0         | MGVSDVPRDLEVAAPPTSLISWASGSLQYVRIITYGETGNSPQVEFTVPGVATATISGLKPGVDYTTTAAVTDYK<br>NPATHEYKHQPIISINRTEIDKFSQ   |
| 282  | E67 | 75.3         | MGVSDVPRDLEVAAPPTSLISWASGSLQYVRIITYGETGNSPQVEFTVPGVATATISGLKPGVDYTTTAAVTDYK<br>NPATHEYKHQPIISINRTEIDKFSQ   |
| 283  | E68 | 78.5         | MGVSDVPRDLEVAAPPTSLISWASGSLQYVRIITYGETGNSPQVEFTVPGVATATISGLKPGVDYTTTAAVTDYK<br>NPATHEYKHQPIISINRTEIDKFSQ   |
| 284  | E69 | 85.1         | MGVSDVPRDLEVAAPPTSLISWASGSLQYVRIITYGETGNSPQVEFTVPGVATATISGLKPGVDYTTTAAVTDYK<br>NPATHEYKHQPIISINRTEIDKFSQ   |
| 285  | E70 | 76.8         | MGVSDVPRDLEVAAPPTSLISWASGSLQYVRIITYGETGNSPQVEFTVPGVATATISGLKPGVDYTTTAAVTDYK<br>NPATHEYKHQPIISINRTEIDKFSQ   |
| 286  | E71 | 80.4         | MGVSDVPRDLEVAAPPTSLISWASGSLQYVRIITYGETGNSPQVEFTVPGVATATISGLKPGVDYTTTAAVTDYK<br>NPATHEYKHQPIISINRTEIDKFSQ   |
| 287  | E72 | 82.8         | MGVSDVPRDLEVAAPPTSLISWASGSLQYVRIITYGETGNSPQVEFTVPGVATATISGLKPGVDYTTTAAVTDYK<br>NPATHEYKHQPIISINRTEIDKFSQ   |

【図 45 - 6】

Figure 45 つづき

| 配列番号               | 結合率 | 100nMでの阻害率 % | 7nM/濃配列                                                                                                    |
|--------------------|-----|--------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 288                | E73 | 78.8         | MGVSDVPRDLEVAAPPTSLISWASGSLQYVRIITYGETGNSPQVEFTVPGVATATISGLKPGVDYTTTAAVTDYK<br>NPATHEYKHQPIISINRTEIDKFSQ   |
| 289                | E74 | 80.9         | MGVSDVPRDLEVAAPPTSLISWASGSLQYVRIITYGETGNSPQVEFTVPGVATATISGLKPGVDYTTTAAVTDYK<br>NPATHEYKHQPIISINRTEIDKFSQ   |
| 290                | E75 | 76.5         | MGVSDVPRDLEVAAPPTSLISWASGSLQYVRIITYGETGNSPQVEFTVPGVATATISGLKPGVDYTTTAAVTDYK<br>NPATHEYKHQPIISINRTEIDKFSQ   |
| 291                | E76 | 79.0         | MGVSDVPRDLEVAAPPTSLISWASGSLQYVRIITYGETGNSPQVEFTVPGVATATISGLKPGVDYTTTAAVTDYK<br>NPATHEYKHQPIISINRTEIDKFSQ   |
| 292                | E77 | 81.1         | MGVSDVPRDLEVAAPPTSLISWASGSLQYVRIITYGETGNSPQVEFTVPGVATATISGLKPGVDYTTTAAVTDYK<br>NPATHEYKHQPIISINRTEIDKFSQ   |
| 293                | E78 | 76.9         | MGVSDVPRDLEVAAPPTSLISWASGSLQYVRIITYGETGNSPQVEFTVPGVATATISGLKPGVDYTTTAAVTDYK<br>NPATHEYKHQPIISINRTEIDKFSQ   |
| 294                | E79 | 99.2         | MGVSDVPRDLEVAAPPTSLISWASGSLQYVRIITYGETGNSPQVEFTVPGVATATISGLKPGVDYTTTAAVTDYK<br>NPATHEYKHQPIISINRTEIDKFSQ   |
| 295                | E80 | 89.6         | MGVSDVPRDLEVAAPPTSLISWASGSLQYVRIITYGETGNSPQVEFTVPGVATATISGLKPGVDYTTTAAVTDYK<br>NPATHEYKHQPIISINRTEIDKFSQ   |
| 296                | E81 | 75.1         | MGVSDVPRDLEVAAPPTSLISWASGSLQYVRIITYGETGNSPQVEFTVPGVATATISGLKPGVDYTTTAAVTDYK<br>PHADGHEIYKHQPIISINRTEIDKFSQ |
| 297                | E82 | 77.2         | MGVSDVPRDLEVAAPPTSLISWASGSLQYVRIITYGETGNSPQVEFTVPGVATATISGLKPGVDYTTTAAVTDYK<br>PHADGHEIYKHQPIISINRTEIDKFSQ |
| 298                | E83 | 90.7         | MGVSDVPRDLEVAAPPTSLISWASGSLQYVRIITYGETGNSPQVEFTVPGVATATISGLKPGVDYTTTAAVTDYK<br>NPATHEYKHQPIISINRTEIDKFSQ   |
| 299                | E84 | 86.5         | MGVSDVPRDLEVAAPPTSLISWASGSLQYVRIITYGETGNSPQVEFTVPGVATATISGLKPGVDYTTTAAVTDYK<br>NPATHEYKHQPIISINRTEIDKFSQ   |
| 300                | E85 | 89.3         | MGVSDVPRDLEVAAPPTSLISWASGSLQYVRIITYGETGNSPQVEFTVPGVATATISGLKPGVDYTTTAAVTDYK<br>NPATHEYKHQPIISINRTEIDKFSQ   |
| 配列番号107<br>変異1~108 | E4  | 94.3         | MGVSDVPRDLEVAAPPTSLISWASGSLQYVRIITYGETGNSPQVEFTVPGVATATISGLKPGVDYTTTAAVTDYK<br>NPATHEYKHQPIISINRTEIDKFSQ   |

Figure 45 つづき

| 配列番号        | 結合率 | 100nMでの阻害率 % | 7nM/濃配列                                                                                                    |
|-------------|-----|--------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| ここに X = Ser |     |              |                                                                                                            |
| 301         | E86 | 84.7         | MGVSDVPRDLEVAAPPTSLISWASGSLQYVRIITYGETGNSPQVEFTVPGVATATISGLKPGVDYTTTAAVTDYK<br>NPATHEYKHQPIISINRTEIDKFSQ   |
| 302         | E87 | 87.0         | MGVSDVPRDLEVAAPPTSLISWASGSLQYVRIITYGETGNSPQVEFTVPGVATATISGLKPGVDYTTTAAVTDYK<br>NPATHEYKHQPIISINRTEIDKFSQ   |
| 303         | E88 | 89.3         | MGVSDVPRDLEVAAPPTSLISWASGSLQYVRIITYGETGNSPQVEFTVPGVATATISGLKPGVDYTTTAAVTDYK<br>NPATHEYKHQPIISINRTEIDKFSQ   |
| 304         | E89 | 82.6         | MGVSDVPRDLEVAAPPTSLISWASGSLQYVRIITYGETGNSPQVEFTVPGVATATISGLKPGVDYTTTAAVTDYK<br>NPATHEYKHQPIISINRTEIDKFSQ   |
| 305         | E90 | 81.3         | MGVSDVPRDLEVAAPPTSLISWASGSLQYVRIITYGETGNSPQVEFTVPGVATATISGLKPGVDYTTTAAVTDYK<br>NPATHEYKHQPIISINRTEIDKFSQ   |
| 306         | E91 | 84.7         | MGVSDVPRDLEVAAPPTSLISWASGSLQYVRIITYGETGNSPQVEFTVPGVATATISGLKPGVDYTTTAAVTDYK<br>NPATHEYKHQPIISINRTEIDKFSQ   |
| 307         | E92 | 88.5         | MGVSDVPRDLEVAAPPTSLISWASGSLQYVRIITYGETGNSPQVEFTVPGVATATISGLKPGVDYTTTAAVTDYK<br>NPATHEYKHQPIISINRTEIDKFSQ   |
| 308         | E93 | 76.9         | MGVSDVPRDLEVAAPPTSLISWASGSLQYVRIITYGETGNSPQVEFTVPGVATATISGLKPGVDYTTTAAVTDYK<br>PHADGHEIYKHQPIISINRTEIDKFSQ |
| 309         | E94 | 78.7         | MGVSDVPRDLEVAAPPTSLISWASGSLQYVRIITYGETGNSPQVEFTVPGVATATISGLKPGVDYTTTAAVTDYK<br>PHADGHEIYKHQPIISINRTEIDKFSQ |
| 310         | E95 | 98.0         | MGVSDVPRDLEVAAPPTSLISWASGSLQYVRIITYGETGNSPQVEFTVPGVATATISGLKPGVDYTTTAAVTDYK<br>NPATHEYKHQPIISINRTEIDKFSQ   |
| 311         | E96 | 91.7         | MGVSDVPRDLEVAAPPTSLISWASGSLQYVRIITYGETGNSPQVEFTVPGVATATISGLKPGVDYTTTAAVTDYK<br>NPATHEYKHQPIISINRTEIDKFSQ   |
| 312         | E97 | 89.3         | MGVSDVPRDLEVAAPPTSLISWASGSLQYVRIITYGETGNSPQVEFTVPGVATATISGLKPGVDYTTTAAVTDYK<br>PHADGHEIYKHQPIISINRTEIDKFSQ |
| 313         | E98 | 75.8         | MGVSDVPRDLEVAAPPTSLISWASGSLQYVRIITYGETGNSPQVEFTVPGVATATISGLKPGVDYTTTAAVTDYK<br>PHADGHEIYKHQPIISINRTEIDKFSQ |

【図 45 - 5】

【図 45 - 7】

【図 4 5 - 8】

Figure 45 つづき

| 配列番号 | 結合例  | 100MCTの<br>留意率% | 7ミ、補正列                                                                                                     |
|------|------|-----------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 314  | E99  | 84.7            | MGVSDFRDLVEVAAPTSLISLWDAPEKQYVYRITVGTGNSPQVEFTVPGCVRTATISGLKPGVDYITVAVTDYK<br>PHADGPHYHEPISINRYTEIDKPSQ    |
| 315  | E100 | 83.3            | MGVSDFRDLVEVAAPTSLISLWPEAKNSQYVYRITVGTGNSPQVEFTVPHDLVATISGLKPGVDYITVAVTDHK<br>PHADGPHYHEPISINRYTEIDKPSQ    |
| 316  | E101 | 90.9            | MGVSDFRDLVEVAAPTSLISLWDAEANTYQYVYRITVGTGNSPQVEFTVPHDLVATISGLKPGVDYITVAVTDYK<br>PHADGPHYHEPISINRYTEIDKPSQ   |
| 317  | E102 | 80.0            | MGVSDFRDLVEVAAPTSLISLWTEAKNSQYVYRITVGTGNSPQVEFTVPHDLVATISGLKPGVDYITVAVTDHK<br>PHADGPHYHEPISINRYTEIDKPSQ    |
| 318  | E103 | 76.3            | MGVSDFRDLVEVAAPTSLISLWTEAKNSQYVYRITVGTGNSPQVEFTVPGCVRTATISGLKPGVDYITVAVTDMM<br>HVEYSEYFISINRYTEIDKPSQ      |
| 319  | E104 | 88.3            | MGVSDFRDLVEVAAPTSLISLWDAEANTYQYVYRITVGTGNSPQVEFTVPHDLVATISGLKPGVDYITVAVTDHK<br>PHADGPHYHEPISINRYTEIDKPSQ   |
| 320  | E105 | 87.0            | MGVSDFRDLVEVAAPTSLISLWDAETSRVQYVYRITVGTGNSPQVEFTVPGSLSTATISGLKPGVDYITVAVTDYK<br>PHADGPHYHEPISINRYTEIDKPSQ  |
| 321  | E106 | 84.0            | MGVSDFRDLVEVAAPTSLISLWDAETSRVQYVYRITVGTGNSPQVEFTVPGVDYITATISGLKPGVDYITVAVTDYK<br>PHADGPHYHEPISINRYTEIDKPSQ |
| 322  | E107 | 75.8            | MGVSDFRDLVEVAAPTSLISLWDSGRGYSQYVYRITVGTGNSPQVEFTVPHDVYVATISGLKPGVDYITVAVTDMM<br>HVEYTEFISINRYTEIDKPSQ      |
| 323  | E108 | 80.0            | MGVSDFRDLVEVAAPTSLISLWDAEANTYQYVYRITVGTGNSPQVEFTVPGCVRTATISGLKPGVDYITVAVTDYK<br>PHADGPHYHEPISINRYTEIDKPSQ  |
| 324  | E109 | 90.9            | MGVSDFRDLVEVAAPTSLISLWDAETSRVQYVYRITVGTGNSPQVEFTVPHDLVATISGLKPGVDYITVAVTDYK<br>PHADGPHYHEPISINRYTEIDKPSQ   |
| 325  | E110 | 81.3            | MGVSDFRDLVEVAAPTSLISLWDAEANTYQYVYRITVGTGNSPQVEFTVPGSVRATISGLKPGVDYITVAVTDYK<br>PHADGPHYHEPISINRYTEIDKPSQ   |
| 326  | E111 | 85.5            | MGVSDFRDLVEVAAPTSLISLWDAETSRVQYVYRITVGTGNSPQVEFTVPHDLVATISGLKPGVDYITVAVTDMM<br>HVEYSEYFISINRYTEIDKPSQ      |
| 327  | E112 | 86.2            | MGVSDFRDLVEVAAPTSLISLWDAEANTYQYVYRITVGTGNSPQVEFTVPGCVRTATISGLKPGVDYITVAVTDYK<br>PHADGPHYHEPISINRYTEIDKPSQ  |

【図 4 6】

Figure 46

|    |             |            |                  |         |                  |     |         |        |
|----|-------------|------------|------------------|---------|------------------|-----|---------|--------|
| 21 | EWAAFTSLLI  | SWAAFTSLLI | YHITIGTSGSPQVETV | PGQVETV | ATISGKRGQVDTIVAV | 76  | PGQVETV | ISINRT |
| 22 | KWAAPFTSLLI | SWAAFTSLLI | YHITIGTSGSPQVETV | PGQVETV | ATISGKRGQVDTIVAV | 77  | PGQVETV | ISINRT |
| 23 | KWAAPFTSLLI | SWAAFTSLLI | YHITIGTSGSPQVETV | PGQVETV | ATISGKRGQVDTIVAV | 78  | PGQVETV | ISINRT |
| 24 | KWAAPFTSLLI | SWAAFTSLLI | YHITIGTSGSPQVETV | PGQVETV | ATISGKRGQVDTIVAV | 79  | PGQVETV | ISINRT |
| 25 | KWAAPFTSLLI | SWAAFTSLLI | YHITIGTSGSPQVETV | PGQVETV | ATISGKRGQVDTIVAV | 80  | PGQVETV | ISINRT |
| 26 | KWAAPFTSLLI | SWAAFTSLLI | YHITIGTSGSPQVETV | PGQVETV | ATISGKRGQVDTIVAV | 81  | PGQVETV | ISINRT |
| 27 | KWAAPFTSLLI | SWAAFTSLLI | YHITIGTSGSPQVETV | PGQVETV | ATISGKRGQVDTIVAV | 82  | PGQVETV | ISINRT |
| 28 | KWAAPFTSLLI | SWAAFTSLLI | YHITIGTSGSPQVETV | PGQVETV | ATISGKRGQVDTIVAV | 83  | PGQVETV | ISINRT |
| 29 | KWAAPFTSLLI | SWAAFTSLLI | YHITIGTSGSPQVETV | PGQVETV | ATISGKRGQVDTIVAV | 84  | PGQVETV | ISINRT |
| 30 | KWAAPFTSLLI | SWAAFTSLLI | YHITIGTSGSPQVETV | PGQVETV | ATISGKRGQVDTIVAV | 85  | PGQVETV | ISINRT |
| 31 | KWAAPFTSLLI | SWAAFTSLLI | YHITIGTSGSPQVETV | PGQVETV | ATISGKRGQVDTIVAV | 86  | PGQVETV | ISINRT |
| 32 | KWAAPFTSLLI | SWAAFTSLLI | YHITIGTSGSPQVETV | PGQVETV | ATISGKRGQVDTIVAV | 87  | PGQVETV | ISINRT |
| 33 | KWAAPFTSLLI | SWAAFTSLLI | YHITIGTSGSPQVETV | PGQVETV | ATISGKRGQVDTIVAV | 88  | PGQVETV | ISINRT |
| 34 | KWAAPFTSLLI | SWAAFTSLLI | YHITIGTSGSPQVETV | PGQVETV | ATISGKRGQVDTIVAV | 89  | PGQVETV | ISINRT |
| 35 | KWAAPFTSLLI | SWAAFTSLLI | YHITIGTSGSPQVETV | PGQVETV | ATISGKRGQVDTIVAV | 90  | PGQVETV | ISINRT |
| 36 | KWAAPFTSLLI | SWAAFTSLLI | YHITIGTSGSPQVETV | PGQVETV | ATISGKRGQVDTIVAV | 91  | PGQVETV | ISINRT |
| 37 | KWAAPFTSLLI | SWAAFTSLLI | YHITIGTSGSPQVETV | PGQVETV | ATISGKRGQVDTIVAV | 92  | PGQVETV | ISINRT |
| 38 | KWAAPFTSLLI | SWAAFTSLLI | YHITIGTSGSPQVETV | PGQVETV | ATISGKRGQVDTIVAV | 93  | PGQVETV | ISINRT |
| 39 | KWAAPFTSLLI | SWAAFTSLLI | YHITIGTSGSPQVETV | PGQVETV | ATISGKRGQVDTIVAV | 94  | PGQVETV | ISINRT |
| 40 | KWAAPFTSLLI | SWAAFTSLLI | YHITIGTSGSPQVETV | PGQVETV | ATISGKRGQVDTIVAV | 95  | PGQVETV | ISINRT |
| 41 | KWAAPFTSLLI | SWAAFTSLLI | YHITIGTSGSPQVETV | PGQVETV | ATISGKRGQVDTIVAV | 96  | PGQVETV | ISINRT |
| 42 | KWAAPFTSLLI | SWAAFTSLLI | YHITIGTSGSPQVETV | PGQVETV | ATISGKRGQVDTIVAV | 97  | PGQVETV | ISINRT |
| 43 | KWAAPFTSLLI | SWAAFTSLLI | YHITIGTSGSPQVETV | PGQVETV | ATISGKRGQVDTIVAV | 98  | PGQVETV | ISINRT |
| 44 | KWAAPFTSLLI | SWAAFTSLLI | YHITIGTSGSPQVETV | PGQVETV | ATISGKRGQVDTIVAV | 99  | PGQVETV | ISINRT |
| 45 | KWAAPFTSLLI | SWAAFTSLLI | YHITIGTSGSPQVETV | PGQVETV | ATISGKRGQVDTIVAV | 100 | PGQVETV | ISINRT |

【図 4 7 - 1】

Figure 47

[illegible]

【图 4 7 - 2】

Figure 47 つづき

[illegible]

【図 4 7 - 3】

| 配列番号 | 結合相 | ヌクレオチド配列                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
|------|-----|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 342  | E17 | ATGSGAGTTCTTGATGTGCGGGGAGCTGGAGATGGTGTGTCGCACCCACAGCGCTGTGATGAGTGTGCGAGGTTCGGGTT<br>CGAGTACCAATATACCGCATCTTACCGATGATGCGGAGAAAGAGGCAATAGCCCTGTCCAGAGATTCATCTGCTGCGAGTTCG<br>CAGACGCTCGCATACCTTAACTCGCTTGATTAATCATCATCATCTGTATGTCGACGAGAAATGACAAACCATCTCCAGCATCATCAC<br>CACAC                                                                                     |
| 343  | E18 | ATGGAGTTTCTGATGTGCGGGGAGCTGGAGATGGTGTGTCGCACCCACAGCGCTGTGATGAGTGTGCGAGGTTCGGGTT<br>TCTGCTTACCAATATACCGCATCTTACCGATGATGCGGAGAAAGAGGCAATAGCCCTGTCCAGAGATTCATCTGCTGCGAGTTCG<br>TCCAGTACCAATATACCGCATCTTAACTCGCTTGATTAATCATCATCATCTGTATGTCGACGAGAAATGACAAACCATCTCCAGCATCATCAC<br>GAGGCTCGCATACCTTAACTCGCTTGATTAATCATCCGACAGAAATGACAAACCATCTCCAGCATCATCAC            |
| 344  | E19 | ATGGAGTTTCTGATGTGCGGGGAGCTGGAGATGGTGTGTCGCACCCACAGCGCTGTGATGAGTGTGCGAGAGGACGAGG<br>AACGCTTACCAATATACCGCATCTTACCGATGATGCGGAGAAAGAGGCAATAGCCCTGTCCAGAGATTCATCTGCTGCGAGTTCG<br>TAGACGATCAATATACCGCATCTTAACTCGCTTGATTAATCATCATCATCTGTATGTCGACGAGAAATGACAAACCATCTCCAGCATCATCAC<br>GAGGCTCGCATACCTTAACTCGCTTGATTAATCATCCGACAGAAATGACAAACCATCTCCAGCATCATCAC            |
| 345  | E20 | ATGGAGTTTCTGATGTGCGGGGAGCTGGAGATGGTGTGTCGCACCCACAGCGCTGTGATGAGTGTGATGAGTGTGATGAGTGTGCGGC<br>TGCGTGTACCAATATACCGCATCTTACCGATGATGCGGAGAAAGAGGCAATAGCCCTGTCCAGAGATTCATCTGCTGCGAGTTCG<br>CAGACGCTCGCATACCTTAACTCGCTTGATTAATCATCATCATCTGTGTATGTCGACGAGAAATGACAAACCATCTCCAGCATCATCAC<br>CATCTCGCATACCTGATCATCTCTCATCATCTTCCATTAATACCGCAGAAATGACAAACCATCTCCAGCATCATCAC |
| 346  | E2  | ATGGAGTTTCTGATGTGCGGGGAGCTGGAGATGGTGTGTCGCACCCACAGCGCTGTGATGAGTGTGCGAGTTCGGATTCGAGAGGA<br>GTGCTTCATCAATATACCGCATCTTACCGATGATGCGGAGAAAGAGGCAATAGCCCTGTCCAGAGATTCATCTGCTGCGAGTTCG<br>CATACGATCAATATACCGCATCTTAACTCGCTTGATTAATCATCATCATCTGTGTATGTCGACGAGATTCATCTGCTGCGAGTTCG<br>GAGCTGCGATCTTCCATGATCTTCCATTAATACCGCAGAAATGACAAACCATCTCCAGCATCATCAC                |
| 347  | E22 | ATGGAGTTTCTGATGTGCGGGGAGCTGGAGATGGTGTGTCGCACCCACAGCGCTGTGATGAGTGTGCGAGTTCGGATTCGAGAGGA<br>ATCAATATACCGCATCTTACCGATGATGCGGAGAAAGAGGCAATAGCCCTGTCCAGAGATTCATCTGCTGCGAGTTCG<br>ACTACGATCAATATACCGCATCTTAACTCGCTTGATTAATCATCATCATCTGTGTATGTCGACGAGATTCATCTGCTGCGAGTTCG<br>ACTACGATCAATATACCGCATCTTCCATTAATACCGCAGAAATGACAAACCATCTCCAGCATCATCAC                      |
| 348  | E23 | ATGGAGTTTCTGATGTGCGGGGAGCTGGAGATGGTGTGTCGCACCCACAGCGCTGTGATGAGTGTGCGAGTTCGGATTCGAGAGGA<br>TCGATGTACCAATATACCGCATCTTACCGATGATGCGGAGAAAGAGGCAATAGCCCTGTCCAGAGATTCATCTGCTGCGAGTTCG<br>ATACGATCAATATACCGCATCTTAACTCGCTTGATTAATCATCATCATCTGTGTATGTCGACGAGATTCATCTGCTGCGAGTTCG<br>TAGCTGTGATTAATCAATCTTCCATTAATACCGCAGAAATGACAAACCATCTCCAGCATCATCAC                   |

【图 4 7 - 4】

| 配列番号 | 結合相 | ヌクレオチド配列                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
|------|-----|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 349  | E24 | ATGGAGATTTGATGTGCGGGGAGCTGGAGTGGTGTGTCACCCGCCACGAGCTGTGCGATGATCAGTGGGGCTACCAAGT<br>GGCGTCTAACTATTACCGATCTTACGGGAGAGAGGAGGAAAGGCGCTGTCCAGAGATTAAGTGGTGGTGGTGGTGGTGGT<br>CGGATGACCAATTAACCGATTAACCGTGGGTTGATATACATATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT<br>CCACAGCTACATCAAGAGCGCTTAACTGGGTTGATATACATATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT<br>ACTCAATGACATACCATCAGATCGCTTTCCTTAATTCGCGACAGAAATTTGACAAATGATCCGACGACCATCAGCCAC<br>CACAC |
| 350  | E25 | ATGGAGATTTGATGTGCGGGGAGCTGGAGTGGTGTGTCACCCGCCACGAGCTGTGCGATGATCAGTGGGGCTACCAAGT<br>GGCGTCTAACTATTACCGATCTTACGGGAGAGAGGAGGAAAGGCGCTGTCCAGAGATTAAGTGGTGGTGGTGGTGGTGGT<br>CGGATGACCAATTAACCGATTAACCGTGGGTTGATATACATATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT<br>CCACAGCTACATCAAGAGCGCTTAACTGGGTTGATATACATATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT<br>TACAGAGCATCGATTTCATTTTCATTTGCGACAGAAATTTGACAAATGATCCGACGACCATCAGCCAC                 |
| 351  | E26 | ATGGAGATTTGATGTGCGGGGAGCTGGAGTGGTGTGTCACCCGCCACGAGCTGTGCGATGATCAGTGGGGCTACCAAGT<br>GGCGTCTAACTATTACCGATCTTACGGGAGAGAGGAGGAAAGGCGCTGTCCAGAGATTAAGTGGTGGTGGTGGTGGTGGT<br>CGGATGACCAATTAACCGATTAACCGTGGGTTGATATACATATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT<br>AAACAGCTACATCAAGAGCGCTTAACTGGGTTGATATACATATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT<br>TAGCTGGATACCGATTTTCATTTTCATTTGCGACAGAAATTTGACAAATGATCCGACGACCATCAGCCAC               |
| 352  | E27 | ATGGAGATTTGATGTGCGGGGAGCTGGAGTGGTGTGTCACCCGCCACGAGCTGTGCGATGATCAGTGGGGCTACCAAGT<br>AAATCTACCAATTAACCGATCTTACGGGAGAGAGGAGGAAAGGCGCTGTCCAGAGATTAAGTGGTGGTGGTGGTGGTGGT<br>TACAGCTACATCAAGAGCGCTTAACTGGGTTGATATACATATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT<br>ACTACAGATACATATATCTACGATCGCTCAATTTTCATTTTCGCGACAGAAATTTGACAAATGATCCGACGACCATCAGCCAC<br>CACAC                                                                                      |
| 353  | E28 | ATGGAGATTTGATGTGCGGGGAGCTGGAGTGGTGTGTCACCCGCCACGAGCTGTGCGATGATCAGTGGGGCTACCAAGT<br>AAAGCTTCTAATTAACCGATCTTACGGGAGAGAGGAGGAAAGGCGCTGTCCAGAGATTAAGTGGTGGTGGTGGTGGTGGT<br>CGTACGATACATCAAGAGCGCTTAACTGGGTTGATATACATATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT<br>ACTCAATGACATACATATCTACGATCGCTCAATTTTCATTTTCGCGACAGAAATTTGACAAATGATCCGACGACCATCAGCCAC<br>CACAC                                                                                    |
| 354  | E29 | ATGGAGATTTGATGTGCGGGGAGCTGGAGTGGTGTGTCACCCGCCACGAGCTGTGCGATGATCAGTGGGGCTACCAAGT<br>CAATATACCGATCTTACCGATCTTACGGGAGAGAGGAGGAAAGGCGCTGTCCAGAGATTAAGTGGTGGTGGTGGTGGTGGT<br>ATGACGATACATCAAGAGCGCTTAACTGGGTTGATATACATATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT<br>ACTATGATGATATATCTTACGATCGCTCAATTTTCATTTTCGCGACAGAAATTTGACAAATGATCCGACGACCATCAGCCAC<br>CACAC                                                                                     |
| 355  | E30 | ATGGAGATTTGATGTGCGGGGAGCTGGAGTGGTGTGTCACCCGCCACGAGCTGTGCGATGATCAGTGGGGCTACCAAGT<br>ATGCTCTACCAATTAACCGATCTTACGGGAGAGAGGAGGAAAGGCGCTGTCCAGAGATTAAGTGGTGGTGGTGGTGGTGGT<br>TACAGCTACATCAAGAGCGCTTAACTGGGTTGATATACATATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT<br>ACTCAATGACATACATCTACGATCGCTCAATTTTCATTTTCGCGACAGAAATTTGACAAATGATCCGACGACCATCAGCCAC<br>CACAC                                                                                      |

【図 47-5】

[illegible]

【图 4 7 - 6】

| 配列番号 | 結合剤 | ヌクレオチド配列                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
|------|-----|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 363  | E38 | ATGGGAGTTTCTGATGTGCGCGGCACTGGAGATGGTTGCTGCGACCCCGACACAGCTCTGTGTATCATGCTGGATATGCTCGGACG<br>GACCTATACCAATATACGAGTATGCGGCGGCTTAACCTGCGGTGATATACCTGATATATACGAGGATGATGATGCTCTGTGACCTG<br>GAAACAGTACACATGCGGCGCTTAACCTGCGGTGATATACCTGATATATACGAGGATGATGATGCTCTGTGACCTGATATACGAGGATG<br>GACGCGCGCGACTACTTACGAGATGGCCATTTCCATTTAATTACCGACAGGAAATGACAAACATCCGACACATCATCACAC<br>CACAC                                                                                              |
| 364  | E39 | ATGGGAGTTTCTGATGTGCGCGGCACTGGAGATGGTTGCTGCGACCCCGACACAGCTCTGTGTATCATGCTGGATATGCTCGGACG<br>TTCCGTAACCAATATACGAGTATACGCTACTTACGCGAAGACGAGCAATACGCTGTCCAGAGATGCTACTATATACCTGATGGT<br>TCTACAGCTACATCATGCGGCTTAACCTGCGGTGATATACCACTGATGCTGTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG<br>GACGCTGGCGATCTACTTCTGTAATATCCCAATTTCCATTAATTACCGACAGGAAATGACAAACATCCGACGACCATCACAC<br>CACAC                                                                                               |
| 365  | E40 | ATGGGAGTTTCTGATGTGCGCGGCACTGGAGATGGTTGCTGCGACCCCGACACAGCTCTGTGTATCATGCTGGATATGCTCGGACG<br>AGGCTATCAATATATACGAGTATACGCTACTTACGCGAAGACGAGCAATACGCTGCTCCAGAGATGATCACTGCTGCTGCTGCTGCTG<br>TACCAAGTATACATCATGCGGCTTAACCTGCGGTGATATACCACTGATGCTGTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG<br>ACCGATGATACCAATACGAGCTTCAACCTGCGGTGATATACCACTGATGCTGTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG<br>ACACAC                                                                                 |
| 366  | E41 | ATGGGAGTTTCTGATGTGCGCGGCACTGGAGATGGTTGCTGCGACCCCGACACAGCTCTGTGTATCATGCTGGATATGCTCGGACG<br>TCTGTGTATATATATACGAGTATACGCTACTTACGCGAAGACGAGCAATACGCTGCTCCAGAGATGCTACTATATACCTGATGGT<br>ACTGAGTATACATCATGCGGCTTAACCTGCGGTGATATACCACTGATGCTGTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG<br>ACCATGATACGAGTATCATCTACTCTCAATTTCCATTAATTACCGACAGGAAATGACAAACATCCGACGACCATCACAC<br>CACAC                                                                                                 |
| 367  | E42 | ATGGGAGTTTCTGATGTGCGCGGCACTGGAGATGGTTGCTGCGACCCCGACACAGCTCTGTGTATCATGCTGGATATGCTCGGACG<br>TGGGCTACCAATATATACGAGTATACGCTACTTACGCGAAGACGAGCAATACGCTGCTCCAGAGATGCTACTATATACCTGATGGT<br>TCTACAGCTACATCATGCGGCTTAACCTGCGGTGATATACCACTGATGCTGTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG<br>GAAACAGTACACATGCGGCGCTTAACCTGCGGTGATATACCACTGATGCTGTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG<br>ACGTPAAGATACACATATTTACTTATCTCATTTCCATTTAATTACCGACAGGAAATGACAAACATCCGACGACCATCACAC<br>CACAC |
| 368  | E43 | ATGGGAGTTTCTGATGTGCGCGGCACTGGAGATGGTTGCTGCGACCCCGACACAGCTCTGTGTATCATGCTGGATATGCTCGGACG<br>ATGGGCTATATATATACGAGTATACGCTACTTACGCGAAGACGAGCAATACGCTGCTCCAGAGATGCTACTATATACCTGATGGT<br>TACACAGTACATCATGCGGCTTAACCTGCGGTGATATACCACTGATGCTGTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG<br>GACGCTGGCGATCTTACCATGATATCCCAATTTCCATTAATTACCGACAGGAAATGACAAACATCCGACGACCATCACAC<br>CACAC                                                                                                 |
| 369  | E44 | ATGGGAGTTTCTGATGTGCGCGGCACTGGAGATGGTTGCTGCGACCCCGACACAGCTCTGTGTATCATGCTGGATATGCTCGGACG<br>CTTTCTATACATATATACGAGTATACGCTACTTACGCGAAGACGAGCAATACGCTGCTCCAGAGATGCTACTATATACCTGATGGT<br>TACACAGTACATCATGCGGCTTAACCTGCGGTGATATACCACTGATGCTGTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG<br>ACGCGATGATATTTTTTTCGACGACATATCCCAATTTCCATTAATTACCGACAGGAAATGACAAACATCCGACGACCATCACAC<br>CACAC                                                                                            |

【図 47-8】

Figure 47 つづき

[illegible]

## 【图 4-7-1】

Figure 47 つづき

[illegible]

【図 4 7 - 1 1】

Figure 47 つづき

[illegible]

【図 4 7 - 1 2】

Figure 47 つづき

[illegible]

【図 4 7 - 1 3】

Figure 47 つづき

[illegible]

【図 47-14】

Figure 47 つづき

[illegible]

【図 4 7 - 1 5】

| 配列番号 | 結合剤  | ヌクレオチド配列                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
|------|------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 425  | E98  | ATGGGAGTTTCTGATGTGGCGCGGACCTGGAGTGGTGTGTCGCACCCCAACAGCTGCTGATCAGCTGGGAGCGCTCGAACC<br>TCCGCTACCAATATACGCATCTACTACGGGAAACAGAGGAGCAATAGCCCTGTCCAGAGATCTACTGTGCTGGTGGTGT<br>GTGACAGCTACATCAGGGCTTAACCTGGGTTTTCATTAATACCGACATGTGTATGCTGCTACTGACAGCAATAAACGACATGCT<br>CCGAGATCTATACATGATACCCCAATTCATTAATACCGGACGAATATGCAAAACCAATCCGAGCAACATCAGCAACATCAGC<br>CACAC                         |
| 426  | E99  | ATGGGAGTTTCTGATGTGGCGCGGACCTGGAGTGGTGTGTCGCACCCCAACAGCTGCTGATCAGCTGGGAGCGCTCGAACC<br>TCCGCTACCAATATACGCATCTACTACGGGAAACAGAGGAGCAATAGCCCTGTCCAGAGATCTACTGTGCTGGTGGTGT<br>GTGACAGCTACATCAGGGCTTAACCTGGGTTTTCATTAATACCGACATGTGTATGCTGCTACTGACAGCAATAAACGACATGCT<br>CCGAGATCTATACATGATACCCCAATTCATTAATACCGGACGAATATGCAAAACCAATCCGAGCAACATCAGCAGCAC<br>CACAC                             |
| 427  | E100 | ATGGGAGTTTCTGATGTGGCGCGGACCTGGAGTGGTGTGTCGCACCCCAACAGCTGCTGATCAGCTGGGAGCGCTCGAAT<br>AAATCTACCAATATATACGCATCTACTACGGGAAACAGAGGAGCAATAGCCCTGTCCAGAGATCTACTGTGCTGGTGGTGT<br>GTGACAGCTACATCAGGGCTTAACCTGGGTTTTCATTAATACCATCTACTGTGCTGCTACTGACAGCAATAAACGACATGCT<br>GAGGCTCCGACATCTACTACATGAATACCCCAATTCATTAATACCGGACGAATATGCAAAACCAATCCGAGCAACATCAGCAGCAC<br>CACAC                      |
| 428  | E101 | ATGGGAGTTTCTGATGTGGCGCGGACCTGGAGTGGTGTGTCGCACCCCAACAGCTGCTGATCAGCTGGGAGCGCTCGGCTGT<br>GTACTTACCAATATATACGCATCTACTACGGGAAACAGAGGAGCAATAGCCCTGTCCAGAGATCTACTGTGCTGGTGGTGGTGT<br>GTGACAGCTACATCAGGGCTTAACCTGGGTTTTCATTAATACCGACATGTGTATGCTGCTACTGACAGCAATAAACGACATGCT<br>GAGGCTCCGATCTACTACATGAATTCACCAATTCATTAATACCGGACGAATATGCAAAACCAATCCGAGCAACATCAGCAGCAC<br>CACAC                 |
| 429  | E102 | ATGGGAGTTTCTGATGTGGCGCGGACCTGGAGTGGTGTGTCGCACCCCAACAGCTGCTGATCAGCTGGGAGCGCTCGGCTGT<br>AAATCTACCAATATATACGCATCTACTACGGGAAACAGAGGAGCAATAGCCCTGTCCAGAGATCTACTGTGCTGGTGGTGGTGT<br>GTGACAGCTACATCAGGGCTTAACCTGGGTTTTCATTAATACCATCTACTGTGCTGCTACTGACAGCAATAAACGACATGCT<br>GAGGCTCCGCACTACTACCATGATTCGCCCAATTCATTAATACCGGACGAATATGCAAAACCAATCCGAGCAACATCAGCAGCAC<br>CACAC                  |
| 430  | E103 | ATGGGAGTTTCTGATGTGGCGCGGACCTGGAGTGGTGTGTCGCACCCCAACAGCTGCTGATCAGCTGGGAGCGCTCGGCTGT<br>AAATCTACCAATATATACGCATCTACTACGGGAAACAGAGGAGCAATAGCCCTGTCCAGAGATCTACTGTGCTGGTGGTGGTGT<br>GTGACAGCTACATCAGGGCTTAACCTGGGTTTTCATTAATACCGACATGTGTATGCTGCTACTGACAGCAATAAACGACATGCT<br>TACTCTGAATACCCCAATTCATTAATACCGACGAATATGCAAAACCAATCCGAGCAACATCAGCAGCACATCAGCAGCAC                              |
| 431  | E104 | ATGGGAGTTTCTGATGTGGCGCGGACCTGGAGTGGTGTGTCGCACCCCAACAGCTGCTGATCAGCTGGGAGCGCTGGTGGCTGT<br>GTGACAGCTACATCAGGGCTTAACCTGGGTTTTCATTAATACCGACATGTGTATGCTGCTACTGACAGGAGTGTCTGCTGCTCATGAGCTG<br>GTGACAGCTACATCAGGGCTTAACCTGGGTTTTCATTAATACCGACATGTGTATGCTGCTACTGACAGGAGTGTCTGCTGCTCATGAGCTG<br>GAGGCTCCGATCTACTACATGAATACCCCAATTCATTAATACCGGACGAATATGCAAAACCAATCCGAGCAACATCAGCAGCAC<br>CACAC |

Figure 47つづき

【図 47-16】

[illegible]

Figure 47 つづき

【図 4 7 - 1 7】

| 配列番号 | 結合剤  | ヌクレオチド配列                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
|------|------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 439  | E112 | ATGGAGTTTTCGTGATGTCGGCCGACCTGGAGTGGTGTGCTCCACCCACACAGCTGCTGATCAGCTGGGAGCGTGGTGCT<br>GTATCTACCAAGTATPACCGCATCTACCTACGGCGAAGACAGAGGATAGCGCTGTCGAGAGTGTCTCATGTCTGGTGGTGGTGT<br>CTGCAGCTCTCATACCGGGCTTAAACTGGGCTGATGATTAACCATCTACCTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT<br>GAGCTGGCGACACTTACCATGATATTCATTAATPACCGACAGAAATTGCAAAACGATCCCGACGACCATCCAC<br>CACAC        |
| 440  | E113 | ATGGGAGTTTTCGTGATGTCGGCCGACCTGGAGTGGTGTGCTCCACCCACACAGCTGCTGATCAGCTGTATGTCGGCCAA<br>CCAGATTAATTAATPACCGCATCTACCTACGGCGAAGACAGAGGATAGCGCTGCTCGAGAGTTCATGTGTGCTTACTCTGGT<br>TAGACACTACCATACCGGGCTTAAACTGGGCTGATGATTAACCATCTACCTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT<br>TACTCGATPACCATTTCTCATTAATPACCGACAGAAATTGCAAAACGATCCCGACGACCATCCACACACAC                     |
| 441  | E114 | ATGGGAGTTTTCGTGATGTCGGCCGACCTGGAGTGGTGTGCTCCACCCACACAGCTGCTGATCAGCTGTATGTCGGCCAACTCAAC<br>AGCAATATPACCATTAATPACCGCATCTACCTACGGCGAAGACAGAGGATAGCGCTGTCGAGAGTTCATGTGTGCTGGTGGTGGT<br>CTGCAGCTACCATACCGGGCTTAAACTGGGCTGATGATTAACCATCTACCTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT<br>GAGCTGGCGACACTTACCATGATATTCATTAATPACCGACAGAAATTGCAAAACGATCCCGACGACCATCCAC<br>CACAC |

Figure 47 つづき

【图 4 8 - 1】

| 配列番号 | 結合剂        | DNA 配列                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
|------|------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 442  | E3-GS10-11 | <p>ATGGAGGTTCTTGATGTGCGCGACACTGGAGTGGTTGCTGCACCCCCACAGCGCTGCTGATCAGCTGGTTGGCGGGACA<br/> AGCTGGGACCAATTAATACCGCATCTACTTACGGCGAAGACAGAGCAATAGCCCTGTCGACAGGATTTCACTGTGGCTCATGGA<br/> CTTGCGGATCACTAACATCAGCGGCTTAAACCTGGGCTGATTAATACCATCACTGTGTATGCTGATCACTAATGATGATCAT<br/> GTTGATATCTTGATACCAATTCATTATTAATACCGACAGAAATAGCAAGATGAGCGGCTGTGGTTCGACACCCCAACG<br/> CTGGACAGGCTCTGGACAGGCTTCCTGCTCCGTTCTGATGTGCGCGACCTGGAGATGGTGTGGTTCGACACCCCAACG<br/> CTCTCATCATCTGATCTGGCTGGGGCTGTGAAGTTGCGCAGTATTAACCGATCACTATACGGGGAAGAACAGAGCAATCACTGCT<br/> CTTCAGAGATTCAGCTGTGCTTAAAGCGTTTACACAGCTACACAGCGGCTTAAACCTGGGCTGATTTGATTAATACCATCACTGCT<br/> TGATATGCTGTCATGTTTCGGCGATCTACCGACCAATTTCCATTATTAACCGACAGAAATAGCAACCACTGACCGACGACA<br/> CCACACCAACAC</p>   |
| 443  | 11-GS10-E3 | <p>ATGGAGGTTCTTGATGTGCGCGACACTGGAGTGGTTGCTGCACCCCCACAGCGCTGCTGATCAGCTGGTCTGGCGGTC<br/> TGAAGATTCGCGAATTAATACCGCATCTACTTACGGCGAAGACAGAGCAATAGCCCTGTCGACAGGATTTCACTGTGGCTCAAAA<br/> CGTTTACACCAATTCATTAATCAGCGGCTTAAACCTGGGCTGATTAATACCATCACTGTGTATGCTGATCACTGTGGCGGAC<br/> TACCGACCAATTTCCATTAATTAATACCGACAGAAATAGCAAGATGAGCGGCTGTGGTTCGACACCCCAACGCTGCGGAGT<br/> CTTGCTGGGCTCTGGCTGTGGTTCGATTAATTAATACCGCATCTGGAGATGGTGTGGTTCGACACCCCAACGCTGATGACAG<br/> CTGTGTCGGCGGACAGCTGGGTGTACGAATTAATACCGCATCTACTTACGGGGAAGAACAGAGCAATGACGCTGACAGATTC<br/> ACTGTGCTCATACCTGGCTGACAGCTCAACAGCGGCTTAAACCTGGGCTGATTTATTAATACCATCACTGTGTATGCTGCTG<br/> CTAATATGATGATGATATGTTGATCTCTGATACCACTTTCCATTAATTAACCGACAGAAATAGCAACCACTGACCGACGACA<br/> CCACACCAACAC</p>  |
| 444  | E1-GS10-11 | <p>ATGGAGGTTCTTGATGTGCGCGACACTGGAGTGGTTGCTGCACCCCCACAGCGCTGCTGATCAGCTGGTTCGGCGGGG<br/> CGAGGACTATCAATTAATACCGCATCTACTTACGGCGAAGACAGAGCAATAGCCCTGTCGACAGGATTTCACTGTGGCTCATGGA<br/> CTTGCGGATCACTAACATCAGCGGCTTAAACCTGGGCTGATTAATACCATCACTGTGTATGCTGATCACTAATGATGATCAT<br/> GTTGATATCTTGATACCAATTCATTATTAATACCGACAGAAATAGCAAGATGAGCGGCTGTGGTTCGACACCCCAACG<br/> CTGGACAGGCTCTGGACAGGCTTCCTGCTCCGTTCTGATGTGCGCGACCTGGAGATGGTGTGGTTCGACACCCCAACG<br/> CTCTCATCATCTGATCTGGCTGGGGCTGTGAAGTTGCGCAGTATTAACCGATCACTATACGGGGAAGAACAGAGCAATCACTGCT<br/> CTTCAGAGATTCAGCTGTGCTTAAAGCGTTTACACAGCTACACAGCGGCTTAAACCTGGGCTGATTTGATTAATACCATCACTGCT<br/> TGATATGCTGTCATGTTTCGGCGATCTACCGACCAATTTCCATTATTAATACCGACAGAAATAGCAACCACTGACCGACGACA<br/> CCACACCAACAC</p> |

Figure 48

【図 4 8 - 2】

[illegible]

Figure 48 つづき

【图 48-3】

[illegible]

Figure 48 つづき\*

【図 48-4】

[illegible]

Figure 48 つづき

【図 48-5】

| 配列番号 | 核苷酸          | DNA 配列                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
|------|--------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 457  | 11-GS10-E4   | ATGGGGTGTTCCTGATGTTCCGGCTGATCTGGAGATCTGGAGATCCGGGTGATCTGGATCTGCTGCTGGACGCTG<br>TGAAATGTTCCCGGTGATTTACGGATCTATGCGATCTGATGGAACCGGTGATGTTCCGGTCCAGGAATACCGCTTCGCGAGAA<br>TGTTTATCCGACCAACATTCAGGCGCTGAAACCGGGTGTATTACACACATACACCTGTTATGATGATGATGATGATGATGATG<br>TATTCACCGGATAGCATTTACTATTCGACCGACCAATGATTAAGTAGTAGTGTGTCGAGACCAACATCCCTCTACCTGATTC<br>CTGTAGTAGTAGTGTGTCGAGCGCTGCTGATGATTTAGAGTAGTGTGTCGAGACCAACATCCCTCTACCTGATTC<br>TTGCGTAGGAAGTAGTGTGTCGAGCGCTGATGATTCGATATTCGATATTCGACGAAACCGGAGAAATACCCCTCTGACGAAGATTC<br>TACGATACCGGTGGTGTGTGACCGCCCAATATTCGTTTAAACCTTGGCTGCTGATTCACATTCAGAGTATTCGATGATGATGA<br>CCGATTATTTACGTCGACCAACGAGATATTTATGACGACACCCCGCTGCTTCACTATATTCGACGAGATGATGATGA<br>ATGCTGTCATCCACCATCATCTAC |
| 458  | 11-GS10-E105 | ATGGGGTGTTCCTGATGTTCCGGCTGATCTGGAGATCTGGAGATCCGGGTGATCTGGATCTGCTGCTGGACGCTG<br>TGAAATGTTCCCGGTGATTTACGGATCTATGCGATCTGATGGAACCGGTGATGTTCCGGTCCAGGAATACCGCTTCGCGAGAA<br>TGTTTATCCGACCAACATTCAGGCGCTGAAACCGGGTGTATTACACACATACACCTGTTATGATGATGATGATGATGATGATG<br>TATTCACCGGATAGCATTTACTATTCGACCGACCAATGATTAAGTAGTAGTGTGTCGAGACCAACATCCCTCTACCTGATTC<br>CTGTAGTAGTAGTGTGTCGAGCGCTGCTGATGATTTAGAGTAGTGTGTCGAGACCAACATCCCTCTACCTGATTC<br>TTGCGTAGGAAGTAGTGTGTCGAGCGCTGATGATTCGATATTCGATATTCGACGAAACCGGAGAAATACCCCTCTGACGAAGATTC<br>TACGATACCGGTGGTGTGTGACCGCCCAATATTCGTTTAAACCTTGGCTGCTGATTCACATTCAGAGTATTCGATGATGATGA<br>CCGATTATTTACGTCGACCAACGAGATATTTATGACGACACCCCGCTGCTTCACTATATTCGACGAGATGATGATGA<br>ATGCTGTCATCCACCATCATCTAC |
| 459  | 11-GS10-E112 | ATGGGGTGTTCCTGATGTTCCGGCTGATCTGGAGATCTGGAGATCCGGGTGATCTGGATCTGCTGCTGGACGCTG<br>TGAAATGTTCCCGGTGATTTACGGATCTATGCGATCTGATGGAACCGGTGATGTTCCGGTCCAGGAATACCGCTTCGCGAGAA<br>TGTTTATCCGACCAACATTCAGGCGCTGAAACCGGGTGTATTACACACATACACCTGTTATGATGATGATGATGATGATGATG<br>TATTCACCGGATAGCATTTACTATTCGACCGACCAATGATTAAGTAGTAGTGTGTCGAGACCAACATCCCTCTACCTGATTC<br>CTGTAGTAGTAGTGTGTCGAGCGCTGCTGATGATTTAGAGTAGTGTGTCGAGACCAACATCCCTCTACCTGATTC<br>TTGCGTAGGAAGTAGTGTGTCGAGCGCTGATGATTCGATATTCGATATTCGACGAAACCGGAGAAATACCCCTCTGACGAAGATTC<br>TACGATACCGGTGGTGTGTGACCGCCCAATATTCGTTTAAACCTTGGCTGCTGATTCACATTCAGAGTATTCGATGATGATGA<br>CCGATTATTTACGTCGACCAACGAGATATTTATGACGACACCCCGCTGCTTCACTATATTCGACGAGATGATGATGA<br>ATGCTGTCATCCACCATCATCTAC |
| 460  | 11-GSGG88-E5 | ATGGGGTGTTCCTGATGTTCCGGCTGATCTGGAGATCTGGAGATCCGGGTGATCTGGATCTGCTGCTGGACGCTG<br>TGAAATGTTCCCGGTGATTTACGGATCTATGCGATCTGATGGAACCGGTGATGTTCCGGTCCAGGAATACCGCTTCGCGAGAA<br>TGTTTATCCGACCAACATTCAGGCGCTGAAACCGGGTGTATTACACACATACACCTGTTATGATGATGATGATGATGATGATG<br>TATTCACCGGATAGCATTTACTATTCGACCGACCAATGATTAAGTAGTAGTGTGTCGAGACCAACATCCCTCTACCTGATTC<br>CTGTAGTAGTAGTGTGTCGAGCGCTGCTGATGATTTAGAGTAGTGTGTCGAGACCAACATCCCTCTACCTGATTC<br>TTGCGTAGGAAGTAGTGTGTCGAGCGCTGATGATTCGATATTCGATATTCGACGAAACCGGAGAAATACCCCTCTGACGAAGATTC<br>TACGATACCGGTGGTGTGTGACCGCCCAATATTCGTTTAAACCTTGGCTGCTGATTCACATTCAGAGTATTCGATGATGATGA<br>CCGATTATTTACGTCGACCAACGAGATATTTATGACGACACCCCGCTGCTTCACTATATTCGACGAGATGATGATGA<br>ATGCTGTCATCCACCATCATCTAC |

Figure 48 つづき

【図 48-7】

Figure 48 つづき

[illegible]

フロントページの続き

|                |           |                |       |
|----------------|-----------|----------------|-------|
| (51)Int.Cl.    |           | F I            |       |
| A 6 1 K 47/48  | (2006.01) | A 6 1 K 47/48  |       |
| A 6 1 K 47/34  | (2006.01) | A 6 1 K 47/34  |       |
| A 6 1 K 38/00  | (2006.01) | A 6 1 K 37/02  |       |
| A 6 1 K 39/395 | (2006.01) | A 6 1 K 39/395 | E     |
| A 6 1 P 35/00  | (2006.01) | A 6 1 P 35/00  |       |
| A 6 1 P 43/00  | (2006.01) | A 6 1 P 43/00  | 1 2 1 |
| C 1 2 N 15/09  | (2006.01) | C 1 2 N 15/00  | A     |

- (31)優先権主張番号 61/212,966  
 (32)優先日 平成21年4月17日(2009.4.17)  
 (33)優先権主張国 米国(US)  
 (31)優先権主張番号 61/227,330  
 (32)優先日 平成21年7月21日(2009.7.21)  
 (33)優先権主張国 米国(US)  
 (31)優先権主張番号 61/200,164  
 (32)優先日 平成20年11月24日(2008.11.24)  
 (33)優先権主張国 米国(US)

前置審査

- (74)代理人 100170520  
 弁理士 笹倉 真奈美  
 (72)発明者 スチュアート・エマニュエル  
 アメリカ合衆国18902ペンシルベニア州 Doylestown、サウス・ディアー・ラン・ロード5  
 678番  
 (72)発明者 リンダ・エンゲル  
 アメリカ合衆国01701マサチューセッツ州フラミンガム、ランディ・ロード19番  
 (72)発明者 レイ・カンブハウゼン  
 アメリカ合衆国01778マサチューセッツ州ウェイランド、バイフィールド・ロード7番  
 (72)発明者 マーティン・シー・ライト  
 アメリカ合衆国02115マサチューセッツ州ボストン、カンバーランド・ストリート・ナンバー  
 4、12番  
 (72)発明者 ジンジャー・チャオ・レイクストロー  
 アメリカ合衆国02139マサチューセッツ州ケンブリッジ、ナンバー105、フランクリン・ス  
 トリート345番  
 (72)発明者 マルコ・ゴッターディス  
 アメリカ合衆国08540ニュージャージー州プリンストン、ハリス・ロード9番  
 (72)発明者 ジョーン・カーボニ  
 アメリカ合衆国19067ペンシルベニア州ヤードリー、マイケル・ロード311番

審査官 山本 晋也

- (56)参考文献 国際公開第2008/066752 (WO, A1)  
 特表2007-516707 (JP, A)  
 国際公開第2007/062188 (WO, A1)  
 国際公開第2007/096076 (WO, A1)  
 国際公開第2008/048970 (WO, A1)

国際公開第2007/092537 (WO, A1)

国際公開第2007/121894 (WO, A1)

国際公開第2007/044688 (WO, A1)

Duan et al, Biochemistry, 2007年, Vol. 46, pp.12656-12664

Lu et al, Journal of Biological Chemistry, 2004年 1月23日, Vol. 279, No. 4, pp.2856-2865

Koide et al, Methods in Molecular Biology, 2007年, Vol. 352, pp.95-109

HUANG FEI et al, CANCER RESEARCH, 2009年 1月 1日, Vol. 69, No. 1, p. 161-170

EMANUEL STUART L et al, FUNCTIONAL ACTIVITY OF A BISPECIFIC ADNECTIN INHIBITOR TO EGFR AND IGFR, PROCEEDINGS OF THE ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, 米国, AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, 2009年 4月 1日, Vol. 50, p. 680

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N

C07K

CAPLUS/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS  
(STN)

UniProt/GeneSeq