

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6023703号

(P6023703)

(45) 発行日 平成28年11月9日(2016.11.9)

(24) 登録日 平成28年10月14日(2016.10.14)

(51) Int.Cl.

F I

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C O 7 K 14/78 (2006.01)

C O 7 K 14/78

C O 7 K 19/00 (2006.01)

C O 7 K 19/00

A 6 1 K 38/00 (2006.01)

A 6 1 K 37/02

A 6 1 K 31/7088 (2006.01)

A 6 1 K 31/7088

請求項の数 17 (全 61 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2013-512226 (P2013-512226)  
 (86) (22) 出願日 平成23年5月26日 (2011.5.26)  
 (65) 公表番号 特表2013-534812 (P2013-534812A)  
 (43) 公表日 平成25年9月9日 (2013.9.9)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2011/038013  
 (87) 国際公開番号 W02011/150133  
 (87) 国際公開日 平成23年12月1日 (2011.12.1)  
 審査請求日 平成26年5月23日 (2014.5.23)  
 (31) 優先権主張番号 61/348,647  
 (32) 優先日 平成22年5月26日 (2010.5.26)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)  
 (31) 優先権主張番号 61/348,663  
 (32) 優先日 平成22年5月26日 (2010.5.26)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 391015708  
 ブリストル・マイヤーズ スクイブ カン  
 パニー  
 BRISTOL-MYERS SQUIB  
 B COMPANY  
 アメリカ合衆国08543ニュージャージ  
 ー州 プリンストン、ルート206アンド  
 ・プロビンス・ライン・ロード  
 (74) 代理人 100081422  
 弁理士 田中 光雄  
 (74) 代理人 100084146  
 弁理士 山崎 宏  
 (74) 代理人 100122301  
 弁理士 富田 憲史

前置審査

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 改善された安定性を有するフィブロネクチンをベースとする足場タンパク質

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

第一のフィブロネクチン I I I 型第 10 (  $^{10}Fn3$  ) ドメインおよび第二の  $^{10}Fn3$  ドメインを含む、フィブロネクチンをベースとするタンパク質二量体であって、第一の  $^{10}Fn3$  ドメインおよび第二の  $^{10}Fn3$  ドメインのそれぞれが、

( i ) A B ループ、B C ループ、C D ループ、D E ループ、E F ループ、および F G ループを含み；かつ

( i i ) 配列番号：1 と少なくとも 90 % 同一性を有するアミノ酸配列を含み、かつ 100 n M 未満の  $K_D$  で標的分子に結合し；かつ

( i i i ) 配列番号：4 のアミノ酸配列を含み、かつ D K 配列を含有しない、4 - 10 アミノ酸の C 末端テールを含む、タンパク質二量体。

【請求項 2】

$^{10}Fn3$  ドメインのそれぞれが、配列番号：1 のアミノ酸配列を有するヒト  $^{10}Fn3$  ドメインの対応するループの配列と比べて、変化したアミノ酸配列を備える、B C、D E および F G ループから選択される少なくとも一つのループを有する、請求項 1 に記載のタンパク質二量体。

【請求項 3】

一以上の  $^{10}Fn3$  ドメインの C 末端テールが、リジンまたはシステイン残基をさらに含む、請求項 1 または 2 に記載のタンパク質二量体。

## 【請求項 4】

－以上の<sup>10</sup>F<sub>n</sub>3ドメインのC末端テールが、配列番号：4、配列番号：6、配列番号：32、配列番号：33、配列番号：34および配列番号：35からなる群から選択されるアミノ酸配列をさらに含む、請求項1または2に記載のタンパク質二量体。

## 【請求項 5】

C末端テールが4 - 8アミノ酸である、請求項1 - 4のいずれか一項に記載のタンパク質二量体。

## 【請求項 6】

－以上の<sup>10</sup>F<sub>n</sub>3ドメインが、1 - 10アミノ酸を含むN末端伸長をさらに含む、請求項1 - 5のいずれか一項に記載のタンパク質二量体。

10

## 【請求項 7】

N末端伸長が、M、MG、Gならびに配列番号：19 - 21および26 - 31のいずれかからなる群から選択される配列を含む、請求項6に記載のタンパク質二量体。

## 【請求項 8】

二以上の<sup>10</sup>F<sub>n</sub>3ドメインを含む、請求項1 - 7のいずれか一項に記載のタンパク質二量体。

## 【請求項 9】

請求項8に記載のタンパク質二量体であって、該タンパク質二量体が異なる標的に結合する第一および第二の<sup>10</sup>F<sub>n</sub>3ドメインを含む、タンパク質二量体。

## 【請求項 10】

20

少なくとも二つの<sup>10</sup>F<sub>n</sub>3ドメインが、1 - 30アミノ酸を含むポリペプチドリinkerにより連結される、請求項8または9に記載のタンパク質二量体。

## 【請求項 11】

ポリペプチドリinkerが、グリシン - セリンをベースとするリンカー、グリシン - プロリンをベースとするリンカー、プロリン - アラニンリンカーおよびF<sub>n</sub>をベースとするリンカーからなる群から選択される、請求項10に記載のタンパク質二量体。

## 【請求項 12】

請求項8 - 10のいずれか一項に記載のタンパク質二量体であって、該タンパク質二量体が：

(i) IGF - IRに結合する一つの<sup>10</sup>F<sub>n</sub>3ドメインおよびEGFRに結合する別の<sup>10</sup>F<sub>n</sub>3ドメイン、または

30

(ii) VEGFR2に結合する一つの<sup>10</sup>F<sub>n</sub>3ドメインおよびIGF - IRに結合する別の<sup>10</sup>F<sub>n</sub>3ドメイン

を含むフィブロネクチンをベースとする足場タンパク質二量体である、タンパク質二量体。

## 【請求項 13】

請求項12に記載のタンパク質二量体であって、IGF - IRに結合する<sup>10</sup>F<sub>n</sub>3ドメインが：

(i) 配列番号：2に示されるアミノ酸配列と少なくとも90%同一であるアミノ酸配列、

40

(ii) 配列番号：2に示されるアミノ酸配列と少なくとも95%同一であるアミノ酸配列、

(iii) 配列番号：40のアミノ酸配列を有するBCループ、配列番号：41のアミノ酸配列を有するDEループ、配列番号：42のアミノ酸配列を有するFGループ、または

(iv) 配列番号：2のアミノ酸配列

を含む、タンパク質二量体。

## 【請求項 14】

請求項12または13に記載のタンパク質二量体であって、該タンパク質二量体が：

(i) 配列番号：25に示されるアミノ酸配列と90%同一であるアミノ酸配列、

(ii) 配列番号：25に示されるアミノ酸配列と95%同一であるアミノ酸配列、また

50

は

( i i i ) 配列番号 : 25 のアミノ酸配列を含む、タンパク質二量体。

【請求項 15】

請求項 1 - 14 のいずれか一項に記載のタンパク質二量体であって、該タンパク質二量体が、少なくとも 4 週間、pH 4.0 で、溶液中での保存の間に、4%未満の断片化を有する、タンパク質二量体。

【請求項 16】

ポリオキシアルキレン部分、ヒト血清アルブミン結合タンパク質、シアル酸、ヒト血清アルブミン、トランスフェリンおよびFc断片から選択される一以上の薬物動態(PK)部分をさらに含む、請求項 1 - 15 のいずれか一項に記載のタンパク質二量体。

10

【請求項 17】

請求項 1 - 16 のいずれか一項に記載のタンパク質二量体をコードする核酸。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願

本出願は、その全体が出典明示により本明細書に組み込まれる、2010年5月26日に出願された米国仮特許出願第61/348,647号および2010年5月26日に出願された同第61/348,663号の利益を主張する。

20

【背景技術】

【0002】

序論

フィブロネクチンをベースとする足場は、対象とする任意の化合物と結合するよう進化させることができるタンパク質のファミリーである。一般に、フィブロネクチンIII型(Fn3)またはFn3様ドメインに由来する足場を使用するこれらのタンパク質は、天然の抗体または操作された抗体(すなわち、ポリクローナル、モノクローナルまたは一本鎖抗体)に特徴的な形で機能し、さらに、構造的利点を有する。具体的には、これらの抗体模倣物の構造は、普通は抗体における構造および機能の喪失につながる条件下でも、フォールディング、安定性および溶解性が最適となるように設計されている。フィブロネクチンをベースとする足場タンパク質の一例として、アドネクチン<sup>商標</sup>(Adnexus, Bristol-Myers Squibbの完全所有の子会社)がある。

30

【0003】

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-細胞相互作用において重要な役割を果たす大きなタンパク質であり;3種(I、IIおよびIII型)の小さなドメインの多数の反復からなる(Baron et al., 1991)。Fn3自体が、細胞接着分子、細胞表面ホルモンおよびサイトカイン受容体、シャペロンおよび炭水化物結合ドメインの部分を含む大きなサブファミリーのパラダイムである。総説については、Bork & Doolittle, Proc Natl Acad Sci U S A, 1992 Oct 1;89(19):8990-4; Bork et al., J Mol Biol, 1994 Sep 30;242(4):309-20; Campbell & Spitzfaden, Structure, 1994 May 15;2(5):333-7; Harpez & Chothia, J Mol Biol, 1994 May 13;238(4):528-39)参照。

40

【0004】

フィブロネクチンIII型(Fn3)ドメインは、N末端からC末端の順に、または様鎖、A;ループ、AB;または様鎖、B;ループ、BC;または様鎖、C;ループ、CD;または様鎖、D;ループ、DE;または様鎖、E;ループ、EF;または様鎖、F;ループ、FG;およびまたは様鎖、Gを含む。ループAB、BC、CD、DE、EFおよびFGのいずれかまたは全てが、標的結合に関与し得る。B

50

C、D EおよびF Gループは、免疫グロブリン由来の相補性決定領域(C D R)と構造上および機能上の両面で類似している。米国特許第7, 115, 396号には、B C、D EおよびF Gループの変化が高親和性T N F バインダーをもたらすF n 3ドメインタンパク質が記載されている。米国公開第2007/0148126号には、B C、D EおよびF Gループの変化が高親和性V E G F R 2バインダーをもたらすF n 3ドメインタンパク質が記載されている。

#### 【0005】

タンパク質製剤は、それらの生成、精製、保存および運搬の間、物理学および化学的な不安定さを伴い得る。これらの不安定さの問題は、タンパク質治療と関連する生物学的特性に悪影響を与え、それによってそのタンパク質治療の有効性を低減させる。S o l a , 2009, J. Pharm Sci, 98(4): 1223-1245。従って、改善された安定性、例えば低減された断片化(f r a g m e n t a t i o n)および/または凝集に関連し、治療および診断目的の両方のために用いることができる、改善されたフィブロネクチンドメイン足場タンパク質を獲得することは有利だろう。

#### 【発明の概要】

#### 【発明が解決しようとする課題】

#### 【0006】

##### 概要

本出願の一態様は、低減された断片化および/または低減された凝集を含む、増大した安定性に関連する、新規のフィブロネクチンをベースとする足場タンパク質を提供する。

#### 【0007】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるフィブロネクチンをベースとする足場タンパク質は、フィブロネクチンI I I型第10(<sup>10</sup>F n 3)ドメインを含み、ここに、該<sup>10</sup>F n 3ドメインは、配列番号: 1と少なくとも60%同一性を有するアミノ酸配列を含み、100nM未満のK<sub>D</sub>で標的分子に結合するものであり、かつ、該<sup>10</sup>F n 3ドメインは、D K配列を含有しないC末端テールをさらに含むものである。例示的な実施形態では、C末端テールは配列番号: 4のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、C末端テールはシステイン残基をさらに含む。他の実施形態では、C末端テールは配列番号: 5の配列を含む。

#### 【0008】

特定の実施形態では、フィブロネクチンをベースとする足場タンパク質は、野生型の<sup>10</sup>F n 3ドメインによっては結合されない標的に結合する。特定の実施形態では、フィブロネクチンをベースとする足場タンパク質は、E G F R、ヒト血清アルブミンまたはP C S K 9の一以上に結合しない。特定の実施形態では、単一の<sup>10</sup>F n 3ドメインを含むフィブロネクチンをベースとする足場タンパク質は、E G F R、ヒト血清アルブミンまたはP C S K 9の一以上に結合しない。特定の実施形態では、多価フィブロネクチンをベースとする足場タンパク質は、標的分子の以下の組合せ: i) E G F RおよびI G F - I R; i i) E G F Rおよび任意の他の標的タンパク質; またはi i i) ヒト血清アルブミンおよび任意の他の標的タンパク質、の一以上に結合しない。

#### 【0009】

いくつかの実施形態では、フィブロネクチンをベースとする足場タンパク質の<sup>10</sup>F n 3ドメインは、1-10アミノ酸を含むN末端伸長をさらに含む。他の実施形態では、フィブロネクチンをベースとする足場タンパク質の<sup>10</sup>F n 3ドメインは: M、M G、Gならびに配列番号: 19-21および26-31のいずれかからなる群から選択される配列を含む。

#### 【0010】

いくつかの実施形態では、フィブロネクチンをベースとする足場タンパク質は、第二の<sup>10</sup>F n 3ドメインをさらに含み、ここに、該第二の<sup>10</sup>F n 3ドメインは、配列番号: 1と少なくとも60%同一性を有するアミノ酸配列を含み、100nM未満のK<sub>D</sub>で標的分子に結合するものであり、かつ、該第二の<sup>10</sup>F n 3ドメインは、D K配列を含有しな

10

20

30

40

50

いC末端テールをさらに含むものである。例示的な実施形態では、第二の<sup>10</sup>F<sub>n</sub>3ドメインは配列番号：4のアミノ酸配列を含むC末端テールを含む。いくつかの実施形態では、第一および第二の<sup>10</sup>F<sub>n</sub>3ドメインは異なる標的に結合する。いくつかの実施形態では、第二の<sup>10</sup>F<sub>n</sub>3ドメインは1-10アミノ酸を含むN末端伸長をさらに含む。いくつかの実施形態では、N末端伸長は：M、MG、Gならびに配列番号：19-21および25-31のいずれかからなる群から選択される配列を含む。いくつかの実施形態では、第一および第二の<sup>10</sup>F<sub>n</sub>3ドメインは、1-30アミノ酸を含むポリペプチドリinkerにより連結される。いくつかの実施形態では、ポリペプチドリinkerは、グリシン-セリンをベースとするリンカー、グリシン-プロリンをベースとするリンカー、プロリン-アラニンリンカーおよびF<sub>n</sub>をベースとするリンカーからなる群から選択される。

10

#### 【0011】

特定の実施形態では、フィブロネクチンをベースとする足場タンパク質は、ループ、AB；ループ、BC；ループ、CD；ループ、DE；ループ、EF；およびループ、FGを含む、一以上の<sup>10</sup>F<sub>n</sub>3ドメインを含み、各々、独立して、ヒト<sup>10</sup>F<sub>n</sub>3ドメインの対応するループの配列と比べて、変化したアミノ酸配列を備える、BC、DEおよびFGから選択される少なくとも一つのループを有する。特定の実施形態では、<sup>10</sup>F<sub>n</sub>3ドメインは、配列番号：1により表される天然に存在するヒト<sup>10</sup>F<sub>n</sub>3ドメインと、少なくとも50、60、70または80%同一であるアミノ酸配列を含む。例示的な実施形態では、フィブロネクチンをベースとする足場タンパク質は、2つの<sup>10</sup>F<sub>n</sub>3ドメインを含む二量体である。

20

#### 【0012】

別の態様では、本出願はPCT特許出願国際公開第2009/142773号に記載されるフィブロネクチンをベースとする足場タンパク質二量体と比べ、低減されたタンパク質断片化に関連する、新規なフィブロネクチンをベースとする足場タンパク質二量体を提供する。いくつかの実施形態では、フィブロネクチンをベースとする足場タンパク質二量体は、配列番号：48のアミノ酸配列を含む。

#### 【0013】

別の態様では、本出願はN1-D1-C1-L-N2-D2-C2構造を有するフィブロネクチンをベースとする足場タンパク質二量体を提供する。特定の実施形態では、N1およびN2は0-10アミノ酸を独立して含む任意のN末端伸長であり；D1およびD2は、(i)配列番号：2に示されるアミノ酸配列と少なくとも95%同一性を有する第10フィブロネクチンIII型ドメイン(<sup>10</sup>F<sub>n</sub>3)であって、ここに、前記<sup>10</sup>F<sub>n</sub>3ドメインは500nM未満のK<sub>D</sub>でIGF-IRに結合するものである、および(ii)配列番号：3に示されるアミノ酸配列と少なくとも95%同一性を有する<sup>10</sup>F<sub>n</sub>3ドメインであって、ここに、前記<sup>10</sup>F<sub>n</sub>3ドメインは500nM未満のK<sub>D</sub>でVEGFR2に結合するものである、からなる群から独立して選択され；Lは0-30アミノ酸残基を含むポリペプチドリinkerであり；C1は配列番号：4に示されるアミノ酸配列を含み；ならびに、C2は配列番号：4、5または6に示されるアミノ酸配列を含む。

30

#### 【0014】

いくつかの実施形態では、フィブロネクチンをベースとする足場タンパク質二量体はN1-D1-C1-L-N2-D2-C2構造を有し、ここに、D1は配列番号：2に示されるアミノ酸配列と少なくとも95%同一性を有する<sup>10</sup>F<sub>n</sub>3ドメインを含み、D2は配列番号：3に示されるアミノ酸配列と少なくとも95%同一性を有する<sup>10</sup>F<sub>n</sub>3ドメインを含むものである。他の実施形態では、フィブロネクチンをベースとする足場タンパク質二量体はN1-D1-C1-L-N2-D2-C2構造を有し、ここに、D1は配列番号：3に示されるアミノ酸配列と少なくとも95%同一性を有する<sup>10</sup>F<sub>n</sub>3ドメインを含み、D2は配列番号：2に示されるアミノ酸配列と少なくとも95%同一性を有する<sup>10</sup>F<sub>n</sub>3ドメインを含むものである。

40

#### 【0015】

いくつかの実施形態では、フィブロネクチンをベースとする足場タンパク質二量体はN

50

1 - D 1 - C 1 - L - N 2 - D 2 - C 2 構造を有し、ここに、C 2 は配列番号：6 のアミノ酸配列を含むものである。

【0016】

いくつかの実施形態では、フィブロネクチンをベースとする足場タンパク質二量体は N 1 - D 1 - C 1 - L - N 2 - D 2 - C 2 構造を有し、ここに、N 1 は M、M G、G ならびに配列番号：19 - 21 および 26 - 31 のいずれか一つからなる群から選択されるアミノ酸配列を含むものである。例示的な実施形態では、N 1 は配列番号：19 のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、フィブロネクチンをベースとする足場タンパク質二量体は N 1 - D 1 - C 1 - L - N 2 - D 2 - C 2 構造を有し、ここに、N 2 は M、M G、G ならびに配列番号：19 - 21 および 26 - 31 のいずれか一つからなる群から選択されるアミノ酸配列を含むものである。例示的な実施形態では、N 2 は配列番号：20 のアミノ酸配列を含む。

10

【0017】

いくつかの実施形態では、フィブロネクチンをベースとする足場タンパク質二量体は N 1 - D 1 - C 1 - L - N 2 - D 2 - C 2 構造を有し、ここに、L は、グリシン - セリンをベースとするリンカー、グリシン - プロリンをベースとするリンカー、プロリン - アラニンリンカーおよび F n をベースとするリンカーからなる群から選択されるポリペプチドリンカーである。他の実施形態では、L は配列番号：7 のアミノ酸配列を含む。

【0018】

いくつかの実施形態では、フィブロネクチンをベースとする足場タンパク質は、ポリオキシアルキレン部分、ヒト血清アルブミン結合タンパク質、シアル酸、ヒト血清アルブミン、トランスフェリン、I g G、I g G 結合タンパク質および F c 断片から選択される一以上の薬物動態 (P K) 部分をさらに含む。いくつかの実施形態では、P K 部分は、ポリオキシアルキレン部分であり、かつ、前記ポリオキシアルキレン部分はポリエチレングリコ - ル (P E G) である。いくつかの実施形態では、P E G 部分は、C y s または L y s アミノ酸を介してフィブロネクチンをベースとする足場タンパク質と共有結合によって連結している。いくつかの実施形態では、P E G は約 0.5 k D a および約 100 k D a の間である。

20

【0019】

一態様では、本出願は、フィブロネクチンをベースとする足場タンパク質を含む医薬上許容される組成物を提供する。いくつかの実施形態では、組成物は、本質的に発熱物質を含まない。いくつかの実施形態では、組成物は、微生物汚染を実質的に含まず、これによって、インビボ投与に適したものとなる。組成物は、例えば、I V、I P または皮下投与のために製剤され得る。いくつかの実施形態では、組成物は生理学的に許容される担体を含む。いくつかの実施形態では、組成物の p H は 4.0 - 6.5 の間である。いくつかの実施形態では、組成物の p H は 4.0 - 5.5 の間である。他の実施形態では、組成物の p H は 5.5 である。他の実施形態では、組成物の p H は 4.0 である。いくつかの実施形態では、フィブロネクチンをベースとする足場タンパク質の濃度は、組成物において 5 m g / m l である。

30

【0020】

別の態様では、本出願は、フィブロネクチンをベースとする足場タンパク質を含む医薬製剤を提供し、ここに、該製剤は少なくとも 5 m g / m l のフィブロネクチンをベースとする足場タンパク質を含み、4.0 の p H を有し、かつ静脈内投与に適しているものである。いくつかの実施形態では、該医薬製剤は、25 で 4 週間、安定である。いくつかの実施形態では、医薬製剤は 4 % 未満の断片化を有する。いくつかの実施形態では、該製剤は 4 % 未満の凝集を有する。

40

【0021】

別の態様では、本出願は、本明細書に記載される任意の組成物の治療有効量を、必要とされる対象へ投与することを含む、対象における過剰増殖性障害 (h y p e r p r o l i f e r a t i v e d i s o r d e r) を処置するための方法を提供する。

50

## 【 0 0 2 2 】

別の態様では、本出願は、本明細書に記載されるフィブロネクチンをベースとする足場タンパク質をコードする核酸を提供する。このようなタンパク質のためのポリヌクレオチドを含有するベクターも同様に含まれる。適したベクターとして、例えば、発現ベクターが挙げられる。本出願のさらなる態様は、フィブロネクチンをベースとする足場タンパク質をコードする、ポリヌクレオチド、ベクターまたは発現ベクターを含む細胞を提供する。配列は、好ましくは、使用される細胞種において発現を最大にするよう最適化される。いくつかの実施形態では、発現は微生物細胞にある。他の実施形態では、発現はほ乳類細胞にある。好ましくは、発現は大腸菌にある。一態様では、細胞はフィブロネクチンをベースとする足場タンパク質を発現する。一態様では、フィブロネクチンをベースとする足場タンパク質をコードするポリヌクレオチドは、選択された細胞種における発現のために最適化されたコドンである。また、フィブロネクチンをベースとする足場タンパク質をコードする核酸を含む、ヌクレイック ( n u c l e i c ) 、ベクターまたは発現ベクターを含む宿主細胞を培養することと、および培養物から発現されたフィブロネクチンをベースとする足場タンパク質を回収することを含む、本明細書に記載されるフィブロネクチンをベースとする足場タンパク質を生成する方法も提供される。

10

## 【図面の簡単な説明】

## 【 0 0 2 3 】

【図 1】2 種の濃度の P E G 化 V / I ( D K + ) ( 配列番号 : 2 2 ) に対する、時間経過に伴うタンパク質凝集の量を示す、サイズ排除 - 高速液体クロマトグラフィー ( S E - H P L C ) データ。P E G 化タンパク質は、3 m g / m L のタンパク質濃度で、1 0 m M コハク酸、5 % ソルビトール、p H 5 . 5 中に、1 2 ヶ月間 4 で保存された。

20

【図 2】2 種の濃度の P E G 化 V / I ( D K + ) ( 配列番号 : 2 2 ) に対する、時間経過に伴うタンパク質断片化の量を示す、S E - H P L C データ。P E G 化タンパク質は、3 m g / m L のタンパク質濃度で、1 0 m M コハク酸、5 % ソルビトール、p H 5 . 5 中に、1 2 ヶ月間 4 で保存された。

【図 3】P E G 化 V / I ( D K + ) ( 配列番号 : 2 2 ) に対する、時間経過に伴うタンパク質凝集への p H の影響を示す、S E - H P L C データ。P E G 化タンパク質は、2 0 m M 酢酸ナトリウム ( p H 4 および 5 に対して ) または 2 0 m M リン酸ナトリウム ( p H 6 および 7 に対して ) と、5 0 m M N a C l を含有する製剤中に、3 週間 2 5 で保存された。

30

【図 4】P E G 化 V / I ( D K + ) ( 配列番号 : 2 2 ) に対する、時間経過に伴うタンパク質断片化への p H の影響を示す、S E - H P L C データ。P E G 化タンパク質は、2 0 m M 酢酸ナトリウム ( p H 4 および 5 に対して ) または 2 0 m M リン酸ナトリウム ( p H 6 および 7 に対して ) と、5 0 m M N a C l を含有する製剤中に、3 週間 2 5 で保存された。

【図 5】p H 5 . 5 で、1 0 m M 酢酸塩、1 5 0 m M N a C l 中に、4 週間 2 5 での保存後の、P E G 化 V / I ( D K + ) 分子 ( 配列番号 : 2 2 ) の切断部位を示す、逆相 - 高速液体クロマトグラフィー ( R P - H P L C ) プロファイル。図に示されるように、タンパク質切断は、以下の位置、D 9 5、D 1 0 6、D 1 8 0 および D 2 0 0 で直接起こり、大部分は以下の位置、D 9 5 および D 2 0 0 で直接起こる。P E G 化タンパク質は、5 m g / m L のタンパク質濃度で、1 0 m M 酢酸ナトリウム、1 5 0 m M 塩化ナトリウム、p H 5 . 5 中に、2 5 で 4 週間保存された。

40

【図 6】P E G 化 E / I ( D K + ) ( 配列番号 : 2 3 ) に対する、時間経過に伴うタンパク質凝集への p H の影響を示す、S E - H P L C データ。P E G 化タンパク質は、1 0 m M コハク酸、5 % ソルビトール、p H 4 . 0、4 . 5 および 5 . 5 中に、2 5 で 4 週間保存された。

【図 7】P E G 化 E / I ( D K + ) ( 配列番号 : 2 3 ) に対する、時間経過に伴うタンパク質断片化の量への p H の影響を示す、S E - H P L C データ。P E G 化タンパク質は、1 0 m M コハク酸、5 % ソルビトール、p H 4 . 0、4 . 5 および 5 . 5 中に、2 5 で

50

4週間保存された。

【図8】5mg/mLのタンパク質濃度で、10mMコハク酸、5%ソルビトール、pH 4.0中に、4週間25℃での保存後の、PEG化E/I(DK+) (配列番号: 23)の切断部位を示す、RP-HPLCプロファイル。図に示されるように、タンパク質切断は、以下の位置、D95、D199およびD218で直接起こる。

【図9】様々なフィブロネクチンをベースとする足場タンパク質構築体に対する、時間経過に伴うタンパク質凝集へのpHの影響を示す、SE-HPLCデータ。様々なフィブロネクチンをベースとする足場タンパク質に対する凝集レベルが、25℃で4週間の保存の間、pH 5.5またはpH 4.0のいずれかで試験された。E/I(DK+)は配列番号: 23であり; E/I(DK-、C末端無し)は配列番号: 24であり; E/I(2DK-)は配列番号: 25であり; かつ、V/I(DK+)は配列番号: 22である。

【図10】25℃で4週間の保存の間の、種々のpHでの様々なフィブロネクチンをベースとする足場タンパク質の断片化の量を示す、RP-HPLCデータ。DK配列を含有するフィブロネクチンをベースとする足場タンパク質は、pH 5.5と比較して、pH 4.0で断片化の影響をより受けやすい。DK配列を含有しないフィブロネクチンをベースとする足場タンパク質は、DK配列を含有するフィブロネクチンをベースとする足場タンパク質と比較して、pH 4.0で断片化に対してより抵抗性である。E/I(DK+)は配列番号: 23であり; E/I(DK-、C末端無し)は配列番号: 24であり; E/I(2DK-)は配列番号: 25であり; かつ、V/I(DK+)は配列番号: 22である。

【図11】E/I(DK-、C末端無し)分子(配列番号: 24)における主要な切断部位がD199である一方、E/I(DK+)分子(配列番号: 23)における主要な切断部位がD218であることを実証する、LC-MSデータ。

【図12】E/I(2DK-)分子(配列番号: 25)における主要な切断部位がD199であることを実証する、LC-MSデータ。

【図13】SE-HPLC解析により評価される、最長2ヶ月間25℃での保存下で、V/I(DK+) (配列番号: 56)およびV/I(DK-) (配列番号: 57)において観察される凝集率。

【図14】RP-HPLC解析により評価される、最長2ヶ月間25℃での保存下で、V/I(DK+) (配列番号: 56)およびV/I(DK-) (配列番号: 57)において観察されるクリップ率。

【図15】25℃で2ヶ月間のインキュベーション後の、V/I(DK+) (配列番号: 56)およびV/I(DK-) (配列番号: 57)のRP-HPLCの重ね合わせた(overlay)クロマトグラムのクリップ領域。V/I(DK+)に対する総%クリップは16%であるのに対し、V/I(DK-)に対しては6.9%である。

【発明を実施するための形態】

【0024】

詳細な説明

定義

「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、二以上のアミノ酸の任意の配列が意味される。「ポリペプチド」、「ペプチド」および「タンパク質」は、本明細書において同義的に使用される。ポリペプチドは、出典明示により本明細書に組み込まれる米国特許第6,559,126号に記載されるものなどの天然アミノ酸および非天然アミノ酸を含み得る。ポリペプチドはまた、種々の標準的な化学法のいずれかで修飾されていてもよい(例えば、アミノ酸は保護基で修飾されていてもよい;カルボキシ末端アミノ酸は、末端アミド基にされてもよい;アミノ末端残基は、例えば、親油性を増強するための基で修飾されてもよい;またはポリペプチドは、化学的にグリコシル化されていてもよく、あるいは、安定性もしくはインビボ(in vivo)半減期を増大するよう修飾されていてもよい)。ポリペプチド修飾は、ポリペプチドへの、環状化合物または他の分子などの別の構造の結合(attachment)を含み、また変化した立体配置(すなわち、RもしくはS;または、LもしくはD)で一以上のアミノ酸を含有するポ

10

20

30

40

50



リペプチドを含み得る。

【0025】

本明細書において、「アミノ酸配列同一性パーセント(%)」とは、配列同一性の一部分として保存的置換は全く考慮することなく、最大配列同一性パーセントを達成するために、配列をアラインし、必要に応じてギャップを導入した後の、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パーセンテージとして定義される。アミノ酸配列同一性パーセントを決定する目的上、アラインメントは、当技術分野における技術の範囲内にある様々な方法で、例えば、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できる。当業者ならば、比較されている配列の全長にわたって最大アラインメントを達成するのに必要な任意のアルゴリズムを含む、アラインメントを測定するための適当なパラメーターを決定できる。しかしながら、本明細書における目的上、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を用いることによって、以下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、ユーザー文書とともに米国著作権局、Washington D.C., 20559に提出されており、ここでは、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.を通じ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で使用する

10

20

【0026】

本明細書における目的上、所与のアミノ酸配列Bと、それに関して、または、それに対する所与のアミノ酸配列Aのアミノ酸配列同一性%(あるいは、所与のアミノ酸配列Bと、それに関して、または、それに対して特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として表現される場合もある)は、以下のとおりに算出される： $100 \times X / Y$ 比、式中、XはAおよびBのプログラムのアラインメントにおいて配列アラインメントプログラムALIGN-2によって同一マッチとしてスコアリング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。当然のことではあるが、アミノ酸配列Aの長さがアミノ酸配列Bの長さとは等しくない場合には、Bに対するAのアミノ酸配列同一性%は、Aに対するBのアミノ酸配列同一性%とは等しくならない。

30

【0027】

用語「治療有効量」とは、ほ乳類における疾患または障害を治療するために有効な薬物の量を指す。癌の場合には、薬物の治療有効量は、癌細胞の数を低減し得る；腫瘍の大きさを低減し得る；末梢臓器への癌細胞浸潤を阻害し得る（すなわち、ある程度遅延し得る、好ましくは、停止し得る）；腫瘍転移を阻害し得る（すなわち、ある程度遅延し得る、好ましくは、停止し得る）；腫瘍増殖をある程度阻害し得る；および/または障害と関連している一以上の症状をある程度軽減し得る。薬物が増殖を妨げ、かつ/または既存の癌細胞を死滅させ得る限り、細胞分裂停止性および/または細胞傷害性であり得る。癌治療について、インビボでの有効性は、例えば、無増悪期間(time to disease progression)(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できる。

40

【0028】

アミノ酸配列または化合物の半減期は、一般に、インビボでポリペプチドの血清濃度が、例えば、天然の機序による、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によって50%低減されるのにかかる時間として定義され得る。半減期は、薬物動態解析によってなど、それ自体公知の任意の方法で決定できる。適した技術は、当業者には明らかであり、例えば、通常治療される霊長類に、アミノ酸配列または化合物の適した用量を適宜投与する工程；前記霊長類から定期的に血液サンプル

50

ルまたは他のサンプルを採取する工程；前記血液サンプル中の本発明のアミノ酸配列または化合物のレベルまたは濃度を決定する工程；およびこのように得られたデータ（のプロット）から、本発明のアミノ酸配列または化合物のレベルまたは濃度が、投与時の初期レベルと比べて50%低減されるまでの時間を算出する工程を含み得る。例えば、Kenneth, A et al: Chemical Stability of Pharmaceuticals: A Handbook for Pharmacists and in Peters et al, Pharmacokinetic analysis: A Practical Approach (1996) などの標準的なハンドブックが参照される。Marcel Dekker, 2nd Rev. edition (1982) により公開された「Pharmacokinetics」, M Gibaldi & D Perron もまた参照される。

10

#### 【0029】

半減期は、 $t_{1/2}$ 、 $t_{1/2}$  および曲線下面積（AUC）などのパラメータを用いて表現され得る。本明細書において、「半減期の増大」とは、これらのパラメータのうちいずれか1種、例えば、これらのパラメータのうち任意の2種、または本質的に3種のこれらのパラメータの全ての増大を指す。「半減期の増大」とは、特に、 $t_{1/2}$  および/またはAUCまたは両方の増大を伴うか、または伴わない、 $t_{1/2}$  の増大を指す。

#### 【0030】

概説

20

本明細書には、増大した安定性に関連する、改善されたフィブロネクチンをベースとする足場タンパク質が記載されている。本明細書に記載されるフィブロネクチンをベースとする足場タンパク質は、一以上の所望の標的に結合するように修飾された、一以上の第10フィブロネクチンIII型ドメインを含む。本明細書にはまた、1つがVEGFR2に特異的に結合するように修飾され、1つがIGF-IRに特異的に結合するように修飾された、2つのヒト第10フィブロネクチンIII型ドメインを含み、増大した安定性に関連する、改善されたVEGFR2/IGF-IR二重特異的フィブロネクチンをベースとする足場タンパク質二量体が記載されている。PCT特許出願国際公開第2009/142773号には、共有結合によって、または非共有結合によって連結されることができ、かつVEGFR2およびIGF-IRの両方に結合する、フィブロネクチン足場多量体が記載されている。本出願は、幾分かは、VEGFR2およびIGF-IRに結合する二重特異的なフィブロネクチンをベースとする足場タンパク質が、特定のアスパラギン酸残基で、高頻度の断片化を受けるという驚くべき発見に関する。特に、リジン残基が直接後に続くアスパラギン酸残基が、他のアミノ酸が後に続くアスパラギン酸残基と比べて、フィブロネクチンをベースとする足場タンパク質において、切断に対してより感受性であることが発見された。本出願はまた、同一の保管条件およびこれらの類似するタンパク質間で共有される配列同一性の高いパーセンテージにもかかわらず、VEGFR2/IGF-IR結合フィブロネクチンをベースとする足場タンパク質の断片化の程度が、関連するフィブロネクチンをベースとする足場タンパク質、すなわち、二重特異的なEGFR/IGF-IR結合フィブロネクチンをベースとする足場タンパク質二量体に関連する断片化の程度よりも相当高い、という驚くべき発見に関する。本出願はまた、DK部位が除去、または、異なるアミノ酸、例えばグルタミン酸でアスパラギン酸残基を置換するために修飾される場合、モデルのフィブロネクチンをベースとする足場タンパク質の断片化が著しく低減されることを実証する。本明細書において、保管の間、増大した安定性を有するフィブロネクチンをベースとする足場タンパク質の改善された組成物もまた提供される。

30

40

#### 【0031】

フィブロネクチンをベースとする足場

F<sub>n</sub>3はフィブロネクチン由来のIII型ドメインを指す。F<sub>n</sub>3ドメインは小さく、単量体であって、可溶性で、かつ安定である。それはジスルフィド結合を欠くため、還元条件下でも安定である。F<sub>n</sub>3の全体構造は免疫グロブリンと似ている。F<sub>n</sub>3ドメイン

50

は、N末端からC末端の順に、または様鎖、A；ループ、AB；または様鎖、B；ループ、BC；または様鎖、C；ループ、CD；または様鎖、D；ループ、DE；または様鎖、E；ループ、EF；または様鎖、F；ループ、FG；およびまたは様鎖、Gを含む。7つの逆平行鎖は、安定なコアを形成する2つのシートとしてまとめられ、一方で、または様鎖に結合するループから構成される2つの「顔」を作成している。ループAB、CDおよびEFは1つの顔に位置し、ループBC、DEおよびFGは反対側の顔に位置する。任意の、または全てのループAB、BC、CD、DE、EFおよびFGが、リガンド結合に参加し得る。少なくとも15種のFn3の異なるモジュールが存在し、モジュール間の配列相同性は低いが、それらは全て三次構造において高い類似性を共有する。

10

## 【0032】

アドネクチン<sup>商標</sup> (Adnexus, a Bristol-Myers Squibb Company) は、第10フィブロネクチンIII型ドメイン、すなわちFn3の第10モジュール (<sup>10</sup>Fn3) に基づくリガンド結合足場タンパク質である。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：37に示される：

## 【化1】

VSDVPRDLEVVAATPTSLISWDAPAVTVRYRITYGETGGNSPVQEFTVPGSKSTATIS

GLKPGVDYTTITVYAVTGRGDSPASSKPISINYRT (配列番号:37) (AB、CDおよびEF

ループは下線が引かれ、BC、FGおよびDEループは太字で強調されている)。

20

## 【0033】

配列番号：37において、ABループは残基15 - 16に対応し、BCループは残基21 - 30に対応し、CDループは残基39 - 45に対応し、DEループは残基51 - 56に対応し、EFLループは残基60 - 66に対応し、かつFGLループは残基76 - 87に対応する。例えば、Xu et al., Chemistry & Biology 2002 9:933 - 942を参照のこと。BC、DEおよびFGLループは分子の1つの顔に沿って整列し、AB、CDおよびEFLループは分子の反対側の顔に沿って整列する。配列番号：37において、鎖Aは残基9 - 14に対応し、鎖Bは残基17 - 20に対応し、鎖Cは残基31 - 38に対応し、鎖Dは残基46 - 50に対応し、鎖Eは残基57 - 59に対応し、鎖Fは残基67 - 75に対応し、かつ鎖Gは残基88 - 94に対応する。鎖は、対応するループを介して互いに結合する、例えば、鎖AおよびBは、鎖A、ループAB、鎖Bの順番で、ループABを介して結合する等。配列番号：37の最初の8アミノ酸 (上記斜字体) は、分子の結合活性を保有しながら、欠失され得る。配列番号：37において、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：37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、該コアアミノ酸残基は、一文字アミノ酸コードと、それに続く配列番号：37内でそれらが位置する位置によって表されている。例えば、Dickinson et al., J. Mol. Biol. 236:1079 - 1092 (1994)を参照のこと。

30

40

## 【0034】

<sup>10</sup>Fn3ドメインは、構造的および機能的に抗体、特に抗体の可変領域に類似している。<sup>10</sup>Fn3ドメインは「抗体模倣物」または「抗体様タンパク質」と記載され得る一方、それらは従来の抗体を超える多数の利点を示す。特に、それらは抗体に比べてより良好なフォールディングと熱安定性特性を示し、また、特定の条件下で正しいフォールディングを妨害もしくは阻害すると知られているジスルフィド結合を欠く。

## 【0035】

<sup>10</sup>Fn3ドメインのBC、DEおよびFGLループは、免疫グロブリン由来の相補性決定領域 (CDR) に類似している。これらのループ領域でのアミノ酸配列の変化が、<sup>10</sup>

50

F n 3 の結合特性を変化させる。A B、C DおよびE F ループでの修飾を備える<sup>10</sup>F n 3 ドメインもまた、所望の標的に結合する分子を生成するために作製され得る。ループの外側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、<sup>10</sup>F n 3 の構造的立体配座 (structural conformation) において役割を果たす。<sup>10</sup>F n 3 のフレームワーク様領域における変化は、リガンド結合を攪乱するほど構造的立体配座が変化されない限り、許容される。<sup>10</sup>F n 3 リガンド特異的バインダーを生成するための方法は、高親和性T N F バインダーを開示するP C T国際公開第00/034787号、同第01/64942号および同第02/032925号、高親和性V E G F R 2 バインダーを開示するP C T国際公開第2008/097497号、高親和性I G F - I R バインダーを開示するP C T国際公開第2008/066752号、ならびに高親和性多価V E G F R 2 / I G F - I R バインダーを開示するP C T国際公開第2009/142773号に記載される。<sup>10</sup>F n 3 バインダーおよびバインダーを選択するための方法を議論するさらなる参考文献には、P C T国際公開第98/056915号、同第02/081497号および同第2008/031098号、ならびに米国特許出願公開第2003/0186385号が挙げられる。

#### 【0036】

上述のように、配列番号：37の残基21 - 30、51 - 56および76 - 87に対応するアミノ酸残基は、それぞれB C、D EおよびF G ループを定義する。しかしながら、V E G F R 2 またはI G F - I R 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 n 3 結合ドメインを獲得するために、ループ領域内の全ての残基が修飾される必要があるというわけではないことが理解されるべきである。例えば、いくつかの実施形態では、B C ループのアミノ酸23 - 29、D E ループのアミノ酸52 - 55およびF G ループのアミノ酸77 - 86に対応する残基のみが修飾され、高親和性<sup>10</sup>F n 3 バインダーを生成した（例えば、配列番号：3を有するV E G F R 2 結合コアを参照）。従って、特定の実施形態では、B C ループは配列番号：37の残基23 - 29に対応するアミノ酸配列により定義され、D E ループは配列番号：37の残基52 - 55に対応するアミノ酸配列により定義され、かつF G ループは配列番号：37の残基77 - 86に対応するアミノ酸配列により定義される。

#### 【0037】

さらに、高親和性<sup>10</sup>F n 3 結合ドメインを生成しながら、ループ領域における挿入および欠失もまた作製され得る。例えば、配列番号：3を有するV E G F R 2 バインダーのF G ループは野生型<sup>10</sup>F n 3 ドメインと同じ長さのF G ループを有する、すなわち、配列番号：37の10個の残基77 - 86が配列番号：3の10個の残基69 - 78で交換された。対照的に、配列番号：2を有するI G F - I R バインダーのF G ループは野生型<sup>10</sup>F n 3 ドメインの対応するF G ループよりも長さにおいて短い、すなわち、配列番号：37の10個の残基77 - 86が配列番号：2の6個の残基69 - 74で交換された。最終的に、配列番号：39を有するE G F R バインダーのF G ループは野生型<sup>10</sup>F n 3 ドメインの対応するF G ループよりも長さにおいて短い、すなわち、配列番号：37の10個の残基77 - 86が配列番号：39の15個の残基69 - 83で交換された。

#### 【0038】

従って、いくつかの実施形態では、B C、D E、およびF G から選択される一以上のループは、野生型ヒト<sup>10</sup>F n 3 における対応するループと比べて、長さにおいて伸長または短縮されてもよい。いくつかの実施形態では、ループの長さを2 - 25アミノ酸分、伸長することができる。いくつかの実施形態では、ループの長さを1 - 11アミノ酸分、短縮することができる。特に、<sup>10</sup>F n 3 のF G ループは12残基長である一方、抗体重鎖における対応するループは4から28残基の範囲である。それゆえ、抗原結合を最適化するために、<sup>10</sup>F n 3 のF G ループの長さは、4 - 28残基のC D R 3 の範囲を覆うように、長さならびに配列において変化され、抗原結合において最も高い可能な可動性および親和性を獲得する。いくつかの実施形態では、インテグリン結合モチーフ「アルギニン - グリシン - アスパラギン酸」(R G D) (配列番号：37のアミノ酸78 - 80) の一以

上の残基が、インテグリン結合を攪乱するように交換され得る。一実施形態では、R G D配列は、極性アミノ酸 - 中性アミノ酸 - 酸性アミノ酸配列（N末端からC末端方向）により交換される。別の実施形態では、R G D配列はS G Eで交換される。

#### 【0039】

<sup>10</sup>F n 3、つまり「<sup>10</sup>F n 3足場」の非リガンド結合配列は、<sup>10</sup>F n 3ドメイン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、変化され得る。いくつかの実施形態では、A s p 7、G l u 9、およびA s p 2 3の一以上は、たとえば、非負荷電アミノ酸残基（たとえばA s n、L y s等）などの他のアミノ酸により交換される。これらの変異は、野生型形態と比べて、中性pHにて、変異体<sup>10</sup>F n 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（P C T国際公開第02/04523号を参照されたい）。有益なまたは中間的な<sup>10</sup>F n 3足場における様々なさらなる改変が開示されている。例えば、B a t o r i e t a l . , P r o t e i n E n g . 2002 15(12):1015-20; K o i d e e t a l . , B i o c h e m i s t r y 2001 40(34):10326-33を参照されたい。

#### 【0040】

<sup>10</sup>F n 3足場は、一以上の保存的置換によって修飾され得る。<sup>10</sup>F n 3足場中の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<sup>10</sup>F n 3の親和性を実質的に変化することなく、保存的置換により変化され得る。特定の実施形態では、足場は、約0-15、0-10、0-8、0-6、0-5、0-4、0-3、1-15、1-10、1-8、1-6、1-5、1-4、1-3、2-15、2-10、2-8、2-6、2-5、2-4、5-15または5-10個の保存的アミノ酸置換を含み得る。例示的な実施形態では、足場修飾は、好ましくは、リガンドに対する<sup>10</sup>F n 3バインダーの結合親和性を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。このような変化は、インビボで<sup>10</sup>F n 3の免疫原性を変化する場合があり、免疫原性が減少する場合には、このような変化は望ましいであろう。本明細書で用いる場合、「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、D a y h o f f e t a l . , A t l a s o f P r o t e i n S e q u e n c e a n d S t r u c t u r e 5:345-352 (1978 & S u p p . )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。

#### 【0041】

一態様において、本出願はフィブロネクチンをベースとする足場タンパク質、例えば、少なくとも一つの<sup>10</sup>F n 3ドメインを含み、D K配列を欠くC末端テールを有するポリペプチドを提供する。例示的な実施形態では、フィブロネクチンをベースとする足場タンパク質は、配列番号：4のアミノ酸配列を含むC末端テールを有する<sup>10</sup>F n 3ドメインを含む。このようなフィブロネクチンをベースとする足場タンパク質は、一以上のD K配列を含有するフィブロネクチンをベースとする足場と比べて、改善された安定性を有する。

#### 【0042】

いくつかの実施形態では、フィブロネクチンをベースとする足場タンパク質は、配列番号：1のアミノ酸配列を有するヒト<sup>10</sup>F n 3ドメインと、少なくとも40%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%または90%同一性を有する<sup>10</sup>F n 3ドメインを含む。変動(v a r i a b i l i t y)の大半は、一般に一以上のループで起こる。フィブロネクチンをベースとする足場タンパク質における<sup>10</sup>F n 3ド

メインのそれぞれの または 様鎖は、このような変動が生理学的条件においてポリペプチドの安定性を撓乱しないという条件で、配列番号：1の対応する または 様鎖の配列と少なくとも80%、85%、90%、95%または100%同一であるアミノ酸配列を含む、必須としてなる、またはからなる。例示的な実施形態では、 $^{10}$ F n 3ドメインは、500 nM、100 nM、1 nM、500 pM、100 pM未満またはそれ以下の $K_D$ で所望の標的に結合する。例示的な実施形態では、フィブロネクチンをベースとする足場タンパク質は、野生型 $^{10}$ F n 3ドメイン、特に野生型ヒト $^{10}$ F n 3ドメインによって結合されない標的に、特異的に結合する。

#### 【0043】

いくつかの実施形態では、本開示内容は、 $^{10}$ F n 3ドメインを含むポリペプチドを提供し、ここに、該 $^{10}$ F n 3ドメインは、ループ、A B；ループ、B C；ループ、C D；ループ、D E；ループ、E F；およびループ、F Gを含み、かつ、ヒト $^{10}$ F n 3ドメインの対応するループの配列と比べて変化したアミノ酸配列を備えるループB C、D EおよびF Gから選択される、少なくとも一つのループを有するものである。いくつかの実施形態では、B CおよびF Gループが変化されている。いくつかの実施形態では、B C、D EおよびF Gループが変化されている、すなわち該 $^{10}$ F n 3ドメインは天然に存在しないループを含む。「変化した」によって、鋳型配列（すなわち対応するヒトフィブロネクチンドメイン）に比べて一以上のアミノ酸配列変化を意味し、アミノ酸付加、欠失および置換を含む。アミノ酸配列を変化させることは、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動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合成によって起こってもよい。

#### 【0044】

いくつかの実施形態では、B C、D EおよびF Gから選択される一以上のループは、対応するヒトフィブロネクチンループと比べて、長さにおいて伸長または短縮してもよい。いくつかの実施形態では、ループの長さは2 - 25アミノ酸分、伸長することができる。いくつかの実施形態では、ループの長さは1 - 11アミノ酸分、短縮することができる。特に、ヒト $^{10}$ F n 3のF Gループは12残基長である一方、抗体重鎖における対応するループは4 - 28残基の範囲である。それゆえ、抗原結合を最適化するために、 $^{10}$ F n 3のF Gループの長さは、4 - 28残基のC D R 3の範囲を覆うように、長さならびに配列において変化され、抗原結合において最も高い可能な可動性および親和性を獲得する。

#### 【0045】

いくつかの実施形態では、フィブロネクチンをベースとする足場タンパク質は、少なくとも一つの選択されたB C、D EおよびF Gが変化される、配列番号：1の非ループ領域と少なくとも80、85、90、95、98または100%同一のアミノ酸配列を有する $^{10}$ F n 3ドメインを含む。いくつかの実施形態では、変化したB Cループは、最大10のアミノ酸置換、最大4のアミノ酸欠失、最大10のアミノ酸挿入、またはそれらの組合せを有する。いくつかの実施形態では、変化したD Eループは、最大6のアミノ酸置換、最大4のアミノ酸欠失、最大13のアミノ酸挿入、またはそれらの組合せを有する。いくつかの実施形態では、F Gループは、最大12のアミノ酸置換、最大11のアミノ酸欠失、最大25のアミノ酸挿入、またはそれらの組合せを有する。

#### 【0046】

特定の実施形態では、フィブロネクチンをベースとする足場タンパク質は、一般に以下の配列により定義される $^{10}$ F n 3ドメインを含む：

#### 【化2】

EVVAATPTSLLSW(X)<sub>x</sub>RYRITYGETGGNSPVOEFTVP(X)<sub>y</sub>TATISGLKPGVDYTITVYA  
VT(X)<sub>z</sub>PISINYRTEIEK (配列番号:38)

配列番号：38において、B Cループは $X_x$ により表され、D Eループは $X_y$ により表され、かつF Gループは $X_z$ により表される。Xは任意のアミノ酸を表し、Xに続く下付き文字はアミノ酸の数の整数値を表す。特に、x、yおよびzは、それぞれ独立して、約2

10

20

30

40

50

- 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個のアミノ酸の範囲であり得る。好ましい実施形態では、xは7アミノ酸、yは4アミノ酸、かつzは6、10または15アミノ酸である。鎖の配列(下線)は、配列番号: 38に示される対応するアミノ酸に比べて、7種の足場領域の全てにわたって、0から10、0から8、0から6、0から5、0から4、0から3、0から2、または0から1の範囲で置換、欠失または付加を有し得る。例示的な実施形態では、鎖の配列は、配列番号: 38に示される対応するアミノ酸に比べて、全ての7種の足場領域にわたって、0から10、0から8、0から6、0から5、0から4、0から3、0から2、または0から1の範囲で保存的置換を有し得る。特定の実施形態では、コアアミノ酸残基は固定され、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。太字で示されるEIEKテール(配列番号: 4)は固定される。特定の実施形態では、ループ領域を直接挟むアミノ酸(例えば、下線を引かれていない残基)は、それぞれ独立して、置換または欠失され得る。ループを直接挟む残基を置換する時、各残基は同数のアミノ酸を有する配列で、またはより多くのアミノ酸配列(例えば、0 - 10、0 - 8、0 - 5、0 - 3もしくは0 - 2個のアミノ酸残基の挿入)で置換され得る。下線を引かれていない残基はループ領域の一部であり、そのため、<sup>10</sup>F<sub>n</sub>3ドメインの構造に著しく影響を与えることなく、置換を受け入れる。

#### 【0047】

<sup>10</sup>F<sub>n</sub>3ドメインは一般に、配列番号: 37のアミノ酸番号1から開始する。しかしながら、アミノ酸欠失を備えるドメインもまた、本発明により包含される。いくつかの実施形態では、配列番号: 37の最初の8アミノ酸が欠失している。さらなる配列もまた、配列番号: 37の1 - 94に対応するアミノ酸または配列番号: 37のアミノ酸9 - 94を有する、<sup>10</sup>F<sub>n</sub>3ドメインのNまたはC末端に付加され得る。例えば、さらなるMG配列が<sup>10</sup>F<sub>n</sub>3ドメインのN末端に配置されてもよい。このMは通常切断され、N末端にGが残るだろう。いくつかの実施形態では、N末端伸長は、M、MG、Gおよび配列番号: 19 - 21のいずれかからなる群から選択されるアミノ酸配列からなる。

#### 【0048】

<sup>10</sup>F<sub>n</sub>3ドメインは、長さにおいて1 - 20、1 - 15、1 - 10、1 - 8、1 - 5、1 - 4、1 - 3、1 - 2または1アミノ酸のN末端伸長を任意に含み得る。例示的なN末端伸長は、(一文字アミノ酸コードにより表わされる)M、MG、G、MGVSDVPRDL(配列番号: 19)、VSDVPRDL(配列番号: 20)およびGVSDVPRDL(配列番号: 21)、または配列番号: 19、20もしくは21のいずれか1つのN末端切断型(truncation)を含む。他の適したN末端伸長は、例えば、X<sub>n</sub>SDVPRDL(配列番号: 26)、X<sub>n</sub>DVPRDL(配列番号: 27)、X<sub>n</sub>VPRDL(配列番号: 28)、X<sub>n</sub>PRDL(配列番号: 29)、X<sub>n</sub>RDL(配列番号: 30)、X<sub>n</sub>DL(配列番号: 31)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。Met - Gly配列が<sup>10</sup>F<sub>n</sub>3ドメインのN末端に付加される場合、このMは通常切断され、N末端にGが残るだろう。

#### 【0049】

本明細書で提供されるフィブロネクチンをベースとする足場タンパク質は、配列番号: 4のアミノ酸配列を含むC末端テールを有する<sup>10</sup>F<sub>n</sub>3ドメインを含む。例示的なC末端テールは、長さにおいて1 - 20、1 - 15、1 - 10、1 - 8、1 - 5または1 - 4アミノ酸であるポリペプチドを含む。テール配列の具体的な例は、例えば、EIEK(配列番号: 4)、EGSGC(配列番号: 5)、EIEKPCQ(配列番号: 6)、EIEKPSQ(配列番号: 32)、EIEKP(配列番号: 33)、EIEKPS(配列番号: 34)またはEIEKPC(配列番号: 35)を含む、必須としてなる、またはからなる、ポリペプチドを含む。このようなC末端配列は本明細書においてテールまたは伸長と呼ばれ、本明細書でさらに記載される。例示的な実施形態では、C末端テールは配列番号

10

20

30

40

50

: 6 のアミノ酸配列を含む、必須としてなる、またはからなる。好ましい実施形態では、C 末端配列は D K 配列を欠く。例示的な実施形態では、C 末端テールは、P E G による修飾を容易にする残基、すなわちリジンまたはシステイン残基を含む。好ましい実施形態では、C 末端テールは D K 配列を欠き、システイン残基を含む。

【 0 0 5 0 】

特定の実施形態では、フィブロネクチンをベースとする足場タンパク質は、N 末端伸長および C 末端テールの両方を有する  $^{10}$  F n 3 ドメインを含む。いくつかの実施形態では、H i s 6 - タグが N 末端または C 末端に配置されてもよい。

【 0 0 5 1 】

例示的な実施形態では、フィブロネクチンをベースとする足場タンパク質は、V E G F R 2 に結合する  $^{10}$  F n 3 ドメインを含む。特定の実施形態では、フィブロネクチンをベースとする足場タンパク質は、5 0 0 n M 未満の  $K_D$  で V E G F R 2 に結合し、B C ループは配列番号: 4 3 のアミノ酸配列を含み、D E は配列番号: 4 4 のアミノ酸配列を含み、F G ループは配列番号: 4 5 のアミノ酸配列を含み、かつ該タンパク質は D K 配列を欠く C 末端テールを含む。例示的な実施形態では、C 末端テールは E I E K (配列番号: 4)、E G S G C (配列番号: 5)、E I E K P C Q (配列番号: 6)、E I E K P S Q (配列番号: 3 2)、E I E K P (配列番号: 3 3)、E I E K P S (配列番号: 3 4) または E I E K P C (配列番号: 3 5) を含む。好ましい実施形態では、C 末端テールは E I E K (配列番号: 4) または E I E K P C Q (配列番号: 6) を含む。

【 0 0 5 2 】

特定の実施形態では、フィブロネクチンをベースとする足場タンパク質は、二以上の  $^{10}$  F n 3 ドメインを含む多価タンパク質である。例えば、多価フィブロネクチンをベースとする足場タンパク質は、共有結合される 2、3 またはそれより多い  $^{10}$  F n 3 ドメインを含んでもよい。例示的な実施形態では、フィブロネクチンをベースとする足場タンパク質は、2 つの  $^{10}$  F n 3 ドメインを含む二価または二量体タンパク質である。特定の実施形態では、多価フィブロネクチンをベースとする足場タンパク質は、第一の標的分子に結合する第一の  $^{10}$  F n 3 ドメインおよび第二の標的分子に結合する第二の  $^{10}$  F n 3 ドメインを含む。第一および第二の標的分子は同一または異なる標的分子であってもよい。第一および第二の標的分子が同一である場合、 $^{10}$  F n 3 ドメイン、すなわち結合ループは、同一または異なっているてもよい。それゆえ、第一および第二の  $^{10}$  F n 3 ドメインは、同一の標的ではあるが異なるエピトープで結合する。

【 0 0 5 3 】

例示的な実施形態では、多価フィブロネクチンをベースとする足場タンパク質の各  $^{10}$  F n 3 ドメインは、5 0 0 n M、1 0 0 n M、1 n M、5 0 0 p M、1 0 0 p M 未満またはそれ以下の  $K_D$  で所望の標的に結合する。例示的な実施形態では、多価フィブロネクチンをベースとする足場タンパク質の各  $^{10}$  F n 3 ドメインは、野生型  $^{10}$  F n 3 ドメイン、特に野生型ヒト  $^{10}$  F n 3 ドメインによって結合されない標的に、特異的に結合する。

【 0 0 5 4 】

多価フィブロネクチンをベースとする足場タンパク質における  $^{10}$  F n 3 ドメインは、ポリペプチドリンカーにより結合され得る。例示的なポリペプチドリンカーとして、1 - 2 0、1 - 1 5、1 - 1 0、1 - 8、1 - 5、1 - 4、1 - 3 または 1 - 2 アミノ酸を有するポリペプチドが挙げられる。適したポリペプチドリンカーの具体例は、本明細書にさらに記載される。特定の実施形態では、該リンカーは、本明細書に記載される C 末端テールポリペプチド、本明細書に記載される N 末端伸長ポリペプチド、以下に記載されるリンカーポリペプチド、またはそれらの任意の組み合わせであってもよい。

【 0 0 5 5 】

多価フィブロネクチンをベースとする足場タンパク質の場合には、好ましくは  $^{10}$  F n 3 ドメインのどれもが D K 配列を含有する C 末端テールを含まない。例示的な実施形態では、多価フィブロネクチンをベースとする足場タンパク質は二以上の  $^{10}$  F n 3 ドメインを含み、ここに、各ドメインは、D K 配列を含有しない C 末端テールを含むものである。



特定の実施形態では、多価フィブロネクチンをベースとする足場タンパク質は二以上の<sup>1</sup><sub>0</sub>F<sub>n</sub>3ドメインを含み、ここに、各ドメインは、D K配列を含有せず、リジンまたはシステイン残基などの、P E G部分の付加のために適した残基を含有するC末端テールを含むものである。特定の実施形態では、多価フィブロネクチンをベースとする足場タンパク質は二以上の<sup>1</sup><sub>0</sub>F<sub>n</sub>3ドメインを含み、ここに、各ドメインは、配列番号：4のアミノ酸配列を含むC末端テールを含むものである。特定の実施形態では、多価フィブロネクチンをベースとする足場タンパク質は二以上の<sup>1</sup><sub>0</sub>F<sub>n</sub>3ドメインを含み、ここに、N末端<sup>1</sup><sub>0</sub>F<sub>n</sub>3ドメインは配列番号：4のアミノ酸配列を含むC末端テールを含み、C末端<sup>1</sup><sub>0</sub>F<sub>n</sub>3ドメインはE I E K（配列番号：4）、E G S G C（配列番号：5）、E I E K P C Q（配列番号：6）、E I E K P S Q（配列番号：32）、E I E K P（配列番号：33）、E I E K P S（配列番号：34）またはE I E K P C（配列番号：35）のアミノ酸配列を含むC末端テールを含むものである。

#### 【0056】

<sup>1</sup><sub>0</sub>F<sub>n</sub>3ドメインのループ配列を変えることにより、任意の所望の標的に結合するフィブロネクチンをベースとする足場タンパク質を生成することができる。例示的な実施形態では、増大した安定性を有する、本明細書で提供されるフィブロネクチンをベースとする足場タンパク質は、例えば、T N F、V E G F R 2、I G F - I RまたはE G F Rなどの治療上望ましい標的に結合し得る。特定の実施形態では、フィブロネクチンをベースとする足場タンパク質は、以下の標的：E G F R、I G F - I R、H S AおよびP C S K 9、または前述のいずれかの断片、のー以上に結合しない。特定の実施形態では、単一の<sup>1</sup><sub>0</sub>F<sub>n</sub>3ドメインを含むフィブロネクチンをベースとする足場タンパク質は、以下の標的：E G F R、I G F - I R、H S AおよびP C S K 9、または前述のいずれかの断片、のー以上に結合しない。特定の実施形態では、単一の<sup>1</sup><sub>0</sub>F<sub>n</sub>3ドメインを含むフィブロネクチンをベースとする足場タンパク質は、以下の標的：E G F R、I G F - I R、H S AおよびP C S K 9、または前述のいずれかの断片、のー以上に結合しない。特定の実施形態では、2つの<sup>1</sup><sub>0</sub>F<sub>n</sub>3ドメインを含むフィブロネクチンをベースとする足場タンパク質は、以下の標的：E G F R、I G F - I R、H S AおよびP C S K 9、または前述のいずれかの断片、のー以上に結合しない。特定の実施形態では、2つの<sup>1</sup><sub>0</sub>F<sub>n</sub>3ドメインを含むフィブロネクチンをベースとする足場タンパク質は、標的分子の以下の組み合わせ：i) E G F RおよびI G F - I R；ii) E G F Rおよび任意の他の標的タンパク質；またはiii) ヒト血清アルブミンおよび任意の他の標的タンパク質、のー以上に結合しない。特定の実施形態では、2つの<sup>1</sup><sub>0</sub>F<sub>n</sub>3ドメインを含むフィブロネクチンをベースとする足場タンパク質は、標的分子の以下の組み合わせ：i) E G F RおよびI G F - I R；ii) E G F Rおよび任意の他の標的タンパク質；またはiii) ヒト血清アルブミンおよび任意の他の標的タンパク質、のー以上に結合しない。

#### 【0057】

フィブロネクチンをベースとする足場タンパク質二量体

特定の実施形態では、本明細書に記載されるフィブロネクチンをベースとする足場タンパク質は、2つの<sup>1</sup><sub>0</sub>F<sub>n</sub>3ドメインを含む二量体である。一実施形態では、本出願は、(i) 配列番号：40のアミノ酸配列を有するB Cループ、配列番号：41のアミノ酸配列を有するD Eループ、配列番号：42のアミノ酸配列を有するF Gループ、および配列番号：4-6のいずれか一つのアミノ酸配列を含むC末端テールを含み、I G F - I Rに結合するものである、<sup>1</sup><sub>0</sub>F<sub>n</sub>3ドメイン；ならびに(ii) 配列番号：43のアミノ酸配列を有するB Cループ、配列番号：44のアミノ酸配列を有するD Eループ、配列番号：45のアミノ酸配列を有するF Gループ、および配列番号：4-6のいずれか一つのアミノ酸配列を含むC末端テールを含み、V E G F R 2に結合するものである、<sup>1</sup><sub>0</sub>F<sub>n</sub>3ドメイン；からなる群から選択される第一および第二の<sup>1</sup><sub>0</sub>F<sub>n</sub>3ドメインを含む、V / Iフィブロネクチンをベースとする足場タンパク質二量体を提供する。例示的な実施形態では、V E G F R 2およびI G F - I R結合<sup>1</sup><sub>0</sub>F<sub>n</sub>3ドメインのそれぞれは、500 nM、100 nM、1 nM、500 pM、100 pM未満またはそれ以下のK<sub>D</sub>でその標的

10

20

30

40

50

に結合する。

【0058】

特定の実施形態では、V/Iフィブロネクチンをベースとする足場タンパク質二量体は、N末端からC末端の順に、IGF-IR結合ドメインおよびVEGFR2結合ドメインを含む。例示的な実施形態では、フィブロネクチンをベースとする足場タンパク質二量体は、(i)配列番号：40のアミノ酸配列を有するBCループ、配列番号：41のアミノ酸配列を有するDEループ、配列番号：42のアミノ酸配列を有するFGループ、および配列番号：4のアミノ酸配列を含むC末端テールを含み、IGF-IRに結合するものである、第一の<sup>10</sup>F<sub>n</sub>3ドメイン；ならびに(ii)配列番号：43のアミノ酸配列を有するBCループ、配列番号：44のアミノ酸配列を有するDEループ、配列番号：45のアミノ酸配列を有するFGループ、および配列番号：6のアミノ酸配列を含むC末端テールを含み、VEGFR2に結合するものである、第二の<sup>10</sup>F<sub>n</sub>3ドメイン；を含む。例示的な実施形態では、VEGFR2およびIGF-IR結合<sup>10</sup>F<sub>n</sub>3ドメインのそれぞれは、500nM、100nM、1nM、500pM、100pM未満またはそれ以下のK<sub>D</sub>でその標的に結合する。

10

【0059】

特定の実施形態では、V/Iフィブロネクチンをベースとする足場タンパク質二量体は、N末端からC末端の順に、VEGFR2結合ドメインおよびIGF-IR結合ドメインを含む。例示的な実施形態では、フィブロネクチンをベースとする足場タンパク質二量体は、(i)配列番号：43のアミノ酸配列を有するBCループ、配列番号：44のアミノ酸配列を有するDEループ、配列番号：45のアミノ酸配列を有するFGループ、および配列番号：4のアミノ酸配列を含むC末端テールを含み、VEGFR2に結合するものである、第一の<sup>10</sup>F<sub>n</sub>3ドメイン；ならびに(ii)配列番号：40のアミノ酸配列を有するBCループ、配列番号：41のアミノ酸配列を有するDEループ、配列番号：42のアミノ酸配列を有するFGループ、および配列番号：6のアミノ酸配列を含むC末端テールを含み、IGF-IRに結合するものである、第二の<sup>10</sup>F<sub>n</sub>3ドメイン；を含む。例示的な実施形態では、VEGFR2およびIGF-IR結合<sup>10</sup>F<sub>n</sub>3ドメインのそれぞれは、500nM、100nM、1nM、500pM、100pM未満またはそれ以下のK<sub>D</sub>でその標的に結合する。

20

【0060】

特定の実施形態では、V/Iフィブロネクチンをベースとする足場タンパク質二量体は、(i)配列番号：2と少なくとも90%、95%、97%、98%、99%または100%同一性を有するアミノ酸配列を含み、必須としてなり、またはからなり、配列番号：4-6のいずれか一つのアミノ酸配列を有するC末端テールを含み、必須としてなる、またはからなるものであり、IGF-IRに結合するものである、<sup>10</sup>F<sub>n</sub>3ドメイン；ならびに(ii)配列番号：3と少なくとも90%、95%、97%、98%、99%または100%同一性を有するアミノ酸配列を含み、必須としてなり、またはからなり、配列番号：4-6のいずれか一つのアミノ酸配列を有するC末端テールを含み、必須としてなる、またはからなるものであり、VEGFR2に結合するものである、<sup>10</sup>F<sub>n</sub>3ドメイン；からなる群から選択される第一および第二の<sup>10</sup>F<sub>n</sub>3ドメインを含む。例示的な実施形態では、VEGFR2およびIGF-IR結合<sup>10</sup>F<sub>n</sub>3ドメインのそれぞれは、500nM、100nM、1nM、500pM、100pM未満またはそれ以下のK<sub>D</sub>でその標的に結合する。例示的な実施形態では、第一および第二の<sup>10</sup>F<sub>n</sub>3ドメインはポリペプチドリンカーを介して連結される。特定の実施形態では、V/Iフィブロネクチンをベースとする足場タンパク質二量体は、N末端VEGFR2結合<sup>10</sup>F<sub>n</sub>3ドメインおよびC末端IGF-IR結合<sup>10</sup>F<sub>n</sub>3ドメインを含む。特定の実施形態では、V/Iフィブロネクチンをベースとする足場タンパク質二量体は、N末端IGF-IR結合<sup>10</sup>F<sub>n</sub>3ドメインおよびC末端VEGFR2結合<sup>10</sup>F<sub>n</sub>3ドメインを含む。特定の実施形態では、N末端<sup>10</sup>F<sub>n</sub>3ドメインは配列番号：4のアミノ酸配列を有するC末端テールを含み、C末端<sup>10</sup>F<sub>n</sub>3ドメインは配列番号：6のアミノ酸配列を有するC末端テールを含

30

40

50

む。

【 0 0 6 1 】

特定の実施形態では、V / I フィブロネクチンをベースとする足場タンパク質二量体は、配列番号：48 - 55のいずれか一つのアミノ酸配列を含む。他の実施形態では、V / I フィブロネクチンをベースとする足場タンパク質二量体は、配列番号：48のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、V / I フィブロネクチンをベースとする足場タンパク質二量体は、配列番号：48 - 55のいずれか一つのアミノ酸配列と、少なくとも70、75、80、85、90、95、97、98、99または100%同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【 0 0 6 2 】

特定の実施形態では、V / I フィブロネクチンをベースとする足場タンパク質二量体は、N1 - D1 - C1 - L - N2 - D2 - C2構造を有するポリペプチドを含み、ここに、N1およびN2は0 - 10アミノ酸を独立して含む任意のN末端伸長であり、D1およびD2は、(i) 配列番号：2に示されるアミノ酸配列と少なくとも90%、95%、97%、98%、99%または100%同一性を有する第10フィブロネクチンIII型ドメイン( $^{10}\text{Fn3}$ )、ここに、該 $^{10}\text{Fn3}$ ドメインは500nM、100nM、1nM、500pM、100pM未満またはそれ以下の $K_D$ でIGF - IRに結合するものである、および(ii) 配列番号：3に示されるアミノ酸配列と少なくとも90%、95%、97%、98%、99%または100%同一性を有する $^{10}\text{Fn3}$ ドメイン、ここに、該 $^{10}\text{Fn3}$ ドメインは500nM未満の $K_D$ でVEGFR2に結合するものである：からなる群から独立して選択され；Lは0 - 30アミノ酸残基を含むポリペプチドリinkerであり；C1は配列番号：4のアミノ酸配列を含み、必須としてなり、またはからなり；C2は配列番号：4、5または6のアミノ酸配列のいずれか一つを含む、必須としてなり、またはからなるものである。特定の実施形態では、D1はVEGFR2に結合し、D2はIGF - IRに結合する。他の実施形態では、D1はIGF - IRに結合し、D2はVEGFR2に結合する。

【 0 0 6 3 】

特定の実施形態では、D1またはD2領域は、配列番号：43のアミノ酸配列を有するBCループ、配列番号：44のアミノ酸配列を有するDEループ、および配列番号：45のアミノ酸配列を有するFGループを含む、VEGFR2に結合する $^{10}\text{Fn3}$ ドメインであって、ここに、該 $^{10}\text{Fn3}$ ドメインは100nM未満の $K_D$ でVEGFR2に結合するものである。

【 0 0 6 4 】

特定の実施形態では、D1またはD2領域は、以下のアミノ酸配列により表されるVEGFR2バインダーである：

【 化 3 】

EVVAATPTSLISWRHPHFPTRYRITYGETGGNSPVQEFVPLQPPTATISGLKPGVD  
YTITVYAVTDGRNGRLLSIPISINYRT (配列番号:3)

配列番号：3において、BC、DEおよびFGループは太字で示される固定された配列を有し(例えば、配列番号：43のアミノ酸配列を有するBCループ、配列番号：44のアミノ酸配列を有するDEループ、および配列番号：45のアミノ酸配列を有するFGループ)、かつ、下線が引かれた残りの配列(例えば、7つの鎖ならびにAB、CDおよびEFループの配列)は、配列番号：3に示される対応するアミノ酸と比べて、0から20、0から15、0から10、0から8、0から6、0から5、0から4、0から3、0から2、または0から1の範囲で置換、保存的置換、欠失または付加を有する。特定の実施形態では、コアアミノ酸残基は固定され、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。

【 0 0 6 5 】

VEGFR2に結合する $^{10}\text{Fn3}$ ドメインは、長さにおいて1 - 20、1 - 15、1

- 10、1 - 8、1 - 5、1 - 4、1 - 3、1 - 2または1アミノ酸のN末端伸長(N1またはN2)に、任意に連結され得る。例示的なN末端伸長は、(一文字アミノ酸コードにより表わされる)M、MG、G、MGVSDVPRDL(配列番号:19)、VSDVPRDL(配列番号:20)およびGVSDVPRDL(配列番号:21)、または配列番号:19、20もしくは21のいずれか1つのN末端切断型(truncation)を含む。他の適したN末端伸長は、例えば、X<sub>n</sub>SDVPRDL(配列番号:26)、X<sub>n</sub>DVPRDL(配列番号:27)、X<sub>n</sub>VPRDL(配列番号:28)、X<sub>n</sub>PRDL(配列番号:29)、X<sub>n</sub>RDL(配列番号:30)、X<sub>n</sub>DL(配列番号:31)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。好ましい実施形態では、N1は、配列番号:19のアミノ酸配列を含む、必須としてなる、またはからなる。好ましい実施形態では、N2は、配列番号:20のアミノ酸配列を含む、必須としてなる、またはからなる。

10

#### 【0066】

VEGFR2に結合する<sup>10</sup>F<sub>n</sub>3ドメインは、C末端テール(C1またはC2)を任意に含み得る。クレームされる発明のフィブロネクチンをベースとする足場タンパク質二量体のC末端テールは、DK配列を含有しない。例示的なC末端テールとして、長さにおいて1-20、1-15、1-10、1-8、1-5、1-4、1-3、1-2または1アミノ酸であるポリペプチドが挙げられる。C末端テールの具体例として、EIEKPSQ(配列番号:32)、EIEKPCQ(配列番号:6)およびEIEK(配列番号:4)が挙げられる。他の実施形態では、適したC末端テールは、例えば、以下のアミノ酸配列(一文字アミノ酸コードにより表わされる)の一つ:EIE、EIEKP(配列番号:33)、EIEKPS(配列番号:34)またはEIEKPC(配列番号:35)を含む、配列番号:4、6または32のC末端切断された断片であってもよい。他の適したC末端テールには、例えば、ES、EC、EGS、EGC、EGSGS(配列番号:36)またはEGSGC(配列番号:5)が挙げられる。特定の実施形態では、C1は、配列番号:4のアミノ酸配列を含む、必須としてなる、またはからなる。特定の実施形態では、C2は、配列番号:4、5または6のアミノ酸配列を含む、必須としてなる、またはからなる。好ましい実施形態では、C1は、配列番号:4のアミノ酸配列を含み、必須としてなり、またはからなり、C2は、配列番号:6のアミノ酸配列を含む、必須としてなる、またはからなる。

20

30

#### 【0067】

特定の実施形態では、VEGFR2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。例示的な実施形態では、N1はGlyまたはMet-Glyで始まり、C1はシステイン残基を含有せず、N2はMetで開始せず、かつC2はシステイン残基を含む。VEGFR2に結合する<sup>10</sup>F<sub>n</sub>3ドメインの具体例は:(i)配列番号:3に示されるアミノ酸配列または(ii)配列番号:3に示されるアミノ酸配列と少なくとも85%、90%、95%、97%、98%または99%同一性を有するアミノ酸配列を含む、ポリペプチドである。

#### 【0068】

特定の実施形態では、D1またはD2領域は、配列番号:40のアミノ酸配列を有するBCループ、配列番号:41のアミノ酸配列を有するDEループ、および配列番号:42のアミノ酸配列を有するFGループを含む、IGF-IRに結合する<sup>10</sup>F<sub>n</sub>3ドメインであって、ここに、該<sup>10</sup>F<sub>n</sub>3ドメインは100nM未満のK<sub>D</sub>でIGF-IRに結合するものである。

40

#### 【0069】

特定の実施形態では、D1またはD2領域は、以下のアミノ酸配列により表されるIGF-IRバインダーである:

## 【化 4】

EVVAATPTSLISWSARLKVARYYRITYGETGGNSPVQEEFVPKNVYTATISGLKPGVD

YTIITVYAVTRFRDYQPISINYRT (配列番号:2)

配列番号：2において、BC、DEおよびFGループは太字で示される固定された配列を有し（例えば、配列番号：40のアミノ酸配列を有するBCループ、配列番号：41のアミノ酸配列を有するDEループ、および配列番号：42のアミノ酸配列を有するFGループ）、かつ、下線が引かれた残りの配列（例えば、7つの鎖ならびにAB、CDおよびEFループの配列）は、配列番号：2に示される対応するアミノ酸と比べて、0から20、0から15、0から10、0から8、0から6、0から5、0から4、0から3、0から2、または0から1の範囲で置換、保存的置換、欠失または付加を有する。特定の実施形態では、コアアミノ酸残基は固定され、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。

10

## 【0070】

IGF-IRに結合する<sup>10</sup>F<sub>n</sub>3ドメインは、長さにおいて1-20、1-15、1-10、1-8、1-5、1-4、1-3、1-2または1アミノ酸のN末端伸長（N1またはN2）に、任意に連結され得る。例示的なN末端伸長は、（一文字アミノ酸コードにより表わされる）M、MG、G、MGVSDVPRDL（配列番号：19）、VSDVPRDL（配列番号：20）およびGVSDVPRDL（配列番号：21）、または配列番号：19、20もしくは21のいずれか1つのN末端切断型（truncation）を含む。他の適したN末端伸長は、例えば、X<sub>n</sub>SDVPRDL（配列番号：26）、X<sub>n</sub>DVPRDL（配列番号：27）、X<sub>n</sub>VPRDL（配列番号：28）、X<sub>n</sub>PRDL（配列番号：29）、X<sub>n</sub>RDL（配列番号：30）、X<sub>n</sub>DL（配列番号：31）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。好ましい実施形態では、N1は、配列番号：19のアミノ酸配列を含む、必須としてなる、またはからなる。好ましい実施形態では、N2は、配列番号：20のアミノ酸配列を含む、必須としてなる、またはからなる。

20

## 【0071】

IGF-IRに結合する<sup>10</sup>F<sub>n</sub>3ドメインは、C末端テール（C1またはC2）を任意に含み得る。クレームされる発明のフィブロネクチンをベースとする足場タンパク質二量体のC末端テールは、DK配列を含有しない。例示的なC末端テールとして、長さにおいて1-20、1-15、1-10、1-8、1-5、1-4、1-3、1-2または1アミノ酸であるポリペプチドが挙げられる。C末端テールの具体例として、EIEKPSQ（配列番号：32）、EIEKPCQ（配列番号：6）およびEIEK（配列番号：4）が挙げられる。他の実施形態では、適したC末端テールは、例えば、以下のアミノ酸配列（一文字アミノ酸コードにより表わされる）の一つ：EIE、EIEKP（配列番号：33）、EIEKPS（配列番号：34）またはEIEKPC（配列番号：35）を含む、配列番号：4、6または32のC末端切断された断片であってもよい。他の適したC末端テールには、例えば、ES、EC、EGS、EGC、EGSGS（配列番号：36）またはEGSGC（配列番号：5）が挙げられる。特定の実施形態では、C1は、配列番号：4のアミノ酸配列を含む、必須としてなる、またはからなる。特定の実施形態では、C2は、配列番号：4、5または6のアミノ酸配列を含む、必須としてなる、またはからなる。好ましい実施形態では、C1は、配列番号：4のアミノ酸配列を含み、必須としてなり、またはからなり、C2は、配列番号：6のアミノ酸配列を含む、必須としてなる、またはからなる。

30

40

## 【0072】

特定の実施形態では、IGF-IR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。例示的な実施形態では、N1はGlyまたはMet-Glyで始まり、C1はシステイン残基を含有せず、N2はMetで開始せず、かつC2はシ

50

ステイン残基を含む。I G F - I R に結合する  $^{10}\text{Fn3}$  ドメインの具体例は：( i ) 配列番号：2 に示されるアミノ酸配列または( i i ) 配列番号：2 に示されるアミノ酸配列と少なくとも85%、90%、95%、97%、98%または99%同一性を有するアミノ酸配列を含む、ポリペプチドである。

#### 【0073】

L 領域はポリペプチドリンカーである。例示的なポリペプチドリンカーとして、1 - 20、1 - 15、1 - 10、1 - 8、1 - 5、1 - 4、1 - 3または1 - 2アミノ酸を有するポリペプチドが挙げられる。適したポリペプチドリンカーの具体例は、本明細書にさらに記載される。特定の実施形態では、該リンカーは、本明細書に記載されるC末端テールポリペプチド、本明細書に記載されるN末端伸長ポリペプチド、またはそれらの組み合わせであってもよい。

10

#### 【0074】

特定の実施形態では、N1、N2、L、C1またはC2の一以上が、システインまたはリジン残基などの、PEG化に適したアミノ酸残基を含み得る。例示的な実施形態では、C2が、システインまたはリジン残基などの、PEG化に適した少なくとも一つのアミノ酸を含む。適したポリペプチドリンカーの具体例は、以下にさらに記載される。N1 - D1 - C1 - L - N2 - D2 - C2構造を有するフィブロネクチンをベースとする足場タンパク質二量体の具体例は：( i ) 配列番号：48 - 55のいずれか一つに示されるアミノ酸配列または( i i ) 配列番号：48 - 55のいずれか一つと、少なくとも85%、90%、95%、97%、98%または99%同一性を有するアミノ酸配列を含む、ポリペ

20

#### 【0075】

特定の実施形態では、フィブロネクチンをベースとする足場タンパク質二量体はN1 - D1 - L - N2 - D2構造を有し、ここに、D1およびD2は、各々、以下の配列を有するアミノ酸配列を含むものである：

#### 【化5】

EVVAATPTSLISW(X)<sub>x</sub>RYRITYGETGGNSPVQFTVP(X)<sub>y</sub>TATISGLKPGVDYTITVYA  
VT(X)<sub>z</sub>PISINYRTEIEK (配列番号:38)

配列番号：38において、BCループはX<sub>x</sub>により表され、DEループはX<sub>y</sub>により表され、かつFGループはX<sub>z</sub>により表される。鎖の配列(下線)は、配列番号：38に示される対応するアミノ酸に比べて、7種の足場領域の全てにわたって、0から10、0から8、0から6、0から5、0から4、0から3、0から2、または0から1の範囲で置換、保存的置換、欠失または付加を有し得る。例示的な実施形態では、鎖の配列は、配列番号：38に示される対応するアミノ酸に比べて、全ての7種の足場領域にわたって、0から10、0から8、0から6、0から5、0から4、0から3、0から2、または0から1の範囲で保存的置換を有し得る。特定の実施形態では、コアアミノ酸残基は固定され、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。太字で示されるEIEK配列(配列番号：4)は固定される。特定の実施形態では、ループ領域を直接挟むアミノ酸(例えば、下線を引かれていない残基)は、それぞれ独立して、置換または欠失される。ループを直接挟む残基を置換する時、各残基は同数のアミノ酸を有する配列で、またはより多くのアミノ酸配列(例えば、0 - 10、0 - 8、0 - 5、0 - 3もしくは0 - 2個のアミノ酸残基の挿入)で置換され得る。下線を引かれていない残基はループ領域の一部であり、そのため、 $^{10}\text{Fn3}$  ドメインの構造に著しく影響を与えることなく、置換を受け入れる。

30

40

#### 【0076】

特定の実施形態では、フィブロネクチンをベースとする足場タンパク質二量体はN1 - D1 - L - N2 - D2構造を有し、ここに、D1およびD2は：( i ) 配列番号：38を含む $^{10}\text{Fn3}$  ドメイン、ここに、X<sub>x</sub>は配列番号：40のアミノ酸配列を含み、必須としてなり、またはからなり、X<sub>y</sub>は配列番号：41のアミノ酸配列を含み、必須としてな

50

り、またはからなり、かつ $X_z$ は配列番号：42のアミノ酸配列を含む、必須としてなる、またはからなるものである、および、(i i)配列番号：38を含む<sup>10</sup>F n 3ドメイン、ここに、 $X_x$ は配列番号：43のアミノ酸配列を含み、必須としてなり、またはからなり、 $X_y$ は配列番号：44のアミノ酸配列を含み、必須としてなり、またはからなり、かつ $X_z$ は配列番号：45のアミノ酸配列を含む、必須としてなる、またはからなるものである、からなる群から選択されるものである。

#### 【0077】

例示的な実施形態では、フィブロネクチンをベースとする足場タンパク質二量体はN1-D1-L-N2-D2構造を有し、D1は配列番号：38のアミノ酸配列を含み、ここに、 $X_x$ は配列番号：40のアミノ酸配列を含み、必須としてなり、またはからなり、 $X_y$ は配列番号：41のアミノ酸配列を含み、必須としてなり、またはからなり、かつ $X_z$ は配列番号：42のアミノ酸配列を含む、必須としてなる、またはからなるものであって、かつ、D2は配列番号：38のアミノ酸配列を含み、ここに、 $X_x$ は配列番号：43のアミノ酸配列を含み、必須としてなり、またはからなり、 $X_y$ は配列番号：44のアミノ酸配列を含み、必須としてなり、またはからなり、かつ $X_z$ は配列番号：45のアミノ酸配列を含む、必須としてなる、またはからなるものである。

#### 【0078】

別の実施形態では、フィブロネクチンをベースとする足場タンパク質二量体はN1-D1-L-N2-D2構造を有し、D1は配列番号：38のアミノ酸配列を含み、ここに、 $X_x$ は配列番号：43のアミノ酸配列を含み、必須としてなり、またはからなり、 $X_y$ は配列番号：44のアミノ酸配列を含み、必須としてなり、またはからなり、かつ $X_z$ は配列番号：45のアミノ酸配列を含む、必須としてなる、またはからなるものであって、かつ、D2は配列番号：38のアミノ酸配列を含み、ここに、 $X_x$ は配列番号：40のアミノ酸配列を含み、必須としてなり、またはからなり、 $X_y$ は配列番号：41のアミノ酸配列を含み、必須としてなり、またはからなり、かつ $X_z$ は配列番号：42のアミノ酸配列を含む、必須としてなる、またはからなるものである。

#### 【0079】

特定の実施形態では、N1-D1-L-N2-D2構造を有するフィブロネクチンをベースとする足場タンパク質二量体は、C末端テールをさらに含む。例示的な実施形態では、C末端テールは、PEG部分の付加のために適した残基、例えばリジンまたはシステイン残基、を含む。好ましい実施形態では、C末端テールは配列PCQを含む。

#### 【0080】

様々な実施形態では、N1-D1-L-N2-D2構造を有するフィブロネクチンをベースとする足場タンパク質二量体のL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として、1-20、1-15、1-10、1-8、1-5、1-4、1-3または1-2アミノ酸を有するポリペプチドが挙げられる。適したポリペプチドリinkerの具体例は、本明細書にさらに記載される。加えて、N1およびN2は本明細書で上述のN末端伸長である。

#### 【0081】

好ましい実施形態では、本明細書に記載されるフィブロネクチンをベースとする足場タンパク質二量体は、インビトロ(in vitro)、インビボ(in vivo)または両方のいずれかで、増大した安定性を有する。特定の実施形態では、本明細書に記載されるフィブロネクチンをベースとする足場タンパク質二量体は、溶液中での保存の間、低減された断片化および/または減少した凝集を有する。特定の実施形態では、本明細書に記載されるフィブロネクチンをベースとする足場タンパク質二量体は、増大した血清半減期を有する。

#### 【0082】

例示的な実施形態では、本明細書に記載されるフィブロネクチンをベースとする足場タンパク質二量体は、DK配列を含むフィブロネクチンをベースとする足場タンパク質二量体に比べて、低減された断片化を有する。特に、本明細書に記載されるフィブロネクチン

10

20

30

40

50

をベースとする足場タンパク質二量体は、C末端テール、N末端伸長または2つの<sup>10</sup>F<sub>n</sub>3ドメインの間のリンカーのいずれか一つにおいて、一以上のDK配列を有するフィブロネクチンをベースとする足場タンパク質二量体に比べて、増大した安定性を有する。例えば、フィブロネクチンをベースとする足場タンパク質二量体は、例えば、第一および/または第二<sup>10</sup>F<sub>n</sub>3サブユニットの後に配列番号：46を有するテールを含む、一方または両方のC末端テール領域でDK配列を有する、フィブロネクチンをベースとする足場タンパク質二量体よりも、より安定である。例示的な実施形態では、本明細書に記載されるフィブロネクチンをベースとする足場タンパク質二量体は、C1および/またはC2が配列番号：46を含む、N1-D1-C1-L-N2-D2-C2式を有するフィブロネクチンをベースとする足場タンパク質二量体に比べて、低減された断片化を有する。断片化は、例えば、実施例3に記載されるRP-HPLC解析を用いて評価され得る。

10

#### 【0083】

例示的な実施形態では、本明細書に記載されるフィブロネクチンをベースとする足場タンパク質二量体は、pH4.0で4週間の溶液中での保存中に、7%、6%、5%、4%、3.5%、3%、2%未満またはそれ以下の断片化を示す。特定の実施形態では、本明細書に記載されるフィブロネクチンをベースとする足場タンパク質二量体は、一以上のDK配列を含有するフィブロネクチンをベースとする足場タンパク質二量体の同等型(equivalent version)に比べて、少なくとも25%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%以上低減される断片化のレベルを示す。

#### 【0084】

20

例示的な実施形態では、本明細書に記載されるフィブロネクチンをベースとする足場タンパク質二量体は、一以上のDK配列を含有するフィブロネクチンをベースとする足場タンパク質二量体の同等型の血清半減期に比べて、少なくとも10%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%以上増大した血清半減期を示す。他の実施形態では、本明細書に記載されるフィブロネクチンをベースとする足場タンパク質二量体は、一以上のDK配列を含有するフィブロネクチンをベースとする足場タンパク質二量体の同等型の血清半減期に比べて、2倍、3倍、5倍、10倍以上増大した血清半減期を示す。

#### 【0085】

特定の実施形態では、本出願は、EGFRに結合する一つの<sup>10</sup>F<sub>n</sub>3ドメインおよびIGF-IRに結合する一つの<sup>10</sup>F<sub>n</sub>3ドメインを含む、E/Iフィブロネクチンをベースとする足場タンパク質二量体を提供する。特定の実施形態では、E/Iフィブロネクチンをベースとする足場タンパク質二量体は、配列番号：22-25のいずれか一つのアミノ酸配列を含む。他の実施形態では、E/Iフィブロネクチンをベースとする足場タンパク質二量体は、配列番号：25のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、E/Iフィブロネクチンをベースとする足場タンパク質二量体は、配列番号：22-25のいずれか一つのアミノ酸配列と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、99または100%同一性を有するアミノ酸配列を含む。

30

#### 【0086】

ポリペプチドリンカー

40

本出願は、ポリペプチドリンカーを介して連結された少なくとも2つの<sup>10</sup>F<sub>n</sub>3ドメインを含む、多価フィブロネクチンをベースとする足場タンパク質二量体を提供する。一実施形態では、本出願は、ポリペプチドリンカー(L)を介して連結された少なくとも2つの<sup>10</sup>F<sub>n</sub>3ドメインを含む、多価フィブロネクチンをベースとする足場タンパク質二量体を提供する。ポリペプチドは、第一の<sup>10</sup>F<sub>n</sub>3ドメインを含むN末端ドメインおよび第二の<sup>10</sup>F<sub>n</sub>3ドメインを含むC末端ドメインを含む。第一および第二の<sup>10</sup>F<sub>n</sub>3ドメインは、直接的またはポリペプチドリンカー(L)を介して間接的に連結され得る。さらなるリンカーまたはスペーサー、例えば、配列番号：4、6または32が、<sup>10</sup>F<sub>n</sub>3ドメインとポリペプチドリンカーの間の第一の<sup>10</sup>F<sub>n</sub>3ドメインのC末端において、導入されてもよい。さらなるリンカーまたはスペーサーが、<sup>10</sup>F<sub>n</sub>3ドメインとポリペ

50



プチドリンカーの間の第二の<sup>10</sup>F<sub>n</sub>3ドメインのN末端において、導入されてもよい。  
【0087】

<sup>10</sup>F<sub>n</sub>3ドメインを連結するための適したリンカーとして、別個のドメインが、互いとは独立にフォールディングして、標的分子との高親和性結合を可能にする三次元構造を形成するのを可能にするものがある。本出願は、これらの条件を満たす、適したリンカーが、グリシン-セリンをベースとするリンカー、グリシン-プロリンをベースとするリンカー、プロリン-アラニンをベースとするリンカー、ならびにリンカー配列番号：7を含むことを提供する。国際公開第2009/142773号に記載される例は、これらのリンカーを介して連結されたF<sub>n</sub>3ドメインが、そ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では、リンカーはグリシン-セリンをベースとするリンカーである。これらのリンカーはグリシンおよびセリン残基を含み、8-50、10-30および10-20個の間のアミノ酸の長さであり得る。このようなリンカーの例として配列番号：8-12が挙げられる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドリンカーは配列番号：8および9から選択される。いくつかの実施形態では、リンカーはグリシン-プロリンをベースとするリンカーである。これらのリンカーはグリシンおよびプロリン残基を含み、3-30、10-30および3-20個の間のアミノ酸の長さであり得る。このようなリンカーの例として配列番号：13、14および15が挙げられる。いくつかの実施形態では、リンカーはプロリン-アラニンをベースとするリンカーである。これらのリンカーはプロリンおよびアラニン残基を含み、長さにおいて、3-30、10-30、3-20および6-18個の間のアミノ酸の長さであり得る。このようなリンカーの例として配列番号：16、17および18が挙げられる。最適なリンカー長およびアミノ酸組成は、当技術分野で周知の方法による、日常の実験により、決定され得ると考えられる。いくつかの実施形態では、ポリペプチドリンカーは配列番号：7である。例示的な実施形態ではリンカーはDK配列を全く含有しない。

【0088】

#### 薬物動態部分

一態様では、本出願は、薬物動態(PK)部分をさらに含むフィブロネクチンをベースとする足場タンパク質を提供する。薬物動態は、例として、対象による吸収、分布、代謝および排泄を含む、化合物の特性を包含する。改善される薬物動態は、認識される治療的必要性に従って評価できる。おそらくは、タンパク質が、投与後の血清において利用可能なままである時間を増大することによって、バイオアベイラビリティを増大すること、および/または用量間の時間を増大することが望ましいことが多い。場合によっては、経時的な(over time)タンパク質の血清濃度の連続性を改善すること(例えば、投与の直後および次の投与の直前のタンパク質の血清濃度の相違の減少)が望ましい。フィブロネクチンをベースとする足場タンパク質は、哺乳類(例えば、マウス、ラットまたはヒト)においてポリペプチドのクリアランス速度(clearance rate)を、修飾されていないポリペプチドに比べて三倍超低減する部分に結合させてもよい。薬物動態の改善の他の尺度として、血清半減期を上げることができ、これは相および相に分けられることが多い。いずれかの相または両方の相が、適当な部分の付加によって大幅に改善され得る。PK部分は、生物学的に活性な分子と融合される場合、生物学的に活性な分子の薬物動態特性に影響を及ぼす、任意のタンパク質、ペプチドまたは部分を指す。

【0089】

血液からのタンパク質のクリアランスを遅延する傾向があるPK部分として、ポリオキシアルキレン部分、例えば、ポリエチレングリコール、糖(例えば、シアル酸)および耐容性良好であるタンパク質部分(例えば、Fc、Fc断片、トランスフェリンまたは血清アルブミン)が挙げられる。フィブロネクチンをベースとする足場タンパク質は、米国公開第20070048282号に記載される、アルブミンまたはアルブミンの断片(部分)もしくは変種と融合してもよい。いくつかの実施形態では、PK部分は、米国公開第2007/0178082号および同第2007/0269422号に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。いくつかの実施形態では、PK部分は、米国

公開第2007/0178082号に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。

【0090】

いくつかの実施形態では、フィブロネクチンをベースとする足場タンパク質は、非タンパク質性ポリマーを含むPK部分に結合されてもよい。いくつかの実施形態では、ポリマーは、米国特許第4,640,835号；同第4,496,689号；同第4,301,144号；同第4,670,417号；同第4,791,192号または同第4,179,337号に記載されるような、ポリエチレングリコール(「PEG」)、ポリプロピレングリコールまたはポリオキシアルキレンである。例示的な実施形態では、ポリマーはPEG部分である。

10

【0091】

PEGは、市販されているが、当技術分野で周知の方法に従うエチレングリコールの開環重合によって調製することもできる、周知の、水溶性ポリマーである(Sandler and Karo, Polymer Synthesis, Academic Press, New York, Vol. 3, pages 138-161)。用語「PEG」は、広く使用され、大きさ、PEGの末端での修飾にかかわらず、任意のポリエチレングリコール分子を包含し、式： $X-O(CH_2CH_2O)_{n-1}CH_2CH_2OH(1)$ (式中、 $n$ は、20から2300であり、 $X$ は、 $H$ または末端修飾、例えば、 $C_{1-4}$ アルキルである)によって表され得る。一実施形態では、本発明のPEGは、一方の末端でヒドロキシまたはメトキシで終結する、すなわち、 $X$ は、 $H$ または $CH_3$ である(「メトキシPEG」)。PEGは、結合反応に必要な；分子の化学合成に起因する；または分子の部分の最適距離のためのスペーサーである、さらなる化学基を含み得る。さらに、このようなPEGは、一緒に連結している一以上のPEG側鎖からなり得る。二以上のPEG鎖を有するPEGは、マルチアームの、または分岐PEGと呼ばれる。分岐PEGは、例えば、グリセロール、ペンタエリスリトールおよびソルビトールを含む種々のポリオールへのポリエチレンオキシドの付加によって調製できる。例えば、4アームの分岐PEGをペンタエリスリトールおよびエチレンオキシドから調製できる。分岐PEGは、例えば、欧州公開出願番号第473084A号および米国特許第5,932,462号に記載されている。PEGの1つの形として、リジンの第一級アミノ基を介して連結している2つのPEG側鎖(PEG2)が挙げられる(Monfardini, C., et al., Bioconjugate Chem. 6 (1995) 62-69)。

20

30

【0092】

ペプチドまたはタンパク質とのPEGコンジュゲーションは、一般に、PEGの活性化および活性化されたPEG中間体の、標的タンパク質/ペプチドとの直接的な、またはリンカーとのカップリングを含み、リンカーは、その後に活性化され、標的タンパク質/ペプチドとカップリングされる(Abuchowski, A. et al., J. Biol. Chem., 252, 3571 (1977)およびJ. Biol. Chem., 252, 3582 (1977), Zalipsky, et al., and Harris et. al., in: Poly(ethylene glycol) Chemistry: Biotechnical and Biomedical Applications; (J. M. Harris ed.) Plenum Press: New York, 1992; Chap. 21 and 22参照)。PEG分子を含有するフィブロネクチンをベースとする足場タンパク質はまた、複合タンパク質(conjugated protein)としても知られているのに対し、結合しているPEG分子を欠くタンパク質は、コンジュゲートしていないと呼ばれることもあるということに留意されたい。

40

【0093】

利用されるPEGの大きさは、フィブロネクチンをベースとする足場タンパク質の意図される用途を含む、いくつかの因子に応じて変わる。より大きいPEGが、身体、血液、

50

非血液細胞外液または組織において半減期を増大するために好ましい。インビボ細胞活性のためには、約10から60kDaの範囲のPEG、ならびに約100kDa未満のPEGが好ましく、約60kDa未満がより好ましいが、約100kDaを超える大きさも同様に使用できる。インビボイメージング適用には、大きなPEGと同じ程度には半減期を増大せず、より迅速な分布およびより短い半減期を可能にする、より小さいPEG、一般に、約20kDa未満を使用してもよい。フィブロネクチンをベースとする足場タンパク質へのコンジュゲーションのために、種々の分子量の形態のPEG、例えば、約1,000ダルトン(Da)から100,000Da(nは、20から2300である)が選択できる。PEG中の反復単位の数「n」は、ダルトンで記載される分子量に対して見積もられている。活性化されたリンカー上のPEGの組み合わせられた分子量が、製薬学的用途にとって適していることが好ましい。したがって、一実施形態では、PEG分子の分子量は、100,000Daを超えない。例えば、3PEG分子が、リンカーと結合しており、各PEG分子が、12,000Daの同一分子量を有する場合には(各nが約270である)、リンカー上のPEGの総分子量は、約36,000Daである(総nは、約820である)。リンカーと結合しているPEGの分子量は異なってもよく、例えば、リンカー上の3分子のうち2つのPEG分子が、各5,000Daであり(各nは、約110である)、1つのPEG分子が12,000Daであり得る(nは、約270である)。いくつかの実施形態では、1つのPEG部分が、フィブロネクチンをベースとする足場タンパク質とコンジュゲートしている。いくつかの実施形態では、PEG部分は、約20、30、40、50、60、70、80または90kDaである。いくつかの実施形態では、PEG部分は、約40kDaである。

#### 【0094】

いくつかの実施形態では、PEG化されたフィブロネクチンをベースとする足場タンパク質は、一、二以上のPEG部分を含む。一実施形態では、PEG部分(単数または複数)は、標的リガンドと接触するタンパク質の表面上にある、および/または表面から離れたアミノ酸残基と結合している。一実施形態では、PEG化されたフィブロネクチンをベースとする足場タンパク質中のPEGの組み合わせられた分子量または総分子量は、約3,000Daから60,000Daまたは約10,000Daから36,000Daである。一実施形態では、PEG化されたフィブロネクチンをベースとする足場タンパク質は、実質的に直線の、直鎖PEGである。

#### 【0095】

当業者ならば、例えば、PEG化されたフィブロネクチンをベースとする足場タンパク質が、どのように治療的に使用されるか、所望の投与量、循環時間、タンパク質分解に対する抵抗性、免疫原性および他の検討事項に基づいてPEGの適した分子量を選択できる。タンパク質の特性を増強するためのPEGおよびその使用についての論述については、N. V. Katre, Advanced Drug Delivery Reviews 10: 91-114 (1993)を参照のこと。

#### 【0096】

いくつかの実施形態では、フィブロネクチンをベースとする足場タンパク質は、アミド結合を形成するポリ(エチレングリコール)基の-CO(すなわち、カルボニル)を用いて、式： $-CO-(CH_2)_x-(OCH_2CH_2)_m-OR$ の1つのポリ(エチレングリコール)基と、結合ポリペプチドのアミノ基の1つと共有結合によって連結しており；Rは低級アルキルであり；xは2または3であり；mは約450から約950であり；nおよびmは結合ポリペプチドを引いたコンジュゲートの分子量が、約10から40kDaであるよう選択される。一実施形態では、フィブロネクチンをベースとする足場タンパク質のリジンのアミノ基が、利用可能な(遊離)アミノ基である。

#### 【0097】

特定の一実施形態では、PEG-フィブロネクチンをベースとする足場タンパク質を形成するためにPEGの炭酸エステルが用いられる。N,N'-ジスクシンイミジルカルボネート(DSC)を、PEGとの反応において用いて、活性な混合PEG-スクシンイミ

10

20

30

40

50

ジルカルボネートを形成してもよく、これをして、リンカーの求核基またはフィブロネクチンをベースとする足場タンパク質のアミノ基と反応させてもよい（米国特許第5,281,698号および米国特許第5,932,462号参照）。同様の種類の反応において、1,1'-（ジベンゾトリアゾリル）カルボネートおよびジ-（2-ピリジル）カルボネートをPEGと反応させて、PEG-ベンゾトリアゾリルおよびPEG-ピリジル混合カルボネートをそれぞれ形成してもよい（米国特許第5,382,657号）。

【0098】

フィブロネクチンをベースとする足場タンパク質のPEG化は、最先端の方法に従って、例えば、フィブロネクチンをベースとする足場タンパク質と求電子的に活性なPEGとの反応によって実施できる（供給業者：Shearwater Corp., USA、[www.shearwatercorp.com](http://www.shearwatercorp.com)）。本発明の好ましいPEG試薬として、例えば、N-ヒドロキシスクシンイミジルプロピオネート（PEG-SPA）、ブタノエート（PEG-SBA）、PEG-スクシンイミジルプロピオネートまたはmPEG2-NHSなどの分岐N-ヒドロキシスクシンイミドがある（Monfardini, C., et al., Bioconjugate Chem. 6 (1995) 62-69）。このような方法を用いて、フィブロネクチンをベースとする足場タンパク質のリジンの - アミノ基、またはフィブロネクチンをベースとする足場タンパク質のN末端アミノ基でPEG化してもよい。

【0099】

別の実施形態では、PEG分子を、フィブロネクチンをベースとする足場タンパク質上のスルフヒドリル基とカップリングしてもよい（Sartore, L., et al., Appl. Biochem. Biotechnol., 27, 45 (1991); Morpurgo et al., Biocon. Chem., 7, 363-368 (1996); Goodson et al., Bio/Technology (1990) 8, 343; 米国特許第5,766,897号）。米国特許第6,610,281号および同第5,766,897号には、スルフヒドリル基とカップリングしてもよい例示的な反応性PEG種が記載されている。

【0100】

いくつかの実施形態では、PEG化されたフィブロネクチンをベースとする足場タンパク質は、部位指定PEG化によって、特にシステイン部分とのPEGのコンジュゲーションによって生成される。特定の実施形態では、Cys残基は、フィブロネクチンをベースとする足場タンパク質の、N末端に、N末端と最もN末端の または 様鎖の間に、C末端に、またはC末端と最もC末端の間に位置し得る。特定の実施形態では、フィブロネクチンをベースとする足場タンパク質は二量体であり、Cys残基は、フィブロネクチンをベースとする足場タンパク質二量体の各結合ドメインの、N末端に、N末端と最もN末端の または 様鎖の間に、C末端に、またはC末端と最もC末端の間に位置し得る。特定の実施形態では、Cys残基は、フィブロネクチンをベースとする足場タンパク質二量体のN末端に、フィブロネクチンをベースとする足場タンパク質二量体の（すなわち、フィブロネクチンをベースとする足場タンパク質二量体のN末端結合ドメインの）N末端と最もN末端の または 様鎖の間に、あるいはフィブロネクチンをベースとする足場タンパク質二量体のC末端に、またはフィブロネクチンをベースとする足場タンパク質二量体の（すなわち、フィブロネクチンをベースとする足場タンパク質二量体のC末端結合ドメインの）C末端と最もC末端の または 様鎖の間に、位置し得る。Cys残基は、同様に他の位置、特に、標的結合に関与しないループのいずれか、または多価フィブロネクチンをベースとする足場タンパク質の結合ドメインの間に位置していてもよい。PEG部分はまた、アミンとのコンジュゲーションによるものを含めて、他の化学反応によって結合させてもよい。

【0101】

PEG分子が、フィブロネクチンをベースとする足場タンパク質上のシステイン残基とコンジュゲートしている、いくつかの実施形態では、システイン残基は、フィブロネクチ

ンをベースとする足場タンパク質に対して天然である一方、他の実施形態では、一以上のシステイン残基がフィブロネクチンをベースとする足場タンパク質中で操作されている。フィブロネクチンをベースとする足場タンパク質をコードする配列中に変異を導入し、システイン残基を生成してもよい。これは、例えば、一以上のアミノ酸残基をシステインに変異することによって達成され得る。システイン残基に変異するための好ましいアミノ酸として、セリン、トレオニン、アラニンおよび他の親水性残基が挙げられる。システインに変異される残基は、表面にさらされている残基であることが好ましい。一次配列またはタンパク質に基づいて残基の表面到達性を予測するためのアルゴリズムは、当技術分野で周知である。あるいは、それに基づいてフィブロネクチンをベースとする足場タンパク質が設計されている、第10f n 3ドメインフレームワークの結晶構造が解かれていることを考えると、フィブロネクチンをベースとする足場タンパク質のアミノ酸配列を比較することにより、表面残基を予測することができ(Himanen et al., Nature, (2001) 20-27; 414 (6866): 933-8参照)、それゆえ、表面にさらされている残基が同定される。一実施形態では、システイン残基がフィブロネクチンをベースとする足場タンパク質に、Nおよび/またはC末端で、もしくはその付近で、またはループ領域内で導入される。システイン残基のPEG化は、例えば、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-オルトピリジルジスルフィドを用いて実施できる。

10

#### 【0102】

いくつかの実施形態では、PEG化されたフィブロネクチンをベースとする足場タンパク質は、N末端アミノ酸のアミノ基と共有結合しているPEG分子を含む。部位特異的N末端還元的アミノ化は、Pepinsky et al., (2001) JPET, 297, 1059および米国特許第5,824,784号に記載されている。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-アルデヒドの使用は、米国特許第4,002,531号に、Wieder et al., (1979) J. Biol. Chem. 254, 12579に、およびChamow et al., (1994) Bioconjugate Chem. 5, 133に記載されている。

20

#### 【0103】

別の実施形態では、PEG化されたフィブロネクチンをベースとする足場タンパク質は、リンカーと共有結合している一以上のPEG分子を含み、リンカーは、次いで、フィブロネクチンをベースとする足場タンパク質のN末端でアミノ酸残基のアミノ基と結合される。このようなアプローチは、米国公開第2002/0044921号および国際公開第94/01451号に開示されている。

30

#### 【0104】

一実施形態では、フィブロネクチンをベースとする足場タンパク質は、C末端でPEG化される。特定の実施形態では、タンパク質は、C末端アジド-メチオニンの導入およびその後のスタウディング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PEG化される。このC末端コンジュゲーション法は、Cazalis et al., C-Terminal Site-Specific PEGylation of a Truncated Thrombomodulin Mutant with Retention of Full Bioactivity, Bioconjug Chem. 2004; 15(5): 1005-1009に記載されている。

40

#### 【0105】

例示的な実施形態では、フィブロネクチンをベースとする足場タンパク質は、本明細書にさらに記載されるC末端テール領域でPEG化される。例示的なC末端テールとして、例えば、配列番号: 5、6または35のいずれか一つを有するポリペプチドが挙げられる。

#### 【0106】

50

サイズ排除（例えば、ゲル濾過）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で公知の従来の分離および精製技術を用いて、PEG化されたフィブロネクチンをベースとする足場タンパク質を精製できる。SDS-PAGEを用いて生成物を分離してもよい。分離できる生成物として、モノ-、ジ-、トリ-、ポリPEG化された、およびPEG化されていないフィブロネクチンをベースとする足場タンパク質、ならびに遊離PEGが挙げられる。モノPEGコンジュゲートのパーセンテージは、溶出ピーク周辺の広い画分をプールすることによって制御し、組成物中のモノPEGのパーセンテージを高めることができる。約90パーセントのモノPEGコンジュゲートは、収率および活性の良好なバランスに相当する。例えば、コンジュゲートの少なくとも92パーセントまたは少なくとも96パーセントが、モノPEG種である組成物が望ましいものであり得る。本発明の実施形態では、モノPEGコンジュゲートのパーセンテージは、90パーセントから96パーセントである。

10

#### 【0107】

本発明の一実施形態では、PEG化されたフィブロネクチンをベースとする足場タンパク質中のPEGは、ヒドロキシルアミンアッセイ、例えば、室温で、8から16時間かけて、450mMヒドロキシルアミン（pH6.5）を用いて、PEG化アミノ酸残基から加水分解されず、したがって、安定である。一実施形態では、組成物の80%超が、より好ましくは、少なくとも90%、最も好ましくは、少なくとも95%が、安定なモノPEGフィブロネクチンをベースとする足場タンパク質である。

#### 【0108】

20

別の実施形態では、PEG化されたフィブロネクチンをベースとする足場タンパク質は、非修飾タンパク質と関連する生物活性の少なくとも約25%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%または100%を保持することが好ましい。一実施形態では、生物活性とは、 $K_D$ 、 $k_{on}$ または $k_{off}$ によって評価される、一以上の標的分子に結合するその能力を指す。具体的な一実施形態では、PEG化されたフィブロネクチンをベースとする足場タンパク質は、PEG化されていないフィブロネクチンをベースとする足場タンパク質と比べて、一以上の標的分子との結合における増大を示す。

#### 【0109】

PEG修飾されたフィブロネクチンをベースとする足場タンパク質の血清クリアランス速度は、修飾されていないフィブロネクチンをベースとする足場タンパク質のクリアランス速度と比べて、約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%または90%さえも減少され得る。PEG修飾されたフィブロネクチンをベースとする足場タンパク質は、修飾されていないフィブロネクチンをベースとする足場タンパク質の半減期と比べて、増強されている半減期（ $t_{1/2}$ ）を有し得る。PEG修飾されたフィブロネクチンをベースとする足場タンパク質の半減期は、修飾されていないフィブロネクチンをベースとする足場タンパク質の半減期と比べて、少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、125%、150%、175%、200%、250%、300%、400%または500%、またはさらに1000%まで増強され得る。いくつかの実施形態では、タンパク質半減期は、緩衝生理食塩水または血清中などインビトロで決定される。他の実施形態では、タンパク質半減期は、動物の血清または他の体液中でのフィブロネクチンをベースとする足場タンパク質の半減期などの、インビボ半減期である。

30

40

#### 【0110】

核酸-タンパク質融合技術

一態様では、本出願は、例えば、TNF-、EGFR、VEGFR2、IGF-IRまたは他のタンパク質などの、ヒト標的に結合するフィブロネクチンIII型ドメインを含む、フィブロネクチンをベースとする足場タンパク質を提供する。特異的結合特性を備えるFn3ドメインを、迅速に作製し、試験する1つの方法は、Adnexus、Bristol-Myers Squibb企業の核酸-タンパク質融合技術である。核酸-タンパク質融合体（RNA-およびDNA-タンパク質融合体）を利用する、PROfus

50

ion 商標と呼ばれる、このようなインビトロ発現およびタグ技術を用いて、タンパク質との結合にとって重要である、新規ポリペプチドおよびアミノ酸モチーフを同定し得る。核酸-タンパク質融合技術は、タンパク質をそのコードする遺伝情報と共有結合によってカップリングする技術である。RNA-タンパク質融合技術およびフィブロネクチンをベースとする足場タンパク質ライブラリースクリーニング法の詳細な説明については、出典明示により本明細書に組み込まれる、Szostak et al., 米国特許第6,258,558号; 同第6,261,804号; 同第6,214,553号; 同第6,281,344号; 同第6,207,446号; 同第6,518,018号; 国際公開第00/34784号; 国際公開第01/64942号; 国際公開第02/032925号; およびRoberts and Szostak, Proc Natl. Acad. Sci. 94:12297-12302, 1997参照。

10

#### 【0111】

##### ベクター&ポリヌクレオチド

本明細書に開示される様々なフィブロネクチンをベースとする足場タンパク質のいずれかをコードする核酸は、化学的に、酵素的にまたは組換えによって合成してもよい。コドン使用頻度(codon usage)は、細胞における発現を改良するよう選択され得る。このようなコドン使用頻度は、選択される細胞種に応じて変わる。大腸菌および他の細菌、ならびに哺乳類細胞、植物細胞、酵母細胞および昆虫細胞については、特定化されたコドン使用パターンが開発されている。例えば: Mayfield et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 2003 Jan 21; 100(2):438-42; Sinclair et al. Protein Expr Purif. 2002 Oct; 26(1):96-105; Connell ND. Curr Opin Biotechnol. 2001 Oct; 12(5):446-9; Makrides et al. Microbiol Rev. 1996 Sep; 60(3):512-38; およびSharp et al. Yeast. 1991 Oct; 7(7):657-78参照。

20

#### 【0112】

核酸操作の一般的な技術は、例えば、出典明示により本明細書に組み込まれる、Sambrook et al., Molecular Cloning, : A Laboratory Manual, Vols. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2ed., 1989またはF. Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology (Green Publishing and Wiley-Interscience: New York, 1987)および定期的更新に記載されている。ポリペプチドをコードするDNAは、哺乳類、ウイルスまたは昆虫遺伝子に由来する適した転写または翻訳調節エレメントと作動可能に連結されている。このような調節エレメントとして、転写プロモーター、転写を制御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制御する配列が挙げられる。宿主において複製する能力は、通常、複製起点により付与され、形質転換体の認識を容易にする選択遺伝子がさらに組み込まれる。

30

40

#### 【0113】

本明細書に記載されるフィブロネクチンをベースとする足場タンパク質は、直接的にだけでなく、好ましくは、シグナル配列または成熟タンパク質あるいはポリペプチドのN末端に特異的切断部位を有する他のポリペプチドである、異種ポリペプチドとの融合ポリペプチドとしても、組換えによって生成してもよい。選択される異種シグナル配列は、宿主細胞によって認識され、プロセッシングされる(すなわち、シグナルペプチダーゼによって切断される)ものであることが好ましい。天然シグナル配列を認識およびプロセッシングしない原核生物宿主細胞のために、シグナル配列は、例えば、アルカリホスファターゼ、ペニシリナーゼ、lppまたは熱安定性エンテロトキシンIIリーダーの群から選択される原核生物シグナル配列で置換される。酵母分泌のためには、天然シグナル配列を、例え

50

ば、酵母インベルターゼリーダー、因子リーダー（サッカロミセス（*Saccharomyces*）およびクルイベロマイセス（*Kluyveromyces*） 因子リーダーを含む）または酸性ホスファターゼリーダー、*C. アルビカン*（*albicans*）グルコアミラーゼリーダーまたはPCT国際公開90/13646に記載されるシグナルによって置換してもよい。哺乳類細胞発現では、哺乳類シグナル配列ならびにウイルスの分泌リーダー、例えば、単純ヘルペスgDシグナルが利用可能である。このような前駆体領域のDNAを、タンパク質をコードするDNAにリーディングフレームでライゲートしてもよい。

#### 【0114】

発現ベクターおよびクローニングベクターは両者とも、ベクターが一以上の選択された宿主細胞において複製するのを可能にする核酸配列を含有する。一般に、クローニングベクターでは、この配列は、ベクターが宿主染色体DNAとは独立に複製するのを可能にするものであり、複製起点または自立複製配列を含む。このような配列は、様々な細菌、酵母およびウイルスについてよく知られている。プラスミドpBR322に由来する複製起点は、ほとんどのグラム陰性菌にとって適しており、2ミクロンのプラスミド起点が酵母に適しており、様々なウイルス起点（SV40、ポリオーマ、アデノウイルス、VSVまたはBPV）が、哺乳類細胞中のクローニングベクターにとって有用である。一般に、複製起点成分は、哺乳類発現ベクターにとって必要ではない（SV40起点は、通常、単に、それが初期プロモーターを含むために、使用され得る）。

#### 【0115】

発現ベクターおよびクローニングベクターは、選択マーカーとも呼ばれる選択遺伝子を含有し得る。典型的な選択遺伝子は、（a）抗生物質または他の毒素、例えば、アンピシリン、ネオマイシン、メトトレキセートもしくはテトラサイクリンに対する耐性を付与する、（b）栄養要求欠損を補完する、または（c）複合培地からは利用できない決定的な栄養素を供給するタンパク質をコードするものであり、例えば、バチルス（*Bacilli*）のD-アラニンラセマーゼをコードする遺伝子が挙げられる。

#### 【0116】

酵母において使用するために適した選択遺伝子として、酵母プラスミドYRp7中に存在する

#### 【0117】

発現ベクターおよびクローニングベクターは、通常、宿主生物により認識され、フィブロネクチンをベースとする足場タンパク質をコードする核酸と作動可能に連結されたプロモーターを含有する。原核生物宿主とともに使用するために適したプロモーターとして、phoAプロモーター、-ラクタマーゼおよびラクトースプロモーター系、アルカリホスファターゼ、トリプトファン（trp）プロモーター系、およびtacプロモーターなどのハイブリッドプロモーターが挙げられる。しかし、他の既知細菌プロモーターも適している。細菌系において使用するためのプロモーターはまた、フィブロネクチンをベースとする足場タンパク質をコードするDNAと作動可能に連結されたシャイン-ダルガーノ（S.D.）配列を含有するだろう。

#### 【0118】

真核生物のためのプロモーター配列は公知である。実質的にすべての真核細胞遺伝子は、転写が開始される部位からおよそ25から30塩基上流に位置するATリッチ領域を有する。多数の遺伝子の転写の開始から70から80塩基上流に見られる別の配列は、CN

10

20

30

40

50



C A A T 領域であり、ここで、N は、任意のヌクレオチドであり得る。ほとんどの真核細胞遺伝子の 3' 末端には、コード配列の 3' 末端へのポリ A テールの付加のためのシグナルであり得る A A T A A A 配列がある。これらの配列のすべてが、真核細胞発現ベクターに適宜挿入される。

#### 【 0 1 1 9 】

酵母宿主とともに使用するために適した促進配列の例として、3 - ホスホグリセレートキナーゼ、またはエノラーゼ、グリセルアルデヒド - 3 - リン酸デヒドロゲナーゼ、ヘキソキナーゼ、ピルビン酸デカルボキシラーゼ、ホスホフルクトキナーゼ、グルコース - 6 - リン酸イソメラーゼ、3 - ホスホグリセレートムターゼ、ピルビン酸キナーゼ、トリオースリン酸イソメラーゼ、ホスホグルコースイソメラーゼおよびグルコキナーゼなどの他の解糖酵素のためのプロモーターが挙げられる。

10

#### 【 0 1 2 0 】

増殖条件によって制御される転写というさらなる利点を有する誘導性プロモーターである、他の酵母プロモーターとして、アルコールデヒドロゲナーゼ 2、イソシトクロム C、酸性ホスファターゼ、窒素代謝に関連する分解酵素、メタロチオネイン、グリセルアルデヒド - 3 - リン酸デヒドロゲナーゼならびにマルトースおよびガラクトース利用に關与する酵素のためのプロモーター領域がある。酵母発現における使用のための適したベクターおよびプロモーターは、欧州特許公報番号 7 3 , 6 5 7 にさらに記載されている。酵母エンハンサーも、酵母プロモーターとともに有利に用いられる。

#### 【 0 1 2 1 】

20

哺乳類宿主細胞におけるベクターからの転写は、例えば、ポリオーマウイルス、鶏痘ウイルス、( アデノウイルス 2 などの ) アデノウイルス、ウシパピローマウイルス、トリ肉腫ウイルス、サイトメガロウイルス、レトロウイルス、B 型肝炎ウイルスおよび最も好ましくは、サルウイルス 4 0 ( S V 4 0 ) などのウイルスのゲノムから、異種哺乳類プロモーター、例えば、アクチンプロモーターまたは免疫グロブリンプロモーターから、ヒートショックプロモーターから得られたプロモーターにより、このようなプロモーターが宿主細胞系と適合するならば、制御され得る。

#### 【 0 1 2 2 】

S V 4 0 ウイルスの初期および後期プロモーターは、S V 4 0 ウイルス複製起点をも含有する S V 4 0 制限断片として都合よく得られる。ヒトサイトメガロウイルスの最初期プロモーターは、H i n d I I I E 制限断片として都合よく得られる。ベクターとしてウシパピローマウイルスを用いる、哺乳類宿主において D N A を発現するための系は、米国特許第 4 , 4 1 9 , 4 4 6 号に開示されている。この系の改変は、米国特許第 4 , 6 0 1 , 9 7 8 号に記載されている。単純ヘルペスウイルス由来チミジンキナーゼプロモーターの制御下でのマウス細胞におけるヒト - インターフェロン c D N A の発現に関しては、R e y e s e t a l . , N a t u r e 2 9 7 : 5 9 8 - 6 0 1 ( 1 9 8 2 ) も参照。あるいは、ラウス肉腫ウイルスの長末端反復配列 ( l o n g t e r m i n a l r e p e a t ) をプロモーターとして用いることができる。

30

#### 【 0 1 2 3 】

高等真核生物によるフィブロネクチンをベースとする足場タンパク質をコードする D N A の転写は、ベクター中にエンハンサー配列を挿入することにより増大されることが多い。哺乳類遺伝子 ( グロビン、エラスターゼ、アルブミン、 - フェトプロテインおよびインスリン ) に由来する多数のエンハンサー配列が現在知られている。しかし、通常、真核細胞ウイルス由来のエンハンサーを用いるだろう。例として、複製起点の後側の S V 4 0 エンハンサー ( b p 1 0 0 - 2 7 0 )、サイトメガロウイルス初期プロモーターエンハンサー、複製起点の後側のポリオーマエンハンサーおよびアデノウイルスエンハンサーが挙げられる。真核細胞プロモーターの活性化のためのエンハンサーエレメントに関しては、Y a n i v , N a t u r e 2 9 7 : 1 7 - 1 8 ( 1 9 8 2 ) も参照。エンハンサーは、ポリペプチドコード配列の 5' または 3' の位置でベクター中にスプライシングされ得るが、プロモーターの 5' 側に位置することが好ましい。

40

50

## 【0124】

真核宿主細胞（例えば、酵母、真菌、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）において用いられる発現ベクターはまた、転写の終結のために、かつmRNAを安定化するために必要な配列も含有するだろう。このような配列は一般に、真核細胞またはウイルスのDNAまたはcDNAの5'非翻訳領域、および場合により、3'非翻訳領域から得ることができる。これらの領域は、ポリペプチドをコードするmRNAの非翻訳部分中のポリアデニル化断片として転写される、ヌクレオチドセグメントを含有する。1つの有用な転写終結成分は、ウシ成長ホルモンポリアデニル化領域である。国際公開94/11026およびそこで開示される発現ベクターを参照。

## 【0125】

組換えDNAはまた、フィブロネクチンをベースとする足場タンパク質を精製するために有用であり得る任意の種類のタンパク質タグ配列を含み得る。タンパク質タグの例として、ヒスチジンタグ、FLAGタグ、mycタグ、HAタグまたはGSTタグが挙げられるが、これらに限定されるものではない。細菌、真菌、酵母および哺乳類細胞宿主とともに使用するために適当なクローニングおよび発現ベクターは、Cloning Vector: A Laboratory Manual, (Elsevier, New York, 1985) 中に見ることができ、その関連の開示内容は、出典明示により本明細書に組み込まれる。

## 【0126】

発現コンストラクトは、当業者には明らかであるように、宿主細胞にとって適当な方法を用いて宿主細胞に導入される。宿主細胞に核酸を導入するための種々の方法が当技術分野で公知であり、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、DEAE-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（ベクターが感染性物質である）感染が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

## 【0127】

適した宿主細胞として、原核生物、酵母、哺乳類細胞または細菌細胞が挙げられる。適した細菌として、グラム陰性またはグラム陽性菌、例えば、大腸菌またはバチルス種が挙げられる。好ましくは、S. cerevisiaeなどの、サッカロミセス種に由来する酵母も、ポリペプチドの生成のために使用してよい。様々な哺乳類または昆虫細胞培養系を使用して、組換えタンパク質を発現することもできる。昆虫細胞において異種タンパク質を生成するためのバキュロウイルス系は、Luckow and Summers, (Bio/Technology, 6:47, 1988) に総説されている。適した哺乳類宿主細胞株の例として、内皮細胞、COS-7サル腎臓細胞、CV-1、L細胞、C127、3T3、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)、ヒト胚性腎臓細胞、HeLa、293、293TおよびBHK細胞株が挙げられる。精製されたフィブロネクチンをベースとする足場タンパク質は、組換えタンパク質を発現するために適した宿主/ベクター系を培養することにより調製される。多数の適用のために、本明細書に開示される小さいサイズのフィブロネクチンをベースとする足場タンパク質は、発現のための好ましい方法として大腸菌において発現を行う。次いで、フィブロネクチンをベースとする足場タンパク質は、培養培地または細胞抽出物から精製される。

## 【0128】

タンパク質生成

宿主細胞は、タンパク質生成のために本明細書に記載される発現またはクローニングベクターを用いて形質転換され、プロモーターを誘導し、形質転換体を選択し、または所望の配列をコードする遺伝子を増幅するために適当に改変された従来の栄養培地で培養される。

## 【0129】

フィブロネクチンをベースとする足場タンパク質を生成するために用いられる宿主細胞は、種々の培地で培養してもよい。Ham's F10 (Sigma)、最小必須培地（

10

20

30

40

50

(MEM)、(Sigma))、RPMI-1640(Sigma)およびダルベッコ改変イーグル培地((DMEM)、(Sigma))などの市販の培地が、宿主細胞を培養するために適している。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；同第4,657,866号；同第4,927,762号；同第4,560,655号；または同第5,122,469号；国際公開90/03430；国際公開87/00195；または米国特許第Re.30,985号に記載される培地のいずれかも、宿主細胞のための培養培地として用いてよい。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成長因子など)、塩(塩化ナトリウム、カルシウム、マグネシウムおよびホスフェートなど)、バッファー(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<sup>商標</sup>薬など)、微量元素(マイクロモル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)およびグルコースまたは同等なエネルギー供給源を用いて補給され得る。任意の他の必要な栄養補助剤を、当業者に公知である適当な濃度で含めてもよい。温度、pHなどの培養条件は、発現のために選択された宿主細胞とともにこれまでに使用されたものであり、当業者には明らかであろう。

#### 【0130】

本明細書に開示されるフィブロネクチンをベースとする足場タンパク質はまた、無細胞翻訳系を使用して生成できる。このような目的上、フィブロネクチンをベースとする足場タンパク質をコードする核酸は、インピトロ転写を可能にしてmRNAを生成し、使用されている特定の無細胞系(哺乳類または酵母細胞などの真核細胞を含まない翻訳系または細菌細胞などの原核生物を含まない翻訳系)におけるmRNAの細胞を含まない翻訳を可能にするよう改変されなければならない。

#### 【0131】

フィブロネクチンをベースとする足場タンパク質はまた、化学合成によって(例えば、Solid Phase Peptide Synthesis, 2nd ed., 1984, The Pierce Chemical Co., Rockford, ILに記載される方法によって)生成できる。フィブロネクチンをベースとする足場タンパク質への修飾も化学合成によって生成できる。

#### 【0132】

フィブロネクチンをベースとする足場タンパク質は、タンパク質化学の分野で一般に知られている、タンパク質の単離/精製法により精製できる。非限定的な例として、抽出、再結晶化、塩析(例えば、硫酸アンモニウムまたは硫酸ナトリウムを用いる)、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、アフィニティークロマトグラフィー、電気泳動、向流分配またはこれらの任意の組合せが挙げられる。精製後、フィブロネクチンをベースとする足場タンパク質を、濾過および透析を含むが、これらに限定されるものではない、当技術分野で公知の種々の方法のいずれかにより、異なるバッファーに交換してもよく、かつ/または、濃縮してもよい。

#### 【0133】

精製されたフィブロネクチンをベースとする足場タンパク質は、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、最も好ましくは、少なくとも98%純粋である。純度の正確な数値にかかわらず、フィブロネクチンをベースとする足場タンパク質は医薬製剤として使用するために十分に純粋である。

#### 【0134】

例示的な使用

一態様では、本出願は、検出可能な部分で標識されたフィブロネクチンをベースとする足場タンパク質を提供する。フィブロネクチンをベースとする足場タンパク質は、種々の

診断的適用のために用いてもよい。検出可能な部分は、検出可能なシグナルを直接的または間接的のいずれかで生じることができる任意のものであり得る。例えば、検出可能な部分は、H 3、C 1 4、C 1 3、P 3 2、S 3 5またはI 1 3 1などの放射性同位元素；フルオレセインイソチオシアネート、ローダミンもしくはルシフェリンなどの蛍光もしくは化学発光化合物；またはアルカリホスファターゼ、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼもしくは西洋ワサビペルオキシダーゼなどの酵素であり得る。

#### 【0135】

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) によって記載される方法を含む、タンパク質を検出可能な部分にコンジュゲートするための、当技術分野で公知の任意の方法を使用してもよい。インビトロ法は、Cys および Lys などの特定のアミノ酸のための化学反応などの、タンパク質と適合する化学反応を含む当技術分野で周知であるコンジュゲーション化学を含む。フィブロネクチンをベースとする足場タンパク質に、検出可能な部分を連結するために、連結基または反応性基が用いられる。適した連結基は当技術分野で周知であり、ジスルフィド基、チオエーテル基、酸に不安定な基、感光基、ペプチダーゼに不安定な基およびエステラーゼに不安定な基が挙げられる。好ましい連結基として、適用に応じて、ジスルフィド基およびチオエーテル基がある。Cys アミノ酸を含まないポリペプチドのために、Cys を、コンジュゲーションのための位置を作り出しながら、タンパク質の活性が存在するのを可能にする位置に操作して入れてもよい。

#### 【0136】

検出可能な部分で連結されているフィブロネクチンをベースとする足場タンパク質はまた、インビボイメージングにとって有用である。ポリペプチドは、対象に、好ましくは、血流中に投与される、放射線を通さない (radio-opaque) 物質または放射性同位元素と連結でき、対象における標識されたタンパク質の存在および位置がアッセイされる。このイメージング技術は、例えば、フィブロネクチンをベースとする足場タンパク質が癌に関連する標的に結合する場合、悪性腫瘍のステージ分類および治療において有用である。フィブロネクチンをベースとする足場タンパク質は、核磁気共鳴、放射線学によってであれ、当技術分野で公知の他の検出手段によってであれ、対象において検出可能である任意の部分を用いて標識してもよい。

#### 【0137】

フィブロネクチンをベースとする足場タンパク質はまた、アフィニティー精製物質としても有用である。この過程では、フィブロネクチンをベースとする足場タンパク質は、当技術分野で周知の方法を用いて、セファデックス樹脂または濾紙などの適した支持体上に固定化されている。

#### 【0138】

フィブロネクチンをベースとする足場タンパク質は、競合結合実験、直接および間接サンドイッチアッセイおよび免疫沈降アッセイなどの、任意の公知のアッセイ法において使用できる (Zola, Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, pp. 147-158 (CRC Press, Inc., 1987))。

#### 【0139】

特定の態様では、本開示内容は、VEGFR2、IGF-IRまたはEGFRなどのサンプル中の標的分子を検出する方法を提供する。方法は、サンプルを、本明細書に記載されるフィブロネクチンをベースとする足場タンパク質と接触させること、ここに、前記接触は、フィブロネクチンをベースとする足場タンパク質-標的複合体形成を可能にする条件下で実施されるものである；および前記複合体を検出し、それによって前記サンプル中の前記標的を検出することを含み得る。検出は、例えば、X線撮影、免疫学的アッセイ、

蛍光検出、質量分析または表面プラズモン共鳴などの、当技術分野で公知の任意の技術を用いて実施してもよい。サンプルは、生検、特に、腫瘍、疑わしい腫瘍の生検などの、生物学的サンプルであることが多い。サンプルは、ヒトまたは他の哺乳類に由来するものであり得る。フィブロネクチンをベースとする足場タンパク質は、放射活性部分、蛍光部分、発色性部分、化学発光部分またはハプテン部分などの標識部分を用いて標識され得る。フィブロネクチンをベースとする足場タンパク質は、固体支持体上に固定化され得る。

#### 【0140】

一態様では、本出願は、障害の治療において有用であるフィブロネクチンをベースとする足場タンパク質を提供する。治療され得る疾病あるいは障害は、フィブロネクチンをベースとする足場タンパク質の結合特異性により決まるだろう。本出願はまた、対象にフィ  
10  
プロネクチンをベースとする足場タンパク質を投与する方法を提供する。いくつかの実施形態では、対象はヒトである。いくつかの実施形態では、フィブロネクチンをベースとする足場タンパク質は、哺乳類、特に、ヒトにとって医薬上許容される。「医薬上許容される」ポリペプチドとは、相当な有害な医学的結果を伴わずに動物に投与されるポリペプチドを指す。医薬上許容されるフィブロネクチンをベースとする足場タンパク質の例として、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エンドトキシンを含まない、または極めて低いエンドトキシンレベルを有する<sup>10</sup>Fn3ドメインが挙げられる。

#### 【0141】

特定の実施形態では、フィブロネクチンをベースとする足場タンパク質、特に、IGF-IR、VEGFR2および/またはEGFRに結合するフィブロネクチンをベースとする足場タンパク質は、癌などの障害の治療において有用である。特定の実施形態では、フィ  
20  
プロネクチンをベースとする足場タンパク質は、IGF-IR、VEGFR2および/またはEGFRの変異または発現レベルに関連する癌の障害の治療において有用である。いくつかの実施形態では、フィブロネクチンをベースとする足場タンパク質の投与は、対象における抗増殖性障害(antiproliferative disorder)を治療する。いくつかの実施形態では、フィブロネクチンをベースとする足場タンパク質の投与は、インビボでの腫瘍細胞増殖を阻害する。腫瘍細胞は、表皮、上皮、内皮、白血病、肉腫、多発性骨髄腫または中胚葉細胞を含む任意の細胞種に由来するものであり得るが、これに限定されない。異種移植片腫瘍研究において使用するための一般的な腫瘍細胞株  
30  
の例として、A549(非小細胞肺癌)細胞、DU-145(前立腺)細胞、MCF-7(乳房)細胞、Colo205(結腸)細胞、3T3/JGF-IR(マウス繊維芽細胞)細胞、NCIH441細胞、HEPG2(肝細胞腫)細胞、MDAMB231(乳房)細胞、HT-29(結腸)細胞、MDA-MB-435s(乳房)細胞、U266細胞、SH-SY5Y細胞、Sk-Mel-2細胞、NCI-H929、RPM18226およびA431細胞が挙げられる。いくつかの実施形態では、フィブロネクチンをベースとする足場タンパク質は、未処置動物における腫瘍の増殖と比べて、腫瘍細胞増殖を阻害する。いくつかの実施形態では、フィブロネクチンをベースとする足場タンパク質は、未処理動物における腫瘍の増殖と比べて、腫瘍細胞増殖を50、60、70、80%以上  
40  
阻害する。いくつかの実施形態では、腫瘍細胞増殖の阻害は、動物がフィブロネクチンをベースとする足場タンパク質を開始した後、少なくとも7日または少なくとも14日測定される。いくつかの実施形態では、別の抗悪性腫瘍薬がフィブロネクチンをベースとする足場タンパク質とともに動物に投与される。

#### 【0142】

特定の態様では、本開示内容は、腫瘍および/または腫瘍転移の治療および/または予防のためにフィブロネクチンをベースとする足場タンパク質を投与する方法を提供し、ここで、腫瘍は、脳腫瘍、尿生殖路の腫瘍、リンパ系の腫瘍、胃の腫瘍、咽頭腫瘍、単球性白血病、肺腺癌、小細胞肺癌腫、膵臓癌、膠芽腫および乳癌からなる群から選択されることが特に好ましいが、それに制限されない。

#### 【0143】

10

20

30

40

50

特定の態様では、本開示内容は、フィブロネクチンをベースとする足場タンパク質を、扁平上皮癌、膀胱癌、胃癌、肝臓癌、腎臓癌、結腸直腸癌、乳癌、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からなる群から選択される癌性疾患の治療のために投与する方法を提供する。

#### 【0144】

他の実施形態では、フィブロネクチンをベースとする足場タンパク質は、例えば腫瘍壊死因子(TNF)などの、炎症反応および/または自己免疫疾患に關与する標的に結合する。このようなフィブロネクチンをベースとする足場タンパク質は、関節リウマチ、強直性脊椎炎、クローン病、乾癬および難治性の喘息などの、自己免疫疾患を治療するために有用なものであり得る。

#### 【0145】

製剤および投与

本出願は、本明細書に記載されるフィブロネクチンをベースとする足場タンパク質を含む医薬上許容される組成物をさらに提供し、該組成物は、本質的にエンドトキシンを含まないものである。

#### 【0146】

フィブロネクチンをベースとする足場タンパク質を含む治療用製剤は、所望の程度の純度を有する記載されるタンパク質を、所望による生理学的に許容される担体、賦形剤または安定剤と混合することによって、水溶液、凍結乾燥された、または他の乾燥された製剤の形態で、保存のために調製される(Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980))。許容される担体、賦形剤または安定剤は、使用される投与量および濃度で受容者(recipient)にとって非毒性であり、リン酸、クエン酸および他の有機酸などのバッファー；アスコルビン酸およびメチオニンを含む酸化防止剤；保存料(オクタデシジメチルベンジル(octadecyldimethylbenzyl)塩化アンモニウム；塩化ヘキサメトニウム；塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム；フェノール、ブチルもしくはベンジルアルコール；メチルもしくはプロピルパラベンなどのアルキルパラベン；カテコール；レゾルシノール；シクロヘキサノール；3-ペンタノール；およびm-クレゾールなど)；低分子量(約10残基未満)ポリペプチド；血清アルブミン、ゼラチンまたは免疫グロブリンなどのタンパク質；ポリビニルピロリドンなどの親水性ポリマー；グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニンまたはリジンなどのアミノ酸；単糖、二糖およびグルコース、マンノースまたはデキストランを含む他の炭水化物；EDTAなどのキレート化剤；スクロース、マンニトール、トレハロースまたはソルビトールなどの糖；ナトリウムなどの塩形成性対イオン；金属錯体(例えば、Zn-タンパク質複合体)；ならびに/あるいはTWEEN<sup>商標</sup>、PLURONIC<sup>商標</sup>またはポリエチレングリコール(PEG)などの非イオン性界面活性剤が挙げられる。

#### 【0147】

また、本明細書における製剤とは、治療されている特定の適応症にとって必要な二以上の活性化化合物、好ましくは、互いに有害な影響を及ぼさない相補的な活性を有するものを含み得る。このような分子は、意図される目的上効果的である量の組み合わせで適宜存在する。

#### 【0148】

フィブロネクチンをベースとする足場タンパク質はまた、例えば、コアセルベーション技術によって、または界面重合によって、調製されたマイクロカプセル、例えば、それぞれ、ヒドロキシメチルセルロースまたはゼラチン-マイクロカプセルおよびポリ-(メチルメタクリレート)マイクロカプセル中に、コロイドドラッグデリバリーシステム(例えば、リボソーム、アルブミンミクロスフェア、マイクロエマルジョン、ナノ粒子およびナノカプセル)中に、またはマクロエマルジョン中に封入されてもよい。このような技術は、Remington's Pharmaceutical Sciences 16t

10

20

30

40

50

h edition, Osol, A. Ed. (1980)に開示されている。

【0149】

特定の実施形態では、本出願は、pH 4.0 - 6.5を有するフィブロネクチンをベースとする足場タンパク質の安定な組成物を提供する。他の実施形態では、本出願は、pH 4.0 - 5.5を有するフィブロネクチンをベースとする足場タンパク質の安定な組成物を提供する。他の実施形態では、本出願は、pH 5.5を有するフィブロネクチンをベースとする足場タンパク質の安定な組成物を提供する。他の実施形態では、本出願は、pH 4.0を有するフィブロネクチンをベースとする足場タンパク質の安定な組成物を提供する。特に、本出願は、溶液中での保存の間、低減された断片化および/または低レベルの凝集を有する、フィブロネクチンをベースとする足場タンパク質の安定な組成物を提供する。例示の節で実証されるように、本明細書に記載されるフィブロネクチンをベースとする足場タンパク質は、pH 4.0で増大した安定性を有し、一方でそれと同時に、pH 5.5と比較してpH 4.0で減少した凝集レベルを示した。pH 4.0を有するこのような安定で、可溶性の製剤は、特に静脈内投与に適している。いくつかの実施形態では、このような安定な製剤におけるタンパク質濃度は、少なくとも3 mg/mLである。例示的な実施形態では、このような安定な製剤におけるタンパク質濃度は、少なくとも5 mg/mLである。特定の実施形態では、このような安定な製剤におけるタンパク質濃度は、3 - 10 mg/mL、3 - 8 mg/mL、3 - 6 mg/mL、3 - 5 mg/mL、4 - 10 mg/mL、4 - 8 mg/mL、4 - 6 mg/mL、5 - 10 mg/mL、5 - 8 mg/mLまたは5 - 6 mg/mLの範囲である。例示的な実施形態では、フィブロネクチンをベースとする足場タンパク質の安定な組成物は、より高いpHで、フィブロネクチンをベースとする足場タンパク質の同等製剤(equivalent formulation)と比べて、低減された凝集を有する。例えば、安定な製剤は、pH 5.5以上で4週間の保存の間、フィブロネクチンをベースとする足場タンパク質の保存の間に見られる凝集レベルと比べて、pH 4.0で4週間の溶液中での保存の間、少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%以下の凝集を示し得る。特定の実施形態では、フィブロネクチンをベースとする足場タンパク質の安定な製剤は、少なくとも4週間の25℃での保存の後、10%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%以下の凝集を有する。特定の実施形態では、フィブロネクチンをベースとする足場タンパク質の安定な製剤は、pH 4.0かつ25℃で4週間、溶液中での保存で、7%、6%、5%、4%、3.5%、3%、2%未満またはそれ以下の断片化を有する。特定の実施形態では、フィブロネクチンをベースとする足場タンパク質の安定な製剤は、少なくとも4週間の25℃での溶液中での保存の間、5%未満の断片化および5%未満の凝集を有する。例示的な実施形態では、フィブロネクチンをベースとする足場タンパク質の安定な製剤は、少なくとも4週間の25℃での溶液中での保存の間、4%未満の断片化および4%未満の凝集を有する。

【0150】

インビボ投与に使用される製剤は、無菌でなければならない。これは、滅菌濾過膜を通した濾過により容易に達成される。

【0151】

持続放出製剤を調製してもよい。持続放出製剤の適した例として、本明細書に記載されるフィブロネクチンをベースとする足場タンパク質を含有する固体疎水性ポリマーの半透性マトリックスが挙げられ、ここで、マトリックスは、成形品、例えば、フィルムまたはマイクロカプセルの形態である。持続放出マトリックスの例として、ポリエステル、ヒドロゲル(例えば、ポリ(2-ヒドロキシエチル-メタクリレート)、またはポリ(ビニルアルコール))、ポリラクチド(米国特許第3,773,919号)、L-グルタミン酸およびγ-エチル-L-グルタミンのコポリマー、非分解性エチレン-ビニルアセテート、LUPRON DEPOSIT<sup>商標</sup>(乳酸-グリコール酸共重合体および酢酸ロイプロリドからなる注射用ミクロスフェア)などの分解性乳酸-グリコール酸コポリマーおよびポリ-D-( )-3-ヒドロキシ酪酸が挙げられる。エチレン-ビニルアセテートおよび乳酸

- グリコール酸などのポリマーは、100日にわたる分子の放出を可能にする一方、特定のヒドロゲルは、より短い期間タンパク質を放出する。被包された本発明のタンパク質が体内に長時間とどまる場合には、それらは、37℃で湿度に対する曝露の結果として変性または凝集し、生物活性の喪失および免疫原性の可能性ある変化をもたらす得る。関与する機序に応じて、安定化のための合理的な戦略を考え出すことができる。例えば、凝集機序がチオ-ジスルフィド交換による分子間S-S結合形成であると見い出される場合には、安定化は、スルフヒドリル残基を修飾すること、酸性溶液から凍結乾燥させること、水分含量を制御すること、適当な添加物を用いることおよび特定のポリマーマトリックス組成物を開発することによって達成され得る。

#### 【0152】

当業者ならば、各フィブロネクチンをベースとする足場タンパク質の投与量は、タンパク質の正体によって変わることは理解するであろうが、好ましい投与量は、約10mg/平方メートルから約2000mg/平方メートル、より好ましくは、約50mg/平方メートルから約1000mg/平方メートルの範囲であり得る。

#### 【0153】

治療適用のために、フィブロネクチンをベースとする足場タンパク質は、医薬上許容される剤形で対象に投与される。それらは、ボラスとして、または一定時間にわたる連続注入によって静脈内に、筋肉内、皮下、関節内、滑液内、くも膜下腔内、経口、局所または吸入経路によって投与され得る。タンパク質はまた、腫瘍内、腫瘍周囲、病巣内または病変部周囲経路によって投与され、局所ならびに全身治療効果を発揮し得る。適した医薬上許容される担体、希釈剤および賦形剤は周知であり、臨床状況が必要とする際に、当業者によって決定され得る。適した担体、希釈剤および/または賦形剤の例として：(1) 約1mg/mlから25mg/mlのヒト血清アルブミンを含有するダルベッコのリン酸緩衝生理食塩水、pH約7.4、(2) 0.9%生理食塩水(0.9% w/v NaCl)および(3) 5%(w/v)デキストロースが挙げられる。本発明の方法は、インビトロ、インビボまたはエキソビボ(ex vivo)で実施できる。

#### 【0154】

フィブロネクチンをベースとする足場タンパク質および/または以上のさらなる治療薬の投与は、同時投与されるか、逐次投与されるかにかかわらず、治療適用のために、上記のように起こり得る。同時投与に適した医薬上許容される担体、希釈剤および賦形剤は、当業者によって、同時投与されている特定の治療薬の正体に応じて変わると理解される。

#### 【0155】

凍結乾燥されているのではなく水性の剤形で存在する場合には、フィブロネクチンをベースとする足場タンパク質は、通常、約0.1mg/mlから100mg/mlの濃度で製剤されるが、これらの範囲の外側の広い変動も容認される。疾患の治療のための、フィブロネクチンをベースとする足場タンパク質の適当な投与量は、上記で定義されるような治療される疾患の種類、疾患の重篤度および経過、フィブロネクチンをベースとする足場タンパク質が予防目的で投与されるか治療目的で投与されるか、これまでの治療の経過、患者の病歴およびフィブロネクチンをベースとする足場タンパク質に対する反応、ならびに主治医の裁量に応じて変わる。フィブロネクチンをベースとする足場タンパク質は、1回で、または一連の治療にわたって、患者に適宜投与される。

#### 【0156】

配列表

WTコア配列

E V V A A T P T S L L I S W D A P A V T V R Y Y R I T Y G E T G G N S P V Q E F  
T V P G S K S T A T I S G L K P G V D Y T I T V Y A V T G R G D S P A S S K P I  
S I N Y R T (配列番号：1)

Iコア(配列番号：2)

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

10

20

30

40

50



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

Vコア（配列番号：3）

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

短いテール（配列番号：4）

E I E K

10

修飾されたCysテール（配列番号：5）

E G S G C

Cysテール（配列番号：6）

E I E K P C Q

Fnをベースとするリンカー（配列番号：7）

P S T S T S T

20

GS<sub>5</sub>リンカー（配列番号：8）

G S G S G S G S G S

GS<sub>10</sub>リンカー（配列番号：9）

G S G S G S G S G S G S G S G S G S

(G G G G S)<sub>3</sub>（配列番号：10）

G G G G S G G G G S G G G G S

(G G G G S)<sub>5</sub>（配列番号：11）

G G G G S G G G G S G G G G S G G G G S G G G G S

30

G<sub>4</sub>S G<sub>4</sub>S G<sub>3</sub>S G（配列番号：12）

G G G G S G G G G S G G G S G

G P G（配列番号：13）

G P G P G P G（配列番号：14）

G P G P G P G P G P G（配列番号：15）

40

PA3リンカー（配列番号：16）

P A P A P A

PA6リンカー（配列番号：17）

P A P A P A P A P A P A

PA9リンカー（配列番号：18）

P A P A P A P A P A P A P A P A P A

50

M G V S D V P R D L ( 配列番号 : 1 9 )

V S D V P R D L ( 配列番号 : 2 0 )

G V S D V P R D L ( 配列番号 : 2 1 )

D K + V E G F R 2 / I G F - I R バインダー ( 配列番号 : 2 2 )

【化 6】

MGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWSARLKVARYYRITYGETGGNSPVQEFTVPKNVYT  
ATISGLKPGVDYTITVYAVTRFRDYQPISINYRTEIDKPSTSTSTVSDVPRDLEVVAATPT  
SLISWRHPHFTRYRITYGETGGNSPVQEFTVPLQPPTATISGLKPGVDYTITVYAVTD  
GRNGRLLSIPISINYRTEIDKPCQ

10

D K + E G F R / I G F - I R バインダー ( 配列番号 : 2 3 )

【化 7】

MGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWSARLKVARYYRITYGETGGNSPVQEFTVPKNVYT  
ATISGLKPGVDYTITVYAVTRFRDYQPISINYRTEIDKGSGSGSGSGSGSGSGSGSVS  
DVPRDLEVVAATPTSLISWWAPVDYQYYRITYGETGGNSPVQEFTVPRDVYTATISG  
LKPGVDYTITVYAVTDYKPHADGPHTYHESPISINYRTEIDKPCQ

20

G S G C テールを備える D K - E G F R / I G F - I R バインダー ( 配列番号 : 2 4 )

【化 8】

MGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWSARLKVARYYRITYGETGGNSPVQEFTVPKNVYT  
ATISGLKPGVDYTITVYAVTRFRDYQPISINYRTEIEKGSGSGSGSGSGSGSGSGSVS  
DVPRDLEVVAATPTSLISWWAPVDYQYYRITYGETGGNSPVQEFTVPRDVYTATISG  
LKPGVDYTITVYAVTDYKPHADGPHTYHESPISINYRTEGSGC

E I E K P C Q テールを備える D K - E G F R / I G F - I R バインダー ( 配列番号 : 2 5 )

【化 9】

MGVSDVPRDLEVVAATPTSLISWSARLKVARYYRITYGETGGNSPVQEFTVPKNVYT  
ATISGLKPGVDYTITVYAVTRFRDYQPISINYRTEIEKGSGSGSGSGSGSGSGSGSVS  
DVPRDLEVVAATPTSLISWWAPVDYQYYRITYGETGGNSPVQEFTVPRDVYTATISG  
LKPGVDYTITVYAVTDYKPHADGPHTYHESPISINYRTEIEKPCQ

30

$X_n$  S D V P R D L ,  $n = 0$ 、1 または 2 アミノ酸であり、 $n = 1$  の場合、X は M e t または G l y であり、 $n = 2$  の場合、X は M e t - G l y である ( 配列番号 : 2 6 )

$X_n$  D V P R D L ,  $n = 0$ 、1 または 2 アミノ酸であり、 $n = 1$  の場合、X は M e t または G l y であり、 $n = 2$  の場合、X は M e t - G l y である ( 配列番号 : 2 7 )

40

$X_n$  V P R D L ,  $n = 0$ 、1 または 2 アミノ酸であり、 $n = 1$  の場合、X は M e t または G l y であり、 $n = 2$  の場合、X は M e t - G l y である ( 配列番号 : 2 8 )

$X_n$  P R D L ,  $n = 0$ 、1 または 2 アミノ酸であり、 $n = 1$  の場合、X は M e t または G l y であり、 $n = 2$  の場合、X は M e t - G l y である ( 配列番号 : 2 9 )

$X_n$  R D L ,  $n = 0$ 、1 または 2 アミノ酸であり、 $n = 1$  の場合、X は M e t または G l y であり、 $n = 2$  の場合、X は M e t - G l y である ( 配列番号 : 3 0 )

50

$X_nDL$ ,  $n = 0, 1$  または 2 アミノ酸であり、 $n = 1$  の場合、 $X$  は  $Met$  または  $Gly$  であり、 $n = 2$  の場合、 $X$  は  $Met - Gly$  である (配列番号: 31)

EIEKPSQ (配列番号: 32)

EIEKP (配列番号: 33)

EIEKPS (配列番号: 34)

EIEKPC (配列番号: 35)

EGSGS (配列番号: 36)

WTフィブロネクチン配列

10

【化10】

VSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYRITYGETGGNSPVQEFTVPGSKSTATIS  
GLKPGVDYTITVYAVTGRGDSPASSKPISINYRT (配列番号: 37)

EIEKテールを備える<sup>10</sup>Fn3コア

EVVAATPTSLLISW(X)<sub>x</sub>RYRITYGETGGNSPVQEFTVP  
(X)<sub>y</sub>TATISGLKPGVDYTITVYAVT(X)<sub>z</sub>PISINYRTEIE  
K (配列番号: 38)

20

Eコア (配列番号: 39)

EVVAATPTSLLISWWAPVDRYQYYRITYGETGGNSPVQEF  
TVPRDVYTATISGLKPGVDYTITVYAVTDYKPHADGPHTY  
HESPIISINYRT

IGF-IR BCループ (配列番号: 40)

SARLKVA

IGF-IR DEループ (配列番号: 41)

KNVY

30

IGF-IR FGループ (配列番号: 42)

RFRDYQ

VEGFR2 BCループ (配列番号: 43)

RHPHFPT

VEGFR2 DEループ (配列番号: 44)

LQPP

40

VEGFR2 FGループ (配列番号: 45)

DGRNGRLLSI

EIDK (配列番号: 46)

EIDKPCQ (配列番号: 47)

Cysテールを備えるI-Fn-V(2DK-) (配列番号: 48)

## 【化 1 1】

MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSARLKVARYYRITYGETGGNSPVQEFTVPKNVYT  
ATISGLKPGVDYTITVYAVTRFRDYQPISINYRTEIEKPSTSTSTVSDVPRDLEVVAATPT  
LLISWRHPHFPTTRYRITYGETGGNSPVQEFTVPLQPPTATISGLKPGVDYTITVYAVTD  
GRNGRLLSIPISINYRTEIEKPCQ

s e r テールを備える I - F n - V ( 2 D K - ) ( 配列番号 : 4 9 )

## 【化 1 2】

MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSARLKVARYYRITYGETGGNSPVQEFTVPKNVYT  
ATISGLKPGVDYTITVYAVTRFRDYQPISINYRTEIEKPSTSTSTVSDVPRDLEVVAATPT  
LLISWRHPHFPTTRYRITYGETGGNSPVQEFTVPLQPPTATISGLKPGVDYTITVYAVTD  
GRNGRLLSIPISINYRTEIEKPSQ

10

s e r または c y s テールを備える I - G S 5 - V ( 2 D K - ) ( 配列番号 : 5 0 )

## 【化 1 3】

MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSARLKVARYYRITYGETGGNSPVQEFTVPKNVYT  
ATISGLKPGVDYTITVYAVTRFRDYQPISINYRTEIEKGSGSGSGSGSVSDVPRDLEVVA  
ATPTSLLISWRHPHFPTTRYRITYGETGGNSPVQEFTVPLQPPTATISGLKPGVDYTITVY  
AVTDGRNGRLLSIPISINYRTEIEKPXQ, x=セリンまたはシステイン

20

s e r または c y s テールを備える I - G S 1 0 - V ( 2 D K - ) ( 配列番号 : 5 1 )

## 【化 1 4】

MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSARLKVARYYRITYGETGGNSPVQEFTVPKNVYT  
ATISGLKPGVDYTITVYAVTRFRDYQPISINYRTEIEKGSGSGSGSGSGSGSGSGSVS  
DVPRDLEVVAATPTSLLISWRHPHFPTTRYRITYGETGGNSPVQEFTVPLQPPTATISGLK  
PGVDYTITVYAVTDGRNGRLLSIPISINYRTEIEKPXQ, x=セリンまたはシステイン

s e r テールを備える V - F n - I ( 2 D K - ) ( 配列番号 : 5 2 )

## 【化 1 5】

MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWRHPHFPTTRYRITYGETGGNSPVQEFTVPLQPPTAT  
ISGLKPGVDYTITVYAVTDGRNGRLLSIPISINYRTEIEKPSTSTSTVSDVPRDLEVVAATP  
TSSLISWSARLKVARYYRITYGETGGNSPVQEFTVPKNVYTATISGLKPGVDYTITVYAV  
TRFRDYQPISINYRTEIEKPSQ

30

c y s テールを備える V - F n - I ( 2 D K - ) ( 配列番号 : 5 3 )

## 【化 1 6】

MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWRHPHFPTTRYRITYGETGGNSPVQEFTVPLQPPTAT  
ISGLKPGVDYTITVYAVTDGRNGRLLSIPISINYRTEIEKPSTSTSTVSDVPRDLEVVAATP  
TSSLISWSARLKVARYYRITYGETGGNSPVQEFTVPKNVYTATISGLKPGVDYTITVYAV  
TRFRDYQPISINYRTEIEKPCQ

40

s e r または c y s テールを備える V - G S 5 - I ( 2 D K - ) ( 配列番号 : 5 4 )

## 【化 1 7】

MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWRHPHFPTTRYRITYGETGGNSPVQEFTVPLQPPTAT  
ISGLKPGVDYTITVYAVTDGRNGRLLSIPISINYRTEIEKGSGSGSGSGSVSDVPRDLEVVA  
AATPTSLLISWSARLKVARYYRITYGETGGNSPVQEFTVPKNVYTATISGLKPGVDYTIT  
VYAVTRFRDYQPISINYRTEIEKPXQ, x=セリンまたはシステイン

s e r または c y s テールを備える V - G S 1 0 - I ( 2 D K - ) ( 配列番号 : 5 5 )

## 【化 18】

MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWRHPHFPTYYRITYGETGGNSPVQEFTVPLQPPTAT  
ISGLKPGVDYTITVYAVTDGRNGRLLSIPISINYRTEIEKGSGSGSGSGSGSGSGSGSV  
SDVPRDLEVVAATPTSLLISWSARLKVARYYRITYGETGGNSPVQEFTVPKNVYTATISG  
LKPGVDYTITVYAVTRFRDYQPISINYRTEIEKPXQ, x=セリンまたはシステイン

VI (DK+) (配列番号: 56)

## 【化 19】

GVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSARLKVARYYRITYGETGGNSPVQEFTVPKNVYTAT  
ISGLKPGVDYTITVYAVTRFRDYQPISINYRTEIDKPSTSTSTVSDVPRDLEVVAATPTSL  
LISWRHPHFPTYYRITYGETGGNSPVQEFTVPLQPPTATISGLKPGVDYTITVYAVTDG  
RNGRLLSIPISINYRTEIDKPCQ

10

VI (DK-) (配列番号: 57)

## 【化 20】

GVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSARLKVARYYRITYGETGGNSPVQEFTVPKNVYTAT  
ISGLKPGVDYTITVYAVTRFRDYQPISINYRTEIEKPSTSTSTVSDVPRDLEVVAATPTSL  
LISWRHPHFPTYYRITYGETGGNSPVQEFTVPLQPPTATISGLKPGVDYTITVYAVTDG  
RNGRLLSIPISINYRTEIEKPCQ

20

## 【実施例】

## 【0157】

本発明を、以下の実施例を参照することによって説明するが、これは、単に例示的なものであって、本発明を制限しようとするものではない。本発明は、特定の実施形態を参照して詳細に説明されているが、その趣旨および範囲を逸脱することなく、それに種々の変更および改変を行ってもよいということは当業者には明らかであろう。

## 【実施例 1】

## 【0158】

フィブロネクチンをベースとする足場タンパク質

VEGFR2 / IGF-IR バインダー (「V / I バインダー」) および EGF R / IGF-IR バインダー (「E / I バインダー」) を含む、様々なフィブロネクチンをベースとする足場タンパク質を生成した。以下の表は、本明細書に記載される構築体およびそれらの対応する配列番号を表す。

30

## 【0159】

表 1. 様々な V / I バインダーおよび E / I バインダーの概説。

【表 1】

| 構築体                                   | 説明   | 配列番号 | 略称             |
|---------------------------------------|--|------|----------------|
| EIDKPCQテールを備える、DK+ IGF-IR/VEGFR2バインダー | 配列番号：46からなるC1テールおよび配列番号：47からなるC2テールを備える、二価V/I構築体 | 22   | V/I(DK+)       |
| EIDKPCQテールを備える、DK+ EGFR/IGF-IRバインダー   | 配列番号：46からなるC1テールおよび配列番号：47からなるC2テールを備える、二価E/I構築体 | 23   | E/I(DK+)       |
| EGSGCテールを備える、DK- EGFR/IGF-IRバインダー     | 配列番号：4からなるC1テールおよび配列番号：5からなるC2テールを備える、二価E/I構築体   | 24   | E/I(DK-、C末端無し) |
| EIEKPCQテールを備える、DK- EGFR/IGF-IRバインダー   | 配列番号：4からなるC1テールおよび配列番号：6からなるC2テールを備える、二価E/I構築体   | 25   | E/I(2DK-)      |

10

## 【0160】

配列番号：22は、国際公開2009/142773に最初に記載されたV/I(DK+)二価構築体のアミノ酸配列である。V/I(DK+)は、IGF-IRおよびVEGFR2に結合するフィブロネクチンドメインを含む。IGF-IR結合フィブロネクチンコアは配列番号：2に示される配列を有し、VEGFR2結合フィブロネクチンコアは配列番号：3に示される配列を有する。2つのドメインは、ヒトフィブロネクチンにおいて第一および第二Fn3ドメインを連結するアミノ酸配列に由来するポリペプチドリinker（配列番号：7）により連結される。V/I(DK+)のI結合サブユニットは、配列番号：46のアミノ酸配列を有するC末端伸長(C1)を含有する、すなわち、DK部位を含有する。V/I(DK+)のV結合サブユニットは、配列番号：47のアミノ酸配列を有するC末端伸長(C2)を含有する、すなわち、DK部位を含有する。

20

## 【0161】

配列番号：23は、E/I(DK+)二価構築体のアミノ酸配列である。E/I(DK+)は、IGF-IRおよびEGFRに結合するフィブロネクチンドメインを含む。IGF-IR結合フィブロネクチンコアは配列番号：2に示される配列を有し、EGFR2結合フィブロネクチンコアは配列番号：39に示される配列を有する。2つのドメインは、配列番号：9を有するグリシン-セリンポリペプチドリinkerにより連結される。E/I(DK+)のI結合サブユニットは、配列番号：46のアミノ酸配列を有するC末端伸長(C1)を含有する、すなわち、DK部位を含有する。E/I(DK+)のE結合サブユニットは、配列番号：47のアミノ酸配列を有するC末端伸長(C2)を含有する、すなわち、DK部位を含有する。

30

## 【0162】

配列番号：24は、E/I(DK-、C末端無し)二価構築体のアミノ酸配列である。E/I(DK-、C末端無し)は、グリシン-セリンリンカー（配列番号：9）により連結された、IGF-IRコア（配列番号：2）およびEGFRコア（配列番号：39）を含む。IGF-IR結合サブユニットは、配列番号：4のアミノ酸配列を有するC末端伸長(C1)を含有する、すなわち、DK部位よりもEK部位を含有する。EGFR結合サブユニットは、配列番号：5のアミノ酸配列を有するC末端伸長(C2)を含有する、すなわち、DK部位を欠く。

40

## 【0163】

配列番号：25は、E/I(2DK-)二価構築体のアミノ酸配列である。E/I(2DK-)は、グリシン-セリンリンカー（配列番号：9）により連結された、IGF-IRコア（配列番号：2）およびEGFRコア（配列番号：39）を含む。IGF-IR結

50

合サブユニットは、配列番号：4のアミノ酸配列を有するC末端伸長（C1）を含有する、すなわち、DK部位よりもEK部位を含有する。EGFR結合サブユニットは、配列番号：6のアミノ酸配列を有するC末端伸長（C2）を含有する、すなわち、DK部位よりもEK部位を含有する。

#### 【実施例2】

##### 【0164】

フィブロネクチンをベースとする足場タンパク質の発現および精製

E/I分子の発現

E/I二価構築体を可溶型で大腸菌細胞中で発現させた。封入体は細胞破壊と遠心分離により回収される。E/Iタンパク質は濾過され、カラムクロマトグラフィーを用いて捕捉される。精製されたタンパク質は、次いで、単一のシステイン残基で、マレイミド化学反応を介して、PEGに共有結合される。PEG化生成物は次いで、カラムクロマトグラフィーを用いて仕上げられ（polish）、タンジェンシャルフロー濾過（tangential flow filtration）を用いて製剤化される。

10

##### 【0165】

V/I分子の発現

V/I二価構築体の発現のために、構築体をコードするヌクレオチド配列が誘導性発現ベクターにクローニングされ、大腸菌細胞中で細胞内封入体内に発現させた。単一の蒔かれたコロニーから生成した細胞バンクバイアルを用いて、大規模発酵のための接種材料として振盪フラスコ培養に接種した。あるいは、種子発酵（seed fermentor）は最終の発酵容量に応じて、接種原培養に用いられる。大規模発酵は、生物量を蓄積させるための増殖期およびフィブロネクチンをベースとする足場タンパク質を生成するための生成期を含む。一次回収のため、細胞内封入体は、マイクロフルイダイザー（microfluidizer）を用いて、回収された細胞から放出され、遠心分離により回収され、続いてバッファーおよび水で洗浄された。

20

##### 【0166】

二価構築体のための精製工程は、塩酸グアニジンを経る封入体の再可溶化、続いてタンパク質のリフォールディングを用いる。リフォールディングされたタンパク質は濾過され、陽イオン交換クロマトグラフィーカラムの上にロードされる。生成物は次いで、疎水性相互作用カラムを用いて精製され、生じる溶出プールをPEG試薬の添加によりPEG化し、PEG化タンパク質を生成する。

30

##### 【0167】

PEG化タンパク質は次いで、第二の陽イオン交換クロマトグラフィーカラムを渡って精製される。溶出は標的タンパク質濃度に濃縮され、次いで、限外濾過/透析濾過（UF/DF）を用いて、製剤バッファーへ交換される。UF/DF生成物は、0.22 μmのファイナルフィルターを用いて濾過される。濾過された生成物は、次いで、バイアル内に満たされ、最終製剤を生成する。

#### 【実施例3】

##### 【0168】

V/Iタンパク質の安定性へのタンパク質濃度の影響

40

精製されたV/I（DK+）（配列番号：22）の物理学的（凝集）および化学的（断片化）安定性へのタンパク質濃度の影響を試験した。V/I（DK+）タンパク質を、pH 5.5で、10 mMコハク酸、5%ソルビトール中に製剤化した。V/Iタンパク質濃度は、3 mg/mLまたは5 mg/mLのいずれかであった。サンプルを12ヶ月の期間4で保管し、該サンプルを1ヶ月目、6週目、2ヶ月目、3ヶ月目、6ヶ月目、9ヶ月目および12ヶ月目に回収して解析した。

##### 【0169】

凝集量は、経時的に（over time）、（高分子量（「HMW」）種として測定される）凝集を形成した総タンパク質のパーセンテージを評価することにより、測定する。凝集を、サイズ排除-高速液体クロマトグラフィー（SE-HPLC）解析を用いて測

50

定し、経時的に (over time) HMWのレベルを評価した。SE-HPLC解析は、スーパーデックス200 10/300 GLカラムを用いて、0.2 Mリン酸カリウム、0.15 M塩化ナトリウム、0.02 %アジ化ナトリウム、pH 6.8の移動相で、実行した。280 nmでの検出で、流速は0.5 mL/分であった。経時的な (over time) (0 - 12ヶ月)、V/Iタンパク質の凝集へのタンパク質濃度の影響は、図1に表される。V/I (DK+) は、3 mg/mLの濃度で0.3 %/月の速度で凝集する。より高いタンパク質濃度 (5 mg/mL) は、より速い凝集速度を導く。

#### 【0170】

断片化は、経時的に (over time)、断片化した、または「クリップ化」した総タンパク質のパーセンテージを評価することにより測定する。クリップ化したタンパク質のレベルは、逆相 - 高速液体クロマトグラフィー (RP-HPLC) を利用することにより、決定した。RP-HPLCは、Varian PLRP-Sカラム (4.6 \* 250 mm、細孔径300、粒径5 µm) を用いて実行された。様々な種の分離は、水/アセトニトリル/トリフルオロ酢酸からなるグラジエントを介して達成される。流速は1.0 mL/分であった。二重検出は、(タンパク質関連種のため) 280 nmで、および蒸発光散乱 (ELS、PEG関連種のため) で、実行された。図2は、V/I (DK+) の断片化が、凝集よりも、タンパク質濃度への依存が少ないことが発見されたことを示す。V/I (DK+) についての断片化速度は、4 で、~ 0.1 %/月であった。

#### 【0171】

これらの凝集および断片化データに基づき、凝集を最低限にし、1年間の十分な安定性を確保するためには、3 mg/mLのタンパク質濃度を有するV/I (DK+) の製剤が、5 mg/mLの濃度よりも、好ましいであろう。

#### 【実施例4】

#### 【0172】

V/Iタンパク質の安定性へのpHの影響

精製されたV/I (DK+) (配列番号: 22) の物理学的および化学的安定性へのpHの影響を試験した。V/I (DK+) タンパク質を、20 mM酢酸ナトリウム (pH 4および5のため) または20 mMリン酸ナトリウム (pH 6および7のため) であるバッファー組成物と共に、50 mM塩化ナトリウム中に製剤化し、25 で保存した。

#### 【0173】

4週間の期間、一週間に一度、サンプルを回収し、実施例3に記載されるようにSE-HPLCを用いて、凝集の評価を実行した。経時的な (over time) (0 - 4週間)、V/I (DK+) タンパク質の凝集へのpHの影響は、図3に表される。最も低い凝集率が、試験された最低pH (pH 4.0) を有するサンプルにおいて観察された。最も高い凝集率が、試験された最高pH (pH 7.0) を有するサンプルにおいて観察された。

#### 【0174】

4週間の期間、一週間に一度、サンプルを回収し、実施例3に記載されるようにSE-HPLCを用いて、断片化の評価を実行した。V/I (DK+) タンパク質の断片化へのpHの影響は、図4に表される。低pH (pH 4.0) でV/I (DK+) タンパク質の経時的な (over time) 凝集を阻害することがわかった (図3) 一方、低pHはV/I (DK+) タンパク質のタンパク質断片化における増加を引き起こすことがわかった (図4)。

#### 【0175】

断片化されたV/I (DK+) タンパク質におけるクリップ部位を同定するために、液体クロマトグラフ - 質量分析 (LC-MS) が実行された。V/I (DK+) タンパク質を、5 mg/mLのタンパク質濃度で、pH 5.5、10 mM酢酸ナトリウム、150 mM塩化ナトリウム中に製剤化した。LC-MSは、実施例3に記載されるRP-HPLC法に従って、続いて、Thermo LTQイオントラップ質量分析計 (MS) に結合して実行された。HPLC溶出は、0.2 mL/分フローで1:5にスプリットされ、MS

10

20

30

40

50



に向けられた。280 nmでのオンライン検出が継続された。図5は、この実験からのLC-MSデータを表し、断片化が起こる主要な部位であるD95およびD200と、数個のアスパラギン酸(D)残基が断片化に関与することを実証する。V/I(DK+)タンパク質の至る所に数個のD残基が存在する(例えばD5、D9、D110)が、D95およびD200だけが直後にリジン残基が続くことに注目すべきである。「V I des Met」は、熱ストレスの結果としてPEGコンジュゲーションのマレイミド結合で起こる切断事象を示す。

#### 【0176】

これらの実験に基づいて、凝集および断片化は、pH 5.5で製剤を準備することにより、最良のバランスが保たれるが、しかしながら、このpHレベルだけに頼ることによ

10

#### 【実施例5】

#### 【0177】

E/Iタンパク質での凝集および断片化の評価

V/I(DK+) (配列番号: 22)で観察される凝集および断片化の不安定さの問題が、他の構造的に関連した二価構築体に共通している問題であったことを確認するために、E/I(DK+) (配列番号: 23)の凝集および断片化特性もまた、数種のpHレベルで評価された。

#### 【0178】

E/I(DK+)を、pH 4.0、4.5または5.5で、10 mMコハク酸、5%ソルビトール中に製剤化した。E/I(DK+)は、30 kD MWCO膜を用いるタンジェンシャルフロー濾過(TFF)により、所望の製剤に製剤化された。少なくとも6透析容量(dia-volume)のバッファーを交換して、最終製剤を達成した。生じるタンパク質の濃度はA280により確認され、さらなる製剤バッファーで5 mg/mLに調節された。製剤化されたE/I(DK+)はラミナーフローフード(laminar flow hood)にて無菌濾過され、安定性監視のため無菌ガラスバイアル中に充填された。バイアルは蓋をされクリンプ(crimp)され、続いて4、25および37で温度制御されたインキュベーター内に配置された。

20

#### 【0179】

E/I(DK+)の凝集率は、SE-HPLC解析を実行することにより評価された。SE-HPLCは、Shodex KW404-4F HPLCカラム(4.6 \* 250 mm、細孔径300、粒径5 μm)およびpH 5.5で10 mMコハク酸/3%ソルビトール/0.4 Mアルギニンからなる移動相を用いて実行された。流速は0.35 mL/分であり、検出は280 nmで実行された。図6は、V/I(DK+)と同様に、E/I(DK+)の凝集率は、25でより低いpHで保存されたサンプルについてよりも、25でより高いpHレベルで保存されたサンプルについて、より高かったことを示す。同一のデータ傾向が、37でストレスを加えられたサンプルについても観察された。

30

#### 【0180】

E/I(DK+)の凝集率へのタンパク質濃度の影響もまた評価された。V/I(DK+)と同様に、表2は、4週後、より高い濃度(7 mg/mL)のE/I(DK+)が、より高いパーセンテージの凝集形成(より低いパーセンテージの単量体)に関連したことを図示している。表2は、タンパク質濃度とともにpHを低減することにより、凝集のパーセンテージがさらに減少することを実証している。

40

#### 【表2】

| タンパク質濃度   | 製剤 pH | %単量体   |
|-----------|-------|--------|
| 7.5 mg/mL | 5.5   | 94.30% |
| 5.0 mg/mL | 5.5   | 97.70% |
| 5.0 mg/mL | 4.0   | 99.20% |

50

## 【0181】

E / I ( D K + ) の断片化は、実施例 3 に記載されるように R P - H P L C 解析を実行することにより、評価された。図 7 は、V / I ( D K + ) と同様に、25 でより高い pH で保存されたサンプルについてよりも、25 でより低い pH レベルで保存されたサンプルについて、より高かったことを示す。同一のデータ傾向が、37 でストレスを加えられたサンプルについても観察された。

## 【0182】

断片化された E / I ( D K + ) タンパク質におけるクリップ部位を同定するために、実施例 4 に記載されるように L C - M S が実行された。E / I ( D K + ) タンパク質が、5 mg / ml のタンパク質濃度で、pH 4.0、10 mM コハク酸、5 % ソルビトール中に製剤化され、タンパク質ストレスを誘導するために 25 で維持された。図 8 は、この実験からの L C - M S データを表し、D 95 および D 218 ( V / I ( D K + ) ) における D 200 に相同な位置を含む、数個のアスパラギン酸 ( D ) 残基が断片化に関与することを実証する。断片化は D 199 でも観察された。D 199 部位は、E G F R 結合領域の F G 結合ループに位置するので、これらの E / I 分子に特有であり、V / I 分子では見られない。

## 【実施例 6】

## 【0183】

D K マイナス E / I 変種での凝集および断片化の評価

様々な E / I バインダー ( 配列番号 : 23 - 25 ) が製剤化され、それらの物理学的 ( 凝集 ) および化学的 ( 断片化 ) 安定性が、同一の条件下で互いに比較された ( 表 1 参照 ) 。E / I ( D K + ) で観察された D 95 および D 218 クリップ部位の特徴付けに基づき ( 実施例 5 ) 、またこれらの D K クリップ部位が構造的に必須でない C 末端テールに位置するという事実に基づき、C 末端テール D K 部位が除去または置換されている、二つの異なる E / I 構築体が生成された。

## 【0184】

E / I ( D K + ) 分子 ( 配列番号 : 23 ) は、2 つの結合ドメインのそれぞれの後に、D K 部位 ( D 95 および D 218 ) を含む C 末端テールを含有する、コントロール E / I バインダーである。この分子の物理学的および化学的安定性は、実施例 5 で特徴づけられた。E / I ( D K - 、C 末端無し ) 分子 ( 配列番号 : 24 ) は、D K 部位を全く含有しない。この分子では、位置 95 のアスパラギン酸塩がグルタミン酸に変異しており、かつ E I D K P C Q テール ( 配列番号 : 47 ) が E G S G C テール ( 配列番号 : 5 ) と交換されている。E / I ( 2 D K - ) 分子 ( 配列番号 : 25 ) もまた、D K 部位を全く含有しない。この分子では、位置 95 および 218 のアスパラギン酸塩がグルタミン酸と交換されている。V / I ( D K + ) はコントロールとして、この実験に含まれた。

## 【0185】

E / I タンパク質 ( 配列番号 : 23 - 25 ) が、pH 4.0 で、10 mM コハク酸、5 % ソルビトール中に製剤化された。さらに、E / I ( D K + ) ( 配列番号 : 23 ) および V / I ( D K + ) ( 配列番号 : 22 ) が、pH 5.5 で、10 mM コハク酸、5 % ソルビトール中に製剤化された。予備的な界面活性剤スクリーニングに基づいて、界面活性剤は必要なものとは認められなかった。E / I ( D K + ) は、30 k D M W C O 膜を用いるタンジェンシャルフロー濾過 ( T F F ) により、所望の製剤に製剤化された。少なくとも 6 透析容量 ( d i a - v o l u m e ) のバッファーを交換して、最終製剤を達成した。生じるタンパク質の濃度は A 280 により確認され、さらなる製剤バッファーで 5 mg / ml に調節された。製剤化された各二価構築体はラミナフローフード ( l a m i n a r f l o w h o o d ) にて無菌濾過され、安定性監視のため無菌ガラスバイアル中に充填された。バイアルは蓋をされクリンプ ( c r i m p ) され、続いて 4、25 および 37 で温度制御されたインキュベーター内に配置された。

## 【0186】

異なる E / I 分子の凝集率は、実施例 5 により記載されるように、S E - H P L C を実

10

20

30

40

50

行することにより評価され、この実験からの結果は図 9 に図示される。予想通り、凝集率は、25 で E / I ( D K + ) について、p H 4 . 0 よりも p H 5 . 5 で著しく高い。図 9 に見られる傾き ( s l o p e ) に基づき、E / I ( D K + ) についての凝集率は、25 で、p H 4 . 0 よりも p H 5 . 5 でおおよそ 7 倍高い。D K 部位を欠く 2 つの E / I 分子について、凝集率は p H 4 . 0 で影響を受けなかった。E / I ( D K + ) および V / I ( D K + ) は、p H 5 . 5 で同様の凝集率を表した。

#### 【 0 1 8 7 】

異なる E / I 分子の断片化率は、実施例 3 に記載されるように R P - H P L C 解析を実行することにより評価され、この実験からの結果は図 1 0 に図示される。クリッピング ( c l i p p i n g ) に関して、図 1 0 は、25 で E / I ( D K + ) について、p H 4 . 0 よりも p H 5 . 5 で、より低いクリップ率 ( c l i p r a t e ) を示す。図 1 0 で示される分子の間で、最も高いクリップ率は、p H 4 . 0 で E / I ( D K + ) において見られ、それは製剤の p H を p H 5 . 5 へ増大させた場合、著しく最小化された。しかしながら、上述の通り、この分子は p H 5 . 5 で凝集率が最も高かった。D K 部位を欠く他の 2 つの E / I 分子について、p H 4 . 0 でのクリップ率は、同じ p H での E / I ( D K + ) と比較して、おおよそ 3 倍減少した。V / I ( D K + ) は、同じ p H ( p K 5 . 5 ) で E / I ( D K + ) と比較してより高い程度の断片化を示し、V / I ( D K + ) および E / I ( D K + ) 分子は類似するが、V / I ( D K + ) 分子は断片化の影響をより受けやすいことを示す。

#### 【 0 1 8 8 】

E / I ( D K + ) に対するクリップ化部位と比較して、E / I ( D K - 、C 末端無し ) に対するクリップ化部位の特徴付けは、実施例 4 に記載されるように L C - M S を用いて実行された。2 つの異なる E / I バインダーが、5 m g / m l のタンパク質濃度で、p H 4 . 0 、1 0 m M コハク酸、5 % ソルビトール中にそれぞれ製剤化され、タンパク質ストレスを誘導するために 25 で維持された。図 1 1 は、この実験からの L C - M S データを表し、断片化プロファイルが 2 つの異なる E / I バインダー間で異なることを実証する。E / I ( D K + ) における断片化に関与する主要なアスパラギン酸 ( D ) 残基は、D 9 5 、D 2 1 8 および D 1 9 9 であった。一方、E / I ( D K - 、C 末端無し ) における断片化に関与する主要なアスパラギン酸残基は、D 1 9 9 、D 8 2 および D 1 9 3 であった。しかしながら、以下の表 3 に図示されるように、4 週間後の E / I ( D K - 、C 末端無し ) における総クリップのパーセンテージは、この同じ期間後の E / I ( D K + ) と比較して、ほぼ半減していた ( 7 . 5 % と比べて 3 . 8 % ) 。これらの結果は、E / I ( D K + ) と比較して、E / I ( D K - 、C 末端無し ) が低減された断片化と関連することを示している。

#### 【 0 1 8 9 】

E / I ( 2 D K - ) に対するクリップ化部位の特徴付けは、実施例 4 に記載されるように L C - M S を用いて実行された。E / I ( 2 D K - ) が、5 m g / m l のタンパク質濃度で、p H 4 . 0 、1 0 m M コハク酸、5 % ソルビトール中に製剤化され、タンパク質ストレスを誘導するために 25 で維持された。図 1 2 は、この実験からの L C - M S データを表し、E / I ( D K - 、C 末端無し ) と同様に、E / I ( 2 D K - ) における断片化に関与する主要なアスパラギン酸残基が、D 1 9 9 、D 8 2 および D 1 9 3 であったことを実証する。また、以下の表 3 に図示されるように、4 週間後の E / I ( 2 D K - ) における総クリップのパーセンテージは、この同じ期間後の E / I ( D K + ) と比較して、半減以上であった。 ( 7 . 5 % と比べて 3 . 5 % ) これらの結果は、E / I ( D K + ) と比較して、E / I ( 2 D K - ) が低減された断片化と関連することを示している。

#### 【 0 1 9 0 】

表 3 . 25 での保存の 4 週間後の様々な E / I バインダーについての断片化の量および位置。

【表 3】

| 構築体                | 配列番号 | 同定されたクリップ部位<br>(強さ順に)  | 4週間での%総クリップ<br>(T=0での値) |
|--------------------|------|------------------------|-------------------------|
| E/I(DK+)           | 23   | D218K<br>D199G<br>D95K | 7.5%<br>(0.5%)          |
| E/I(DK-、<br>C末端無し) | 24   | D199G<br>D193Y<br>D82Y | 3.8%<br>(1.4%)          |
| E/I(2DK-)          | 25   | D199G<br>D193Y<br>D82Y | 3.5%<br>(0.9%)          |

10

## 【 0 1 9 1 】

上記のように、D 1 9 9 部位は E G F R 結合領域の F G 結合ループ内に位置する。そのため、D 1 9 9 はおそらく結合機能のために必要であり、E / I ( 2 D K - ) 分子または E / I ( D K - 、 C 末端無し ) 分子から除去することは難しいだろう。

## 【 0 1 9 2 】

V / I ( D K + ) および E / I ( D K + ) で観察されたアスパラギン酸部位でのクリッピングの正確な機序は、明らかではない。NMR 法により測定される、グルカゴンでの 3 つのアスパラギン酸の見かけの p K a 値に基づき、J o s h i r a ( J o u r n a l o f P h a r m a c e u t i c a l S c i e n c e s , 9 4 ( 9 ) , 2 0 0 5 ) は、アスパラギン酸部位での切断反応に対するいくつかの機序を提案した。理論に束縛されるものではないが、提案された機序のいくつかは、五員環を形成するためのアスパラギン酸側鎖の環化、続いて、ペプチド結合切断を次いで引き起こす、ペプチドカルボニルへの求核攻撃を含む可能性がある。アスパラギン酸をグルタミン酸で置換することにより、立体障害に起因して容易に環形成が起こらず、それゆえその位置でのペプチド結合切断を阻害する可能性がある。

20

## 【実施例 7】

## 【 0 1 9 3 】

D K マイナス V / I 変種での凝集および断片化の評価

2 つの V E G F R - I G F R ( V I ) フィブロネクチンをベースとする足場タンパク質の安定性が比較された。第一の構築体は、V I ( D K + ) ( 配列番号 : 5 6 ) であり、第二の構築体 V I ( D K - ) ( 配列番号 : 5 7 ) は、配列番号 : 5 6 の位置 9 4 および 1 9 9 で、アスパラギン酸のグルタミン酸との置換を含有する。

30

## 【 0 1 9 4 】

両分子は、p H 4 . 0、4 . 5 および 5 . 5 で、1 0 m M コハク酸、5 % ソルビトール中に、3 m g / m l のタンパク質濃度で製剤化された。これらの製剤の制限された安定性を、S E - H P L C および R P - H P L C による解析のために引かれた定期的な時点で、最長 2 ヶ月間、4 および 2 5 で実行した。さらに、L C - M S での特徴付けを、両タンパク質での正確なクリップ部位を決定するために、2 ヶ月 2 5 のサンプルで実行した。

40

## 【 0 1 9 5 】

V I フィブロネクチンをベースとする足場タンパク質における凝集率への p H の影響

過去のフィブロネクチンをベースとする足場タンパク質での経験に基づき、低 p H 製剤が、これらの分子に対して最良の生物物理学的安定性 ( すなわち、より低い凝集 ) を提供することが認識されている。今回の研究では、2 つの V I 構築体が、図 1 3 に図示されるように、以前見られたものと同じ傾向を明示する。凝集の開始レベルは 2 つの分子間でわずかに異なるが、安定性期間にわたって観察された率は、所与の各 p H で非常に類似しており、両分子についての凝集率は同じ順序、p H 5 . 5 > > p H 4 . 5 > p H 4 . 0、を示す。

50

## 【 0 1 9 6 】

ⅤⅠフィブロネクチンをベースとする足場タンパク質におけるクリップ率へのpHの影響

過去のフィブロネクチンをベースとする足場タンパク質での経験に基づき、クリッピングの影響を受けやすい部位がタンパク質配列に存在する場合、低pH製剤が、これらのタンパク質に対して最低の化学的安定性を提供することが認識されている。ⅤⅠ(DK+) (配列番号: 56) に対して実行された過去の安定性研究では、多数のクリップ部位が同定され、最も重度であるD94およびD199でのクリッピングを有していた。今回の研究では、2つのⅤⅠ構築体が、図14に図示されるように、以前見られたものと同じ傾向を明示し、ⅤⅠ(DK-) に対するよりもⅤⅠ(DK+) に対する方がより悪い、クリップ率へのpHの影響を有している。クリップ率は、両分子について、pH4.0 > pH4.5 > pH5.5 という一般的な傾向に追随するが、ⅤⅠ(DK-) は、全3種のpH値にわたり、そのクリップ率についてほとんど相違がないことを示す。

10

## 【 0 1 9 7 】

図13および14に示される安定性データ傾向から、製剤pHが5.5から4.0に減少した場合、ⅤⅠ(DK+) についての一週間あたりのクリップ率は3.3倍増加するが、他方では、ⅤⅠ(DK-) 分子については、2つの位置での主要なクリップ部位の除去により、この率は1.6倍増加した。それゆえ、これらのアミノ酸置換で、ⅤⅠフィブロネクチンをベースとする足場タンパク質におけるクリップ率は、pH4製剤を用いる場合、同じ安定性期間にわたり、約50%減少した。一方で、製剤pHが5.5から4.0に減少した場合、ⅤⅠ(DK+) およびⅤⅠ(DK-) についての一週間あたりの凝集率は、それぞれ86倍および216倍減少する。凝集率へのpH影響は、それゆえ、ⅤⅠフィブロネクチンをベースとする足場タンパク質におけるクリップ率への影響よりも劇的である。

20

## 【 0 1 9 8 】

LC-MSによるクリップ部位の同定

ⅤⅠ(DK+) およびⅤⅠ(DK-) において観察されたクリップ部位の構造的特徴付けが、LC-MSにより実行された。25 / 2ヶ月時点からのクリップ領域の重ね合わせた(overlay) RP-HPLCクロマトグラムが図15に見られ、ピーク同定が表4に要約される。

## 【 0 1 9 9 】

表4. 質量分析によるピーク同定の要約。赤で強調される残基は、ⅤⅠ(DK-) 構築体ではグルタミン酸に交換された、本来のⅤⅠ配列に存在するアスパラギン酸を示す。

30

【表4】

| ピーク # | ⅤⅠ(DK+)における<br>クリップの構造 | ⅤⅠ(DK+)における<br>全てのクリップ間<br>のピーク領域% | ⅤⅠ(DK-)における<br>クリップの構造 | ⅤⅠ(DK-)における<br>全てのクリップ間<br>のピーク領域% |
|-------|------------------------|------------------------------------|------------------------|------------------------------------|
| 1     | G1-D105                | 11.6                               | G1-D105                | 37.8                               |
| 2     | G1-D81                 | 3.1                                | G1-D81                 | 7.9                                |
| 3     | G1-D94                 | 24.7                               | G1-R80                 | 36.3                               |
| 4     | G1-D199                | 43.0                               | G1-D179                | 14.1                               |
| 5     | G1-K200                | 3.7                                | T15-D81                | 3.9                                |
| 6     | (G1-D199)-18           | 5.1                                | n/a                    | n/a                                |
| 7     | (G1-D199)-35           | 3.2                                | n/a                    | n/a                                |
| 8     | D109-Q203              | 1.9                                | n/a                    | n/a                                |

40

## 【 0 2 0 0 】

いくつかのクリップが2つの分子間で同一のままである一方、ⅤⅠ(DK-) においてD94とD199での主要なクリップ部位は除去され、25 / 2ヶ月のストレスの後、

50

総クリップのレベルを6.9%までもたらず。他方では、VI(DK+)における総クリップは、同じ安定性期間にわたり、16.0%で高いままであった。低レベルの他のクリップもまたVI(DK-)において同定されたが、VI(DK+)では見られなかった。

【0201】

表5. VI(DK+)およびVI(DK-)でのクリップ率の比較。

【表5】

| 製剤 pH | VI(DK+)に対する率<br>(一週間あたりの%) | VI(DK-)に対する率<br>(一週間あたりの%) |
|-------|----------------------------|----------------------------|
| 4.0   | 1.6650                     | 0.6350                     |
| 4.5   | 1.0375                     | 0.4330                     |
| 5.5   | 0.4975                     | 0.3925                     |

10

【0202】

pH4.0でのVI(DK+)のクリップ率は、pH4.5および5.5でのVI(DK+)のクリップ率よりも、それぞれ、1.6倍および3.3倍速かった。pH4.0でのVI(DK-)のクリップ率は、pH4.5および5.5でのVI(DK-)のクリップ率よりも、それぞれ、1.5倍および1.6倍速かった。

【0203】

表6. VI(DK+)およびVI(DK-)での凝集率の比較。

20

【表6】

| 製剤 pH  | VI(DK+)に対する率<br>(一週間あたりの%) | VI(DK-)に対する率<br>(一週間あたりの%) |
|--------|----------------------------|----------------------------|
| 4.0    | 0.0225                     | 0.0075                     |
| 4.5    | 0.4450                     | 0.4050                     |
| 1.9400 | 1.9400                     | 1.6200                     |

【0204】

pH4.5および5.5でのVI(DK+)の凝集率は、pH4.0でのVI(DK+)の凝集率よりも、それぞれ、4.4倍および8.6倍速かった。pH4.5および5.5でのVI(DK-)の凝集率は、pH4.0でのVI(DK-)の凝集率よりも、それぞれ、4.0倍および2.16倍速かった。

30

【0205】

2種類のVIフィブロネクチンをベースとする足場タンパク質で得られた安定性結果は、フィブロネクチンをベースとする足場タンパク質における特定の化学分解を除去する目的で、問題のあるアスパラギン酸のグルタミン酸への選択的置換の有効性および利益を実証する。このアプローチを通じて除去された主要な化学分解で、フィブロネクチンをベースとする足場タンパク質におけるより良い生物物理学的安定性が、低pHでの製剤を介して、これから達成され得る。VIでの本研究からの結果、ならびにEI二重機能的フィブロネクチンをベースとする足場タンパク質からこれまでに得られたものは、クリッピングされやすいと知られている特定のアスパラギン酸を除去することの必要性を実証し、同様に、フィブロネクチンをベースとする足場タンパク質における生物物理学的安定を最大限にするために、酸性pHでの製剤化が用いられることを可能にする。

40

【0206】

材料および方法

製剤：各分子は、30kD MWCO膜を用いるタンジェンシャルフロー濾過(TFF)を介して、所望の製剤に製剤化された。少なくとも6透析容量(dialysis volume)のバッファを交換して、最終製剤を達成した。生じるタンパク質の濃度はA280により確認され、さらなる製剤バッファで3mg/mLに調節された。

50

## 【0207】

バイアル充填および安定性：製剤化された各タンパク質は、ラミナーフローフード（laminar flow hood）にて無菌濾過され、安定性監視のため無菌ガラスバイアル中に充填された。バイアルは蓋をされクリンプ（crimp）され、続いて4および25で温度制御されたインキュベーター内に配置された。

## 【0208】

解析方法：

サイズ排除HPLC（SE-HPLC）：解析は、Shodex KW404-4F HPLCカラム（4.6×250mm、細孔径300、粒径5μm）およびpH5.5で10mMコハク酸/3%ソルビトール/0.4Mアルギニンからなる移動相を用いて実行された。流速は0.35mL/分であり、検出は280nmで実行された。

10

## 【0209】

逆相HPLC（RP-HPLC）：解析は、Varian PLRP-Sカラム（4.6×250mm、細孔径300、粒径5μm）を用いて実行された。様々な種の分離は、水/アセトニトリル/トリフルオロ酢酸からなるグラジエントを介して達成される。流速は1.0mL/分であった。二重検出は、（タンパク質関連種のため）280nmで、および蒸発光散乱（ELS、PEG関連種のため）で、実行された。

## 【0210】

LC-MS：クリップ部位の特徴付けは、Thermo LTQイオントラップ質量分析（MS）に連結された、Jupiter C18カラム（4.6×250mm、細孔径300、粒径5μm）を用いて実行された。HPLC溶出は、0.2mL/分フローで1:5にスプリットされ、MSに向けられた。280nmでのオンライン検出が継続された。

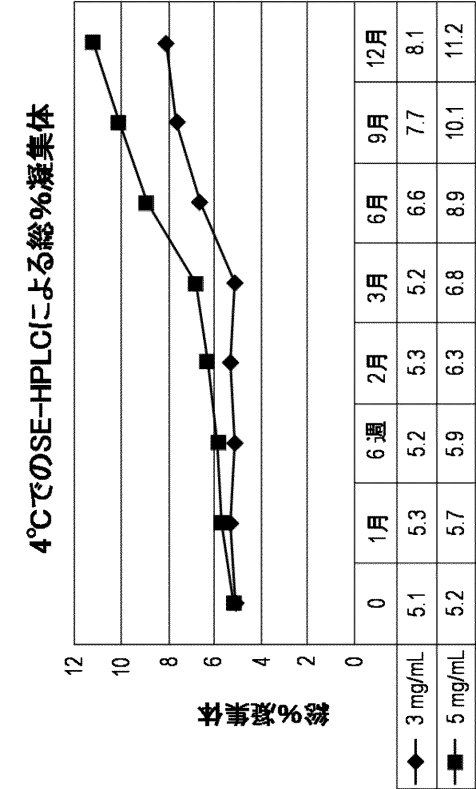
20

## 【0211】

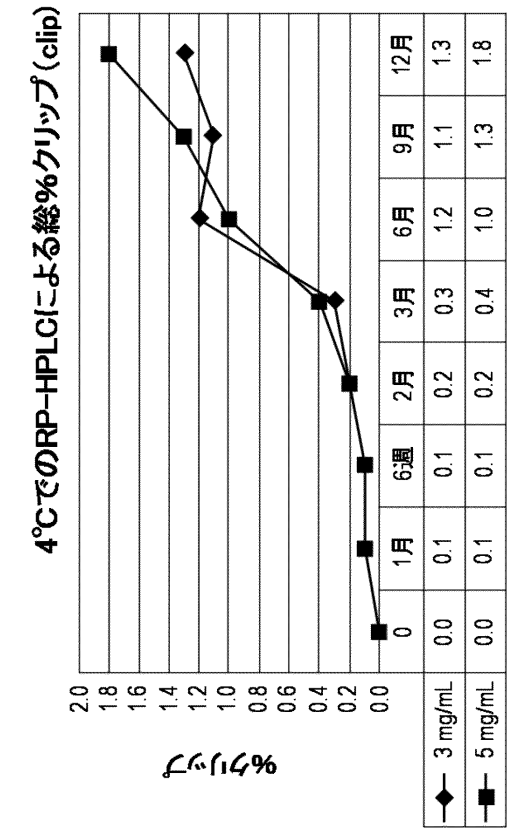
出典明示による組み込み

特許出願文書およびウェブサイトを含む、本明細書に記載される全ての文書および参考文献は、あたかもそれらが全体または一部分において本文書に書かれたのと同程度に、出典明示により本文書に個々に組み込まれる。

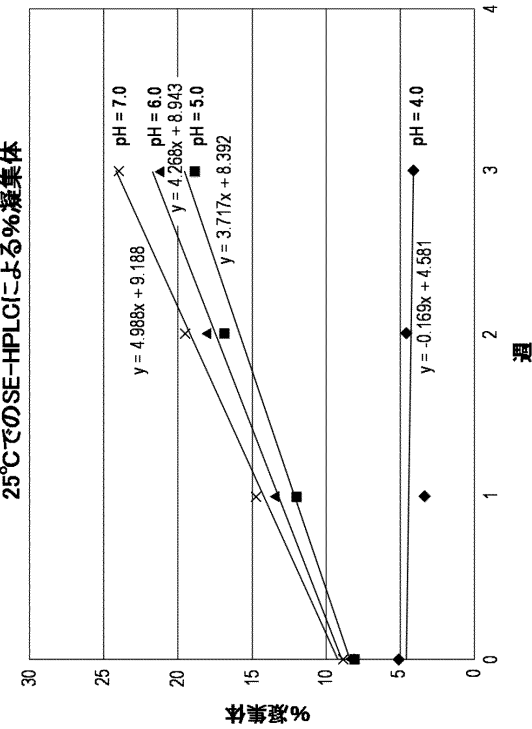
【 図 1 】



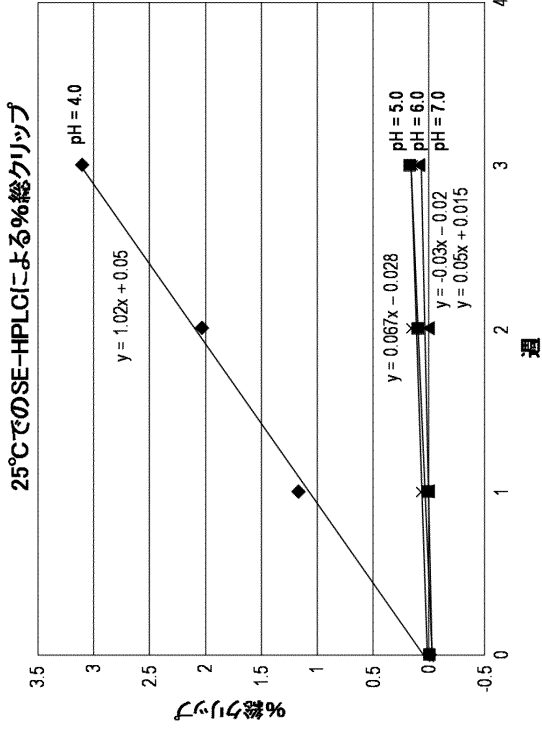
【 図 2 】



【 図 3 】

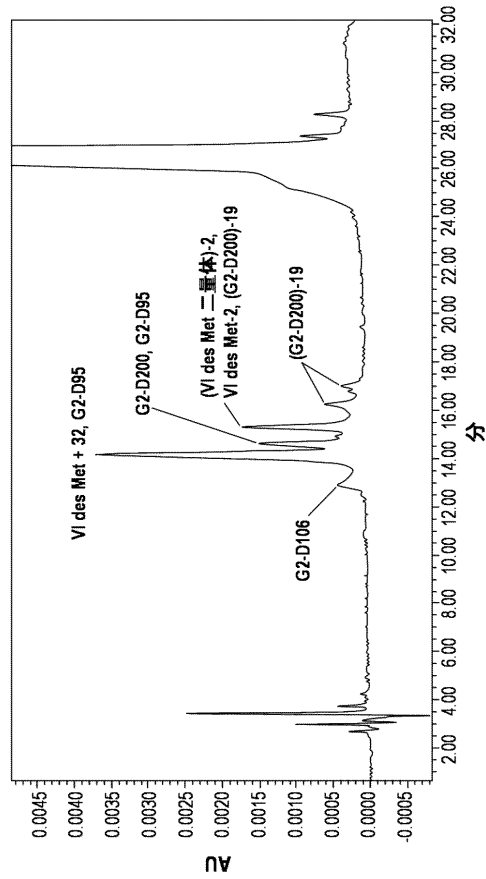


【 図 4 】

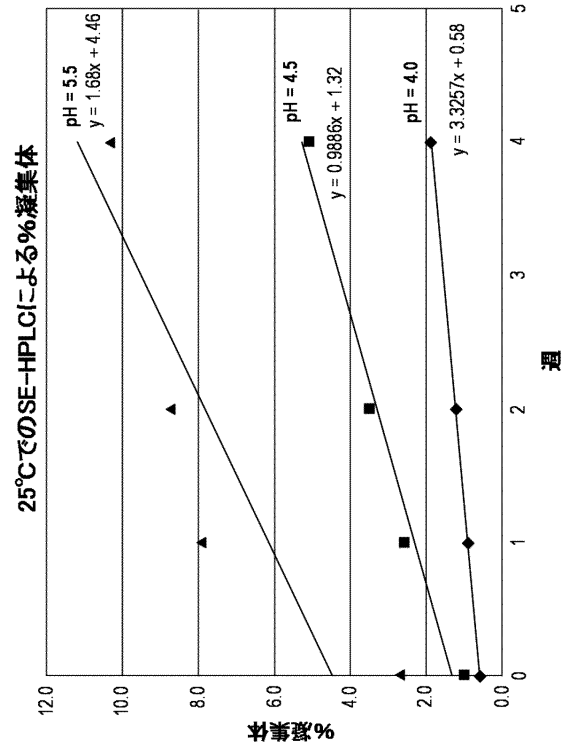




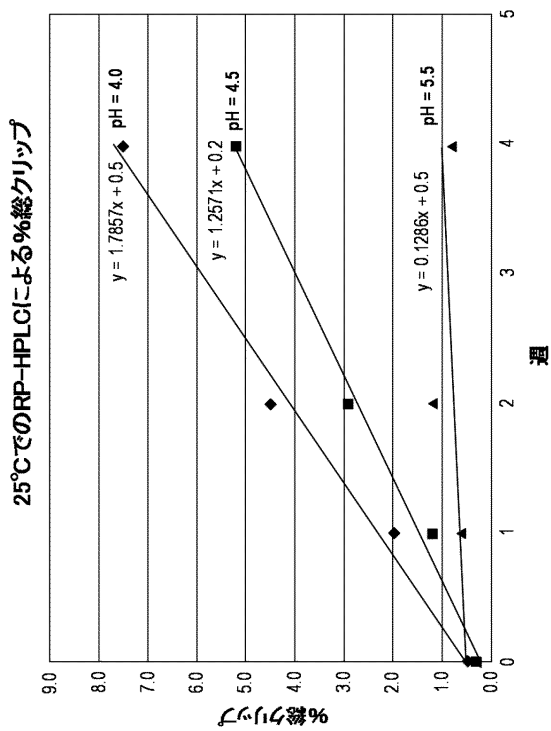
【図 5】



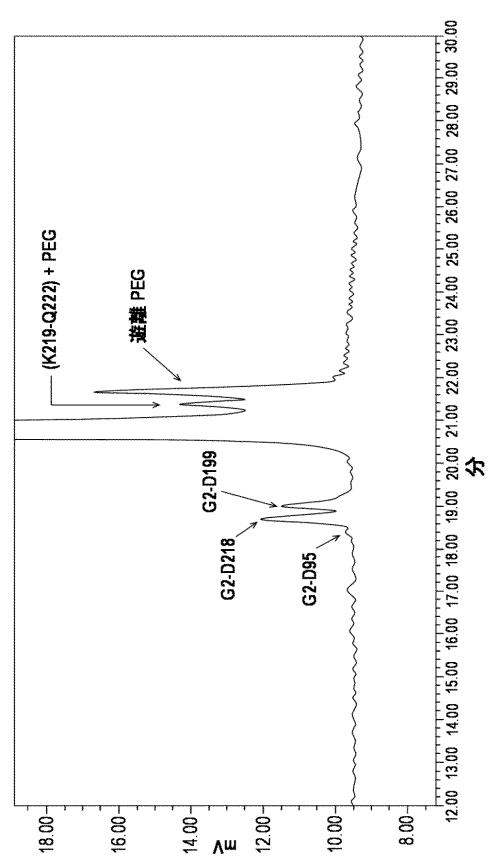
【図 6】



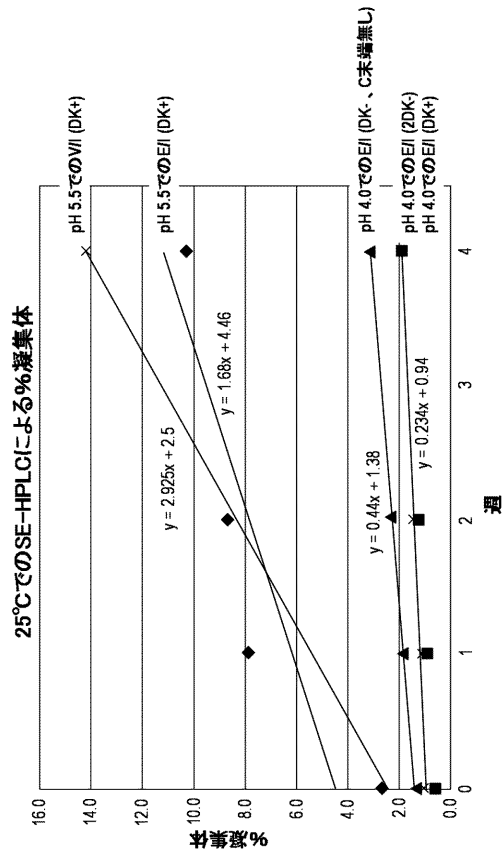
【図 7】



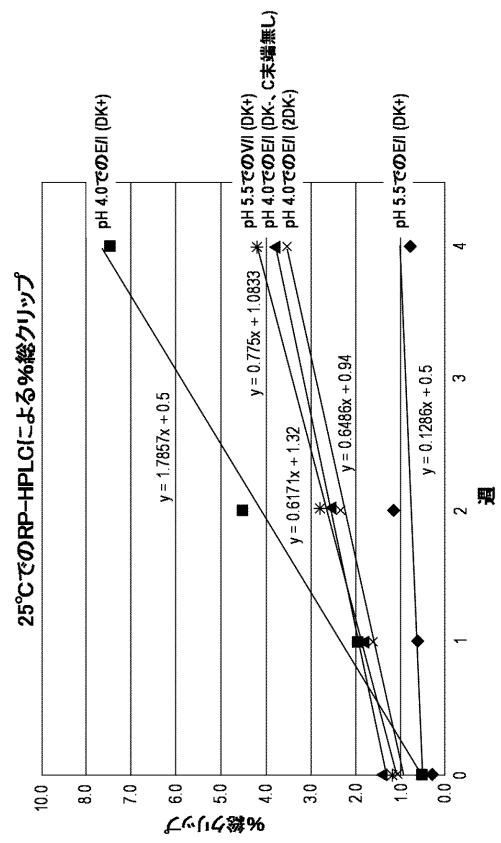
【図 8】



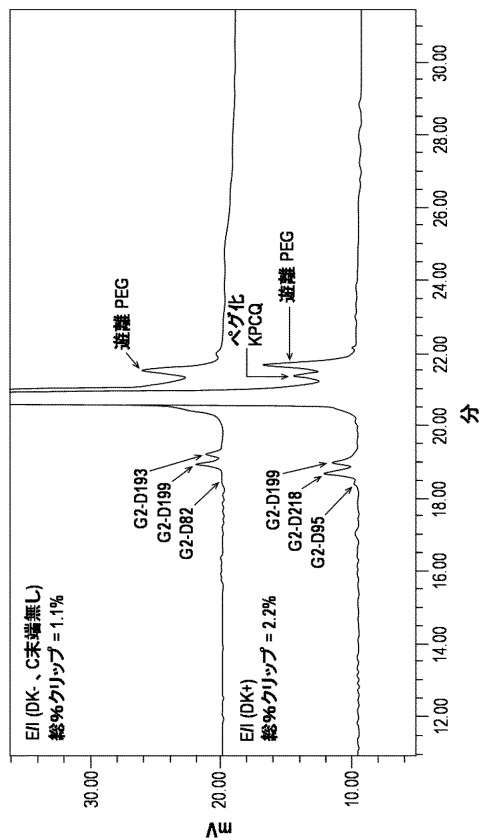
【図 9】



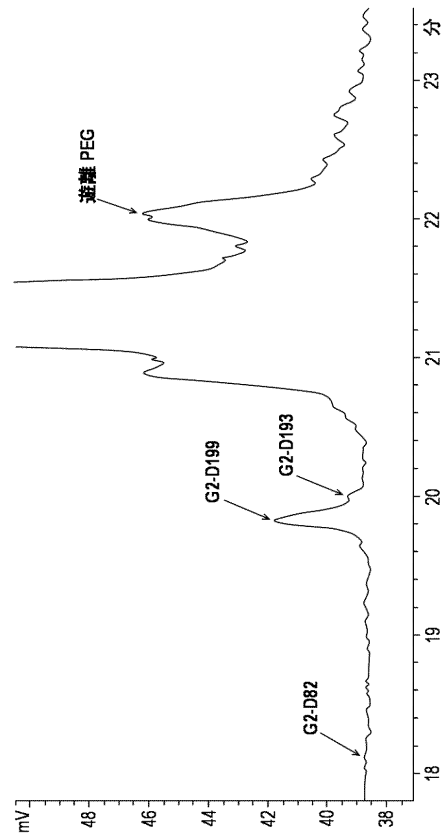
【図 10】



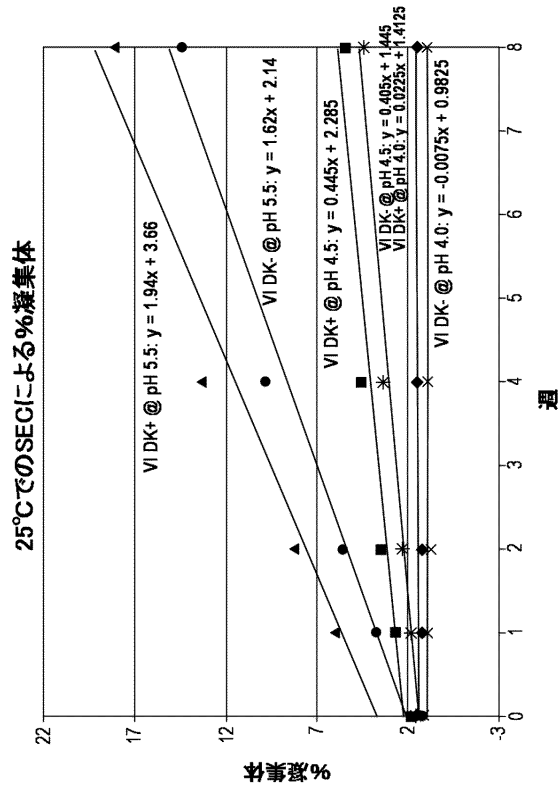
【図 11】



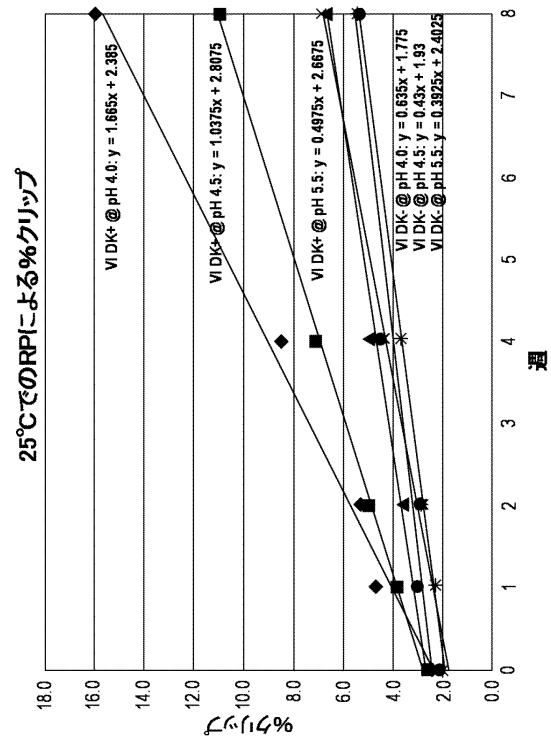
【図 12】



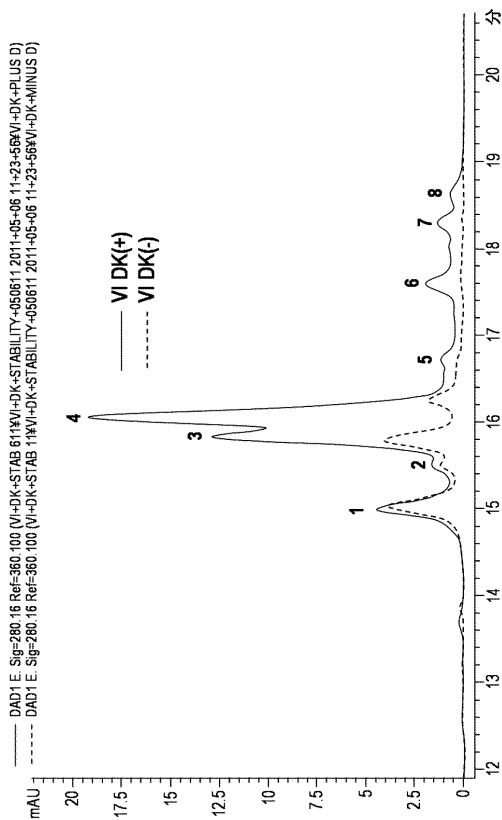
【図 13】



【図 14】



【図 15】



【配列表】

0006023703000001.app

## フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I  
**A 6 1 P 35/00 (2006.01)** A 6 1 P 35/00

(74)代理人 100157956

弁理士 稲井 史生

(72)発明者 レイ・カンブハウゼン

アメリカ合衆国 0 1 7 7 8 マサチューセッツ州ウェイランド、キャンベル・ロード 4 9 番

(72)発明者 ジョン・オローリン

アメリカ合衆国 0 1 7 7 5 マサチューセッツ州ストウ、ウエスト・アクトン・ロード 1 5 8 番

(72)発明者 バーニス・ヤン

アメリカ合衆国 0 2 4 2 0 マサチューセッツ州レキシントン、マサチューセッツ・アベニュー 1 0 0 9 番

(72)発明者 ジャン・イホン

アメリカ合衆国 0 1 7 2 0 - 4 2 3 2 マサチューセッツ州アクトン、フォークナー・ヒル・ロード 4 4 番

審査官 福澤 洋光

(56)参考文献 国際公開第 2 0 0 9 / 1 4 2 7 7 3 ( W O , A 1 )

特表 2 0 0 7 - 5 1 6 7 0 7 ( J P , A )

特表 2 0 1 0 - 5 1 0 3 1 5 ( J P , A )

特表 2 0 1 3 - 5 3 1 6 1 3 ( J P , A )

特表 2 0 1 0 - 5 2 7 6 0 7 ( J P , A )

特表 2 0 1 1 - 5 2 2 5 1 7 ( J P , A )

Duan et al , Biochemistry , 2 0 0 7 年 , Vol.46 , p.12656-12664

Lu et al , Journal of Biological Chemistry , 2 0 0 4 年 1 月 2 3 日 , Vol.279, No.4 , p.2856-2865

Duan et al , Biochemistry , 2 0 0 7 年 , Vol. 46 , pp.12656-12664

Lu et al , Journal of Biological Chemistry , 2 0 0 4 年 1 月 2 3 日 , Vol. 279, No. 4 , pp .2856-2865

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

C 1 2 N 1 / 0 0 - 1 5 / 9 0

C 0 7 K 1 / 0 0 - 1 9 / 0 0

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

U n i P r o t / G e n e S e q

P u b M e d

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