

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5537946号
(P5537946)

(45) 発行日 平成26年7月2日 (2014.7.2)

(24) 登録日 平成26年5月9日 (2014.5.9)

(51) Int.Cl.

F I

C O 7 K 14/78 (2006.01)

C O 7 K 14/78 Z N A

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 15/00 A

A 6 1 K 38/00 (2006.01)

A 6 1 K 37/02

A 6 1 K 47/48 (2006.01)

A 6 1 K 47/48

A 6 1 K 47/42 (2006.01)

A 6 1 K 47/42

請求項の数 10 (全 89 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2009-538410 (P2009-538410)
 (86) (22) 出願日 平成19年11月21日 (2007.11.21)
 (65) 公表番号 特表2010-510315 (P2010-510315A)
 (43) 公表日 平成22年4月2日 (2010.4.2)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2007/024316
 (87) 国際公開番号 W02008/066752
 (87) 国際公開日 平成20年6月5日 (2008.6.5)
 審査請求日 平成22年7月9日 (2010.7.9)
 (31) 優先権主張番号 60/860,605
 (32) 優先日 平成18年11月22日 (2006.11.22)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 60/879,666
 (32) 優先日 平成19年1月9日 (2007.1.9)
 (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
 アメリカ合衆国ニューヨーク州 1015
 4 ニューヨーク パーク アベニュー
 345
 (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】 IGF-1Rを含むチロシンキナーゼ受容体に対する改変タンパク質に基づく標的治療薬

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

第10フィブロネクチンタイプIII ($^{10}Fn3$) ドメインを含むポリペプチドであ
 って、 $^{10}Fn3$ ドメインが配列番号111および184~202のいずれか一つのアミ
 ノ酸配列を含む、ポリペプチド。

【請求項2】

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フラグメントから選択される1つ以上の薬物
 動態 (PK) 部分をさらに含む、請求項1に記載のポリペプチド。

【請求項3】

PK部分がポリオキシアルキレン部分であり、前記ポリオキシアルキレン部分がポリエ
 チレングリコールである、請求項2のポリペプチド。

【請求項4】

50kD未満の抗体部分；リボカリンの誘導体；テトラネクチンの誘導体；アビマー；
 アンキリンの誘導体、および第2の第10フィブロネクチンタイプIII ($^{10}Fn3$)
 ドメインから選択される第2ドメインをさらに含み、第2ドメインはヒトタンパク質を結
 合し、第2の $^{10}Fn3$ ドメインは (i) ループAB；ループBC；ループCD；ループ
 DE；およびループFGを含み；(ii) ヒト $^{10}Fn3$ ドメインの対応するループの配
 列と比較してランダム化されたアミノ酸配列を持つループ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持ち、かつ (iii) ヒト $^{10}Fn3$ ドメインによっ

10

20

て結合されないヒトタンパク質を10 nM以下の解離定数で結合する、請求項1から3のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項5】

第2ドメインがヒトIGF-IRを結合する、請求項4のポリペプチド。

【請求項6】

第2ドメインがヒトVEGFR2を結合する、請求項4のポリペプチド。

【請求項7】

第2ドメインが第2の¹⁰Fn3ドメインであり、配列番号126～183のいずれか一つのアミノ酸配列を含む、請求項4のポリペプチド。

【請求項8】

¹⁰Fn3ドメインと第2ドメインとが少なくとも一つのジスルフィド結合、ペプチド結合、ポリペプチド、ポリマー糖、またはポリエチレングリコール部分によって作動的に連結される、請求項4から7のいずれか一項に記載のポリペプチド。

【請求項9】

前記ポリペプチドがIGF-IRへのIGF-IまたはIGF-IIの結合を阻害し、細胞ベースのアッセイにおいてIC50未満の濃度でヒトIGF-IRを活性化しない、請求項1から8のいずれか一項に記載ポリペプチド。

【請求項10】

請求項1から9のいずれか一項に記載のポリペプチドを含む薬学的に許容できる組成物であって、本質的にエンドトキシンフリーである組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願

本願は米国仮特許出願第60/860,605号（2006年11月22日出願）および同第60/879,666号（2007年1月9日出願）の利益を主張し、これらの出願は参照によりその全てが本明細書に組み込まれる。

【0002】

本発明は、インスリン様成長因子I受容体（IGF-IR）および他の重要なタンパク質に結合する画期的タンパク質に関する。本発明は、医薬調製物中の画期的タンパク質およびそれらタンパク質の誘導体、ならびに診断、研究および治療的应用におけるそれらの使用にも関係する。さらに本発明は、それらのタンパク質を含む細胞、それらのタンパク質をコードするポリヌクレオチドまたはそのフラグメント、および上記画期的タンパク質をコードするポリヌクレオチドを含むベクターに関する。

【背景技術】

【0003】

インスリン様成長因子I受容体（IGF-IR）は、2つの細胞外アルファ鎖と2つの膜貫通ベータ鎖とがジスルフィド連結されたベータ-アルファ-アルファ-ベータ構成をとっている膜貫通ヘテロ四量体タンパク質である。IGF-IR受容体の細胞外ドメインによるインスリン様成長因子I（IGF-I）やインスリン様成長因子II（IGF-II）などのリガンドの結合は、それを活性化し、多くの場合、その細胞内チロシンキナーゼドメインを活性化して、受容体の自己リン酸化および基質リン酸化をもたらす。

【0004】

IGF-IRはインスリン受容体と相同であり、ベータ鎖チロシンキナーゼドメインでは84%という高い配列類似性を持ち、アルファ鎖細胞外システインリッチドメインでは48%という低い配列類似性を持つ（Ulrich, A.ら, 1986, EMBO, 5, 2503-2512; Fujita-Yamaguchi, Y.ら, 1986, J. Biol. Chem., 261, 16727-16731; LeRoith, D.ら, 1995, Endocrine Reviews, 16, 143-163）。IGF-IRとそのリガンド（IGF-IおよびIGF-II）は、胚発生時の成長および発生、成人における代謝、細胞増殖および細胞分化を含む数多くの生理学的過程で、重要な役割を果たす（LeRoith, D., 2000, Endocrinology, 141, 1287-1288; LeRoit

10

20

30

40

50

h, D., 1997, New England J. Med., 336, 633-640)。

【 0 0 0 5 】

IGF-IリガンドおよびIGF-IIリガンドは、血中のエンドクリンホルモン（血中では主としてIGF結合タンパク質との複合体として存在する）として機能すると共に、局所的に産生されるパラクリン成長因子およびオートクリン成長因子としても機能する（Humbel, R. E., 1990, Eur. J. Biochem., 190, 445-462; Cohick, W. S.およびClemmons, D. R., 1993, Annu. Rev. Physiol. 55, 131-153）。

【 0 0 0 6 】

インビボではIGF-Iの血清レベルが下垂体成長ホルモン（GH）の存在に依存する。肝臓はGH依存的IGF-I合成の主要部位であるが、数多くの肝臓外組織もIGF-Iを産生する（DaughadayおよびRotwein, Endocrine Rev. 10:68-91 (1989)）。種々の新生物組織もIGF-Iを産生しうる（WernerおよびLeRoith, Adv. Cancer Res. 68:183-223 (1996)）。したがってIGF-Iは、エンドクリン機序によるだけでなく、オートクリン機序またはパラクリン機序によっても、正常なおよび異常な細胞増殖の調節物質として作用しうる。IGF-IおよびIGF-IIはインビボでIGF結合タンパク質（IGFBP）に結合する。IGFに結合すると、IGFBPは循環によってIGFを輸送するか、またはタンパク質分解的切断および不活化からIGFを保護しうる。IGF-IRとの相互作用に関する遊離IGFの利用可能性は、IGFBPによって調整される。IGFBPおよびIGF-Iを概観するには、Grimbergら, J. Cell. Physiol. 183:1-9, 2000を参照されたい。

【 0 0 0 7 】

分子レベルでは、IGF-IRは、腫瘍細胞の成長、トランスフォーメーションおよび生存に関連づけられている（Baserga, R.ら, 1997, Biochem. Biophys. Acta, 1332, F105-F126; Blakesley, V. A.ら, 1997, Journal of Endocrinology, 152, 339-344; Kaleko, M., Rutter, W. J.およびMiller, A. D. 1990, Mol. Cell. Biol., 10, 464-473）。乳がん、大腸がん、卵巣癌、滑膜肉腫および膀胱がんを含むいくつかの腫瘍タイプは、正常レベルより高レベルのIGF-IRを発現させることが知られている。Khandwala, H. M.ら, 2000, Endocrine Reviews, 21, 215-244; Werner, H.およびLeRoith, D., 1996, Adv. Cancer Res., 68, 183-223; Happerfield, L. C.ら, 1997, J. Pathol., 183, 412-417; Frier, S.ら, 1999, Gut, 44, 704-708; van Dam, P. A.ら, 1994, J. Clin. Pathol., 47, 914-919; Xie, Y.ら, 1999, Cancer Res., 59, 3588-3591; Bergmann, U.ら, 1995, Cancer Res., 55, 2007-2011を参照されたい。

【 0 0 0 8 】

インビトロでは、IGF-IおよびIGF-IIは、肺がん、乳がん、大腸がん、骨肉腫および子宮頸がんなど、いくつかのヒト腫瘍細胞株に対して、強力なマイトジェンであることが示されている（Ankrapp, D. P.およびBevan, D. R., 1993, Cancer Res., 53, 3399-3404; Cullen, K. J., 1990, Cancer Res., 50, 48-53; Hermanto, U.ら, 2000, Cell Growth & Differentiation, 11, 655-664; Guo, Y. S.ら, 1995, J. Am. Coll. Surg., 181, 145-154; Kappel, C. C.ら, 1994, Cancer Res., 54, 2803-2807; Steller, M. A.ら, 1996, Cancer Res., 56, 1761-1765）。これらの腫瘍および腫瘍細胞株のいくつかは、高レベルのIGF-IまたはIGF-IIも発現させ、それがその成長をオートクリンのまたはパラクリンのに刺激しうる（Quinn, K. A.ら, 1996, J. Biol. Chem., 271, 11477-11483）。

【 0 0 0 9 】

疫学的研究により、IGF-Iの血漿レベルの上昇（および低いIGF結合タンパク質3レベル）と、前立腺がん、大腸がん、肺がんおよび乳がんに関するリスクの増加との相関関係が示されている（Chan, J. M.ら, 1998, Science, 279, 563-566; Wolk, A.ら, 1998, J. Natl. Cancer Inst., 90, 911-915; Ma, J.ら, 1999, J. Natl. Cancer Inst., 91, 620-625; Yu, H.ら, 1999, J. Natl. Cancer Inst., 91, 151-156; Hankinson, S. E.ら, 1998, Lancet, 351, 1393-1396）。血漿中のIGF-Iレベルを低下させるための戦略、またはIGF-IRの機能を阻害するための戦略が、がん予防のために提案されている（Wu, Y.ら, 2002, Cancer Res., 62, 1030-1035; Grimberg, A.およびCohen P., 2000, J. Cell. Physiol.,

183, 1-9)。

【0010】

IGF-IRは、成長因子枯渇、足場非依存性または細胞毒性薬物処置が引き起こすアポトーシスから腫瘍細胞を保護することができる (Navarro, M.およびBaserga, R., 2001, *Endocrinology*, 142, 1073-1081; Baserga, R.ら, 1997, *Biochem. Biophys. Acta*, 1332, F105-F126)。IGF-IRのミトジェン活性、トランスフォーミング活性および抗アポトーシス活性にとって不可欠なIGF-IRのドメインは、突然変異解析によって同定されている。例えばIGF-IRのチロシン1251残基は、抗アポトーシス活性およびトランスフォーメーション活性にとって不可欠であると同定されているが、そのミトジェン活性にとっては不可欠でない (O'Connor, R.ら, 1997, *Mol. Cell. Biol.*, 17, 427-435; Miura, M.ら, 1995, *J. Biol. Chem.*, 270, 22639-22644)。

10

【0011】

IGF-IR拮抗作用またはIGF-IR阻害に基づく治療薬を作製することの難しさ

IGF-IRは治療ターゲットとして魅力的なバイオロジーを持っているが、アンタゴニストまたは他のタイプの阻害剤を作製しようとする試みは遅々として進んでおらず、その理由は主に、その治療パラダイムに依存して、以下の因子の1つ以上にある：受容体活性化作用を伴わずにターゲットを拮抗することが困難または不可能であること；他のチロシンキナーゼターゲットまたは受容体、例えばインスリン受容体などとの望ましくない交差反応性により、選択的アンタゴニストまたは選択的阻害剤を作製することが困難または不可能であること；潜在的治療薬の半減期が短いため、効果的な投与が困難であること；潜在的治療薬の溶解度が低いため、効果的な投与が困難であること；および潜在的治療薬の凝集により、効果的な投与が困難であること。本発明の治療薬は、これらの問題点の1つ以上を克服するものである。

20

【0012】

IGF-IR mRNAに対するアンチセンスを発現させる腫瘍細胞は、バイオ拡散チャンバー (biodiffusion chamber) に入れて動物に注入すると、著しいアポトーシスを起こす。この知見から、IGF-IRの阻害によるアポトーシスに対し、腫瘍細胞は正常細胞よりも感受性が高いという仮説に基づけば、IGF-IRは魅力的な治療ターゲットになる (Resnicoff, M.ら, 1995, *Cancer Res.*, 55, 2463-2469; Baserga, R., 1995, *Cancer Res.*, 55, 249-252)。しかし、アンチセンス治療戦略も、siRNA治療戦略も、投与の問題と潜在的製品原価の障壁に悩まされる。

30

【0013】

腫瘍細胞におけるIGF-IRの機能を阻害するためのもう一つの戦略は、IGF-IRの細胞外ドメインに結合して活性化を阻害する抗IGF-IR抗体を使用することだった。IGF-IRに対するマウスモノクローナル抗体を開発しようとする試みはいくつか報告されている。また、そのうちの2つの阻害抗体 - IR3および1H7 - は入手可能であり、それらの使用が、いくつかのIGF-IR研究で報告されている。

【0014】

IR3抗体は、インスリン受容体の部分精製胎盤調製物を使ってマウスを免疫処置することによって開発されたものであり、この免疫処置では、インスリン受容体を選択的に結合する抗体IR1と、IGF-IR (ソマトメジンC受容体) の優先的免疫沈降を示すがインスリン受容体の弱い免疫沈降も示す2つの抗体IR2およびIR3とが得られた (Kull, F. C.ら, 1983, *J. Biol. Chem.*, 258, 6561-6566)。

40

【0015】

抗体の典型的欠陥

抗体はIGF-IRを活性化する場合がある。これは文献で何度か示されている。さらにまた、「阻害する」ことが示された抗体が、注意深く特徴づけられておらず、さらに低い抗体濃度などといった一定の条件下では、実際にはIGF-IRを活性化する可能性もある。おそらく抗体の拡散勾配が存在するであろう腫瘍では、腫瘍内の抗体濃度が低いところで、抗体によるIGF-IRの活性化が起こりうる。

50

【 0 0 1 6 】

1H7抗体は、IGF-IRの精製胎盤調製物でマウスを免疫処置することによって開発されたものであり、この免疫処置では、3つの刺激抗体に加えて、阻害抗体1H7が得られた(Li, S.-L.ら, 1993, Biochem. Biophys. Res. Commun., 196, 92-98; Xiong, L.ら, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 5356-5360)。

【 0 0 1 7 】

もう一つの報告では、ヒトIGF-IRに特異的なマウスモノクローナル抗体のパネルが、高レベルのIGF-IRを発現させるトランスフェクト3T3細胞でマウスを免疫処置することによって取得され、それらが、結合競合研究と、トランスフェクト3T3細胞に対するIGF-I結合のそれらによる阻害または刺激とによって、7つのグループに分類された(Soos, M. A.ら, 1992, J. Biol. Chem., 267, 12955-12963)。

10

【 0 0 1 8 】

IR3抗体はインビトロでのIGF-IR研究に最もよく使用される阻害抗体であるが、この抗体には、ヒトIGF-IRを発現させるトランスフェクト3T3細胞およびCHO細胞において、アゴニスト活性を示すという欠点がある(Kato, H.ら, 1993, J. Biol. Chem., 268, 2655-2661; Steele-Perkins, G.およびRoth, R. A., 1990, Biochem. Biophys. Res. Commun., 171, 1244-1251)。同様に、Soosらが開発した抗体のパネルのうち、最も阻害的な抗体24-57および24-60も、トランスフェクト3T3細胞において、アゴニスト活性を示した(Soos, M. A.ら, 1992, J. Biol. Chem., 267, 12955-12963)。IR3抗体は、無傷の細胞において、そしてまた可溶化後に、発現された受容体に対するIGF-Iの結合を阻害する(しかしIGF-IIの結合は阻害しない)と報告されているが、この抗体は、細胞におけるDNA合成を刺激するというIGF-IとIGF-IIの両方の能力をインビトロで阻害することが示されている(Steele-Perkins, G.およびRoth, R. A., 1990, Biochem. Biophys. Res. Commun., 171, 1244-1251)。IR3抗体の結合エピトープは、キメラインスリン-IGF-IRコンストラクトから、IGF-IRの223-274領域であると推測されている(Gustafson, T. A.およびRutter, W. J., 1990, J. Biol. Chem., 265, 18663-18667; Soos, M. A.ら, 1992, J. Biol. Chem., 267, 12955-12963)。

20

【 0 0 1 9 】

MCF-7ヒト乳がん細胞株は、IGF-IおよびIGF-IIの成長応答をインビトロで実証するためのモデル細胞株として、典型的に使用される(Dufourny, B.ら, 1997, J. Biol. Chem., 272, 31163-31171)。MCF-7細胞において、IR3抗体は、無血清条件下で外から加えられたIGF-IおよびIGF-IIの刺激効果を、不完全に、約80%遮断する。また、IR3抗体は、10%血清におけるMCF-7細胞の成長を有意に阻害しない(25%未満)(Cullen, K. J.ら, 1990, Cancer Res., 50, 48-53)。インビトロでIR3抗体が、血清刺激されたMCF-7細胞の成長を、このように弱く阻害することは、IR3抗体処置がヌードマウスにおけるMCF-7異種移植片の成長を有意に阻害しなかったインビボ研究の結果と関連づけることができる(Arteaga, C. L.ら, 1989, J. Clin. Invest., 84, 1418-1423)。

30

【 0 0 2 0 】

IR3抗体および他の報告された抗体は弱いアゴニスト活性を持ち、(無血清条件下で外から加えられたIGF-IまたはIGF-IIによる刺激ではなく)より生理的な血清刺激条件下でのMCF-7細胞などの腫瘍細胞の成長を有意に阻害することができないので、新しい抗IGF-IR調整物質であって、それ自体による有意なアゴニスト活性を伴わずに、血清刺激された腫瘍細胞の成長を阻害しうるものが必要とされている。アゴニスト活性が望ましい場合もあるだろうが、それは通常、腫瘍学以外または不適切に制御されたもしくは望ましくない組織拡大、組織増殖、もしくは組織成長以外に応用される場合である。

40

【 0 0 2 1 】

抗IGF-IR抗体は自己免疫疾患を持つ一定の患者に存在すると報告されているが、これらの抗体はいずれも精製されておらず、診断手法または臨床手法のためにIGF-I活性を阻害するのに適していることが示されたものもない。例えばThompsonら, Pediat. Res. 32: 455-459, 1988; Tappyら, Diabetes 37: 1708-1714, 1988; Weightmanら, Autoimmunity 1

50

6:251-257, 1993 ; Drexhageら, Nether. J. of Med. 45:285-293, 1994を参照されたい。また、細胞増殖を刺激することができるIGF-1Rに対するモノクローナル抗体も報告されている (Xiongら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:5356-5360, 1992)。

【0022】

さらにまた、特異性、受容体活性化作用、凝集および溶解度ゆえに、抗体および他の治療薬を作製すること、ならびにIGF-1Rをターゲットとして含む二重特異性治療薬を（特に抗体を使って）作製することは、歴史的に困難だった。

【0023】

小分子阻害剤の典型的欠陥

小分子化学プログラムは、ほとんどの場合、IGF-1Rに対する治療薬の創製には成功してこなかった。タンパク質および小分子によるこのターゲットのドラッグアビリティ (drugability) は、関連するチロシンキナーゼ類または受容体、例えばインスリン受容体などを阻害したり、それに結合したりせずに、IGF-1Rに対する選択的化学作用を得ることができるかどうかなどといったいくつかの理由から、困難であった。また、小分子の溶解度は低いことが多く、それがバイオアベイラビリティ、投与または製剤を困難にする。

【0024】

アポトーシスおよびIGF-1R

本発明の数多くの態様の一つは、本発明のポリペプチドが、IGF-1Rに選択的に結合して、腫瘍などの所望の組織の細胞でアポトーシスをトリガーすることである。活性化を含むIGF-1Rのバイオロジーは、アポトーシスの調節に寄与する。これは、アポトーシスを遅らせまたは防止することができる。さまざまな遺伝子損傷によるアポトーシスプログラムの抑制は、悪性疾患の発生と進行に寄与しうる。

【0025】

最新の潜在的治療戦略は、インビトロでアポトーシスを誘発すること、または増加したIGF-1レベル、増加したIGF-IIレベル、および/もしくは増加したIGF-1R受容体レベルに関連する細胞増殖をインビトロで阻害することはできるものの、IGF-1レベルもしくはIGF-IIレベルを抑制すること、またはIGF-1RへのIGF-1の結合を防止することを含み、より良い治療には依然として不適切なままである。例えば、長時間作用性ソマトスタチン類似体オクトレオチドが、IGFの合成および/または分泌を減少させるために使用されている。可溶性IGF-1Rは、実験動物系で、腫瘍細胞におけるアポトーシスをインビボで誘発し、腫瘍形成を阻害するために使用されている (D'Ambrosioら, Cancer Res. 56: 4013-20, 1996)。また、IGF-1Rアンチセンスオリゴヌクレオチド、IGF-1のペプチド類似体、およびIGF-1Rに対する抗体も、IGF-1またはIGF-1R発現を減少させるために使用されている (上記参照)。しかし、これらの薬剤はいずれも、ヒト患者への長期投与には適していなかった。また、低身長、骨粗鬆症、筋肉量の低下、ニューロパシーまたは糖尿病を処置するためにIGF-1が患者に投与されているが、IGFBPへのIGF-1の結合がIGF-1による処置を困難または無効にする場合も多かった。がんおよび増殖性障害を含む障害、例えばIGF-1もしくはIGF-IIおよび/またはIGF-1Rが過剰発現される場合などにおいて、IGF-1、IGF-IIおよびIGF-1Rが果たす役割と、他の治療アプローチ (例えば小分子、siRNA、アンチセンスおよび抗体) の欠陥とを考慮すると、IGF-1Rを選択的に調整、阻害または遮断しうる、IGF-1R経路 (あるいは同受容体のさまざまなアイソフォームもしくは突然変異体またはそのリガンド) に対する治療薬、例えば本発明のポリペプチドを作製することが望ましいだろう。

【0026】

また、そのようなポリペプチドが、費用対効果の高い方法で発現されること、望ましい生物物理学的性質 (例えばT_m、実質的に単量体であること、またはよく折りたたまれていること) を持ち、組織に浸透するように小さなサイズを持ち、IGF-1Rまたは他のターゲットに対する結合アフィニティーを上回って、血中で、適正な半減期またはインビボ曝露時間を持つことも望ましいだろう。

【発明の概要】

【0027】

10

20

30

40

50

本発明の一態様は、IGF-IRを高いアフィニティで結合する新規ポリペプチドに関する。いくつかの実施形態では、本ポリペプチドが、約1 μ M以下、約10nM以下、または約1nM以下の解離定数で、IGF-IRを結合する。いくつかの実施形態では、本ポリペプチドが、約1 μ M以上の解離定数で、インスリン受容体に結合する。いくつかの実施形態では、本発明のポリペプチドが、IGF-IRに対するIGF-IまたはIGF-IIの結合を阻害し、IC50が約1nMまたは約100pM未満である細胞ベースのアッセイにおいて、IC50未満の濃度でヒトIGF-IRを活性化しない。いくつかの実施形態では、本発明のポリペプチドが、IGF-IR活性化に依存する細胞株での細胞ベースアッセイにおいて、アポトーシスを誘発する。いくつかの実施形態では、IGF-IR結合剤が、アポトーシス、リン酸化または二量体化の制御などといったIGF-IR活性を遮断する。

10

【0028】

単一特異性治療薬または多重特異性（二重特異性または三重特異性を含む）治療薬としてIGF-IRをターゲットとする本発明のタンパク質が、インスリン受容体との比較でIGF-IRに対して選択的であることは、特にインビボ応用においては、望ましいことが多いだろう。そのような選択性は、好ましくは、少なくとも約100倍、少なくとも約1000倍、少なくとも約10,000倍および少なくとも約100,000倍である。また、IGF-IRに対して高いアフィニティを持つタンパク質の場合は特に、治療薬またはタンパク質の濃度が所定の値以下である場合に、インスリン受容体を検出するほどには結合しないことが望ましいだろう。この場合、そのような濃度は約100nM、約1 μ M、または約10 μ Mである。インスリン受容体との比較でIGF-IRに結合するタンパク質の選択性関係は、アッセイに依存して測定もしくは算出されるKd、IC50、およびKiを比較することによって表すか、または同じ生化学的または生物学的パラメータ（例えばKd、IC50、およびKi）の比として表すこともできる。そのような比には、好ましくは約100、約1,000、約10,000または約100,000という、インスリン受容体結合または他の測定値とIGF-IR結合または他の測定値との比が含まれる。他のターゲット（特にチロシンキナーゼ受容体）に結合する本発明の他のタンパク質は、好ましくは、本明細書に記載の選択性の指針を使って、インスリン受容体との比較で、所望のターゲット（例えばEGFRまたはHer2）に対して選択的である。

20

【0029】

いくつかの実施形態では、本ポリペプチドが、フィブロネクチンベースのスキファールドタンパク質を含む。いくつかの実施形態では、本ポリペプチドが第10フィブロネクチンタイプIII（¹⁰Fn3）ドメインを含み、その¹⁰Fn3ドメインは、（i）ループAB；ループBC；ループCD；ループDE；ループEF；およびループFGを含み；（ii）ヒト¹⁰Fn3ドメインの対応するループの配列と比較して変化したアミノ酸配列を持つループ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持ち、かつ（iii）ヒトIGF-IRを約1 μ M以下の解離定数で結合する。いくつかの実施形態では、ループBC、DE、およびFGから選択される少なくとも一つのループ中の少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10個のアミノ酸が、野生型配列とは異なるアミノ酸で置換される。いくつかの実施形態では、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10個のアミノ酸を、ループBC、DE、およびFGから選択される少なくとも一つのループから欠失させるか、またはループBC、DE、およびFGから選択される少なくとも一つのループに付加する。いくつかの実施形態では、ループBCおよびループFGが、ヒト¹⁰Fn3ドメインの対応するループの配列と比較して変化したアミノ酸配列を持つ。いくつかの実施形態では、本ポリペプチドが配列番号2～125、184～203、または226のいずれか一つのアミノ酸配列を含む。フィブロネクチンベースのスキファールドによるIGF-IRへの結合が実質的に一価であることは、本発明のこの実施形態および他の実施形態において、IGF-IR活性化を減少させるのに役立つ。

30

40

【0030】

いくつかの実施形態では、本発明のポリペプチドが、さらに、1つ以上の薬物動態（PK）部分を含む。PK部分は、本ポリペプチドの1つ以上の薬物動態特性、例えばバイオアベイラビリティ、血清中半減期、インビボ安定性、および薬物分布などを改善する。いくつかの実施形態では、PK部分が、ポリオキシアルキレン部分、ヒト血清アルブミン結合タ

50

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またはFcフラグメントから選択される。いくつかの実施形態では、PK部分がポリエチレングリコール（PEG）である。いくつかの実施形態では、そのPEG部分が、CysまたはLysアミノ酸を介して、本発明のポリペプチドに共有結合される。いくつかの実施形態では、本発明のポリペプチドが、ヒト血清アルブミン（HSA）を約300nM以下の結合アフィニティーで結合する第2のタンパク質に、少なくとも一つのペプチド結合によって連結される。

【0031】

いくつかの実施形態では、本発明のポリペプチドが、さらに、ヒトタンパク質に結合する第2のドメインを含む。いくつかの実施形態では、そのヒトタンパク質が、EGFR、葉酸受容体、Her2、Her3、c-kit、c-Met、FGFR1、FGFR2、PDGFR、VEGFR1、VEGFR2、VEGF3、Tie2、Ang1、Ang2、FGF（線維芽細胞成長因子）、EGF（上皮成長因子）、HGF（肝細胞増殖因子）、VEGF-A（血管内皮増殖因子A）、VEGF-C、およびVEGF-Dから選択される。いくつかの実施形態では、ヒトタンパク質がIGF-IRである。いくつかの実施形態では、ヒトタンパク質がチロシン受容体である。いくつかの実施形態では、第2ドメインが約1μM以下、約10nM以下、または約1nM以下の解離定数で、ヒトタンパク質に結合する。いくつかの実施形態では、第2ドメインが約1μM以下、約10nM以下、または約1nM以下の解離定数でVEGFR2に結合し、約1μM、10μM、または10μM以上の解離定数でVEGFR1に結合する。

【0032】

いくつかの実施形態では、本ポリペプチドが第1および第2タンパク質を含み、一方または両方のタンパク質が単鎖抗体であって、第1および第2タンパク質がPEG部分を介して連結される。いくつかの実施形態では、第1タンパク質がIGF-IRを結合する。

【0033】

いくつかの実施形態では、第2ドメインが、約50kDa未満の抗体部分；リポカリンの誘導体；テトラネクチン（tetranectin）の誘導体；アビマー（avimer）；アンキリンの誘導体、および第2の第10フィブロネクチンタイプIII（¹⁰F_n3）ドメイン（この場合、第2の¹⁰F_n3ドメインはループAB；ループBC；ループCD；ループDE；およびループFGを含み；ヒト¹⁰F_n3ドメインの対応するループの配列と比較してランダム化されたアミノ酸配列を持つループ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持ち、かつヒト¹⁰F_n3ドメインによって結合されないヒトタンパク質を約10nM以下の解離定数で結合する）から選択される。いくつかの実施形態では、第2ドメインが¹⁰F_n3ドメインであり、配列番号2～203、または226のいずれか一つのアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、本発明のポリペプチドと第2ドメインとが、少なくとも一つのジスルフィド結合、ペプチド結合、ポリペプチド、ポリマー糖、またはポリエチレングリコール（PEG）部分を介して、作動的に連結される。いくつかの実施形態では、そのPEGが約0.5kDa～約100kDaである。

【0034】

本発明のいくつかの実施形態では、本発明のポリペプチドがポリペプチドを介して連結された第1および第2タンパク質を含み、その第1もしくは第2タンパク質またはポリペプチドリンカーが、血中またはターゲット組織中のプロテアーゼによって切断されうるプロテアーゼ部位を持つ。このような実施形態は、そのようなタンパク質を別々の生成させる場合と比較して送達特性もしくは治療特性または生成効率を向上させる目的で、2つ以上の治療薬タンパク質を遊離させるために使用することができる。

【0035】

いくつかの実施形態では、第1タンパク質と第2タンパク質とが、ポリマー糖などの生体適合性ポリマーを使って連結される。そのようなポリマー糖は、血中またはターゲット組織中の酵素によって切断されうる酵素切断部位を含むことができる。このような実施形態は、そのようなタンパク質を別々の生成させる場合と比較して送達特性もしくは治療特性または生成効率を向上させる目的で、2つ以上の治療薬タンパク質を遊離させるために使用することができる。

【0036】

本発明のもう一つの態様は、多機能タンパク質を創製するために、ポリマーを介して、

10

20

30

40

50

1つ以上の本発明のタンパク質または本明細書に記載する他のタンパク質を、本発明のタンパク質治療薬が作製されるように作動的に連結することである。例えば、そのポリマーはポリペプチド、ポリマー糖、炭素系ポリマー（例えば脂肪族鎖）またはPEGでありうる。本発明のさらにもう一つの態様には、本明細書に記載するようにIGF-IRを結合する本発明のタンパク質を、PEGを使って、もう一つのタンパク質、例えばFab、単鎖Ab、ドメイン抗体、ラクダ抗体およびそれらの誘導体（特に約50kDa未満の実体）、抗体部分（例えば約50kDa未満）、アドテイン（Adtein）（例えば、ターゲットを望ましい特異性で結合すると共に、本明細書に記載する薬学的または生化学的性質（特にチロシンキナーゼ受容体に関するもの）の1つ以上を持つ5～40kDaのタンパク質）、フィブロネクチンベースのスキファールドタンパク質（例えばAdnectin（商標））、または抗体代替物、例えばアビマー（Avimer）、マイクロボディ、Trans-body（商標）、Affibody（商標）、Affilin（商標）、またはトリネクチン（trinectin）類（例えばテトラネクチン類）およびリボカリンまたはアンキリン（DAPPin）のようなタンパク質の他の誘導体に連結することが含まれる。いくつかの実施形態では、第1および第2の連結されたタンパク質が、全体として、1個または0個のジスルフィド結合を持つ。細胞ベースの系におけるタンパク質産生を改善するには、これが望ましいだろう。好ましくは、前記第1タンパク質が、IGF-IRに対して実質上一価の結合を持つ実質上単一のドメインである。細胞ベースの系におけるタンパク質産生を改善するには、これが望ましいだろう。好ましくは、前記第1タンパク質がヒトIGF-IRを約100pM以下の結合アフィニティーで結合し、ヒトIGF-IRに対する前記第1タンパク質の結合に参加する少なくとも2つの構造ループを持つ。好ましくは、前記第2タンパク質が、少なくとも一つのペプチド結合によって前記第1タンパク質に連結されたフィブロネクチンベースのスキファールドタンパク質である。いくつかの実施形態では、前記第1タンパク質と第2タンパク質とが、少なくとも一つのジスルフィド結合によって連結される。これは、細胞内で達成することもできるが、この連結は細胞を使わずにインビトロで行うことが望ましいだろう。本発明のポリペプチドは、ヒトIGF-IRを約300pM以下の結合アフィニティーで結合する第1タンパク質であって、ヒトIGF-IRへの当該第1タンパク質の結合に参加する少なくとも二つの構造ループを持つ第1タンパク質を含みうる。好ましくは、前記第1タンパク質はヒトIGF-IRを約1nM以下の結合アフィニティーで結合し、ヒトインスリン受容体を約1 μ M以上の結合アフィニティーで結合する。好ましくは、本発明のポリペプチドは、さらに、前記第1タンパク質または前記第2タンパク質に作動的に連結されたPEG部分を含む。好ましくは、前記第2タンパク質が、ヒトがんにおいてアップレギュレートされるヒトチロシンキナーゼ受容体を結合し、この場合、前記第2タンパク質は、ヒトチロシンキナーゼ受容体を約10nM以下の結合アフィニティーで結合し、かつヒトインスリン受容体を約1 μ M以上の結合アフィニティーで結合する。

【0037】

いくつかの実施形態では、本発明のポリペプチドが、全体として少なくとも6個のジスルフィド結合を持つか、あるいはもう一つの態様として、全体として少なくとも8個のジスルフィド結合を持つ、第1タンパク質および前記第2タンパク質を含みうる。好ましくは、前記第1タンパク質および前記第2タンパク質は、微生物から発現される単一ポリペプチドである。好ましくは、前記第1タンパク質はヒトIGF-IRを約100pM以下の結合アフィニティーで結合し、ヒトIGF-IRへの前記第1タンパク質の結合に参加する少なくとも2つの構造ループを持つ。いくつかの実施形態では、前記第1タンパク質および前記第2タンパク質の少なくとも一方が抗体部分である。好ましくは、そのような抗体部分が約50kDa未満であるか、もう一つの態様として、約40kDa未満である。いくつかの実施形態では、抗体部分が単鎖抗体部分である。タンパク質治療薬には、前記第2タンパク質が、以下に挙げるヒトタンパク質：EGFR、葉酸受容体、Her2、Her3、c-kit、c-Met、FGFR1、FGFR2、PDGFR、V EGFR1、VEGFR2、VEGF3、およびTie2；ならびにリガンド：Ang1、Ang2、FGF、EGF、HGF、幹細胞因子（SCF）、VEGF-A、VEGF-C、およびVEGF-Dの一つを結合する実施形態が含まれる。いくつかの実施形態では、第1タンパク質および/または第2タンパク質がリボカリンの誘導体である。いくつかの実施形態では、前記第1タンパク質および前記第2タンパク質

の少なくとも一方がテトラネクチンの誘導体である。いくつかの実施形態では、前記第1タンパク質部分および前記第2タンパク質部分の少なくとも一方がアビマーの誘導体である。

【0038】

PEGは、本発明の多くの態様において使用することができ、望ましい治療効果または他のインビボ効果（例えばイメージング）を得るために、本明細書に記載するように、さまざまなサイズを使用することができる。体内、血中、血液以外の細胞外液または組織における半減期を増加させるには、大きいPEGが好ましい。インビボ細胞活性には、約10～60kDaの範囲のPEGが、約100kDa未満、より好ましくは約60kDa未満のPEGと共に好ましいが、約100kDaより大きいサイズも同様に使用することができる。インビボイメージング応用には、より迅速な分布とより短い半減期が可能になるように、大きいPEGほどには半減期を増加させない小さいPEG（一般に約20kDa未満のもの）を使用することができる。

10

【0039】

いくつかの実施形態では、本発明のポリペプチドが、単一のCysまたはLysを介してPEGに作動的に連結された第1タンパク質および第2タンパク質を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも第1または第2タンパク質が、1個を超えるCysまたはLysを持たない。いくつかの実施形態では、上記単一のCysまたはLysが、前記第1または第2タンパク質において、そのアミノ酸配列中の非野生型である場所に位置する。

【0040】

いくつかの実施形態では、本発明のポリペプチドが第1および第2タンパク質を含み、前記第1タンパク質は細胞増殖を阻害し、少なくとも55 のT_mを持つと共に、そのアミノ酸配列の中のヒトIGF-IRへの結合を実質的に妨害しない領域に非野生型のCysまたはLysを持つ。いくつかの実施形態では、第1タンパク質および第2タンパク質が微生物から発現される単一ポリペプチドである。いくつかの実施形態では、第1タンパク質がヒトIGF-IRを約50pM以下の結合アフィニティで結合し、ヒトIGF-IRへの前記第1タンパク質の結合に参加する少なくとも2つの構造ループを持つ。いくつかの実施形態では、本発明のポリペプチドが、IV投与時に少なくとも1日のインビボ半減期を持つ。いくつかの実施形態では、本発明のポリペプチドが、投与後の齧歯類で24時間にわたって、ヒトIGF-IRに対する前記第1タンパク質の結合アフィニティの少なくとも約10倍という濃度の曝露レベルを持つ。いくつかの実施形態では、本発明のポリペプチドが、皮下投与後の齧歯類で24時間にわたって、ヒトIGF-IRに対する前記第1タンパク質の結合アフィニティの少なくとも約100倍という濃度の曝露レベルを持つ。いくつかの実施形態では、第1または第2タンパク質がフィブロネクチンベースのスクヤフォールドタンパク質である。

20

30

【0041】

IGF-IR、他のヒトタンパク質、またはPK部分に対する本発明のポリペプチドのさまざまなアフィニティは、診断的応用、治療的応用、インビトロ応用またはインビボ応用に応じて使用することができる。例えば、約1μM、約100nM、約10nM、約1nM、約100pM、約10pM、約1pMまたは約100fMと同等かそれ未満の解離定数を持つアフィニティが、とりわけIGF-IRについては好ましい。所望のターゲットに対して異なるアフィニティを持つ本発明のタンパク質のインビボ試験は、インビボ応用にとって望ましいアフィニティを選択するのに役立つ。インビトロ試験では、他のタンパク質の存在およびIGF-IRの量に応じて、一般に、インビボ応用とは異なるアフィニティを持つ本発明のタンパク質を使用することができる。多くの場合、インビトロでは、より低いアフィニティまたはより弱い結合を使用することができる。

40

【0042】

いくつかの実施形態において、本ポリペプチドは、a) それぞれがヒト¹⁰F_n3ドメインコード配列とは異なる候補第10フィブロネクチンタイプIII（¹⁰F_n3）ドメイン配列を含む候補RNA分子の集団（このRNA分子はそれぞれが前記候補¹⁰F_n3ドメインコード配列に作動的に連結された翻訳開始配列および開始コドンを含み、かつそれぞれがその3'末端で核酸-ピュロマイシンリンカーに作動的に連結されている）を作製するステップ；b) 前記候

50

補¹⁰F_n3ドメインコード配列をインビトロ翻訳して候補RNA-¹⁰F_n3融合物の集団を産生させるステップ；c) 候補RNA-F_n3融合物の前記集団をIGF-IRと接触させるステップ；およびd) IGF-IRに対する結合アフィニティーまたは特異性が、IGF-IRに対する前記ヒト¹⁰F_n3の結合アフィニティーまたは特異性と比較して、変化しているタンパク質部分を持つRNA-¹⁰F_n3融合物を選択するステップを含む方法によって選択される、¹⁰F_n3ドメインである。

【0043】

本発明の一態様は、ヒトターゲットに結合するフィブロネクチンベースのスカフォールドタンパク質を含むポリペプチドに関する。いくつかの実施形態では、ポリペプチドがさらに、本明細書で説明するPK部分を含む。PK部分は、任意の適切なリンカー（例えば本明細書に記載するもの）によって、フィブロネクチンベースのスカフォールドタンパク質に連結することができる。

10

【0044】

本発明の一態様では、例えば血清、インスリン様成長因子Iおよびインスリン様成長因子IIなどの成長刺激物質の存在下で、がん細胞の成長を約80%以上阻害する能力を持つ本発明のポリペプチドが得られる。

【0045】

本発明のさらにもう一つの態様では、本発明のポリペプチドを含む薬学的に許容できる組成物が得られ、その組成物は本質的にエンドトキシフリーである。好ましくは、本組成物は微生物汚染が実質的にないため、インビボ投与に適している。本組成物は、例えばIV、IPまたは皮下投与用に製剤化することができる。

20

【0046】

本発明のもう一つの態様では、1つ以上の本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む細胞が得られる。そ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包含される。配列は、好ましくは、使用する細胞タイプにおける発現量が最大になるように最適化される。好ましくは、発現は大腸菌で行われる。本発明のタンパク質は、例えば、酵母（例えばピキアまたはセレビスエ（*cervaisea*））または藍藻類を含む真核微生物でも発現させることができる。本明細書に記載のどのタンパク質でも望ましいグリコシル化が起こるように、酵母細胞を改変することができる。本発明の細胞は哺乳動物細胞であることができる。ある態様では、本明細書に記載のどのタンパク質でも、望ましい糖鎖付加が起こるように、哺乳動物細胞を改変することができる。ある態様では、細胞がフィブロネクチンベースのスカフォールドタンパク質を発現させる。ある態様では、フィブロネクチンベースのスカフォールドタンパク質をコードするポリヌクレオチドに、選択した細胞タイプにおける発現に関して、コドン最適化が行われる。

30

【0047】

本発明の一態様は、本発明の新規ポリペプチドを単独で、または他の細胞毒性剤もしくは治療剤と組み合わせて投与することによって、がんを持つ対象を処置するための方法を提供する。がんは、例えば乳がん、大腸がん、卵巣癌、骨肉腫、子宮頸がん、前立腺がん、肺がん、滑膜癌（*synovial carcinoma*）、膀胱がん、または今後決定される他のがんであって、非腫瘍形成細胞と比較してIGF-IRレベルが上昇し、アップレギュレートされ、変異し、またはその生理機能が変化するものの1つ以上であることができる。

40

【0048】

本発明のもう一つの態様は、本発明のポリペプチドを単独で、または他の細胞毒性剤もしくは治療剤と組み合わせて投与することによって、がんを持つ対象を処置するための方法を提供する。特に、好ましい細胞毒性剤および治療剤には、ドセタキセル、パクリタキセル、ドキソルビシン、エピルビシン、シクロホスファミド、トラスツズマブ、カベシタピン、タモキシフェン、トレミフェン、レトロゾール、アナストロゾール、フルベストラント、エクセメスタン、ゴセレリン、オキサリプラチン、カルボプラチン、シスプラチン、デキサメタゾン、アンチド、ベバシズマブ、5-フルオロウラシル、ロイコボリン、レバミゾール、イリノテカン、エトポシド、トポテカン、ゲムシタピン、ビンORELビン、エストラムスチン、ミトキサントロン、アバレリックス、ゾレドロン酸、ストレプトゾシン

50

、リツキシマブ、イダルビシン、ブスルファン、クロラムブシル、フルダラビン、イマチニブ、シタラビン、イブリットモマブ、トシツモマブ、インターフェロン -2b、メルファラン (melphalam)、ボルテゾミブ、アルトレタミン、アスパラギナーゼ、ゲフィチニブ、エルロニチブ (erlonitib)、抗EGF受容体抗体 (例えばセツキシマブまたはパニツムマブ)、イクサベピロン、およびエポチロンまたはその誘導体などがある。より好ましくは、治療剤が、白金剤 (例えばカルボプラチン、オキサリプラチン、シスプラチン)、タキサン (例えばパクリタキセル、ドセタキセル)、ゲムシタビン、またはカンプトテシンである。

【0049】

また、本発明のポリペプチドを第2の治療用タンパク質と単一分子として組み合わせるか、あるいは単一分子として第3の治療用タンパク質と組み合わせることが好ましいかもしれない。そのような治療物質は、PEGまたは他のポリマー (例えばCys-Cysジスルフィドまたはポリペプチド) によって1つ以上の治療用タンパク質に連結された本発明のタンパク質を含む。そのような治療用タンパク質には、抗体誘導体 (例えばFab、ラクダ抗体およびそれらの誘導体、ドメイン抗体 (例えばサイズが約50kD未満のもの) および単鎖抗体 (好ましくはサイズが約50kDa未満のもの)、Adnectin (商標) および好ましくは約5~約40kDaの範囲にあるタンパク質が含まれる。

【0050】

本発明のタンパク質のターゲットには、特にヒト型の、ただし場合によってはマウス、ラット、サルおよびイヌなどのモデル種の、IGF-1R、FGFR1、FGFR2、FGFR3、FGFR4、c-Kit、ヒトp185受容体様チロシンキナーゼ (HER2またはHer2)、Her3、c-Met、葉酸受容体、PDGFR、VEGFR1、VEGFR2、VEGFR3、ヒト血管内皮増殖因子 (VEGF) A、VEGF C、VEGF D、ヒトCD20、ヒトCD18、ヒトCD11a、ヒトアポトーシス受容体2 (Apo-2)、ヒト 4-7インテグリン、ヒトGPIIb-IIIaインテグリン、幹細胞因子 (SCF)、ヒト上皮成長因子受容体 (EGFR)、およびヒトCD3が含まれる。また、本発明の諸態様には、第1ターゲットと少なくとも一つの他のターゲットとを結合する多機能タンパク質が含まれる。好ましくは、そのようなタンパク質は本明細書に記載のPEG関連発明によって連結されるが、多くの実施形態では、そのようなタンパク質をポリペプチドもしくは他のポリマーリンカーまたは非ポリマーリンカーによって連結することができる。

【0051】

安定に連結された本発明のタンパク質は、がんの治療的処置に役立ちうる。本発明の多重特異性タンパク質には、2つ、3つ、4つまたはそれ以上の治療ターゲットまたはエピトープに向けられる場合に、2つ以上の治療ターゲットを調整、遮断または阻害するという利点がある。

【0052】

任意の腫瘍タイプおよび任意の腫瘍抗原タイプを、治療薬の対応するバイオロジーで、ターゲットにすることができると考えられる。がんは、例えば乳がん、大腸がん、卵巣癌、骨肉腫、子宮頸がん、前立腺がん、肺がん、滑膜癌、膵がん、黒色腫、多発性骨髄腫、神経芽細胞腫、および横紋筋肉腫、または今後決定される他のがんであって、非腫瘍形成細胞と比較してIGF-1Rレベルが上昇し、アップレギュレートされ、変異し、その生理機能が変化するものの1つ以上であることができる。

【0053】

ターゲットになりうる他の典型的腫瘍タイプには、急性リンパ芽球性白血病、急性骨髄性白血病、胆道がん、乳がん、子宮頸がん、慢性リンパ球性白血病、慢性骨髄性白血病、直腸結腸がん、子宮内膜がん、食道がん、胃がん、頭頸部がん、ホジキンリンパ腫、肺がん、甲状腺髄様がん、非ホジキンリンパ腫、多発性骨髄腫、腎がん、卵巣がん、膵がん、神経膠腫、黒色腫、肝がん、前立腺がん、および膀胱がんなどがある。

【0054】

さらにまた、腫瘍関連ターゲットを、本発明のポリペプチドのターゲットにすることもできる。いくつかの実施形態では、抗原ターゲティングが、組織分布という観点から、ま

10

20

30

40

50

たはその組織タイプもしくは所望の細胞タイプにおける増加した局所濃度効果という観点から、治療薬を局在化させるのに役立つだろう。あるいは、それは、作製される治療薬が標的とする本明細書に記載のターゲットの一つと共に、がんと闘うためのもう一つの作用機序を提供しうる。そのような抗原またはターゲットには、例えば限定するわけではないが、炭酸脱水酵素IX、A3、A33抗体に特異的な抗原、BrE3抗原、CD1、CD1a、CD3、CD5、CD15、CD16、CD19、CD20、CD21、CD22、CD23、CD25、CD30、CD45、CD74、CD79a、CD80、HLA-DR、NCA95、NCA90、HCGおよびそのサブユニット、CEA (CEACAM-5)、CEACAM-6、CSAp、EGFR、EGP-1、EGP-2、Ep-CAM、Ba733、HER2/neu、低酸素誘導因子 (HIF)、KC4抗原、KS-1抗原、KS1-4、Le-Y、マクロファージ阻害因子 (macrophage inhibition factor : MIF)、MAGE、MUC1、MUC2、MUC3、MUC4、PAM-4抗原、PSA、PSMA、RS5、S100、TAG-72、p53、テネイシン、IL-6、IL-8、インスリン成長因子I (IGF-I)、インスリン成長因子II (IGF-II)、Tn抗原、トムソン・フリーデンライヒ (Thomson-Friedenreich) 抗原、腫瘍壊死抗原、胎盤増殖因子 (PlGF)、17-1A抗原、血管新生マーカー (例えばED-Bフィブロネクチン)、がん遺伝子マーカー、がん遺伝子産物、および他の腫瘍関連抗原などがある。腫瘍関連抗原に関する最近の報文には、Mizukamiら (2005, Nature Med. 11:992-97) ; Hatfieldら (2005, Curr. Cancer Drug Targets 5:229-48) ; Vallbohmerら (2005, J. Clin. Oncol. 23:3536-44) ; およびRenら (2005, Ann. Surg. 242:55-63) などがあり、これらはそれぞれ参照により本明細書に組み込まれる。

【0055】

他の実施形態では、抗血管新生剤が治療薬の一部を形成し、本発明のタンパク質に作動的に連結されうる。有用な典型的抗血管新生剤には、アンジオスタチン、バキュロスタチン (baculostatin)、カンスタチン、マスピン、抗VEGF抗体またはペプチド、抗胎盤成長因子抗体またはペプチド、抗Flk-1抗体、抗Flt-1抗体またはペプチド、ラミニンペプチド、フィブロネクチンペプチド、プラスミノゲンアクチベーターインヒビター、組織メタロプロテイナーゼインヒビター、インターフェロン、インターロイキン12、IP-10、Gro-、トロンボスポンジン、2-メトキシエストラジオール、プロリフェリン関連タンパク質、カルボキシアミドトリアゾール、CM101、マリマスタット、ペントサンポリ硫酸、アンジオポエチン2、インターフェロン-、ハービマイシンA、PNU145156E、16Kプロラクチンフラグメント、リノマイド (Linomide)、サリドマイド、ペントキシフィリン、ゲニステイン、TNP-470、エンドスタチン、パクリタキセル、アキュチン (accutin)、アンジオスタチン、シドフォビル、ピンクリスチン、ブレオマイシン、AGM-1470、血小板因子4またはミノサイクリンなどがある。

【0056】

本発明のもう一つの態様は、本明細書に記載する要素の1つ以上とそれらの要素の使用に関する指示とを含むキットを提供する。好ましい実施形態では、本発明のキットは、本発明のタンパク質を単独で、または第2の治療薬と共に含む。この好ましい実施形態に関する指示には、本発明のタンパク質を単独でまたは第2の治療剤と共に使ってがん細胞の成長を阻害するための指示、および/またはそれを使ってがんを持つ患者を処置する方法に関する指示が含まれる。

【0057】

本発明のもう一つの態様は、ヒトIGF-IRを特異的に結合する第1タンパク質 (ここに、前記第1タンパク質は分子量が約4kD ~ 約40kDであり、ヒトIGF IまたはIGF IIに対して約30パーセント未満のアミノ酸一致度を持ち、微生物汚染が実質的にないためインビボ投与に適している) を含むタンパク質ベースの組成物を提供する。いくつかの実施形態では、本組成物が、さらに、例えばPEGまたはヒト血清アルブミンを結合するタンパク質などといったPK部分を含む。いくつかの実施形態では、第1タンパク質がヒトIGF-IRに対して約1nM以下の解離定数を持つ。いくつかの実施形態では、本組成物がIGF-IRへのIGF-IまたはIGF-IIの結合を遮断する。

【0058】

本発明のもう一つの態様は、ヒトIGF-IRを約10nM以下の結合アフィニティーで結合し、

10

20

30

40

50

かつヒトインスリン受容体を約 $1\mu\text{M}$ 以上の結合アフィニティーで結合する第1タンパク質（ここに、前記第1タンパク質は、ヒトIGF-IRに関して実質上一価の結合を持つ実質上単一のドメインであり、微生物汚染が実質的にないためインビボ投与に適している）を含むタンパク質ベースの組成物を提供する。いくつかの実施形態では、本組成物が、さらに、前記第1タンパク質にペプチド結合によって連結された第2タンパク質を含み、前記第2タンパク質はヒトIGF-IRを約 10nM 以下の結合アフィニティーで結合し、かつヒトインスリン受容体を約 $1\mu\text{M}$ 以上の結合アフィニティーで結合する。いくつかの実施形態では、本組成物が、さらに、少なくとも一つのペプチド結合によって前記第1タンパク質に連結された第2タンパク質を含み、前記第2タンパク質はヒト血清アルブミンを約 300nM 以下の結合アフィニティーで結合する。いくつかの実施形態では、本組成物が、さらに、PEGによって前記第1タンパク質に連結された第2タンパク質を含み、前記第2タンパク質がヒトIGF-IRを約 10nM 以下の結合アフィニティーで結合し、かつヒトインスリン受容体を約 $1\mu\text{M}$ 以上の結合アフィニティーで結合する。いくつかの実施形態では、第1または第2タンパク質が、フィブロネクチンベースのスカフォールドタンパク質を含む。

10

【0059】

本発明のもう一つの態様は、ヒトIGF-IRを約 100nM の結合アフィニティーで結合する第1タンパク質とヒトタンパク質を結合する第2タンパク質とに連結された第1PEGを含むPEGベースの組成物であって、前記PEGは約 0.5kD ～約 100kD であり、前記組成物は遊離のPEGを実質的に含まず、かつ微生物汚染が実質的にないためインビボ投与に適しているものを提供する。いくつかの実施形態では、第2タンパク質が、少なくとも一つのヒトチロシン受容体または少なくとも一つのヒトチロシン受容体リガンドを約 1nM 以下の結合アフィニティーで結合し、かつヒトインスリン受容体を約 $1\mu\text{M}$ 以上の結合アフィニティーで結合する。いくつかの実施形態では、一方または両方のタンパク質がフィブロネクチンベースのスカフォールドタンパク質である。

20

【0060】

本発明のもう一つの態様は、ヒトタンパク質を結合する第2タンパク質に作動的に連結されたヒトIGF-IRを結合する第1タンパク質を含む、タンパク質ベースの組成物であって、前記第1タンパク質はヒトIGF-IRを約 10nM 以下の結合アフィニティーで結合すると共にヒトインスリン受容体を約 $1\mu\text{M}$ 以上の結合アフィニティーで結合し、微生物汚染が実質的にないためインビボ投与に適しているものを提供する。いくつかの実施形態では、本タンパク質ベースの組成物が、さらに、前記第1タンパク質または前記第2タンパク質に作動的に連結されたPEG部分を含む。いくつかの実施形態では、第2タンパク質がヒトがんにおいてアップレギュレートされるヒトチロシンキナーゼ受容体を結合し、前記第2タンパク質は、そのヒトチロシンキナーゼ受容体を約 10nM 以下の結合アフィニティーで結合し、かつヒトインスリン受容体を約 $1\mu\text{M}$ 以上の結合アフィニティーで結合する。

30

【0061】

本発明のもう一つの態様は、ヒト治療ターゲットを結合する第2タンパク質部分に作動的に連結されたヒトIGF-IRを結合する第1タンパク質部分を含むタンパク質治療薬であって、前記第1タンパク質がヒトIGF-IRを約 10nM 以下の結合アフィニティーで結合すると共に、ヒトインスリン受容体を約 $1\mu\text{M}$ 以上の結合アフィニティーで結合し、かつ微生物汚染が実質的にないためインビボ投与に適しており、さらに前記第2タンパク質がヒト治療ターゲットを約 10nM 以下の結合アフィニティーで結合すると共に、ヒトインスリン受容体を約 $1\mu\text{M}$ 以上の結合アフィニティーで結合し、かつ微生物汚染が実質的にないためインビボ投与に適しているものを提供する。いくつかの実施形態では、第1タンパク質および第2タンパク質が微生物から発現される単一ポリペプチドである。

40

【0062】

本発明のもう一つの態様は、ヒト治療ターゲットを結合する第2タンパク質部分に作動的に連結されたPEGに作動的に連結されたヒトIGF-IRを結合する第1タンパク質部分を含むタンパク質治療薬であって、前記第1タンパク質部分がヒトIGF-IRを約 10nM 以下の結合アフィニティーで結合すると共にヒトインスリン受容体を約 $1\mu\text{M}$ 以上の結合アフィニティー

50

で結合し、かつ微生物汚染が実質的にないためインビボ投与に適しており、さらに前記第2タンパク質部分がヒト治療ターゲットを約10nM以下の結合アフィニティーで結合すると共にヒトインスリン受容体を約1 μ M以上の結合アフィニティーで結合し、かつ微生物汚染が実質的にないためインビボ投与に適しているものを提供する。いくつかの実施形態では、第1タンパク質部分および第2タンパク質部分が全体として少なくとも6個のジスルフィド結合を持つ。

【0063】

本発明のもう一つの態様は、ヒト治療ターゲットを結合する第2タンパク質部分に作動的に連結されたPEGに作動的に連結されたヒトIGF-IRを結合する第1タンパク質部分を含むタンパク質治療薬であって、前記第1タンパク質部分がヒトIGF-IRを約10nM以下の結合アフィニティーで結合すると共にヒトインスリン受容体を約1 μ M以上の結合アフィニティーで結合し、ヒトIGF-IRに関する結合が実質的に一価であり、かつ微生物汚染が実質的にないためインビボ投与に適しており、さらに前記第2タンパク質部分がヒト治療ターゲットを約10nM以下の結合アフィニティーで結合すると共にヒトインスリン受容体を約1 μ M以上の結合アフィニティーで結合し、かつ微生物汚染が実質的にないためインビボ投与に適しているものを提供する。

【0064】

本発明のもう一つの態様は、ヒト治療ターゲットを結合する第2タンパク質部分に作動的に連結された生体適合性ポリマーに作動的に連結されたヒトIGF-IRを結合する第1タンパク質部分を含むタンパク質治療薬であって、前記第1タンパク質部分がヒトIGF-IRを約10nM以下の結合アフィニティーで結合すると共にヒトインスリン受容体を約1 μ M以上の結合アフィニティーで結合し、かつ微生物汚染が実質的にないためインビボ投与に適しており、さらに前記第2タンパク質部分がヒト治療ターゲットを約10nM以下の結合アフィニティーで結合すると共にヒトインスリン受容体を約1 μ M以上の結合アフィニティーで結合し、微生物汚染が実質的にないためインビボ投与に適しており、さらに前記第1タンパク質部分および第2タンパク質部分が、それぞれのターゲットに対して、非治療的効果が最小限に抑えられかつ2つ以上の治療ターゲットに結合することの治療利益が最大になるように最適化されたアフィニティーを持つものを提供する。いくつかの実施形態では、ポリペプチドが血中またはターゲット組織中のプロテアーゼによって切断されうるプロテアーゼ部位を持つ。

【0065】

本発明のもう一つの態様は、ヒトタンパク質を結合する第2タンパク質に作動的に連結されたPEGに作動的に連結されたヒトIGF-IRを結合する第1タンパク質を含むタンパク質治療薬であって、前記第1タンパク質がヒトIGF-IRを約10nM以下の結合アフィニティーで結合すると共にヒトインスリン受容体を約1 μ M以上の結合アフィニティーで結合し、かつヒトIGF-IRのアンタゴニストであって、微生物汚染が実質的にないためインビボ投与に適しており、さらに前記第2タンパク質がヒト治療ターゲットを約10nM以下の結合アフィニティーで結合すると共にヒトインスリン受容体を約1 μ M以上の結合アフィニティーで結合し、かつ微生物汚染が実質的にないためインビボ投与に適しているものを提供する。いくつかの実施形態では、第1タンパク質が細胞増殖を阻害し、少なくとも55 のTmを持ち、ヒトIGF-IRへの結合を実質的に妨害しないそのアミノ酸配列中の領域に非野生型のcysまたはlysを持つ。いくつかの実施形態では、本タンパク質治療薬がIV投与時にインビボで少なくとも1日の半減期を持つ。いくつかの実施形態では、本タンパク質治療薬が、投与後の齧歯類で24時間にわたって、ヒトIGF-IRに対する前記第1タンパク質の結合アフィニティーの少なくとも約10倍という濃度の曝露レベルを持つ。いくつかの実施形態では、第1および/または第2タンパク質がフィブロネクチンベースのスカフォールドである。

【0066】

本発明のもう一つの態様は、本明細書に記載の1つ以上のタンパク質をコードするポリヌクレオチドを含む細胞を提供する。いくつかの実施形態では、細胞が、本明細書に記載のどのタンパク質でも望ましい糖鎖付加が起こるように改変された酵母である。いくつか

10

20

30

40

50

の実施形態では、細胞が藍藻類である。いくつかの実施形態では、細胞が、本明細書に記載のどのタンパク質でも望ましい糖鎖付加が起こるように改変された哺乳動物細胞である。いくつかの実施形態では、タンパク質がフィブロネクチンベースのスクャフォールドであり、場合によっては、ある細胞での発現に関してコドン最適化が行われたポリヌクレオチドを持つ。

【図面の簡単な説明】

【0067】

【図1】ヒトIGF-IR結合クロンの単離に関する選択プロファイル。ランダムフィブロネクチンスクャフォールドドメインタンパク質のライブラリーを使ったPROfusion実験の過程で起こるIGF-IR結合パーセントの増加を表すグラフが図示されている。1兆個のmRNA/cDNA-タンパク質融合物のライブラリーを、溶解した100nMビオチン化IGF-IRに結合させ、ストレプトアビジン被覆磁気ビーズ上に捕捉した。cDNAを溶出させ、PCRで増幅し、それを使って、新しいmRNA/cDNA-タンパク質融合物のライブラリーを作成した。5ラウンドのPROfusionをこの方法で行い、IGF-IRに結合するライブラリーのパーセンテージを定量PCRによってモニターした。

10

【図2】ヒトIGF-IR競合クロンのSDS PAGE。実施例35に記載のHTPPによって精製されたヒトIGF-IR競合アドネクチン(Adnectin)を示すSDS PAGEゲルが図示されている。試料を10%NuPAGEミニゲルにのせ、シプロオレンジ(Sypro-orange)を使って染色する。

【図3】ヒトIGF-IR競合クロン218C04の精製ステップのSDS PAGE。実施例35に記載するヒトIGF-IR競合フィブロネクチンスクャフォールドドメインタンパク質(この例ではリードクローン218C04)の典型的な中規模精製と最終産物の品質を示すSDS PAGEゲル。試料を10%NuPAGEミニゲルにのせ、シプロオレンジを使って染色する。

20

【図4】ヒトIGF-IR競合クロン218C04のサイズ排除クロマトグラフィー。代表的なヒトIGF-IR競合フィブロネクチンスクャフォールドドメインタンパク質リード(具体的にはクローン218C04)のサイズ排除クロマトグラム。このクロマトグラフィーの詳細は実施例35で説明する。蛍光検出を使用した。

【図5】ヒトIGF-IR競合クロン218C04の最適化。ヒトIGF-IRフィブロネクチンスクャフォールドドメインタンパク質リード(この例ではクローン218C04)に関する典型的な最適化ステップを表す図。図5aは、クローン218C04にそれぞれ由来する1つのループのランダム化によって得られる3つのライブラリーから得られた結果を示す。1兆個のmRNA/cDNA-タンパク質融合物のライブラリーを、溶解した100nMビオチン化IGF-IRに結合させ、ストレプトアビジン被覆磁気ビーズ上に捕捉した。cDNAを溶出させ、PCRで増幅し、それを使って、新しいmRNA/cDNA-タンパク質融合物のライブラリーを作成した。ライブラリー構築とアフィニティー選択の過程を、IGF-IRに結合されるパーセンテージが定量PCRで測定して1%を超えるまで繰り返した。この時点で、最適化されたループを増幅し、それらを組み換えて、3つの最適化ループの全てを含有する単一のライブラリーを作成した(図5b)。このライブラリーのmRNA/cDNA-タンパク質融合物をIGF-IR被覆ビーズ上に捕捉し、次に1nMビオチン化IGF-IRを使って3ラウンドのPROfusionを行った。いずれの場合も、結合パーセンテージを定量PCRによって測定した(図5c)。

30

【図6】クローン218C04最適化クロンのIGF-I/IGF-IR競合アッセイ。実施例35に記載の競合ELISAにおいて、IGF-IとIGF-IRの間の相互作用を阻害する能力が改善されている、最適化されたフィブロネクチンスクャフォールドドメインタンパク質の例を示すグラフ。

40

【図7】選ばれたクローン218C04最適化精製IGF-IRクロンのSDS-PAGE。リードの最適化によって誘導され、実施例35に記載のHTPPによって精製された、改良型ヒトIGF-IR競合アドネクチンを示すSDS PAGEゲルが図示されている。試料を10%NuPAGEミニゲルにのせ、シプロオレンジを使って染色する。

【図8】最適化された競合IGF-IRクローン338A06の示差走査熱量測定。代表的なIGF-IR最適化クローン(この例ではクローン338A06)の示差走査熱量測定(DSC)。黒い軌跡は生データであり、赤い軌跡はフィットである。DSCは実施例35で説明するように行った。

【図9】最適化されたIGF-IR競合クローン338A06のSEC。最適化プロセスによって誘導さ

50

れた代表的ヒトIGF-IR競合フィブロネクチンスクヤフォールドドメインタンパク質（具体的にはクローン338A06）のサイズ排除クロマトグラム。このクロマトグラフィーの詳細は実施例35で説明する。蛍光検出を使用した。

【図10】最適化されたIGF-IR競合クローン338A06のSEC MALLS。フィブロネクチンスクヤフォールドドメインタンパク質クローン338A06のSEC-MALLS解析。溶出時間対溶出ピークのモル質量のプロット。レイリー比は、溶媒のみによって散乱される光を上回って散乱された過剰な光である（90°検出器だけを図示）。

【図11】IGF-IR競合クローン338A06の質量分析。ヒトIGF-IR競合クローン338A06のMALDI MS。試料調製および実験条件は実施例35で説明するとおりである。

【図12】クローン338A06のIGF-I増殖アッセイ。選ばれたヒト競合IGF-IR結合クローン（この例ではクローン338A06）によるIGF-I媒介性有糸分裂誘発の阻害を表すグラフ。市販されている中和抗IGF-IR Mab（MAB391）との比較を含めた。ヒト膵腺癌細胞株BxPC-3を実施例35で説明するように使用した。

【図13】IGF-IR競合クローン338A06のIGF-IR阻害アッセイ。選ばれたヒト競合IGF-IR結合クローン（この例ではクローン338A06）によるIGF-IとIGF-IRの間の相互作用の破壊を表すグラフ。IGF-Iおよび市販されている中和抗IGF-IR Mab（MAB391）との比較を含めた。ヒト乳癌MCF-7を実施例35で説明するように使用した。

【図14】クローン338A06 FGループ最適化クロンのIGF-IR結合アッセイ。実施例35に記載の直接結合ELISAにおけるクローン338A06 FGループ最適化クロンの活性を示すグラフ。

【図15】FGループ最適化338A06 IGF-IR競合クロンのSEC。18個の選ばれたFGループ最適化338A06 IGF-IR競合クロンのサイズ排除クロマトグラム。クロマトグラフィー条件は実施例29で説明する。蛍光検出を使用した。

【図16】IGF-IR FGループ最適化クローン387B01のSEC。中規模レベルまで精製された代表的ヒトFGループ最適化338A06 IGF-IR競合クローン（具体的にはクローン387B01）のサイズ排除クロマトグラム。このクロマトグラフィーの詳細は実施例35で説明する。蛍光検出を使用した。

【図17】IGF-IR FGループ最適化クローン387B01のRP-HPLC。中規模レベルまで精製された代表的ヒトFGループ最適化338A06 IGF-IR競合クローン（具体的にはクローン387B01）のRP-HPLCクロマトグラム。このクロマトグラフィーの詳細は実施例35で説明する。A280nmでの検出を使用した。

【図18】IGF-IR FGループ最適化クローン387B01のMALDI TOF質量分析。中規模レベルまで精製された代表的ヒトFGループ最適化338A06 IGF-IR競合クローン（具体的にはクローン387B01）のMALDI MS。試料調製および実験条件は実施例35で説明するとおりである。

【図19】PEG化タンパク質のSDS PAGE。385A08のPEG化変種を示すSDS PAGEゲルが図示されている。PEG化条件は実施例35で説明するとおりである。試料を10%NuPAGEミニゲルにのせ、シプロオレンジを使って染色する。

【図20】PEG化ヒトIGF-IR変種の細胞ベースアッセイ。選ばれたクローン385A08のIGF-IR PEG化変種による血清媒介性増殖の阻害を表すグラフ。ヒト形質細胞腫細胞株NCI-H929を実施例35で説明するように使用した。

【図21】IGF-IRマルチマーの細胞ベースアッセイ。選ばれたIGF-IR結合フィブロネクチンスクヤフォールドクローンによるIGF媒介性増殖の阻害を表すグラフ。改変リンパ球細胞株32D:IGF-IRを、10%ウシ胎仔血清（Hyclone、ユタ州ローガン）を含有するRPMI（Invitrogen、カリフォルニア州カールズバッド）中、100ng/mLのIGFおよびさまざまな濃度の各IGF-IRアンタゴニスト（黒 IGF-IRモノクローナル抗体MAB391；黒 IGF-IR結合クローン385A08（配列番号226）白 PEGによって連結された2つのIGF-IR結合クローン（配列番号203）：385A08-PEG20-385A08；黒 ジスルフィド結合によって連結された2つのIGF-IR結合クローン（配列番号203）：385A08-SS-385A08）の存在下で、96ウェルプレートに10000細胞/ウェルの濃度でプレーティングした。

【図22】IGF-IR/VEGFR2マルチマーの細胞ベースIGF-IRアッセイ。選ばれたIGF-IR結合

10

20

30

40

50

フィブロネクチンスキヤフォールドクロンによる血清媒介性増殖の阻害を表すグラフ。ヒト形質細胞腫細胞株NCI-H929 (ATCC、バージニア州マナッサス) を、10%ウシ胎仔血清 (Hyclone、ユタ州ローガン) を含有するDMEM (Invitrogen、カリフォルニア州カールズバッド) 中、さまざまな濃度の各IGF-IRアンタゴニスト (黒 抗IGF-IRモノクローナル抗体MAB391、R&D Systems、ミネソタ州ミネアポリス; 白 IGF-IR結合クロン385A08 (配列番号203); 黒 PEGで連結されたVEGFR2/IGF-IR結合クロン (配列番号203): 385A08-PEG20-配列番号128; 黒 VEGFR2結合クロン (配列番号128)) の存在下で、96ウェルプレートに25000細胞/ウェルの濃度でプレーティングした。

【図23】IGF-IR/VEGFR2マルチマーの細胞ベースVEGFR2アッセイ。選ばれたIGF-IR結合フィブロネクチンスキヤフォールドクロンによるVEGF媒介性増殖の阻害を表すグラフ。10
改変プロB細胞株hKE8-3 (Ba/F3:VEGFR2) を、10%ウシ胎仔血清 (Hyclone、ユタ州ローガン) を含有するRPMI (Invitrogen、カリフォルニア州カールズバッド) 中、5ng/mL VEGF およびさまざまな濃度の各VEGFR2アンタゴニスト (黒 VEGFR2結合クロン配列番号128; 白 対照配列番号227; 黒 PEGで連結されたVEGFR2/IGF-IR結合クロン (配列番号203): 385A08-PEG20-配列番号128) の存在下で、96ウェルプレートに25000細胞/ウェルの濃度でプレーティングした。

【図24】 V_H ドメインと 10 F n 3ドメインの構造。免疫グロブリンフォールドを持つ単ドメインポリペプチド (免疫グロブリンの V_H ドメイン、左側) と免疫グロブリン様フォールドを持つ単ドメインポリペプチド (10 F n 3ドメイン、右側) について構造構成が図示されている。20

【図25】HSAに連結されたフィブロネクチンスキヤフォールドIGF-IR結合剤の評価。選ばれたIGF-IR結合フィブロネクチンスキヤフォールドクロンによる血清媒介性増殖の阻害を表すグラフ。ヒト形質細胞腫細胞株NCI-H929 (ATCC、バージニア州マナッサス) を、10%ウシ胎仔血清 (Hyclone、ユタ州ローガン) を含有するDMEM (Invitrogen、カリフォルニア州カールズバッド) 中、さまざまな濃度の各IGF-IRアンタゴニスト (黒 抗IGF-IRモノクローナル抗体MAB391、R&D Systems、ミネソタ州ミネアポリス; 白 IGF-IR結合クロン385A08 (配列番号203); 黒 HSA-385A08 (配列番号203); 黒 ヒト血清アルブミン (HSA、Invitrogen、カリフォルニア州カールズバッド)) の存在下で、96ウェルプレートに25000細胞/ウェルの濃度でプレーティングした。細胞を37℃、5%CO₂で、72時間増殖させた。この増殖期間後に、細胞をCell Titer 96 Aqueous Proliferation Reagent (Promega、ウィスコンシン州マディソン) に曝露し、さらに4時間インキュベートした。490nmでの吸光度をSpectramax Plus 384 (Molecular Devices、カリフォルニア州サニーバール) で測定し、得られたデータをSigmaPlot (Systat Software、カリフォルニア州ポイントリッチモンド) を使って解析した。30

【図26】IGF-IRコンストラクトによるインビボ腫瘍成長阻害。腫瘍体積中央値 (mg) (y軸) が、腫瘍移植後の日数 (x軸) に対してプロットされている。X軸の最下部にある三角形は投与された用量を示す。IGFIR化合物 (IGF-IRアンタゴニスト); 385A08 (配列番号226); 385A08-PEG20-385A08 (配列番号203-PEG20-配列番号203); 385A08-PEG40 (配列番号203); および385A08-HSA (配列番号203) は、Rh41異種移植片モデルにおいてさまざまな腫瘍阻害度を示す。40

【図27】IGF-IRコンストラクトによるインビボ腫瘍成長阻害。500mgの群腫瘍サイズ中央値に到達した日数 (y軸) が、図26で述べた異なる処置群 (x軸) に対してプロットされている。ターゲットサイズに到達するまでの群の時間中央値が水平線で示されている。500mgに達する時間に関し、対照との比較で、*p < 0.05または***p < 0.0005。

【図28】IGF-IR-Fc融合コンストラクトの特徴づけ。上図はSDS PAGEゲルを示し、最も左端の列は分子量マーカー、続いて非還元IGF-IR-Ig (レーン1)、endo-H処理したIGF-IR-Ig (レーン2)、およびEndo H (レーン3) である。endo H処理時に起こる低質量側への小さなシフトは、IGF-IR-Igタンパク質が少量の糖鎖付加を持つことを示す。下図は、還元剤存在下でのSDS PAGEゲルを示し、最も左端の列は分子量マーカー、続いて無処理のIGF-IR-Ig (レーン1)、endo-H処理したIGF-IR-Ig (レーン2)、endo-HおよびSDS処理したI 50

GF-IR-Ig (レーン3) ならびにEndo H (レーン4) である。図からわかるように、観測される質量は、ジスルフィド連結した完全なIGF-IR-Igに予想されるとおり、非還元試料のサイズの約半分である。

【図29】Rh41ヒト横紋筋肉腫細胞におけるIGF-1R AKTおよびMAPKリン酸化を阻害する385A08-Fcの能力を評価するために使用したウェスタンブロット。細胞をIGF-I、IGF-II、インスリンリガンド (50ng/ml) で刺激した後、または刺激なしで (NS) 、さまざまな濃度の385A08-Fc (配列番号226) で処理した。メンブレンを表示の抗体ならびにホスホ特異的抗体でプローブした。

【図30】ヒトフィブロネクチンタイプIIIドメインの野生型第10モジュール (配列番号1) 、実施例2で同定されたIGF-IR競合クローン (配列番号2 ~ 109) 、実施例8で得た最適化された218C04クローン (配列番号110 ~ 125) 、典型的VEGFR-2結合¹⁰Fn3ポリペプチド (配列番号126 ~ 183) 、実施例18で得た最適化された338A06クローン (配列番号184 ~ 202) 、図21のIGF-IR結合クローン385A08対照 (配列番号226) 、図23のフィブロネクチンスクフォールドタンパク質対照 (配列番号227) 、典型的HSA-IGF-IR融合タンパク質 (配列番号228 ~ 235) 、および典型的トランスフェリン-IGF-IR融合タンパク質 (配列番号236 ~ 243) のアミノ酸配列。配列番号1 ~ 125ではBC、DE、およびFGループが網掛け表示されている。

【発明を実施するための形態】

【0068】

定義

本明細書に記載する方法を使って、少なくとも2つの関連するタンパク質構造群 (すなわち免疫グロブリンフォールドを持つタンパク質および免疫グロブリン様フォールドを持つタンパク質) から誘導された単ドメインIGF-IR結合ポリペプチドを含む (ただしこれらに限るわけではない) 本発明のタンパク質を開発することに成功した。

【0069】

「ポリペプチド」とは、長さ、翻訳後修飾、または機能を問わず、2つ以上のアミノ酸のあらゆる配列を意味する。「ポリペプチド」「ペプチド」および「タンパク質」は本明細書では可換的に用いられる。ポリペプチドは、天然アミノ酸および非天然アミノ酸、例えば参照により本明細書に組み込まれる米国特許第6,559,126号に記載されているものを含むことができる。ポリペプチドは種々の標準的な化学的方法のいずれかで修飾することもできる (例えばアミノ酸は保護基で修飾することができ ; カルボキシ末端アミノ酸は末端アミド基にすることができ ; アミノ末端残基は、例えば親油性を強化するための基などで修飾することができ ; あるいは、ポリペプチドを化学的にグリコシル化するか、他の方法で修飾して、安定性またはインビボ半減期を増加させることができる) 。ポリペプチド修飾には、そのポリペプチドへのもう一つの構造、例えば環状化合物または他の分子などの取付けを含めることができ、立体配置 (すなわちRもしくはS ; またはLもしくはD) が変化している1つ以上のアミノ酸を含有するポリペプチドも含めることができる。「単ドメインポリペプチド」という用語は、当該ポリペプチドのターゲット結合活性 (例えばIGF-IR結合活性) が、例えば抗原結合活性が一般に重鎖可変ドメインと軽鎖可変ドメインの両方による寄与を受ける抗体や単鎖抗体とは異なり、単一構造ドメイン内に位置することを示すために用いられる。本明細書に開示する種類の単ドメインポリペプチドを複数個つなぎ合わせて、増加したアビディティを持つ複合分子を創製することもできるだろうと考えられる。同様に、単ドメインポリペプチドを、例えば蛍光ポリペプチド、ターゲティングポリペプチドおよび異なる治療効果を持つポリペプチドなど、いくつかの他のポリペプチドに (例えば融合タンパク質として) 取付けることもできる。

【0070】

「PK」という用語は「薬物動態 (pharmacokinetic) 」の頭字語であり、例えば対象による吸収、分布、代謝、および排除などを含む化合物の性質を包含する。「PK調整タンパク質」または「PK部分」とは、ある生物活性分子に融合されるか、ある生物活性分子と一緒に投与された場合に、その生物活性分子の薬物動態特性に影響を及ぼす任意のタンパク質

10

20

30

40

50

、ペプチド、または部分を指す。PK調整タンパク質またはPK部分の例には、PEG、ヒト血清アルブミン（HSA）結合剤（米国特許出願公開第20050287153号および同第20070003549号に記載のもの）、ヒト血清アルブミン、FcまたはFcフラグメント、および糖類（例えばシアル酸）などがある。

【0071】

免疫グロブリンスキヤフォールドまたは免疫グロブリン様スキヤフォールドの単ドメインポリペプチドは、一定の構造的特徴を共有する傾向を示すだろう。例えば、それらのポリペプチドは、約80～約150個のアミノ酸を含み、それらのアミノ酸が構造上一組のストランドまたは様ストランドに組織されて、それらのストランドまたは様ストランドが介在ループ部分によってつながれたシートを形成しうる。構造構成の例を、重鎖可変ドメインおよび¹⁰Fn3ドメインに関して、図24に示す。シートは単ドメインポリペプチドの安定なコアを形成すると同時に、ストランドまたは様ストランドをつなぐループから構成される2つの「面」を生じる。本明細書で説明するように、これらのループを変異させて、カスタマイズされたリガンド結合部位を作出することができ、適切に制御すれば、タンパク質の全体的安定性を破壊せずに、さまざまな変異種を生成させることができる。抗体においては、3つのこれらのループが、周知の相補性決定領域（または「CDR」）である。

【0072】

単ドメインポリペプチドを形成させるためのスキヤフォールドは生理的条件下で高度な可溶性および安定性を示すべきである。免疫グロブリンスキヤフォールドの例は、単ドメインV_HまたはV_Lスキヤフォールド、ならびに単ドメインラクダ型V_{HH}ドメイン（ラクダ科動物に見出される可変重鎖ドメインの一形態）または自然に見出される他の免疫グロブリン可変ドメインもしくは実験室で改変された他の免疫グロブリン可変ドメインである。本明細書に開示する単ドメインフォーマットでは、免疫グロブリンポリペプチドが、結合活性を獲得するために、第2のポリペプチドと共に二量体を形成する必要がない。したがって、第2タンパク質へのジスルフィド架橋を媒介するシステインをもともと含有するそのようなポリペプチドはいずれも、そのシステインが排除されるように変化させることができる。あるいは、PEGなどの追加部分をその単ドメインポリペプチドにコンジュゲートする際に使用するべく、そのシステインを残しておいてもよい。

【0073】

他のスキヤフォールドとして非抗体スキヤフォールドタンパク質を挙げることもできる。「非抗体スキヤフォールドタンパク質またはドメイン」とは、免疫グロブリン様フォールドを持つ非抗体ポリペプチドを意味する。「免疫グロブリン様フォールド」とは、2つの逆平行シート層を含む約80～150アミノ酸残基のタンパク質ドメインであって、それら2つのシートの平坦な疎水面が互いに向かい合ってパッキングされているものを意味する。そのようなスキヤフォールドの一例が、「フィブロネクチンベースのスキヤフォールドタンパク質」であり、これは、フィブロネクチンタイプIIIドメイン（Fn3）に基づくポリペプチドを意味する。フィブロネクチンベースのスキヤフォールドタンパク質の例はAdnectin（商標）（Adnexus Therapeutics, Inc.）である。フィブロネクチンは細胞外マトリックスの形成および細胞間相互作用に不可欠な役割を果たす大きなタンパク質であり、これは3タイプ（タイプI、II、およびIII）の小さなドメインの数多くの反復からなる（Baronら、1991）。Fn3そのものは、細胞接着分子、細胞表面のホルモンおよびサイトカイン受容体、シャペロニンおよび糖質結合ドメインの一部を含む大きなサブファミリーの範例である。概観するには、BorkおよびDoolittle, Proc Natl Acad Sci U S A. 1992 Oct 1;89(19):8990-4; Borkら、J Mol Biol. 1994 Sep 30;242(4):309-20; CampbellおよびSpitzfaden, Structure. 1994 May 15;2(5):333-7; HarpezおよびChothia, J Mol Biol. 1994 May 13;238(4):528-39)を参照されたい。

【0074】

フィブロネクチンベースのスキヤフォールドタンパク質は、好ましくは「10Fn3」スキヤフォールドであり、これは、溶媒露出ループの1つ以上、特にBCループ（アミノ酸23-30

10

20

30

40

50

)、DEループ(アミノ酸52-56)およびFGループ(アミノ酸77-87)と同定される3つのループの1つ以上にランダム化または突然変異が施されている、ヒトフィブロネクチンタイプIIIタンパク質の第10モジュールに基づくポリペプチド変種を意味する(番号付けスキームはヒトフィブロネクチンタイプIIIDメインの野生型第10モジュールでの配列: VSDVPRDLEVVAATPTSLLSWDAPAVTVRYRITYGETGGNSPVQEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYITITVYAVTGRGDSPASSKPISINYRT(配列番号1)に基づく)。フィブロネクチンベースのスキヤフォールドタンパク質は、好ましくは、配列番号1に基づく。

【0075】

さまざまな突然変異型¹⁰F_n3スキヤフォールドが報告されている。ある態様ではAsp7、Glu9、およびAsp23の1つ以上が、別のアミノ酸、例えば非陰性荷電アミノ酸残基(例: Asn、Lysなど)で置き換えられる。これらの突然変異は、野生型と比較して中性pHにおける突然変異型¹⁰F_n3の安定性の向上を促進する効果を持つと報告されている(PCT公開番号WO 02/04523参照)。¹⁰F_n3スキヤフォールドにおける有益なまたは中立的な変化が、他にも種々開示されている。例えばBatoriら, Protein Eng. 2002 Dec;15(12):1015-20; Koideら, Biochemistry 2001 Aug 28;40(34):10326-33を参照されたい。

【0076】

変種型および野生型¹⁰F_n3タンパク質はどちらも同じ構造、すなわちA~Gと名付けられた7つの ストランドドメイン配列と、それら7つの ストランドドメイン配列をつなぐ6つのループ領域(ABループ、BCループ、CDループ、DEループ、EFループ、およびFGループ)とを特徴とする。N末端およびC末端の最も近くに位置する ストランドは、溶解した状態では 様コンフォメーションをとりうる。配列番号1では、ABループが残基15-16に相当し、BCループが残基22-30に相当し、CDループが残基39-45に相当し、DEループが残基51-55に相当し、EFループが残基60-66に相当し、かつFGループが残基76-87に相当する。図24に示すように、BCループ、DEループ、およびFGループは全て、ポリペプチドの同じ端面に配置される。同様に、免疫グロブリンスキヤフォールドは、少なくとも7つの ストランドまたは 様ストランド、多くの場合、9つの ストランドまたは 様ストランドを持つ傾向を示す。フィブロネクチンベースのスキヤフォールドタンパク質には、他のF_n3タイプフィブロネクチンドメインも、それらが¹⁰F_n3タイプドメインと類似する有用な活性および性質を示す限り、含めることができる。

【0077】

本明細書に開示する単一ドメインポリペプチドは、少なくとも2つの シートに分配される少なくとも5~7つの ストランドまたは 様ストランドと、2つの ストランドまたは 様ストランドをつなぐ少なくとも1つのループ部分とを持つことができ、そのループ部分はIGF-IRへの結合に参加し、その結合は、解離定数が 1×10^{-6} M未満、好ましくは 1×10^{-8} M未満であることを特徴とする。本明細書で述べるように、リガンドシグナリングを阻害するためにインビボで治療的に使用するには、 5×10^{-9} M未満の解離定数を持つポリペプチドが特に望ましい。エクスピボまたはインビボでIGF-IRタンパク質を検出または標識する際に使用するには、 1×10^{-6} M~ 5×10^{-9} Mの解離定数を持つポリペプチドが望ましいだろう。

【0078】

場合によっては「IGF-IR結合タンパク質」が同じ種に由来する他の関連タンパク質と比較してIGF-IRを特異的に結合するだろう。「特異的に結合する」とは、ターゲットタンパク質(例えばIGF-IR)を認識してそれと相互作用するが、試料(例えば生物学的試料)中の他の分子を実質的に認識してそれと相互作用することがないポリペプチドを意味する。好ましい実施形態において、本発明のポリペプチドはIGF-IRを少なくとも500nMという強さの K_D で特異的に結合する。このポリペプチドは、好ましくは、IGF-IRを1pM~500nM、より好ましくは1pM~100nM、さらに好ましくは1pM~10nM、最も好ましくは1pM~1nM以下の K_D で、特異的に結合するだろう。

【0079】

「機能的Fc領域」はネイティブ配列Fc領域の「エフェクター機能」を少なくとも一つは

10

20

30

40

50

持つ。典型的な「エフェクター機能」には、C1q結合；補体依存性細胞傷害（CDC）；Fc受容体結合；抗体依存性細胞性細胞傷害（ADCC）；食作用；細胞表面受容体（例えばB細胞受容体；BCR）のダウンレギュレーションなどがある。そのようなエフェクター機能は、一般に、Fc領域が結合ドメイン（例えば抗体可変ドメイン）と組み合わせられることを必要とし、そのような抗体エフェクター機能を評価するための当技術分野で知られるさまざまなアッセイを使って評価することができる。

【0080】

「ネイティブ配列Fc領域」は自然に見出されるFc領域のアミノ酸配列と同一なアミノ酸配列を含む。図3に、ネイティブ配列ヒトおよびマウスIgG Fc領域のアミノ酸配列を記載する。

10

【0081】

「変種Fc領域」は、少なくとも1つのアミノ酸修飾ゆえにネイティブ配列Fc領域のアミノ酸配列とは異なるアミノ酸配列を含む。好ましくは、変種Fc領域は、ネイティブ配列Fc領域中または親ポリペプチドのFc領域中に、ネイティブ配列Fc領域または親ポリペプチドのFc領域と比較して、少なくとも1つのアミノ酸置換、例えば約1～約10個のアミノ酸置換、好ましくは約1～約5個のアミノ酸置換を持つ。ここでは変種Fc領域が、好ましくはネイティブ配列Fc領域および/または親ポリペプチドのFc領域と少なくとも約80%の配列一致度、最も好ましくは、それと少なくとも90%の配列一致度、さらに好ましくは、それと少なくとも95%の配列一致度を持つだろう。

【0082】

20

「抗体依存性細胞性細胞傷害」および「ADCC」は、Fc受容体（FcR）を発現させる非特異的細胞傷害性細胞（例えばナチュラルキラー（NK）細胞、好中球、およびマクロファージ）がターゲット細胞上の結合された抗体を認識し、続いてそのターゲット細胞の溶解を引き起こす細胞性反応を指す。ADCCを媒介する主要細胞であるNK細胞がFc RIIIだけを発現させるのに対して、単球はFc RI、Fc RIIおよびFc RIIIを発現させる。造血細胞上のFcR発現は、RavetchおよびKinet, Annu. Rev. Immunol 9:457-92 (1991)の464頁の表3に要約されている。興味ある分子のADCC活性を評価するには、米国特許第5,500,362号または同第5,821,337号に記載されているようなインビトロADCCアッセイを行うことができる。そのようなアッセイに役立つエフェクター細胞には、末梢血単核球（PBMC）およびナチュラルキラー（NK）細胞などがある。これに代えて、またはこれに加えて、興味ある分子のADCC活性を、インビボで、例えばClaynesら. PNAS (USA) 95:652-656 (1998)に開示されているような動物モデルで、評価することもできる。

30

【0083】

本明細書における「アミノ酸配列一致率（％）」は、配列を整列し、最大の配列一致率が得られるように必要に応じてギャップを導入した後で、どの保存的置換も配列一致の一部とはみなさないで、選択した配列中のアミノ残基と同一な、候補配列中のアミノ酸残基のパーセンテージと定義される。アミノ酸一致率を決定するためのアラインメントは、当業者の技量の範囲内にあるさまざまな方法で、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することができるコンピュータソフトウェアを使って、達成することができる。当業者は、アラインメントを判定するために、比較され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めて、適当なパラメータを決定することができる。しかし、ここでの目的には、アミノ酸配列一致率（％）値が、配列比較コンピュータプログラムALIGN-2を使用することにより、以下のように取得される。ALIGN-2配列比較コンピュータプログラムはGenentech, Inc.によって記述され、米国著作権局（Washington D.C., 20559）に登録申請されて、米国著作権登録番号TXU510087として登録されており、Genentech, Inc.（カリフォルニア州サウスサンフランシスコ）を通して公的に入手することができる。ALIGN-2プログラムは、UNIX（登録商標）オペレーティングシステム、好ましくはdigital UNIX（登録商標）V4.0Dで使用するためにコンパイルされるべきである。全ての配列比較パラメータはALIGN-2プログラムによって設定され、変化しない。

40

50

【0084】

ここでの目的には、与えられたアミノ酸配列Aの、与えられたアミノ酸配列Bへの、または与えられたアミノ酸配列Bとの、または与えられたアミノ酸配列Bに対するアミノ酸配列一致率(%) (これは、与えられたアミノ酸配列Bに、または与えられたアミノ酸配列Bと、または与えられたアミノ酸配列Bに対して、一定のアミノ酸配列一致率(%)を持つ、または含む、与えられたアミノ酸配列Aと、言い換えることもできる)は、以下のように算出される: $100 \times \text{分率} X/Y$ (ここにXは、配列アラインメントプログラムALIGN-2が、そのプログラムによるAとBとのアラインメントにおいて、完全一致 (identical match) とスコアリングしたアミノ酸残基の数であり、YはB中のアミノ酸残基の総数である)。アミノ酸配列Aの長さがアミノ酸配列Bの長さとは等しくない場合に、Bに対するAのアミノ酸配列一致率(%)が、Aに対するBのアミノ酸配列一致率(%)と等しくなくなることは、理解されるだろう。

10

【0085】

「ポリペプチド鎖」は、そのドメインのそれぞれが他のドメインに、非共有結合的相互作用またはジスルフィド結合ではなくペプチド結合によって接合されているポリペプチドである。

【0086】

「単離された」ポリペプチドは、その自然環境の一成分から同定され、かつ単離および/または回収されたものである。その自然環境の夾雑成分とは、そのポリペプチドの診断的使用または治療的使用を妨害するであろう物質であり、これには、酵素、ホルモン、および他のタンパク質性もしくは非タンパク質性の溶質が含まれる。好ましい実施形態では、ポリペプチドが、(1) ローリー法による決定でポリペプチドの95重量%より高純度に、最も好ましくは99重量%より高純度に精製されるか、(2) スピニングカップシークエネーターを使ってN末端アミノ酸配列または内部アミノ酸配列の少なくとも15残基を得るのに十分な程度まで精製されるか、または(3) クーマシーブルー染色、もしくは好ましくは銀染色を使って、還元条件下または非還元条件下でのSDS-PAGEによって均一になるまで精製されるだろう。単離されたポリペプチドには組換え細胞内でその場にある (in situ) ポリペプチドも包含される。というのも、そのポリペプチドにとっての自然環境のうち少なくとも一つの成分が存在しないだろうからである。しかし通常は、単離されたポリペプチドは、少なくとも一つの精製ステップによって調製されるだろう。

20

30

【0087】

ターゲットは前記ターゲットのフラグメントであってもよい。したがってターゲットは、免疫応答を引き出す能力を持つ前記ターゲットのフラグメントでもある。ターゲットは、完全長ターゲットに対して産生させた単一ドメイン抗体に結合する能力を持つ前記ターゲットのフラグメントでもある。

【0088】

本明細書にいうフラグメントとは、その配列の100%未満 (例えば99%、90%、80%、70%、60%、50%、40%、30%、20%、10%など) であるが、5、6、7、8、9、10、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25個またはそれ以上のアミノ酸を含むものを指す。フラグメントは、興味ある相互作用が $1 \times 10^{-6} \text{M}$ か、それよりも良いアフィニティーで維持されるように、十分な長さを持つ。

40

【0089】

本明細書にいうフラグメントとは、野生型ターゲットに対して産生させた単一ドメイン抗体に結合するターゲットの能力を実質的に変化させない1個以上のアミノ酸の随意の挿入、欠失および置換も指す。アミノ酸挿入、アミノ酸欠失またはアミノ酸置換の数は、好ましくは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69または70アミノ酸までである。

【0090】

50

「細胞死を誘発」する本発明のタンパク質は、生細胞を生存不能にならしめるものである。その細胞は、一般に、本タンパク質が結合する抗原を発現させるもの（特に細胞がその抗原を過剰発現させる場合）である。好ましくは、その細胞はがん細胞、例えば乳房細胞、卵巣細胞、胃細胞、子宮内膜細胞、唾液腺細胞、肺細胞、腎臓細胞、結腸細胞、甲状腺細胞、膵臓細胞または膀胱細胞である。インビトロでは、細胞は、例えばSKBR3、BT474、Calu 3、MDA-MB453、MDA-MB-361またはSKOV3細胞であることができる。インビトロでの細胞死は、抗体依存性細胞性細胞傷害（ADCC）または補体依存性細胞傷害（CDC）によって誘発された細胞死を識別するために、補体および免疫エフェクター細胞の非存在下で決定することができる。したがって、細胞死に関するアッセイは、熱非働化血清を使って（すなわち補体の非存在下で）、および免疫エフェクター細胞の非存在下で行うことができる。本発明のタンパク質が細胞死を誘発できるかどうかを決定するために、ヨウ化プロピジウム（PI）、トリパンプルー（Mooreら、Cytotechnology 17:1-11（1995）参照）または7AADの取り込みによって評価される膜完全性の喪失を、無処理細胞と比較して評価することができる。

【0091】

「アポトーシスを誘発」する本発明のタンパク質は、アポトーシス関連分子の結合またはアポトーシス関連事象、例えばアネキシンV、DNAの断片化、細胞縮小、小胞体の拡大、細胞断片化、および/または膜小胞（アポトーシス小体と呼ばれる）の形成などによって決定されるプログラム細胞死を誘発するものである。この細胞は、本タンパク質が結合する抗原を発現させるものであり、その抗原を過剰発現させるものであることができる。その細胞は腫瘍細胞、例えば乳房細胞、卵巣細胞、胃細胞、子宮内膜細胞、唾液腺細胞、肺細胞、腎臓細胞、結腸細胞、甲状腺細胞、膵臓細胞または膀胱細胞であることができる。インビトロでは、細胞が、例えばSKBR3、BT474、Calu 3細胞、MDA-MB453、MDA-MB-361またはSKOV3細胞であることができる。アポトーシスに関連する細胞事象の評価には、さまざまな方法を利用することができる。例えばホスファチジルセリン（PS）トランスロケーションはアネキシン結合によって測定することができ、DNA断片化は本明細書の実施例に開示するDNAラダリングによって評価することができ、そしてDNA断片化を伴う核/クロマチン凝縮は、低二倍体細胞の増加によって評価することができる。好ましくは、アポトーシスを誘発するタンパク質は、本発明のタンパク質が結合する抗原を発現させる細胞を使ったアネキシン結合アッセイにおいて、無処理の細胞と比較して2～50倍、好ましくは約5～50倍、最も好ましくは約10～50倍の、アネキシン結合の誘発をもたらすものである。

【0092】

「治療有効量」という用語は、哺乳動物における疾患または障害を処置するのに有効な薬物の量を指す。がんの場合、薬物の治療有効量は、がん細胞の数を減らし；腫瘍サイズを減少させ；周辺臓器へのがん細胞浸潤を阻害し（すなわち、ある程度減速させ、好ましくは停止させ）；腫瘍転移を阻害し（すなわち、ある程度減速させ、好ましくは停止させ）；腫瘍成長をある程度阻害し；かつ/またはその障害に関連する症状の1つ以上をある程度軽減しうる。薬物が既存のがん細胞の成長を防止しかつ/または既存のがん細胞を殺しうる限りにおいて、それは細胞増殖抑制性かつ/または細胞傷害性である。がん治療の場合、インビボ効力は、例えば無増悪期間（TTP）を評価し、かつ/または応答率（RR）を決定することによって測定することができる。

【0093】

概観

本発明者らは、以下に挙げる特性を含む（ただしそれらに限定するわけではない）有利な特性でIGF-1Rを結合する本発明の新規タンパク質を発明した：一価または多価結合モード（例えば特定のターゲット（IGF-1Rおよび他のチロシンキナーゼ受容体を含む）を結合する1つまたは2つ以上のドメイン）；他の受容体との比較で所望のターゲットに対する高い選択性（特にインスリン受容体と比較してIGF-1Rを選択的に結合するタンパク質に関して）；約100nM～約10pM未満（フェムトモル濃度のアフィニティーを含む）の範囲を含む、調整可能なアフィニティー；特異的アンタゴニスト活性を持つと同時に、アゴニスト活

性は最小限または検出不能である；IGF-IまたはIGF-II結合または活性化の遮断；所望のターゲットに対する単一特異性または多重特異性結合；単一または多重エピトープ結合；ラットにおける長い血清中半減期；皮下（SC）または静脈内（IV）投薬；小さいサイズ（例えば約5kDa～約40kDa）；約55 を超えるまたは約60 を超えるT_m；および実質的に単量体性（例えばサイズ排除クロマトグラフィー（SEC）で、面積の約90%、面積の約95%、または面積の約98%などといった単一ピーク）。

【0094】

何兆もの新規タンパク質の作製および試験

本発明の一態様として、推定1～5兆個の異なるタンパク質変種を、そのようなタンパク質に対応しそのようなタンパク質をコードする1～5兆個のRNAおよびDNA変種と共に作製した。作製したタンパク質をヒトIGF-IRへの結合について試験し、場合によっては、適切な有用タンパク質、特に治療薬を同定する助けとなるように、それらをさらに発現させ、精製して、さまざまな生物学的、生化学的および生物物理学的アッセイおよび測定に付した。

10

【0095】

さらにまた、本発明のベクターおよびポリヌクレオチドの例を使って、5000を超えるタンパク質変種を大腸菌で発現させ、発現レベルならびにさまざまな生物学的、生化学的および生物物理学的アッセイについて試験した。これらの測定の結果に応じて、選ばれた異なるタンパク質をさらに推し進めて、本明細書に記載の特徴を持つさらに最適化された変異種を作製した。数多くのそのようなタンパク質をインスリン受容体に関する選択性について試験した。

20

【0096】

IGF-IRに結合するタンパク質およびドメインのこのタイプの包括的評価を応用したのは、本発明者らが初めてである。このタイプの評価を行うために本発明のタンパク質を迅速に作製し試験する一方法は、Adnexus Therapeutics, Inc.の核酸-タンパク質融合技術である。この開示では、核酸-タンパク質融合物（RNA-およびDNA-タンパク質融合物）を利用して、IGF-IRおよびチロシンキナーゼ受容体を含む他のタンパク質への結合にとって重要な新規単ドメインおよび多ドメインポリペプチドおよびアミノ酸モチーフを同定する、PROfusion（商標）と名付けられた、そのようなインビトロ発現およびタギング技術の使用を説明する。核酸-タンパク質融合技術は、タンパク質をそのコード化遺伝情報に共有結合的にカップリングさせる技術である。PROfusion（商標）技術を使って、ヒトフィブロネクチンタイプ3ドメイン（¹⁰Fn3）に基づくスキヤフォールドを使って構築された、または抗体軽鎖の可変ドメインから構築された、単ドメインポリペプチドをコードする核酸のコレクションをスクリーニングした。発現されたポリペプチド（これをスキヤフォールドタンパク質の「ライブラリー」と呼ぶ）を、ターゲットを高いアフィニティで結合しうるポリペプチドについてスクリーニングした。本発明者らは、このスキヤフォールドタンパク質のライブラリーから、IGF-IRに結合してIGF-IRの生物学的活性を阻害する新規単ドメインポリペプチドを単離した。さらにまた、免疫グロブリンスキヤフォールドまたは免疫グロブリン様スキヤフォールド中に位置する数多くの独立にランダム化されたループは、IGF-IR結合に参加する関連する一組のコンセンサス配列に集束する傾向を示すことが見出された。したがって、これらのコンセンサス配列を持つポリペプチドは、それらが同定された時のタンパク質背景から分離されたとしても、IGF-IR結合剤として役立つだろうと予想される。例えば、本明細書に記載の実施例および表を参照されたい。そのようなポリペプチドは、独立した小ペプチドIGF-IR結合剤として使用するか、他のタンパク質中、特に免疫グロブリンフォールドまたは免疫グロブリン様フォールドを共有するタンパク質中に置くことができる。（RNA-タンパク質融合技術およびフィブロネクチンベーススキヤフォールド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、参照により本明細書に組み込まれるSzostakらの米国特許第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；PCT公開番号W000/34784；W001/64942；W002/032925；ならびにRobertsおよびSzostak, Proc Natl. Aca

30

40

50

d. Sci. 94:12297-12302, 1997を参照されたい)。

【0097】

上述のように、一定の望ましい特性（例えばIGF-IRに対する高アフィニティー結合、そのような受容体のリガンドの1つ以上に関するアンタゴニスト作用、および改善された薬物動態など）を持つ単ドメインポリペプチドを有効な抗癌剤として使用できることを、本開示は実証する。そのようなポリペプチドの抗がん剤としての有効性は、がんにおけるIGFリガンドおよびIGF受容体の役割に関連すると考えられるものの、本発明者らはどの特定機序にも束縛されることを望まない。

【0098】

我々が知る限り、本開示は、IGF-IRに関してインビトロおよびインビボで治療効果が得られるように設計されたFn3ベースのポリペプチドを使用することに成功した初めての試みである。インビボ有効性を獲得する際になされた改良および発見の多くは、このターゲットおよび他のターゲットならびに他のタンパク質部分およびドメインに対する他のFn3ベースのポリペプチド、一般的には約50kDa未満または約40kDa未満のタンパク質にも、広く応用することができるだろう。言い換えると、Fn3ベースのポリペプチドのリガンド結合特性は一般的には溶媒露出ループ領域中に位置する比較的少数のアミノ酸によって決定されるだろうが、Fn3ベースのポリペプチドの他の特徴、例えば薬物動態特徴は、リガンド結合に直接的には関与せず、ターゲットタンパク質が何であろうと、タンパク質間で保存されている、そのタンパク質の大部分によって決定される傾向を示すだろう。抗体がこれに当てはまり、抗体では、CDR領域と呼ばれる数個のループが、抗原結合を媒介すると同時に、インビボ抗体挙動の他の特徴は、主として、保存されたフレームワーク領域および定常ドメインによって決定されている。

【0099】

他のタンパク質実施形態

本発明のタンパク質には、一般にIGF-IRなどのターゲットに結合するポリペプチドであって、例えば抗原結合活性が一般に重鎖可変ドメインと軽鎖可変ドメインの両方による寄与を受ける抗体および単鎖抗体とは異なり、ターゲット結合活性が単一の構造ドメイン内に位置している、本明細書に記載の単ドメインポリペプチドが包含される。本開示は、ターゲットに結合する単ドメインポリペプチドを含みうる、より大きなタンパク質も提供する。例えば、複数の単ドメインポリペプチドをつなぎ合わせて、増加したアビディティまたは多価性を持つ複合分子を創製することができる。同様に、単ドメインポリペプチドを、いくつもの他のポリペプチドに（例えば融合タンパク質として）取付けることもできる。一定の態様において、単ドメインポリペプチドは、免疫グロブリンドメインおよび免疫グロブリン様ドメインによって例示されるように、少なくとも2つのシートに分配される少なくとも5~7つのストランドまたは様ストランドを含みうる。様ストランドは、単ドメインポリペプチドの安定化に参加するアミノ酸のストリングであるが、必ずしもストランドコンフォメーションを取らない。様ストランドがタンパク質の安定化に参加するかどうかは、そのストリングを欠失させるか、そのストリングの配列を変化させ、タンパク質の安定性が減少するかどうかを解析することによって評価することができる。安定性は、例えば熱変性および再生研究などによって評価することができる。好ましくは、単ドメインポリペプチドは、2つ以下の様ストランドを含むだろう。様ストランドは、通常、ヘリックスコンフォメーションをとらないだろうが、ランダムコイル構造はとりうる。免疫グロブリンドメインまたは免疫グロブリン様ドメインにあっては、様ストランドは、通常であれば最もN末端側のストランドまたは最もC末端側のストランドによって占められるであろう構造中の位置に、最も多く見出されるだろう。タンパク質配列の内部に位置する場合には通常ストランドを形成するであろうアミノ酸ストリングが、N末端またはC末端近くの位置に位置する場合には、明確にはストランドでないコンフォメーションをとることがあり、それを本明細書では様ストランドという。

【0100】

一定の実施形態において、本開示は、IGF-IRに結合する単ドメインポリペプチドを提供する。好ましくは、本単ドメインポリペプチドは、ヒトIGF-IRおよびモデル生物種のIGF-IRに結合する。単ドメインポリペプチドは、少なくとも2つのストランドに分配される少なくとも7つのストランドまたは様ストランドと、2つのストランドまたは様ストランドをつなぐ少なくとも1つのループ部分とを含み、そのループ部分がIGF-IRへの結合に参加するという構造構成を持つ、約80～約150個のアミノ酸を含みうる。言い換えると、ループ部分は、2つのストランド、2つの様ストランドまたは1つのストランドと1つの様ストランドを連結しうる。典型的には、それらループ部分の1つ以上がIGF-IR結合に参加するだろうが、ストランド部分または様ストランド部分（特にループ部分に最も近接して位置するストランド部分または様ストランド部分）の1つ以上もIGF-IR結合に参加することは考えられる。単ドメインポリペプチドは、免疫グロブリンドメインまたは免疫グロブリン様ドメインである構造ユニットを含みうる。単ドメインポリペプチドはIGF-IRのどの部分に結合してもよいが、IGF-IRの細胞外ドメインに結合するポリペプチドは好ましい。結合は、平衡定数（例えば解離定数、 K_D ）を使って、また速度定数（例えば会合速度定数（on rate constant） k_{on} および解離速度定数（off rate constant） k_{off} ）を使って、評価することができる。単ドメインポリペプチドは、典型的には、IGF-IRに約 10^{-6} M未満、または約 10^{-7} M未満、約 5×10^{-8} M未満、約 10^{-8} M未満、もしくは約 10^{-9} M未満の K_D で結合するように選択されるだろう。IGF-IR結合ポリペプチドは、IGFファミリーの1つまたは2つもしくはそれ以上のメンバー、特にIGF-IおよびIGF-IIと、結合に関して競合し、IGF-IRが媒介する生物学的現象、例えばがん細胞の増殖およびがん転移などを阻害しうる。IGF-IR結合ポリペプチドは、治療目的に使用できると共に、IGF-IRの検出または結合を伴うあらゆる目的に使用することができる。治療用のポリペプチドは一般に 5×10^{-8} M未満、 10^{-8} M未満、または 10^{-9} M未満の K_D を持つだろうが、 k_{off} が十分に低いか、 k_{on} が十分に高い場合には、これより高い K_D 値でも許容しうる。一定の実施形態では、IGF-IRに結合する単ドメインポリペプチドが、本明細書に記載するIGF-IR結合クローンから選択されるIGF-IR結合配列のコンセンサス配列または1つ以上の配列を含むだろう。好ましくは、そのような配列は、ループ内、特に、ChenらがPCT公開番号W02005/056764A2に記載したBC、DE、およびFGループ内に位置するだろう。

【0101】

一定の実施形態では、単ドメインポリペプチドが免疫グロブリン（Ig）可変ドメインを含む。Ig可変ドメインは、例えば、ヒト V_L ドメイン、ヒト V_H ドメインおよびラクダ型 V_H ドメインからなる群より選択することができる。Ig可変ドメインの1つ、2つ、3つまたはそれ以上のループがIGF-IRへの結合に参加することができ、典型的にはCDR1、CDR2またはCDR3と呼ばれているループはいずれも、IGF-IR結合に参加するだろう。

【0102】

一定の実施形態では、単ドメインポリペプチドが免疫グロブリン様ドメインを含む。免疫グロブリン様ドメインの1つ、2つ、3つまたはそれ以上のループがIGF-IRへの結合に参加しうる。好ましい免疫グロブリン様ドメインはフィブロネクチンタイプIII（Fn3）ドメインである。そのようなドメインは、N末端からC末端に向かって順に、ストランドまたは様ストランドA；ループAB；ストランドまたは様ストランドB；ループBC；ストランドまたは様ストランドC；ループCD；ストランドまたは様ストランドD；ループDE；ストランドまたは様ストランドE；ループEF；ストランドまたは様ストランドF；ループFG；およびストランドまたは様ストランドGを含みうる。構造構成の一例については図24を参照されたい。場合によっては、ループAB、BC、CD、DE、EFおよびFGのいずれかまたは全てがIGF-IR結合に参加しうるが、好ましいループはBC、DEおよびFG、特にループBCおよびFGである。好ましいFn3ドメインはヒトフィブロネクチン由来のFn3ドメイン、特に 10 Fn3と呼ばれるフィブロネクチンの第10 Fn3ドメインである。本明細書に開示するIGF-IR結合ポリペプチドはいずれもネイティブ 10 Fn3とは同じアミノ酸配列を持たず、その配列はIGF-IR結合タンパク質が得られるように修飾されているが、 10 Fn3の基本的な構造上の特徴を持つタンパク質、特にネイティブ 10 Fn3に対して認識可能な配列ホ

モロジーを保っているものは、それでもなお、本明細書では「 $^{10}\text{Fn3}$ ポリペプチド」と呼ばれることに注意すべきである。この命名法は、例えばある特定ターゲットタンパク質に対して生成させた組換え抗体 V_L ドメインが自然に存在するどの V_L ドメインとも同一でないかもしれないのに、それでもなお、そのタンパク質は、それと認識できる程度に V_L タンパク質であるという、抗体分野に見られる命名法と類似している。 $^{10}\text{Fn3}$ ポリペプチドは、配列番号1に示すヒト $^{10}\text{Fn3}$ ドメインと少なくとも60%、65%、70%、75%、80%、85%、または90%同一でありうる。変異性の大部分は、一般的には、ループの1つ以上に見出されるだろう。 $^{10}\text{Fn3}$ ポリペプチドの スtrandまたは 様strandのそれぞれは、そのような変異が生理的条件下でそのポリペプチドの安定性を破壊しないという条件の下で、本質的に、配列番号1の対応する スtrandまたは 様strandの配列と少なくとも80%、85%、90%、95%または100%同一なアミノ酸配列からなりうる。 $^{10}\text{Fn3}$ ポリペプチドは、ループAB、CD、およびEFのそれぞれにおいて、本質的に、配列番号1の対応するループの配列と少なくとも80%、85%、90%、95%または100%同一なアミノ酸配列からなる配列を持ちうる。多くの場合、ループBC、DE、およびFGのいずれかまたは全ては、配列番号1と比較して、あまり保存されていないだろう。例えば、ループBC、DE、およびFGの全てが、配列番号1の対応する各ループに対して、20%未満、10%未満または0%の一致度を示しうる。いくつかの実施形態では、BCループとFGループだけが、配列番号1に対して、あまり保存されていないだろう。

【0103】

一定の実施形態において、本開示は、第10フィブロネクチンタイプIII ($^{10}\text{Fn3}$) ドメインを含むポリペプチドであって、その $^{10}\text{Fn3}$ ドメインがループAB；ループBC；ループCD；ループDE；ループEF；およびループFGを含み、かつヒト $^{10}\text{Fn3}$ ドメインの対応するループの配列と比較して変化したアミノ酸配列を持つループ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持つポリペプチドを提供する。「I」は、テンプレート配列（対応するヒトフィブロネクチンドメイン）との比較で1つ以上のアミノ酸配列変化を意味し、アミノ酸の付加、欠失、および置換を包含する。アミノ酸配列の変化は、一般的には核酸コード配列の、計画的、非計画的、または自然発生的変異によって達成することができ、任意の技法、例えばPCR、エラープロードPCR、化学的DNA合成などによって行うことができる。

【0104】

いくつかの実施形態では、BC、DE、およびFGから選択される1つ以上のループの長さを、対応するヒトフィブロネクチンループと比較して、延長または短縮することができる。いくつかの実施形態では、ループの長さを、2~25アミノ酸分、延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、 $^{10}\text{Fn3}$ のFGループは12残基長であるが、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には、好ましくは、 $^{10}\text{Fn3}$ のFGループの長さならびに配列をランダム化して、抗原結合において最大限の可動性およびアフィニティーが得られるように、4~28残基のCDR3範囲をカバーする。いくつかの実施形態では、インテグリン結合モチーフを、あるアミノ酸配列で置き換えることができ、この場合、極性アミノ酸-中性アミノ酸-酸性アミノ酸配列（N末端 C末端方向）。

【0105】

いくつかの実施形態では、 $^{10}\text{Fn3}$ ドメインを含むポリペプチドが、配列番号2~125または184~202のいずれか一つのアミノ酸配列を含む。追加配列をN末端またはC末端に付加してもよい。例えば追加MG配列をN末端に置くことができる。通常、このMは切り離されて、N末端にGVS...配列が残るだろう。いくつかの実施形態では、 $^{10}\text{Fn3}$ ドメインのC末端にリンカー配列を置くことができる。例えば配列番号203および226。

【0106】

一定の実施形態において、本開示は、IGF-IRに結合する免疫グロブリン様フォールドを持つドメインを含む非抗体ポリペプチドを提供する。非抗体ポリペプチドは20kDa未満または15kDa未満の分子量を持つことができ、一般的には、Fn3スキヤフォールドなどの基準

10

20

30

40

50

(または「スキヤフォールド」)タンパク質から(例えばアミノ酸配列の変更などによって)誘導されるだろう。非抗体ポリペプチドはIGF-IRを 10^{-6} M未満、または 10^{-7} M未満、 5×10^{-8} M未満、 10^{-8} Mもしくは 10^{-9} M未満の K_D で結合しうる。変更を加えていない基準タンパク質はIGF-IRに意味があるほど結合しないが、 10^{-6} Mより高い K_D で結合するだろう。非抗体ポリペプチドは、特に非抗体ポリペプチドが 5×10^{-8} M未満、 10^{-8} M未満または 10^{-9} M未満の K_D を持つ場合(ただし、 k_{off} が十分に低い場合(例えば $5 \times 10^{-4} s^{-1}$ 未満)は、これより高い K_D 値でも許容しうる)には、IGF-IRシグナリングを阻害しうる。免疫グロブリン様フォールドは¹⁰Fn3ポリペプチドでありうる。

【0107】

一定の実施形態において、本開示は、IGF-IRに結合する免疫グロブリンフォールドを持つ単一ドメインを含むポリペプチドを提供する。本ポリペプチドは20kDa未満または15kDa未満の分子量を持つことができ、一般的には、免疫グロブリンの可変ドメインから(例えばアミノ酸配列の変更などによって)誘導されるだろう。本ポリペプチドはIGF-IRを 10^{-6} M未満、または 10^{-7} M未満、 5×10^{-8} M未満、 10^{-8} M未満もしくは 10^{-9} M未満の K_D で結合しうる。本ポリペプチドは、特に本ポリペプチドが 5×10^{-8} M未満、 10^{-8} M未満または 10^{-9} M未満の K_D を持つ場合(ただし、 k_{off} が十分に低いか、 k_{on} が十分に高い場合は、これより高い K_D 値でも許容しうる)には、IGF-IRシグナリングを阻害しうる。一定の好ましい実施形態では、免疫グロブリン軽鎖可変ドメインから誘導され、IGF-IRに結合することができる、免疫グロブリンフォールドを持つ単一ドメインポリペプチドが、本明細書に記載のIGF-IR結合クローンから選択されるアミノ酸配列を含みうる。

【0108】

一定の好ましい実施形態において、本開示は、最も望ましい生化学的特徴を持つ、本明細書に記載のIGF-IR結合クローンのいずれかのアミノ酸配列を含むIGF-IR結合ポリペプチドを提供する。そのようなアミノ酸配列を含むポリペプチドの場合、PEG部分または他の興味ある部分を、そのタンパク質に応じて約85から約100までの位置にあるシステインに共有結合させることができる。PEG部分はポリペプチド中のアミン部分に共有結合させることもできる。アミン部分は、例えばポリペプチドのN末端に見出される1級アミンであってもよいし、リジンまたはアルギニンなどのアミノ酸中に存在するアミン基であってもよい。一定の実施形態では、a) N末端; b) N末端と最もN末端側のストランドまたは様ストランドとの間; c) ターゲット結合部位とは反対のポリペプチド面上に位置するループ; d) C末端と最もC末端側のストランドまたは様ストランドとの間; ならびにe) C末端からなる群より選択されるポリペプチド上の位置に、PEG部分が取付けられる。

【0109】

一定の態様において、本開示は、IGF-IR結合を媒介する短いペプチド配列を提供する。そのような配列は、単離された形で、または特定のタンパク質構造、例えば免疫グロブリンまたは免疫グロブリン様ドメイン中に挿入された場合に、IGF-IR結合を媒介しうる。そのような配列の例には、表に開示されているもの、および配列番号1または本明細書に列挙した他の任意の配列と少なくとも85%、90%、または95%同一であって、IGF-IR結合活性を保持している他の配列が含まれる。したがって本開示は、そのような配列のいずれかの配列と少なくとも85%同一であるアミノ酸配列を含む実質的に純粋なまたは単離されたポリペプチドであって、前記ポリペプチドがIGF-IRに結合し、IGF-IRへの結合に関してIGF F種と競合するものを提供する。そのようなポリペプチドの例には、表中のいずれかの配列と少なくとも85%同一なアミノ酸配列と少なくとも80%、85%、90%、95%または100%同一なアミノ酸を含むポリペプチドが含まれる。好ましくは、そのようなポリペプチドは、IGFの生物学的活性を阻害し、IGF-IRに 10^{-6} M未満、または 10^{-7} M未満、 5×10^{-8} M未満、 10^{-8} M未満もしくは 10^{-9} M未満の K_D で結合しうる。

【0110】

一定の実施形態では、本明細書に記載のIGF-IR結合ポリペプチドのいずれかを、例えば、同様にIGF-IRに結合する部分(例えば第2の同じまたは異なるIGF-IR結合ポリペプチド)、異なるターゲットに結合する部分(例えば二重特異性結合剤を創製するため)、ラベ

リング部分、タンパク質精製を容易にする部分または改善された薬物動態を与える部分などといった、1つ以上の追加部分に結合することができる。改善された薬物動態は、認知された治療ニーズに応じて評価することができる。多くの場合、バイオアベイラビリティを増加させること、および/または、投与後の血清中でタンパク質が利用可能な状態を保つ時間を増加させることなどによって投与間隔を増加させることが望ましい。場合によっては、タンパク質の血清中濃度の経時的な持続性を改善する（例えば投与直後と次の投与の直前におけるタンパク質の血清中濃度の差を減少させる）ことが望ましい。血液からのタンパク質のクリアランスを遅くする傾向を持つ部分を、本明細書では「PK部分」と呼び、これには、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、糖類（例えばシアル酸）、および忍容性の高いタンパク質部分（例えばFc、Fcフラグメントまたは血清アルブミン）が含まれる。本発明のポリペプチドは、米国特許出願公開第20070048282号に記載されているように、アルブミンまたはアルブミンのフラグメント（一部分）もしくは変種に融合することができる。単一ドメインポリペプチドを、哺乳動物（例えばマウス、ラット、またはヒト）におけるそのポリペプチドのクリアランス率を無修飾のポリペプチドと比較して3分の1未満に低下させる部分に取付けてもよい。改善された薬物動態の他の尺度には、しばしば相と相に分割される血清中半減期が含まれる。適当な部分を付加することにより、一方または両方の相を有意に改善することができる。ポリエチレングリコールを使用する場合は、1つ以上のPEG分子を、タンパク質中の異なる位置に取付けることができ、そのような取付は、アミン、チオールまたは他の適切な反応基との反応によって達成することができる。PEG化は部位特異的PEG化によって達成することができ、この場合は、PEG化が優先的に起こる部位を作出するために、適切な反応基がタンパク質中に導入される。好ましい実施形態では、望ましい位置にシステイン残基を持つことになるようにタンパク質を修飾して、そのシステインでの部位特異的PEG化を可能にする。PEGは広くさまざまな分子量を持つことができ、分岐していてもよいし、線状でもよい。注目すべきことに、本開示は、PEG化が¹⁰F_n3ポリペプチドのターゲット結合活性と両立できること、そしてさらに、PEG化がそのようなポリペプチドの薬物動態を改善することを立証する。したがって、ある実施形態において、本開示はPEG化型の¹⁰F_n3ポリペプチドを提供する（そのポリペプチドが結合することのできるターゲットは問わない）。

【0111】

いくつかの実施形態では、本発明のポリペプチドがフィブロネクチンベースのスクャフォールドタンパク質とPK部分とのコンジュゲートを含む。フィブロネクチンベースのスクャフォールドタンパク質はどのヒトタンパク質を結合してもよく、好ましくは¹⁰F_n3ドメインから誘導される。PK部分はフィブロネクチンベーススクャフォールドタンパク質の薬物動態を改善する任意の部分であることができる。いくつかの実施形態では、PK部分がスクャフォールドタンパク質の血清中半減期を少なくとも2倍にする。いくつかの実施形態では、PK部分がポリペプチドリンカーを介してスクャフォールドタンパク質に連結される。典型的なポリペプチドリンカーには、PSTSTST（配列番号244）、EIDKPSQ（配列番号245）、およびGSリンカー、例えばGSGSGSGSGS（配列番号246）およびそのマルチマーなどがある。いくつかの実施形態では、PK部分がヒト血清アルブミンである。いくつかの実施形態では、PK部分がトランスフェリンである。

【0112】

一定の態様において、本開示は、細胞におけるIGFの生物学的活性を阻害するために、またはIGF-IRによって媒介される生物学的活性を阻害するために、IGF-IR結合タンパク質を使用する方法を提供する。細胞はインビボまたはエクスピボに位置することができ、例えば生きている生物の細胞、培養細胞または組織試料中の細胞であることができる。本方法は、前記細胞を、本明細書に開示するIGF-IR阻害ポリペプチドのいずれかと、そのような生物学的活性を阻害するのに十分な量で、十分な時間、接触させることを含む。

【0113】

一定の態様において、本開示は、IGFまたはIGF-IRの阻害に応答する状態を持つ対象を処置するための方法を提供する。そのような方法は、本明細書に記載のIGF-IR阻害ポリペ

10

20

30

40

50

プチドのいずれかの有効量を前記対象に投与することを含みうる。状態は、不適当なIGF-IRバイオロジーを特徴とするものであることができる。本明細書に記載するIGF-IR阻害ポリペプチドはいずれも、障害、特に自己免疫障害、再狭窄、およびがんからなる群より選択される障害を処置するための医薬の製造に使用することができる。

【0114】

一定の態様において、本開示は、試料中のIGF-IRを検出するための方法を提供する。方法は、試料を本明細書に記載のIGF-IR結合ポリペプチドと接触させること（この場合、前記接触は、ポリペプチド-IGF-IR複合体の形成を許す条件下で行われる）、および前記複合体を検出することによって、前記試料中の前記IGF-IRを検出することを含みうる。検出は、例えば放射線写真法、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、当技術分野で知られる任意の技法を使って行うことができる。試料は多くの場合、生物学的試料、例えば生検材料、特に腫瘍、腫瘍と疑われる組織の生検材料であるだろう。試料はヒトまたは他の哺乳動物に由来しうる。IGF-IR結合ポリペプチドは、放射性部分、蛍光部分、発色部分、化学発光部分、またはハプテン部分などのラベリング部分で標識することができる。IGF-IR結合ポリペプチドを固形支持体上に固定化してもよい。

【0115】

本開示のもう一つの態様は、本明細書に開示するポリペプチドをコードする核酸配列を含む核酸に関する。一定の実施形態では、核酸が、本明細書に開示する表中のタンパク質配列のいずれかからなる群より選択されるポリペプチドをコードする核酸配列を含みうる。

【0116】

本開示のさらにもう一つの態様は、プロモーターと作動的に連結された核酸を含む発現ベクターであって、核酸が本明細書に開示するポリペプチドをコードするものに関する。本開示のもう一つの態様は、本明細書に開示する核酸を含む細胞に関する。IGF-IRを結合するポリペプチドを製造する方法であって、本開示のポリペプチドをコードする核酸を発現させることを含む方法も提供する。一定の実施形態では、核酸が、本明細書に開示する表中の配列およびそれらに対応するタンパク質のいずれかからなる群より選択されるポリペプチドをコードする配列を含みうる。一定の実施形態では、核酸を細胞内で発現させる。あるいは、核酸を無細胞系で発現させる。

【0117】

一定の態様において、本開示は、どのターゲットを結合するように当該ポリペプチドを改変するかを問わず、任意の¹⁰F_n3ポリペプチドに応用することができるであろう発見を提供する。上記のように、本開示は、PEGを使って、ターゲット結合に意味のある妨害をなすことなく、¹⁰F_n3ポリペプチドの薬物動態をうまく改善できることを実証する。したがって、本開示は、ターゲットに結合し、非PEG化ポリペプチドと比較して改善された薬物動態を持つ、PEG化¹⁰F_n3ポリペプチドを提供する。さらにもう一つの実施形態において、本開示は、¹⁰F_n3ポリペプチドの最初の8アミノ酸の欠失がターゲット結合アフィニティを増加させうることを実証する。したがって本開示は、最初の8アミノ酸（配列番号1の配列を基準として番号づけられたアミノ酸）を欠く¹⁰F_n3ポリペプチドを提供する。翻訳と適正なプロセッシングを助長するために、欠失型のポリペプチドに1つまたは2つのアミノ酸を付加しなおすこともできると理解される。本開示は、¹⁰F_n3ポリペプチドの皮下投与が、血流へのポリペプチドの放出を遅延させ、¹⁰F_n3ポリペプチドの最大血清中濃度を低下させることを実証する。したがって本開示は、¹⁰F_n3ポリペプチドを皮下投与によって患者に投与する方法を提供する。この投与経路は、静脈内投与と比較して放出を遅延させ、かつ/または、¹⁰F_n3ポリペプチドの最大血清中濃度を、同じ投薬量の静脈内投与によって達成される最大血清中濃度と比較して、少なくとも25%または少なくとも50%は減少させるのに役立つ。投与される¹⁰F_n3ポリペプチドは、¹⁰F_n3ポリペプチドの血清中半減期を増加させる（またはクリアランス率を減少させる、または別の薬物動態パラメータに同様の影響を及ぼす）部分、例えばポリエチレングリコール部分などに取付けることができる。好ましくは、投与される¹⁰F_n3ポリペプチドが、配列番号1と少なくとも60%、65%

、70%、75%、80%、85%、90%同一であるアミノ酸配列を含む。

【0118】

一定の態様において、本開示は、第1の哺乳動物に由来する事前に選択されたターゲットタンパク質と、第2の哺乳動物に由来するそのホモログとに結合する単ドメインポリペプチドを提供する。そのような単ドメインポリペプチドは、第1哺乳動物がヒトであり、かつ第2哺乳動物が前臨床試験を行うのに望ましい哺乳動物、例えばマウス、ラット、モルモット、イヌ、または非ヒト霊長類である場合には、特に有用である。本開示は、そのような二重特異性を持つように単ドメインポリペプチドを改変することができることと、その二重特異性が、ヒト細胞、ヒト被験者および動物モデルでの同じポリペプチドの試験を可能にすることによって、薬物開発を簡略化することとを実証する。好ましくは、第1哺乳動物の事前に選択されたターゲットタンパク質と第2哺乳動物に由来するそのホモログとは、二重特異性ペプチドの生成が可能であるようにアミノ酸配列が十分に類似している。例えば、事前に選択されたターゲットタンパク質と第2の哺乳動物に由来するホモログとは、少なくとも50アミノ酸の領域にわたって、少なくとも80%、90%、または95%の一致度を共有することができ、場合によっては、タンパク質配列全体にわたって、または膜タンパク質であれば細胞外ドメインの配列にわたって、少なくとも80%、90%、または95%の一致度を共有することができる。このタイプの二重特異性結合特徴を持つ単ドメインポリペプチドは、免疫グロブリンまたは免疫グロブリン様ドメインを含むことができ、好ましくは、事前に選択されたヒトターゲットタンパク質とそのホモログとの両方に、 $1 \times 10^{-6} \text{M}$ 、 $1 \times 10^{-7} \text{M}$ 、 $5 \times 10^{-8} \text{M}$ 、 $1 \times 10^{-8} \text{M}$ または $1 \times 10^{-9} \text{M}$ 未満の解離定数で結合するだろう。

【0119】

その他のアッセイ

本発明のIGF-IR結合タンパク質による、インビボでの、チロシンリン酸化、IGF-IRレベルを介したIGF-IRの阻害、または腫瘍細胞成長の阻害

さらにもう一つの実施形態では、本発明のタンパク質により、インビボでIGF-IRのチロシンリン酸化レベルもしくは受容体レベルまたはその両方を抑制するIGF-IR結合剤が得られる。ある実施形態では、動物へのIGF-IR結合剤の投与が、IGF-IR発現腫瘍におけるIGF-IRホスホチロシンシグナルの減少を引き起こす。好ましい実施形態では、IGF-IR結合剤が、ホスホチロシンシグナルを少なくとも20%減少させる。より好ましい実施形態では、IGF-IR結合剤が、ホスホチロシンシグナルを少なくとも50%、さらに好ましくは60%減少させる。より一層好ましい実施形態では、結合剤が、ホスホチロシンシグナルを少なくとも70%、より好ましくは80%、さらに好ましくは90%減少させる。

【0120】

もう一つの実施形態では、動物へのIGF-IR結合剤の投与が、IGF-IR発現腫瘍におけるIGF-IRレベルの減少を引き起こす。好ましい実施形態では、IGF-IR結合剤が、受容体レベルを、無処置の動物と比較して少なくとも20%減少させる。より好ましい実施形態では、IGF-IR結合剤が、受容体レベルを、無処置の動物における受容体レベルの少なくとも50%、より好ましくは60%まで減少させる。より一層好ましい実施形態では、結合剤が、受容体レベルを、少なくとも70%、より好ましくは80%減少させる。

【0121】

インビボ調整

本発明のタンパク質のもう一つの実施形態では、IGF-IR結合剤がインビボで腫瘍細胞成長を阻害する。腫瘍細胞は任意の細胞タイプ、例えば限定するわけではないが、表皮細胞、上皮細胞、内皮細胞、白血病、肉腫、多発性骨髄腫、または中胚葉細胞などに由来する。異種移植片腫瘍研究で使用される一般的腫瘍細胞株の例には、A549（非小細胞肺癌）細胞、DU-145（前立腺）細胞、MCF-7（乳房）細胞、Colo 205（結腸）細胞、3T3/IGF-IR（マウス線維芽細胞）細胞、NCI H441細胞、HEP G2（肝細胞癌）細胞、MDA MB 231（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細胞などがある。好ましい実施形態では、結

合剤が、無処置動物における腫瘍の成長と比較して、腫瘍細胞成長を阻害する。より好ましい実施形態では、結合剤が腫瘍細胞成長を50%阻害する。より一層好ましい実施形態では、結合剤が腫瘍細胞成長を60%、65%、70%、または75%阻害する。ある実施形態では、動物が結合剤による処置を開始した少なくとも7日後に、腫瘍細胞成長の阻害が測定される。さらに好ましい実施形態では、動物が結合剤による処置を開始した少なくとも14日後に、腫瘍細胞成長の阻害が測定される。もう一つの好ましい実施形態では、もう一つの抗新生物剤がIGF-1R結合剤と共に動物に投与される。好ましい実施形態において、その抗新生物剤は、腫瘍細胞成長をさらに阻害することができる。より一層好ましい実施形態では、抗新生物剤がアドリマイシン、タキソール、タモキシフェン、5-フルオロデオキシウリジン (5-FU) またはCP-358,774である。

10

【0122】

その他の二重特異性および多重特異性実施形態

多くの実施形態では、多重特異性組成物、例えば2つ以上のターゲットまたは他の興味あるタンパク質を結合する組成物を作製することが望ましいだろう。ある態様では、本発明のタンパク質が、第1の所望するターゲット（例えばIGF-1R）に対して約10nM以下の結合アフィニティー（本明細書に記載する他の適当なアフィニティー）を持つ第1タンパク質を含み、前記第1タンパク質は、所望しない関連ターゲット（例えばヒトインスリン受容体）を約1 μ M以上の結合アフィニティー（本明細書に記載する他の適当なアフィニティー）で結合し、好ましくは単ドメインであるか、実質上一価であり、その第1タンパク質は、第2の所望するターゲット（例えばEGFR、c-Met、c-kit、Her2、FGFR1、VEGFR2、VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D、葉酸受容体）に対して約10nM以下の結合アフィニティー（本明細書に記載する他の適当なアフィニティー）を持つ第2タンパク質に連結されていて、前記第2タンパク質は、所望しない関連ターゲット（例えばヒトインスリン受容体）を約1 μ M以上の結合アフィニティー（本明細書に記載する他の適当なアフィニティー）で結合し、好ましくは単ドメインであるか、実質上一価である。二重特異性を持つそのような分子は、さらに、本明細書に記載する他のタンパク質を含む他の分子に取付けることができる。

20

【0123】

ある態様では、本発明のタンパク質が、IGF-1Rに結合する第1¹⁰Fn3ドメインとVEGFR2を結合する第2¹⁰Fn3ドメインとを含む。VEGFR-2結合ポリペプチドは参照により本明細書に組み込まれるPCT公開番号WO2005/056764に記載されているように生成させた。本発明に役立つ好ましいVEGFR-2結合¹⁰Fn3ポリペプチドの配列を図30の配列番号126~183に示す。本発明のタンパク質は、最初の8アミノ酸が欠失している開示のアミノ酸配列を含み、N末端またはC末端に追加のアミノ酸を含みうる。例えば追加のMG配列をN末端に置くことができる。通常、このMは切り離されて、N末端にGEV...配列が残るだろう。N末端に正常な8アミノ酸を再付加することでも、望ましい特性を持つVEGFR2結合タンパク質が得られる。いくつかの実施形態では、N末端メチオニンが切り離される。インピボで使用するために、PEG化に適した型を生成させることができる。ある実施形態では、システインを含むC末端テールを付加することができる（例えばEIDKPCQ（配列番号225）をC末端に付加する）。

30

【0124】

ある態様では、本発明のタンパク質が、第1の所望するターゲット（例えばEGFR）に対して約10nM以下の結合アフィニティー（本明細書に記載する他の適当なアフィニティー）を持つ第1タンパク質を含み、前記第1タンパク質は、所望しない関連ターゲット（例えばヒトインスリン受容体）を約1 μ M以上の結合アフィニティー（本明細書に記載する他の適当なアフィニティー）で結合し、好ましくは単ドメインであるか、実質上一価であり、その第1タンパク質は、第2の所望するターゲット（例えばHer2、葉酸受容体）に対して約10nM以下の結合アフィニティー（本明細書に記載する他の適当なアフィニティー）を持つ第2タンパク質に連結されていて、前記第2タンパク質は、所望しない関連ターゲット（例えばヒトインスリン受容体）を約1 μ M以上の結合アフィニティー（本明細書に記載する他の適当なアフィニティー）で結合し、好ましくは単ドメインであるか、実質上一価で

40

50

ある。二重特異性を持つそのような分子は、さらに、本明細書に記載する他のタンパク質を含む他の分子に取付けることができる。

【0125】

ある態様では、本発明のタンパク質が、第1の所望するターゲット（例えばEGFR）に対して約10nM以下の結合アフィニティー（本明細書に記載する他の適当なアフィニティー）を持つ第1タンパク質を含み、前記第1タンパク質は、所望しない関連ターゲット（例えばヒトインスリン受容体）を約1 μ M以上の結合アフィニティー（本明細書に記載する他の適当なアフィニティー）で結合し、好ましくは単一ドメインであるか、実質上一価であり、その第1タンパク質は、第2の所望するターゲット（例えばVEGFR2）に対して約10nM以下の結合アフィニティー（本明細書に記載する他の適当なアフィニティー）を持つ第2タンパク質に連結されていて、前記第2タンパク質は、所望しない関連ターゲット（例えばVEGFR1）を約1 μ M以上の結合アフィニティー（本明細書に記載する他の適当なアフィニティー）で結合し、好ましくは単一ドメインであるか、実質上一価である。二重特異性を持つそのような分子は、さらに、本明細書に記載する他のタンパク質を含む他の分子に取付けることができる。

10

【0126】

ある態様では、本発明のタンパク質が、第1の所望するターゲット（例えばHer2）に対して約10nM以下の結合アフィニティー（本明細書に記載する他の適当なアフィニティー）を持つ第1タンパク質を含み、前記第1タンパク質は、所望しない関連ターゲット（例えばHer4）を約1 μ M以上の結合アフィニティー（本明細書に記載する他の適当なアフィニティー）で結合し、好ましくは単一ドメインであるか、実質上一価であり、その第1タンパク質は、第2の所望するターゲット（例えばVEGFR2）に対して約10nM以下の結合アフィニティー（本明細書に記載する他の適当なアフィニティー）を持つ第2タンパク質に連結されていて、前記第2タンパク質は、所望しない関連ターゲット（例えばVEGFR1）を約1 μ M以上の結合アフィニティー（本明細書に記載する他の適当なアフィニティー）で結合し、好ましくは単一ドメインであるか、実質上一価である。二重特異性を持つそのような分子は、さらに、本明細書に記載する他のタンパク質を含む他の分子に取付けることができる。

20

【0127】

ある態様では、本発明のタンパク質が、第1の所望するターゲット（例えばFGFR1、c-Met、c-kit）に対して約10nM以下の結合アフィニティー（本明細書に記載する他の適当なアフィニティー）を持つ第1タンパク質を含み、前記第1タンパク質は、所望しない関連ターゲット（例えばヒトインスリン受容体）を約1 μ M以上の結合アフィニティー（本明細書に記載する他の適当なアフィニティー）で結合し、好ましくは単一ドメインであるか、実質上一価であり、その第1タンパク質は、第2の所望するターゲット（例えばVEGFR2）に対して約10nM以下の結合アフィニティー（本明細書に記載する他の適当なアフィニティー）を持つ第2タンパク質に連結されていて、前記第2タンパク質は、所望しない関連ターゲット（例えばVEGFR1）を約1 μ M以上の結合アフィニティー（本明細書に記載する他の適当なアフィニティー）で結合し、好ましくは単一ドメインであるか、実質上一価である。二重特異性を持つそのような分子は、さらに、本明細書に記載する他のタンパク質を含む他の分子に取付けることができる。

30

40

【0128】

ある態様では、本発明のタンパク質が、第1の所望するターゲット（例えばHer2）に対して約10nM以下の結合アフィニティー（本明細書に記載する他の適当なアフィニティー）を持つ第1タンパク質を含み、前記第1タンパク質は、所望しない関連ターゲット（例えばヒトインスリン受容体）を約1 μ M以上の結合アフィニティー（本明細書に記載する他の適当なアフィニティー）で結合し、好ましくは単一ドメインであるか、実質上一価であり、その第1タンパク質は、第2の所望するターゲット（例えばHer3）に対して約10nM以下の結合アフィニティー（本明細書に記載する他の適当なアフィニティー）を持つ第2タンパク質に連結されていて、前記第2タンパク質は、所望しない関連ターゲット（例えばHer4）を約1 μ M以上の結合アフィニティー（本明細書に記載する他の適当なアフィニティー）

50

で結合し、好ましくは単一ドメインであるか、実質上一価である。二重特異性を持つそのような分子は、さらに、本明細書に記載する他のタンパク質を含む他の分子に取付けることができる。

【0129】

その他のPEG実施形態

我々の知る限り、PEG（または機能的に類似する分子）を使って、単一のターゲットを結合する非抗体部分である2つのタンパク質（特に各結合タンパク質が単一ドメインまたは多ドメインから構成されていて、通常は各ドメインが（5～20アミノ酸の小さなペプチドではなく）約50または約60または約75アミノ酸以上であるタンパク質）をつなぐことができたのは、これが初めてである。そのような実施形態では、好ましくはフィブロネクチン
10
スキファールドタンパク質を、より好ましくはCysまたはLysアミノ酸を適切に工作して、有利に使用することができる。

【0130】

我々の知る限り、PEG（または機能的に類似する分子）を使って、2つ以上の異なるターゲットまたは興味あるタンパク質（例えばPK調整タンパク質）を結合する非抗体部分である2つのタンパク質（特に各結合タンパク質が単一ドメインまたは多ドメインから構成されていて、通常は各ドメインが（5～20アミノ酸の小さなペプチドではなく）約50または約60または約75アミノ酸以上であるタンパク質）をつなぐことができたのは、これが初めてである。そのような実施形態では、好ましくはフィブロネクチン
20
スキファールドタンパク質を、より好ましくはCysまたはLysアミノ酸を適切に工作して、有利に使用することができる。

【0131】

また、本発明の非PEG態様およびPEG態様は、抗体部分（例えばラクダ抗体およびその誘導体、ならびに単鎖抗体およびドメイン抗体；特に微生物から発現されるもの）および抗体様部分（例えばリボカリン、アンキリン、多Cys-Cysドメイン、およびテトラネクチンの誘導体；特に微生物から発現されるもの）、特にPEGでつながれる約40kDa未満のもの、より好ましくは限られた数のcysアミノ酸を持つものを含む。

【0132】

本発明のPEG連結タンパク質には、今まで認識されることも発見されることもなかった数多くの特性および利点がある。そのようなタンパク質を微生物で発現させる場合は、ド
30
メインを単離してから、PEGまたは他のポリマーリンカーを介してそれらを連結することが好ましいだろう。以下に挙げる特徴の1つ以上を持つタンパク質を創製するために、PEGまたは他の機能的に作動するポリマーリンカーを使って、各タンパク質部分間の距離を最適に変化させることができる：1）興味あるタンパク質（例えばターゲット）に結合するときの、1つ以上のタンパク質ドメインの結合の立体障害の増加または減少、2）異なるターゲットを結合する2つ以上のドメインをつなぐ、3）安定性または溶解度を増加させるための追加アミノ酸置換を探索することなく、タンパク質の安定性または溶解度を増加させる（例えば少なくとも約20mg/mlまたは少なくとも約50mg/mlの溶解度）、4）（例えばSECによって測定される）安定性を減少させるための追加アミノ酸置換を探索することなく、タンパク質凝集を減少させる、4）追加の結合ドメインを付加することにより、興味あ
40
るタンパク質に対する当該タンパク質の総合的アビディティまたはアフィニティを増加させる。

【0133】

本発明の¹⁰F_n3ポリペプチドはPEG化してもリガンド結合活性を保つことができる。好ましい実施形態では、PEG化¹⁰F_n3ポリペプチドが、部位特異的PEG化によって、特にN末端またはC末端にあるシステイン部分へのPEGのコンジュゲーションによって製造される。したがって本開示は、改善された薬物動態特性を持つターゲット結合¹⁰F_n3ポリペプチドであ
って、約80～約150個のアミノ酸を持つ¹⁰F_n3ドメイン（この¹⁰F_n3ドメインのループの少なくとも一つはターゲット結合に参加する）と、共有結合されたPEG部分とを含み、前記¹⁰F_n3ポリペプチドがターゲットに100nM未満のK_Dで結合し、かつ哺乳動物において30mL/時
50

間/kg未満のクリアランス率を持つポリペプチドを提供する。PEG部分は部位特異的PEG化によって、例えばCys残基への取付けによって（この場合、Cys残基は、 $^{10}\text{Fn3}$ ポリペプチドのN末端に位置するか、またはN末端と最もN末端側にある スtrandまたは 様strandととの間に位置するか、 $^{10}\text{Fn3}$ ポリペプチドのC末端に位置するか、C末端と最もC末端側にある スtrandまたは 様strandととの間に位置することができる）、 $^{10}\text{Fn3}$ ポリペプチドに取付けることができる。Cys残基は他の位置、特にターゲット結合に参加しないループのいずれかにあってもよい。PEG部分は、アミンへのコンジュゲーションによる方法など、他の化学反応によって取付けることもできる。また、本発明は、抗体部分（例えばラクダ抗体およびその誘導体、ならびに単鎖抗体およびドメイン抗体；特に微生物から発現されるもの）および抗体様部分（例えばリボカリン、アンキリン、多Cys-Cysドメイン、およびテトラネクチンの誘導体；特に微生物から発現されるもの）、特にPEGでつながれる約40kDa未満のもの、より好ましくは限られた数のcysアミノ酸を持つものへの、このタイプのN末端またはC末端PEGコンジュゲーションも包含する。

【0134】

ある具体的実施形態では、対象可溶性ポリペプチドの修飾型が、非タンパク質性ポリマーへの対象可溶性ポリペプチドの連結を含む。ある具体的実施形態では、ポリマーが、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号に記載されてい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。本発明の修飾ポリペプチドの例には、本明細書でさらに説明するPEG化タンパク質が含まれる。

【0135】

PEGは周知の水溶性ポリマーであり、これは市販されているか、または当技術分野で周知の方法に従って、エチレングリコールの開環重合によって製造することができる（SanderおよびKaro「Polymer Synthesis」Academic Press, ニューヨーク, 第3巻138~161頁）。「PEG」という用語は、サイズまたはPEGの末端における修飾を考慮することなく、任意のポリエチレングリコール分子を包含するために広く使用され、式： $\text{X-O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_{n-1}\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ (1) [式中、 n は20~2300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]によって表すことができる。ある実施形態において、本発明のPEGは一端がヒドロキシまたはメトキシで終わる（すなわち X はHまたは CH_3 （「メトキシPEG」である）。PEGは、結合反応に必要なさらなる化学基であって、その分子の化学合成によってもたらされるもの、またはその分子の部分間の距離を最適にするためのスペーサーであるものを含有することができる。また、そのようなPEGは、互いに連結された1つ以上のPEG側鎖からなることができる。2つ以上のPEG鎖を持つPEGは、分枝型PEGまたは分岐PEGと呼ばれる。分岐PEGは、例えばグリセロール、ペンタエリトリール、およびソルビトールを含むさまざまなポリオールへのポリエチレンオキシドの付加によって製造することができる。例えば4分枝型分岐PEGはペンタエリトリールとエチレンオキシドから製造することができる。分岐PEGは例えば欧州特許出願公開第473084A号および米国特許第5,932,462号に記載されている。PEGの一形態には、リジンの1級アミノ基を介して連結された2つのPEG側鎖（PEG2）が含まれる（Monfardini, C.ら, Bioconjugate Chem. 6 (1995) 62-69）。

【0136】

PEGは周知であるが、我々が知る限り、2つの独立した $^{10}\text{Fn3}$ ポリペプチドをPEG化してもリガンド結合活性が保たれうることを実証したのは、これが初めてである。好ましい実施形態では、PEG化 $^{10}\text{Fn3}$ ポリペプチドが、部位特異的PEG化によって、特にN末端またはC末端にあるシステイン部分へのPEGのコンジュゲーションによって製造される。したがって本開示は、改善された薬物動態特性を持つターゲット結合 $^{10}\text{Fn3}$ ポリペプチドであって、約80~約150個のアミノ酸を持つ $^{10}\text{Fn3}$ ドメイン（この $^{10}\text{Fn3}$ ドメインのループの少なくとも一つはターゲット結合に参加する）と、共有結合されたPEG部分とを含み、前記 $^{10}\text{Fn3}$ ポリペプチドがターゲットに100nM未満の K_D で結合し、かつ哺乳動物において30mL/時間/kg未満のクリアランス率を持つポリペプチドを提供する。PEG部分は部位特異的PEG化によって、例えばCys残基への取付けによって（この場合、Cys残基は、 $^{10}\text{Fn3}$ ポリペプチドのN末

端に位置するか、またはN末端と最もN末端側にある ストランドまたは 様ストランドとの間に位置するか、¹⁰F_n3ポリペプチドのC末端に位置するか、C末端と最もC末端側にある ストランドまたは 様ストランドとの間に位置することができる)、¹⁰F_n3ポリペプチドに取付けることができる。Cys残基は他の位置、特にターゲット結合に参加しないループのいずれかにあってもよい。PEG部分は、アミンへのコンジュゲーションによる方法など、他の化学反応によって取付けることもできる。

【0137】

ペプチドまたはタンパク質へのPEGコンジュゲーションは、一般に、PEGの活性化と、活性化されたPEG中間体のターゲットタンパク質/ペプチドへの直接的カップリング、またはリンカーへのカップリング(このリンカーは、次に活性化されて、ターゲットタンパク質/ペプチドにカップリングされる)とを伴う(Abuchowski, A.ら, *J. Biol. Chem.*, 252, 3571 (1977)および*J. Biol. Chem.*, 252, 3582 (1977)、J. M. Harris編「Poly(ethylene glycol) Chemistry: Biotechnical and Biomedical Applications」(Plenum Press: ニューヨーク, 1992)の第21章および第22章(ZalipskyらおよびHarrisら)を参照されたい)。PEG分子を含有する結合ポリペプチドはコンジュゲートタンパク質とも呼ばれており、これに対して、PEG分子が取付けられていないタンパク質を非コンジュゲート型と呼ぶことができることに注意されたい。

【0138】

本発明の結合ポリペプチドへのコンジュゲーションには、例えば約1,000ダルトン(Da)から100,000Da(nが20~2300)まで、さまざまな分子質量型のPEGを選択することができる。PEG中の繰返し単位の数「n」はダルトンで記載される分子質量の概略値になる。活性化されたリンカー上のPEGの合計分子質量が医薬的使用にとって適切であることが好ましい。したがってある実施形態では、PEG分子の分子質量が100,000Daを超えない。例えば、3つのPEG分子がリンカーに取付けられ、各PEG分子が12,000Da(各nは約270)という同じ分子質量を持つならば、リンカー上のPEGの合計分子質量は約36,000Da(合計nは約820)である。リンカーに取付けられるPEGの分子質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分子がそれぞれ5,000Da(各nは約110)であり、1つのPEG分子が12,000Da(nは約270)であることもできる。

【0139】

本発明の具体的な一実施形態では、IGF-1Rまたは他の受容体結合ポリペプチドが、式： $-CO-(CH_2)_x-(OCH_2CH_2)_m-OR$ [式中、ポリ(エチレングリコール)基の-CO(すなわちカルボニル)は結合ポリペプチドのアミノ基の一つとアミド結合を形成する；Rは低級アルキルである；xは2または3である；mは約450~約950である；そしてnおよびmは、コンジュゲートの分子量から結合ポリペプチドを差し引いたものが約10~約40kDaになるように選択される]の1つのポリ(エチレングリコール)基に共有結合される。ある実施形態では、結合ポリペプチドのリジンの -アミノ基が利用可能な(遊離)アミノ基である。

【0140】

上記のコンジュゲートは、式(II)： $P-NHCO-(CH_2)_x-(OCH_2CH_2)_m-OR$ (II) [式中、Pは上述した結合ポリペプチドの基(すなわち、式(II)に示すカルボニル基とアミド結合を形成する1つまたは複数のアミノ基を除くもの)である；またRは低級アルキルである；xは2または3である；mは約450~約950であり、コンジュゲートの分子量から結合ポリペプチドを差し引いたものが約10~約40kDaになるように選択される]によって、より具体的に表すことができる。本明細書において、与えられた「m」の範囲は指針的意味合いを持つ。「m」の範囲はいずれの場合も、正確にはPEG基の分子量によって決定される。

【0141】

当業者は、例えばPEG化結合ポリペプチドを治療的に使用方法、望ましい投薬量、循環時間、タンパク質分解に対する耐性、免疫原性、および他の考慮すべき事項に基づいて、PEGの適切な分子質量を選択することができる。PEGおよびタンパク質の性質を強化するためのその使用に関する議論については、N. V. Katre, *Advanced Drug Delivery Reviews* 10: 91-114 (1993)を参照されたい。

【0142】

本発明の一実施形態では、PEG分子を活性化して、結合ポリペプチド上のアミノ基、例えばリジンと反応させることができる (Bencham C. O.ら, Anal. Biochem., 131, 25 (1983); Veronese, F. M.ら, Appl. Biochem., 11, 141 (1985); Zalipsky, S.ら, Polymeric Drugs and Drug Delivery Systems, adrs 9-110 ACS Symposium Series 469 (1999); Zalipsky, S.ら, Europ. Polym. J., 19, 1177-1183 (1983); Delgado, C.ら, Biotechnology and Applied Biochemistry, 12, 119-128 (1990))。

【0143】

ある具体的実施形態では、PEGの炭酸エステルを使って、PEG結合ポリペプチドコンジュゲートを形成させる。PEGとの反応にN,N'-ジスクシンイミジルカーボネート (DSC) を使って、活性な混合PEG-スクシンイミジルカーボネートを形成させ、次にそれをリンカーの求核基または結合ポリペプチドのアミノ基と反応させることもできる (米国特許第5,281,698号および米国特許第5,932,462号)。類似するタイプの反応で、1,1'-(ジベンゾトリアゾリル)カーボネートおよびジ-(2-ピリジル)カーボネートをPEGと反応させて、それぞれPEG-ベンゾトリアゾリルおよびPEG-ピリジル混合カーボネートを形成させることができる (米国特許第5,382,657号)。

【0144】

¹⁰F_n3ポリペプチドのPEG化は、最新技術の方法に従って、例えば結合ポリペプチドと求電子的に活性なPEG (供給業者: Shearwater Corp., USA, www.shearwatercorp.com) との反応によって行うことができる。本発明の好ましいPEG試薬は、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分岐N-ヒドロキシスクシンイミド、例えばmPEG2-NHS (Monfardini, C.ら, Bioconjugate Chem. 6 (1995) 62-69) である。そのような方法を使って、結合ポリペプチドのリジンの -アミノ基または結合ポリペプチドのN末端アミノ基をPEG化することができる。

【0145】

もう一つの実施形態では、結合ポリペプチドのスルフヒドリル基にPEG分子をカップリングすることができる (Sartore, L.ら, Appl. Biochem. Biotechnol., 27, 45 (1991); Morpurgoら, Biocon. Chem., 7, 363-368 (1996); Goodsonら, 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させることができる典型的な反応性PEG種が記載されている。

【0146】

PEG分子が結合ポリペプチド上のシステイン残基にコンジュゲートされるいくつかの実施形態では、システイン残基がその結合ポリペプチドにとってネイティブであるが、別の実施形態では、1つ以上のシステイン残基が結合ポリペプチド中に工学的に導入される。結合ポリペプチドコード配列中に突然変異を導入してシステイン残基を生成させることができる。これは、例えば1つ以上のアミノ酸残基をシステインに変異させることなどによって達成できるかもしれない。システイン残基へと変異させるのに好ましいアミノ酸には、セリン、スレオニン、アラニンおよび他の親水性残基がある。好ましくは、システインに変異させるべき残基は、表面露出残基である。タンパク質の一次配列に基づいて残基の表面露出性を予測するためのアルゴリズムは、当技術分野ではよく知られている。あるいは、結合ポリペプチドを設計し発展させる際の基礎となったフレームワークの結晶構造が解かれており (Himanenら, Nature. (2001) 20-27; 414(6866):933-8参照)、それゆえに表面露出残基が同定されているのであれば、結合ポリペプチドのアミノ酸配列を比較することによって、表面残基を予測することもできる。ある実施形態では、システイン残基が結合ポリペプチドのN末端および/またはC末端またはその近くに導入されるか、ループ領域内に導入される。

【0147】

いくつかの実施形態では、PEG化結合ポリペプチドが、N末端アミノ酸のアミノ基に共

10

20

30

40

50

有結合で取付けられたPEG分子を含む。部位特異的なN末端の還元的アミノ化はPepinskyら(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してタンパク質の還元的アミノ化を行うためのPEG-アルデヒドの使用は、米国特許第4,002,531号、Wiederら(1979) J. Biol. Chem. 254,12579、およびChamowら(1994) Bioconjugate Chem. 5, 133に記載されている。

【0148】

もう一つの実施形態では、PEG化結合ポリペプチドが、リンカーに共有結合で取付けられた1つ以上のPEG分子を含み、そのリンカーが結合ポリペプチドのN末端にあるアミノ酸残基のアミノ基に取付けられる。そのようなアプローチは米国特許出願公開第2002/0044921号およびPCT公開番号W094/01451に開示されている。

10

【0149】

ある実施形態では、結合ポリペプチドがC末端でPEG化される。具体的な一実施形態では、C末端アジド-メチオニンを導入してから、シュタウディンガー反応でメチル-PEG-トリアリールホスフィン化合物をコンジュゲートすることによって、タンパク質が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ら「C-Terminal Site-Specific PEGylation of a Truncated Thrombomodulin Mutant with Retention of Full Bioactivity」Bioconjug Chem. 2004;15(5):1005-1009に開示されている。

【0150】

結合ポリペプチドのモノPEG化は、PCT公開番号W094/01451に記載の一般法に従って製造することもできる。W094/01451には、修飾末端アミノ酸 炭素反応性基を持つ組換えポリペプチドを製造する方法が記載されている。この方法のステップには、組換えポリペプチドを形成させること、ならびにそのN末端 -アミンおよびC末端 -カルボキシルを1つ以上の生物学的に付加される保護基で保護することが含まれる。次に、そのポリペプチドを化学的保護剤と反応させて反応性側鎖を選択的に保護し、そうすることによって側鎖基が修飾されるのを防ぐことができる。次にそのポリペプチドを生物学的保護基に特異的な切断剤で切断して、保護されていない末端アミノ酸 炭素反応性基を形成させる。この保護されていない末端アミノ酸 炭素反応性基を化学修飾剤で修飾する。次に、その側鎖保護され末端修飾された単コピーポリペプチドの側鎖基を脱保護して、末端修飾された組換え単コピーポリペプチドを形成させる。この方法におけるステップの数と順序を変更して、ポリペプチドのN末端および/またはC末端アミノ酸の選択的修飾を達成することができる。

20

30

【0151】

コンジュゲーション反応における結合ポリペプチド対活性化PEGの比は、約1:0.5~1:50、約1:1~1:30、または約1:5~1:15であることができる。この方法では、結合ポリペプチドへのPEGの共有結合による付加を触媒するために、さまざまな水性バッファーを使用することができる。ある実施形態では、使用するバッファーのpHが約7.0~9.0である。もう一つの実施形態では、pHがわずかに塩基性域、例えば約7.5~8.5である。中性pH域に近いpKaを持つバッファー、例えばリン酸バッファーを使用することもできる。多重特異性PEG連結タンパク質を製造する場合は、例えば約1:4~1:8、または約1:3~1:5などといった他の比が使用されるだろう。

40

【0152】

PEG化結合ポリペプチドの精製には、サイズ排除クロマトグラフィー(例えばゲル濾過)やイオン交換クロマトグラフィーなどといった、当技術分野で知られる従来の分離および精製技法を使用することができる。SDS-PAGEを使って生成物を分離することもできる。分離することができる生成物には、モノ-、ジ-、トリ-、ポリ-および非-PEG化結合ポリペプチド、ならびに遊離PEGが含まれる。モノPEGコンジュゲートのパーセンテージは、組成物中のモノPEGのパーセンテージが増加するように、溶出ピーク付近の幅広い画分をプールすることによって制御することができる。約90パーセントのモノPEGコンジュゲートは収率と活性のバランスが良好な例に相当する。例えば少なくとも92パーセントまたは少なくとも96パーセントのコンジュゲートがモノPEG種であるような組成物が望ましいだろう。

50

。本発明の一実施形態では、モノPEGコンジュゲートのパーセンテージが90パーセント～96パーセントである。

【0153】

ある実施形態では、本発明のPEG化結合ポリペプチドが1個、2個またはそれ以上のPEG部分を含有する。ある実施形態では、PEG部分が、そのタンパク質の表面にあり、かつ/またはターゲットリガンドと接触する表面から離れているアミノ酸残基に結合される。ある実施形態では、PEG-結合ポリペプチド中のPEGの総分子質量または合計分子質量が約3,000Da～60,000Da、場合によっては約10,000Da～36,000Daである。ある実施形態では、PEG化結合ポリペプチド中のPEGが実質的に線状の直鎖PEGである。

【0154】

本発明のある実施形態では、PEG化結合ポリペプチド中のPEGが、ヒドロキシルアミンアッセイを使った場合に、例えば450mMヒドロキシルアミン (pH6.5)、室温で、8～16時間にわたって、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。ある実施形態では、80%を上回る組成物が、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結合ポリペプチドである。

【0155】

もう一つの実施形態では、本発明のPEG化ポリペプチドが、好ましくは、無修飾タンパク質に付随する生化学的活性の少なくとも約25%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%または100%を保持するだろう。ある実施形態では、生物学的活性とは、 K_D 、 k_{on} または k_{off} によって評価される、VEGFR-2またはIGF-1Rに結合するその能力を指す。ある具

【0156】

PEG修飾ポリペプチドの血清クリアランス率は、無修飾結合ポリペプチドのクリアランス率と比較して、約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、さらには90%減少しうる。PEG修飾ポリペプチドは、無修飾タンパク質の半減期と比較して増加した半減期 ($t_{1/2}$) を持ちうる。PEG-結合ポリペプチドの半減期は、無修飾結合ポリペプチドの半減期と比較して、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%、さらには1000%増加しうる。いくつかの実施形態では、タンパク質半減期がインビトロで、例えば緩衝塩類溶液中または血清中で決定される。別の実施形態では、タンパク質半減期がインビボ半減期、例えば動物の血清または他の体液におけるタンパク質の半減期である。

【0157】

その他のベクターおよびポリヌクレオチド実施形態

本明細書に開示するさまざまなタンパク質またはポリペプチドのいずれかをコードする核酸は、化学的に合成することができる。コドン使用頻度は細胞における発現が改善されるように選択することができる。そのようなコドン使用頻度は選択した細胞タイプに依存するだろう。大腸菌および他の細菌、ならびに哺乳動物細胞、植物細胞、酵母細胞および昆虫細胞に特化させたコドン使用頻度パターンが開発されている。例えばMayfieldら, *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Jan 21;100(2):438-42; Sinclairら, *Protein Expr Purif*. 2002 Oct;26(1):96-105; Connell ND. *Curr Opin Biotechnol*. 2001 Oct;12(5):446-9; Makridesら, *Microbiol Rev*. 1996 Sep;60(3):512-38; およびSharpら, *Yeast*. 1991 Oct;7(7):657-78を参照されたい。

【0158】

核酸操作の一般技法は、例えば、参照により本明細書に組み込まれるSambrookら「*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*」第1～3巻 (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 第2版, 1989) またはF. Ausubelら「*Current Protocols in Molecular Biology*」(Green Publishing and Wiley-Interscience: ニューヨーク, 1987) とその定期改訂版に記載されている。ポリペプチドをコードするDNAは、哺乳動物遺伝子、ウイルス遺伝子または昆虫遺伝子に由来する適切な転写または翻訳調節エレメントに作動的に連結される。そ

のような調節エレメントには、転写プロモーター、転写を制御するための随意のオペレーター配列、適切な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含まれる。宿主内で複製する能力（これは通常、複製起点によって付与される）および形質転換体の認識を容易にする選択遺伝子も組み込まれる。

【0159】

本発明のタンパク質は、直接的に組換え生産できるだけでなく、好ましくはシグナル配列または成熟タンパク質もしくは成熟ポリペプチドのN末端に特異的切断部位を持つ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組換え生産することもできる。選択される異種シグナル配列は、好ましくは、宿主細胞によって認識され、プロセシングされる（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。ネイ
10
ティブシグナル配列を認識せずプロセシングしない原核宿主細胞の場合は、シグナル配列を、例えばアルカリホスファターゼリーダー、ペニシリナーゼリーダー、lppリーダー、または耐熱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する。酵母での分泌には、ネイティブシグナル配列を、例えば酵母インベルターゼリーダー、
20
因子リーダー（サッカロミセス（*Saccharomyces*）およびクリベロミセス（*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、カンジダ・アルビカンズ（*C. albicans*）グルコアミラーゼリーダー、またはPCT公開番号W090/13646に記載のシグナルなどで置換することができる。哺乳動物細胞発現では、哺乳類シグナル配列ならびにウイルス分泌リーダー、例えば単純ヘルペスgDシグナルを利用することができる。そのような前駆体領域のDNAは、タンパク質をコードするDNAに読み枠を合わせてライ
ゲートすることができる。

【0160】

発現ベクターとクローニングベクターはどちらも、1つ以上の選択した宿主細胞内でそのベクターが複製すること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、この配列が、宿主染色体DNAとは独立してベクターが複製することを可能にするものであり、複製起点または自立複製配列を含む。そのような配列は、さまざまな細菌、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由来の複製起点は大半のグラム陰性細菌に適し、2 μ プラスミド起点は酵母に適し、さまざまなウイルス起
点（SV40、ポリオーマ、アデノウイルス、VSVまたはBPV）は、哺乳動物細胞中のクロー
30
ニングベクターに役立つ。一般に複製起点コンポーネントは、哺乳動物細胞発現ベクターには必要ない（SV40起点が典型的に使用されうるのは、それが初期プロモーターを含有するという理由でしかない）。

【0161】

発現ベクターおよびクローニングベクターは、選択可能マーカーとも呼ばれる選択遺伝子を含有しうる。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、メトトレキサート、またはテトラサイクリンなどに対する耐性を付与するタンパク質、（b）栄養要求性の欠陥を補うタンパク質、または（c）複合培地からは取得できない重要な栄養素を供給するタンパク質（例えばパチルスに関してD-アラニンラセマーゼをコードする遺伝子）をコードする。

【0162】

選択スキームの一例では、宿主細胞の成長を停止させる薬物を利用する。異種遺伝子でうまく形質転換された細胞は、薬物耐性を付与するタンパク質を産生するので、この選択レジメンに耐えて生き残る。そのような優性選択の例では薬物ネオマイシン、ミコフェノール酸およびハイグロマイシンを使用する。

【0163】

哺乳動物細胞または真核細胞に適した選択可能マーカーのもう一つの例は、多価抗体核酸を取り込む能力を持つ細胞の同定を可能にするもの、例えばDHFR、チミジンキナーゼ、メタロチオネイン-Iおよび-II、好ましくは霊長類メタロチオネイン遺伝子、アデノシンデアミナーゼ、オルニチンデカルボキシラーゼなどである。

【0164】

10

20

30

40

50

例えば、DHFR選択遺伝子で形質転換された細胞は、まず最初に、形質転換体の全てを、DHFRの競合アンタゴニストであるメトトレキサート (Mtx) を含有する培養培地で培養することによって同定される。野生型DHFRを使用する場合、適当な宿主細胞は、DHFR活性が欠損しているチャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞株である。

【 0 1 6 5 】

あるいは、多価抗体、野生型DHFRタンパク質、およびもう一つの選択可能マーカー、例えばアミノグリコシド3'-ホスホトランスフェラーゼ (APH) で形質転換または同時形質転換された宿主細胞 (特に内在性DHFRを含有する野生型宿主) を、その選択可能マーカー用の選択剤、例えばカナマイシン、ネオマイシン、またはG418などのアミノグリコシド系抗生物質を含有する培地における細胞成長によって選択することもできる。米国特許第4,965,199号を参照されたい。

10

【 0 1 6 6 】

酵母での使用に適した選択遺伝子は、酵母プラスミドYRp7中に存在するtrp1遺伝子である (Stinchcombら, Nature, 282:39 (1979))。trp1遺伝子は、トリプトファン中で成長する能力を欠く酵母突然変異体、例えばATCC番号44076またはPEP4-1用の選択マーカーになる。Jones, Genetics, 85:12 (1977)。この場合、酵母宿主細胞ゲノムにおけるtrp1欠陥の存在は、トリプトファン非存在下での成長によって形質転換を検出するための有効な環境になる。同様に、Leu2欠損酵母株 (ATCC 20,622または38,626) は、Leu2遺伝子を保有する既知のプラスミドによって補完される。

【 0 1 6 7 】

20

また、1.6 μ m環状プラスミド由来のベクターpKD1も、クリベロミセス酵母の形質転換に使用することができる。あるいは、組換えウシキモシンを大規模生産するための発現系が、クリベロミセス・ラクティス (K. lactis) について報告された。Van den Berg, Bio/Technology, 8:135 (1990)。クリベロミセスの工業株から成熟組換えヒト血清アルブミンを分泌させるための安定な多コピー発現ベクターも開示されている。Fleerら, Bio/Technology, 9:968-975 (1991)。

【 0 1 6 8 】

発現ベクターおよびクローニングベクターは、通常、宿主生物によって認識され、本発明のタンパク質 (例えばフィブロンекチンベースのスクヤフォールドタンパク質) をコードする核酸に作動的に連結されるプロモーターを含有する。原核宿主で使用するのに適したプロモーターには、phoAプロモーター、 β -ラクタマーゼおよびラクトースプロモーター系、アルカリホスファターゼプロモーター、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ある。しかし他の既知細菌プロモーターも適切である。細菌系で使用するプロモーターは、本発明のタンパク質をコードするDNAに作動的に連結されたシャイン・ダルガノ (S.D.) 配列も含有するだろう。

30

【 0 1 6 9 】

真核生物用のプロモーター配列は知られている。事実上全ての真核遺伝子が、転写が開始される部位の約25~30塩基上流に位置するATリッチ領域を持っている。多くの遺伝子の転写開始点の70~80塩基上流に見出されるもう一つの配列はCNCAAT領域であり、ここにNは任意のヌクレオチドであることができる。ほとんどの真核遺伝子の3'端には、コード配列の3'端にポリAテールを付加するためのシグナルになりうるAATAAA配列がある。これらの配列は全て、真核発現ベクター中に適切に挿入される。

40

【 0 1 7 0 】

酵母宿主での使用に適したプロモーター配列の例には、3-ホスホグリセリン酸キナーゼまたは他の解糖系酵素、例えばエノラーゼ、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-ホスホグリセリン酸ムターゼ、ピルビン酸キナーゼ、トリオースリン酸イソメラーゼ、ホスホグルコースイソメラーゼ、およびグルコキナーゼのプロモーターが含まれる。

【 0 1 7 1 】

50

転写が成長培地によって制御されるという追加の利点を持つ誘導性プロモーターである他の酵母プロモーターは、アルコールデヒドロゲナーゼ2、イソシトクロム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、およびマルトース資化およびガラクトース資化を担う酵素のプロモーター領域である。酵母発現における使用に適したベクターおよびプロモーターは、EP特許公開番号73,657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共に有益に使用される。

【0172】

哺乳類宿主細胞におけるベクターからの転写は、例えば、当該プロモーターが宿主細胞系と適合する限り、ポリオーマウイルス、鶏痘ウイルス、アデノウイルス（アデノウイルス2など）、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シミアンウイルス40（SV40）などのウイルスのゲノムから得られるプロモーター、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などから得られるプロモーター、熱ショックプロモーターから得られるプロモーターなどによって制御することができる。

【0173】

SV40ウイルスの初期および後期プロモーターはSV40制限フラグメントとして都合よく入手することができ、このフラグメントはSV40ウイルス複製起点も含有している。ヒトサイトメガロウイルスの前初期プロモーターは、HindIII E制限フラグメントとして都合よく入手することができる。ウシパピローマウイルスをベクターとして使用して哺乳動物宿主中でDNAを発現させるための系は、米国特許第4,419,446号に開示されている。この系の変形が米国特許第4,601,978号に記載されている。単純ヘルペスウイルス由来のチミジンキナーゼプロモーターの制御下で行われるマウス細胞におけるヒト γ -インターフェロンcDNAの発現に関するReyesら、Nature 297:598-601 (1982)も参照されたい。あるいは、ラウス肉腫ウイルス末端反復配列をプロモーターとして使用することもできる。

【0174】

本発明のタンパク質をコードするDNAの高等真核生物による転写は、ベクター中にエンハンサー配列を挿入することにより、多くの場合、増加する。現在では、哺乳類遺伝子に由来するエンハンサー配列が数多く知られている（グロビン、エラスターゼ、アルブミン、 α -フェトプロテイン、およびインスリン）。しかし典型的には、真核細胞ウイルス由来のエンハンサーが使用されるだろう。複製起点の後期側（bp100-270）にあるSV40エンハンサー、サイトメガロウイルス初期プロモーターエンハンサー、複製起点の後期側にある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などが、その例である。真核プロモーターを活性化するための強化エレメントに関するYaniv, Nature 297:17-18 (1982)も参照されたい。エンハンサーは多価抗体コード配列の5'側または3'側の位置でベクター中に接合させうるが、好ましくはエンハンサーをプロモーターに対して5'側に置く。

【0175】

真核宿主細胞（酵母、カビ、昆虫、植物、動物、ヒト、または他の多細胞生物に由来する有核細胞）で使用される発現ベクターは、転写の終結およびmRNAの安定化に必要な配列も含有するだろう。そのような配列は、真核細胞またはウイルスのDNAまたはcDNAの5'非翻訳領域および時には3'非翻訳領域から、一般に入手することができる。これらの領域は、多価抗体をコードするmRNAの非翻訳部分に、ポリアデニル化フラグメントとして転写されるヌクレオチドセグメントを含有する。有用な転写終結コンポーネントの一つは、ウシ成長ホルモンポリアデニル化領域である。WO94/11026およびそこに開示されている発現ベクターを参照されたい。

【0176】

組換えDNAは、タンパク質の精製に役立ちうるあらゆるタイプのタンパク質タグ配列も含むことができる。タンパク質タグの例には、限定するわけではないが、ヒスチジンタグ、FLAGタグ、mycタグ、HAタグ、またはGSTタグなどがある。細菌、真菌、酵母、および哺

10

20

30

40

50

乳動物細胞宿主と共に使用するのに適したクローニングベクターおよび発現ベクターは、「Cloning Vectors: A Laboratory Manual」(Elsevier, ニューヨーク, 1985)に見出すことができ、この文献の関連する開示は、参照により本明細書に組み込まれる。

【0177】

当業者には明白であるだろうが、発現コンストラクトは宿主細胞に適した方法を使って宿主細胞中に導入される。宿主細胞中に核酸を導入するための方法は、例えば限定するわけではないが、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；および感染（ベクターが感染性物質である場合）など、当技術分野では種々知られている。

【0178】

適切な宿主細胞には、原核生物、酵母、哺乳動物細胞、または細菌細胞が含まれる。適切な細菌にはグラム陰性生物またはグラム陽性生物、例えば大腸菌 (*E. coli*) またはバチルス属 (*Bacillus* spp.) が含まれる。酵母、好ましくはサッカロミセス属のもの、例えばサッカロミセス・セレビシエ (*S. cerevisiae*) もポリペプチドの製造に使用することができる。さまざまな哺乳動物細胞または昆虫細胞培養系も、組換えタンパク質を発現させるために使用することができる。昆虫細胞中で異種タンパク質を製造するためのバキュロウイルス系は、LuckowおよびSummersによって概説されている (*Bio/Technology*, 6:47, 1988)。適切な哺乳動物宿主細胞の例には、内皮細胞、COS-7サル腎臓細胞、CV-1、L細胞、C127、3T3、チャイニーズハムスター卵巣 (CHO)、ヒト胎児腎臓細胞、HeLa、293、293T、およびBHK細胞株などがある。精製ポリペプチドは、適切な宿主/ベクター系を培養して組換えタンパク質を発現させることによって製造される。多くの応用では、本明細書に開示するポリペプチドの多くはサイズが小さいので、大腸菌における発現が、好ましい発現方法になるだろう。次にタンパク質を培養培地または細胞抽出物から精製する。

【0179】

その他の発現および細胞実施形態

製造実施形態用および細胞実施形態用の好ましいタンパク質は、フィブロネクチンベーススキャフォールドおよび関連タンパク質である。本明細書に記載のベクター中のDNAをクローニングし、または発現させるのに適した宿主細胞は、上述の原核生物、酵母、または高等真核細胞である。この目的に適した原核生物には、グラム陰性生物またはグラム陽性生物などの真正細菌、例えば腸内細菌科、例えばエシェリキア (*Escherichia*)、例えば大腸菌、エンテロバクター (*Enterobacter*)、エルウィニア (*Erwinia*)、クレブシエラ (*Klebsiella*)、プロテウス (*Proteus*)、サルモネラ (*Salmonella*)、例えばネズミチフス菌 (*Salmonella typhimurium*)、セラチア (*Serratia*)、例えば霊菌 (*Serratia marcescans*)、および赤痢菌 (*Shigella*)、ならびにバチルス、例えば枯草菌 (*B. subtilis*) およびバチルス・リケニフォルミス (*B. licheniformis*; 例えば1989年4月12日に公開されたDD266,710に開示されているバチルス・リケニフォルミス41P)、シュードモナス (*Pseudomonas*)、例えば緑膿菌 (*P. aeruginosa*)、およびストレプトミセス (*Streptomyces*) などがある。好ましい大腸菌クローニング宿主の一つは大腸菌294 (ATCC 31,446) であるが、他の株、例えば大腸菌B、大腸菌X1776 (ATCC 31,537)、および大腸菌W3110 (ATCC 27,325) も適切である。これらの例は限定ではなく例示である。

【0180】

原核生物に加えて、糸状菌または酵母などの真核微生物も、タンパク質をコードするベクターにとって適切なクローニング宿主または発現宿主である。サッカロミセス・セレビシエ、すなわち一般的なパン酵母は、下等真核宿主微生物のなかで、最もよく使用されている。しかし、いくつかの他の属、種、および株、例えばシゾサッカロミセス・ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*)；クリベロミセス宿主、例えばクリベロミセス・ラクティス、クリベロミセス・フラギリス (*K. fragilis*) (ATCC 12,424)、クリベロミセス・ブルガリカス (*K. bulgaricus*) (ATCC 16,045)、クリベロミセス・ウィッケラミイ (*K. wickerhamii*) (ATCC 24,178)、クリベロミセス・ワルティイ (*K. waltii*) (ATCC 56,500

10

20

30

40

50

)、クリベロミセス・ドロソフィラルム (*K. drosophilum*) (ATCC 36,906)、クリベロミセス・サーモトレランス (*K. thermotolerans*)、およびクリベロミセス・マルキシアヌス (*K. marxianus*) ; ヤロウィア (*yarrowia*) (EP特許公開番号402,226) ; ピキア・パストリス (*Pichia pastoris*) (EP 183,070) ; カンジダ (*Candida*)、トリコデルマ・リーシア (*Trichoderma reesia*) (EP特許公開番号244,234)、ニューロスボラ・クラッサ (*Neurospora crassa*)、シュワンニオミセス (*Schwanniomyces*)、例えばシュワンニオミセス・オクシデンタリス (*Schwanniomyces occidentalis*) ; ならびに例えばニューロスボラ、ペニシリウム (*Penicillium*)、トリボクラジウム (*Tolypocladium*)、およびアスペルギルス (*Aspergillus*) 宿主 (例えばアスペルギルス・ニデュランス (*A. nidulans*) およびアスペルギルス・ニガー (*Aspergillus niger*) などの糸状菌も一般に入手可能であり、本発明において有用である。

10

【0181】

本発明のグリコシル化タンパク質の発現に適した宿主細胞は多細胞生物に由来する。無脊椎動物細胞の例には植物細胞と昆虫細胞が含まれる。数多くのバキュロウイルス株および変種ならびに対応する許容昆虫宿主細胞が、スポドプテラ・フルギペルダ (*Spodoptera frugiperda*) (イモムシ)、ネッタイシマカ (*Aedes aegypti*) (蚊)、ヒトスジシマカ (*Aedes albopictus*) (蚊)、キイロショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) (ミバエ)、およびカイコ (*Bombyx mori*) などの宿主から同定されている。オートグラフ・カリフォルニカ (*Autographa californica*) NPVのL-1変種およびカイコNPVのBm-5株など、トランスフェクション用のさまざまなウイルス株を公的に入手することができ、そのようなウイルスを、ここでのウイルスとして、特にスポドプテラ・フルギペルダ細胞のトランスフェクションに、使用することができる。

20

【0182】

場合によっては、糖鎖付加など、脊椎動物細胞中でタンパク質を製造することが望ましいだろう。培養脊椎動物細胞 (組織培養) の増殖は日常的手法になっている。有用な哺乳動物宿主細胞株の例は、SV40で形質転換されたサル腎臓CV1株 (COS-7, ATCC CRL 1651) ; ヒト胎児腎臓株 (293または懸濁培養で成長するようにサブクローニングされた293細胞 ; Grahamら, J. Gen Virol. 36:59. (1977)) ; ベビーハムスター腎臓細胞 (BHK, ATCC CCL 10) ; チャイニーズハムスター卵巣細胞/-DHFR (CHO, Urlaubら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216 (1980)) ; マウスセルトリ細胞 (TM4, Mather, Biol. Reprod. 23:243-251 (1980)) ; サル腎臓細胞 (CV1 ATCC CCL 70) ; アフリカミドリザル腎臓細胞 (VERO-76, ATCC CRL-1587) ; ヒト子宮頸癌細胞 (HELA, ATCC CCL 2) ; イヌ腎臓細胞 (MDCK, ATCC CCL 34) ; バッファローラット肝臓細胞 (BRL 3A, ATCC CRL 1442) ; ヒト肺細胞 (W138, ATCC CCL 75) ; ヒト肝臓細胞 (Hep G2, HB 8065) ; マウス乳房腫瘍 (MMT 060562, ATCC CCL51) ; TRI細胞 (Matherら, Annals N.Y. Acad. Sci. 383:44-68 (1982)) ; MRC5細胞 ; FS4細胞 ; ヒト肝細胞癌株 (Hep G2) ; および骨髓腫またはリンパ腫細胞 (例えばY0、J558L、P3およびNS0細胞) である (米国特許第5,807,715号参照)。ワタ、トウモロコシ、ジャガイモ、ダイズ、ペチュニア、トマト、およびタバコの植物細胞培養も、宿主として利用することができる。

30

【0183】

宿主細胞は、本明細書に記載のタンパク質製造用の発現ベクターまたはクローニングベクターで形質転換され、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宜変更された従来の栄養培地で培養される。

40

【0184】

細胞の培養

本発明のタンパク質を製造するために使用される宿主細胞は、さまざまな培地で培養することができる。市販の培地、例えばハムF10 (Sigma)、最小必須培地 (MEM, Sigma)、RPMI-1640 (Sigma)、およびダルベッコ変法イーグル培地 (DMEM, Sigma) は、宿主細胞の培養に適している。さらにまた、Hamら, Meth. Enz. 58:44 (1979)、Barnesら, 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

50

；同第4,560,655号；もしくは同第5,122,469号；W090/03430；W087/00195；または米国再発行特許第30,985号に記載の培地はいずれも、宿主細胞の培養培地として使用することができる。これらの培地には、ホルモンおよび/または他の成長因子（例えばインスリン、トランスフェリン、または上皮成長因子）、塩類（例えば塩化ナトリウム、カルシウム、マグネシウム、およびリン酸塩）、バッファー（例えばHEPES）、ヌクレオチド（例えばアデノシンおよびチミジン）、抗生物質（ゲンタマイシン（GENTAMYCIN（商標））薬）、微量元素（通常はマイクロモル濃度域の最終濃度で存在する無機化合物と定義される）、およびグルコースまたは等価なエネルギー源を必要に応じて補足することができる。他の必須補助剤も、当業者に知られているであろう適当な濃度で含めることができる。温度、pHなどの培地条件は、発現用に選択した宿主細胞で過去に使用されたものであり、当業者には明白だろう。

10

【0185】

本明細書に開示するタンパク質は、細胞-翻訳系を使って製造することもできる。そのような目的には、インビトロ転写によるmRNAの製造が可能になり、利用する特定無細胞系（真核無細胞翻訳系、例えば哺乳動物もしくは酵母の無細胞翻訳系、または原核無細胞翻訳系、例えば細菌の無細胞翻訳系）におけるそのmRNAの無細胞翻訳が可能になるように、ポリペプチドをコードする核酸を修飾しなければならない。

【0186】

本発明のタンパク質は化学合成によって（例えば「Solid Phase Peptide Synthesis」第2版（1984, The Pierce Chemical Co., イリノイ州ロックフォード）に記載の方法によって）製造することもできる。タンパク質の修飾も化学合成によって行うことができる。

20

【0187】

本発明のタンパク質は、タンパク質化学の分野で広く知られているタンパク質の単離/精製方法によって精製することができる。限定でない例として、抽出、再結晶、塩析（例えば硫酸アンモニウムまたは硫酸ナトリウムによるもの）、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、向流分配法またはこれらの任意の組合せが挙げられる。精製後に、ポリペプチドは、当技術分野で知られているさまざまな方法のいずれか、例えば限定するわけではないが、濾過および透析などによって、異なるバッ

30

【0188】

精製ポリペプチドの純度は、好ましくは少なくとも85%、より好ましくは少なくとも95%、最も好ましくは少なくとも98%である。純度の正確な数値とは関わりなく、本ポリペプチドは、医薬製品としての使用にとって、十分に純粋である。

【0189】

その他の糖鎖付加実施形態

いくつかの実施形態では、本発明のタンパク質をグリコシル化することが好ましいだろう。好ましくは、そのようなタンパク質はフィブロネクチンベースのスキュフォールドである。フィブロネクチンベースのスキュフォールドは、通常は糖鎖付加部位を含有しないが、そのような糖鎖付加をタンパク質中に工学的に導入することができる。

40

【0190】

タンパク質の糖鎖付加は、典型的には、N結合型またはO結合型である。N結合型とは、アスパラギン残基の側鎖への糖質部分の取付けを指す。トリペプチド配列アスパラギン-X-セリンおよびアスパラギン-X-スレオニン（ここにXはプロリンを除く任意のアミノ酸である）が、アスパラギン側鎖に糖質部分を酵素的に取付けるための認識配列である。これらは、本発明のタンパク質、特にフィブロネクチンベースのスキュフォールドタンパク質およびその対応するポリヌクレオチド中に、工学的に導入することができる。したがって、ポリペプチドにおけるこれらトリペプチド配列のどちらかの存在が、潜在的糖鎖付加部位を生成させる。O結合型糖鎖付加とは、ヒドロキシアミノ酸（最も一般的にはセリンま

50

たはスレオニンであるが、5-ヒドロキシプロリンまたは5-ヒドロキシリジンも使用されうる)への糖鎖N-アセチルガラクトサミン、ガラクトース、またはキシロースの一つの取付けを指す。

【0191】

本発明のタンパク質への糖鎖付加部位の付加は、アミノ酸配列をそれが上述したトリペプチド配列の1つ以上を含有するように変化させることによって、都合よく達成される(N結合型糖鎖付加部位の場合)。元の抗体の配列に1つ以上のセリンまたはスレオニン残基を付加するか、元の抗体の配列を1つ以上のセリンまたはスレオニン残基で置換することによって、変化させることもできる(O結合型糖鎖付加部位の場合)。

【0192】

本発明のタンパク質のそのようなアミノ酸配列変種をコードする核酸分子は、当技術分野で知られるさまざまな方法によって製造される。これらの方法には、限定するわけではないが、天然供給源からの単離(自然に存在するアミノ酸配列変種の場合)、または先に製造された変種もしくは非変種型タンパク質(例えばフィブロネクチンベースのスクャフォールドタンパク質)のオリゴヌクレオチド指定(もしくは部位指定)突然変異誘発法、PCR突然変異誘発法、およびカセット突然変異誘発法による製造が含まれる。

【0193】

例えば抗体の抗原依存性細胞性細胞傷害活性(ADCC)および/または補体依存性細胞傷害活性(CDC)が強化されるように、本発明のタンパク質をエフェクター機能に関して、修飾することが望ましいかもしれない。これは、Fc領域の活性部分を導入すること、ならびに本タンパク質(例えばフィブロネクチンベースのスクャフォールドタンパク質)のFc領域に1つ以上のアミノ酸修飾を導入して変種Fc領域を生成させることによって達成する。Fc領域変種は、1つ以上のアミノ酸位置にアミノ酸修飾(例えば置換)を含むヒトFc領域配列(例えばヒトIgG1、IgG2、IgG3またはIgG4 Fc領域)を含みうる。

【0194】

ある実施形態では、ネイティブ配列Fc領域と比較して、変種Fc領域が、ヒトエフェクター細胞の存在下でより効果的に、抗体依存性細胞性細胞傷害(ADCC)を媒介するか、またはFc受容体(FcR)をより良いアフィニティーで結合する。そのようなFc領域変種は、Fc領域の位置256、290、298、312、326、330、333、334、360、378または430の任意の1つ以上にアミノ酸修飾を含みうる(この場合、Fc領域中の残基の番号はKabatに見られるEUインデックスの番号である)。

【0195】

その他の抗体に基づくタンパク質(部分および誘導体を含む)

本発明のさらなる実施形態は、その相補性決定領域が単一ドメインペプチドの一部であるような抗体である単一ドメイン抗体を包含する。好ましくは、IGF-1Rに対する抗体であると共に、本発明のPEG連結タンパク質に含まれる。限定するわけではないが、重鎖抗体、生来的に軽鎖を欠く抗体、従来の4鎖抗体から誘導される単一ドメイン抗体、改変抗体および抗体から誘導されるもの以外の単一ドメインスクャフォールドなどが、その例である。単一ドメイン抗体は、従来技術の、または将来出現する、どの単一ドメイン抗体であってもよい。単一ドメイン抗体は、マウス、ヒト、ラクダ、ラマ、ヤギ、ウサギ、ウシ、その他を含めて、どの種に由来してもよい。本発明の一態様では、本明細書にいう単一ドメイン抗体が、軽鎖を欠く重鎖抗体として知られている天然の単一ドメイン抗体である。そのような単一ドメイン抗体は例えばW094/04678に開示されている。誤解が生じないように、生来的に軽鎖を欠く重鎖抗体から誘導されるこの可変ドメインは、それを従来の4鎖免疫グロブリンのVHと区別するために、ここでは、VHHまたはナノボディと呼ばれている。そのようなVHH分子は、ラクダ科の種、例えばラクダ、ヒトコブラクダ、ラマ、ビクーナ、アルパカおよびグアナコで生じさせた抗体から誘導することができる。ラクダ科以外の他の種も、生来的に軽鎖を欠く重鎖抗体を産生することができ、そのようなVHHは本発明の範囲に包含される。

【0196】

VHHは、本発明によれば、また当業者に知られているとおり、生来的に軽鎖を欠く免疫グロブリンから誘導される重鎖可変ドメイン、例えばWO94/04678に記載のラクダ科から誘導されたもの（以後、VHHドメインまたはナノボディという）である。VHH分子は大きさがIgG分子の約10分の1である。これらは単一ポリペプチドであり、極めて安定で、極端なpHおよび温度条件に耐える。そのうえ、これらはプロテアーゼの作用に対して耐性であり、これは従来の抗体にはないものである。さらにまた、VHHのインビトロ発現は、適正に折りたたまれた機能的VHHをもたらす。また、ラクダ科の動物で産生させた抗体は、抗体ライブラリーを使ってインビトロで生成させた抗体またはラクダ科の動物以外の哺乳動物の免疫化によって生成させた抗体が認識するエピトープではないエピトープを認識するだろう（WO9749805）。したがって、抗EGFR VHHは、従来の抗体よりも効率よくEGFRと相互作用することにより、EGFRとEGFRリガンドとの相互作用を、より効率よく遮断しうる。VHHは空洞や溝などの「非通常型」エピトープ中に結合することが知られているので（WO97/49805）、そのようなVHHのアフィニティーは、治療的処置に、より一層適しうる。

【0197】

本発明のもう一つの実施形態は、EGFRまたは近縁のファミリーメンバーに対するラクダ科VHHの配列に対応する配列からなる抗上皮成長因子受容体である。本発明は、前記ポリペプチドの相同配列、機能部分、または相同配列の機能的部分にも関係する。本発明は、前記ポリペプチドをコードする能力を持つ核酸にも関係する。本発明の単一ドメイン抗体は、EGFRまたは近縁のファミリーメンバーに対する抗体でありうる。

【0198】

本発明によれば、本明細書で議論するとおり、ポリペプチドコンストラクトはさらに、例えば血清アルブミンなどといった他のターゲットに対する単一ドメイン抗体を含みうる。あるターゲットに対する単一ドメイン抗体とは、 10^{-6} Mより良好なアフィニティーで前記ターゲットに結合する能力を持つ単一ドメイン抗体を意味する。

【0199】

本発明は、さらに、ヒト様配列を持つクラスに属するVHHである単一ドメイン抗体に関する。そのようなクラスの一つは、そのVHHが、Kabatの番号付けで、位置45にグリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、メチオニン、セリン、スレオニン、アスパラギン、またはグルタミンからなる群より選ばれるアミノ酸（例えばL45など）を持ち、位置103にトリプトファンを持つことを特徴とする。したがって、このクラスに属するポリペプチドは、ヒトVHフレームワーク領域に対して高いアミノ酸配列ホモロジーを示し、前記ポリペプチドは、望ましくない免疫応答を引き起こす可能性を伴わず、またさらなるヒト化の負担も伴わずに、ヒトに直接投与されるかもしれない。

【0200】

ラクダ科単一ドメイン抗体のもう一つのヒト様クラスはPCT公開番号W003/035694に記載されており、ヒト起源のまたは他の種由来の従来型抗体に典型的に見出される疎水性FR2残基を含有するが、この親水性の喪失を、二本鎖抗体由来のVH中に存在する保存されたトリプトファンに代わる位置103の荷電アルギニン残基で補償している。したがって、これら2つのクラスに属するペプチドはヒトVHフレームワーク領域に対して高いアミノ酸配列ホモロジーを示し、前記ペプチドは、望ましくない免疫応答を引き起こす可能性を伴わず、またさらなるヒト化の負担も伴わずに、ヒトに直接投与されるかもしれない。本発明は、前記ポリペプチドをコードする能力を持つ核酸にも関係する。ポリペプチドは、完全長ラクダ科抗体、すなわちFcドメインおよびVHHドメインを含みうる。

【0201】

抗アルブミンVHHは、担体タンパク質であることが知られている血清アルブミンと、より効率のよい方法で相互作用しうる。担体タンパク質として、血清アルブミンのエピトープの一部は、結合されたタンパク質、ペプチドおよび小化学化合物によって、接近不可能になりうる。VHHは、空洞などの「非通常型」または非従来型エピトープ中に結合することが知られているので（WO97/49805）、循環アルブミンに対するそのようなVHHのアフィ

ニティーは、治療的処置に、より一層適しうる。血清タンパク質は、対象の血清中に見出される任意の適切なタンパク質、またはそのフラグメントであることができる。本発明の一態様では、血清タンパク質が血清アルブミン、血清免疫グロブリン、チロキシン結合タンパク質、トランスフェリン、またはフィブリノゲンである。意図する用途、例えば効果的な処置に要求される半減期および/またはターゲット抗原のコンパートメント化などに応じて、VHHパートナーを上記血清タンパク質の一つに指向させることができる。

【0202】

「抗体フラグメント」は、完全な抗体の一部（一般に、完全な抗体の抗原結合部位を含み、したがって抗原結合能を保持している部分）だけを含む。この定義によって包含される抗体フラグメントの例には以下に挙げるものがある：(i) VL、CL、VHおよびCH1ドメインを持つFabフラグメント；(ii) CH1ドメインのC末端に1つ以上のシステイン残基を持つFabフラグメントであるFab'フラグメント；(iii) VHおよびCH1ドメインを持つFdフラグメント；(iv) VHおよびCH1ドメインを持ち、かつCH1ドメインのC末端に1つ以上のシステイン残基を持つFd'フラグメント；(v) 抗体の単一アームのVLおよびVHドメインを持つFvフラグメント；(vi) VHドメインからなるdAbフラグメント（Wardら，Nature 341, 544-546 (1989)）；(vii) 単離されたCDR領域；(viii) F(ab')₂フラグメント、ヒンジ領域のジスルフィド橋で連結された2つのFab'フラグメントを含む二価フラグメント；(ix) 単鎖抗体分子（例えば単鎖Fv；scFv）（Birdら，Science 242:423-426 (1988)；およびHustonら，PNAS (USA) 85:5879-5883 (1988)）；(x) 同じペプチド鎖中の軽鎖可変ドメイン（VL）につながれた重鎖可変ドメイン（VH）を含み、2つの抗原結合部位を持つ、「ダイアボディ」（例えばEP特許公開番号404,097；WO93/11161；およびHollingerら，Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993)）；(xi) 相補的軽鎖ポリペプチドと共に一対の抗原結合領域を形成する一対の直列Fdセグメント（VH-CH1-VH-CH1）を含む「線状抗体」（Zapataら，Protein Eng. 8(10):1057-1062 (1995)；および米国特許第5,641,870号）。

【0203】

本発明で使用される抗体フラグメントを作製するために使用しうるさまざまな抗体フラグメント製造技法が開発されている。伝統的には、これらのフラグメントは、完全な抗体のタンパク質分解消化によって得られた（例えばMorimotoら，Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107-117 (1992)；およびBrennanら，Science, 229:81 (1985)）。しかし現在では、組換え宿主細胞によってこれらのフラグメントを直接製造することができる。例えば抗体フラグメントは、上述の抗体ファージライブラリーから単離することができる。あるいは、Fab'-SHフラグメントを大腸菌から直接回収し、それらを化学的にカップリングしてF(ab')₂フラグメントを形成させることもできる（Carterら，Bio/Technology 10:163-167 (1992)）。もう一つのアプローチによれば、F(ab')₂フラグメントを組換え宿主細胞培養から直接単離することができる。他の抗体フラグメント製造技法は当業者には明白だろう。別の実施形態では、選択される抗体が単鎖Fvフラグメント（scFv）である。WO 93/16185；米国特許第5,571,894号および米国特許第5,587,458号を参照されたい。抗体フラグメントは、例えば米国特許第5,641,870号などに記載されている「線状抗体」であることもできる。そのような線状抗体フラグメントは単一特異性または二重特異性であることができる。

【0204】

他の標的タンパク質治療薬

一定の実施形態では、本明細書に記載する本発明のタンパク質が、1つ以上のアビマー配列を含みうる。アビマーは、本明細書に記載するものを含むさまざまなターゲット分子に対してアフィニティーと特異性を持つ結合タンパク質のタイプである。これらのタンパク質は、本発明のPEG連結実施形態に含めることができる。それらは、ヒト細胞外受容体ドメインから、インビトロエクソンシャフリングおよびファージディスプレイによって開発された（Silvermanら，2005, Nat. Biotechnol. 23:1493-94；Silvermanら，2006, Nat. Biotechnol. 24:220）。結果として得られる多ドメインタンパク質は、単一エピト

ープ結合タンパク質と比較して改善されたアフィニティー（場合によってはナノモル濃度未満）および特異性を示しうる多重の独立した結合ドメインを含みうる。さまざまな実施形態で、アビマーは、例えばPEGまたはポリペプチドリinkerに取付けるか、PEGまたはポリペプチドリinkerを使って取付けることができる。アビマーの構築法および使用方法に関するさらなる詳細は、例えば米国特許出願公開第20040175756号、同第20050048512号、同第20050053973号、同第20050089932号および同第20050221384号に開示されており、各公開公報の実施例部分は、その文書全体と共に、参照により本明細書に組み込まれる。

【0205】

一定の実施形態では、本明細書に記載する本発明のタンパク質が、1つ以上のリボカリン関連配列、例えばアンチカリン（anticalin）類またはリボカリン誘導体を含みうる。アンチカリンまたはリボカリン誘導体は、本明細書に記載するものを含むさまざまなターゲット分子に対してアフィニティーと特異性を持つ結合タンパク質のタイプである。そのようなタンパク質は、米国特許出願公開第20060058510号「Anticalins」、米国特許出願公開第20060088908号「Muteins of human neutrophil gelatinase-associated lipocalin and related proteins」、米国特許出願公開第20050106660号「Muteins of apolipoprotein d」およびPCT公開番号W02006/056464に記載されている。これらのタンパク質は、本発明のPEG連結実施形態に含めることができる。

10

【0206】

一定の実施形態では、本明細書に記載する本発明のタンパク質が、1つ以上のテトラネクチンC型レクチン関連配列またはトリネクチン、例えばテトラネクチンC型レクチンまたはテトラネクチンC型レクチン誘導体を含みうる。テトラネクチンC型レクチンまたはテトラネクチンC型レクチン誘導体は、本明細書に記載するものを含むさまざまなターゲット分子に対してアフィニティーと特異性を持つ結合タンパク質のタイプである。異なるテトラネクチンC型レクチンおよび関連タンパク質が、PCT公開番号W02006/053568、W02005/080418、W02004/094478、W02004/039841、W02004/005335、W02002/048189、W098/056906、および米国特許出願公開第20050202043号に記載されている。これらのタンパク質は、本発明のPEG連結実施形態に含めることができる。

20

【0207】

一定の実施形態では、本明細書に記載する本発明のタンパク質が、1つ以上の天然アンキリンリピートタンパク質、例えばDARPin類（Molecular Partner）を含みうる。

30

【0208】

一定の実施形態では、本明細書に記載する本発明のタンパク質が、1つ以上のAffibody（商標）を含みうる。Affibody（商標）は、スタフィロコッカスのプロテインAのIgG結合ドメインから誘導される。プロテインAドメインの結合表面近くに位置する残基を変化させることによって新規な結合特性を得ることができる。

【0209】

一定の実施形態では、本明細書に記載する本発明のタンパク質が、1つ以上のシステムノットベースのタンパク質スキュフォールド、すなわちマイクロボディ（Selecure/NascaCell）を含みうる。

【0210】

一定の実施形態では、本明細書に記載する本発明のタンパク質が、1つ以上のTrans-body（商標）を含みうる。Trans-body（商標）はトランスフェリンスキュフォールドに基づく（BioResis/Pfizer）。

40

【0211】

一定の実施形態では、本明細書に記載する本発明のタンパク質が、 α -クリスタリンまたはユビキチンに基づく結合タンパク質を含みうる。これらのいわゆるAffilin（商標）（Scil Proteins）分子は、それらのタンパク質のシート構造中の結合領域のデノボ設計を特徴とする。Affilin（商標）分子は米国特許出願公開第20070248536号に記載されている。

【0212】

50

本発明のタンパク質に連結された毒素および他の分子

本明細書に開示する本発明のタンパク質は細胞毒性剤に連結することができる。そのような実施形態は、適宜、インビトロ法またはインビボ法で製造することができる。インビトロ法には、タンパク質に適合するケミストリー、例えばCysおよびLysなどの具体的アミノ酸のケミストリーなど、当技術分野で周知のコンジュゲーションケミストリーが含まれる。細胞毒性剤を本発明のタンパク質に連結するには、連結基または反応性基が使用される。適切な連結基は当技術分野では周知であり、これにはジスルフィド基、チオエーテル基、酸不安定基、光不安定基、ペプチダーゼ不安定基およびエステラーゼ不安定基が含まれる。好ましい連結基は、ジスルフィド基およびチオエーテル基である。例えばコンジュゲートは、ジスルフィド交換反応によって構築するか、抗体と細胞毒性剤との間にチオエーテル結合を形成させることによって構築することができる。好ましい細胞毒性剤はメイタンシノイド類、タキサン類およびCC-1065の類似体である。

10

【0213】

インビボ法には、毒性タンパク質、タギングタンパク質またはラベリングタンパク質を本発明のタンパク質に融合タンパク質として連結することが含まれる。所望のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを使って単一のポリペプチドが製造される。毒性タンパク質は、毒素耐性細胞または毒素非感受性細胞中で発現させるか、感受性細胞中で誘導性プロモーターを使って発現させることによって、制御することができる。

【0214】

限定するわけではないが、さまざまな実施形態において、細菌毒素、植物毒素、リシン、リボヌクレアーゼ (RNase)、DNase I、プロテアーゼ、ブドウ球菌エンテロトキシンA、アメリカヤマゴボウ抗ウイルスタンパク質、ゲロニン、ジフテリン (diphtherin) 毒素、シュードモナス外毒素、シュードモナス内毒素、ランピマーゼ (Ranpimase) (Rap)、Rap(N69Q)、酵素、または蛍光タンパク質などのタンパク質に、本発明のタンパク質を連結することができる。

20

【0215】

メイタンシノイド類およびメイタンシノイド類似体は、好ましい細胞毒性剤の一つである。適切なメイタンシノイド類の例には、メイタンシノールおよびメイタンシノール類似体がある。適切なメイタンシノイド類は、米国特許第4,424,219号；同第4,256,746号；同第4,294,757号；同第4,307,016号；同第4,313,946号；同第4,315,929号；同第4,331,598号；同第4,361,650号；同第4,362,663号；同第4,364,866号；同第4,450,254号；同第4,322,348号；同第4,371,533号；同第6,333,410号；同第5,475,092号；同第5,585,499号；および同第5,846,545号に開示されている。

30

【0216】

タキサン類も好ましい細胞毒性剤である。本発明での使用に適したタキサン類は米国特許第6,372,738号および同第6,340,701号に開示されている。

【0217】

CC-1065およびその類似体も本発明での使用に好ましい細胞毒性薬である。CC-1065およびその類似体は米国特許第6,372,738号；同第6,340,701号；同第5,846,545号および同第5,585,499号に開示されている。

40

【0218】

そのような細胞毒性コンジュゲートの製造にとって魅力的な候補は、ストレプトミセス・ゼレンシス (*Streptomyces zelensis*) の培養ブロスから単離された強力な抗腫瘍抗生物質CC-1065である。CC-1065は、よく使用される抗がん薬、例えばドキソルビシン、メトトレキサートおよびピンクリスチンなどより、インビトロで約1000倍強力である (B. K. Bhuyanら, Cancer Res., 42, 3532-3537 (1982))。

【0219】

メトトレキサート、ダウノルビシン、ドキソルビシン、ピンクリスチン、ピンブラスチン、メルファラン、マイトマイシンC、クロラムブシル、およびカリケアマイシンなどの細胞毒性薬も、本発明のコンジュゲートの製造に適しており、それらの薬物分子は血清ア

50

ルブミンなどの仲介担体分子を介して抗体分子に連結することもできる。

【 0 2 2 0 】

診断的応用の場合、本発明の抗体は、典型的には、検出可能部分で標識されるだろう。検出可能部分は、検出可能なシグナルを直接的または間接的に生成する能力を持つものならなんでもよい。例えば検出可能部分は、放射性同位体、例えばH3、C14もしくは13、P32、S35、またはI131；蛍光もしくは化学発光化合物、例えば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；または酵素、例えばアルカリホスファターゼ、 α -ガラクトシダーゼもしくはセイヨウワサビペルオキシダーゼであることができる。

【 0 2 2 1 】

コンジュゲーション

当技術分野で知られている、タンパク質を検出可能部分にコンジュゲートするための方法は、Hunterら、Nature 144:945 (1962)；Davidら、Biochemistry 13:1014 (1974)；Painら、J. Immunol. Meth. 40:219 (1981)；およびNygren, J. Histochem. and Cytochem. 30:407 (1982)に記載されている方法を含めて、どれでも使用することができる。インビトロ法には、タンパク質と適合するケミストリー、例えばCysおよびLysなどの具体的アミノ酸のケミストリーなど、当技術分野で周知のコンジュゲーションケミストリーが含まれる。ある部分（例えばPEG）を本発明のタンパク質に連結するには、連結基または反応性基が使用される。適切な連結基は当技術分野では周知であり、これにはジスルフィド基、チオエーテル基、酸不安定基、光不安定基、ペプチダーゼ不安定基およびエステラーゼ不安定基が含まれる。好ましい連結基は、その応用に依存して、ジスルフィド基およびチオエーテル基である。cysアミノ酸を持たないフィブロンекチンベースのスクヤフォールドまたは他のタンパク質には、コンジュゲーション用の位置を作り出すと同時にタンパク質の活性も許容されうるような位置に、cysを工学的に導入することができる。

【 0 2 2 2 】

イメージングおよび他の応用

本発明のタンパク質は、放射性不透過剤または放射性同位体などの検出可能部分で標識されたタンパク質を対象に（好ましくは血流中に）投与し、その宿主における標識タンパク質の存在および位置をアッセイするインビボイメージングにも有用である。このイメージング技法は、悪性疾患の病期分類と処置に役立つ。タンパク質は、核磁気共鳴であれ、放射線法であれ、当技術分野で知られる他の検出手段であれ、宿主内で検出可能な任意の部分で標識することができる。

【 0 2 2 3 】

本発明のタンパク質は、アフィニティー精製剤としても有用である。このプロセスでは、セファデックス樹脂またはろ紙などの適切な支持体上に、当技術分野で周知の方法を使って、抗体を固定化する。

【 0 2 2 4 】

本発明のタンパク質は、細胞におけるIGF-IRの機能をそれらが阻害することに基づいて、生物学的研究における試薬としても役立つ。

【 0 2 2 5 】

本発明のタンパク質は、競合結合アッセイ、直接および間接サンドイッチアッセイ、ならびに免疫沈降アッセイなど、既知の任意のアッセイ方法で使用することができる（Zola「Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques」147-158頁（CRC Press, Inc., 1987））。

【 0 2 2 6 】

本発明の適当な実施形態と一緒に使用しうる追加薬剤

他の治療的処置または治療組成物では、本発明のタンパク質が、1つ以上の追加治療剤と同時にまたは逐次的に投与される。適切な治療剤には、例えば限定するわけではないが、標的治療薬、他の標的生物学製剤、または細胞毒性剤もしくは細胞増殖抑制剤が含まれる。場合によっては、同じまたは別個の治療的に許容できるバイアル、シリンジまたは液体

10

20

30

40

50

製剤を保持する他の投与装置から、薬剤を投与することが好ましいだろう。

【0227】

がん治療剤は、患者への影響を最小限に抑えつつがん細胞を殺すかその成長を制限しようとする薬剤である。したがってそのような薬剤は、健常宿主細胞と比較したがん細胞の特性の相違（例えば代謝、血管化または細胞表面抗原提示）をどれでも利用することができる。腫瘍形態の相違は潜在的介入部位である：例えば第2治療薬は、固形腫瘍の内部の血管化を遅延させ、その結果としてその成長速度を遅くするのに役立つ、抗VEGF抗体などの抗体であることができる。他の治療剤には、限定するわけではないが、グラニセトロンHClなどの添加剤、酢酸ロイプロリドなどのアンドロゲン阻害剤、ドキソルビンなどの抗生物質、タモキシフェンなどの抗エストロゲン剤、インターフェロン-2aなどの代謝拮抗物質、タキソールなどの細胞毒性剤、rasファルネシルトランスフェラーゼ阻害剤などの酵素阻害剤、アルデスロイキンなどの免疫調整物質、およびメルファランHClなどのナイトロジェンマスタード誘導体などが含まれる。

10

【0228】

改善された抗がん効力が得られるように本発明のタンパク質と組み合わせて使用することができる治療剤には、がん医療で使用される多様な薬剤（参考文献：「Cancer, Principles & Practice of Oncology」DeVita, V. T., Hellman, S., Rosenberg, S. A., 第6版, Lippincott-Raven, フィラデルフィア, 2001）、例えばドセタキセル、パクリタキセル、ドキソルビン、エピルビン、シクロホスファミド、トラスツズマブ、カベシタビン、タモキシフェン、トレミフェン、レトロゾール、アナストロゾール、フルベストラント、エクセメスタン、ゴセリン、オキサリプラチン、カルボプラチン、シスプラチン、デキサメタゾン、アンチド、ベバシズマブ、5-フルオロウラシル、ロイコボリン、レバミソール、イリノテカン、エトポシド、トポテカン、ゲムシタビン、ピノレルビン、エストラムスチン、ミトキサントロン、アバレリックス、ゾレドロネート、ストレプトゾシン、リツキシマブ、イダルビン、ブスルファン、クロラムブシル、フルダラビン、イマチニブ、シタラビン、イブリットモマブ、トシツモマブ、インターフェロン-2b、メルファラン、ボルテゾミブ、アルトレタミン、アスパラギナーゼ、ゲフィチニブ、エルロニチブ、抗EGF受容体抗体（例えばセツキシマブまたはパニツマブ（panitumab））、イクサベピロン、エポチロン類またはその誘導体、および細胞毒性薬と細胞表面受容体に対する抗体とのコンジュゲートなどが含まれる。好ましい治療剤は白金剤（例えばカルボプラチン、オキサリプラチン、シスプラチン）、タキサン類（例えばパクリタキセル、ドセタキセル）、ゲムシタビン、およびカンプトテシンである。

20

30

【0229】

1つ以上の追加治療剤は、本発明の抗体、抗体フラグメントもしくはコンジュゲートの前に、または本発明の抗体、抗体フラグメントもしくはコンジュゲートと同時に、または本発明の抗体、抗体フラグメントもしくはコンジュゲートの後に投与することができる。各治療剤ごとに特定の投与順序が有利になりうることは、当業者には理解されるだろう。同様に、薬剤の投与と本発明の抗体、抗体フラグメントまたはコンジュゲートの投与との間の時間の長さが、各治療剤ごとに変化することも、当業者には理解されるだろう。

【0230】

40

製剤および投与

本発明の治療製剤は、望ましい純度を持つ上記タンパク質を、随意の生理学的に許容できる担体、賦形剤または安定剤（「Remington's Pharmaceutical Sciences」第16版, Osol, A. 編(1980)）と混合することにより、水溶液、凍結乾燥製剤または他の乾燥製剤の形で、貯蔵用に調製される。許容できる担体、賦形剤、または安定剤は、使用する投薬量および濃度で、受容者にとって無毒であり、これには、リン酸、クエン酸、および他の有機酸などの緩衝剤；アスコルビン酸およびメチオニンを含む酸化防止剤；保存剤（例えばオクタデシルジメチルベンジルアンモニウムクロリド；塩化ヘキサメトニウム；塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム；フェノール、ブチルアルコールまたはベンジルアルコール；アルキルパラベン、例えばメチルパラベンまたはプロピルパラベン；カテコール；

50

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）；低分子量（約10残基未満の）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；親水性ポリマー、例えばポリビニルピロリドン；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；グルコース、マンノース、またはデキストランを含む、単糖類、二糖類、および他の糖質；EDTAなどのキレート剤；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類；ナトリウムなどの塩形成対イオン；金属錯体（例えばZn-タンパク質錯体）；および/またはTWEEN（商標）、PLURONIC（商標）もしくはポリエチレングリコール（PEG）などの非イオン界面活性が含まれる。

【0231】

10

本明細書に記載の製剤は、処置される特定の適応症のために、必要に応じて2つ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補完的活性を持つものを含有する。活性化化合物の組合せの例を本明細書に記載する。そのような分子は、意図する目的に有効な量で組み合わせられて、適切に存在する。

【0232】

活性成分を、例えばコアセルベーション技法または界面重などによって製造されるマイクロカプセル（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）、コロイド薬物送達システム（例えばリポソーム、アルブミンマイクロスフェア、マイクロエマルジョン、ナノ粒子およびナノカプセル）またはマクロエマルジョンに封入することもできる。そのような技法は「Remington's Pharmaceutical Sciences」第16版（Olso, A. 編（1980））に開示されている。

20

【0233】

インビボ投与に使用される製剤は滅菌状態でなければならない。これは滅菌濾過膜を通す濾過によって容易に達成される。

【0234】

徐放性調製物を製造することができる。徐放性調製物の適切な例として、本発明のタンパク質を含有する固形疎水性ポリマーの半透性マトリックであって、そのマトリックスが造形品、例えばフィルム、またはマイクロカプセルの形態をとるものが挙げられる。徐放性マトリックスの例には、ポリエステル、ヒドロゲル（例えばポリ(2-ヒドロキシエチルメタクリレート)、またはポリ(ビニルアルコール)）、ポリラクチド（米国特許第3,773,919号）、L-グルタミン酸とD-エチル-L-グルタメートのコポリマー、非分解性エチレン-酢酸ビニル、分解性乳酸-グリコール酸コポリマー、例えばLUPRON DEPOT（商標）（乳酸-グリコール酸コポリマーおよび酢酸ロイプロリドから構成される注射可能なマイクロスフェア）、およびポリ-D-(-)-3-ヒドロキシ酪酸などがある。エチレン-酢酸ビニルおよび乳酸-グリコール酸などのポリマーは100日以上にわたる分子の放出を可能にするが、一定のヒドロゲルは、それより短い期間に、タンパク質を放出する。封入された本発明のタンパク質が体内に長期間留まりうる場合、それらは37℃で水分に曝露された結果として、変性または凝集して、生物学的活性の喪失および免疫原性が変化する可能性をもたらす。関与する機序に応じて安定化のために合理的戦略を考案することができる。例えば、凝集機

30

40

【0235】

各治療剤の投薬量が薬剤のアイデンティティに依存することは当業者には理解されるだろうが、好ましい投薬量は約10mg/平方メートル～約2000mg/平方メートル、より好ましくは約50mg/平方メートル～約1000mg/平方メートルの範囲におよぶ。白金剤（カルボプラチン、オキサリプラチン、シスプラチン）などの好ましい薬剤の場合、好ましい投薬量は約10mg/平方メートル～約400mg/平方メートルであり、タキサン類（パクリタキセル、

50

ドセタキセル)の場合、好ましい投薬量は約20mg/平方メートル～約150mg/平方メートルであり、ゲムシタピンの場合、好ましい投薬量は約100mg/平方メートル～約2000mg/平方メートルであり、カンプトテシンの場合、好ましい投薬量は約50mg/平方メートル～約350mg/平方メートルである。この治療剤および他の治療剤の投薬量は、本発明の抗体、抗体フラグメントまたはコンジュゲートが治療剤と同時に投与されるか、逐次的に投与されるかに依存しうる。

【0236】

治療的応用の場合、本発明のタンパク質またはコンジュゲートは、薬学的に許容できる剤形で、対象に投与される。それらは、ボラスとして静脈内投与するか、ある期間にわたって持続注入によって投与するか、筋肉内、皮下、関節内、滑液包内、髄腔内、経口、局所外用、または吸入経路によって投与することができる。全身性治療効果に加えて局所的治療効果も発揮するように、タンパク質を、腫瘍内、腫瘍周囲、病変内、または病変周囲経路で投与することもできる。適切な薬学的に許容できる担体、希釈剤、および賦形剤はよく知られており、当業者は、臨床状況の求めに応じて、それらを決定することができる。適切な担体、希釈剤および/または賦形剤の例には、以下に挙げるものが含まれる：
(1) 約1mg/ml～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食塩水、pH約7.4、(2) 0.9%食塩水(0.9%w/vNaCl)、および(3) 5%(w/v)デキストロース。
本発明の方法はインビトロ、インビボ、またはエクスピボで実施することができる。

10

【0237】

本発明のタンパク質と1つ以上の追加治療剤との投与は、同時投与されるか、逐次的に投与されるかを問わず、治療的応用に関して上述したように行うことができる。同時投与の適切な薬学的に許容できる担体、希釈剤、および賦形剤が、同時投与されるその特定治療剤のアイデンティティに依存することは、当業者には理解されるだろう。

20

【0238】

凍結乾燥されるのではなく水性剤形で存在する場合、タンパク質は典型的には約0.1mg/ml～100mg/mlの濃度で製剤化されるだろう(ただしこれらの範囲を超えて広く変動することができる)。疾患を処置する場合、抗体またはコンジュゲートの適当な投薬量は、上に定義した処置される疾患のタイプ、疾患の重症度および経過、抗体が予防目的で投与されるか治療目的で投与されるか、過去の治療の経過、患者の病歴および抗体に対する応答、ならびに担当医の裁量に依存するだろう。本タンパク質は、一度に、または一連の処置で、患者に適切に投与される。

30

【0239】

例えば1回またはそれ以上の独立した投与によるか、持続注入によるかを問わず、疾患のタイプおよび重症度に応じて、好ましくは約1mg/平方メートル～約2000mg/平方メートルのタンパク質、より好ましくは約10mg/平方メートル～約1000mg/平方メートルの抗体が、患者への投与に関する初期候補投薬量である。数日以上にわたる反復投与には、状態に応じて、疾患症状の望ましい抑制が起こるまで、処置が繰り返される。しかし他の投薬レジメンが有用な場合もあり、それらも排除されない。

【0240】

本発明は、本明細書に記載する要素の1つ以上とそれらの要素の使用に関する指示とを含むキットも包含する。好ましい実施形態において、本発明のキットは、本発明の抗体、抗体フラグメントまたはコンジュゲートと、治療剤とを含む。この好ましい実施形態の指示には、本発明のタンパク質とその治療剤とを使ってがん細胞の成長を阻害するための指示、および/または本発明の抗体、抗体フラグメントまたはコンジュゲートとその治療剤とを使ってがんを持つ患者を処置する方法に関する指示が含まれる。

40

【0241】

好ましくは、キットで使用される治療剤は、ドセタキセル、パクリタキセル、ドキソルピシン、エピルピシン、シクロホスファミド、トラスツズマブ、カペシタビン、タモキシフェン、トレミフェン、レトロゾール、アナストロゾール、フルベストラント、エクセメスタン、ゴセレリン、オキサリプラチン、カルボプラチン、シスプラチン、デキサメタゾ

50

ン、アンチド、ベバシズマブ、5-フルオロウラシル、ロイコボリン、レバミソール、イリノテカン、エトポシド、トポテカン、ゲムシタピン、ビノレルピン、エストラムスチン、ミトキサントロン、アバレリックス、ゾレドロネート、ストレプトゾシン、リツキシマブ、イダルビシン、ブスルファン、クロラムブシル、フルダラビン、イマチニブ、シタラビン、イブリツモマブ、トシツモマブ、インターフェロン -2b、メルファラン (melphalam)、ボルテゾミブ、アルトレタミン、アスパラギナーゼ、ゲフィチニブ、エルロニチブ、抗EGF受容体抗体 (例えばセツキシマブまたはパニツムマブ)、イクサベピロン、およびエポチロンまたはその誘導体からなる群より選択される。より好ましくは、治療剤が白金剤 (例えばカルボプラチン、オキサリプラチン、シスプラチン)、タキサン (例えばパクリタキセル、ドセタキセル)、ゲムシタピン、またはカンプトテシンである。

10

【0242】

本発明のキットの要素は、溶液または凍結乾燥粉末など、キットに適した形態をとる。本キットの要素の濃度または量が、そのキットの各要素のアイデンティティおよび意図する用途に依存して変動することは、当業者には理解されるだろう。

【0243】

本キットの指示において言及されるがん、およびそのがん由来する細胞には、乳がん、大腸がん、卵巣癌、骨肉腫、子宮頸がん、前立腺がん、肺がん、滑膜癌、膵がん、黒色腫、多発性骨髄腫、神経芽細胞腫、および横紋筋肉腫が含まれる。

【0244】

その他の特許文献

20

以下に追記する特許出願および特許に記載されている方法および組成物も、この開示に包含される：米国特許出願公開第20050186203号；同第20050084906号；同第20050008642号；同第20040202655号；同第20040132028号；同第20030211078号；同第20060083683号；同第20060099205号；同第20060228355号；同第20040081648号；同第20040081647号；同第20050074865号；同第20040259155号；同第20050038229号；同第20050255548号；同第20060246059号；ならびに米国特許第5,707,632号；同第6,818,418号；および同第7,115,396号；ならびにPCT公開番号WO2005/085430；同WO2004/019878；同WO2004/029224；同WO2005/056764；同WO2001/064942；および同WO2002/032925。本願は、それぞれ2006年11月22日および2007年1月9日に提出された米国仮特許出願第60/860,605号および同第60/879,666号に基づく優先権を主張し、前記仮特許出願の内容は、参照によりそのまま本明細書に組み込まれる。

30

【0245】

参照による組み込み

本明細書に記載した文書および参考文献は、特許文書およびウェブサイトを含めて全て、この文書にその全部または一部が記載されている場合と同じ程度に、参照によりこの文書に個別に組み込まれる。

【0246】

実施例

以下に実施例を挙げて本発明を説明するが、これらの実施例は例示に過ぎず、本発明を限定しようとするものではない。本発明をその具体的実施形態に関して詳細に説明したが、その要旨と範囲から逸脱することなく、それらにさまざまな変化および変更を加えることは、当業者には明らかだろう。

40

【実施例1】

【0247】

IGF-1R結合分子の初期同定

位置23-29、52-55および77-86 (アミノ酸番号については配列番号1を参照されたい) に3つのランダム化された領域を持つヒトフィブ्रोネクチンの第10タイプ3ドメインのスクリーンに基づいて約 10^{13} 個のRNA-タンパク質融合物変種のライブラリーを構築した (3ルーブライブラリー；Xuら, Chemistry & Biology 9:933-942, 2002)。mRNA/cDNAヘテロ二重鎖に変換した後、その1兆個のmRNA/cDNA-タンパク質融合物のライブラリーを、溶解

50

した100nMビオチン化 IGF-IRに結合させ、ストレプトアビジン被覆磁気ビーズ上に捕捉した。cDNAを溶出させ、PCRで増幅し、それを使って、新しいmRNA/cDNA-タンパク質融合物のライブラリーを作成した。この方法で5ラウンドの選択を行い、ターゲット結合の濃縮を確認するために、IGF-IRに結合するライブラリーのパーセンテージを、各ラウンド後に定量PCRによってモニターした（図1）。

【実施例 2】

【0248】

競合 IGF-IR クローンの同定

個々のクローンがコードするタンパク質を、IGF-IRの存在下で、競合結合アッセイを使って、ターゲット結合の阻害について解析した。IGF-IRへのIGF-Iの結合を阻害するクローンは100個以上同定され、これらのクローンは天然リガンド（IGF-I）結合部位またはその近くでIGF-IRを結合することが示唆された。これら100個のクローンの配列番号（図30参照）と、競合結合アッセイにおけるその阻害パーセントを、表1に提示する。

【表 1 - 1】

表1：IGF-IR競合クローンの配列番号および阻害率（％）					
クローン	配列番号	阻害率（％）	クローン	配列番号	阻害率（％）
223B02	2	89.1%	224D01	56	62.3%
223A04	3	87.0%	225D09	57	61.8%
223F03	4	86.8%	218H08	58	61.6%
214D04	5	86.5%	225C05	59	61.1%
225E09	6	84.6%	224B02	60	60.2%
224A02	7	84.6%	214F04	61	59.6%
223A07	8	83.8%	225H10	62	58.4%
223E11	9	82.2%	215G10	63	58.2%
223H04	10	82.2%	225G09	64	58.1%
215G06	11	80.5%	223A09	65	58.0%
219F08	12	80.0%	225A10	66	58.0%
223B01	13	79.7%	215G07	67	58.0%
225B01	14	79.4%	215H06	68	57.6%
214C11	15	78.9%	215G01	69	57.4%
219C07	16	78.8%	225D11	70	57.3%
218C04	17	77.0%	225H09	71	56.8%
215A07	18	76.1%	215H03	72	56.4%
223D01	19	76.0%	218F11	73	56.4%
225D03	20	74.8%	225G07	74	56.1%
225A02	21	74.6%	225E05	75	55.7%
223A10	22	73.7%	218G01	76	54.3%
225B03	23	73.7%	224F01	77	53.6%
218C05	24	73.6%	225F05	78	53.0%
225A05	25	72.1%	219C04	79	52.5%
224A01	26	72.0%	215F02	80	50.7%
214F03	27	72.0%	223B05	81	50.6%
214A08	28	70.6%	214G08	82	50.5%
223H11	29	70.5%	219F03	83	50.3%
218B03	30	70.4%	214H01	84	50.0%
215E09	31	70.3%	215A03	85	49.7%
223A11	32	70.2%	214C08	86	49.6%
215H07	33	70.0%	214E04	87	49.2%
219G02	34	69.8%	219F07	88	49.1%
224F02	35	69.6%	215A05	89	49.0%
225A07	36	68.9%	214B07	90	48.7%
225B08	37	68.9%	214B10	91	48.5%
215E10	38	68.8%	215F10	92	48.1%
225B11	39	68.6%	215D01	93	47.9%
214C04	40	68.5%	223C04	94	46.8%

10

20

30

40

【表 1 - 2】

218F01	41	68.3%	219A09	95	46.7%
225H01	42	67.1%	219C11	96	46.6%
215D11	43	67.1%	215C05	97	46.6%
219H07	44	66.3%	215E11	98	46.3%
225A06	45	65.9%	225C03	99	45.9%
218A10	46	65.7%	219A06	100	45.9%
225H08	47	65.7%	215B03	101	45.7%
214B04	48	65.6%	215H09	102	45.7%
218F04	49	65.2%	219G08	103	45.4%
225A09	50	65.0%	225C06	104	45.3%
223G04	51	64.2%	215E01	105	45.3%
224H03	52	63.7%	219G10	106	44.9%
215G08	53	63.6%	219A11	107	44.7%
218B06	54	62.7%	215F05	108	44.7%
224D05	55	62.5%	219F04	109	44.3%

10

【実施例 3】

【0249】

IGF-IR競合クローンの電気泳動特性の検査

選択したクローンの純度および電気泳動特性をSDS-PAGEで調べた(図2)。単一カラム精製であることを考えると、これらは妥当な純度であることがわかり、(C末端タグに伴う追加質量を考慮すると)理論質量と合致する見掛けの分子量を持っていた。

20

【実施例 4】

【0250】

IGF-IRを結合する配列ファミリーの同定

IGF-Iと競合することができるクローンを配列決定し、Vector NTI (Invitrogen) を使って整列させた。大半のクローンは明確に異なる3つのファミリーに分類された。ファミリーの一つは、BCループの位置6にある保存されたバリンと、保存されたアルギンおよびチロシンを含有するさまざまな長さのFGループとによって認識された(クローン218C04、215D09、214C04、214F03、214C03、214E01、および218F09)。第2のファミリーは、DEループ中の保存されたチロシンおよびプロリンによって認識され、通常はちょうど10アミノ酸のFGループを伴っていた(クローン225D03、215E09、215B07、215D11、218E09、309B01、310A01、および310A03)。第3のクローンファミリーは、疎水性アミノ酸が保存されている14アミノ酸のFGループを持っていた(クローン223B01、223B02、および218F08)。残りのクローンは、他のファミリーとの類似性を示さず、明確に異なるファミリーにグループ分けすることができなかったものであり、ここには示さない。

30

【実施例 5】

【0251】

最適化に適した候補クローンの同定

上記の選択プロセスから得られるクローンは、バイオ治療薬(biotherapeutic)の厳密なアフィニティー、特異性および生物物理学的要件を満たさない可能性が高く、それゆえに、結合ループが精密化または「最適化」される、さらなる突然変異誘発が必要である。この方向に最も進んだクローンを同定するために、選ばれたいくつかの候補を綿密な特徴づけに付した。この実施例では、IGF-IR競合クローン218C04の特徴づけについて説明する。

40

【0252】

1リットルの大腸菌培養物を調製し、クローン218C04をSDS-PAGEで示すように精製した(図3)。生物物理学的性質の検査において、218C04は、SECで示されるように事実上全てが単量体であり(図4)、このクローンが高いタンパク質濃度で安定な凝集物を生成する傾向を持たないことが示唆された。精製品の表面プラズモン共鳴(BIAcore)解析により、溶液相に注入されたクローンは固定化IGF-IRに1.8nMのKDで結合することがわかった。

50

これらの性質は、全体として、このクローンが最適化に適することを示した。

【実施例 6】

【0253】

IGF-IR特異的クローンの最適化

以下の実施例では、IGF-IR特異的クローンの一つ、218C04の最適化について説明する。クローン218C04の配列を、BC、DE、およびFGループにそれぞれ下線を付けて示す：

VSDVPRDLEVVAAATPTSLLISWSPYLRVARYRITYGETGGNSPVQEFTVPSSARTATISGLKPGVDYITVYAVTPSNI
IGRHYGPISINYRT (配列番号17)。

【0254】

一度に1つのループをランダム配列で置き換えた3つのライブラリーを構築した。これらのライブラリーは、3つのループのうち2つのループにおいて、ランダム配列を、クローン218C04に対応する固定配列で置き換えた点を除いて、以下に説明するようにDNAレベルで構築した。

【0255】

これら3つのライブラリーを使って、増幅、mRNA-タンパク質融合物の合成、およびアフィニティ選択を行った。結合パーセンテージを各ラウンドごとにモニターし(図5a)、各ライブラリーが1%を上回る結合を示すまで、PROfusionを続けた。この時点で、各ライブラリーからランダムループを増幅し、それらを再び組み合わせて、3つのループが最適化されているマスターライブラリーを作成した(図5b)。

【0256】

3つの最適化されたループを全て含有するマスターライブラリーを、増幅、mRNA-タンパク質融合物の合成、およびアフィニティ選択のサイクルにかけた。最も高アフィニティの結合剤を選択するために、IGF-IRを、濃度を低下させながら使用した(図5c)。

【実施例 7】

【0257】

最適化された誘導体クローンを評価するための競合 IGF-IR アッセイ

この実施例では、選ばれた最適化フィブロネクチンベーススキファールドタンパク質を、最適化前のクローンであるクローン218C04と、競合アッセイで、IGF-IとIGF-IRの間の相互作用を阻害するその能力について比較した。HTPPおよび定量後に、多くのクローンは出発クローンよりも優れた阻害を示し、低nM領域のIC50を持つ(図6)。特に、あるクローン338A06は、このアッセイにおいて、1nMまたはそれ未満のIC50を持つようだった(図6)。

【実施例 8】

【0258】

最適化された IGF-IR 競合 クローンの配列

選ばれたクローンの最適化と、競合アッセイでのIGF-IGF-IR相互作用の阻害に関する誘導体の評価に続いて、クローンを配列決定した。図30の配列番号110~125と表2を参照されたい。この例では、親クローン218C04と同様に、全ての阻害性誘導体クローンが、保存されたバリン残基をBCループに含有していた。また、保存された疎水性残基、典型的にはロイシンも、BCループ中の保存された位置にしばしば認められた。

【0259】

また、最適化されたクローンのFGループは、ループ長のばらつきにもかかわらず、特異的な位置に、保存された残基を親クローン218C04と共有していた。この特定のクローンファミリーの場合、アルギニン-X-チロシンモチーフは、機能性に要求される重要なモチーフであると思われる。これは、一つのクローンを除く全ての誘導体クローンに見出され、そのクローン(354C10、アルギニン-X-バリン)は許容できる保存的置換であると思われる。したがって、218C04クローンファミリーの場合、IGF-IR結合と阻害活性の規定に最も大きな役割を果たすらしい4つの特徴的な位置が、2つはBCループ中に、また2つはFGループ中に存在するようである。

【表 2】

クローン	配列番号	クローン	配列番号	クローン	配列番号
338A05	110	354A09	115	354D10	120
338A06	111	354A10	116	354E02	121
339A01	112	354B10	117	354F11	122
353F10	113	354C05	118	354F06	123
353H09	114	354C10	119	354G02	124
				354G09	125

【実施例 9】

10

【0260】

最適化されたIGF-IR競合クローンの電気泳動特性の検査

選ばれた最適化クローンの1リットル大腸菌培養物を調製し、タンパク質を精製した。SDS PAGE (図7) により、単一カラム精製であるにもかかわらず、良好な純度と、(タグを計算に入れた) 理論分子量に合致する各クローンの見掛けの分子量とが明らかになった。

【実施例 10】

【0261】

最適化されたIGF-IR競合クローンの熱安定性の検査

選ばれたIGF-IR最適化クローンの1リットル大腸菌培養物を調製し、タンパク質を精製した。個々のクローンのアンフォールディングのエネルギー論または融解温度 T_m を特徴づけるために、示差走査熱量測定 (DSC) を行った。クローン338A06は、高度に安定な構造を示す62 というアンフォールディング温度を示した (図8)。他の最適化クローンの融解温度を表3に記載する。

20

【表 3】

表3：示差走査熱量測定によって決定されたIGF-IRクローンの融解温度	
クローン	(T_m , °C)
338A05	68
353F10	59
353H09	55
354A10	46
368G05	56
375G10	59

30

【実施例 11】

【0262】

最適化されたIGF-IR競合クローンの溶液特性の検査

選ばれた最適化クローンの1リットル大腸菌培養物を調製し、タンパク質を精製した。サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) により、クローン338A06に関するこの例では、単量体的挙動 (図9) が明らかになったことから、最適化されたクローンは高いタンパク質濃度で凝集する傾向を持たないことが示された。SECを多角度レーザー光散乱法 (MALLS) と併用して、単量体性を確認した。「古典的」光散乱法 (「静的」または「レイリー」散乱法またはMALLSとも呼ばれている) は分子質量の直接的尺度を与える。したがってこれは、あるタンパク質のネイティブ状態が単量体であるか高次オリゴマーであるかを決定するのに、そして凝集体または他の非ネイティブ種の質量を測定するのに、極めて有用である。本実施例では、クローン338A06の解析を提示する。図10に示すように、SEC MALLSにより、クローン338A06に関して、12,190Daという質量が決定され、これは、11,740というHisタグ付き単量体の予想質量に対して、十分に実験誤差内である。これは、これらのクローンが溶解した状態で模範的な単量体であることを示すさらなる証拠になる。

40

【実施例 12】

50

【 0 2 6 3 】

最適化されたIGF-IR競合クローンの結合アフィニティーおよび結合速度論の決定

選ばれた最適化クローンの1リットル大腸菌培養物を調製し、タンパク質を精製した。結合速度論および結合アフィニティーを決定するために、組換え固定化IGF-IRと溶液相クローンとを使って、表面プラズモン共鳴（BIAcore）解析を行った。表4に示すように、本実施例に示すクローンの場合、結合アフィニティーは、二桁のpMから一桁のnMまでの K_D という範囲にあった。解離速度は 10^{-4} （1/s）域にあり、会合速度は極めて速く、典型的には約 10^6 （1/M・s）だった。

【表 4】

表4：BIAcoreによる k_a 、 k_d および K_D の決定			
クローン	k_a (1/M・s) $\times 10^6$	k_d (1/s) $\times 10^{-4}$	K_D (nM)
353F10	3.7	2.1	0.056
353H09	3.8	2.2	0.057
338A06	2.2	4.3	0.069
354A10	1.1	1.8	0.158
338A05	1.3	3.3	0.261
375G10	1.3	7	0.538
339A01	1.2	6.7	0.565
368G05	0.0036	9.8	2.74

【実施例 1 3】

【 0 2 6 4 】

インスリン受容体に対する最適化されたIGF-IR競合クローンの結合の決定

選ばれた最適化クローンの1リットル大腸菌培養物を調製し、タンパク質を精製した。ヒトインスリン受容体に対するヒトIGF-IRのホモロジーは約56%である。IGF-IR競合クローンがIGF-IRに対して実際に特異的であることを保証するために、BIAcore法を使用して、ヒトインスリン受容体に対して、それらを高濃度で評価した。ヒトインスリン受容体をBIAcoreチップ上に固定化し、非特異的結合を考慮するために、無関係なタンパク質も同様にした。大半のクローンでIGF-IR結合の K_D より10,000倍以上大きい10 μ Mという濃度で、チップ上にクローンを流した。類似する濃度でのインスリン結合のシグナルに対するパーセンテージを記録し、それらを表5に提示する。大半のクローンは、この高濃度においてインスリン受容体への検出可能な結合を示さないか、ほとんど示さなかったことから、これらは実際にIGF-IRに対して特異的であることが例証された。インスリン受容体に対してある程度の結合を示すクローンは選択的結合剤であるらしい。

【表 5】

表5：IGF-IRクローンによるインスリン受容体（IR）結合	
クローン	10 μ MにおけるIR結合率（%）
338A06	2
354A10	1
353F10	1
353H09	0
375G10	0
368G05	21
338A05	45
339A01	>100
インスリン	100

【実施例 1 4】

【 0 2 6 5 】

IGF-IRクローン338A06のMALDI TOF質量分析

アイデンティティを保証するために、精製最適化IGF-IRクローンの質量分析を行った。本実施例では、クローン338A06を調べた。クローン338A06の予想質量は11741原子質量単位 (amu) である。クローン338A06のMALDI TOF質量分析により、標準品を使った較正後に、11741 m/zという質量が明らかになった (図11)。他にも微量種が、より高いm/zとして観察されるが、これらはマトリックス付加物に合致する (図11)。したがって338A06は、そして実際には検査したIGF-IRクローンの全てが、それぞれの予想質量と合致する質量を与えた。

【実施例 1 5】

【0 2 6 6】

細胞ベースのアッセイにおけるIGF-IR競合クローン338A06の活性

10

活性を確認するために、精製最適化IGF-IRクローンを細胞ベースのアッセイで評価した。一例として、図12に示すように、選ばれたクローン338A06によるIGF-I媒介性有糸分裂誘発の阻害を実証する。IGF-I非含有培地中のヒト膵腺癌細胞株BxPC-3を、クローン338A06またはよく使用される抗IGF-IRモノクローナル抗体 (MAB391) の希釈系列で処理した。IGF-Iへの24時間の刺激曝露後に、細胞増殖を測定するために、細胞を³H-チミジンで処理した。図12に示すように、クローン338A06は、モノクローナル抗体対照と比較して、IGF-I依存的増殖を、約10~20nMのIC50で阻害した。

【0 2 6 7】

第2の細胞ベースのアッセイでは、IGF-IR発現がん細胞株への放射標識IGF-I結合の、クローン338A06による阻害が実証される。ヒト乳癌MCF-7細胞を、クローン338A06、モノクローナル抗体MAB391、または非標識IGF-Iと共に、30分間、プレインキュベートした。このインキュベーション期間後に、放射標識IGF-Iを加えた。次に細胞を溶解し、放射能を定量した。図13に示すように、クローン338A06および非放射性IGF-Iは、約1~2nMという本質的に同等なIC50を持つが、モノクローナル抗体は、IC50が約5nMで、それほど強力ではないようだった。

20

【実施例 1 6】

【0 2 6 8】

クローン338A06の最適化

貯蔵中のタンパク質によく見られる分解プロセスの一つは、化学的および物理学的な安定性と生物学的活性との潜在的喪失をもたらすメチオニン残基の酸化である。フィブロネクチンベーススキャフォールドタンパク質クローンは、そのバックボーン中にメチオニン残基を含有しないが、選ばれたいくつかのIGF-IR競合クローンはそのループ中にメチオニンを含有する。出発クローンの生物学的活性の望ましい性質および生物物理学的性質を保ちつつも、ループ中の望ましくないメチオニン残基が置換されたクローンを選択するために、最適化を行った。この実施例では、FGループ中にメチオニン残基を含有するクローン338A06の最適化を示す。

30

【0 2 6 9】

FGループ中に6個のランダムアミノ酸を持つ単一ライブラリーを使ってクローン338A06を最適化した。新しいライブラリーのBCおよびDEループには、適当なオリゴヌクレオチドを使って338A06の配列 (配列番号111) を組み込んだ。

40

【0 2 7 0】

ライブラリーを後述するように構築し、二本鎖DNAのDNAをmRNA-タンパク質融合物に変換して、約1000コピーの各FGループ配列を得た。増幅、mRNA-タンパク質融合物形成およびアフィニティー選択というPROfusionサイクルを行った。第1ラウンドでは、ビオチン化IGF-IR濃度を100nMとしたが、最も高アフィニティーの結合剤が濃縮されるように、以後のラウンドではこれを低下させた。

【実施例 1 7】

【0 2 7 1】

338A08の最適化誘導体に関する直接結合アッセイ

直接結合アッセイを使って、クローン338A06の最適化された誘導体を、IGF-IRへの強化

50

された結合についてスクリーニングした。一点アッセイで結合を示したクローンを、クローン濃度の勾配を使ってさらに解析した。図14に示すように、いくつかの誘導体クローンは、親クローン338A06に匹敵するアフィニティーで、IGF-IRを結合した。約1nMの濃度で半最大値 (half-maximal) 結合が認められた (図14)。

【実施例 18】

【0272】

最適化された338A06 IGF-IR競合クローンの配列

338A06クローンのFGループの最適化と、直接結合アッセイにおけるIGF-IRへの結合に関する誘導体の評価に続いて、クローンを配列決定した。図30の配列番号184~202および表6を参照されたい。この実施例で提示するクローンのうち、FGループ中にメチオニンを含むクローンは一つだけで (クローン387A09)、これは親338A06クローンとは異なる位置にある。したがって、338A06クローンのFGグループ中のメチオニンは、機能性にとって重要ではないと思われる。本発明は、この不安定化残基を工学的に取り除く手段を与える。

【0273】

これらのクローンの218C04誘導の場合と合致して、アルギニン-X-チロシンモチーフは、338A06 FGループ最適化作業の産物の全てにおいて保たれていた。これは、この特定ファミリーの場合、フィブロンネクチンベーススキャフォールドタンパク質フォールドという背景において、このレジスタ (register) 中のこれら2つの残基が、IGF-IRの結合および阻害における主要決定基であるらしいことを示すさらにもう一つの証拠になる。

【表 6】

クローン	配列番号	クローン	配列番号	クローン	配列番号
385A08	184	385F08	190	386F10	196
385A09	185	385H06	191	386F11	197
385B04	186	386A03	192	386H05	198
385D05	187	386A05	193	387A03	199
385E01	188	386A07	194	387A09	200
385E04	189	386F01	195	387B01	201
				387C02	202

【実施例 19】

【0274】

FGループ最適化338A06 IGF-IR競合クローンの溶液特性の検査

FGループ最適化338A06 IGF-IR競合クローンのHTPP材料のサイズ排除クロマトグラフィー (SEC) により、最適化されたクローンが高いタンパク質濃度において凝集する傾向を持たないことを示す単量体的挙動が明らかになった。この実施例では最適化およびHTPPによって得られた9個のクローンを提示する (図15)。

【実施例 20】

【0275】

FGループ最適化338A06 IGF-IR競合クローンの結合アフィニティーおよび結合速度論の決定

選ばれたFGループ最適化338A06 IGF-IR競合クローンの1リットル大腸菌培養物を調製し、タンパク質を精製した。結合速度論および結合アフィニティーを決定するために、組換え固定化IGF-IRと溶液相クローンとを使って、BIAcore解析を行った。表7に示すように、本実施例に示すクローンの場合、結合アフィニティーは、二桁から三桁までのpMという範囲にあった。解離速度は 10^{-4} (1/s) 域にあり、会合速度は極めて速く、典型的には約 10^6 (1/M・s) だった。

【表 7】

表7：BIAcoreによる k_a 、 k_d および K_D の決定			
クローン	k_a (1/M・s) $\times 10^{-6}$	k_d (1/s) $\times 10^{-4}$	K_D (pM)
385A08	5.7	1.9	34
386A03	5.2	4.6	88
387B01	6.5	4.4	67
389A12	6.4	2.8	44
386F10	1.9	2.3	123

【実施例 2 1】

10

【0276】

インスリン受容体に対するFGループ最適化338A06 IGF-IR競合クローンの結合の決定

選ばれたFGループ最適化338A06 IGF-IR競合クローンの1リットル大腸菌培養物を調製し、タンパク質を精製した。ヒトインスリン受容体に対するヒトIGF-IRのホモロジーは約56%である。IGF-IR競合クローンがIGF-IRに対して実際に特異的であることを保証するために、BIAcore法を使用して、ヒトインスリン受容体に対して、それらを高濃度で評価した。ヒトインスリン受容体をBIAcoreチップ上に固定化し、非特異的結合を考慮するために、無関係なタンパク質も同様にした。大半のクローンでIGF-IR結合の K_D より10,000倍以上大きい10 μ Mという濃度で、チップ上にクローンを流した。類似する濃度でのインスリン結合のシグナルに対するパーセンテージを記録し、それらを表8に提示する。大半のクローンは、この高濃度においてインスリン受容体への検出可能な結合を示さなかったことから、これらのクローンは実際にIGF-IRに対して特異的であることが例証された。

20

【表 8】

表8：338A06FGループ最適化IGF-IRクローンによるインスリン受容体結合	
クローン	10 μ MにおけるIR結合率 (%)
338A06	0
385A08	0
386A03	3
387B01	0
386F10	3
389A12	0
インスリン	100

30

【実施例 2 2】

【0277】

IGF-IRに対するFGループ最適化338A06クローンの熱安定性の検査

選ばれたFGループ最適化338A06 IGF-IR競合クローンの1リットル大腸菌培養物を調製し、タンパク質を精製した。個々のクローンのアンフォールディングのエネルギー論または融解温度 T_m を特徴づけるために、示差走査熱量測定 (DSC) を行った。試験したクローンは、極めて安定な構造を表す58~63 というアンフォールディング温度を示した。最適化されたクローンの融解温度を表9に記載する。

40

【表 9】

表9：示差走査熱量測定法で決定したIGF-IRクローンの融解温度	
クローン	(T _m , °C)
385A08	59
386A03	62
386F10	58
387B01	63
389A12	58

10

【実施例 2 3】

【0 2 7 8】

精製後のFGループ最適化338A06 IGF-IR競合クローンの溶液特性の検査

選ばれたFGループ最適化338A06 IGF-IR競合クローンの1リットル大腸菌培養物を調製し、タンパク質を精製した。FGループ最適化338A06 IGF-IR競合クローンのHTPP材料のサイズ排除クロマトグラフィー（SEC）により、最適化されたクローンが高いタンパク質濃度において凝集する傾向を持たないことを示す単量体的挙動が明らかになった。この実施例では代表的クローン387B01のSECプロファイルを提示する（図16）。

【実施例 2 4】

【0 2 7 9】

精製後のRP-HPLCによるIGF-IRに対するFGループ最適化338A06クローンの純度および均一性の検査

選ばれたFGループ最適化338A06 IGF-IR競合クローンの1リットル大腸菌培養物を調製し、タンパク質を精製した。クローンの純度を特徴づけると共に、クローンの均一性を立証するために、逆相高速液体クロマトグラフィー（RP-HPLC）を行った。図17に示す代表的クロマトグラムによって例示されるように、全てのクローンが、そのC末端に工学的に導入されたC末端タグを利用する単一カラム精製後に、優れた純度および均一性を示した。

【実施例 2 5】

【0 2 8 0】

精製後のFGループ最適化338A06クローンのMALDI TOF質量分析

選ばれたFGループ最適化338A06 IGF-IR競合クローンの1リットル大腸菌培養物を調製し、タンパク質を精製した。アイデンティティを保証するために、精製最適化IGF-IRクローンの質量分析を行った。本実施例では、クローン387B01を調べた。クローン387B01の予想質量は11554原子質量単位（amu）である。クローン387B01のMALDI TOF質量分析により、標準品を使った較正後に、この機器測定の実験誤差内に十分含まれる約11553 m/zという質量が明らかになった（図18）。より高いm/zに、もう一つの微量種が観察される（図18）。これがマトリックス付加物であるのか、微量翻訳後修飾種であるのかは、はっきりしない。したがって387B01は、そして実際には検査したIGF-IRクローンの全てが、それぞれの予想質量と合致する質量を与えた。

【実施例 2 6】

【0 2 8 1】

フィブロネクチンベーススキャフォールドタンパク質のPEG化

インビボ研究を行うために、フィブロネクチンベーススキャフォールドタンパク質のPEG化を行った。本実施例では、下記のタンパク質配列（C末端伸長部を太字の斜体で表し、Cys97に下線を付す）を与えるC末端伸長部を持つクローン385A08を大腸菌発現系で産生させた：

【化 1】

GVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSARLKVARYYYRITYGETGGNSPVQEFTVPK
NVYTATISGLKPGVDYTITVYAVTRFRDYQPISINYRTEIDKPCO (配列番号203)

50

【 0 2 8 2 】

位置97にあるシステイン残基の唯一のスルフヒドリルを使用し、標準的なマレイミドケミストリーを使ってPEG変種にカップリングすることにより、2つの異なるPEG化型385A08を得た。線状20kDa二官能性PEGと一官能性分岐40kDa PEG (NOF Corporation) の両者をクローン385A08にコンジュゲートして、それぞれ385A08-PEG20-385A08および385A08-PEG40を得た。これらのPEG化タンパク質型を未反応のタンパク質およびPEGから、イオン交換およびサイズ排除クロマトグラフィーによって精製した。2つのPEG型385A08の共有結合をSDS-PAGE (図11) および質量分析によって確認した。

【実施例 2 7】

【 0 2 8 3 】

PEG化フィブロネクチンベーススキャフォールドクローン変種の結合アフィニティーおよび結合速度論の決定

385A08-PEG20-385A08変種および385A08-PEG40変種の結合速度論および結合アフィニティーを決定するために、組換え固定化IGF-IRと溶液相分析物とを使って、表面プラズモン共鳴 (BIAcore) 解析を行った。385A08-PEG40型は無修飾385A08と比較して約10分の1の遅い会合速度 (k_a) を持つことがわかったが、385A08-PEG20-385A08型は約2倍速い会合速度を持つ (表10)。変種の解離速度 (k_d ; 表10) は、無修飾385A08と比較して、385A08-PEG40型の場合はわずかに増加し、385A08-PEG20-385A08変種の場合はわずかに減少した。

【表 1 0】

表10: BIAcoreによる k_a 、 k_d および K_D の決定			
クローン	k_a (1/M · s) $\times 10^{-6}$	k_d (1/s) $\times 10^{-4}$	K_D (pM)
385A08	6.9	1.6	23
385A08-PEG20-385A08	15	0.96	6
385A08-PEG40	0.6	2.1	355

【実施例 2 8】

【 0 2 8 4 】

IGF-IR増殖アッセイにおけるPEG化フィブロネクチンベーススキャフォールドクローン変種の評価

PEG化フィブロネクチンベーススキャフォールド変種を、ヒト形質細胞腫細胞株NCI-H929を使って、血清媒介性増殖の阻害について評価した。この細胞株において、抗IGF-IR MA B391と無修飾385A08は、同等程度の細胞成長阻害を示し、見掛けのIC50は約100pMだった。385A08-PEG40変種は阻害性がわずかに弱く、IC50は1nMに近かった。これに対し、PEG20-385A08-PEG20変種は極めて強力であり、試験した全ての濃度で本質的に100%阻害的だった。したがってIC50は100fM未満だった。

【実施例 2 9】

【 0 2 8 5 】

IGF-IR増殖アッセイにおけるフィブロネクチンベーススキャフォールドIGF-IR結合剤のマルチマーの評価

ヒトIGF-IRを発現させるマウスリンパ球細胞株32Dを使って、IGF-IRアンタゴニストの効果の評価した。2つのフィブロネクチンベーススキャフォールドIGF-IR結合ドメインを含むアンタゴニストは、単一フィブロネクチンベーススキャフォールドドメインまたは抗IGF-IR抗体と比較して、阻害効果の著しい増加を示した。

【実施例 3 0】

【 0 2 8 6 】

IGF-IR増殖アッセイにおける二重特異性フィブロネクチンベーススキャフォールドマルチマーの評価

フィブロネクチンベーススキャフォールドタンパク質を、ヒト形質細胞腫細胞株NCI-H929を使って、血清媒介性増殖の阻害について評価した。この細胞株において、IGF-IRフィブロネクチンベーススキャフォールドとIGF-IR/VEGFR2二重特異性フィブロネクチンベーススキャフォールド

マルチマーは、同等程度の細胞成長阻害を示した。

【実施例 3 1】

【0287】

VEGFR2増殖アッセイにおける二重特異性フィブロネクチンスクフォールドマルチマーの評価

フィブロネクチンスクフォールドタンパク質を、VEGF依存性細胞株の阻害について評価した。この細胞株において、VEGFR2フィブロネクチンスクフォールドとIGF-1R/VEGFR2二重特異性フィブロネクチンスクフォールドマルチマーは、同等程度の細胞成長阻害を示した。

【実施例 3 2】

【0288】

フィブロネクチンスクフォールドIGF-1R結合剤HSAコンジュゲートの評価

フィブロネクチンスクフォールドタンパク質を、ヒト形質細胞腫細胞株NCI-H929を使って、血清媒介性増殖の阻害について評価した。IGF-1RとIGF-1R/HSAタンパク質は、同等程度の細胞成長阻害を示した（図25参照）。

【0289】

さまざまなIGF-1Rアンタゴニストを、それらのインビボ抗腫瘍活性について、RH41肉腫異種移植片で試験した（図26および27参照）。その研究の結果を表11に要約する。

【表 1 1】

RH41肉腫研究におけるインビボ抗腫瘍活性

化合物	スケジュール, 経路	用量 (mg/kg)	平均重量 変化(g) ^c	LCK	%TGI*	%TGIに 関するp値*	LCKによ る成績 (%TGI)
IGF-1R 化合物	qd×21; 20po ^a	50	-0.9	0.5	70	0.004	I(A)
385A08	2qd×20; 28ip ^b	40	1.0	0.2	19	0.301	I(I)
385A08	2qd×20; 28ip ^b	20	0.6	0.2	33	0.053	I(I)
385A08- PEG20- 385A08	TIW×3; 20ip ^b	40	0.1	0.6	66	0.001	I(A)
385A08- PEG40	TIW×3; 20ip ^b	40	1.4	0.4	56	0.053	I(A)
385A08- HSA	TIW×3; 20ip ^b	40	0.8	0.7	71	0.013	I(A)
対象 (無処理)	---	---	1.4	---	---	1	---

*39日目に算出した腫瘍成長阻害および有意確率(probability value)。^aビヒクルは80%PEG400、20%dH₂Oとした。^bビヒクルはPBSとした。^c各群の平均重量変化は、処置開始時(20日目)の重量と処置終了後(42日目)の重量の間の平均差である。TVDTは500mgのサイズについて算出した。使用した略号は以下のとおりである:po、経口経路;ip、腹腔内経路;LCK、 $LCK = T - C / (3.32 \times TVDT)$ として算出される総(gross)log cell kill。式中、T-Cは、ビヒクル対照群(C)と比較して処置腫瘍(T)が所定のサイズ(腫瘍ターゲットサイズ)に到達するのに要する時間の差(単位:日)であり、これを腫瘍体積倍加時間(TVDT)に3.32を掛けた値で割る。TVDTは、対照腫瘍がターゲットサイズに到達するのに要する中央時間(単位:日)-対照腫瘍がターゲットサイズの半分に到達するのに要する中央時間(単位:日)とした;成績、統計的に有意な1.0のLCKをもたらす場合に、その

処置レジメンは有効であるとみなした； $\%TGI$ 、 $\%TGI = [(C_t - T_t) / (C_t - C_0)] \times 100$ として算出される相対的腫瘍成長阻害率（％）。式中、 C_t = 腫瘍移植後の日数で表した時刻 t における対照マウスの中央腫瘍重量、 T_t = 時刻 t における処置マウスの中央腫瘍重量、 C_0 = 時刻0における対照マウスの中央腫瘍重量。 $\%TGI$ 値は、1.5腫瘍体積倍加時間後に始まり、可能な場合には3腫瘍体積倍加時間の期間にわたって持続する、さまざまな時点で算出した。 $> 50\%$ の $\%TGI$ 値を有効とみなした； $q2d \times 5$ （スケジュールの一例として）、化合物を1日おきに5回投与した。

【 0 2 9 0 】

HSA-IGF-IRのポリペプチド融合タンパク質も作製することができる。以下に、IGF-IRクローン385A08へのさまざまなN末端およびC末端 HSA融合物を列挙する。C末端コンストラクトでは、HSAリーダーおよびプロペプチド配列を省く。Fnリンカー1は、第1および第2フィブロネクチンタイプIIIドメインを連結するアミノ酸配列から誘導される。Fnリンカー2は、第10および第11フィブロネクチンタイプIIIドメインを連結するアミノ酸配列から誘導される（図30参照）。

10

【 0 2 9 1 】

ヒト血清アルブミン（無加工）-Fnリンカー1-385A08；配列番号228

385A08-Fnリンカー1-ヒト血清アルブミン（加工）；配列番号229

ヒト血清アルブミン（無加工）-Fnリンカー2-385A08；配列番号230

ヒト血清アルブミン（無加工）-(GS)₅リンカー-385A08；配列番号231

ヒト血清アルブミン（無加工）-(GS)₁₀リンカー-385A08；配列番号232

20

385A08-Fnリンカー2-ヒト血清アルブミン（加工）；配列番号233

385A08-(GS)₅リンカー-ヒト血清アルブミン（加工）；配列番号234

385A08-(GS)₁₀リンカー-ヒト血清アルブミン（加工）；配列番号235

【 実施例 3 3 】

【 0 2 9 2 】

トランスフェリンに連結されたフィブロネクチンスクフォールドIGF-IR結合剤の評価

トランスフェリンに融合されたフィブロネクチンスクフォールドタンパク質を、ヒト形質細胞腫細胞株NCI-H929を使って、血清媒介性増殖の阻害について評価する。

【 0 2 9 3 】

トランスフェリン-IGF-IRのポリペプチド融合タンパク質を作製することができる。以下にIGF-IRクローン385A08へのさまざまなN末端およびC末端トランスフェリン融合物を列挙する。C末端コンストラクトではトランスフェリンリーダー配列を省く（図30参照）。

30

【 0 2 9 4 】

ヒトトランスフェリン（無加工）-Fnリンカー1-385A08；配列番号236

385A08-Fnリンカー1-ヒトトランスフェリン（加工）；配列番号237

ヒトトランスフェリン（無加工）-Fnリンカー2-385A08；配列番号238

ヒトトランスフェリン（無加工）-(GS)₅リンカー-385A08；配列番号239

ヒトトランスフェリン（無加工）-(GS)₁₀リンカー-385A08；配列番号240

385A08-Fnリンカー2-ヒトトランスフェリン（加工）；配列番号241

385A08-(GS)₅リンカー-ヒトトランスフェリン（加工）；配列番号242

40

385A08-(GS)₁₀リンカー-ヒトトランスフェリン（加工）；配列番号243

【 実施例 3 4 】

【 0 2 9 5 】

IGF-IR-Fc融合タンパク質

Fcに融合されたフィブロネクチンベーススクフォールドタンパク質を、さまざまな細胞株を阻害するその能力について評価した。385A08-Fc（配列番号247のアミノ酸90-423）に関して、Rh41細胞（4.5nM）、DU4475細胞（ > 50 nM）、H929細胞（0.15nM）、BXP-3（ > 500 nM）、およびHT-29細胞（ > 1000 nM）で、IC50値を決定した。IGF-IR-Fc融合物は、Rh41細胞株で91%の最大阻害を示した。

【 0 2 9 6 】

50

Fcに融合されたフィブロネクチンベーススキャフォールドタンパク質を、ヒト横紋筋肉腫細胞におけるIGF-1R、AKTおよびMAPKのリン酸化を阻害するそれらの能力について評価した（図29参照）。

【0297】

Fcに融合したフィブロネクチンベーススキャフォールドタンパク質を、Rh41およびH929細胞株における増殖を阻害するそれらの能力について評価した（表12）。細胞を、nM濃度の385A08-Fcで、記載のとおり処理した。IC50値は以下のとおりである：Rh41試行1（48.6 nM）、Rh41試行2（39.43 nM）、Rh1試行の平均（44 nM）、およびH929試行（0.15 nM）。

【表12】

表12：Rh41およびH929細胞株における細胞増殖に対する385A08-Fcの効果

	Rh41試行1		Rh41試行2		H929アッセイ	
nM	[³ H] 取り込み	標準 偏差	[³ H] 取り込み	標準偏差	[³ H] 取り込み	標準偏差
50	54.9	2.67	52.1	3.27	20.2	1.52
10.0	61.9	1.56	59.3	1.14	18.4	0.89
2.0	77.9	2.86	78.6	1.9	20.6	0.62
0.4	97.1	2.26	94.6	1.08	32.0	1.97
0.08	102.9	1.14	98.4	0.52	57.1	3.87
0.016	101.2	1.26	102.5	0.95	80.1	3.09

【実施例35】

【0298】

本明細書で使用した方法の例

先の実施例で説明した実験には以下の材料および方法を使った。

組換えタンパク質：

組換えヒトIGF-I、IGF-IR、インスリン受容体（IR）、抗IGF-IR MAB391、および組換えヒトVEGF-R2-Fcは、R&D Systems（ミネソタ州ミネアポリス）から入手した。IGF-IRのビオチン化は、EZ-Link（商標）スルホ-NHS-LC-LC-ビオチン（Pierce, イリノイ州）の存在下、1×PBS中、4℃で2時間行った。1×PBSに対する透析によって過剰のEZ-Link（商標）スルホ-NHS-LC-LC-ビオチンを除去した。ビオチン化のレベルを質量分析によって決定し、Coomassie Protein Plus Assay（Pierce, イリノイ州）を使ってタンパク質濃度を決定した。

【0299】

プライマー：

最終的にライブラリーの構築および選択したクローンの突然変異誘発で使用するために、以下のオリゴヌクレオチドを化学合成によって製造した

T7TMV：5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA CAA TTA CTA TTT ACA ATT ACA ATG-3'（配列番号204）

FnAB：5'-GGG ACA ATT ACT ATT TAC AAT TAC AAT GGT TTC TGA TGT GCC GCG CGA CCT GGA AGT GGT TGC TGC CAC CCC CAC CAG CCT GCT GAT CAG CTG G-3'（配列番号205）

FnBC：5'-AGC CTG CTG ATC AGC TGG NNS NNS NNS NNS NNS NNS NNS CGA TAT TAC CGC ATC ACT-3'（配列番号206）

FnCD：5'-AGG CAC AGT GAA CTC CTG GAC AGG GCT ATT GCC TCC TGT TTC GCC GTA AGT GAT GCG GTA ATA TCG-3'（配列番号207）

FnDE：5'-CAG GAG TTC ACT GTG CCT NNS NNS NNS NNS ACA GCT ACC ATC AGC GGC-3'（配列番号208）

FnEF：5'-AGT GAC AGC ATA CAC AGT GAT GGT ATA ATC AAC GCC AGG TTT AAG GCC GCT GAT GGT AGC TGT-3'（配列番号209）

FnFG6：5'-ACT GTG TAT GCT GTC ACT NNS NNS NNS NNS NNS NNS CCA ATT TCC ATT AAT TA C-3'（配列番号210）6個のランダムアミノ酸を持つFGループを与える。

FnFG8：5'-ACT GTG TAT GCT GTC ACT NNS NNS NNS NNS NNS NNS NNS CCA ATT TCC AT

T AAT TAC-3' (配列番号211) 8個のランダムアミノ酸を持つFGループを与える。

FnFG10 : 5'-ACT GTG TAT GCT GTC ACT NNS NNS NNS NNS NNS NNS NNS NNS CCA A
TT TCC ATT AAT TAC-3' (配列番号212) 10個のランダムアミノ酸を持つFGループを与える。

FnFG12 : 5'-ACT GTG TAT GCT GTC ACT NNS NNS NNS NNS NNS NNS NNS NNS NNS NNS
NS CCA ATT TCC ATT AAT TAC-3' (配列番号213) 12個のランダムアミノ酸を持つFGループ
を与える。

FnFG14 : 5'-ACT GTG TAT GCT GTC ACT NNS NNS NNS NNS NNS NNS NNS NNS NNS NNS
NS NNS NNSCCA ATT TCC ATT AAT TAC-3' (配列番号214) 14個のランダムアミノ酸を持つF
Gループを与える。

FnG : 5'-TTA AAT AGC GGA TGC CTT GTC GTC GTC GTC CTT GTA GTC TGT GCG GTA ATT AAT
GGA AAT TGG-3' (配列番号215)

FLAG : 5'-TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTA AAT AGC GGA TGC CTT GTC GTC GTC GTC CTT GTA
-3' (配列番号216)

218C04BC : 5'-AGC CTG CTG ATC AGC TGG TCC CCG TAC CTG CGC GTC GCC CGA TAT TAC CGC
ATC ACT-3' (配列番号217)

218C04DE : 5'-CAG GAG TTC ACT GTG CCT TCC TCC GCC CGC ACA GCT ACC ATC AGC GGC-3'
(配列番号218)

218C04FG : 5'-ACT GTG TAT GCT GTC ACT CCG TCC AAC ATC ATC GGC CGT CAC TAT GGC CCA
ATT TCC ATT AAT TAC-3' (配列番号219)

FnB : 5'-AGC CTG CTG ATC AGC TGG-3' (配列番号220)

FnD : 5'-CAG GAG TTC ACT GTG CCT-3' (配列番号221)

FnF : 5'-ACT GTG TAT GCT GTC ACT-3' (配列番号222)

338A06BC : AGC CTG CTG ATC AGC TGG TCT GCG CGT CTG AAA GTT GCG CGA TAT TAC CGC AT
C ACT (配列番号223)

338A06DE : CAG GAG TTC ACT GTG CCT AAA AAC GTT TAC ACA GCT ACC ATC AGC GGC (配列
番号224)

【 0 3 0 0 】

一次ライブラリー構築：

上に列挙したオーバーラップ合成オリゴヌクレオチドを、KODポリメラーゼ (EMD Biosciences、カリフォルニア州サンディエゴ) を使って伸長することにより、多様なライブラリーを構築した。これらのオリゴヌクレオチド指定において、「N」はA、C、GおよびTの混合物を示し、「S」はCおよびGの混合物を示す。ループの定義は以前記述されたものと同じである (Xuら, 2002)。1Mベタインおよび3% DMSOを添加した100 μl KOD反応において、50pmol FnBCを100pmol FnCDで伸長することにより、BCループを構築した。この反応を、94 °で30秒、52 °で30秒、そしてフラグメントの完全な伸長を保証するために68 °で1分の温度サイクルに、10回かけた。DEループおよびFGループも、DEループについては200pmol FnDEを100pmol FnEFと共に使って、またFGループについては100pmol FnFG10を200pmol FnGと共に使って、同様の方法で構築した。3個の個別ループの伸長後に、DEループとFGループを組み合わせ、94 °で30秒、52 °で30秒、そして68 °で1分の温度サイクルをさらに10回行うことによって、一緒に伸長させた。BCループを100pmol FnABで同じように伸長した。DE/FG混合物とBCループを新鮮なKOD試薬でそれぞれ10倍希釈し、それぞれFLAGおよびT7TMVを使って、94 °で30秒、52 °で30秒、そして68 °で1分の温度サイクルを10回行うことによって伸長した。最後に、それらのフラグメントを組合せ、94 °で30秒、52 °で30秒、そして68 °で1分の温度サイクルを10回行うことによって、一緒に伸長させた。これにより、BCループ中に7個のランダムアミノ酸、DEループ中に4個のランダムアミノ酸、そしてFGループ中に10個のランダムアミノ酸を持つライブラリーが得られた。FnFG10の代わりにオリゴヌクレオチドFnFG6、FnFG8、FnFG12またはFnFG14を使用することにより、異なるFGループ長を持つ追加ライブラリーも構築した。6アミノ酸～14アミノ酸のFGループ長を持つライブラリーを組み合わせ、可変長FGライブラリーを得た。

【 0 3 0 1 】

クローン218C04からの単一ランダム化ライブラリーの構築：

単一のループがランダム配列で置き換えられている3つのライブラリーを構築した。これらのライブラリーは、3つのループのうちの2つでは、ランダム配列をクローン218C04に相当する固定配列で置き換えた点を除き、上述のようにKODポリメラーゼを使って、オーバーラップ伸長により、DNAレベルで構築された。固定配列は、BCループではオリゴヌクレオチド218C04BCによって与えられ、DEループではオリゴヌクレオチド218C04DEによって与えられ、FGループではオリゴヌクレオチド218C04FGによって与えられた。これらを、ライブラリー構築中に、対応するランダムオリゴヌクレオチドFnBC、FnDE、またはFnFG10の代わりに使用した。

10

【 0 3 0 2 】

クローン218C04のBCループがランダムアミノ酸で置き換えられているライブラリーは、オリゴヌクレオチド：T7TMV + FnAB + FnBC + FnCD + 218C04DE + FnEF + 218C04FG + FnG + FLAGを上述のように組み立てることによって作製した。クローン218C04のDEループがランダムアミノ酸で置き換えられているライブラリーは、オリゴヌクレオチド：T7TMV + FnAB + 218C04BC + FnCD + FnDE + FnEF + 218C04FG + FnG + FLAGを組み立てることによって作製した。クローン218C04のFGループがランダムアミノ酸で置き換えられているライブラリーは、オリゴヌクレオチド：T7TMV + FnAB + 218C04BC + FnCD + 218C04DE + FnEF + FnFG10 + FnG + FLAGから組み立てた。

【 0 3 0 3 】

クローン218C04からの3ランダム化ライブラリーの構築：

クローン218C04から誘導した3つの単一ランダム化ライブラリーを上述のPROfusion選択に付した。各ライブラリー中の残存クローンは親クローンに由来する2つのループと、各フィブロネクチンベーススキャフォールドタンパク質の結合と適合するランダム配列に由来する1つのループとを含有した。各ライブラリーから1つずつ、3つのランダムループを、その周囲のスキャフォールド領域を結合するオリゴヌクレオチドプライマーを使って増幅した。BCループは、可変BCループを含有するライブラリーから、オリゴヌクレオチドプライマーFnBおよびFnCDを使って増幅した。DEループは、可変DEループを含有するライブラリーから、オリゴヌクレオチドプライマーFnDおよびFnEFを使って増幅した。FGループは、可変FGループを含有するライブラリーから、オリゴヌクレオチドプライマーFnFおよびFnGを使って増幅した。切り出した3つのループをアガロースゲル電気泳動によって精製し、均等な比率で混合し、まずプライマーFnABおよびFnGを使用し、次にT7TMVおよびFLAGを使って、KODポリメラーゼによって増幅した。

20

30

【 0 3 0 4 】

クローン338A06からの単一ランダム化FGライブラリーの構築：

クローン338A06のFGループが6個のランダムアミノ酸で置き換えられているライブラリーを構築した。オリゴヌクレオチドT7TMV + FnAB + 338A06BC + FnCD + 338A06DE + FnEF + FnFG6 + FnG + FLAGのオーバーラップ伸長には、上述のようにKODポリメラーゼを使用した。クローン338A06に対応するループ配列はオリゴヌクレオチド338A06BCおよび338A06DEを使って導入し、ランダム6アミノ酸FGループはオリゴヌクレオチドFnFG6によって導入された。

40

【 0 3 0 5 】

RNA-タンパク質融合物の製造：

本質的に記述されているとおりにして (Xuら, 2002, Kurzら, *Nuc. Acid Res.* 28:83, 2000)、二本鎖DNAライブラリーをRNA-タンパク質融合物 (PROfusion) に変換した。簡単に述べると、インビトロ転写キット (MEGAscript (商標)、Ambion、テキサス州オースティン) を使ってDNAライブラリーを転写し、その結果生じたRNAをNAP-5カラム (GE Healthcare) でのサイズ排除クロマトグラフィーによって脱塩した。150mM NaCl、10mM Tris-HCl (pH8) および1.5倍過剰のピューロマイシン含有リンカー (5'-Pso u agc gga ugc XXX XXX CC Pu-3' (Pu =ピューロマイシン、Pso = C6-ソラレン、u、a、g、c = 2'-OMe-RNA、X = 9原子PEGスペーサー) を含有する溶液200 μ l中で、20分間、314nmで照射することによ

50

り、2nmolのRNAを架橋した。

【0306】

次に、そのmRNA-ピューロマイシン分子を、3mlのウサギ網状赤血球溶解物（Ambion、テキサス州オースティン）中、 ^{35}S 標識メチオニンの存在下で翻訳した。その結果生じたmRNA-タンパク質融合物をオリゴdTセルロース（GE Healthcare）を使って精製し、superscript II逆転写酵素（Invitrogen）と2nmolのプライマーFLAGとを使用し、製造者の指示に従って逆転写した。

【0307】

cDNA/mRNA-タンパク質融合物をM2 Flagアガロース（Sigma、ミズーリ州セントルイス）で精製し、取り込まれた ^{35}S メチオニンを測定することによって定量した。これにより、約 10^{12} 個の完全長フィブロネクチンベーススキャフォールドタンパク質の精製ライブラリーを得て、それを、次のPROfusion実験で使用するために、プライマーT7TMVおよびFLAGを用いるPCRによって増幅した。

【0308】

IGF-IRへの結合に関するアフィニティー選択：

上述のように調製したmRNA-タンパク質融合物のライブラリーを、ストレプトアビジン被覆磁気ビーズ（M280ストレプトアビジン、Invitrogen）と共にインキュベートして、ストレプトアビジンに結合するフィブロネクチンベーススキャフォールドタンパク質を除去した。ビーズを磁石で分離し、未結合画分を収集し、0.05% Tween 20および1mg/ml BSA（Ambion）を含むPBS中の100nMビオチン化IGF-IRに加えた。30分後に、結合したフィブロネクチンベーススキャフォールドタンパク質を、ストレプトアビジン被覆磁気ビーズ上に捕捉し、Kingfisher磁気ビーズプロセッサ（Thermo Electron、マサチューセッツ州ウォルサム）を使って6回洗浄した。cDNAを100mM KOH中に溶出させ、100mM Tris-HClで中和し、PCRで増幅することにより、IGF-IRを結合する分子が濃縮された第2世代のライブラリーを作成した。増幅、mRNA-タンパク質融合物の合成、およびアフィニティー選択という一連のプロセスを合計5回行い、結合された分子の数を定量PCRでモニターした。第4ラウンド後および第5ラウンド後に得られるフィブロネクチンベーススキャフォールドタンパク質集団を増幅し、組換え（InFusion（商標）、Clontech、カリフォルニア州マウンテンビュー）により、T7 RNAポリメラーゼ用のプロモーターとインフレームHis₆タグとを含有する大腸菌発現ベクター中にライゲートした。ライゲートした混合物を、IPTGで誘導した場合にT7 RNAポリメラーゼを発現しそれゆえに誘導性タンパク質発現をもたらす大腸菌BL21(DE3)pLysS株（Invitrogen）中に、形質転換した。

【0309】

3つのランダムループを含有するクローン218C04の最適化：

3ループランダム化218C04ライブラリーを、上述のように、増幅、mRNA-タンパク質融合物の合成、およびアフィニティー選択のサイクルにかけた。第1ラウンドでは、ストレプトアビジン結合ペプチドの選択を避けるために、IGF-IRをエポキシ活性化ビーズに固定化した。その後は、最も高アフィニティーの結合剤が選択されるように、ビオチン化IGF-IRを、濃度を下げながら使用した。第2ラウンド以降は、IR結合に関する陰性選択として作用するように、非ビオチン化インスリン受容体（IR）も1 μM の濃度で含めた。4ラウンド後に、結果として生じたフィブロネクチンベーススキャフォールドタンパク質集団を、上述のように、解析のために大腸菌中にクローニングした。

【0310】

6アミノ酸ランダムFGループを含有するクローン338A06の最適化：

DNAライブラリーを上述のようにmRNA-タンパク質融合物に変換することにより、約1000コピーの各FGループ配列を得た。増幅、mRNA-タンパク質融合物形成およびアフィニティー選択というPROfusionサイクルを上述のように行った。第1ラウンドでは、ビオチン化IGF-IR濃度を100nMとしたが、これを、第2ラウンドでは0.8nMに低下させ、第3ラウンドでは0.4nMに低下させた。ターゲット濃度は、IGF-IRに結合したmRNA-タンパク質融合物のパーセンテージが、定量PCRによる測定で、いずれの場合も0.1%未満になるように選択した。こ

10

20

30

40

50

の方法によれば、改善されたアフィニティーを持つフィブロネクチンベーススキャフォールドタンパク質は、集団全体と比較して、有利になるだろう。

【0311】

IGF-IRに関する競合ELISA：

MaxiSorp（商標）プレート（Nunc International、ニューヨーク州ロチェスター）を、PBS中の30nM IGF-IRで、4 で終夜コーティングした後、OptEIAバッファー（BD biosciences、カリフォルニア州サンディエゴ）中、室温で3時間ブロッキングした。OptEIAバッファー中の精製フィブロネクチンベーススキャフォールドタンパク質を、50pM～1μMの範囲の濃度で、各ウェルに室温で1時間結合させた。未結合のフィブロネクチンベーススキャフォールドタンパク質を除去するためにPBSTで洗浄した後、10nMビオチン化IGF-I（Upstate、カリフォルニア州テメクラ）を室温で1時間加えて、占有されていないIGF-Rに結合させた。PBSTで洗浄することによって過剰のリガンドを除去し、結合したリガンドを、ストレプトアビジン-HRP（Pierce、イリノイ州ロックフォード）で、TMB検出試薬（BD biosciences）を製造者の指示に従って使用することにより、検出した。

10

【0312】

IGF-IRに関する直接結合ELISA：

Maxisorp（商標）プレート（Nunc International、ニューヨーク州ロチェスター）を、PBS中の10nM IGF-IRで、4 で終夜コーティングし、PBS-カゼインバッファー（Pierce）中、室温で3時間ブロッキングした。カゼインバッファー中の精製フィブロネクチンベーススキャフォールドタンパク質を、5nMの濃度で、各ウェルに室温で1時間結合させた。プレートをPBSTで洗浄し、His-HRPプローブ（Pierce）の1：4000希釈液100μlを各ウェルに加えて、室温で15分間インキュベートした。ウェルをPBSTで5回洗浄し、結合したHRPを、TMB検出試薬（BD biosciences）を製造者の指示に従って使用することにより、検出した。この一点アッセイで結合を示したクローンを、30pmolから330nMまでの範囲にわたるフィブロネクチンベーススキャフォールドタンパク質濃度の勾配を使って、さらに解析した。

20

【0313】

ハイスループットタンパク質生産（HTPP）：

pDEST-14ベクター中にクローニングされ、大腸菌BL21(DE3)pLysS細胞中に形質転換された、選ばれた結合剤を、24ウェルフォーマットで、50μg/mLカルベニシリンおよび34μg/mLクロラムフェニコールを含有するLB培地5mLに接種し、37 で終夜成長させた。その終夜培地から200μlを吸引し、それを適当なウェルに分配することによって、新鮮な5mL LB培地（50μg/mLカルベニシリンおよび34μg/mLクロラムフェニコール）培養物を誘導発現用に調製した。その培養物をA₆₀₀0.6～1.0まで37 で成長させた。1mMイソプロピル-チオガラクトシド（IPTG）による誘導後、培養物を30 でさらに4時間成長させ、4 、3220gで30分間の遠心分離によって収集した。細胞ペレットを-80 で凍結した。

30

【0314】

450μlの溶解バッファー（50mM NaH₂PO₄、0.5M NaCl、1×Complete（商標）プロテアーゼ阻害剤カクテル-EDTAフリー（Roche）、1mM PMSF、10mM CHAPS、40mMイミダゾール、1mg/ml リゾチーム、30μg/ml DNase、2μg/ml アプロトニン（aprotinin）、pH8.0）に再懸濁することによって細胞ペレット（24ウェルフォーマット）を溶解し、室温で1時間振とうした。溶解物を清澄化し、96ウェル650μlキャッチプレートを装着した96ウェルWhatman GF/D Unifilterに移すことによって、再び96ウェルフォーマットに収容し、200gで5分間遠心分離した。清澄化した溶解物を、平衡化バッファー（50mM NaH₂PO₄、0.5M NaCl、10mM CHAPS、40mMイミダゾール、pH8.0）で平衡化しておいた96ウェルNi-キレーティングプレートに移し、5分間インキュベートした。未結合の物質を減圧によって除去した。樹脂を0.3ml/ウェルの洗浄バッファー#1（50mM NaH₂PO₄、0.5M NaCl、5mM CHAPS、40mMイミダゾール、pH8.0）で、各洗浄液を減圧によって除去しながら2回洗浄した。次に、樹脂を0.3ml/ウェルのPBSで、各洗浄ステップを減圧によって除去しながら、3回洗浄した。溶出に先だって、各ウェルを50μlの溶出バッファー（PBS + 20mM EDTA）で洗浄し、5分間イン

40

50

キュベートし、この洗浄液を減圧によって捨てた。さらに100 μ lの溶出バッファーを各ウェルに適用することにより、タンパク質を溶出させた。室温で30分のインキュベーション後に、プレートを200gで5分間遠心分離し、溶出したタンパク質を、Ni-プレートの底に付着させた5 μ lの0.5M $MgCl_2$ を含有する96ウェルキャッチプレートに集めた。ブラッドフォードアッセイを使用し、BSAをタンパク質標準として、溶出したタンパク質を定量した。

【0315】

可溶性フィブロネクチンベーススキャフォールドタンパク質結合剤の中規模発現および精製：

発現のために、His₆タグが後ろに続いている選ばれたクローンを、pDEST-14ベクター中にクローニングし、大腸菌BL21(DE3)pLysS細胞で発現させた。20mlの接種培養物（単一プレート培養コロニーから生成）を使って、50 μ g/mLカルペニシリンおよび34 μ g/mLクロラムフェニコールを含有する1リットルのLB培地に接種した。その培養物をA₆₀₀0.6~1.0まで37℃で成長させた。1mMイソプロピル- β -チオガラクトシド（IPTG）と共にインキュベートした後、培養物を30℃でさらに4時間成長させ、4℃、10,000gで30分間遠心分離することによって収集した。細胞ペレットを-80℃で凍結した。氷上でUltra-turraxホモジナイザー（IKA works）を使って、細胞ペレットを25mLの溶解バッファー（20mM NaH_2PO_4 、0.5M NaCl、1×Complete（商標）プロテアーゼ阻害剤カクテル-EDTAフリー（Roche）、1mM PMSF、pH7.4）に再懸濁した。細胞溶解は、モデルM-110Sマイクロフルイダイザー（Microfluidics）を使用し高圧ホモジナイゼーション（18,000psi）によって達成した。可溶性画分を4℃、23,300gで30分間の遠心分離によって分離した。上清を0.45 μ mフィルターで清澄化した。清澄化した溶解物を、20mM NaH_2PO_4 、0.5M NaCl、pH7.4で前もって平衡化したHisTrapカラム（GE）に乗せた。次にこのカラムを25カラム体積の20mM NaH_2PO_4 、0.5M NaCl、pH7.4で洗浄し、次に20カラム体積の20mM NaH_2PO_4 、0.5M NaCl、25mMイミダゾール、pH7.4で洗浄し、さらに35カラム体積の20mM NaH_2PO_4 、0.5M NaCl、40mMイミダゾール、pH7.4で洗浄した。タンパク質を15カラム体積の20mM NaH_2PO_4 、0.5M NaCl、500mMイミダゾール、pH7.4で溶出させ、画分をA₂₈₀での吸光度に基づいてプールし、1×PBSまたは50mM NaOAc；150mM NaCl；pH4.5に対して透析した。0.22 μ mでの濾過によって全ての沈殿物を除去した。

【0316】

抗IGF1RフィブロネクチンスキャフォールドのPEG化

C型のフィブロネクチンスキャフォールドに対して2倍過剰のPEG-40-kDa（NOF Corporation）を使って、マレイミドケミストリーにより、フィブロネクチンスキャフォールド-PEG40分子を製造した。反応を室温で2.5時間進行させた。遊離のPEG-40を、陽イオン交換クロマトグラフィー（SP-HiTrap；GE）によって、フィブロネクチンスキャフォールド-PEG-40から分離した。反応混合物を20mM NaH_2PO_4 、pH6.7で1：10希釈し、平衡化バッファー（20mM NaH_2PO_4 、10mM NaCl、pH6.7）で前もって平衡化しておいたSP-HiTrapカラムに適用し、平衡化バッファーで洗浄し、20mM NaH_2PO_4 、0.5M NaCl、pH6.7を使って溶出させた。溶出した画分をSDS-PAGE分析に基づいてプールした。SPプール溶出液をG25クロマトグラフィー（GE）でPBSにバッファー交換した。

【0317】

PEG-20-kDa（NOF Corporation）に対して2倍過剰のフィブロネクチンスキャフォールド-Cを使って、マレイミドケミストリーにより、PEG20-フィブロネクチンスキャフォールド-PEG20を製造した。反応を室温で1時間行った。非PEG化フィブロネクチンスキャフォールドを、20mM NaH_2PO_4 、10mM NaCl、pH6.7バッファーにおけるSECクロマトグラフィー（Superose 6；GE）により、PEG20-フィブロネクチンスキャフォールド-PEG20から分離した。PEG20-フィブロネクチンスキャフォールド-PEG20を含有する画分をプールし、モノPEG化フィブロネクチンスキャフォールドを除去するためにさらに精製した。これは陽イオン交換クロマトグラフィー（SP；GE）によって達成された。SP-HiTrapカラムをバッファーA（20mM NaH_2PO_4 、10mM NaCl、pH6.7）で前もって平衡化し、SEC溶出を適用し、次にそのカラムをバッファーAで洗浄し、次に、5カラム体積にわたって0~10%バッファーB（20mM NaH

$_2\text{PO}_4$ 、1.0M NaCl、pH6.7)の勾配に付し、さらに5カラム体積にわたってそれを維持した。50%バッファ-Bで溶出させることにより、PEG20-フィブロネクチンスカフォールド-PEG20を、SP-カラムから溶出させた。A280によって画分をプールし、G25クロマトグラフィー(GE)でPBSにバッファ交換した。

【0318】

IGF-IR-PEG-VEGFR2結合剤の製造

PEG20を微量天秤で計量し、100mg/ml(5mM)になるように、20mMリン酸ナトリウム/10mM NaCl、pH6.7に溶解した。PEG溶液を、クローン385A08(配列番号203)溶液に、5:1(PEG:タンパク質)のモル比で加えた。反応を室温で少なくとも1時間は撹拌しながらインキュベートした。385A08-PEG20を、カップリングしていないPEG、ビス-385A08、非PEG化385A08単量体および385A08ジスルフィド連結二量体から分離するために、PEG-タンパク質反応を、20mMリン酸ナトリウム/10mM NaCl、pH6.7(バッファ-A)で平衡化したHiTrap SP陽イオン交換カラムにのせた。溶出バッファ(バッファ-B)は20mMリン酸ナトリウム/1.0M NaCl、pH6.7である。10%B(100mM NaCl)による定組成溶離で385A08-PEG20-種が単離され、それを使ってVEGFR2特異的結合剤(配列番号128)と反応させる。VEGFR2特異的結合剤を385A08-PEG20-に付加することにより、385A08-PEG20-VEGFR2特異的結合剤ヘテロ二量体が形成される。

【0319】

カップリングしていない単量体型および二量体型のVEGFR2特異的結合剤を、385A08-PEG20-VEGFR2特異的結合剤ヘテロ二量体から分離するために、サイズ排除クロマトグラフィーを行った。Superdex 200カラムを20mMリン酸ナトリウム/10mM NaCl、pH6.7で平衡化した。385A08-PEG20 + VEGFR2特異的結合剤の反応混合物を1.0ml/分の流速で適用した。385A08-PEG20-VEGFR2特異的結合剤に対応する画分を、完成品としてプールした。

【0320】

可溶性フィブロネクチンベーススカフォールドタンパク質のBIAcore解析:

BIAcore 2000または3000バイオセンサー(Pharmacia Biosensor)を使って、ターゲットに対するフィブロネクチンベーススカフォールドタンパク質結合タンパク質の結合速度論を測定した。IGF-IR-Fc融合物を利用して捕捉アッセイを開発した。類似する試薬がForbesらによって記述されていた(Forbesら, 2002, European J. Biochemistry, 269, 961-968)。ヒトIGF-IRの細胞外ドメイン(aa1-932)を、ヒトIgG1のヒンジ領域および定常領域を含有する哺乳動物細胞発現ベクター中にクローニングした。そのプラスミドの一過性トランスフェクションによって融合タンパク質IGF-IR-Fcが産生され、次にそれをプロテインAクロマトグラフィーで精製し、Biasensor CM5チップ上にアミンカップリングによって固定化したプロテインAに捕捉した。速度論的解析には、プロテインAへのIGF-IR-Fcの捕捉と、それに続く溶液状態のフィブロネクチンベーススカフォールドタンパク質の注入、およびグリシン(pH2.0)によるプロテインA表面の再生が含まれる。各濃度でセンサーグラムを取得し、プログラムBiaevaluation、BIA Evaluation 2.0(BIAcore)を使って評価することにより、速度定数 k_a (k_{on})および k_d (k_{off})を決定した。解離定数 K_D は速度定数の比 k_{off}/k_{on} から算出した。典型的には、精製フィブロネクチンベーススカフォールドタンパク質の濃度系列(2 μM ~0 μM)を、プロテインA捕捉ヒトIGF-IR-Fc融合タンパク質への結合について評価した。

【0321】

ヒトインスリン受容体への結合を決定する実験のために、組換えヒトインスリン受容体(IR)および組換えヒトVEGF-R2-Fcを、CM5 Biasensorチップに、Biocore(スウェーデン・ウプサラ)が推奨する標準的手法に従って、アミン基結合を介して直接カップリングした。簡単に述べると、フローセル2および3で、アセテート(acetate)4.5に希釈した60 $\mu\text{g/mL}$ のIRを8300RUのレベルにカップリング/固定化し、アセテート(acetate)5.0に希釈した11.9 $\mu\text{g/mL}$ のVEGF-R2-Fcを9700RUのレベルに固定化した。ブランク参照表面をFC1上に用意した。IRまたはVEGF-R2-Fcへの特異的結合は、ブランク参照フローセル1への結合の観測値を差し引くことによって算出した。フィブロネクチンベースのスカフォールド

タンパク質を10 μ MになるようにHBS-EP (10mM Hepes、150mM NaCl、3mM EDTA、0.05% Surfactant P20) に希釈し、25 のフローセルに20 μ L/分で3分間注入し、解離を10分にわたって観察した。

【0322】

示差走査熱量測定：

熱安定性を決定するために示差走査熱量測定 (DSC) 分析を行った。適当なクローンの1 mg/ml溶液をN-DSC II熱量計 (Calorimetry Sciences Corp) で、3気圧の圧力下、毎分1度の速度で、5 から95 まで昇温することにより、スキャンした。Origin Software (Origin Lab Corp) を使用し、ベストフィット法で、データを、適当なバッファの対照実験と比較解析した。

10

【0323】

サイズ排除クロマトグラフィー：

A214nmおよびA280nmでのUV検出および蛍光検出 (励起波長 = 280nm、蛍光波長 = 350nm) を利用して、Agilent 1100 HPLCシステムで、TSKgel Super SW2000カラム (TOSOH biosciences, LLC) 4.6mm \times 30cmを使って、サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) を行った。100mM硫酸ナトリウム、100mMリン酸ナトリウム、150mM塩化ナトリウム、pH6.8のバッファを100 μ L/分の流速で使用した。試料 (各0.1 ~ 1 μ g) を、約100 μ g/mLの濃度で、別途注入した。分子量の較正にはゲル濾過標準 (Bio-Rad Laboratories、カリフォルニア州ハーキュリーズ) を使用した。

【0324】

IGF-1RフィブロネクチンスクフォールドクローンのSEC MALLS解析：

Waters 2487UV検出器を装着したWaters Breeze HPLCシステムで、Superdex 200カラム (GE Healthcare) と、0.6ml/分の流速で適用される100mM硫酸ナトリウム、100mMリン酸ナトリウム、150mM塩化ナトリウム、pH6.8の移動相とを使って、サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) を行った。試料を移動相で約1.0mg/mlに希釈し、50 μ Lを注入した。UV検出器の後ろにインライン接続したminiDAWN光散乱検出器 (Wyatt Technology Corporation) とOptilab DSP示差屈折計 (Wyatt Technology Corporation) を使って、多角度レーザー光散乱 (MALLS) 解析を行った。光散乱データの解析は、Astra Vバージョン5.1.9.1ソフトウェア (Wyatt Technologies Corporation) を使って行った。280nmでの吸光度によってフィブロネクチンベーススクフォールドタンパク質の濃度を算出するために、アミノ酸配列に基づく理論モル吸光係数を使用した。屈折率による濃度決定には、0.185mL/gという推定比屈折率増分 (dn/dc) を使用した。

20

30

【0325】

RP-HPLCクロマトグラフィー：

A214nmおよびA280nmでのUV検出ならびに蛍光検出 (励起波長 = 280nm、蛍光波長 = 350nm) を利用し、Agilent 1100 HPLCシステムで60 に加熱したC4ポリマーカラム#259VHP5415 (Vydac) 4.6mm \times 15cmを使って、逆相HPLC (RP-HPLC) を行った。溶媒Aは0.01% TFAを含有するMilliQ水からなり、溶媒Bは0.01% TFAを含有する100% アセトリル (HPLCグレード) とした。溶出スキームは、10%Bで10分間という平衡化条件の後、30分で50%Bへの直線的勾配からなった。これらの条件下で、フィブロネクチンベースのスクフォールドタンパク質は、約25 ~ 30分の総実行時間で溶出した。

40

【0326】

MALDI TOF質量分析：

Voyager DE PRO質量分析計 (Applied Biosystems) を使用して、マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型 (MALDI-TOF) 質量分析計で、フィブロネクチンベースのスクフォールドタンパク質を分析した (図14)。試料を0.1% TFAで約1.0mg/mlに希釈した。約12 μ Lの試料をC4 ZipTip (Millipore Corporation) にのせ、塩類および夾雑物を除去するために0.1% トリフルオロ酢酸 (TFA) で洗浄した。2 μ Lのシナピン酸マトリックス (70% アセトリル、0.1% TFA中に10mg/ml) を使って試料をZipTipからターゲットプレート上に直接溶出させた。装置の標準化は、シナピン酸中に最終濃度が5 μ Mになるよう

50

に調製してプレート上にスポットした質量既知の2つのタンパク質、すなわちシトクロムC (12361.96Da) およびアポミオグロビン (16952.27Da) を使って行った。以下の装置設定でスペクトルを取得した：加速電圧25000V、グリッド電圧91%、ガイドワイヤ0.1%、遅延引き出し時間400ナノ秒、レーザー強度3824。Data Explorer v. 4.5 (Applied Biosystems) において、ベースライン補正およびガウス平滑化アルゴリズムをフィルタ幅値 (filter width value) 9で適用することにより、生スペクトルを処理した。

【0327】

細胞有糸分裂誘発アッセイ：

ヒト膀胱癌細胞株BxPC-3 (ATCC、バージニア州マナッサス) を、10%ウシ胎仔血清 (Hyclone、ユタ州ローガン) を含有するRPMI1640 (Invitrogen、カリフォルニア州カールズバッド) 中、2500細胞/ウェルの濃度で、96ウェルプレートにプレーティングした。翌日、0.1%BSA (Sigma、ミズーリ州セントルイス) を含有するRPMI1640からなる飢餓培地で、細胞を洗浄した。洗浄した細胞を、さまざまな濃度の各IGF-1Rアンタゴニストを含有する飢餓培地中で、4時間プレインキュベートした。その4時間のプレインキュベーション後に、細胞を25ng/mLのIGF-1に曝露し、37℃、5%CO₂で、24時間インキュベートした。そのインキュベーションの最後の4時間は、細胞を[³H]-チミジン (0.25 μCi/ウェル; Perkin Elmer、マサチューセッツ州ウェルズリー) に曝露した。このインキュベーション期間後に、細胞をPBS中で洗浄し、0.1%SDS + 0.5N NaOHからなるバッファ-100 μL中で溶解し、TopCount NXTシンチレーション計数器 (Perkin Elmer、マサチューセッツ州ウェルズリー) でカウントした。SigmaPlot (Systat Software、カリフォルニア州ポイントリッチモンド) を使ってデータを解析した。

【0328】

細胞ベースの受容体遮断アッセイ：

ヒト乳癌MCF-7 (ATCC、バージニア州マナッサス) を、10%ウシ胎仔血清 (Hyclone、ユタ州ローガン) を含有するRPMI1640 (Invitrogen、カリフォルニア州カールズバッド) 中、50,000細胞/ウェルの濃度で、24ウェルプレートにプレーティングした。翌日、細胞を、0.1%BSA (Sigma、ミズーリ州セントルイス) を含有するRPMI1640からなる結合バッファで洗浄し、次に、IGF-1R競合剤を含有する結合バッファ-200 μL中、氷上で30分間プレインキュベートした。このプレインキュベーション期間後に、毎分約60000カウントに相当する40pM [¹²⁵I]-IGF-1 (Perkin Elmer、マサチューセッツ州ウェルズリー) を各ウェルに加え、穏やかに撹拌しながら氷上でさらに3時間インキュベートした。次に、0.1%BSAを含有する冷PBSでウェルを洗浄した。0.1%SDS + 0.5N NaOHからなるバッファ-500 μLで細胞を溶解した。Wallac 1470ガンマカウンター (Perkin Elmer、マサチューセッツ州ウェルズリー) を使って溶解物の放射能を測定し、SigmaPlot (Systat Software、カリフォルニア州ポイントリッチモンド) を使ってデータを解析した。

【0329】

NCI-H929細胞増殖アッセイ：

ヒト形質細胞腫細胞株NCI-H929 (ATCC、バージニア州マナッサス) を、さまざまな濃度のIGF-1Rアンタゴニストを含有する10%ウシ胎仔血清 (Hyclone、ユタ州ローガン) 含有DMEM (Invitrogen、カリフォルニア州カールズバッド) 中、10000または25000細胞/ウェルの濃度で、96ウェルプレートにプレーティングした。細胞を37℃、5%CO₂で72時間増殖させた。この増殖期間後に、細胞を20 μLのCell Titer 96 Aqueous Proliferation Reagent (Promega、ウィスコンシン州マディソン) に曝露し、さらに4時間インキュベートした。490nmにおける吸光度をSpectramax Plus 384 (Molecular Devices、カリフォルニア州サニーベール) で測定し、得られたデータをSigmaPlot (Systat Software、カリフォルニア州ポイントリッチモンド) で解析した。

【0330】

32D：IGF-1R細胞増殖アッセイ

細胞 (10⁴個) を、10%ウシ胎仔血清 (Hyclone、ユタ州ローガン) を含有するRPMI (Invitrogen、カリフォルニア州カールズバッド) 中、100ng/mLヒトIGF-1 (R&D Systems、ミ

ネソタ州ミネアポリス)およびIGF-IRアンタゴニストの存在下で、96ウェルプレートに播種した。細胞を37℃、5%CO₂で72時間増殖させた。この増殖期間後に、細胞をCell Titer 96 Aqueous Proliferation Reagent (Promega、ウィスコンシン州マディソン)に曝露し、さらに4時間インキュベートした。490nmにおける吸光度をSpectramax Plus 384 (Molecular Devices、カリフォルニア州サニーベール)で測定し、得られたデータをSigmaPlot (Systat Software、カリフォルニア州ポイントリッチモンド)で解析した。

【0331】

Ba/F3: VEGFR2細胞増殖アッセイ

マウスIL-3依存性プロB細胞株Ba/F3を、キメラVEGR2(細胞外ドメイン)/EpoR(細胞内ドメイン)を過剰発現してVEGF依存性細胞株になるように改変した。BaF3:VEGFR2細胞(2.5 × 10⁴個)を、10%ウシ胎仔血清(Hyclone、ユタ州ローガン)を含有するRPMI (Invitrogen、カリフォルニア州カールズバッド)中、VEGFR2アンタゴニストの存在下で、96ウェルプレートに播種した。細胞を37℃、5%CO₂で72時間増殖させた。この増殖期間後に、細胞をCell Titer 96 Aqueous Proliferation Reagent (Promega、ウィスコンシン州マディソン)に曝露し、さらに4時間インキュベートした。490nmにおける吸光度をSpectramax Plus 384 (Molecular Devices、カリフォルニア州サニーベール)で測定し、得られたデータをSigmaPlot (Systat Software、カリフォルニア州ポイントリッチモンド)で解析した。

【0332】

IGF-IR-HSAコンジュゲートの製造

クローン385A08(配列番号203)に対してモル過剰のBM(PEO)₂を加えた。385A08-BM(PEO)₂を陽イオン交換クロマトグラフィーで単離した。遊離スルフヒドリル基を持つ組換えヒト血清アルブミンを385A08-BM(PEO)₂に加えてHSA-385A08を形成させた。このコンジュゲートを陰イオンおよび陽イオン交換クロマトグラフィーでさらに精製した。

【0333】

IGF-IR-Fc融合物の製造

385A08(配列番号226)(下線部)のカルボキシル末端をFcフラグメント(Fcヒンジ-CH₂-CH₃)(太字)のアミノ末端領域に接合した。立体障害のリスクを最小限に抑えるために、これら2つの間にスペーサー(小文字)を置いた。この分子を、伝統的な哺乳動物細胞アプローチよりも迅速なピキア細胞中で発現させることができるように、発現ベクターを設計した。この発現ベクターは、ピキア細胞での発現時に分泌が可能になるように、因子シグナルペプチド(斜体)も含む。このシグナル配列は分泌されると除去され、最終精製IGF-IR-Fc分子の一部にはならない。得られた発現コンストラクトの配列を以下に示す。

【化2】

MRFPSIFTAVLFAASSALAAPVNTTTEDETAQIPAEAVIGYSDLEGDFDVAVLFFSNSTNNG
LLFINTTIAASIAAKEEGVSLEKREAEAGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSARLKVARYY
RITYGETGGNSPVQEFVTPKNVYTATISGLKPGVDYTITVYAVTRFRDYQPISINYRTE
IDKPSQdpgsEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGSSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV
VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL
NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCL
VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV
FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK(配列番号247)

【0334】

発現コンストラクトを線状化して、3つのピキア宿主細胞X-33、GS115およびKM17Hに形質転換した。形質転換体をゼオシンプレート上で選択し、2ml培養物でIGF-IR-Fc発現についてスクリーニングした。選択したクローンを振とうフラスコ中、さまざまなpHで成長させ、プロテインA樹脂で精製した。発現はpH6.5~7.0で観察された。それらのクローンの

10

20

30

40

50

一つの1L振とうフラスコを使って、pH6.7でIGF-IR-DPGG-Igを発現させ、プロテインAおよびサイズ排除によって精製した。

【0335】

図28に精製IGF-IR-Ig融合タンパク質のSDS PAGE分析を図示する。図からわかるように、観察された質量は、ジスルフィド連結した完全なIGF-IR-Igに予想されるとおり、非還元試料のサイズの約半分である。

【0336】

IGF-IR-HSAコンジュゲートのインビボ腫瘍研究

腫瘍をヌードマウスで増殖させた。腫瘍継代は、ヒトRH41異種移植片の場合、4週間ごとに行った。効力試験については、ヒト腫瘍異種移植片をヌードマウスに移植した。全ての腫瘍継代は皮下(sc)とした。

【0337】

抗腫瘍活性を、a) 治癒、そしてマウス腫瘍モデルの場合は、対照群と比較した処置(T)群の相対的生存期間中央値(MST)(すなわち%T/C値)に反映される寿命の増加;およびb) TマウスとCマウスが所定の「ターゲット」サイズ(記載の全sc腫瘍モデルについて1g)の腫瘍を成長させるのに要する相対的中央時間を算出することによって決定され、T-C値(単位:日)として表現される原発腫瘍成長阻害に関して評価した。治癒したマウスの定義は、処置後10腫瘍体積倍加時間(TVDT)以上において評価した場合に、その腫瘍が検出不可能であるか、<35mgであるものとした。腫瘍阻害/減少に関する活性基準は、1総(gross) log cell kill (LCK)に相当する原発腫瘍成長の統計的に有意な遅延とした。LCKの算出には以下の式を使用した: $LCK = T - C / (3.32 \times TVDT)$ 。式中、TVDT = 対照腫瘍がターゲットサイズに到達するのに要する中央時間(日数) - 対照腫瘍がターゲットサイズの半分に到達するのに要する中央時間(日数)。最大治療効果を与える化合物の用量を至適用量(OD)と名付けた。薬物毒性に起因すると考えられる死が2例以上あった処置群(典型的にはマウス8匹)は、過剰に毒性の高い処置を受けたとみなし、抗腫瘍活性の評価にはそれらのデータを使用しなかった。最大耐量(MTD)は、過剰な毒性(すなわち2例以上の死)が起こったレベルのすぐ下の用量レベルと定義される。腫瘍がターゲットサイズに到達する前に死んだ処置マウスは、薬物毒性によって死んだとみなした。データの統計的評価はゲーハンの一般化ウィルコキソン検定(Gehan, Biometrika 52:203-223, 1965)を使って行った。

【0338】

385A08-Fcのウェスタンブロット分析

Rh41ヒト横紋筋肉腫細胞を0.3%BSAの存在下で血清飢餓させた。次に、溶解に先だって、IGF-I、IGF-II、またはインスリンリガンド(50ng/ml)による5分間の刺激後に、それらを385A08-Fcに37℃で1時間曝露した。細胞をTTGバッファー(20mM Tris-HCl、pH7.6、1%トリトンX-100、5%グリセロール、0.15M NaCl、1mM EDTA、コンプリートタブレット(Complete Tablet)、およびホスファターゼ阻害剤カクテル)中で溶解した。BSAを標準として使用して、総細胞溶解物のタンパク質濃度を決定した。各溶解物から等量のタンパク質をゲルの各ウェルに乗せた。タンパク質をSDS PAGEで分離し、ニトロセルロースメンブレンに転写し、Odyssey Blocking Buffer(Li-Cor biosciences)中、4℃で終夜ブロッキングした。メンブレンをIGF-1R、AktおよびMAPKに対するホスホ特異的抗体を使って、室温で2時間ブロットし、次に0.1%Tween-20を含むTBSで3回洗浄した。洗浄後にメンブレンを蛍光標識二次抗体と共にインキュベートした。タンパク質の可視化は、蛍光シグナルの同時かつ独立した検出を可能にするOdyssey Infrared Imaging System(Li-Cor biosciences)を利用して行った。Li-Cor biosciencesイメージングシステムを使ったデンシトメトリースキヤニングに基づいて、負荷量対照(loading control)として使用されるアクチンまたはGAPDHに対する標準化後に、無処置試料中のホスホシグナルと処置試料中のホスホシグナルの比を比較することによって、阻害を算出した。

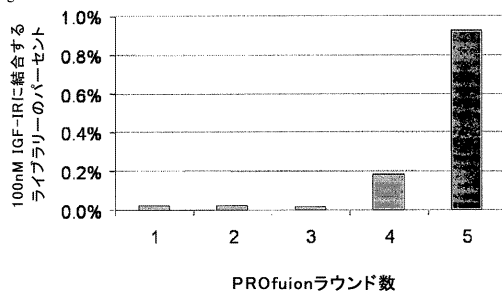
【0339】

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

試薬への72時間の曝露後にDNAへの[3H]-チミジンの取り込みによって増殖を評価した。Rh41細胞を3500細胞/ウェルの密度で、またH929を8000細胞/ウェルの密度で、それぞれ96ウェルマイクロタイタープレートにプレーティングし、24時間後に、それらはある範囲の薬物濃度に曝露した。37℃で72時間インキュベートした後、細胞に4 μ Ci/ml [3H]チミジン (Amersham Pharmacia Biotech、英国) を3時間パルスし、トリプシン処理し、UniFilter-96, GF/Bプレート (PerkinElmer、マサチューセッツ州ボストン) 上に収集し、TopCount NXT (Packard、コネティカット州) でシンチレーションを測定した。結果を、無処置対照細胞の増殖との比較で細胞増殖を50%阻害するのに必要な薬物濃度であるIC50として表す。データは3つ一組のウェルの平均を表し、標準偏差が示されている。

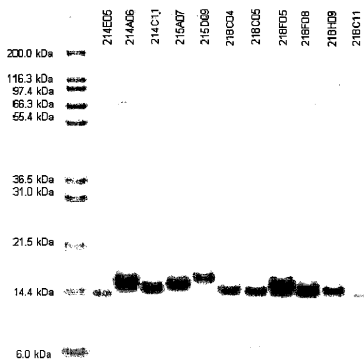
【図1】

Figure 1.



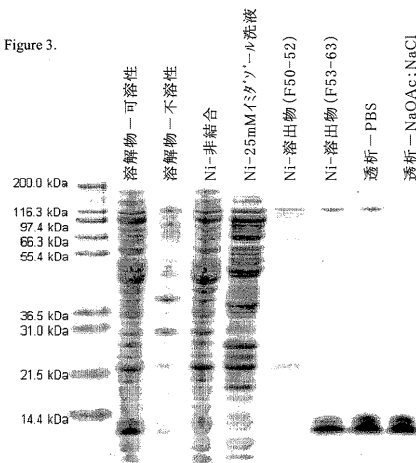
【図2】

Figure 2.



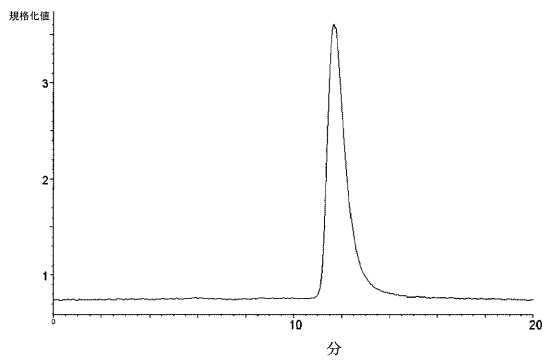
【図3】

Figure 3.



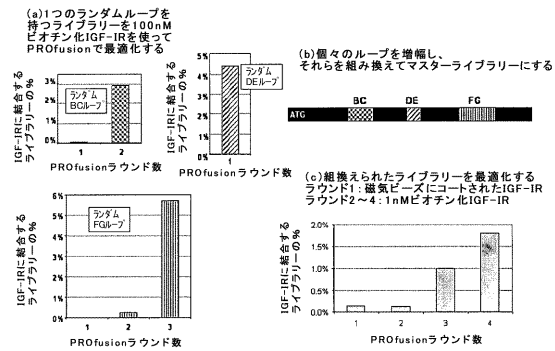
【図 4】

Figure 4.



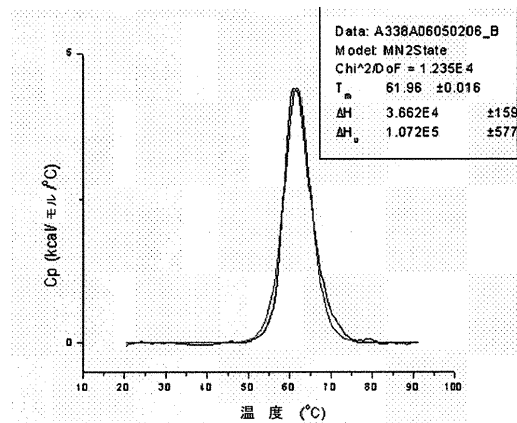
【図 5】

Figure 5.



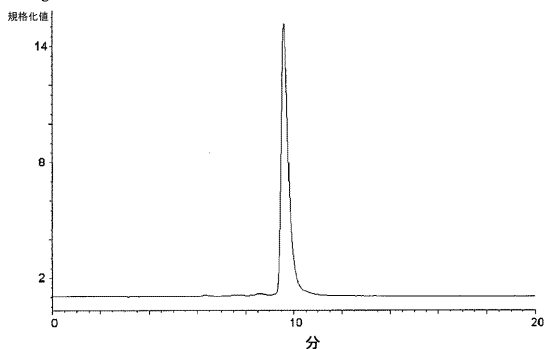
【図 8】

Figure 8.



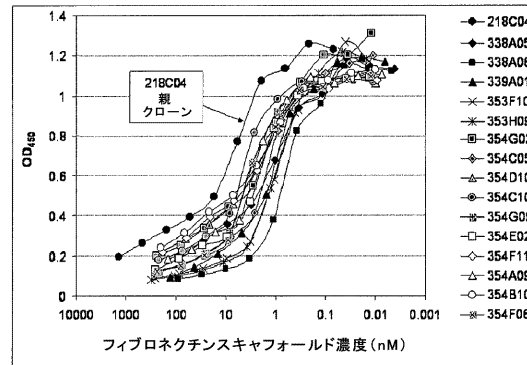
【図 9】

Figure 9.



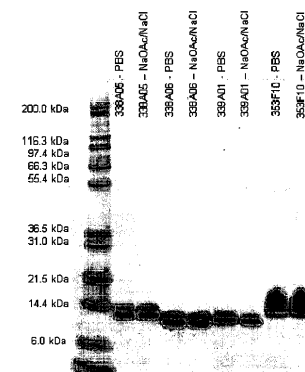
【図 6】

Figure 6.



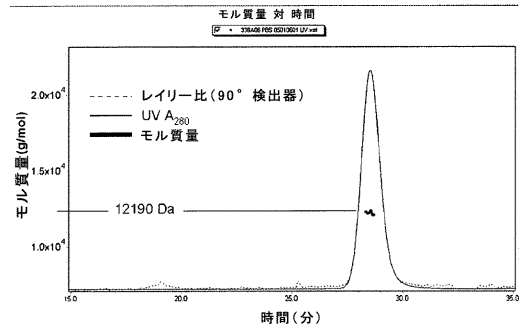
【図 7】

Figure 7.



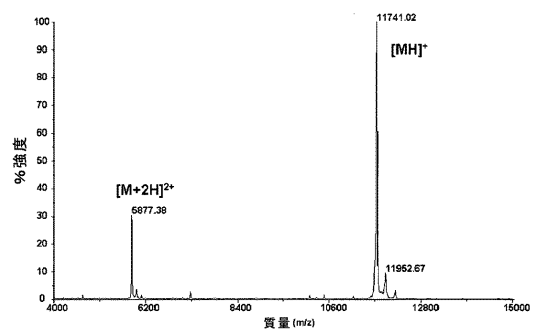
【図 10】

Figure 10.



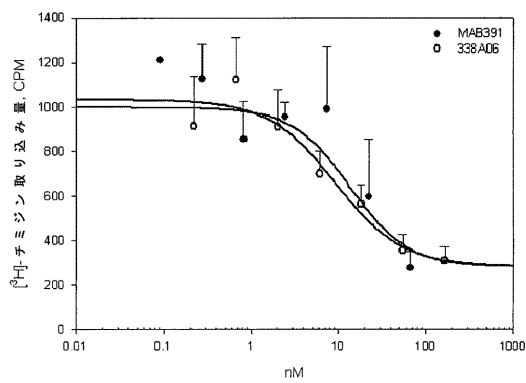
【図 11】

Figure 11.



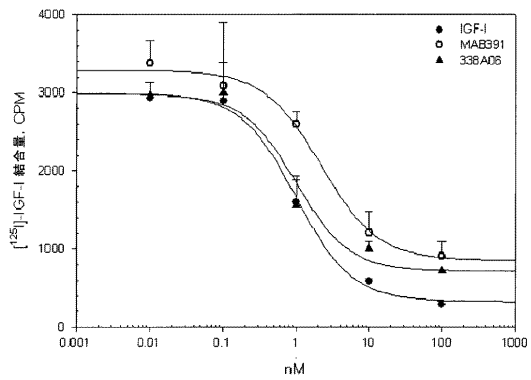
【図 12】

Figure 12.



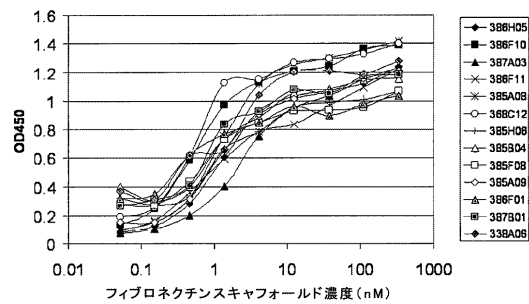
【図 13】

Figure 13.



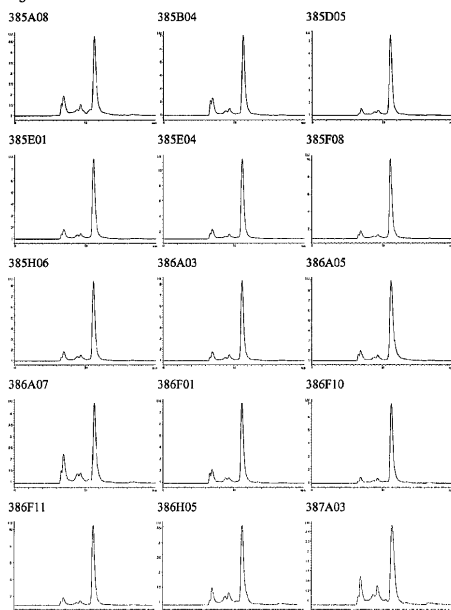
【図 14】

Figure 14.



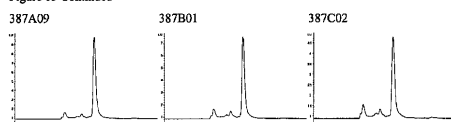
【図 15 - 1】

Figure 15.



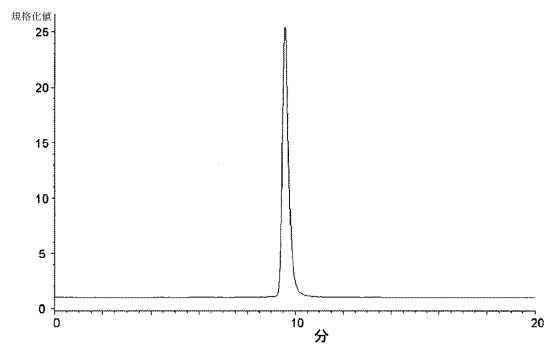
【図 15 - 2】

Figure 15 Continued



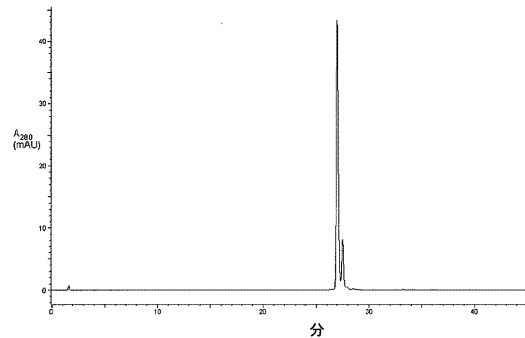
【図 16】

Figure 16.



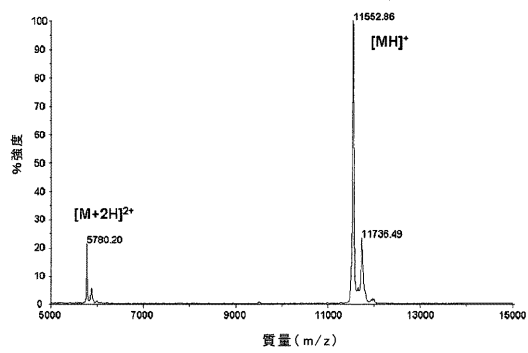
【図 17】

Figure 17.



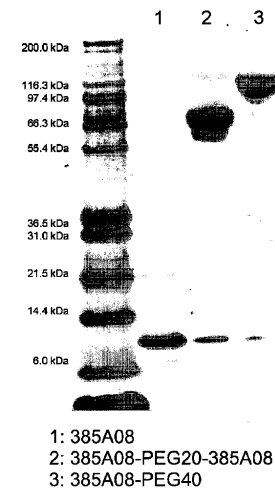
【図 18】

Figure 18.



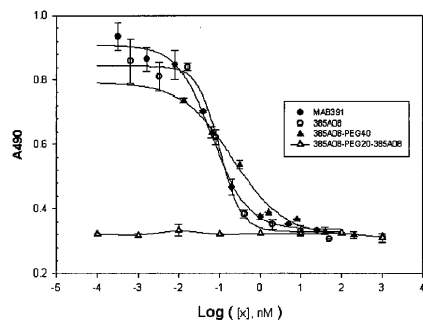
【図 19】

Figure 19.



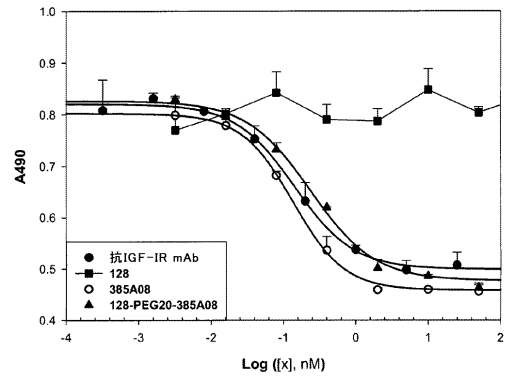
【図 20】

Figure 20.



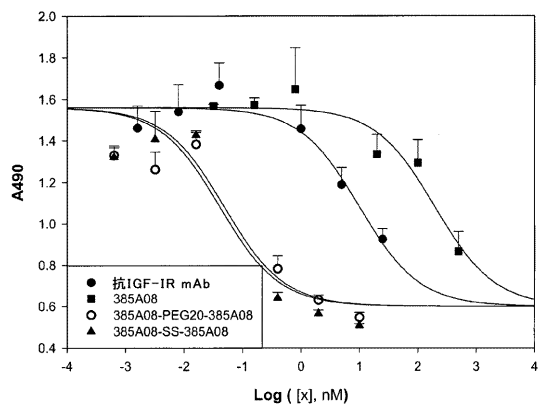
【図 22】

Figure 22.



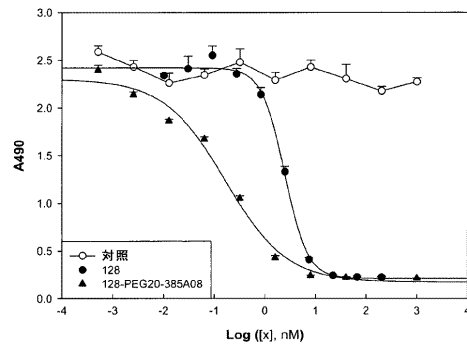
【図 21】

Figure 21.



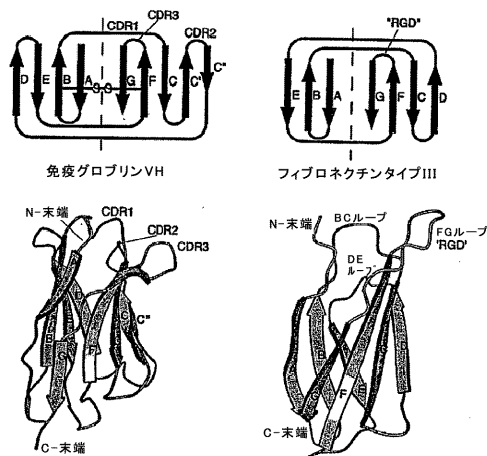
【図 23】

Figure 23.



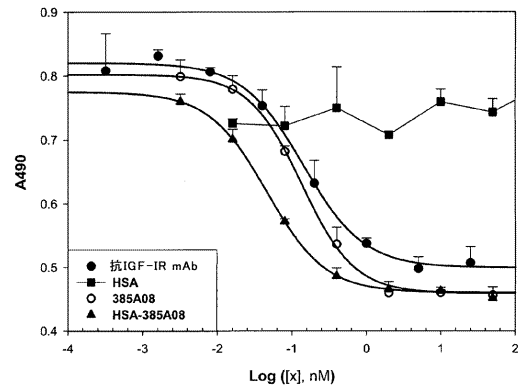
【図 24】

Figure 24.



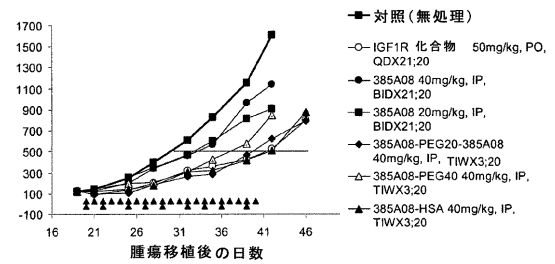
【図 25】

Figure 25.



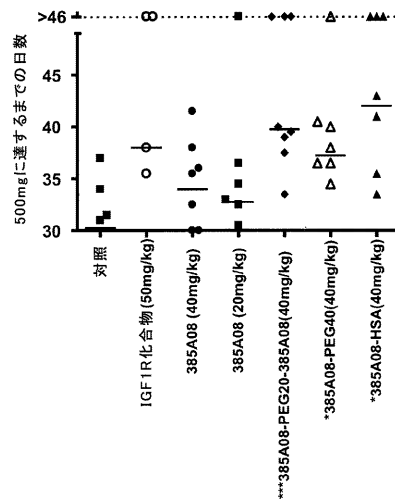
【図 26】

Figure 26.



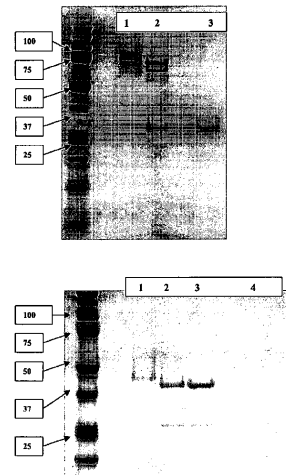
【図 27】

Figure 27



【図 28】

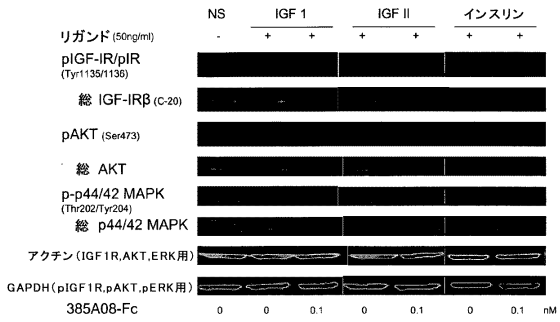
Figure 28.



【図 29】

Figure 29.

Rh41細胞における385A08-Fc±IGF 1/IGF II/インスリンの生化学



Rh41細胞を0.3%BSA培地で終夜血清処理した後、385A08-Fcで1時間処理した。IGF-1/IGF II/インスリン(50ng/ml)による5分間の刺激。

【図 30 - 1】

Figure 30

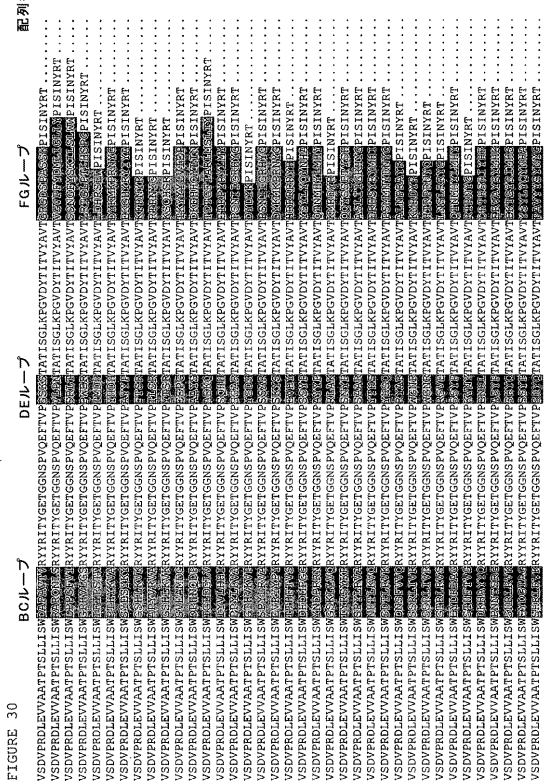
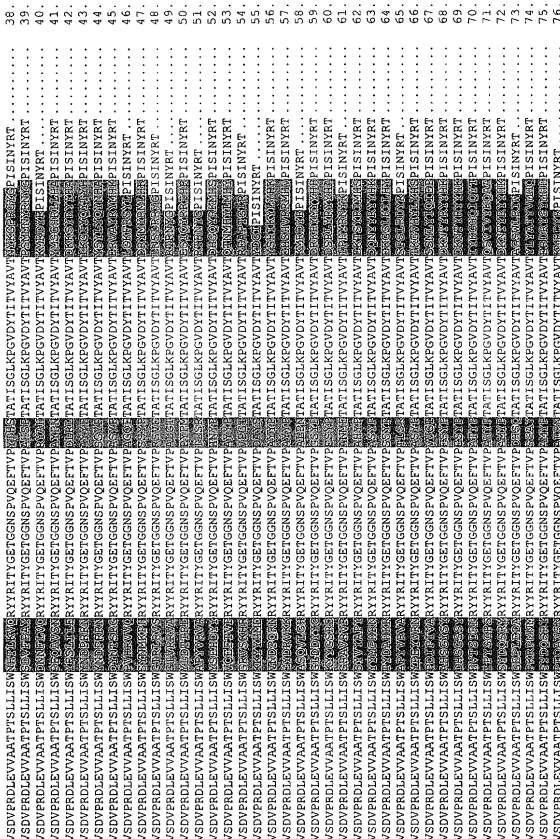
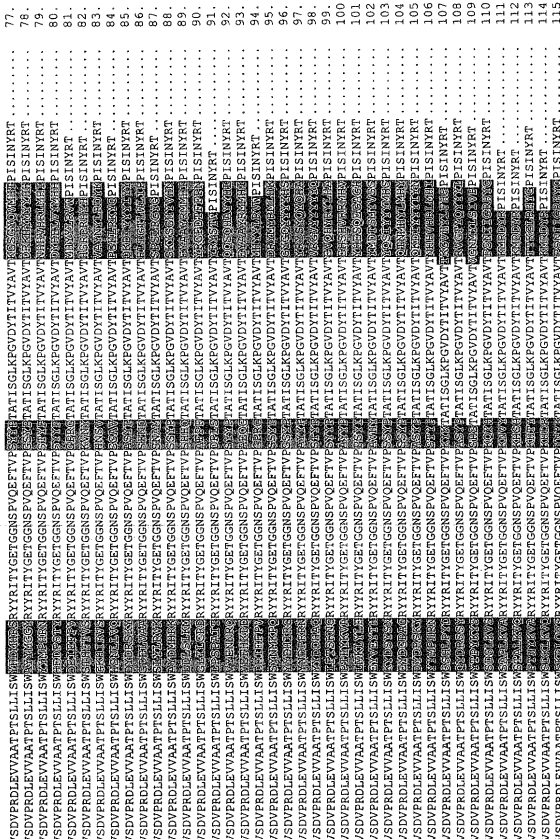


FIGURE 30

【図 30 - 2】



【図 30 - 3】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I
A 6 1 K 47/36 (2006.01)		A 6 1 K 47/36
A 6 1 K 47/34 (2006.01)		A 6 1 K 47/34
A 6 1 P 43/00 (2006.01)		A 6 1 P 43/00 1 1 1
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 2 4 5 2 マサチューセッツ州ウォルサム、リッジ・レイン 2 4 9 番、ナンバー 2 0 7

(72)発明者 デイビッド・ファブリジオ

アメリカ合衆国 0 1 9 0 7 マサチューセッツ州スワンズスコット、バンクス・テラス 1 9 番

(72)発明者 マーティン・シー・ライト

アメリカ合衆国 0 2 1 1 5 マサチューセッツ州ボストン、カンバーランド・ストリート 1 2 番、ナンバー 4

(72)発明者 パトリック・ゲージ

アメリカ合衆国 1 9 0 0 4 ペンシルベニア州バラ・シンウィッド、ユニット 6 0 7、プレジデンシャル・ブルーバード 1 9 番

(72)発明者 ジョン・メンドレイン

アメリカ合衆国 0 2 0 6 6 マサチューセッツ州シチュエート、エジプト・アベニュー 6 6 番

審査官 渡邊 潤也

(56)参考文献 国際公開第 2 0 0 6 / 0 9 1 2 0 9 (W O , A 1)

国際公開第 2 0 0 5 / 0 5 6 7 6 4 (W O , A 1)

特表 2 0 0 4 - 5 2 6 4 1 9 (J P , A)

特表 2 0 0 1 - 5 0 0 5 3 1 (J P , A)

Chem.Biol.,2002 Aug,9(8),p.933-42

J.Mol.Biol.,1998 Dec 11,284(4),p.1141-51

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

UniProt/GeneSeq

PubMed

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

CAplus/BIOSIS(STN)

Thomson Innovation