

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6410724号  
(P6410724)

(45) 発行日 平成30年10月24日 (2018.10.24)

(24) 登録日 平成30年10月5日 (2018.10.5)

(51) Int. Cl.	F I
C O 7 K 19/00 (2006.01)	C O 7 K 19/00 Z N A
C O 7 K 14/00 (2006.01)	C O 7 K 14/00
A 6 1 K 38/16 (2006.01)	A 6 1 K 38/16
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00
C 1 2 N 15/62 (2006.01)	C 1 2 N 15/62 Z

請求項の数 24 (全 58 頁)

(21) 出願番号	特願2015-544498 (P2015-544498)	(73) 特許権者	515146556
(86) (22) 出願日	平成25年12月2日 (2013.12.2)		モレキュラー パートナーズ アクチュエン
(65) 公表番号	特表2015-537044 (P2015-537044A)		ゲゼルシャフト
(43) 公表日	平成27年12月24日 (2015.12.24)		スイス国 ツェーハー 8 9 5 2 チューリ
(86) 国際出願番号	PCT/EP2013/075290		ッヒ シュリーレン ヴァーギシュトラ
(87) 国際公開番号	W02014/083208		セ 1 4
(87) 国際公開日	平成26年6月5日 (2014.6.5)	(74) 代理人	110000109
審査請求日	平成28年11月9日 (2016.11.9)		特許業務法人特許事務所サイクス
(31) 優先権主張番号	12195156.0	(72) 発明者	フィードラー ウルリケ
(32) 優先日	平成24年11月30日 (2012.11.30)		ドイツ連邦共和国 7 9 5 3 9 レーラッ
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		ハ ロイトルムヴェーク 8
		(72) 発明者	ドラド イグナシオ
			スイス国 ツェーハー 4 3 1 0 ラインフ
			エルデン クェレンシュトラーセ 3 9 ア
			ー

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 少なくとも2つの抗HER2反復ドメインを含む結合タンパク質

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

少なくとも第一および第二のアンキリン反復ドメインを含む組換えタンパク質であって、ここで、

前記第一および第二のアンキリン反復ドメインが、それぞれ、HER2の細胞外領域に特異的に結合し、

前記第一のアンキリン反復ドメインが、HER2のドメインIIに結合し、そして、前記第二のアンキリン反復ドメインが、HER2のドメインIVに結合し、

前記第一および第二のアンキリン反復ドメインが、同じポリペプチドに含まれており、かつ、

前記第一のアンキリン反復ドメインが、前記第二のアンキリン反復ドメインのN末端側に配置されている (said first ankyrin repeat domain is located N-terminally to said second ankyrin repeat domain)、組換えタンパク質。

【請求項 2】

(i) 前記第一のアンキリン反復ドメインが、ペルツズマブと、HER2との結合に競合しない、および/または

(ii) 前記第二のアンキリン反復ドメインが、トラスツズマブと、HER2との結合に競合しない、請求項1に記載の組換えタンパク質。

【請求項 3】

前記第一のアンキリン反復ドメインが、PBS中で、HER2の細胞外領域に、 $10^{-7}$

M未満のKdで結合し、そして、

前記第二のアンキリン反復ドメインが、PBS中で、HER2の細胞外領域に、 $10^{-7}$  M未満のKdで結合する、

請求項1～2のいずれか1項に記載の組換えタンパク質。

【請求項4】

(i) 組換えタンパク質が、BT474細胞の刺激された増殖を、100 nM未満のIC50値で阻害する、および/または

(ii) 組換えタンパク質が、BT474細胞におけるアポトーシスを100 nM未満のEC50値で誘導する、

請求項1～3のいずれか1項に記載の組換えタンパク質。

10

【請求項5】

請求項1乃至4のいずれか1項に記載の組換えタンパク質であって、ここで、

(i) 前記第一のアンキリン反復ドメインが、配列番号62～68、72および114～121からなる群より選択されるアンキリン反復ドメインと、HER2との結合に競合する、および/または、

(ii) 前記第二のアンキリン反復ドメインが、配列番号74～82からなる群より選択されるアンキリン反復ドメインと、HER2との結合に競合する、

組換えタンパク質。

【請求項6】

少なくとも第一および第二のアンキリン反復ドメインを含む組換えタンパク質であって、ここで、

20

前記第一及び第二のアンキリン反復ドメインが、それぞれ、HER2の細胞外領域に特異的に結合し、

前記第一および第二のアンキリン反復ドメインが同じポリペプチドに含まれており、

前記第一のアンキリン反復ドメインが、前記第二のアンキリン反復ドメインのN末端側に配置されており(said first ankyrin repeat domain is located N-terminally to said second ankyrin repeat domain)、そして

(i) 前記第一のアンキリン反復ドメインが、配列番号62～68、72および114～121からなる群より選択される1つのアンキリン反復ドメインと、少なくとも90%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、および/または、

30

(ii) 前記第二のアンキリン反復ドメインが、配列番号74～82からなる群より選択される1つのアンキリン反復ドメインと、少なくとも90%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、

組換えタンパク質。

【請求項7】

(i) 前記第一のアンキリン反復ドメインが、配列番号62～68、72および114～121からなる群より選択される、1つのアンキリン反復ドメインと、少なくとも92%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、および/または、

(ii) 前記第二のアンキリン反復ドメインが、配列番号74～82からなる群より選択される1つのアンキリン反復ドメインと、少なくとも92%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、

40

請求項6の組換えタンパク質。

【請求項8】

(i) 前記第一のアンキリン反復ドメインが、配列番号62～68、72および114～121からなる群より選択される1つのアンキリン反復ドメインと、少なくとも97%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、および/または、

(ii) 前記第二のアンキリン反復ドメインが、配列番号74～82からなる群より選択される、1つのアンキリン反復ドメインと、少なくとも97%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、

請求項6の組換えタンパク質。

50

## 【請求項 9】

( i ) 前記第一のアンキリン反復ドメインが、配列番号 62 ~ 68、72 および 114 ~ 121 からなる群より選択される、1つのアンキリン反復ドメインと、少なくとも 95 % のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、および/または、

( i i ) 前記第二のアンキリン反復ドメインが、配列番号 74 ~ 82 からなる群より選択される、1つのアンキリン反復ドメインと、少なくとも 95 % のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、

請求項 6 の 組換えタンパク質。

## 【請求項 10】

( i ) 前記第一のアンキリン反復ドメインが、配列番号 62 ~ 68、72 および 114 ~ 121 からなる群より選択されるアミノ酸配列を含み、および/または、

( i i ) 前記第二のアンキリン反復ドメインが、配列番号 74 ~ 82 からなる群より選択される、アミノ酸配列を含み、

そして、さらに、

前記アンキリン反復ドメインの 1 番目の G および/または 2 番目の S が欠失していてもよく、および

前記アンキリン反復ドメインの C - 末端から 2 番目の L および/または C - 末端の N が A と交換されていてよい、

請求項 6 の 組換えタンパク質。

## 【請求項 11】

請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の 組換えタンパク質 であって、ここで、

( i ) 前記第一のアンキリン反復ドメインが、配列番号 15 ~ 18、21 ~ 23、37、38、125、126、129、130、133、134 および配列番号 15 ~ 18、21 ~ 23、37、38、125、126、129、130、133、134 に含まれている 3 個までのアミノ酸残基が、他の任意のアミノ酸残基に置き換えられている配列からなる群より選択されるアミノ酸配列を有するアンキリン反復モジュールを含み、および/または

( i i ) 前記第二のアンキリン反復ドメインが、配列番号 46、47、51、52、55 および 56 ならびに配列番号 46、47、51、52、55 および 56 に含まれている 3 個までのアミノ酸残基が他の任意のアミノ酸残基に置き換えられている配列からなる群より選択されるアミノ酸配列を有するアンキリン反復モジュールを含む、

組換えタンパク質。

## 【請求項 12】

請求項 1 乃至 5 のいずれか 1 項に記載された 組換えタンパク質 であって、ここで、

前記第一のアンキリン反復ドメインが、

( i ) K D F Q G I T P L H I A A T S G H L E I V E V L L K A G A D V N A ( 配列番号 16 )、

( i i ) 配列番号 16 に含まれている 3 個までのアミノ酸残基が他の任意のアミノ酸残基で置き換えられている配列、および

( i i i ) 配列番号 16 ( ここで、

- ・ 3 番目の F が A と交換されていてよく、
- ・ 4 番目の Q が E と交換されていてよく、
- ・ 5 番目の G が S と交換されていてよく、
- ・ 6 番目の I が V と交換されていてよく、
- ・ 11 番目の I が L と交換されていてよく、
- ・ 14 番目の T が Q と交換されていてよく、および/または
- ・ 15 番目の S が、N および W からなる群より選択されるアミノ酸と交換されていてよい )

からなる群より選択されるアミノ酸配列を有するアンキリン反復モジュールを含む、組換えタンパク質。

## 【請求項 13】

請求項 1 乃至 5 のいずれか 1 項に記載された組換えタンパク質であって、ここで、  
前記第一のアンキリン反復ドメインが、

( i ) K D I T G E T P L H H A A D S G H L E I V E V L L K A G A D V N A ( 配列番号 18 )、

( i i ) 配列番号 18 に含まれている 3 個までのアミノ酸残基が他の任意のアミノ酸残基に置き換えられている配列、および

( i i i ) 配列番号 18 ( ここで、

- ・ 3 番目の I が V と交換されていてもよく、
- ・ 6 番目の E が D と交換されていてもよく、
- ・ 11 番目の H が L と交換されていてもよく、
- ・ 14 番目の D が Q と交換されていてもよく、
- ・ 15 番目の S が H と交換されていてもよく、および / または
- ・ 19 番目の E が V と交換されていてもよい )

からなる群より選択されるアミノ酸配列を有するアンキリン反復モジュールを含む、組換えタンパク質。

## 【請求項 14】

少なくとも、第一及び第二のアンキリン反復ドメインを含む、組換えタンパク質であって、ここで、

第一及び第二のアンキリン反復ドメインのそれぞれが、H E R 2 の細胞外領域に特異的に結合し、かつ、

前記組換えタンパク質が、ポリペプチドを含み、このポリペプチドは、配列番号 83 ~ 98、102、103、122、123 および 136 ~ 141 からなる群より選択されるポリペプチドと、少なくとも 90 % のアミノ酸配列同一性を有する、組換えタンパク質。

## 【請求項 15】

請求項 14 に記載された、組換えタンパク質であって、ここで、

前記組換えタンパク質は、ポリペプチドを含み、このポリペプチドは、配列番号 83 ~ 98、102、103、122、123 および 136 ~ 141 からなる群より選択されるポリペプチドと少なくとも 92 % のアミノ酸配列同一性を有する、組換えタンパク質。

## 【請求項 16】

請求項 14 に記載された、組換えタンパク質であって、ここで、

前記組換えタンパク質は、ポリペプチドを含み、このポリペプチドは、配列番号 83 ~ 98、102、103、122、123 および 136 ~ 141 からなる群より選択されるポリペプチドと少なくとも 95 % のアミノ酸配列同一性を有する、組換えタンパク質。

## 【請求項 17】

請求項 14 に記載された、組換えタンパク質であって、

前記組換えタンパク質は、配列番号 83 ~ 98、102、103、122、123 および 136 ~ 141 からなる群より選択されるポリペプチドを含む、組換えタンパク質。

## 【請求項 18】

H E R 2 の細胞外領域に対して、結合特異性を有する、配列番号 87 のアミノ酸配列を含む、組換えタンパク質。

## 【請求項 19】

請求項 1 ~ 10 のいずれか 1 項に記載の組換えタンパク質であって、

前記第一のアンキリン反復ドメインが、配列番号 115 のアミノ酸配列を含み、および / または、

前記第二のアンキリン反復ドメインが、配列番号 81 のアミノ酸配列を含む、組換えタンパク質。

## 【請求項 20】

請求項 11 に記載の組換えタンパク質であって、

前記第一のアンキリン反復ドメインの前記アンキリン反復モジュールが、配列番号 12

10

20

30

40

50

5 または配列番号 1 2 6 のアミノ酸配列を含む、組換えタンパク質。

【請求項 2 1】

請求項 1 ~ 2 0 のいずれか 1 項に記載の組換えタンパク質および薬理的に許容される担体を含んでいる医薬組成物。

【請求項 2 2】

腫瘍疾患または癌を治療するための、請求項 2 1 に記載の医薬組成物。

【請求項 2 3】

請求項 2 2 に記載の医薬組成物であって、前記腫瘍疾患または癌が、

- ・ H E R 2 をコードしている遺伝子の増幅、
  - ・ H E R 2 をコードしている遺伝子の過剰発現、
  - ・ H E R 2 をコードしている遺伝子の変異型の発現、および
  - ・ トラストズマブ抵抗性腫瘍における H e r 3 をコードしている遺伝子の過剰発現、
- からなる群より選択される少なくとも 1 つの特徴によって特徴付けられる、医薬組成物。

【請求項 2 4】

請求項 2 2 ~ 2 3 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物であって、前記腫瘍疾患または癌が、

- ・ 乳癌、
- ・ 卵巣癌、
- ・ 消化器癌、
- ・ 胃癌、
- ・ 子宮癌、および
- ・ 結腸直腸癌、

からなる群より選択される、医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は、ヒト上皮成長因子受容体 2 ( H E R 2 ) に対する結合特異性を有する反復ドメインを少なくとも 2 つ含んでいる結合タンパク質、ならびにそのような H E R 2 結合タンパク質をコードしている核酸、そのようなタンパク質を含んでいる医薬組成物および疾患の治療におけるそのようなタンパク質の使用に関する。

【背景技術】

【0 0 0 2】

E r b B 2 としても知られているヒト上皮成長因子受容体 2 ( H E R 2 ; ヒト H E R 2 のユニプロット K B ( U n i P r o t K B ) / スイスプロット ( S w i s s - P r o t ) 番号は P 0 4 6 2 6 である ) は、ヒトでは E R B B 2 遺伝子によってコードされているタンパク質である。この遺伝子の増幅または過剰発現が特定の癌の病理発生および進行において重要な役割を担っていることが分かっており、また近年になってこの遺伝子は、重要なバイオマーカーおよび疾患の治療における標的として発展してきた。H E R 2 はより広義の E r b B 受容体ファミリーに属す膜貫通型受容体チロシンキナーゼ ( R T K ) である ( ブリル E . M . およびヤードン Y . , C u r r . O p i n . C e l l B i o l . , 1 9 ( 2 ) , 1 2 4 - 3 4 , 2 0 0 7 ) 。 E r b B 受容体ファミリーは脊椎動物で保存されており、このファミリーの発見のきっかけとなった E r b B 1 ( 上皮成長因子受容体 ( E G F R ) または H E R 1 と呼ばれている ; ヒトタンパク質のユニプロット K B / スイスプロット番号は P 0 0 5 3 3 ) や、より最近になって同定された受容体の H E R 3 ( E r b B 3 と呼ばれている ; ヒトタンパク質のユニプロット K B / スイスプロット番号は P 2 1 8 6 0 ) 、さらには H E R 4 ( E r b B 4 と呼ばれている ; ヒトタンパク質のユニプロット K B / スイスプロット番号は Q 1 5 3 0 3 ) も含んでいる。配列の大部分とドメインの相同性は全ての E r b B 受容体で共通しており、また、これらのタンパク質は、ホモ二量体 ( 例えば E r b B 1 - E r b B 1 , H E R 2 - H E R 2 および H E R 4 - H E

R 4) および全ての組み合わせにおけるヘテロ二量体の形で機能する。受容体のホモ - およびヘテロ二量体化はリガンドの結合または受容体の過剰発現に際して起こり、これが次に、細胞内受容体キナーゼドメインを自己リン酸化によって活性化する。これがその後、下流への細胞内シグナル伝達および生体反応の引き金となる。その他の E r b B 受容体とは異なり、H E R 2 に関してはリガンドが全く知られていないが、二量体を形成することができる。二量体化は H E R 2 が過剰発現すると顕著になり、それ以前に起こるはずのリガンド結合を伴わずに活性化される。重要なことには、H E R 3 も活性のある細胞内キナーゼドメインをもたないが、他の E r b B 受容体ファミリーのメンバーとヘテロ二量体化することで非常に強力な下流へのシグナル伝達を誘導する。このような H E R 3 のヘテロ二量体化および活性化は、H E R 3 にリガンドが結合した時に、またはパートナー受容体、例えば H E R 2 が強く過剰発現している場合に生じる。

10

#### 【 0 0 0 3 】

H E R 2 ならびにその他の全 E r b B 受容体ファミリーのメンバーは、4 つの細胞外ドメインからなる。これらは順に、ドメイン I、II、III および IV と命名されており、ドメイン IV が細胞外細胞膜に最も近く、ドメイン I が最も遠位にある。リガンドを欠乏させた条件では、E r b B 受容体のドメイン I と III が分子内で相互作用し、ドメイン II を閉じ込める。隣接する 2 つの E r b B 受容体の相互作用にはドメイン II が必要なたため、このドメイン I と III の分子内相互作用によって、受容体のホモ / ヘテロ二量体化およびシグナル伝達が阻害される ( バーゲス A . W . ら、M o l . C e l l 1 2 ( 3 )、5 4 1 - 5 5 2、2 0 0 3 )。リガンド結合はドメイン I と III の相互作用を妨害し、その結果、受容体の立体構造が屈曲構造 ( t e t h e r e d ) から伸張構造 ( e x t e n d e d ) へと変化してドメイン II が露出したままに維持される。ドメイン II が露出していることで、この受容体は他の伸張構造をとっている E r b B 受容体のいずれとも二量体化でき、シグナル伝達を開始する。興味深いことに、H E R 2 は E r b B 受容体ファミリーのメンバーの中で唯一、常に伸張した立体構造で発見されるメンバーであり、そのため、ドメイン II は常に露出していて、ホモおよびヘテロ二量体化するために接近することができる。

20

#### 【 0 0 0 4 】

E r b B 受容体の二量体化と自己リン酸化は、正常な生理機能ならびに疾患に関連する、下流にある多くの重要なシグナル伝達分子の活性化を引き起こす。そのような活性化されるシグナル伝達分子の性質はある程度、活性な E r b B 受容体二量体の組成に依存する。例えば、H E R 1 - H E R 1 および H E R 2 - H E R 2 ホモ二量体は、下流の細胞外シグナル調節キナーゼ ( E R K ) のシグナル伝達および増殖を優先的に活性化するが、H E R 2 - H E R 3 ヘテロ二量体も P I 3 K - シグナル伝達経路 ( 下流の A K T キナーゼの活性化を含む ) と、それによる細胞の生存を活性化する。実際に腫瘍細胞では、H E R 2 - H E R 3 シグナル伝達による A K T の活性化は生存を促進し、腫瘍細胞を、H E R 2 標的薬、例えばモノクローナル抗体のトラスツズマブに対して抵抗性のあるものにする ( バーンズ K ら、C a n c e r C e l l 1 2、3 9 5 ~ 4 0 2、2 0 0 7 )。興味深いことに、これらの細胞における H E R 2 - H E R 3 介在性 P I 3 K - A K T シグナル伝達の阻害は律速であり、その結果、細胞死を引き起こす。細胞の増殖および生存以外でも、H E R 2 シグナル伝達は、血管形成や移入などの他の過程の原因となっている。

30

40

#### 【 0 0 0 5 】

H E R 2 は、乳癌全体のおよそ 2 0 % で過剰発現している。その臨床的関連から、H E R 2 は、これを標的とする生物製剤、すなわちトラスツズマブ ( ハーセプチン ( 登録商標 ) ; ジェネンテック ) が開発された最初の R T K となった。この抗体は H E R 2 のドメイン IV に結合し、複数の機序を介して H E R 2 のシグナル伝達を阻害する。その機序はまだ完全には明らかになっていないが、これらには、H E R 2 の発現レベルおよびシグナル伝達の低下、ならびに腫瘍原性が弱まった表現型の誘導をもたらす、腫瘍細胞での受容体の内部移行の誘導が含まれる。トラスツズマブによって生存期間が延び、生活の質が高まることで、乳癌を患った何万人もの女性患者の人生が変わった。しかしながら、トラスツ

50

ズマブの効果は主に抗増殖性の効果であるため、疾患がより進行した段階においては、腫瘍はトラスツズマブの治療から免れる場合がある。より効果的な治療を開発しようという試みの中で、ドメイン I I または H E R 2 を認識する新しい抗体、すなわちペルツズマブ（オムニタグ（登録商標）、パージェタ（登録商標）；ジェネンテック）が生成された。トラスツズマブとは対照的に、この抗体は H E R 2 の膜における発現レベルを低下させるために開発されたのではなく、この受容体のドメイン I I に結合し、ドメイン I I の二量体化を阻害することによって H E R 2 ホモおよびヘテロ二量体の形成を干渉するように開発された。ペルツズマブは単剤治療としては、インビトロおよびインビボで予想外に低い治療効果を有するが、それにも関わらず、トラスツズマブと併用すると相乗効果を示す。そのため、両抗体の併用が、乳癌患者に対する標準的な治療法となってきた（カペラン M . ら、Ann . Oncol . 、24、273～82、2013）。

10

#### 【0006】

前臨床および臨床の両方においてトラスツズマブとペルツズマブの併用が有効であったことから、抗腫瘍効果を高めるためには、H E R 2 のドメイン I I と I V の 2 つを標的とすることが必要であると考えられるようになった。この考えは、H E R 2 のドメイン I I と I V を同時に標的とする、より最近になって生成された他の分子とも一致している。例えば、デンマークの企業であるシンフォゲン（Symphogen）は、H E R 2 のドメイン I I と I V に対する抗体混合物を開発しており、これが前臨床マウス腫瘍モデルよりもいくらか高い効力（つまりトラスツズマブ単独よりも高い効果）を有することを示した。

20

#### 【0007】

同様に、米国特許第 2011/033460 号では、H E R 2 のドメイン I とドメイン I V に結合する抗体の組み合わせが DNA の合成と B T 474 細胞の生存率に対して相乗効果を示すことが記載されている。さらに米国特許第 2011/033460 号には、H E R 2 の 2 つの異なるエピトープ（片方のエピトープは H E R 2 のドメイン I に局在し、もう一方のエピトープは H E R 2 のドメイン I V に局在している）に結合する二重特異性抗体についても記載がある。

#### 【0008】

国際公開第 2009/068625 号では、H E R 2 への結合に関してトラスツズマブと競合する第一の抗体ドメインおよび H E R 2 の別のエピトープまたは別の部分に結合する第二の抗体ドメインとを含む二パラトープ抗体構築物の開発が論じられている。興味深いことに、いくつかの構築物は S K B R 3 細胞の増殖に対して拮抗性の効果をもち、その他の構築物は作用性の効果をもっていた。特に、国際公開第 2009/068625 号では、H E R 2 への結合（つまり H e r 2 のドメイン I V との結合）に関してトラスツズマブと競合する第一の抗体ドメインおよび H E R 2 との結合（つまり H E R 2 のドメイン I I との結合）に関してペルツズマブと競合する第二の抗体ドメインとを含む二パラトープ抗体構築物の開発が論じられている。ドメイン I V に結合する抗体ドメインがドメイン I I に結合する抗体ドメインの N 末端側にクローニングされた構築物はマップ（map）キナーゼ活性化の遮断を示したが、その他の配向（つまり、ドメイン I I 結合抗体ドメインが N 末端側にある）ではそのような遮断は観察されなかった。全体として、国際公開第 2009/068625 号では、S K B R 3 細胞の増殖（作用性もしくは拮抗性）または細胞のシグナル伝達に対して様々な程度の影響を及ぼすが、細胞毒性もアポトーシス作用も示さない、H E R 2 を標的とする様々な二パラトープ抗体構築物が説明されていた。

30

40

#### 【0009】

二価の結合タンパク質、例えば H E R 2 を標的としている二価の二重特異性抗体分子または二価のアフィボディーについても記載がある（ニールセン U . B . ら、Cancer Res . 、60、6434～6440、2000；ステフェン A - C . 、Cancer Biother . Radiopharmaceut . 20、239～248、2005）。このような分子は同じ結合ドメインを 2 回組み合わせたものであって、それぞれが同じ標的分子の別のエピトープに結合する 2 つの結合ドメインを含む二パラトープ分子とは

50

異なる。

#### 【0010】

抗体由来の治療薬やS M Iとは別に、標的分子に特異的に結合させるために使用することができ、その結果、拮抗剤として作用する新規結合タンパク質または結合ドメインがある（例えばピンズH．K．、アムシュトゥツP．およびブルクスンA．、Nat．Biotechnol．23、1257～1268、2005）。Fcをもたないそのような新規結合タンパク質または結合ドメインの分類の1つに、設計反復タンパク質または設計反復ドメインに基づくものがある（国際公開第2002/020565号；ピンズH．K．、アムシュトゥツP．、コールA．、ストンプM．T．、プリヨンC．、フォアーP．、グルッターM．G．、およびブルクスンA．、Nat．Biotechnol．22、575～582、2004；ストンプM．T．、ピンズH．K．およびアムシュトゥツP．、Drug Discov．Today 13、695～701、2008）。

10

#### 【0011】

国際公開第2002/020565号に、どのようにすれば反復タンパク質の大規模なライブラリーを構築することができるかと、それらの一般的な用途についてが記載されている。そのような設計反復ドメインは反復タンパク質の構成単位（モジュール）としての性質を利用するもので、かつ、ドメインの疎水性コアを遮蔽することで設計反復ドメインが凝集するのを防ぐN末端およびC末端キャッピングモジュールを有する場合がある（フォアーP．、ストンプM．T．、ピンズH．K．およびブルクスンA．、FEBS Letters 539、2～6、2003）。この結合タンパク質の新規分類には、設計アンキリン反復タンパク質（DARPin）が含まれる。HER2に結合する単一特異性DARPinの生成については既に記載がある（例えばシュタイナーD．、フォアーP．、およびブルクスンA．、J．Mol．Biol．382、1211～1227、2008；ザーンドC．、ペコラリF．、シュトロウマンN．、ワイラーE．およびブルクスンA．、J．Biol．Chem．281（46）、35167～35175、2006）。

20

#### 【0012】

最近になって、HER2を標的とする、二重特異性設計アンキリン反復タンパク質が報告された（ヨストCh．ら、Structure 21、1～13、2013）。著者らは、短いリンカー（より長いリンカーは同様には機能しなかった）で連結した2つのアンキリン反復ドメイン（1つはHer2のドメインIを標的とし、もう1つがHer2のドメインIVを標的とする）が結合すると、Her2のドメインIVを標的とするトラスツズマブを単独で使用したのと比較して、BT474細胞により強く細胞毒性が生じることを示している。この二パラトープ反復タンパク質は、2つのHer2分子の分子内架橋剤として機能する。つまりこのタンパク質は、2つの膜結合型HER2分子を連結し、それらが他のいずれのEGFRファミリーともシグナル伝達競合性二量体を形成することができなくなるように歪め、任意のキナーゼの二量体化を阻害し、その結果、観察された細胞毒性を引き起こす。

30

#### 【0013】

HER2を標的とすることが疾患、例えば癌の治療に有益なことが先行技術によって示されているが、HER2を標的とし、より高い効力を有する結合タンパク質を生成する必要があることは明らかである。

40

本発明の目的

#### 【0014】

本発明の目的は、Her2に対する新規拮抗剤を提供することである。

#### 【0015】

本発明の別の目的は、HER2が関連する細胞のシグナル伝達を阻害する新規機序を提供することである。

#### 【0016】

本発明の別の目的は、HER2介在性細胞増殖を阻害するためのおよび／または細胞（例えば腫瘍細胞）、組織、器官または患者でアポトーシスを誘導するための新規アプロー

50



チを提供することである。

【 0 0 1 7 】

本発明の別の目的は、二パラトープ反復タンパク質を使用することで H e r 2 の 2 つのドメインに対処する単剤治療法を提供することである。

【 0 0 1 8 】

本発明の別の目的は、癌の新しい治療オプションを提供することである。

【 0 0 1 9 】

本発明の別の目的は、腫瘍性疾患に対する、効力が高いおよび / または副作用の小さい治療法を提供することである。

【 0 0 2 0 】

本発明の別の目的は、先行技術による治療に反応しない ( もしくは部分的にしか反応しない ) 、またはそれらに抵抗性をもつ腫瘍性疾患に対する別の治療法を提供することである。

【 発明の概要 】

【 0 0 2 1 】

これらの目的は、独立請求項の発明の対象によって達成される。同時に、従属請求項および明細書はさらなる好ましい態様を開示する。

【 0 0 2 2 】

本発明を図面およびこれまでの記述によって図解および説明してきたが、このような図解および説明は実例または解説のためのものであり、限定するものではないと見なされ、本発明は開示の態様には限定されない。特許請求された発明を實踐する中で、図面、開示、および添付の請求項を学ぶことによって、当業者は開示された態様の他の変更形態を理解し、実行に移すことができる。請求項における「含んでいる」という用語は他の構成要素または工程を排除するものではなく、また、「 1 つ」または「 1 種」などの不定冠詞は複数を除外するものではない。異なる従属請求項で互いに特定の測定値が引用されているという事実は、これらの測定値の組み合わせを都合良く利用することができないことを示しているのではない。請求項中のいかなる引用符号も範囲を制限するものとは解釈されない。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 2 3 】

【 図 1 A 】 D A R P i n ドメインの H E R 2 への結合。図 1 に図示するように、一価の D A R P i n が H E R 2 の細胞外ドメイン ( ドメイン I ~ I V ) に結合することを、精製した H E R 2 ドメイン ( ドメイン I 、ドメイン I I I - I V またはドメイン I - I I I ) を競合剤として使用した競合的 E L I S A で試験した。500 nM の H e r 2 ドメイン I 存在下では、D A R P i n # 5 1 および D A R P i n # 5 2 は H E R 2 ( ドメイン I - I V ) にもはや結合できず、このことは、それらがドメイン I に局在するエピトープに結合することを示している。500 nM の H e r 2 ドメイン I でも 500 nM の H e r 2 ドメイン I I I - I V でも完全長 H e r 2 ( ドメイン I - I V ) への結合を阻害することができないように、D A R P i n # 7 、D A R P i n # 5 3 および D A R P i n # 5 4 は結合ドメイン I I である。

【 図 1 B 】 D A R P i n ドメインの H E R 2 への結合。図 1 B で図示した E L I S A では、一次抗体 ( マウス抗 R G S - ヒス抗体 ) をモノクローナルマウス抗 D A R P i n 抗体に置き換えた。

【 図 1 C 】 図 1 C は、一価の D A R P i n が予め形成しておいた H E R 2 - ペルツズマブ複合体に結合することができること、従って、H E R 2 のドメイン I I にあるペルツズマブとは異なるエピトープに結合することを示している。D A R P i n の定義については以後を参照のこと。O D、450 nM の吸光度から 620 nm の吸光度を引いたもの ; C、H E R 2 に結合しない対照の D A R P i n ; d 1、H E R 2 のドメイン I ; d 1 - 3 ; H E R 2 のドメイン I - I I I ; d 3 - 4、H E R 2 のドメイン I I I - I V。

【 図 2 A 】 一価のおよび二パラトープ結合タンパク質による B T 4 7 4 細胞の増殖阻害。

一価のDARPin(つまりDARPin#1およびDARPin#18)、これら一価のDARPinの非共有結合性混合物およびこれらの一価のDARPinを異なる配向で含んでいる二パラトープ結合タンパク質(DARPin#41およびDARPin#49)によるBT474の増殖阻害について試験した。図2Aは、それぞれ個別の単独実験に関して、様々な濃度の二パラトープDARPinによる増殖の阻害と、対応する阻害曲線を示している。その後、DARPin#41のIC<sub>50</sub>値が約2nMだったと計算した。個々のDARPinのIC<sub>50</sub>値を表2に示す。図2Aの図は、450nmで測定した吸光度から620nmで測定した吸光度を引いた値を対照(C)と比較してプロットしている。DARPin濃度の単位はnMである。X軸は対数で表している。DARPinの定義については以後を参照のこと。#41、DARPin#41; #49、DARPin#49; #18、DARPin#18; #1、DARPin#1; n.c., 陰性対照。

10

【図2B】図2Bでは、二パラトープDARPin、一価のDARPin両方の混合物、および相当する個々の一価のDARPinの濃度が100nMの時の増殖阻害を示している。Y軸にODをプロットしている。ODの低下は増殖の阻害を反映している。

【図3A】様々な二パラトープDARPinによるBT474細胞の増殖阻害。異なるN末端および/またはC末端アンキリン反復ドメインを含んでいる一群の二パラトープDARPin(#23、#24、#33、#37、#43、#44および#41)によるBT474の増殖阻害を示している。それぞれ個別の単独実験に関して、種々の濃度のDARPinによる増殖の阻害および対応する阻害曲線を示している。個々のDARPinのIC<sub>50</sub>値を表2に示す。図3Aは、DARPin#15を含む二パラトープDARPinによる阻害を示している。図は、450nmで測定した吸光度から620nmで測定した吸光度を差し引いた値を対照(C)に対してプロットした吸光度(OD)を示しており、DARPinの濃度単位はnMである。X軸は対数目盛りを示している。DARPinの定義については以後を参照のこと。#23、DARPin#23; #24、DARPin#24; . #33、DARPin#33; #37、DARPin#37; #41、DARPin#41; #43、DARPin#43; #44、DARPin#44。

20

【図3B】図3BはC末端にDARPin#18を含む二パラトープDARPinによる阻害を示している。

【図3C】図3Cでは、N末端にDARPin#51を含み、C末端にDARPin#18を含む二パラトープDARPinによる阻害を示している。

30

【図3D】図3Dでは、N末端にDARPin#51を含み、C末端にDARPin#21を含む二パラトープDARPinによる阻害を示している。

【図4A】二パラトープDARPin#41による種々の細胞株の細胞増殖の阻害。図4Aでは、DARPin#41およびトラスツズマブによるNCI-N87(図4A)の増殖の阻害を試験した。それぞれ個別の単独実験について、様々な濃度のDARPinによる増殖の阻害作用と対応する阻害曲線を示している。個々の細胞株のIC<sub>50</sub>値を表3に示す。図は、450nmで測定した吸光度から620nmで測定した吸光度を差し引いた値を対照(C)に対してプロットした吸光度(OD)を示しており、DARPinの濃度単位はnMである。X軸は対数目盛りを示している。DARPinおよび参照分子の定義については以後を参照のこと。#41、DARPin#41; T、トラスツズマブ。

40

【図4B】図4Bでは、DARPin#41およびトラスツズマブによるZR75-30の増殖の阻害を試験した。

【図4C】図4Cでは、DARPin#41およびトラスツズマブによるMDA-MB175の増殖の阻害を試験した。

【図5A】二パラトープDARPin#41による種々の細胞株でのアポトーシスの誘導。DARPin#41およびトラスツズマブによる、BT474細胞でのアポトーシスの誘導について試験した。それぞれ別個の単独実験について、様々な濃度のDARPinによるアポトーシスの誘導と対応する阻害曲線を示している。個々の細胞株のEC<sub>50</sub>値を表3に示す。図5Aの図は450nmで測定した吸光度から490nmで測定した吸光度を差し引いた値を対照(C)に対してプロットした吸光度(OD)を示しており、DARPin

50

i nまたはトラスツズマブの濃度単位はn Mである。

【図5B】D A R P i n # 4 1およびトラスツズマブによる、N C I - N 8 7細胞でのアポトーシスの誘導について試験した。図5Bおよび5Cの図は、対照(C)に対してプロットした相対発光量(R L U)を示しており、D A R P i nまたはトラスツズマブの濃度単位はn Mである。X軸は対数目盛りを示している。D A R P i nの定義に関しては以後を参照のこと。T、トラスツズマブ；# 4 1、D A R P i n # 4 1。

【図5C】D A R P i n # 4 1およびトラスツズマブによる、M D A - M B 1 7 5でのアポトーシスの誘導について試験した。

【図6A】細胞増殖の阻害におけるD A R P i n # 4 1と基準の効力の比較。B T 4 7 4細胞を用い、D A R P i n # 4 1および基準であるトラスツズマブとペルツズマブ、ならびに100nMのトラスツズマブと一定の力価のペルツズマブとの組み合わせによる増殖の阻害を試験した。図6Aは、それぞれ個別の単独実験に関して、様々な濃度のD A R P i nによる増殖の阻害、それぞれの基準濃度および対応する阻害曲線を示している。個々の細胞株のI C<sub>50</sub>値を表3に示す。図は450nmで測定した吸光度から620nmで測定した吸光度を差し引いた値を対照(C)に対してプロットした吸光度(O D)を示しており、D A R P i n / 基準の濃度単位はn Mである。X軸は対数目盛りを示している。

【図6B】アポトーシスの誘導におけるD A R P i n # 4 1と基準の効力の比較。B T 4 7 4細胞を用い、D A R P i n # 4 1および基準であるトラスツズマブとペルツズマブ、ならびに100nMのトラスツズマブと一定の力価のペルツズマブとの組み合わせによるアポトーシスの誘導を試験した。図6Bは、それぞれ個別の単独実験に関して、様々な濃度のD A R P i nによるアポトーシスの誘導、それぞれの基準濃度および対応する活性化曲線を示している。個々の細胞株のE C<sub>50</sub>値を表3に示す。図は対照(C)に対してプロットした相対発光量(R L U)を示しており、D A R P i n / 基準の濃度単位はn Mである。X軸は対数目盛りを示している。D A R P i nの定義に関しては以後を参照のこと。T、トラスツズマブ；P、ペルツズマブ；# 4 1、D A R P i n # 4 1。

【図7A】種々の形式の二パラトープ結合タンパク質によるB T 4 7 4細胞の増殖阻害。N末端にD A R P i n # 1を含みC末端にD A R P i n # 18を含む種々の形式の二パラトープD A R P i nによるB T 4 7 4の増殖阻害を示している。図7Aは、個別の単独実験について、血清半減期が長くなるように改変した様々な濃度の二パラトープD A R P i nによる増殖の阻害と、対応する阻害曲線を示している。二パラトープD A R P i n # 6 3はC末端のシステイン残基がペグ化されており、一方、二パラトープD A R P i n # 6 4と# 6 5は血清アルブミンに結合するアンキリン反復ドメインを含んでいる。

【図7B】図7Bは、個別の単独実験について、H E R 2結合反復ドメイン同士の間種々のリンカーを含んでいる、様々な濃度の二パラトープD A R P i nによる増殖の阻害および対応する阻害曲線を示している。D A R P i nのI C<sub>50</sub>値を表2に示す。図は450nmで測定した吸光度から620nmで測定した吸光度を差し引いた値を対照(C)に対してプロットした吸光度(O D)を示しており、D A R P i nの濃度単位はn Mである。X軸は対数目盛りを示している。D A R P i nの定義に関しては以後を参照のこと。# 6 6、D A R P i n # 6 6(2つの反復ドメインの間に長さ2アミノ酸の短いG S - リンカーを含む)；# 6 7、D A R P i n # 6 7(2つの反復ドメインの間に長さ5アミノ酸のG S - リンカーを含む)；# 4 1、D A R P i n # 4 1(2つの反復ドメインの間に長さ10アミノ酸のG S - リンカーを含む)；# 6 8、D A R P i n # 6 8(2つの反復ドメインの間に長さ24アミノ酸のP T - リンカーを含む)。

【発明を実施するための形態】

【0024】

本発明の一態様によれば、組換え結合タンパク質は、少なくとも第一の反復ドメインと第二の反復ドメインとを含んでおり、ここで前記2つの反復ドメインはそれぞれH E R 2の細胞外領域に結合し、かつ、前記反復ドメインは共有結合している。

【0025】

驚くべきことに、少なくとも2つの共有結合した反復ドメインであって、それぞれがH

10

20

30

40

50

HER2の細胞外領域に対する特異性を有している反復ドメインを含んでいる組換え結合タンパク質がHER2の細胞外部分に結合することが、これまでに概要を示したように、複数の別個の結合剤（例えば、トラスツズマブとペルツズマブの組み合わせ；図6）がHER2に結合する先行技術のアプローチを超える有効かつ予想外の効果をもつことが分かった。

【0026】

ヒトHER2は1255個のアミノ酸からなり、そのうちの21アミノ酸がシグナル配列、631アミノ酸が細胞外領域（例えばドメインI～IVを含んでいる外部ドメイン）、23アミノ酸が膜貫通領域、および580アミノ酸が細胞質ドメインである。

【0027】

好ましくは、前記組換え結合タンパク質のHER2の細胞外領域への前記結合は、前記反復ドメインの前記HER2の細胞外領域への結合と同時につまり同時発生的に生じる。さらに好ましくは、前記反復ドメインはHER2の細胞外領域にある異なる2つのエピトープに結合する。また好ましくは、前記反復ドメインはHER2の細胞外領域にある、異なっていてかつ重複していない2つのエピトープに結合する。

【0028】

この高い効力の理由の1つは、本発明の二パラトープ結合タンパク質とHER2の細胞外領域にある異なる2つのエピトープとの分子内相互作用に続いて起こると思われるこれまでに記載のないHER2の細胞外領域の屈曲構造を、本発明の組換え結合タンパク質が誘導することにあると考えられる（実施例8）。つまり、結合タンパク質の両方の反復ドメインが同じHER2分子上の異なるエピトープに同時に結合し、それによって、HER2の細胞外領域をこの新しい屈曲構造をとらざるを得なくなると考えられる。このような屈曲構造は先行技術では説明されていない。重要なことは、これら2つの反復ドメインが同じ結合タンパク質中に存在するように結合させる必要があるということである。つまり、2つの反復ドメインを単に混合しても効力を示さない（図2B）。さらに、このような結合タンパク質のHER2細胞外領域への二価の結合は、高い結合活性、つまり標的上の異なるエピトープに同調的に結合した結果生じる複合的な強度を示すことで、相乗的な結合効果を発揮する可能性がある。結合活性は親和性とは別のもので、単一の結合性相互作用の強度に相当する。まとめると、このような分子による非常に効果的な増殖の阻害およびアポトーシスの誘導は、実施例で示すように、この結合タンパク質とHER2との特異的な相互作用によって説明することができる。

【0029】

この理論によれば、同じタンパク質中に存在する2つの異なる反復ドメインは、それぞれのエピトープに結合するという点で、互いを相乗的に支援し、それによって、標的への総合的な親和性の向上を誘導している。

【0030】

第一の反復ドメインがHER2にあるそのエピトープに結合することによって、第二の反復ドメインは、第二の反復ドメインがHER2の対応するエピトープに結合するのを促進する、エネルギー的におよび/または立体的に好ましい位置に導かれる。

【0031】

実施例に示すように、第一の反復ドメインと第二の反復ドメインの共有結合はそれらの生物学的活性を強めるようである。

【0032】

本発明による組換え結合タンパク質の好ましい態様では、第一の反復ドメインはHER2のドメインIIに結合し、かつ、第二の反復ドメインはHER2のドメインIVに結合する。

【0033】

「ドメインIIに結合する」という用語が、それぞれの反復ドメインがHER2のドメインIIに主に結合することを意味していると理解することが重要である。しかしながらこの定義は、前記反復ドメインのその部分が、他のドメインに結合する、または重複する

10

20

30

40

50

可能性を排除しない。「ドメインⅠⅤに結合する」という用語にも同じことが言える。

【0034】

本発明による二パラトープ結合タンパク質を用いてHER2のドメインⅠⅠおよびⅠⅤを同時に標的とすることは、先行技術によって知られていたものをを超える、際だった予想外の効果を有する。このような結合タンパク質による増殖の阻害と細胞アポトーシスの誘導に関する細胞の反応は、最先端の抗体によってもたらされる効果と比較した場合に、非常に劇的なものであった。例えば、そのような反応の度合いが、HER2のドメインⅠⅤとⅠⅠをそれぞれ標的とするトラスツズマブとペルツズマブの併用などの、臨床的に基準となる抗体によって誘導される反応の度合いを上回るものであることが分かった(図4、5および6)。興味深いことに、HER2のドメインⅠとドメインⅠⅤに結合する二パラトープ結合タンパク質のいくつかはそのような予想外の効果を示さない(図3Cおよび3D)。

10

【0035】

反復ドメインが結合するHER2の細胞外領域ドメインの決定方法は、例えば実施例3に示したように、当業者にはよく知られている(例えば、ヨストら、前掲文献)。

【0036】

出願人の発見は、本発明による二パラトープ結合タンパク質を使ってHER2のドメインⅠⅠとⅠⅤを同時に標的とすることが、現行の抗体標的のアプローチに取って代わるより有効な方法になり得るという点で、HER2によって引き起こされるヒトの癌の治療に対して重要な意味をもつ。

20

【0037】

従って本発明による結合タンパク質は、好ましくは二パラトープ結合タンパク質つまり、同じタンパク質標的(すなわちHER2)にある2つの異なるエピトープまたはドメイン(例えばドメインⅠⅠおよびⅠⅤ)を認識する、抗原反復ドメインを2つ含む結合タンパク質である。しかしながら、多パラトープ性ポリペプチド、すなわち同じ標的タンパク質上にある3個、4個またはそれ以上の数のエピトープを認識する抗原反復ドメインを含有しているポリペプチドも、二パラトープまたは多パラトープの両方および多価のポリペプチド、つまり1つ以上の他の標的タンパク質を認識する抗原反復ドメインを有するポリペプチドと同様に、本発明の範囲に含まれる。

【0038】

本明細書で使用する場合HER2は、Neu、ErbB-2、CD340(表面抗原分類340)またはp185としても知られているヒト上皮成長因子受容体2に関する。HER2は上皮成長因子受容体(EGFR/ErbB)ファミリーのメンバーである。ヒトにおいてHER2は、既知の癌源遺伝子であり、ヒト17番染色体長腕(17q12)に局在しているERBB2によってコードされている。HER2のユニプロットKB/スイスプロット番号はP04626である。

30

【0039】

本発明の好ましい態様によれば、第一の反復ドメインと第二の反復ドメインは同じポリペプチド上に位置しているが、HER2のドメインⅠⅠを標的とする反復ドメインが、HER2のドメインⅠⅤを標的とする反復ドメインのN末端側に位置している。

40

【0040】

例として、これらの態様を図2A、および対応する説明に示す。驚くことに発明者らは、HER2のドメインⅠⅠを標的とする反復ドメインがHER2のドメインⅠⅤを標的とする反復ドメインのC末端側に位置している結合タンパク質の効果が、HER2のドメインⅠⅠを標的とする反復ドメインがHER2のドメインⅠⅤを標的とする反復ドメインのN末端側に位置している結合タンパク質の効果よりも有意に低いことを示した。

【0041】

好ましくは、HER2のドメインⅠⅠに結合する前記第一の反復ドメインは、ペルツズマブのHER2との結合に競合しない。例えば図1Cに、そのような反復ドメインがペルツズマブのHER2との結合に競合しないことを示している。同様に、好ましくは、HE

50

R 2 のドメイン I V に結合する前記第二の反復ドメインはトラスツズマブの H E R 2 との結合に競合しない。例えば、D A R P i n # 1 8 ~ 2 0 の反復ドメインはトラスツズマブの H E R 2 との結合に競合しない。反復ドメインがトラスツズマブまたはペルツズマブの H E R 2 との結合に競合するか否かを決定する方法は、例えば実施例 3 で示しているように、当業者にはよく知られている。

【 0 0 4 2 】

このことは、第一の好ましい態様では第一の反復ドメインが H E R 2 のドメイン I I にあるペルツズマブのエピトープとは異なるエピトープに結合することを意味している。同様に第二の好ましい態様では、第二の反復ドメインは、H E R 2 のドメイン I V にあるトラスツズマブのエピトープとは異なるエピトープと結合する。理論に束縛されないが、発

10

【 0 0 4 3 】

本発明の別の好ましい態様によれば、前記第一の反復ドメインはアンキリン反復ドメイン、つまり設計アンキリン反復ドメインであり、かつ、前記第二の反復ドメインがアンキリン反復ドメイン、つまり設計アンキリン反復ドメインである。

【 0 0 4 4 】

好ましくは、前記アンキリン反復ドメインつまり設計アンキリン反復ドメインは、7 0 から 3 0 0 個のアミノ酸、具体的には 9 0 から 2 0 0 個のアミノ酸を含む。

【 0 0 4 5 】

20

また好ましくは、本発明の反復ドメインは、国際公開第 2 0 0 2 / 0 2 0 5 6 5 に記載のアンキリン反復ドメインつまり設計アンキリン反復ドメインである。H e r 2 の異なるドメインに対する二パラトープ結合特異性を有する設計アンキリン反復ドメインの例を実施例に示している。

【 0 0 4 6 】

本発明の好ましい態様によれば、第一の反復ドメインは P B S 中で H E R 2 の細胞外領域に  $10^{-7}$  M 未満の K d で結合し、前記第二の反復ドメインは P B S 中で H E R 2 の細胞外領域に  $10^{-7}$  M 未満の K d で結合する。

【 0 0 4 7 】

K d は平衡解離定数であり、以後の文章内でさらに定義する。反復ドメインにその標的に対する十分な親和性をもたらすには、 $10^{-7}$  M 未満の K d が必要とされる。好ましくは、反復ドメインは P B S 中で、 $10^{-8}$  M、 $10^{-9}$  M、 $10^{-10}$  M 未満の K d で、または最も好ましくは  $10^{-11}$  M 未満の K d でその標的ドメインに結合する。

30

【 0 0 4 8 】

H e r 2 のドメイン I I および / またはドメイン I V に P B S 中で  $10^{-7}$  M 未満の K d で結合するタンパク質を含んでいる組換え結合タンパク質を実施例 2 に示す。

【 0 0 4 9 】

好ましい態様によれば、前記結合タンパク質は、B T 4 7 4 細胞の刺激された増殖を、 $100$  n M 未満の半数阻害濃度 ( I C 5 0 ) で阻害する。好ましくは、前記結合タンパク質は B T 4 7 4 細胞の刺激された増殖を 9 0 、8 0 、7 0 、6 0 、5 0 、4 0 、3 0 、2 0 または  $10$  n M 未満の I C 5 0 値で阻害する。また好ましくは、前記結合タンパク質は、刺激された B T 4 7 4 細胞の増殖を少なくとも 1 0 0 %、9 0 %、8 0 %、7 0 %、6 0 %、5 0 %、4 0 %、3 0 %、2 0 % または 1 0 % 阻害する。

40

【 0 0 5 0 】

当業者によく知られている標準的な手段、例えば実施例 4 に示す手段により、B T 4 7 4 細胞を使用して、本発明の結合タンパク質が増速を阻害する機能を測定することができる。好ましくは、B T 4 7 4、S K B R - 3、N C I - N 8 7、Z R 7 5 - 3 0、H C C 1 4 1 9 または M D A - M B 1 7 5 細胞を使用して、例えば実施例 5 に示すように、本発明の化合物の増殖阻害機能を測定することができる。

【 0 0 5 1 】

50

実施例 4 では、B T 4 7 4 細胞の刺激された増殖を 1 0 0 n M 未満の I C 5 0 値で阻害する組換え結合タンパク質を開示し、考察する。

【 0 0 5 2 】

別の好ましい態様によれば、前記結合タンパク質は 1 0 0 n M 未満の半数効果濃度 ( E C 5 0 ) で B T 4 7 4 細胞のアポトーシスを誘導する。好ましくは、前記結合タンパク質は、9 0、8 0、7 0、6 0、5 0、4 0、3 0、2 0 または 1 0 n M 未満の E C 5 0 値で B T 4 7 4 細胞のアポトーシスを誘導する。

【 0 0 5 3 】

当業者によく知られている標準的な手段、例えば実施例 5 に示す手段により、B T 4 7 4 細胞を使用して本発明の結合タンパク質がアポトーシスを誘導する機能を測定することができる。好ましくは、B T 4 7 4、S K B R - 3、N C I - N 8 7、Z R 7 5 - 3 0、H C C 1 4 1 9 または M D A - M B 1 7 5 細胞を使用して、例えば実施例 5 に示すように、本発明の化合物のアポトーシス誘導機能を測定することができる。

【 0 0 5 4 】

実施例 5 では、1 0 0 n M 未満の E C 5 0 値で B T 4 7 4 細胞でのアポトーシスを誘導する組換え結合タンパク質を開示し、考察する。

【 0 0 5 5 】

好ましい態様によれば、前記第一の反復ドメインと第二の反復ドメインはポリペプチドリンカーで連結されている。

【 0 0 5 6 】

そのようなポリペプチドリンカーは、例えば、それぞれのドメインをコードしている c D N A を融合させる単なる遺伝子融合によって達成してもよい。そのような型の態様からは、2 つの異なる反復ドメインを有する融合ペプチドタンパク質が得られる。

【 0 0 5 7 】

リンカーは、配列番号 7 ~ 1 2 に示すように、それぞれ、G および S、または P および T のアミノ酸を含んでいるオリゴペプチドからなる可能性がある。別の好ましい態様によれば、後に説明する「多量体化部分」を使用することもできる。あるいは 2 つの反復ドメインを互いに、例えばペプチドを利用しない化学的なリンカーの手段によって連結することができる。

【 0 0 5 8 】

好ましくは、組換え結合タンパク質および / または反復ドメインが p H 7 . 4 の P B S 中で熱変性する際の変性中点温度 ( m i d p o i n t d e n a t u r a t i o n t e m p e r a t u r e、T<sub>m</sub>) は 4 5 より高く、より好ましくは 5 0 より高く、より好ましくは 5 5 より高く、最も好ましくは 6 0 より高い。本発明の結合タンパク質または反復ドメインは、生理学的条件では規定された二次構造および三次構造を有する。そのようなポリペプチドが熱変性するとその三次構造および二次構造が失われるが、これは例えば円二色性 ( C D ) 測定によって追うことができる。結合タンパク質または反復ドメインが熱変性する際の変性中点温度は、生理学的な緩衝液中で温度を 1 0 から約 1 0 0 に徐々に上げていくことで前記タンパク質を熱変性させた際に、共同して構造転移を起こす温度の中間点に相当する。熱編成の際の変性中点温度の決定は、当業者にはよく知られている。結合タンパク質または反復ドメインが熱変性する際のこの変性中点温度は、前記ポリペプチドの熱安定性の指標である。

【 0 0 5 9 】

2 0 g / L まで、好ましくは 4 0 g / L まで、より好ましくは 6 0 g / L まで、さらにより好ましくは 8 0 g / L まで、および最も好ましくは 1 0 0 g / L までの濃度で、P B S 中 3 7 で 5 日間以上、好ましくは 1 0 日間以上、より好ましくは 2 0 日間以上、より好ましくは 4 0 日間以上、および最も好ましくは 1 0 0 日間以上インキュベートしたときに、不溶性の凝集体を 5 % ( w / w ) 未満しか形成しない組換え結合タンパク質および / またはアンキリン反復ドメインもまた好ましい。不溶性凝集体の形成は、目に見える沈殿の様子、ゲル濾過または不溶性の凝集体が形成されると非常に高まる動的光散乱によって

10

20

30

40

50

検出することができる。不溶性の凝集体は、 $10,000 \times g$ で10分間遠心分離することでタンパク質試料から除去することができる。好ましくは、組換え結合タンパク質および/またはアンキリン反復ドメインは、前述のインキュベート条件で、PBS中、37でインキュベートした時に、2%未満、より好ましくは1%、0.5%、0.2%、0.1%未満、または最も好ましくは0.05% (w/w) 未満しか不溶性の凝集体を形成しない。不溶性凝集体のパーセンテージは、不溶性の凝集体を可溶性タンパク質から分離し、その後、可溶性および不溶性画分に含まれるタンパク質量を標準的な定量法によって測定することで決定することができる。

【0060】

また、100 mMのジチオスレイトール (DTT) を含有するPBS中、37で1時間または10時間インキュベートした際に、その天然の三次元構造を失わない組換え結合タンパク質および/またはアンキリン反復ドメインが好ましい。

10

【0061】

特定の一態様において本発明は、HER2に特異的に結合し、かつ、指示したまたは好ましい変性中点温度および前段で定義した非凝集特性を有するアンキリン反復ドメインを2つ含んでいる組換え結合タンパク質に関する。

【0062】

本発明の他の好ましい態様によれば、

- ・前記第一の反復ドメインは、配列番号62～68、72および114～121からなる群より選択されるアンキリン反復ドメインのHER2との結合に競合し、および/または
- ・前記第二の反復ドメインは、配列番号74～82からなる群より選択されるアンキリン反復ドメインのHER2との結合に競合する。

20

【0063】

発明者らは、これらの反復ドメインのうち、第一の反復ドメインはHER2のドメインIIに結合するが、第二の反復ドメインはHER2のドメインIVに結合することを証明した。

【0064】

好ましくは、前記第一の反復ドメインは配列番号62～67および115～121からなる群より選択されるアンキリン反復ドメインのHER2への結合に競合する。より好ましくは、前記第一の反復ドメインは配列番号62、115、120、および121、特に配列番号115および120からなる群より選択されるアンキリン反復ドメインのHER2への結合に競合する。また好ましくは、前記第一の反復ドメインは、DARPin#1～6および54～60の群から選択される結合タンパク質；より好ましくは、DARPin#1、54、59および60の群から選択される結合タンパク質；特にDARPin#54および60の群から選択される結合タンパク質のHER2との結合に競合する。

30

【0065】

さらに好ましくは、前記第二の反復ドメインは、配列番号79～81、特に配列番号80および81からなる群より選択されるアンキリン反復ドメインとHER2との結合に競合する。また好ましくは、前記第二の反復ドメインは、DARPin#18～20の群から選択される結合タンパク質、特にDARPin#19および20の群から選択される結合タンパク質とHER2との結合に競合する。

40

【0066】

本発明のその上さらに他の好ましい態様によれば、

- ・第一の反復ドメインは、配列番号62～68、72および114～121からなる群より選択される1つのアンキリン反復ドメインと少なくとも70%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、
- ・第二の反復ドメインは、配列番号74～82からなる群より選択される1つのアンキリン反復ドメインと少なくとも70%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、さらに、
- ・前記アンキリン反復ドメインの1番目のGおよび/または2番目のSは欠失していても

50



よく、および

・前記アンキリン反復ドメインの末端から2番目のLおよび/または末端のNはAと交換されていてもよい。

【0067】

好ましくは、前記第一の反復ドメインは、配列番号62～67および115～121からなる群より選択される1つのアンキリン反復ドメインと少なくとも70%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。より好ましくは、前記第一の反復ドメインは、配列番号62、115、120、および121、特に配列番号115および120からなる群より選択される1つのアンキリン反復ドメインと少なくとも70%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。また好ましくは、前記第一の反復ドメインは、DARPin#1～6および54～60からなる群より選択される結合タンパク質、より好ましくはDARPin#1、54、59および60の群から選択される結合タンパク質、特にDARPin#54および60の群から選択される結合タンパク質と少なくとも70%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

10

【0068】

さらに好ましくは、前記第二の反復ドメインは、配列番号79～81、特に配列番号80および81からなる群より選択される1つのアンキリン反復ドメインと少なくとも70%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。また好ましくは、前記第二の反復ドメインは、DARPin#18～20からなる群に由来する結合タンパク質、特にDARPin#19および20の群に由来する結合タンパク質と少なくとも70%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

20

【0069】

好ましくは、第一のアンキリン反復ドメインは、配列番号62～68、72および114～121からなる群より選択される1つのアンキリン反復ドメインと少なくとも70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、または100%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0070】

好ましくは、第二のアンキリン反復ドメインは、配列番号74～82からなる群より選択される1つのアンキリン反復ドメインと少なくとも70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、または100%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

30

【0071】

また好ましくは、第一のアンキリン反復ドメインは、配列番号62～68、72および114～121からなる群より選択されるアンキリン反復ドメインのN末端とC末端キャッピングモジュールとの間にある1、2または3つのアンキリン反復モジュールと少なくとも70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、または100%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

40

【0072】

また好ましくは、第二のアンキリン反復ドメインは、配列番号74～82からなる群より選択されるアンキリン反復ドメインのN末端とC末端キャッピングモジュールとの間にある1、2または3つのアンキリン反復モジュールと少なくとも70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、または100%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0073】

本発明の一層さらに他の好ましい態様によれば、

50

・前記第一の反復ドメインは、配列番号 62 ~ 68、72 および 114 ~ 121 からなる群より選択され、

・前記第二の反復ドメインは、配列番号 74 ~ 82 からなる群より選択され、さらに、

・前記アンキリン反復ドメインの 1 番目の G および / または 2 番目の S は欠失していてもよく、および

・前記アンキリン反復ドメインの末端から 2 番目の L および / または末端の N は A と交換されていてもよい。

【0074】

好ましくは、第一のアンキリン反復ドメインは、配列番号 62 ~ 67 および 115 ~ 121、より好ましくは 115、120 および 121、特に配列番号 115 および 120 からなる群より選択される。

【0075】

好ましくは、第二のアンキリン反復ドメインは、配列番号 79 ~ 81、特に配列番号 80 および 81 からなる群より選択される。

【0076】

本発明の一層さらに他の好ましい態様によれば、

・前記第一の反復ドメインは、配列番号 15 ~ 18、21 ~ 23、37、38、125、126、129、130、133 および 134 からなる群より選択されるおよびアミノ酸配列を有するアンキリン反復モジュール、および配列番号 15 ~ 18、21 ~ 23、37、38、125、126、129、130、133 および 134 の 9 つまでのアミノ酸残基が他の任意のアミノ酸残基に置き換えられている配列を含み、および / または

・前記第二の反復ドメインは、配列番号 46、47、51、52、55 および 56 からなる群より選択されるアミノ酸配列を有するアンキリン反復モジュール、および配列番号 46、47、51、52、55 および 56 の 9 つまでのアミノ酸残基が他の任意のアミノ酸残基に置き換えられている配列を含む。

【0077】

好ましくは、第一のアンキリン反復ドメインのそのようなアンキリン反復モジュールは、配列番号 15 ~ 18、125、126、129、130、133 および 134 から、より好ましくは 15、125、129 および 133 から、さらに好ましくは 125 および 133 からなる群より選択される。

【0078】

好ましくは、第二のアンキリン反復ドメインのそのようなアンキリン反復モジュールは、配列番号 46、47、55 および 56 から、より好ましくは 55 および 56 からなる群より選択される。

【0079】

また好ましくは、配列番号 15 ~ 18、21 ~ 23、37、38、46、47、51、52、55、56、125、126、129、130、133 および 134 の反復モジュールに含まれる 8 個までのアミノ酸、より好ましくは 7 個までのアミノ酸、より好ましくは 6 個までのアミノ酸、より好ましくは 5 個までのアミノ酸、さらにより好ましくは 4 個までのアミノ酸、より好ましくは 3 個までのアミノ酸、より好ましくは 2 個までのアミノ酸、最も好ましくは 1 個のアミノ酸は別のアミノ酸と交換されている。

【0080】

キャッピングモジュール、反復モジュールつまり反復ドメイン、反復ドメイン、または結合タンパク質に含まれるアミノ酸が置き換えられている場合には、これらのアミノ酸は、好ましくは、A、D、E、F、H、I、K、L、M、N、Q、R、S、T、V、W および Y からなる群より選択されるアミノ酸、より好ましくは A、D、E、H、I、K、L、Q、R、S、T、V、および Y からなる群由来のアミノ酸と交換される。また好ましくは、アミノ酸は相同のアミノ酸で置き換えられる。つまりアミノ酸は、生物物理学的な特性が似ている側鎖を有するアミノ酸と交換される。例えば、負に帯電しているアミノ酸 D は

10

20

30

40

50

負に帯電しているアミノ酸 E に置き換えてもよく、または、L などの疎水性のアミノ酸を A、I または V に置き換えてもよい。ポリペプチド中のアミノ酸を別のアミノ酸と交換する技術は当業者にはよく知られている。

【0081】

好ましくは、本発明による反復モジュールは、K D F Q G I T P L H I A A T S G H L E I V E V L L K A G A D V N A (配列番号 16)、および配列番号 16 に含まれている 9 個までのアミノ酸残基が他の任意のアミノ酸残基に置き換えられている配列からなる群より選択されるアミノ酸配列を有し、ここで、

- ・ 3 番目の F は A と交換されていてもよく、
- ・ 4 番目の Q は E と交換されていてもよく、
- ・ 5 番目の G は S と交換されていてもよく、
- ・ 6 番目の I は V と交換されていてもよく、
- ・ 11 番目の I は L と交換されていてもよく、
- ・ 14 番目の T は Q と交換されていてもよく、および / または
- ・ 15 番目の S は、N および W からなる群より選択されるアミノ酸と交換されていてもよい。

10

【0082】

この群の非常に好ましい反復モジュールの 1 つは、K D F Q G V T P L H I A A Q S G H L E I V E V L L K A G A D V N A (配列番号 125)、配列番号 129 または配列番号 133 からなるアミノ酸配列を有する。

20

【0083】

また好ましくは、本発明によるアンキリン反復モジュールは、K D I T G E T P L H H A A D S G H L E I V E V L L K A G A D V N A (配列番号 18)、および配列番号 18 に含まれている 9 個までのアミノ酸残基が他の任意のアミノ酸残基に置き換えられている配列からなる群より選択されるアミノ酸配列を有し、ここで

- ・ 3 番目の I は V と交換されていてもよく、
- ・ 6 番目の E は D と交換されていてもよく、
- ・ 11 番目の H は L と交換されていてもよく、
- ・ 14 番目の D は Q と交換されていてもよく、
- ・ 15 番目の S は H と交換されていてもよく、および / または
- ・ 19 番目の E は V と交換されていてもよい。

30

【0084】

この群の非常に好ましい反復モジュールの 1 つは、K D V T G D T P L H L A A Q H G H L E I V E V L L K A G A D V N A (配列番号 126)、配列番号 130 または配列番号 134 からなるアミノ酸配列を有する。

【0085】

また好ましくは、本発明によるアンキリン反復モジュールは、K D W E G T T P L H L A A H T G H L E I V E V L L K A G A D V N A (配列番号 21)、および配列番号 21 に含まれている 9 個までのアミノ酸残基が他の任意のアミノ酸残基に置き換えられている配列からなる群より選択されるアミノ酸配列を有し、ここで、

40

- ・ 3 番目の W は F と交換されていてもよく、
- ・ 4 番目の W は Q と交換されていてもよく、
- ・ 6 番目の T は、I、Y および V、好ましくは T からなる群より選択されるアミノ酸と交換されていてもよく；
- ・ 11 番目の L は、I および V；好ましくは I および V からなる群より選択されるアミノ酸と交換されていてもよく；
- ・ 14 番目の H は、H、Q、Y および W、好ましくは H からなる群より選択されるアミノ酸と交換されていてもよく、および / または
- ・ 15 番目の T は欠失していても、または A および D からなる群より選択されるアミノ酸と交換されていてもよい。

50

## 【 0 0 8 6 】

また好ましくは、本発明によるアンキリン反復モジュールは、K D T V G T T P L H Y A A E D G H L E I V E V L L K A G A D V N A (配列番号 2 2)、および配列番号 2 2 に含まれている 9 個までのアミノ酸残が他の任意のアミノ酸残基に置き換えられている配列からなる群より選択されるアミノ酸配列を有し、ここで、

- ・ 3 番目の T は、等しいアミノ酸分布の S、K、E および I からなる群より選択されるアミノ酸と交換されていてもよく、
- ・ 4 番目の V は、Q、I および Y；好ましくは Y からなる群より選択されるアミノ酸と交換されていてもよく、
- ・ 6 番目の T は、Q、F、R および W からなる群より選択されるアミノ酸と交換されていてもよく、
- ・ 1 1 番目の Y は、L、E および S；好ましくは S からなる群より選択されるアミノ酸と交換されていてもよく、
- ・ 1 4 番目の E は、S、Q、Y および V からなる群より選択されるアミノ酸と交換されていてもよく、および / または
- ・ 1 5 番目の D は、S、F および Y からなる群より選択されるアミノ酸と交換されていてもよく、
- ・ 1 6 番目の G は D と交換されていてもよい。

10

## 【 0 0 8 7 】

また好ましくは、本発明によるアンキリン反復モジュールは、K D V E G W T P L H Y A A S S G H L E I V E V L L K A G A D V N A (配列番号 3 8)、および配列番号 3 8 に含まれている 9 個までのアミノ酸残が他の任意のアミノ酸残基に置き換えられている配列からなる群より選択されるアミノ酸配列を有し、ここで、

- ・ 6 番目の W は Q と交換されていてもよく、
- ・ 1 1 番目の Y は L と交換されていてもよく、および / または
- ・ 1 5 番目の S は Y と交換されていてもよい。

20

## 【 0 0 8 8 】

また好ましくは、本発明によるアンキリン反復モジュールは、K D W R G F T P L H Y A A Y L G H L E I V E V L L K A G A D V N A (配列番号 4 6) および配列番号 4 6 に含まれている 9 個までのアミノ酸残が他の任意のアミノ酸残基に置き換えられている配列からなる群より選択されるアミノ酸配列を有し、ここで、

- ・ 3 番目の W は、W、T、V および R；好ましくは T および R からなる群より選択されるアミノ酸と交換されていてもよく、
- ・ 4 番目の R は、R、T および I；好ましくは I からなる群より選択されるアミノ酸と交換されていてもよく、
- ・ 6 番目の F は、F または H；好ましくは F と交換されていてもよく、
- ・ 1 1 番目の Y は R と交換されていてもよく、
- ・ 1 4 番目の Y は F と交換されていてもよく、
- ・ 1 5 番目の L は V と交換されていてもよく、および / または
- ・ 1 7 番目の H は Q と交換されていてもよい。

30

40

## 【 0 0 8 9 】

好ましくは、配列番号 1 6、1 8、2 8、3 1、2 1、2 2、3 8 および / または 4 6 に含まれている 9、8、7、6、5、4、3、2、または 1 個のアミノ酸残基は他の任意のアミノ酸残基に置き換えられている。

## 【 0 0 9 0 】

さらに、前記結合タンパク質がポリペプチドを含んでいることが特に好ましく、ここで前記ポリペプチドは前記第一のアンキリン反復ドメインと第二のアンキリン反復ドメインを含み、かつ、前記ポリペプチドは、配列番号 8 3 ~ 9 8、1 0 2、1 0 3、1 2 2、1 2 3 および 1 3 6 ~ 1 4 1 からなる群より選択されるポリペプチドと少なくとも 7 0 % のアミノ酸配列同一性を有する。

50

## 【 0 0 9 1 】

好ましくは、前記ポリペプチドは、配列番号 83 ~ 98、102、103、122、123 および 136 ~ 141 からなる群より選択されるポリペプチドと、少なくとも 70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、または 100 % のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。

## 【 0 0 9 2 】

また好ましくは、そのようなポリペプチドは、配列番号 84、85、86、87、90、91、92、98、102、103、122 および 123 から、より好ましくは 85、86、87、90、91、92、102、103、122 および 123 から、さらにより好ましくは 86、87、91 および 92 から、そして最も好ましくは 86 および 87 からなる群より選択される。

10

## 【 0 0 9 3 】

一層さらに他の好ましい態様によれば、前記第一のおよび第二のアンキリン反復ドメインのアンキリン反復モジュールの 1 つ以上のアミノ酸残基は、アンキリン反復単位を整列させた場合に一致する位置に見られるアミノ酸残基と交換される。

## 【 0 0 9 4 】

本発明の別の態様では、前述の説明に従う少なくとも 1 つの結合タンパク質または特定のアンキリン反復ドメインをコードしている核酸分子を提供する。さらに、前記核酸分子を含んでいるベクターについても検討する。

20

## 【 0 0 9 5 】

本発明による結合組成物の全てがポリペプチドまたはタンパク質を含むのではない。後半の態様は、それらを実行する者にだけ関するものである。これに関して出願人は、それらをコードすることが可能な核酸分子の全てを本明細書で開示するのを控える。なぜならば、遺伝子コードの縮重によって、多くの核酸分子が 1 つのおよび同じポリペプチドまたはタンパク質をコードする可能性があるためである。

## 【 0 0 9 6 】

しかしながら、所与の核酸が所与のポリペプチドまたはタンパク質をコードしているかを明白にかつ一義的に決定することができる。従って、本態様は当業者によっては明らかであり、また、その範囲は容易に決定される。

30

## 【 0 0 9 7 】

本発明の別の態様では、

- ・ H E R 2 受容体の二量体化、
- ・ H E R 2 / H E R 3 のヘテロ二量体化、
- ・ H E R 2 受容体の自己リン酸化、
- ・ H E R 受容体介在性シグナル伝達
- ・ H E R 3 受容体リガンド誘導性リン酸化、および / または
- ・ H E R 3 受容体介在性シグナル伝達、

のうちの少なくとも 1 つを阻害するための、前述の説明に従う結合タンパク質の使用を提供する。

40

## 【 0 0 9 8 】

H E R 2 受容体の二量体化（「ホモ二量体化」とも呼ばれる）はリガンドとは無関係に H E R 2 を過剰発現している組織でおこる。前記ホモ二量体化によって細胞内の自己リン酸化が誘導され、これによって最終的に、例えば細胞増殖の高まりが誘導される可能性がある。

## 【 0 0 9 9 】

H E R 3 は固有のキナーゼ活性を欠いているため、H E R 2 が過剰発現している乳癌で H E R 3 は、H E R 2 / H E R 3 ヘテロ二量体が形成された後にリン酸化され、その結果、最終的に、例えばアポトーシスの阻害が起こる。

## 【 0 1 0 0 】

50

前記使用はインビトロまたはインビボのいずれでも行うことができる。前段に示すように、これら全ての過程は病原性の結果を、すなわちそれぞれのシグナル伝達経路を活性化することで、もたらす場合がある。HER2の二量体化および/またはHER2/HER3のヘテロ二量体化によって活性化されるシグナル伝達経路としては、マイトゲン活性化プロテインキナーゼ(MAPK)、ホスホイノシチド3キナーゼ(PI3K/Akt)、ホスホリパーゼC、プロテインキナーゼC(PKC)、シグナル伝達性転写因子(STAT)、Ras-MAPキナーゼ経路およびmTOR経路が挙げられる。

【0101】

例えば、ホスホイノシチド3キナーゼ(PI3K/Akt)経路は、アポトーシスを遮断することで細胞の生存を維持する、非常に重要な経路のうちの1つだと考えられている。従ってその病的な活性化、例えばHER2/HER3ヘテロ二量体化による活性化は悪性の増殖を誘導し得る(例えば実施例を参照のこと)。

10

【0102】

HER2の病的な活性化、例えばHER2ホモ二量体化による活性化は、悪性細胞の転移、浸潤、または増殖を引き起こし得る(例えば、実施例;ハイネスNE、およびレーンHA、Nat. Rev. Cancer、5、341~54、2005を参照のこと)。

【0103】

本発明の一層さらに別の態様では、前述の開示に従う結合タンパク質または組成物、および必要に応じて薬学的に許容可能な担体および/または希釈剤を含んでいる医薬製剤を提供する。

20

【0104】

薬学的に許容可能な担体および/または希釈剤は当業者に知られており、また、より詳細に後述する。さらには、前述の組換え結合タンパク質、具体的には反復ドメインを含んでいる結合タンパク質を1つ以上含んでいる診断的組成物についても検討する。

【0105】

医薬製剤は、前述の組換え結合タンパク質、および薬学上許容可能な担体、賦形剤または安定剤(例えば、レミントンの薬学、第16版、オソルA、編[1980]に記載の)を含む。当業者に知られている好適な担体、賦形剤または安定剤には、生理食塩水、リンガー液、デキストロース溶液、ハンクス液、固定油、オレイン酸エチル、生理食塩水に溶解した5%デキストロース、等張性や化学的な安定性を高める物質、緩衝剤および防腐剤がある。他の好適な担体としては、組成物、例えばタンパク質、多糖、ポリ乳酸、ポリグリコール酸、高分子アミノ酸およびアミノ酸共重合体の投与を受けている個人に有害な抗体をその担体自体が産生しない、いずれもの担体が含まれる。

30

【0106】

インビボ投与に用いられる製剤は、無菌的すなわち滅菌されたものでなくてはならない。このことは、無菌的な濾過膜を介して濾過することで容易に達成される。医薬製剤は、当業者が知り得るいずれの好適な方法によっても投与することができる。

【0107】

さらに本発明の別の態様では、前述の開示に従う少なくとも1つの結合タンパク質、組成物または医薬製剤の薬物としての使用を提供する。同様に、前述の特許請求項に従う結合タンパク質、組成物または医薬製剤を患者に投与することを含む方法を提供する。どちらの例でも、治療される疾患は腫瘍性疾患、好ましくは癌であることが好ましい。

40

【0108】

それぞれの例で、疾患を治療するために、有効量の前述の特許請求項に従う結合タンパク質、組成物または医薬製剤が患者に好ましく投与される。

【0109】

本明細書で使用する場合「腫瘍性疾患」という用語は、増殖が急激な細胞成長または新生物によって特徴付けられる、細胞または組織の異常な段階または状態を指す。より具体的な意味では、この用語は癌の過程、例えば腫瘍および/または白血病に関する。

50

## 【 0 1 1 0 】

本発明による結合タンパク質はアポトーシス性および抗増殖性の作用を示した（実施例の項を参照のこと）。腫瘍性疾患はアポトーシスの抑制および／または増殖の高まりによって特徴付けられることが多いため、これらの実験から、本発明による結合タンパク質が腫瘍性疾患の治療において使用可能であるとする蓋然性が高い。

## 【 0 1 1 1 】

好ましくは、前記腫瘍性疾患は、

- ・ H E R 2 をコードしている遺伝子の増幅、
  - ・ H E R 2 をコードしている遺伝子の過剰発現、
  - ・ H E R 2 をコードしている遺伝子の変異型の発現、および／または
  - ・ トラストズマブ抵抗性腫瘍における H e r 3 をコードしている遺伝子の過剰発現、
- からなる群より選択される少なくとも1つによって特徴付けられる疾患である。

10

## 【 0 1 1 2 】

ヒトでは、H E R 2 は E R B B 2 遺伝子によってコードされている。前述の選択肢は、現在市販されているもののような、現代の分子診断学的手段によって検出することができる、E R B B 2 遺伝子に入った突然変異の結果と帰せられる。

## 【 0 1 1 3 】

本明細書で使用する場合、「H E R 2 をコードしている遺伝子の発現」という用語は、例えば免疫組織化学（I H C）で検出される、H E R 2 受容体タンパク質を発現している細胞、組織または器官に関する。本明細書で使用する場合、「H E R 2 をコードしている遺伝子の増幅または過剰発現」という用語は、正常な細胞、組織または器官での発現レベルと比較して、例えば免疫組織化学（I H C）で検出したときに、細胞、組織、または器官で H E R 2 受容体タンパク質の異常な発現レベルが示されることに関連する。

20

## 【 0 1 1 4 】

そのような I H C 検出アッセイは当該分野で知られており、またこれらには、臨床試験アッセイ（C T A）、商業的に利用可能なラボコープ（L a b C o r p）4 D 5 試験、および市販されているダコ（D A K O）・ハーセプテスト（H e r c e p T e s t）（登録商標）（ダコ、カーピンテリア、カリフォルニア）が含まれる。後者のアッセイでは、細胞の染色を 0 ~ 3 + の一定のスコア範囲に分類して（0 が正常な発現であり、3 + は陽性の発現が最も強いことを示している）H E R 2 タンパク質を過剰発現している癌を同定する。従って、1 +、2 +、または 3 +、好ましくは 2 + または 3 +、より好ましくは 3 + の範囲に分類される H E R 2 タンパク質の過剰発現によって特徴付けられる癌を患っている患者が本発明の治療方法の恩恵を受けるだろう。

30

## 【 0 1 1 5 】

あるいは、H e r 2 の発現および／または過剰発現に関するスコアをインサイツ（i n s i t u）ハイブリダイゼーション（I S H）、R T - P C T および他の方法によって検出することもできる。

## 【 0 1 1 6 】

特に好ましい態様によれば、前記腫瘍性疾患は、

- ・ 乳癌、
- ・ 卵巣癌、
- ・ 消化器癌(gastric cancer)、
- ・ 胃癌(stomach cancer)、
- ・ 子宮癌、および／または
- ・ 結腸直腸癌、

40

を含む群より選択される疾患のうちの少なくとも1つである。

## 【 0 1 1 7 】

さらに前記使用を、状況に合わせて、

- ・ 抗腫瘍剤、
- ・ 内分泌薬、

50

- ・腫瘍ワクチン、
- ・免疫治療、および/または
- ・細胞治療、

からなる群より選択される少なくとも1つの活性成分を投与することで補完することが好ましい。

#### 【0118】

本明細書で使用する場合、「状況に合わせて補完する」という用語は、所与の投与計画の元で行われる同時投与を指す。これには、異なる化合物を同時に投与すること、ならびに異なる化合物を時間をおいて投与すること（例えば、化合物Aを一回投与し、その後、化合物Bを複数回投与すること、もしくはその逆、または両方の化合物を同時に投与し、2つの化合物のうち的一方を後の段階でも投与すること）が含まれる。

10

#### 【0119】

本明細書で使用する場合、「抗腫瘍剤」という用語は、抗腫瘍作用または抗がん作用を有する薬剤または薬剤の組み合わせに関する。これは特に、有糸分裂を害すること、急速に分裂している細胞を効果的に標的とすること、または細胞のアポトーシスを起こすことで機能する化学療法薬について言える。化学療法薬の多くは、アルキル化剤、代謝拮抗剤、アントラサイクリン系薬剤、植物アルカロイド、トポイソメラーゼ阻害剤、および他の抗腫瘍剤に分類することができる。

#### 【0120】

好ましい抗腫瘍剤は、5-フルオロウラシル、アクチノマイシン、アドリアマイシン、アムサクリン、アントラサイクリン系薬剤、アザチオプリン、ベンダムスチン、ブレオマイシン、カルボプラチン、クロラムブシル、シスプラチン、シクロホスファミド、ダウノルビシン、ドセタキセル、ドキソルビシン、エピルビシン、エトポシド、イダルビシン、イホスファミド、イリノテカン、メクトレタミン、メルカプトプリン、メトトレキサート、マイトマイシン、オキサリプラチン、パクリタキセル、プリカマイシン、ポドフィロトキシン、テニポシド、トポテカン、バルルビシン、ビンブラスチン、ビンクリスチン、ビンクリスチン、ビンデシン、および/またはビノレルビンである。

20

#### 【0121】

免疫治療は、癌細胞からのタンパク質の単離、およびその後、癌細胞を死滅させる免疫反応を刺激することを期待して、癌患者にそれらのタンパク質に対する免疫を接種することを伴う。治療学的な抗癌ワクチンの別のアプローチには、患者の中でその場で免疫応答を引き起こすものがある。これによって、溶菌性のウイルス複製に続いて放出された腫瘍抗原に対する抗腫瘍性の免疫応答が高まり、その結果、その場で、患者に特異的な特異的な抗腫瘍ワクチンが生成される。一層さらに別のアプローチでは、癌の発生において生理学的な役割を担う化合物で患者を免疫して、ヒトの身体が前記化合物を排除するようにする。

30

#### 【0122】

標的薬剤は、急速に分裂している細胞を単純に干渉する（例えば従来型の化学療法）というよりはむしろ、発癌および腫瘍の成長に必要な特定の標的分子を干渉することで癌細胞の成長を遮断する型の薬剤である。標的治療の主な分類としては低分子およびモノクローナル抗体がある。

40

#### 【0123】

この定義に含まれる低分子には、ラパチニブ、ネラチニブ、アフアチニブ、イマチニブ、ゲフィチニブ、エルロチニブ、ボルテゾミブ、Bcl-2阻害剤（例えばオバトクラックス（Obatoclax）、ABT-263、およびゴシポール）、PARP阻害剤（例えばイニパリブ（Iniparib）、オラパリブ（Olaparib））、ヤヌスキナーゼ阻害剤、PI3K阻害剤、アパチニブ（Apatinib）、mTOR阻害剤（エベロリムス）、AN-152、AKT阻害剤、HDAC阻害剤、プロテアソーム阻害剤、[D-Lys(6)]-LHRH結合型ドキソルビシン、ペガブタニブ、スニチニブ、ソラフェニブ、チボザニブおよびバゾバニブが含まれるがこれらには限定されない。こ

50



の定義に含まれるモノクローナル抗体には、リツキシマブ、トラスツズマブ、トラスツズマブ-TDM1、ペルツズマブ、セツキシマブおよびペバシズマブが包含されるがこれらには限定されない。

【0124】

本明細書で使用する場合、内分泌薬とは、ホルモンまたはホルモン受容体に拮抗的で、そのため、成長にホルモンを必要とする型の癌を干渉する薬剤である。そのような内分泌薬の一例としては、乳房組織のエストロゲン受容体拮抗剤であるタモキシフェンがある。

【0125】

本明細書で使用する場合、「細胞治療」という用語は、改変したまたは未改変の細胞障害性リンパ球または樹状細胞の養子移植などの、細胞を用いた治療に関する。

10

【0126】

本明細書で使用する場合、「腫瘍ワクチン」という用語は、a) 癌源ウイルスの感染を防ぐワクチン(作用機序はウイルス感染に対する他のワクチンと同様である)、b) 既存の癌を治療するワクチン(治療的癌ワクチン)またはc) 癌の発展を阻害するまたはその作用を軽減するワクチン(予防的癌ワクチン)のいずれかを指す。

【0127】

これらに加えてあるいはこれらとは別に、前記使用は状況に合わせて、

- ・放射線治療、
- ・手術、および/または
- ・レーザー焼灼術、

20

からなる群より選択される少なくとも1つの他の治療で補完されることが好ましい。

【0128】

さらに、前述の開示に従う使用を含む、ヒトまたは動物対象の治療方法を提供する。好ましくは、前記治療方法は、前述の開示の中で示した適応に関する。この方法は、それを必要とするヒトまたは動物に、治療上有効量の本発明の組換え結合タンパク質を投与することを含む。

【0129】

本発明による組換え結合タンパク質またはアンキリン反復ドメインを、バクテリオファージ(国際公開第1990/002809号、同第2007/006665号)もしくは細菌細胞(国際公開第1993/010214号)表面での提示、リボソームディスプレイ(国際公開第1998/048008号)、プラスミドを使ったディスプレイ(国際公開第1993/008278号)もしくはRNA-反復タンパク質交雑構築物を使ったディスプレイ(国際公開第2000/032823号)、または例えばタンパク質相補性検定(国際公開第1998/341120号)による細胞内での発現と選抜/スクリーニングなどの複数の方法によって得てもよく、および/またはそれをさらに発展させてもよい。このような方法は当業者には知られている。

30

【0130】

本発明による組換え結合タンパク質またはアンキリン反復ドメインの選抜/スクリーニングに用いられるアンキリン反復タンパク質のライブラリーを、当業者には知られている手法に従って得てもよい(国際公開第2002/020565号、ピンズH.K.ら、J. Mol. Biol.、332、489~503、2003、およびピンズら、2004、前掲文献)。HER2の細胞外領域に対する特異性を有するアンキリン反復ドメインを選抜するためのそのようなライブラリーの使用を実施例1に例示する。さらに、本発明のアンキリン反復ドメインは、本発明のアンキリン反復モジュールや適切なキャッピングモジュールまたはキャッピング試薬(フォアーP.ら、FEBS letters 539、2~6、2003)から、標準的な組換えDNA技術によって(例えば国際公開第2002/020565号、ピンズら、2003、前掲文献およびピンズら、2004、前掲文献)、規格単位(モジュール)を使った方式で組み立てることができる。

40

【0131】

本発明は実施例で説明した特定の態様に限定されるものではない。以降で説明する一般

50

的な概要に従って、他の供給源を使用・処理してもよい。

#### 定義

##### 【0132】

「タンパク質」という用語はポリペプチドを指し、ここでそのポリペプチドの少なくとも一部は、規定された三次元配置を有するか、またはそのポリペプチド鎖の中におよび／またはそのポリペプチド鎖の間に二次、三次、もしくは四次構造を形成することで、規定された三次元構成を獲得することができる。あるタンパク質が2つ以上のポリペプチドを含む場合、個々のポリペプチド鎖は非共有的にまたは共有的に、例えば2つのポリペプチド間のジスルフィド結合によって結合されている場合がある。個別に規定された三次元構成を有するか、または二次、三次、もしくは四次構造を形成することで規定された三次元配置を獲得することができるタンパク質の一部分は「タンパク質ドメイン」と呼ばれる。当業者であればこのようなタンパク質ドメインをよく知っている。

10

##### 【0133】

組換えタンパク質、組換えタンパク質ドメイン、組換え結合タンパク質などに関して使用される「組換え」という用語は、前記ポリペプチドが、関連する分野の当業者にはよく知られている組換えDNA技術を用いて生産されたものであることを意味している。例えば、ポリペプチドをコードしている組換えDNA分子（例えば遺伝子合成によって生成された分子）を、細菌性の発現プラスミド（例えばpQE30、キアゲン）、酵母の発現プラスミドまたは哺乳類の発現プラスミドにクローニングすることができる。例えば、構築したそのような組換え細菌発現プラスミドを適切な細菌（例えば大腸菌）に挿入すると、この細菌はこの組換えDNAによってコードされているポリペプチドを生産することができる。このようにして生産されたポリペプチドは組換えポリペプチドと呼ばれる。

20

##### 【0134】

本発明において「ポリペプチド」という用語は、ペプチド結合で繋がれた複数の、つまり2個以上のアミノ酸を含む1本以上の鎖からなる分子に関する。ポリペプチドは、ペプチド結合によって繋がれた9個以上のアミノ酸からなることが好ましい。

##### 【0135】

「ポリペプチドタグ」という用語はポリペプチド／タンパク質に付加されたアミノ酸配列を指し、ここで前記アミノ酸配列は、精製、検出もしくは前記ポリペプチド／タンパク質の標的化に有用なアミノ酸配列であるか、そのポリペプチド／タンパク質の物理化学的な挙動を改善するアミノ酸配列であるか、またはエフェクター機能を有するアミノ酸配列である。結合タンパク質のそれぞれのポリペプチドタグ、部分および／またはドメインは、直接またはポリペプチドリinkerを介して互いに連結していてもよい。これらのポリペプチドタグは当該分野でよく知られており、当業者であれば十分に利用できる。ポリペプチドタグの例としては、ヒス（His、例えば配列番号6のヒスタグ）、ミック（myc）、フラグ（FLAG）、またはストレプ（Strept）タグなどの短いポリペプチド配列、または前記ポリペプチド／タンパク質の検出を可能にする酵素（例えばアルカリホスファターゼのような酵素）などの部分、もしくは標的化するのに使用できる部分（例えば免疫グロブリンまたはその断片）および／またはエフェクター分子として使用できる部分がある。

30

40

##### 【0136】

「ポリペプチドリinker」という用語は、例えば、2つのタンパク質ドメイン、ポリペプチドタグとタンパク質ドメイン、タンパク質ドメインとポリエチレングリコールなどの非ポリペプチド部分、または2つの配列タグを繋ぐことができるアミノ酸配列を指す。そのような付加的なドメイン、タグ、非ポリペプチド部分およびリンカーは、関連する分野の当業者には知られている。例を一覧にしたものが、特許出願国際公開第2002/020565号の明細書中に示されている。そのようなリンカーの具体例としては、様々な長さのグリシン-セリン-リンカーやプロリン-トレオニン-リンカーがあり、好ましくは、前記リンカーの長さは2～24アミノ酸、より好ましくは前記リンカーの長さは2～16アミノ酸である。グリシン-セリン-リンカーの例を配列番号7～10に、およびプロ

50

リン - トレオニン - リンカーの例を配列番号 1 1 および 1 2 に示す。配列番号 1 1 のプロリン - トレオニン - リンカーの前および / または後に G S があることが好ましい。

【 0 1 3 7 】

「ポリマー部分」という用語は、タンパク質性のポリマー部分または非タンパク質性のポリマー部分のいずれかを指す。「タンパク質性のポリマー部分」は、安定な三次構造をとらないポリペプチドであることが好ましい。タンパク質性のポリマー部分の例としては、X T E N (登録商標) (アムニクス (A m u n i x) の登録商標; 国際公開第 2 0 0 7 / 1 0 3 5 1 5 号) ポリペプチド、または国際公開第 2 0 0 8 / 1 5 5 1 3 4 号に記載されている、プロリン、アラニンおよびセリン残基を含んでいるポリペプチドが挙げられる。そのようなタンパク質性のポリマー部分を、例えば、標準的な D N A クローニング技術によって遺伝的に融合させたポリペプチドを生成し、その後、それらを標準的に発現・精製することで、本発明の反復ドメインに共有結合することができる。「非タンパク質性のポリマー部分」とは、ポリペプチドから構成されていないポリマー部分である。非タンパク質性ポリマー部分の例としては、ヒドロキシエチルデンプン (H E S)、ポリエチレングリコール (P E G)、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が挙げられる。「ペグ化」という用語は、ペグ (P E G) 部分が、例えば本発明のポリペプチドに共有結合していることを意味する。本発明のポリマー部分の分子量は大きく変わり得る。前記ポリマー部分がポリペプチドリンカーによって反復ドメインに連結されていることが好ましい。

10

【 0 1 3 8 】

具体的な態様では、ペグ部分または他の任意の非タンパク性ポリマーを、例えば本明細書に記載するように、システインがペプチドリンカーを介して反復ドメインの N 末端または C 末端に結合している状態で、マレイミドリンカーを介してシステインチオールに結合させることができる。

20

【 0 1 3 9 】

「結合タンパク質」という用語は、さらに詳しく後述するように、1 つ以上の結合ドメイン、1 つ以上の生理活性化合物および 1 つ以上のポリマー部分を含んでいるタンパク質を指す。好ましくは、前記結合タンパク質は最大 4 つの結合ドメインを含む。さらに、そのような結合タンパク質はいずれも、結合ドメインではない付加的なタンパク質ドメイン、多量体化部分、ポリペプチドタグ、ポリペプチドリンカーおよび / またはシステイン残基を 1 つ含む場合がある。

30

【 0 1 4 0 】

「多量体化部分」の例としては、対合して機能性の免疫グロブリン F c ドメインとなる免疫グロブリンの重鎖定常領域およびロイシンジッパーまたは遊離チオールを含んでいるポリペプチド (遊離チオールは、2 つのそのようなポリペプチド間の分子間ジスルフィド結合を形成する) が挙げられる。ポリペプチドに他の部分を抱合させるために、例えば、当業者にはよく知られているマレイミド化学によって抱合させるために、システイン残基を 1 つ使用することもできる。好ましくは、前記結合タンパク質は組換え結合タンパク質である。また好ましくは、結合タンパク質の結合ドメインは異なる標的特異性を有する。

【 0 1 4 1 】

「との結合に競合する」という用語は、本発明の 2 つの異なる結合ドメインは同時に同じ標的には結合できないが、両方の結合ドメインはそれぞれ同じ標的に結合可能であることを意味している。従ってこのような 2 つの結合ドメイン同士が前記標的との結合に競合する。好ましくは、前記 2 つの競合する結合ドメインは、前記標的上の重複しているまたは同じ結合エピトープに結合する。2 つの結合ドメインが標的との結合に関して競合するか否かを決定するための方法、例えば競合的酵素結合免疫吸着検定法 (E L I S A) または競合的 S P R 測定 (例えばバイオ・ラッドのプロテオン (P r o t e O n) 装置を使った測定) は当業者によく知られている。

40

【 0 1 4 2 】

「多パラトープ性結合タンパク質」という用語は、同じ標的タンパク質にある 2 つ以上

50

の異なるエピトープに対する結合タンパク質を意味する。例えば、HER2を標的としている多パラトープ性結合タンパク質は、少なくとも、HER2の第一のエピトープを標的とする第一の結合ドメインとHER2の別の第二のエピトープを標的とする第二の結合ドメインを含み、場合により、HER2のさらなるエピトープを標的とするさらなる結合ドメインを含む。

#### 【0143】

「二パラトープ結合タンパク質」という用語は、同じ標的タンパク質に局在している2つの異なるエピトープに対する結合タンパク質を意味する。例えば、HER2を標的とする二パラトープ結合タンパク質は、少なくとも、HER2の第一のエピトープを標的とする第一の結合ドメインとHER2の別の第二のエピトープを標的とする第二の結合ドメインを含む。同様に、「二パラトープDARPin」は、同じ標的分子上の第一のエピトープに対する第一の結合ドメインと、別の第二のエピトープに対する第二の結合ドメインを含む。

#### 【0144】

「生理活性化合物」という用語は、疾患を患っている哺乳動物に使用したときに、前記疾患の性質を部分的に変化させる化合物を指す。生理活性化合物は拮抗的な性質をまたは作用性の性質を有していてもよく、また、タンパク質性の生理活性化合物である場合もまたは非タンパク質性の生理活性化合物である場合もある。そのようなタンパク質性の生理活性化合物を、例えば、標準的なDNAクロニング技術によって遺伝的に融合させたポリペプチドを生成し、その後、それらを標準的に発現・精製することで、本発明の結合ドメインに共有結合することができる。そのような非タンパク質性の生理活性化合物を、例えば、化学的手段によって、例えば本明細書に記載するように、マレイミドリンカーを介してシステインオールに結合させることで、ペプチドリンカーを介してシステインが結合ドメインのN末端またはC末端に結合している状態で、本発明の結合ドメインに共有結合することができる。タンパク質性の生理活性化合物の例としては、別個の標的特異性を有する結合ドメイン（例えば、成長因子に結合することでそれを中和する）、サイトカイン（例えばインターロイキン）、成長因子（例えばヒト成長ホルモン）、抗体およびその断片、ホルモン（例えばGLP-1）ならびに生産可能なあらゆるタンパク質性の薬剤が挙げられる。非タンパク質性の生理活性化合物の例には、毒物（例えばイムノゲン（Immunogen）社のDM1）、GPCRを標的とする低分子、抗生物質および生じ得るあらゆる非タンパク質性の薬剤がある。

#### 【0145】

「結合ドメイン」という用語は、以後で定義するように、タンパク質足場と同じ「折り畳み構造」（三次元の配置）を示し、予め決められた特性を有するタンパク質ドメインを意味する。このような結合ドメインは合理的に、最も一般的なところでは、当該分野で知られているコンビナトリアルなタンパク質改変技術によって得ることができる（ビンズら、2005、前掲文献）。例えば、予め決められた特性を有する結合ドメインは、（a）以後でさらに定義するタンパク質足場と同じ折り畳み構造を示すタンパク質ドメインの多様なコレクションを提供する工程；および（b）前記予め決められた特性を有する少なくとも1つのタンパク質ドメインを得るために、前記多様なコレクションをスクリーニングする工程および/または前記予め決められた特性を有する少なくとも1つのタンパク質ドメインを前記多様なコレクションから選抜する工程、を含む方法によって得ることができる。タンパク質ドメインの多様なコレクションは、使用されるスクリーニングおよび/または選抜の系に応じて複数の方法によって提供することができ、また、ファージディスプレイまたはリボソームディスプレイなどの当業者にはよく知られている方法の使用が含まれ得る。好ましくは、前記結合ドメインは組換え結合ドメインである。また好ましくは、前記結合ドメインは、反復タンパク質または設計反復タンパク質である。

#### 【0146】

従って、本明細書で使用する場合「結合する」という用語は、所与の標的を認識しかつ結合するが、他の標的を実質的に認識も結合もしない結合ドメインに関する。好ましくは

、本発明の意味における結合ドメインの候補としての資格を得るためには、PBS中で $10^{-7}$ M未満の平衡解離定数が必要である。

【0147】

「 $K_d$ 」という用語は平衡解離定数に関するもので、平衡解離定数とは、複合体がその構成分子に分離する場合のように、より大きな物体がより小さい化合物に可逆的に分離する（解離する）傾向を測る特定の型の平衡定数である。

【0148】

表面プラズモン共鳴（SPR）を用いた技術（例えばSPR平衡解析）または等温滴定熱量測定（ITC）などのタンパク質間相互作用の平衡解離定数を決定する方法が当業者にはよく知られている。異なる条件（例えば、塩濃度、pH）で測定すれば、測定された特定のタンパク質間相互作用の $K_d$ 値は変わる可能性がある。従って、 $K_d$ 値の測定は、標準化されたタンパク質溶液と標準化された緩衝液、例えばPBSを使って行われるのが好ましい。

【0149】

「PBS」という用語は、137mMのNaCl、10mMのリン酸および2.7mMのKClを含有し、pHが7.4のリン酸緩衝水溶液を意味する。

【0150】

「タンパク質足場」という用語は、アミノ酸の挿入、置換または欠失を多く許容することができる露出した表面を有するタンパク質を意味する。本発明の結合ドメインの生成に用いることができるタンパク質足場の例としては、抗体またはその断片（1本鎖FvもしくはFab断片など）、黄色ブドウ球菌（*Staphylococcus aureus*）由来のプロテインA、オオモンシロチョウ（*Pieris brassicae*）由来のピリン結合タンパク質もしくは他のリポカリン類、アンキリン反復タンパク質もしくは他の反復タンパク質類、およびヒトのフィブロネクチンがある。タンパク質足場は当業者に知られている（ピンズら、2005、前掲文献；ピンズら、2004、前掲文献）。

【0151】

「標的」という用語は、核酸分子、ポリペプチドもしくはタンパク質、炭水化物または他のあらゆる天然に存在する分子などの個々の分子およびそのような個々の分子の一部、または2つ以上のそのような分子の複合体を指す。標的は細胞全体または組織試料であってもよく、または標的は任意の非天然の分子もしくは部分であってもよい。好ましくは、標的は、天然に存在するもしくは非天然のポリペプチドであるか、あるいは化学修飾、例えば天然のもしくは非天然のリン酸化、アセチル化、またはメチル化による修飾を含有しているポリペプチドである。本発明の特定の用途では、標的はHER2の細胞外領域である。

【0152】

「予め決められた特性」という用語は、標的との結合、標的の遮断、標的介在性反応の活性化、酵素活性、および関連するさらなる特性などの特性を指す。所望される特性の種類によって、当業者は、所望の特性を有する結合ドメインのスクリーニングおよび/または選抜を実施するための形式およびその実施に必要な工程を確認することができる。好ましくは、前記予め決められた特性は標的との結合である。

【0153】

以降の反復タンパク質に関する定義は、特許出願である国際公開第2002/020565号に記載されている定義に基づくものである。特許出願である国際公開第2002/020565号はさらに、反復タンパク質の特徴、技術および用途の一般的な説明も含んでいる。

【0154】

「反復タンパク質」という用語は、1つ以上の反復ドメインを含んでいるタンパク質を指す。好ましくは、前記反復タンパク質はそれぞれ、4つまでの反復ドメインを含む。より好ましくは、前記反復タンパク質はそれぞれ、2つまでの反復ドメインを含む。最も好ましくは、反復タンパク質はそれぞれ、反復ドメインを1つだけ含む。さらに前記反復タ

10

20

30

40

50

ンパク質は、付加的な非反復タンパク質ドメイン、ポリペプチドタグおよび/またはポリペプチドリンカーを含んでいてもよい。

【0155】

「反復ドメイン」という用語は、2つ以上の連続した反復単位（モジュール）を構造単位として含んでいるタンパク質ドメインを指し、ここで前記構造単位はそれぞれ同じ折り畳み構造を有し、密に積み重なって、疎水性の結合コアを有する高次らせん構造を形成している。好ましくは、反復ドメインは、N末端および/またはC末端にキャッピング単位（またはモジュール）をさらに含む。一層好ましくは、前記N末端および/またはC末端のキャッピング単位（またはモジュール）はキャッピング反復である。

【0156】

「設計反復タンパク質」および「設計反復ドメイン」という用語はそれぞれ、特許出願の国際公開第2002/020565号で説明されている発明的な手順の結果として得られた反復タンパク質または反復ドメインを指す。設計反復タンパク質および設計反復ドメインは合成されたもので、天然由来のものではない。これらはそれぞれ、それに応じて設計された核酸を発現させることによって得られた人工のタンパク質またはドメインである。真核細胞または細菌細胞などの原核細胞の中で発現させるか、細胞を使わないインビトロの発現系を用いて発現させることが好ましい。従って、設計アンキリン反復タンパク質（つまりDARPin）は、少なくとも1つのアンキリン反復ドメインを含んでいる本発明の組換え結合タンパク質に相当する。

【0157】

「構造単位」という用語は、ポリペプチドのうちの局所的に構造が整っている部分を指し、これは、ポリペプチド鎖に沿って隣接している2つ以上の二次構造セグメント間の三次元的な相互作用によって形成されている。このような構造単位は構造モチーフを表している。「構造モチーフ」という用語は、少なくとも1つの構造単位中に存在する、二次構造の構成要素の三次元的な配置を指す。構造モチーフは当業者にはよく知られている。構造単位だけでは規定の三次元配置を取ることはできないが、それらが、例えば反復ドメインの中の反復モジュールとして、連続して配置されることで隣り合った単位が相互に安定化し、その結果、高次らせん構造がもたらされる。

【0158】

「反復単位」という用語は、1種以上の天然に存在する反復タンパク質の反復配列モチーフを含んでいるアミノ酸配列を指し、ここで前記「反復単位」は複数のコピーに見られ、前記モチーフの全てに共通している規定の折り畳み位相構造を示すことで、タンパク質の折り畳み構造を決定している。このような反復単位は、フォアーら（2003、前掲文献）に記載されている、反復タンパク質の「反復している構造単位（反復）」またはピンズら（2004、前掲文献）に記載されている、反復タンパク質の「連続した相同の構造単位（反復）」に相当する。このような反復単位は骨格残基と相互作用残基とを含んでいる。このような反復単位の例としては、アルマジロ反復単位、ロイシン・リッチ反復単位、アンキリン反復単位、テトラトリコペプチド反復単位、HEAT反復単位、およびロイシン・リッチ変異型反復単位が挙げられる。このような反復単位を2つ以上含有している天然に存在するタンパク質は、「天然に存在する反復タンパク質」と呼ばれる。反復タンパク質の個々の反復単位のアミノ酸配列には、それぞれを比較した場合に、有意な数の変異、置換、付加および/または欠失が入っている場合があるが、それでもなお、反復単位の基本的なパターン、すなわちモチーフを実質的に保持している。

【0159】

従って、「アンキリン反復単位」という用語は反復単位を意味し、これは、記載されている、例えばフォアーら、2003、前掲文献に記載されているアンキリン反復である。アンキリン反復は当業者によく知られている。「アンキリン反復ドメイン」という用語は、2つ以上の連続したアンキリン反復単位（モジュール）を構造単位として含み、好ましくは、N末端および/またはC末端にキャッピング単位（またはモジュール）も含む反復ドメインを指す。

10

20

30

40

50

## 【 0 1 6 0 】

「骨格残基」という用語は反復単位のアミノ酸残基、すなわち反復モジュールの相当するアミノ酸残基に関するもので、骨格残基は折り畳みの位相構造、つまり前記反復単位（またはモジュール）の折り畳み構造に寄与するか、または隣り合った単位（またはモジュール）間の相互作用に寄与する。このような寄与は反復単位（またはモジュール）中の他の残基との相互作用となるか、またはヘリックスもしくはシート、または直線状のポリペプチドもしくはループを形成している一定の長さ(stretches)のアミノ酸に見られるようなポリペプチド骨格の高次構造に影響を与えるものであり得る。

## 【 0 1 6 1 】

「標的相互作用残基」という用語は、反復単位のアミノ酸残基、すなわち反復モジュールの相当するアミノ酸残基に関するもので、これは、標的物質との相互作用に寄与するものである。このような寄与は標的物質との直接的な相互作用となるか、または直接相互作用している他の残基に、例えば反復単位（またはモジュール）のポリペプチドの高次構造を安定化し、前記標的と直接相互作用している残基の相互作用を可能にするまたは向上させることで影響を与えるものであり得る。そのような骨格残基および標的相互作用残基は、X線結晶学、NMRおよび/またはCD分光法などの物理化学的な方法によって得られたデータを解析すること、あるいは構造生物学および/またはバイオインフォマティクス分野の当業者がよく知っている既知のおよび関連する構造情報を比較することによって同定することができる。

## 【 0 1 6 2 】

反復配列モチーフの推定に用いられる反復単位は、好ましくは、同じ構造モチーフを有する反復単位で、前記反復単位の骨格残基が70%を超えて互いに相同な、相同な反復単位である。前記反復単位のうち、80%を上回る骨格残基が相同であることが好ましく、前記反復単位のうち、90%を上回る骨格残基が相同であることが最も好ましい。ポリペプチド間の相同性（パーセンテージ）を決定するためのコンピュータープログラム、例えばFastA、BLASTまたはGapが当業者に知られている。さらに好ましくは、反復配列モチーフの推定に用いられる反復単位は、規定の標的に関して選択された反復ドメインから得られる相同な反復単位である。

## 【 0 1 6 3 】

「反復配列モチーフ」という用語は、1つ以上の反復単位または反復モジュールから推定されたアミノ酸配列を指す。好ましくは、前記反復単位または反復モジュールは同じ標的に対する結合特異性を有する反復ドメインに由来するものである。そのような反復配列モチーフは、骨格残基位置と標的相互作用残基位置を含む。前記骨格残基位置は反復単位（またはモジュール）の骨格残基の位置に相当する。同様に、前記標的相互作用残基位置は、反復単位（またはモジュール）の標的と相互作用する残基の位置に相当する。反復配列モチーフは、定位置および無作為な位置を含む。「定位置」という用語は反復配列モチーフ中のアミノ酸の位置を指し、ここで前記位置には特定のアミノ酸が存在する。たいていの場合、そのような定位置は、骨格残基の位置および/または特定の標的に特異的な標的相互作用残基の位置に相当する。「無作為な位置」という用語は反復配列モチーフ中のアミノ酸の位置を指し、この場合、前記アミノ酸の位置には2種類以上のアミノ酸のいずれが存在してもよい。例えば、一般的な20種類の天然に存在するアミノ酸のいずれが存在してもよく、または20種類の天然に存在するアミノ酸の多くが、例えばシステイン以外のアミノ酸が、もしくはグリシン、システインおよびプロリン以外のアミノ酸が存在してもよい。ほとんどの場合、そのような無作為な位置は標的相互作用残基の位置に相当するが、骨格残基のいくつかの位置が無作為な場合もある。

## 【 0 1 6 4 】

「折り畳みの位相構造」という用語は、前記反復単位または反復モジュールの三次構造を指す。折り畳みの位相構造は、ヘリックスまたはシートの少なくとも一部を形成している一定の長さのアミノ酸、または直線状ポリペプチドもしくはループを形成している一定の長さのアミノ酸によって決定されるか、あるいはヘリックス、シートおよび/

10

20

30

40

50

または直線状ポリペプチド／ループの任意の組み合わせによって決定される。例えば、アンキリン反復単位／モジュールは ターン、それに続く 2 つの逆平行 ヘリックス、そして次の反復単位／モジュールのターンに達しているループからなる。

【 0 1 6 5 】

「連続した」という用語は、反復単位または反復モジュールが直列に配置されている配置を指す。設計反復タンパク質では、少なくとも 2 個、一般的には約 2 ～ 6 個、具体的には少なくとも約 6 個、しばしば 20 個以上の反復単位（またはモジュール）が連続している。ほとんどの場合、反復ドメインの反復単位同士（またはモジュール同士）は、高レベルの配列同一性（対応する位置に同じアミノ酸残基がある）または配列相同性（アミノ酸残基は異なるが、同様の物理化学的特性を有する）を示し、いくつかのアミノ酸残基は重要な残基であり、高度に保存されている。しかしながら、アミノ酸の挿入および／または欠失、および／または反復ドメインの異なる反復単位（またはモジュール）間における置換による高度な配列の変動も、その反復単位（またはモジュール）に共通の折り畳みの位相構造が維持される限りにおいて可能である。

10

【 0 1 6 6 】

X 線結晶学、NMR または CD 分光法などの物理化学的な手段によって、反復タンパク質の折り畳みに関する位相構造を直接決定するための方法は当業者によく知られている。反復単位もしくは反復配列モチーフを同定および決定するための方法、またはそのような反復単位もしくはモチーフを含んでいる関連するタンパク質のファミリーを決定および同定するための方法、例えば相同性検索（BLAST など）は、バイオインフォマティクスの分野において十分に確立されており、かつ、当該分野の当業者によく知られている。最初の反復配列モチーフを改良する工程には過程を繰り返すことが含まれる場合がある。

20

【 0 1 6 7 】

「反復モジュール」という用語は、設計反復ドメインのうちの反復しているアミノ酸配列を指し、これは元々は天然に存在する反復タンパク質の反復単位に由来するものである。反復ドメインに含まれているそれぞれの反復モジュールは、天然に存在する反復タンパク質のファミリーまたはサブファミリー、例えばアルマジロ反復タンパク質もしくはアンキリン反復タンパク質ファミリーの 1 つ以上の反復単位に由来する。さらに好ましくは、反復ドメインに含まれるそれぞれの反復モジュールは、例えば実施例 1 に記載するように、ある標的に関して選択された反復ドメインより得られた相同の反復単位から推定された反復配列モチーフを含み、かつ、同じ標的特異性を有する。

30

【 0 1 6 8 】

従って、「アンキリン反復モジュール」という用語は、元々は天然に存在するアンキリン反復タンパク質の反復単位由来の反復モジュールを意味する。アンキリン反復タンパク質は当業者によく知られている。

【 0 1 6 9 】

「反復モジュール」は、対応している反復モジュールの全コピーに存在しているアミノ酸残基が入っている位置（「定位置」）と、異なるまたは「無作為な」アミノ酸残基が存在する位置（「無作為な位置」）を含んでいてもよい。

【 0 1 7 0 】

40

「キャッピングモジュール」という用語は、反復ドメインの N 末端または C 末端の反復モジュールに融合させたポリペプチドを指し、ここで前記キャッピングモジュールは前記反復モジュールと密な三次元相互作用（つまり三次元構造相互作用）を形成し、それによって、連続した反復モジュールに接触していない側の前記反復モジュールの疎水性コアを溶媒から保護するキャップを構成している。前記 N 末端および／または C 末端キャッピングモジュールは、反復単位に隣接している天然に存在する反復タンパク質中に見られるキャッピング単位または他の構造単位であってよく、あるいはそれらに由来するものであってもよい。「キャッピング単位」という用語は、反復単位の N 末端または C 末端に融合させた特定の構造単位を規定する天然に存在する折り畳まれたポリペプチドを指し、ここで前記ポリペプチドは、前記反復単位と密な三次元構造相互作用を形成し、それによって、

50



前記反復単位の片方にある疎水性コアを溶媒から保護している。好ましくは、キャッピングモジュールまたはキャッピング単位はキャッピング反復である。「キャッピング反復」という用語は、前記隣接している反復単位（またはモジュール）と同様のもしくは同じ折り畳み構造を有する、および／または前記隣接している反復単位（またはモジュール）と同様の配列を有するキャッピングモジュールもしくはキャッピング単位を指す。キャッピングモジュールおよびキャッピング反復については国際公開第2002/020565号に、およびインターランディら、2008（前掲文献）による記載がある。

【0171】

N末端アンキリンキャッピングモジュール（つまりN末端キャッピング反復）の例としては、配列番号1、2、3、13、14、20、26、27、36、40、44、45、50、54、124、128および132が、ならびにアンキリンC末端キャッピングモジュール（つまりC末端キャッピング反復）の例としては配列番号4、5、19、24、25、33、34、35、39、43、48、49、53、57、127、131および135が挙げられる。

10

【0172】

例えば、配列番号13のN末端アンキリンキャッピングモジュールは1～32番目のアミノ酸によってコードされており、配列番号19のC末端キャッピングモジュールは99～126番目のアミノ酸によってコードされている。

【0173】

本発明による組換え結合タンパク質は少なくとも1つのアンキリン反復ドメインを含み、ここで前記アンキリン反復ドメインは哺乳類のHER2の細胞外領域に対する結合特異性を有する。

20

【0174】

「標的に対する結合特異性を有する」、「標的に特異的に結合する」または「標的特異性」などの用語は、ある結合タンパク質または結合ドメインが、PBS中で、関連のないタンパク質、例えば大腸菌の麦芽糖結合タンパク質(MBP)よりも低い平衡解離定数で標的に結合することを意味する。好ましくは、標的に対するPBS中での平衡解離定数は、対応するMBPの平衡解離定数の少なくとも10分の1、より好ましくは少なくとも100分の1、さらに好ましくは少なくとも1,000分の1、最も好ましくは少なくとも10,000分の1よりも小さい。

30

【0175】

「共通配列」という用語は、複数の反復単位を構造によっておよび／または配列によって整列することで得られるアミノ酸配列を指す。構造によっておよび／または配列によって整列させた2つ以上の反復単位を用いて、また、整列中にギャップを入れることを許容することで、各位置で最も頻度の高いアミノ酸残基を決定することが可能になる。共通配列とは、各位置で最も出現頻度の高いアミノ酸を含む配列である。同じ位置に平均より高い頻度で2個以上のアミノ酸が現れる場合には、共通配列はそれらアミノ酸の小集団を含む場合がある。前記2つ以上の反復単位は、単一の反復タンパク質に含まれる複数の反復単位から得られるものであっても、2つ以上の異なる反復タンパク質から得られるものであってもよい。

40

【0176】

共通配列およびそれらの決定方法は当業者によく知られている。

【0177】

「共通アミノ酸残基」とは、共通配列の特定に位置に見られるアミノ酸である。前記2つ以上の反復単位中に同様の確率で2個以上、例えば3、4または5個のアミノ酸残基が見られる場合には、最も高い頻度で見られるアミノ酸を、または前記2個以上のアミノ酸残基の組み合わせを共通アミノ酸とすることができる。

【0178】

天然に存在しないキャッピングモジュール、反復モジュール、結合タンパク質または結合ドメインがさらに好ましい。

50

## 【0179】

「天然に存在しない」という用語は、合成のものであることまたは天然に由来しないことを意味し、より具体的には、この用語は、人工のものであることを意味する。「天然に存在しない結合タンパク質」または「天然に存在しない結合ドメイン」という用語は、前記結合タンパク質または前記結合ドメインが合成されたもの（つまりアミノ酸を使った化学合成によって生産されたもの）または組換えられたものであり、天然に由来しないことを意味する。「天然に存在しない結合タンパク質」または「天然に存在しない結合ドメイン」はそれぞれ、それに応じて設計した核酸を発現させることで得られる人工のタンパク質またはドメインである。真核細胞または原核細胞の中で発現させるか、細胞を使わないインビトロの発現系を用いて発現させることが好ましい。この用語はさらに、前記結合タンパク質または前記結合ドメインの配列が、配列データベース、例えばジェンバンク、EMBLバンクまたはスイスプロットに非人為的な配列として登録されていないことも意味している。これらのデータベースおよび他の同様の配列データベースは当業者によく知られている。

10

## 【0180】

本発明によるアンキリン反復ドメイン、特に本発明によるアンキリン反復モジュールおよびキャッピングモジュールの基本的な修飾および誘導体。

## 【0181】

N末端またはC末端アンキリンキャッピング反復をそれぞれ含んでいるN末端またはC末端アンキリンキャッピングモジュールがさらに好ましく、ここで前記キャッピング反復中に存在する1つ以上のアミノ酸残基は、対応するアンキリンキャッピング単位またはアンキリン反復単位を整列させたときに相当する位置に見られるアミノ酸残基に置き換えられている。

20

## 【0182】

アミノ酸置換は、最も多く天然に存在する20種類のアミノ酸のいずれによる置換であってもよく、好ましくはA、D、E、F、H、I、K、L、M、N、Q、R、S、T、V、WおよびYからなる群より選択されるアミノ酸によって置き換えられ；およびより好ましくはA、D、E、H、I、K、L、Q、R、S、T、V、およびYからなる群より選択されるアミノ酸によって置き換えられる。また好ましくは、アミノ酸の置換は相同のアミノ酸によるものである。つまり、アミノ酸は類似の生物物理学的特性をもつ側鎖を有するアミノ酸によって置き換えられる。例えば、負に帯電しているアミノ酸Dは負に帯電しているアミノ酸Eで置換することができ、またはLなどの疎水性のアミノ酸はA、IまたはVで置換することができる。相同なアミノ酸によるアミノ酸置換は当業者によく知られている。

30

## 【0183】

また、配列番号4、5、19、24、25、33、34、35、39、43、48、49、53、57、127、131または135に基づく前述のC末端キャッピングモジュールのいずれかの、27番目および28番目の位置のAのアミノ酸を含んでいるC末端アンキリンキャッピングモジュールも好ましい。

## 【0184】

また、配列番号4、5、19、24、25、33、34、35、39、43、48、49、53、57、127、131または135に基づく前述のC末端キャッピングモジュールのいずれかの、1～26番目または1～27番目の位置のアミノ酸を含んでいるC末端キャッピングモジュールも好ましい。

40

## 【0185】

配列番号1、2、3、13、14、20、26、27、36、40、44、45、50、54、124、128または132の1番目のGおよび/または2番目のSアミノ酸は、その特性に何ら明白な影響を及ぼすことなく、N末端アンキリンキャッピングモジュールから除去することができる。これら2個のアミノ酸は、アンキリン反復ドメインを別のアミノ酸およびタンパク質と連結するためのリンカーとして役立つ。本発明はまた、1番

50

目のGおよび/または2番目のSが除去されているN末端アンキリンキャッピングモジュールを含んでいるそのようなアンキリン反復ドメインも含む。当然のことながら、本発明で定義したアンキリン反復ドメイン中のアミノ酸の位置(例えば「33番目」)は状況に応じて、例えば1個のアミノ酸が欠失している場合には「33番目」は「32番目」に、または、2つのアミノ酸が欠失している場合には「33番目」は「31番目」に番号が変わる。

#### 【0186】

本発明のアンキリン反復ドメインのアンキリンキャッピングモジュールを、当業者に知られているアミノ酸配列の整列、突然変異生成および遺伝子合成などの結合技術によってアンキリンキャッピングモジュールと交換することができる。例えば、(i)配列番号5の配列と整列させることで、配列番号79のC末端キャッピング反復(つまり99~126番目の配列)を決定すること、(ii)決定した配列番号79のC末端キャッピング反復の配列を、配列番号5の配列で置換すること、(iii)交換したC末端キャッピングモジュールをコードしている反復ドメインをコードしている遺伝子を生成すること、(iv)改変した反復ドメインを大腸菌の細胞質内で発現させること、および(v)改変した反復ドメインを標準的な手段によって精製することによって、配列番号79のC末端キャッピング反復を配列番号5のC末端キャッピング反復と置換することができる。別の例としては、(i)配列番号3の配列と整列させることで、配列番号79のN末端キャッピング反復(つまり1~32番目の配列)を決定すること、(ii)決定した配列番号79のN末端キャッピング反復の配列を、配列番号3の配列で置換すること、(iii)交換したN末端キャッピングモジュールをコードしている反復ドメインをコードしている遺伝子を生成すること、(iv)改変した反復ドメインを大腸菌の細胞質内で発現させること、および(v)改変した反復ドメインを標準的な手段によって精製することによって、配列番号79のN末端キャッピング反復を配列番号3のN末端キャッピング反復と置換することができる。

#### 【0187】

さらに、本発明のアンキリン反復ドメインを、N末端アンキリンキャッピングモジュール(例えば配列番号3のN末端キャッピング反復)、その後1つ以上の反復モジュール(例えば配列番号79の33~99番目のアミノ酸残基を含んでいる2つのアンキリン反復モジュール)さらにその後C末端キャッピングモジュール(例えば配列番号5のC末端キャッピング反復)を配置することで、遺伝子合成の手段によって遺伝的に構築することができる。その後、遺伝的に構築した反復ドメイン遺伝子を前述したように大腸菌内で発現させることができる。

#### 【0188】

C、MまたはNのアミノ酸を含まないアミノ酸配列を有する組換え結合タンパク質、反復ドメイン、反復モジュール、N末端キャッピングモジュールまたはC末端キャッピングモジュールがさらに好ましい。

#### 【0189】

Nのアミノ酸の次にGが存在しないアミノ酸配列を有する組換え結合タンパク質、反復ドメイン、反復モジュール、N末端キャッピングモジュールまたはC末端キャッピングモジュールがさらに好ましい。

#### 【0190】

そのようなN末端またはC末端キャッピングモジュールのいずれかを含んでいる組換え結合タンパク質または反復ドメインがさらに好ましい。

#### 【0191】

本発明によるアンキリン反復ドメインを含んでいる組換え結合タンパク質のさらに好ましい態様では、前記反復ドメインのN末端キャッピングモジュールに含まれている1つ以上のアミノ酸残基が、N末端キャッピング単位を整列させた場合に対応する位置に見られるアミノ酸残基で交換されている。好ましくは、30%までのアミノ酸残基が交換されており、より好ましくは20%まで、一層好ましくは10%までのアミノ酸残基が交換され

ている。そのようなN末端キャッピング単位が天然に存在するN末端キャッピング単位であることが最も好ましい。

【0192】

本発明によるアンキリン反復ドメインを含んでいる組換え結合タンパク質のさらに好ましい態様では、前記反復ドメインのC末端キャッピングモジュールに含まれている1つ以上のアミノ酸残基が、C末端キャッピング単位を整列させた場合に対応する位置に見られるアミノ酸残基で交換されている。好ましくは30%までのアミノ酸残基が交換されており、より好ましくは20%まで、一層好ましくは10%までのアミノ酸残基が交換されている。そのようなC末端キャッピング単位が天然に存在するC末端キャッピング単位であることが最も好ましい。

10

【0193】

その上さらに別の特定の態様では、30%までのアミノ酸残基、より好ましくは20%まで、一層好ましくは10%までのアミノ酸残基が、反復単位、N末端キャッピング単位、またはC末端キャッピング単位に対応する位置に見られないアミノ酸で交換されている。

【0194】

本発明によるアンキリン反復ドメインを含んでいる組換え結合タンパク質のさらに好ましい態様では、前記アンキリン反復ドメインの反復モジュールに含まれている1つ以上のアミノ酸残基が、反復単位を整列させた時に対応する位置に見られるアミノ酸残基で交換されている。好ましくは30%までのアミノ酸残基が交換されており、より好ましくは20%まで、一層好ましくは10%までのアミノ酸残基が交換されている。そのような反復単位が天然に存在する反復単位であることが最も好ましい。

20

【0195】

その上さらに別の特定の態様では、30%までのアミノ酸残基、より好ましくは20%まで、一層好ましくは10%までのアミノ酸残基が、反復単位に対応する位置に見られないアミノ酸で交換されている。

【0196】

さらなる態様では、本明細書に記載の組換えHER2結合タンパク質またはドメインをいずれも、1つ以上の付加的な部分、例えば、異なる標的に結合して二重特異性結合剤を作り出す部分、生理活性化合物、標識部分（例えばフルオレセインなどの蛍光標識または放射性追跡子）、タンパク質の精製を促進する部分（例えばヒスタグまたはストレプタグなどの小さいペプチドタグ）、治療効果を改善するためのエフェクター機能をもたらす部分（例えば抗体依存性細胞介在性細胞傷害作用をもたらすための抗体のFc部分、緑膿菌（*Pseudomonas aeruginosa*）外毒素A（ETA）などの有毒なタンパク質部分またはメイタンシノイドもしくはDNAアルキル化剤などの低分子毒物）または薬物動態を向上させる部分などに共有結合させることができる。薬物動態の向上は、認知されている治療の必要性に応じて評価することができる。可能であれば、投与後にタンパク質が利用可能な状態で血清中に維持される時間を長くすることで、生物学的利用能が高まることおよび/または投与間隔が長くなることが望まれることが多い。時には、タンパク質の血清濃度の経時的な持続性を改善する（例えば、タンパク質の血清濃度について、投与直後の濃度と次の投与直前の濃度との差を小さくする）ことが望まれる。血中からのタンパク質の排出を遅くする傾向のある部分としては、ヒドロキシエチルデンプン（HES）、ポリエチレングリコール（PEG）、糖類（例えばシアル酸）、耐用性の高いタンパク質部分（例えばFc断片または血清アルブミン）、および結合ドメインまたは大量の血清タンパク質、例えば抗体のFc断片もしくは血清アルブミンに対する特異性および親和性を有するペプチドが挙げられる。血清アルブミンに対して親和性を有するそのような結合ドメインまたは反復ドメインの例が国際公開第2012/069654号に挙げられている。本発明の組換え結合タンパク質を、哺乳動物中での（例えばマウス、ラット、またはヒトでの）ポリペプチドの排出速度を、未改変ポリペプチドの3分の1よりも低下させる部分と結合させてもよい。

30

40

50

## 【 0 1 9 7 】

特定の一態様において本発明は、H E R 2 に結合する第一の反復ドメイン、H E R 2 に結合する第二の反復ドメインを含み、さらに、ヒト血清アルブミンに特異的に結合するアンキリン反復ドメインを1つ以上含んでいる組換え結合タンパク質に関する。H E R 2 に対する特異性を有する反復ドメインの例を本明細書に記載しており、また、ヒト血清アルブミンに対する特異性を有するアンキリン反復ドメインの例は国際公開第2 0 1 2 / 0 6 9 6 5 4 号に記載されている。このようなドメイン同士を当業者には知られている方法によって、ポリペプチドリンカーを使った遺伝的な手段で連結させることができる。

## 【 0 1 9 8 】

別の好ましい態様は組換え結合タンパク質であり、ここで第一の反復ドメインと第二の反復ドメインはH E R 2 に対する結合特異性を有し、H E R 2 との結合に関与する内部反復モジュールを1つ、2つ、3つまたはそれ以上含んでいるアンキリン反復ドメインである。好ましくは、そのようなアンキリン反復ドメインはN末端キャッピングモジュール、1～4個の内部反復モジュール、およびC末端キャッピングモジュールを含む。好ましくは、前記キャッピングモジュールはキャッピング反復である。また好ましくは、前記キャッピングモジュールはH E R 2 との結合に関与する。

## 【 0 1 9 9 】

さらに、前述した医薬組成物はいずれも、障害の治療に関して検討される。

## 【 0 2 0 0 】

本発明はさらに、治療方法を提供する。この方法は、それを必要とする患者に、治療上有効量の本発明の組換え結合タンパク質を投与することを含む。

## 【 0 2 0 1 】

さらに、それを必要とする患者に有効量の前述した医薬組成物を投与することを含む、ヒトなどの哺乳動物における病理学的状態の治療方法についても検討する。

## 【 実施例 】

## 【 0 2 0 2 】

これ以後に開示する出発材料および試薬は全て当業者には知られているものであり、市販されているか、またはよく知られている技術によって準備することができる。

## 【 0 2 0 3 】

## 材料

化学物質はフルカ ( F l u k a 、スイス ) から、オリゴヌクレオチドはマイクロシンス ( M i c r o s y n t h 、スイス ) から購入した。特に明記しない限り、DNAポリメラーゼ、制限酵素および緩衝液はニューイングランドバイオラボ ( N e w E n g l a n d B i o l a b s 、米国 ) またはフェルメンタス ( F e r m e n t a s 、リトアニア ) より購入した。クローニングおよびタンパク質の産生には、大腸菌 X L 1 - ブルー ( ストラタジーン、米国 ) または B L 2 1 ( ノバジェン、米国 ) 株を用いた。組換えヒト H E R 2 外部ドメイン ( 標準的な手段によって C H O 細胞内で産生された E r b B 2 S 2 2 - N 5 3 0 - フラグおよび E r b B 2 S 2 2 - E 6 4 5 - フラグ ) は豪州科学産業研究機構 ( C S I R O 、オーストラリア ) から購入した。ビオチン化 H e r 2 外部ドメインは、標準的なビオチン化試薬と方法 ( ピアス、米国 ) により、ビオチン部分をタンパク質の一级アミンにカップリングさせることで化学的に得た。細胞株は、L G C / A T C C ( フランス / 米国 ; カタログ番号 : B T 4 7 4 - H T B - 2 0 、 S K B R - 3 - H T B - 3 0 、 N C I - N 8 7 - C R L 5 8 2 2 、 Z R 7 5 - 3 0 - C R L 1 5 0 4 、 H C C 1 4 1 9 - C R L 2 3 2 6 、 M D A - M B 1 7 5 V I I - H T B - 2 5 ) から購入した。細胞用培地はインビトロジェン / ルビオ ( L u b i o 、スイス ) から、ウシ胎仔血清は P A A から、細胞増殖検出用、細胞増殖 E L I S A 用、B r d U 用 ( 発色 ) ( カタログ番号 1 1 6 4 7 2 2 9 0 0 ) の検定試薬はロシュ ( スイス ) から、アポトーシス検出用の検定試薬、カスパーゼ G l o 3 / 7 ( カタログ番号 G 8 0 9 1 ) はプロメガおよびスイスから、ならびに細胞死検出用 E L I S A P L U S システム ( 1 1 7 7 4 4 2 5 0 0 1 ) はロシュ ( スイス ) から、細胞のトランスフェクション用試薬、リポフェクタミン 2 0 0 0 ( 1 1

10

20

30

40

50

668027)はインビトロジェン(スイス)から得た。FACS分析はベクトン・ディッキンソン社(スイス)のFACS Canto IIシステムを用いて行った。DARPinのHer2との結合は、抗ペンタ-ヒス・アレクサフルオロ647(anti-Penta-His Alexa Fluor 647)抱合体(カタログ番号A21445; ルビオ、スイス)を用いて検出した。アクターゼ(Accutase、カタログ番号:L-11-007)はPAAから、トラスツズマブはカントナル・アポティーケ・チューリッヒ(Kantonal Apotheke Zurich)から購入し、ベルツズマブはエビトラ(Evitra、スイス)で合成した。GFP-タグ化Her2(GFP-tagged Her2)用の発現ベクターはオリジーン(Origene、米国、カタログ番号RG212583)から得た。

10

#### 【0204】

##### 分子生物学

特に明記しない限り、方法は記載されている手法に従って実施される(サンプルックJ.、フリッチE.F.およびマニアティST.、分子クローニング:実験の手引き(Molecular Cloning: A Laboratory Manual)コールド・スプリング・ハーバー研究所、1989、ニューヨーク)。

#### 【0205】

##### 増殖解析

DARPinが細胞の増殖に及ぼす影響を、BrdU標識(BrdU、細胞増殖用ELISA、ロシュ)を使ってDNAの合成を測定することで決定した。簡単に説明すると、96ウェルプレートの1ウェルごとに、100 $\mu$ lの完全培地に入れた10000個のBT474細胞を播種し、24時間インキュベートした。DARPinおよび基準物質を加えてさらに72時間インキュベートした。細胞標識用のBrdUを加え、最後、24時間インキュベートした。標識された(増殖している)細胞を製造業者による手順に従って検出した。データは、X軸には対数で濃度を、Y軸には吸光度(OD 450-602nm)をプロットするグラフパッド・プリズム(GraphPad prism)ソフトウェアを使って解析した。非線形回帰フィッティングを使ってデータを当てはめた(ログ(拮抗剤)対反応-変化のある勾配(4指標))。

20

#### 【0206】

##### アポトーシス解析

DARPinによるアポトーシスの誘導を、カスパーゼ3/7-Gloシステム(プロメガ、スイス)を使ってカスパーゼ3/7の活性化を測定することで決定した。簡単に説明すると、96ウェルプレートの1ウェルごとに、100 $\mu$ lの完全培地に入れた10000個のBT474細胞を播種し、24時間インキュベートした。DARPinおよび基準物質を加えてさらに24時間インキュベートした。カスパーゼGlo試薬を、製造業者による手順に従って1時間加えた。ルシフェラーゼ活性を測定することでカスパーゼ3/7の活性化を監視した。

30

#### 【0207】

あるいは、アポトーシスの誘導を細胞死検出用のELISAPLUSシステム(ロシュ、スイス)を使用して決定した。アッセイは、製造業者による手順に従って行った。細胞数およびインキュベーション時間はカスパーゼGloの測定と同様にした。

40

#### 【0208】

データは、X軸に濃度を、Y軸に吸光度(OD 405/490nm)またはY軸にRLUにプロットするグラフパッド・プリズムソフトウェアを使って解析した。非線形回帰フィッティングを用いてデータを当てはめた(ログ(アゴニスト)対反応-変化のある勾配(4指標))。

#### 【0209】

##### 設計アンキリン反復タンパク質のライブラリー

設計アンキリン反復タンパク質のライブラリーを生成するための方法については記載がある(国際公開第2002/020565号;ピンズら、2003、前掲文献;ピンズら

50

、2004、前掲文献)。そのような方法により、無作為化したアンキリン反復モジュールおよび/または無作為化したキャッピングモジュールを有する設計アンキリン反復タンパク質のライブラリーを構築することができる。従って、例えばそのようなライブラリーは、決まったN末端キャッピングモジュール(例えば配列番号2のN末端キャッピングモジュール)または配列番号60の配列モチーフに従って無作為化したN末端キャッピングモジュール、配列番号58もしくは59の配列モチーフに従って無作為化した1つ以上の反復モジュール、および決まったC末端キャッピングモジュール(例えば配列番号5のC末端キャッピングモジュール)または配列番号61の配列モチーフに従って無作為化したC末端キャッピングモジュールを用いて構築してもよい。そのようなライブラリーは、好ましくは、反復またはキャッピングモジュールの無作為な位置に、C、G、M、N(G残基の前のN)またはPアミノ酸を含まないように構築される。加えて、配列番号58もしくは59の配列モチーフに従って無作為化した反復モジュールは、10番目および/または17番目の位置をさらに無作為化してもよく;配列番号60の配列モチーフに従って無作為化したN末端キャッピングモジュールは7番目および/または9番目の位置をさらに無作為化してもよく;および、配列番号61の配列モチーフに従って無作為化したC末端キャッピングモジュールは10、11および/または17番目の位置をさらに無作為化してもよい。

#### 【0210】

さらに、そのようなライブラリーに含まれているそのような無作為化したモジュールには、アミノ酸の無作為な位置を有するポリペプチドループがさらに挿入されている場合がある。そのような挿入されているポリペプチドループの例としては、抗体の補体決定領域(CDR)ループのライブラリーまたはデノボで合成されたペプチドのライブラリーが挙げられる。例えば、そのようなループ挿入物は、ヒトリボヌクレアーゼLのN末端アンキリン反復ドメインの構造を手本として利用することで設計してもよい(タナカN.、ナカニシM、クサカベY、ゴトウY.、キタデY、ナカムラK.T.、EMBO J. 23(30)、3929~3938、2004)。2つのアンキリン反復の境界近くに存在するターンに10個のアミノ酸が挿入されているこのアンキリン反復ドメインと同様、アンキリン反復タンパク質ライブラリーでも、アンキリン反復ドメインのターンの1つ以上に、様々な長さの(例えば1~20アミノ酸の)無作為化されたループ(定位置と無作為な位置を含む)が挿入される場合がある。

#### 【0211】

そのようなアンキリン反復タンパク質ライブラリーのN末端キャッピングモジュールはいずれも、好ましくは、RI L L A Aモチーフ(例えば、配列番号65の21~26番目にあるモチーフ)の代わりにRE L L K AまたはRI L K A Aモチーフを有し、そのようなアンキリン反復タンパク質ライブラリーのC末端キャッピングモジュールはいずれも、好ましくは、K L Nモチーフ(例えば、配列番号65の最後の3アミノ酸)の代わりにK A AまたはK L Aモチーフを有する。

#### 【0212】

そのようなアンキリン反復タンパク質ライブラリーは、標的と相互作用する、既知のアンキリン反復ドメインの構造を手本として設計することができる。そのような構造の例としては、タンパク質データバンク(Protein Data Bank、PDB)でのそれらの固有の受入番号または識別コード(PDB-ID)で同定される、1WDY、3V31、3V30、3V2X、3V2O、3UXG、3TWQ-3TWX、1N11、1S70および2ZGDがある。

#### 【0213】

N2CおよびN3C設計アンキリン反復タンパク質ライブラリーなどの設計アンキリン反復タンパク質ライブラリーの例については記載がある(国際公開第2002/020565号;ピンズら、2003、前掲文献;ピンズら、2004、前掲文献)。N2CおよびN3Cの中の数字は、N末端キャッピングモジュールとC末端キャッピングモジュールとの間に存在する無作為化された反復モジュールの数を表している。

## 【0214】

反復単位およびモジュール内部の位置を定義するには、ピンズら、2004（前掲文献）に基づく命名法を、アンキリン反復モジュールとアンキリン反復単位の境界を1番目のアミノ酸にずらすという変更を加えて用いた。例えば、ピンズら、2004（前掲文献）のアンキリン反復モジュールの1番目は、本開示のアンキリン反復モジュールの2番目に対応し、その結果、ピンズら、2004（前掲文献）のアンキリン反復モジュールの33番目は、本開示では、次のアンキリン反復モジュールの1番目に対応する。

## 【0215】

DNAの配列は全て配列決定によって確認し、また、記載の全タンパク質について計算した分子量は、質量分析によって確認した。

10

## 【0216】

実施例1：HER2に対する結合特異性を有するアンキリン反復ドメインを含んでいる結合タンパク質の選抜

リボソームディスプレイ（ヘインズJ．およびブルクスンA．、PNAS 94、4937～42、1997）により、HER2の外部ドメインに対する結合特異性を有する多数の設計アンキリン反復タンパク質（DARPin）を、ピンズら、2004（前掲文献）によって記載されているように、DARPinライブラリーから選抜した。粗抽出物を使ったELISA（以後を参照のこと）により、それらの結合特異性を評価した。ELISAの結果は、数百ものHER2 - 特異的結合タンパク質が選抜されたことを示している。ニパレートDARPinがBT474細胞の増殖を阻害するその能力を試験することによって、選抜したクローンのHER2特異的な増殖阻害およびアポトーシスの誘導を測定した。

20

## 【0217】

例えば、配列番号62～82、112～121のアンキリン反復ドメインは、HER2に対する結合特異性を有するアンキリン反復ドメインを含んでいる選抜された結合タンパク質のアミノ酸配列である。HER2に対する結合特異性を有するそのようなアンキリン反復ドメイン由来の個別のアンキリン反復モジュールを、配列番号15～18、21～23、28～32、37、38、41、42、46、47、51、52、55、56、125、126、129、130、133および134に示す。HER2に対する結合特異性を有するそのようなアンキリン反復ドメインの個々のキャッピングモジュールを、配列番号13、14、19、20、24～27、33～36、39、40、43～45、48～50、53、54、57、124、127、128、131、132および135に示す。

30

## 【0218】

リボソームディスプレイによるHER2特異的アンキリン反復タンパク質の選抜

HER2特異的アンキリン反復タンパク質の選抜を、標的タンパク質としてのヒトHER2と前述の設計アンキリン反復タンパク質のライブラリーを用い、確立されている手法（ザードC．、アムシュトゥツP．およびブルクスンA．、Nat. Methods 4、69～79、2007）を用いたリボソームディスプレイ（ヘインズおよびブルクスン、前掲文献）によって行った。選抜の過程をそれぞれ1巡した後には、結合剤の濃縮に起因する収率に合わせて、逆転写（RT）-PCRのサイクル数を常に45回から30回に減らした。選抜の最初の4巡では、標準的なリボソームディスプレイによる選抜を行った。このとき、1巡目から4巡目にかけて標的濃度を下げ、かつ、洗浄の強度を上げることで、選択圧を高めていった（ピンズら、2004、前掲文献）。高親和性の抗HER2 DARPinを濃縮するために、4巡目の標準的なリボソームディスプレイ選抜（前記）から選抜されたものを、選抜強度の高い解離速度選抜（ザード、2007、前掲文献）に供した。標準的な選抜過程の最後の一巡を実施して、解離速度に関して選抜されてきた結合タンパク質を増幅・回収した。

40

## 【0219】

粗抽出物を使ったELISAで示される、HER2に特異的に結合するクローンの選抜

50



DARPinを発現している大腸菌の粗抽出物を使った標準的な手法による酵素結合免疫吸着検定 (ELISA) で、HER2の外部ドメインに特異的に結合する個々の選抜したDARPinを同定した。リボソームディスプレイで選抜したDARPinを、pQE30 (キアゲン) 発現ベクターにクローニングし、大腸菌XL1-ブルー株 (ストラタジーン) に形質転換し、その後、1mlの成長培地 (1%のグルコースと100 µg/mlのアンプシリンを含有している2YT) を入れた96ウェルの深型プレート中、37で一晩生育させた (それぞれのクローンを1つのウェルに入れた)。新しい96ウェルの深型プレートに、100 µlの一晩培養と、1mlの新しい2YT (50 µg/mlアンプシリン含有) を接種した。37で2時間インキュベートした後、IPTG (最終濃度1 mM) で発現を誘導し、3時間継続した。細胞を回収し、100 µlのB-PER II (ピアス) に再懸濁して、撹拌しながら室温で15分間インキュベートした。その後、900 µlのPBS-T (0.25%のカゼイン加水分解物、0.1%のツイーン20 (登録商標) を追加したPBS、pH7.4) を加え、遠心分離して細胞残渣を取り除いた。溶解したクローン100 µlをそれぞれ、ビオチン部分で固定したHER2または無関係のMBPのいずれかが入った、ニュートラアビジンでコーティングしてあるマキシソープ (Maxisorp) プレートのウェルにいれ、室温で1時間インキュベートした。PBS-T (0.1%のツイーン20 (登録商標) を追加したPBS、pH7.4) で長く洗浄した後、モノクローナル西洋わさび標識抗RGS (His)<sub>4</sub>抗体 (34650、キアゲン) を使った標準的なELISAの手順でプレートを展開し、その後、POD基質 (ロシュ) で結合を検出した。呈色を405 nmで測定した。このような細胞の粗抽出物を使ったELISAによって数百個のクローンをスクリーニングした結果、HER2に対する特異性を有する100を上回る種々のDARPinが明らかになった。これらの結合タンパク質をさらなる解析に用いた。HER2の外部ドメインに特異的に結合する選抜したアンキリン反復ドメインのアミノ酸配列の例を、配列番号62~82および112~121に示す。

#### 【0220】

これらのHER2に対する結合特異性を有するアンキリン反復ドメインと、HER2に対する結合特異性をもたない陰性対照のアンキリン反復ドメイン (つまり配列番号111) を、後述するように、単純なタンパク質の精製を促進するためのN末端ヒス-タグを提供するpQE (キアゲン、ドイツ) を基礎とする発現ベクターにクローニングした。従っ

DARPin # 1 (配列番号62、そのN末端にヒス-タグ (配列番号6) を融合させたもの) ;

DARPin # 2 (配列番号63、そのN末端にヒス-タグ (配列番号6) を融合させたもの) ;

DARPin # 3 (配列番号64、そのN末端にヒス-タグ (配列番号6) を融合させたもの) ;

DARPin # 5 (配列番号66、そのN末端にヒス-タグ (配列番号6) を融合させたもの) ;

DARPin # 6 (配列番号67、そのN末端にヒス-タグ (配列番号6) を融合させたもの) ;

DARPin # 7 (配列番号68、そのN末端にヒス-タグ (配列番号6) を融合させたもの) ;

DARPin # 8 (配列番号69、そのN末端にヒス-タグ (配列番号6) を融合させたもの) ;

DARPin # 9 (配列番号70、そのN末端にヒス-タグ (配列番号6) を融合させたもの) ;

DARPin # 10 (配列番号71、そのN末端にヒス-タグ (配列番号6) を融合させたもの) ;

DARPin # 11 (配列番号72、そのN末端にヒス-タグ (配列番号6) を融合させ

たもの) ;

D A R P i n # 1 2 ( 配列番号 7 3、その N 末端にヒス - タグ ( 配列番号 6 ) を融合させたもの) ;

D A R P i n # 1 3 ( 配列番号 7 4、その N 末端にヒス - タグ ( 配列番号 6 ) を融合させたもの) ;

D A R P i n # 1 4 ( 配列番号 7 5、その N 末端にヒス - タグ ( 配列番号 6 ) を融合させたもの) ;

D A R P i n # 1 5 ( 配列番号 7 6、その N 末端にヒス - タグ ( 配列番号 6 ) を融合させたもの) ;

D A R P i n # 1 6 ( 配列番号 7 7、その N 末端にヒス - タグ ( 配列番号 6 ) を融合させたもの) ; 10

D A R P i n # 1 7 ( 配列番号 7 8、その N 末端にヒス - タグ ( 配列番号 6 ) を融合させたもの) ;

D A R P i n # 1 8 ( 配列番号 7 9、その N 末端にヒス - タグ ( 配列番号 6 ) を融合させたもの) ;

D A R P i n # 1 9 ( 配列番号 8 0、その N 末端にヒス - タグ ( 配列番号 6 ) を融合させたもの) ;

D A R P i n # 2 0 ( 配列番号 8 1、その N 末端にヒス - タグ ( 配列番号 6 ) を融合させたもの) ;

D A R P i n # 2 1 ( 配列番号 8 2、その N 末端にヒス - タグ ( 配列番号 6 ) を融合させたもの) ; 20

D A R P i n # 5 0 ( 配列番号 1 1 1、その N 末端にヒス - タグ ( 配列番号 6 ) を融合させたもの) ;

D A R P i n # 5 1 ( 配列番号 1 1 2、その N 末端にヒス - タグ ( 配列番号 6 ) を融合させたもの) ;

D A R P i n # 5 2 ( 配列番号 1 1 3、その N 末端にヒス - タグ ( 配列番号 6 ) を融合させたもの) ;

D A R P i n # 5 3 ( 配列番号 1 1 4、その N 末端にヒス - タグ ( 配列番号 6 ) を融合させたもの) ;

D A R P i n # 5 4 ( 配列番号 1 1 5、その N 末端にヒス - タグ ( 配列番号 6 ) を融合させたもの) ; 30

D A R P i n # 5 5 ( 配列番号 1 1 6、その N 末端にヒス - タグ ( 配列番号 6 ) を融合させたもの) ;

D A R P i n # 5 6 ( 配列番号 1 1 7、その N 末端にヒス - タグ ( 配列番号 6 ) を融合させたもの) ;

D A R P i n # 5 7 ( 配列番号 1 1 8、その N 末端にヒス - タグ ( 配列番号 6 ) を融合させたもの) ;

D A R P i n # 5 8 ( 配列番号 1 1 9、その N 末端にヒス - タグ ( 配列番号 6 ) を融合させたもの) ;

D A R P i n # 5 9 ( 配列番号 1 2 0、その N 末端にヒス - タグ ( 配列番号 6 ) を融合させたもの) ; 40

D A R P i n # 6 0 ( 配列番号 1 2 1、その N 末端にヒス - タグ ( 配列番号 6 ) を融合させたもの) ;

【 0 2 2 1 】

選抜した二パラトープアンキリン反復タンパク質のアミノ酸配列の例を配列番号 8 3 ~ 1 1 0、1 2 2、1 2 3、および 1 3 6 ~ 1 4 1 に示す。これらの二パラトープ D A R P i n を、後述するように、単純なタンパク質の精製を促進するための N 末端ヒス - タグを提供する、p Q E ( キアゲン、ドイツ ) を基礎とする発現ベクターにクローニングした。従って、以下の D A R P i n をコードしている発現ベクターが構築された。

D A R P i n # 2 2 ( 配列番号 8 3、その N 末端にヒス - タグ ( 配列番号 6 ) を融合さ 50

せたもの) ;  
 D A R P i n # 2 3 ( 配列番号 8 4、その N 末端にヒス - タグ ( 配列番号 6 ) を融合させ  
 たもの) ;  
 D A R P i n # 2 4 ( 配列番号 8 5、その N 末端にヒス - タグ ( 配列番号 6 ) を融合させ  
 たもの) ;  
 D A R P i n # 2 5 ( 配列番号 8 6、その N 末端にヒス - タグ ( 配列番号 6 ) を融合させ  
 たもの) ;  
 D A R P i n # 2 6 ( 配列番号 8 7、その N 末端にヒス - タグ ( 配列番号 6 ) を融合させ  
 たもの) ;  
 D A R P i n # 2 7 ( 配列番号 8 8、その N 末端にヒス - タグ ( 配列番号 6 ) を融合させ 10  
 たもの) ;  
 D A R P i n # 2 8 ( 配列番号 8 9、その N 末端にヒス - タグ ( 配列番号 6 ) を融合させ  
 たもの) ;  
 D A R P i n # 2 9 ( 配列番号 9 0、その N 末端にヒス - タグ ( 配列番号 6 ) を融合させ  
 たもの) ;  
 D A R P i n # 3 0 ( 配列番号 9 1、その N 末端にヒス - タグ ( 配列番号 6 ) を融合させ  
 たもの) ;  
 D A R P i n # 3 1 ( 配列番号 9 2、その N 末端にヒス - タグ ( 配列番号 6 ) を融合させ  
 たもの) ;  
 D A R P i n # 3 2 ( 配列番号 9 3、その N 末端にヒス - タグ ( 配列番号 6 ) を融合させ 20  
 たもの) ;  
 D A R P i n # 3 3 ( 配列番号 9 4、その N 末端にヒス - タグ ( 配列番号 6 ) を融合させ  
 たもの) ;  
 D A R P i n # 3 4 ( 配列番号 9 5、その N 末端にヒス - タグ ( 配列番号 6 ) を融合させ  
 たもの) ;  
 D A R P i n # 3 5 ( 配列番号 9 6、その N 末端にヒス - タグ ( 配列番号 6 ) を融合させ  
 たもの) ;  
 D A R P i n # 3 6 ( 配列番号 9 7、その N 末端にヒス - タグ ( 配列番号 6 ) を融合させ  
 たもの) ;  
 D A R P i n # 3 7 ( 配列番号 9 8、その N 末端にヒス - タグ ( 配列番号 6 ) を融合させ 30  
 たもの) ;  
 D A R P i n # 3 8 ( 配列番号 9 9、その N 末端にヒス - タグ ( 配列番号 6 ) を融合させ  
 たもの) ;  
 D A R P i n # 3 9 ( 配列番号 1 0 0、その N 末端にヒス - タグ ( 配列番号 6 ) を融合さ  
 せたもの) ;  
 D A R P i n # 4 0 ( 配列番号 1 0 1、その N 末端にヒス - タグ ( 配列番号 6 ) を融合さ  
 せたもの) ;  
 D A R P i n # 4 1 ( 配列番号 1 0 2、その N 末端にヒス - タグ ( 配列番号 6 ) を融合さ  
 せたもの) ;  
 D A R P i n # 4 2 ( 配列番号 1 0 3、その N 末端にヒス - タグ ( 配列番号 6 ) を融合さ 40  
 せたもの) ;  
 D A R P i n # 4 3 ( 配列番号 1 0 4、その N 末端にヒス - タグ ( 配列番号 6 ) を融合さ  
 せたもの) ;  
 D A R P i n # 4 4 ( 配列番号 1 0 5、その N 末端にヒス - タグ ( 配列番号 6 ) を融合さ  
 せたもの) ;  
 D A R P i n # 4 5 ( 配列番号 1 0 6、その N 末端にヒス - タグ ( 配列番号 6 ) を融合さ  
 せたもの) ;  
 D A R P i n # 4 6 ( 配列番号 1 0 7、その N 末端にヒス - タグ ( 配列番号 6 ) を融合さ  
 せたもの) ;  
 D A R P i n # 4 7 ( 配列番号 1 0 8、その N 末端にヒス - タグ ( 配列番号 6 ) を融合さ 50

せたもの) ;

D A R P i n # 4 8 ( 配列番号 1 0 9、そのN末端にヒス - タグ ( 配列番号 6 ) を融合させたもの) ;

D A R P i n # 4 9 ( 配列番号 1 1 0、そのN末端にヒス - タグ ( 配列番号 6 ) を融合させたもの) ;

D A R P i n # 6 1 ( 配列番号 1 2 2、そのN末端にヒス - タグ ( 配列番号 6 ) を融合させたもの) ;

D A R P i n # 6 2 ( 配列番号 1 2 3、そのN末端にヒス - タグ ( 配列番号 6 ) を融合させたもの) ;

D A R P i n # 6 3 ( 配列番号 1 3 6、そのN末端にヒス - タグ ( 配列番号 6 ) を融合させたもの) ;

D A R P i n # 6 4 ( 配列番号 1 3 7、そのN末端にヒス - タグ ( 配列番号 6 ) を融合させたもの) ;

D A R P i n # 6 5 ( 配列番号 1 3 8、そのN末端にヒス - タグ ( 配列番号 6 ) を融合させたもの) ;

D A R P i n # 6 6 ( 配列番号 1 3 9、そのN末端にヒス - タグ ( 配列番号 6 ) を融合させたもの) ;

D A R P i n # 6 7 ( 配列番号 1 4 0、そのN末端にヒス - タグ ( 配列番号 6 ) を融合させたもの) ;

D A R P i n # 6 8 ( 配列番号 1 4 1、そのN末端にヒス - タグ ( 配列番号 6 ) を融合させたもの)。

#### 【 0 2 2 2 】

一価 D A R P i n の高レベルかつ可溶性での発現

さらなる解析のために、D A R P i n # 1 ~ 5 0 を大腸菌の B L 2 1 または X L 1 - ブルー細胞中で発現させ、そのヒスタグを利用して、標準的な手法によって精製した。静置一晚培養を 2 5 m l ( L B、1 % グルコース、1 0 0 m g / l のアンピシリン ; 3 7 ) を、1 リットル培養 ( 同培地 ) に接種した。6 0 0 n m の吸光度が 0 . 7 になった時点で、この培養を I P T G ( 0 . 5 m M ) で誘導し、3 7 で 4 ~ 5 時間インキュベートした。培養を遠心し、得られた沈殿物を 4 0 m l の T B S 5 0 0 ( 5 0 m M の T r i s - H C l、5 0 0 m M の N a C l、p H 8 ) に再懸濁し、超音波処理した。溶解物を再度遠心し、得られた上清にグリセロール ( 最終濃度 1 0 体積 % ) とイミダゾール ( 最終濃度 2 0 m M ) を加えた。タンパク質をニッケル - ニトリロ三酢酸カラム ( カラム容積 2 . 5 m l ) に負荷し、製造業者の説明 ( キアゲン、ドイツ ) に従って精製した。あるいは、6 × ヒス - タグを欠いた D A R P i n または選抜した反復ドメインは、標準的な樹脂と当業者に知られている手法による陰イオン交換クロマトグラフィーと、その後のサイズ排除クロマトグラフィーによって精製した。大腸菌の 1 リットル培養から最大 2 0 0 m g の高度に可溶化された、H E R 2 に対する結合特異性を有する D A R P i n を、9 5 % を超える純度で ( S D S - 1 5 % P A G E で予測 ) 精製することができる。このような精製した D A R P i n を以降の解析に使用する。

#### 【 0 2 2 3 】

実施例 2 : H E R 2 に対する結合特異性を有する D A R P i n の表面プラズモン共鳴解析による解析

関心のもたれる精製した H E R 2 結合 D A R P i n のタンパク質結合動態を、プロテオン ( P r o t e O n ) アレイシステム ( バイオラッド ) を使った表面プラズモン共鳴 ( S P R ) 解析で検定した。ニュートラアビジンを介してビオチン化ヒト H E R 2 を固定し、遊離している一価の D A R P i n を加えることで、相互作用を測定する設定とした。K d 値の決定は、標準的な手順に従って行った。

#### 【 0 2 2 4 】

ビオチン化したヒト H E R 2 分子の外部ドメインを、コーティングしておいたストレプトアビジンとの結合を介してフローセル内に固定し、選抜した様々な D A R P i n との相

10

20

30

40

50

相互作用を解析した。

【0225】

表面プラズモン共鳴（SPR）解析

SPRはプロテオン装置（バイオラッド）を使用して測定し、また、測定は当業者に知られている標準的な手順に従って行った。泳動用緩衝液としては、0.005%のツイーン20（登録商標）含有のPBS、pH7.4を使った。ニュートラアビジンをGLCチップ（バイオラッド）に、約8000レゾナンスユニット（RU）のレベルまで共有的に固定した。次いで、HER2をニュートラアビジンでコーティングしたチップに固定した。その後、段階希釈したDARPin（50、25、12.5、6.25および3.125 nMの濃度）を含む泳動用緩衝液（0.005%のTween（登録商標）含有PBS）100  $\mu$ Lを注入し（会合速度測定）、次いで泳動用緩衝液を一定の流速（100  $\mu$ L / 分）で10分から最長3時間流すことで（解離速度測定）、DARPinとHER2の相互作用を測定した。コーティングしていない参照セルおよび参照注入（つまり泳動用緩衝液のみの注入）のシグナル（つまりレゾナンスユニット（RU）の値）を、HER2を注入した後に得られたRUの追跡結果から差し引いた（二重参照）。会合速度と解離速度の測定から得られたSRPの追跡結果から、対応するDARPin - HER2間相互作用の会合速度と解離速度を決定することができる。

10

【0226】

結果を表1にまとめる。平衡解離定数（ $K_d$ ）は当業者に知られている標準的な手順を用い、予測された会合速度と解離速度から算出した。

20

【表 1】

表 1 : S P Rで測定した、選抜したD A R P i nとヒトH E R 2の平衡解離定数

DARPin の番号	平衡解離定数 [M]
1	7.81E-11
2	8.75E-10
3	1.31E-11
4	1.86E-10
5	7.08E-11
6	2.92E-11
7	1.03E-09
8	4.83E-10
9	4.17E-10
10	1.03E-09
11	2.56E-10
12	1.41E-09
13	測定せず
14	1.88E-09
15	4.68E-10
16	2.67E-09
17	2.30E-09
18	3.35E-10
19	9.44E-10
20	2.58E-10
21	1.65E-09
51	1.3E-09
52	1.37E-10
53	1.46E-09

10

20

30

40

54	9.27E-12
55	8.73E-11
56	2.00E-09
57	6.04E-11
58	4.13E-11
59	3.33E-11
60	1.17E-11

10

## 【0227】

実施例3：特定の細胞外HER2エピトープに結合する反復ドメインのマッピング

反復ドメインとHER2の細胞外ドメインとの相互作用を、当業者に知られている標準的な方法、例えば、X線結晶学もしくはNMR分光法による複合体の四次構造解析、または、相互作用残基の可能性のある残基へのアラニン突然変異生成を用いたマッピングもしくは質量分析によるエピトープマッピング、および共有結合によるタグ化で解析した。さらに、様々な競合アッセイ、例えば、当業者に知られている競合的酵素酵素結合免疫吸着検定(ELISA)を実施して、選抜した反復タンパク質が結合する細胞外ドメインを同定するか、あるいは、それらが、他の結合タンパク質、例えばトラスツズマブまたはベルツズマブなどの抗体と重複しているエピトープをHER2の細胞外ドメインに有しているか否かを同定した。

20

## 【0228】

HER2の細胞外ドメインは購入するか、あるいは記載されているように(ヨストラ、前掲文献)生産した。

## 【0229】

関心のもたれる精製したHER2結合DARPinの競合を、プロテオンアレイシステム(バイオラッド)を使った表面プラズモン共鳴(SPR)解析によって行った。ピオチン化ヒトErbb2 S22-N530とErbb2 S22-E645をニュートラピジンを通じて固定し、飽和濃度(1μM)の第一の一価DARPinを加え、次いで、第一のDARPinと第二のDARPin(それぞれ100nM)を1:1の割合で混合したものを加えることによって競合を測定する設定とした。第一のDARPinが存在するにもかかわらず第二のDARPinが結合する場合には、この第二のDARPinは異なるエピトープに結合すると見なした。

30

## 【0230】

例えば、競合的ELISA(図1Aおよび1B)のデータは、DARPin#54がHer2のドメインIIに結合し、DARPin#51がHER2のドメインIに結合することを示唆している。これまでに、DARPin#18がHER2のドメインIVに結合することが分かっていた(ヨストラ、前掲文献)。DARPin(20nM)をHER2のドメインI、ドメインI-IIまたはドメインII-IV(いずれの場合もドメインの濃度は500nMとした)とともにPBSに入れ、室温で45分間、プレインキュベートした。この混合物を、F96マキシソープ(ヌンク、カタログ番号442404)プレートにコーティングした20nMの完全長Her2に加えた。モノクローナルマウス抗RGS-ヒス抗体(キアゲン、カタログ番号34650)を一次抗体として、西洋わさびペルオキシダーゼ標識型抗マウス抗体(ピラス、カタログ番号31438)を二次抗体として用い、結合したDARPinを特異的に検出した。図1Bで図示したELISAでは、一次抗体(マウス抗RGS-ヒス抗体)をモノクローナルマウス抗DARPin抗体に置き換えた。

40

50

## 【0231】

測定は450nmで行った。全てのインキュベーション工程は、0.1%のツイーン20（登録商標）と0.25%のカゼインを含有しているPBS（pH7.4）を使用し、ハイドルフ社のタイトラマックス1000振とう器上（450rpm）、室温で2時間行った。ただし、プレートにコーティングする工程だけは、PBS（pH7.4）を用い、4℃で一晩行った。

## 【0232】

フローサイトメトリー（FACS）により、これらのDARPinと、Her2組換えドメインI、ドメインII-IIIおよびドメインIII-IVを有するHer2を過剰発現している細胞（BT474）との結合を競合することで、ここまでの発見を確認した。DARPin（100nM）をそれぞれのHer2構築物（1μM）と25℃で30分、プレインキュベートした。氷上でこの混合物を細胞（100μl中に100,000細胞）に加え、20分間置いた。アレクサ647標識抗ペンタ-ヒス抗体（キアゲン、カタログ番号：35370）で、DARPinの細胞への結合を監視した。この解析によって、DARPin#51がHER2のドメインIに結合すること、DARPin#1がHER2のドメインIIに結合すること、およびDARPin#18がHER2のドメインIVに結合することを確認した。

## 【0233】

フローサイトメトリーを用い、DARPin#1とペルツズマブおよびDARPin#18とトラスツズマブの競合についても試験した。ここでは、BT474細胞をペルツズマブ、トラスツズマブ（いずれも1μM）のそれぞれとプレインキュベートし、その後、それぞれのDARPin（1μM）を加えてインキュベートした。アレクサ647標識抗ペンタ-ヒス抗体（キアゲン、カタログ番号：35370）を利用してDARPinの細胞への結合を、アレクサ546標識抗ヒト-IgG抗体（インビトロジェンカタログ番号：A-21089）を利用してペルツズマブまたはトラスツズマブの結合を監視した。この実験から、いずれのDARPinも、BT474細胞で発現しているHER2とペルツズマブまたはトラスツズマブとの結合に競合しないことが示された。

## 【0234】

このことは、ELISAでも観察された（図1C）。この場合には、ペルツズマブ（F96マキシソープ（ヌンク、カタログ番号442404）にコーティングされている、20nM）を20nMのHer2（ドメインII-III）とプレインキュベートし、その後、それぞれのDARPin（20nM）とインキュベートした。モノクローナルマウス抗RGS-ヒス抗体（キアゲン、カタログ番号34650）と西洋わさびペルオキシダーゼ標識型抗マウス抗体（ピラス、カタログ番号31438）（予め室温で45分間混合しておく）を使用して、DARPinとHer2-ペルツズマブ複合体との特異的な結合を検出した。全てのインキュベーション工程は、ハイドルフ社のタイトラマックス1000振とう器上（450rpm）、室温で2時間行ったが、プレートにコーティングする工程だけは4℃で一晩行った。ブロッキング剤としては、0.1%のツイーン20（登録商標）と0.25%のカゼインを含有するPBS（pH7.4）を使用した。このアッセイで試験したN末端DARPinは全て（DARPin#7、DARPin#52、DARPin#53、およびDARPin#54）ペルツズマブ存在下でHer2と結合しており、このことは、これらは全て、抗体とは違うエピトープに結合することを示している。

## 【0235】

これらの実験は全体として、配列番号62～68、72、および114～121によってコードされている一価の反復ドメインはHER2のドメインIIに結合し、配列番号69～71、73、112および113によってコードされている一価の反復ドメインはHER2のドメインIに結合し、ならびに、配列番号74～82によってコードされている一価の反復ドメインはHER2のドメインIVに結合することを示した。HER2のドメインIIに結合する一価の反復ドメイン（配列番号62～68、72、および114～121）はどれも、ペルツズマブとHER2との結合に競合しない。HER2のドメインI



Vに結合する一価の反復ドメインの中でも、配列番号77、78および82によってコードされている反復ドメインは、トラスツズマブとHER2との結合に競合するが、配列番号74~76および79~81によってコードされている反復ドメインはトラスツズマブと競合しない。

【0236】

実施例4：ニパレートブHer2結合DARPinは、Her2を過剰発現している腫瘍細胞の成長を阻害する。

一価のDARPin、DARPinの混合物、およびニパレートブHer2結合DARPinによるBT474細胞の増殖阻害について試験した。図2は、一価のDARPinおよび一価のDARPinの混合物はBT474の増殖を阻害できないことを示している。対照的に、ニパレートブDARPinの小集団は増殖阻害を誘導している（図2および表2）。興味深いことに、HER2のDARPin反復ドメインIV（HER2のドメインIVに結合するDARPin反復ドメイン）は、その分子のC末端に局在していません（図2）。ニパレートブ形式にした一価のDARPinの複数の組み合わせから、増殖阻害性のニパレートブDARPinが得られた。しかしながら、組み合わせの全てがBT474の増殖を90~100%阻害できるわけではなく（図3）、そのため、DARPinの特定の組み合わせを等級付けることができる。これらの発見は、HER2の特定のエピトープの小集団のそれぞれを、ニパレートブ形式で標的とすることが、効果を高めるのに重要であることを示している。トラスツズマブを使った例で報告されているようなHER2受容体の内部移行および分解の誘導は、腫瘍細胞の増殖を強く阻害するには十分ではない（図3および5）。DARPin#41とDARPin#43はトラスツズマブと同様にHer2の分解を誘導するが、DARPin#41などのDARPinだけが腫瘍細胞の増殖を阻害する。

【0237】

方法の項に記載したように実験を行った。例示的な結果を表2にまとめている。IC<sub>50</sub>値は、当業者に知られている標準的な手順を使用して、前述のようにして得た滴定曲線から算出した。DARPin#41に関する滴定曲線の例を図2および3に示す。

10

20

【表 2】

表 2 : 様々な D A R P i n の B T B 4 7 4 細胞増殖阻害作用

DARPin の番号 または抗体名	IC <sub>50</sub> [nM]	DARPin#41 に対する活性 (%)
32	3.29	48.0
22	4.03	60.1
27	4.57	37.8
35	4.63	63.0
38	3.30	99.3
33	4.47	65.3
23	2.99	97.3
28	5.15	82.5
36	2.56	68.8
34	3.88	95.1
24	1.97	99.9
29	1.33	95.0
37	2.19	94.8
40	2.76	91.2
42	3.77	100
45	1.55	100
46	3.34	100
41	4.01	100
47	n. i.	6.8
43	n. i.	n. i.
44	n. i.	n. i.
48	n. i.	n. i.
49	n. i.	n. i.

10

20

30

40

21	n. i.	n. i.
12	n. i.	n. i.
1	n. i.	n. i.
18	n. i.	n. i.
64	2.31	100
65	4.07	100
63	1.77	100
68	5.35	100
67	4.87	100
66	4.06	100
64	2.31	100
トラスツズマブ	3.05	52
ペルツズマブ	n. i	n. i

n. i. : 阻害は観察されなかった

#### 【0238】

実施例5：ニパラトープHer2標的DARPinは、Her2を過剰発現している様々な細胞株の増殖を阻害し、アポトーシスを誘導する。

ニパラトープDARPin#41の有効性を試験した。このDARPinは、Her2を過剰発現している細胞株の増殖を、Her2 IHC 3+~1+の範囲で阻害したが、野生型のレベルでHER2を発現している細胞の増殖は阻害しなかった（図4；表3）。さらに、このDARPinは24時間以内のインキュベーションで、表に挙げた細胞株で確実にアポトーシスを誘導する（図5、表3）。

#### 【0239】

方法の項に記載したように実験を行った。例示的な結果を表3にまとめている。IC<sub>50</sub>値およびEC<sub>50</sub>値は前述した通り当業者に知られている標準的な手順によって、滴定曲線から算出した。3種類の細胞株に関するDARPin#41の滴定曲線の例を図4および5に示す。試験したDARPinと細胞株に応じて、IC<sub>50</sub>値およびEC<sub>50</sub>値の範囲は0.2~10nMの範囲である。例えば、DARPin#41、#45および#46がBT474、MDA-MB175およびNCI-N87細胞のアポトーシスを誘導することが示された（表3）。本発明の他のニパラトープ結合タンパク質を用いても同様の結果が得られた。

## 【表 3】

表 3：様々な異なる細胞株に対するDARPin # 41の効力

細胞株	Her2 の状態	増殖の阻害 IC <sub>50</sub> [nM]	アポトーシスの誘導 EC <sub>50</sub> [nM]
BT474	IHC 3+	0.98	0.69
SKBR-3	IHC 3+	1.75	未検定
NCI-N87	IHC 2+	0.94	0.26
ZR75-30	IHC 3+	0.60	未検定
HCC1419	IHC 3+	3.17	未検定
MDA-MB175	IHC 1+	3.42	5.94
MCF7	IHC 0/野生型	阻害せず	阻害せず

10

## 【0240】

20

実施例 6：最新の標準治療とは対照的に、Her2 を標的とする二パラトープDARPin はBT474 細胞の増殖を阻害し、そのアポトーシスを誘導する。

二パラトープDARPin # 41 の効力を、Her2 陽性の乳癌の治療に認可されている薬剤であるトラスツズマブおよびペルツズマブと比較した。トラスツズマブ単独、ペルツズマブ単独またはトラスツズマブとペルツズマブの併用とは対照的に、DARPin は効率的にBT474 細胞の増殖を阻害し、かつ、アポトーシスを誘導する（図 6）。

## 【0241】

方法の項に記載したように実験を行った。例示的な結果を図 6 示している。IC<sub>50</sub> 値および EC<sub>50</sub> 値は前述した通り当業者に知られている標準的な手順によって滴定曲線から算出した（表 3）。本発明の他の二パラトープ結合タンパク質を用いても同様の結果が得られた。

30

## 【0242】

実施例 7：様々な形式のDARPin の生成。

一例として、種々の形式の二パラトープDARPin # 41 によるBT474 細胞の増殖阻害をDARPin # 41 と比較した（図 7、表 2）。ペグ化しても、またはN 末端もしくはC 末端にヒト血清アルブミン結合DARPin（DARPin # 41、# 63、# 64、# 65）を融合させても、効果に影響はなかった（図 7A）。また、DARPin 部分間のリンカーを換えても効果に影響を及ぼさなかった（図 7B）。IC<sub>50</sub> 値は1.5 ~ 5.5 nM の範囲である。対応する形式の二パラトープDARPin # 41、# 66、# 67、# 68 を使った場合にも、同様の結果が得られた。まとめるとこれらの結果は全体として、二パラトープDARPin は、その効果を消失することなく、インピボでの半減期が長くなるように修飾できること（ペグ化または血清アルブミン結合ドメインとの融合などの当業者に知られている方法によって）を示唆している。さらにこれらの実験は、二パラトープ構築物に含まれている2つのHER2 結合反復ドメインの間のリンカーは、二パラトープ構築物の効果に有意な影響を及ぼすことなく、少なくとも2 ~ 24 アミノ酸に変更できることを示唆している。

40

## 【0243】

実施例 8：DARPin / Her2 相互作用のマッピング。

本発明の二パラトープDARPin とHER2 外部ドメインとの相互作用を、これら2 つに分子で形成されている複合体を溶液（つまりpH 7.4 のPBS）中で化学的に架橋

50

結合し、その後、この複合体をプロテアーゼで消化し、そして得られたペプチドを質量分析で解析することによってさらに解析した。このような実験では、DARPinがHER2とごく接近している場合にのみ、DARPinの領域をHER2の領域に共有的に架橋結合させることができる。HER2の対応するペプチドに共有的に架橋結合しているDARPin由来のペプチドを質量分光法解析で検出した結果は、これらのペプチドがHER2/DARPin複合体中で非常に近接していることを示している。このような近接解析の方法は当業者に知られており（例えば、バーチカル、Anal. Chem.、82、172～179、2010）、また、様々な企業からサービスとして提供されている（例えば、コバルクス・アーゲー（Covalex AG）、チューリッヒ、スイス）。

【0244】

例えばこのような実験から、HER2のドメインIIとドメインIVに結合する二パラトープDARPin#41がHER2と1対1の複合体を形成することができることが分かった。驚くことに、C末端反復ドメイン（HER2のドメインIVと結合している）とHER2のドメインIとの間には共有的な架橋結合が観察された。このことは、この反復ドメインは複合体中でドメインIVと結合していながらも、HER2のドメインIとも近接していることを示している。HER2が先行技術（例えば、ブプリルおよびヤーデン、前掲文献）に記載されているような高次構造をとっているとすれば、このような架橋結合が見られるとは予想されなかった。重要なことは、HER2外部ドメインを解析した場合、このC末端反復ドメインがドメインIVだけに結合している複合体ではHER2のドメインIへのこのような架橋結合は観察できないということであり、このことは、HER2とドメインIVに結合する単量体反復ドメインとで形成されている複合体の例では、この反復ドメインのドメインIへの近接は存在しないことを示している。従って、本発明の二パラトープ結合タンパク質から形成されている複合体中でのHER2に対するドメインの三次元的な配置は、HER2のドメインIVに結合する個々の反復ドメインで形成されている複合体の配置とは異なっているはずである。

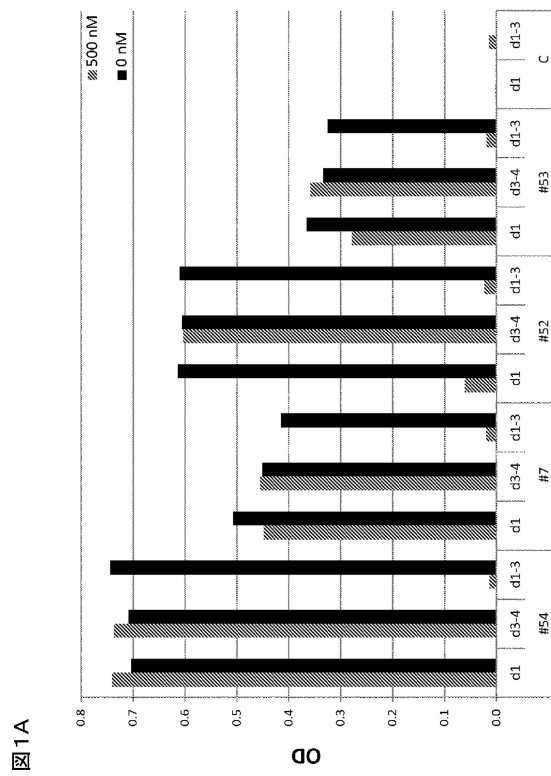
【0245】

興味深いことに、HER2の外部ドメインに関してこれまでに知られている構造では、2つの反復ドメインの間に2～24アミノ酸の短いリンカーがあると想定する場合、本発明の二パラトープ結合タンパク質の両方の反復ドメインは同じHER2分子に同時に結合することはできない。このことは、HER2が、両方の反復ドメインが同時に結合することを許容する未だ知られていない高次構造をとり得ることを示している。

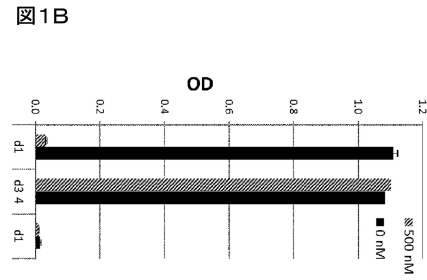
【0246】

これらの実験は全体として、本発明の二パラトープ結合タンパク質はHER2の外部ドメインと分子間相互作用し、それによってHER2の外部ドメインを先行技術では知られていない新規の高次構造に固定する、すなわち、ドメインIとドメインIVを、反復ドメイン（HER2のドメインIVに結合している反復ドメイン）とドメインIとの間の観察された架橋結合が生じるのを可能にする立体配置にすることができるのだろうということを示している。従って、HER2のこの新規高次構造は、本発明の二パラトープ結合タンパク質がHER2のドメインIIとドメインIVに分子間的な様式で同時に結合することによって安定化されるのだろうと考えられる。

【 図 1 A 】



【 図 1 B 】



【 図 1 C 】

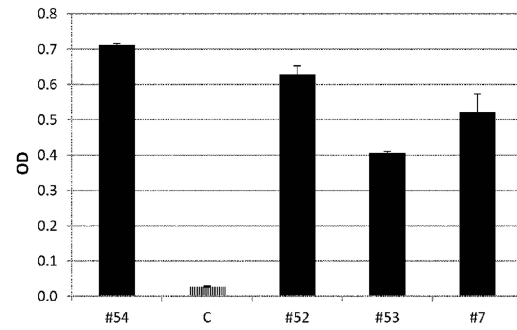
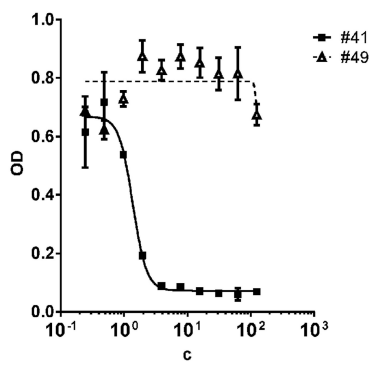


図1C

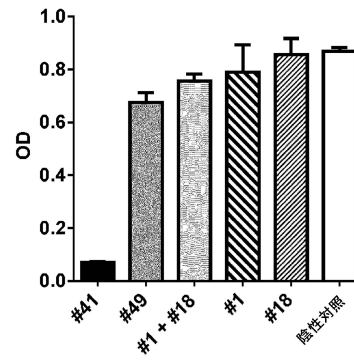
【 図 2 A 】

図2A



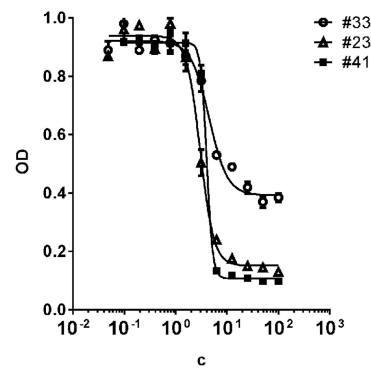
【 図 2 B 】

図2B



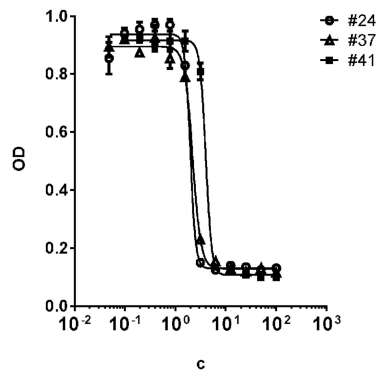
【 図 3 A 】

図3A



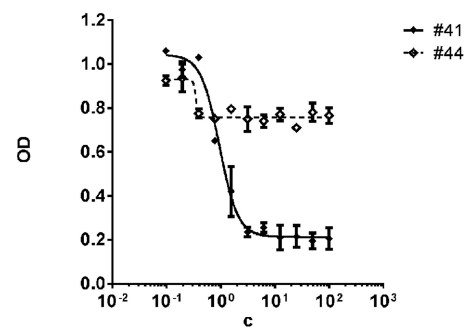
【図 3 B】

図3B



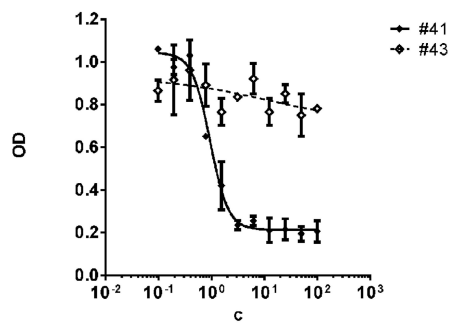
【図 3 D】

図3D



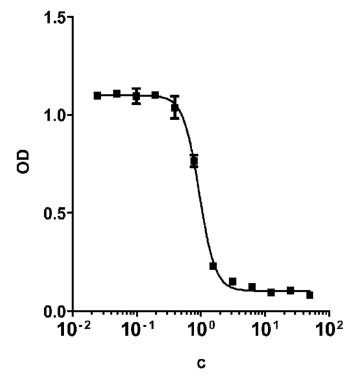
【図 3 C】

図3C



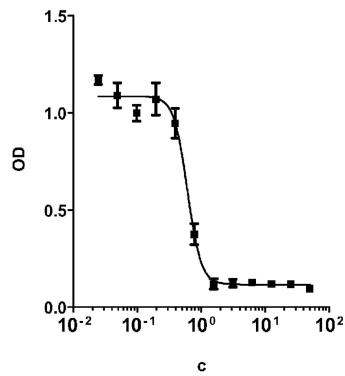
【図 4 A】

図4A



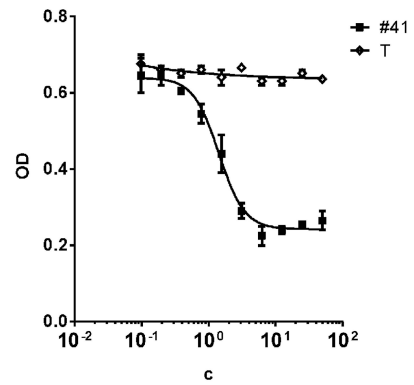
【図 4 B】

図4B



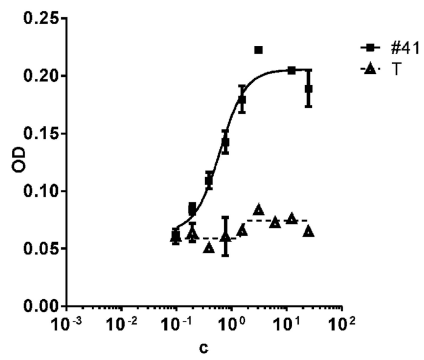
【図 4 C】

図4C



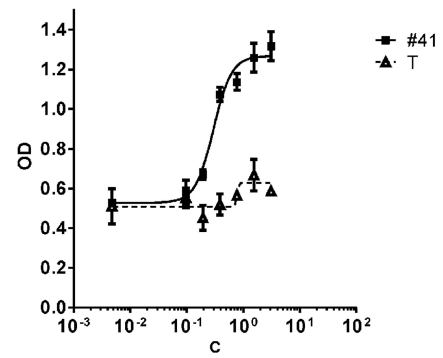
【図 5 A】

図5A



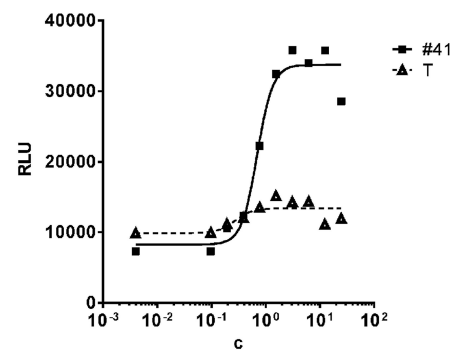
【図 5 B】

図5B



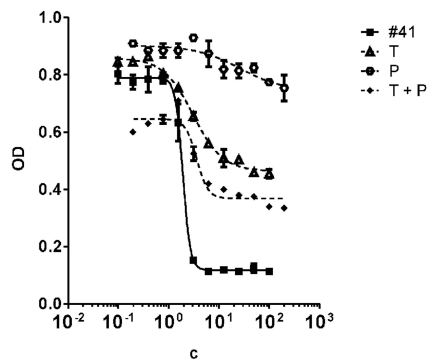
【図 5 C】

図5C



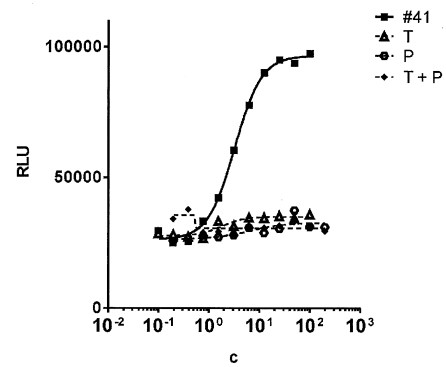
【図 6 A】

図6A



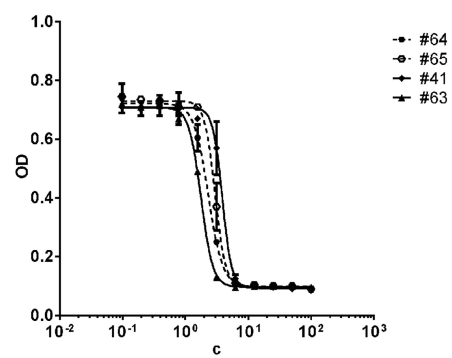
【図 6 B】

図6B



【図 7 A】

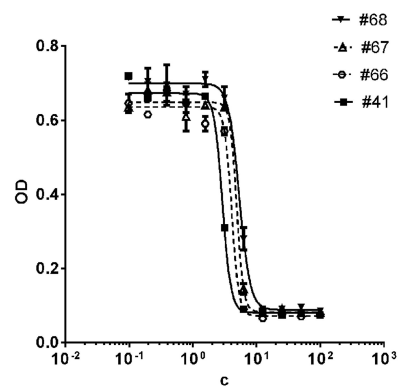
図7A





## 【図 7 B】

図7B



## 【配列表】

0006410724000001.app

---

フロントページの続き

(72)発明者 シュトローベル ハイケ

スイス国 ツェーハー 8048 チューリッヒ バッハマットシュトラッセ 4

審査官 西 賢二

(56)参考文献 国際公開第2011/050262(WO, A2)

ZAHND, C. et al., "Selection and characterization of Her2 binding-designed ankyrin repeat proteins", J. Biol. Chem., 2006年, Vol. 281, pp. 35167-35175

STEINER, D. et al., "Efficient selection of DARPins with sub-nanomolar affinities using SRP phage display", J. Mol. Biol., 2008年, Vol. 382, pp. 1211-1227

STUMPP, M. T. et al., "DARPins: a true alternative to antibodies", Curr. Opin. Drug Discov. Devel., 2007年, Vol. 10, pp. 153-159

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C07K 1/00 - 19/00

C12N 15/00 - 15/90

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

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