

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2018-529310

(P2018-529310A)

(43) 公表日 平成30年10月11日(2018.10.11)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C12N 15/12 (2006.01)	C12N 15/12 ZNA	4B064
C12N 15/63 (2006.01)	C12N 15/63 Z	4B065
C07K 19/00 (2006.01)	C07K 19/00	4C076
C07K 14/47 (2006.01)	C07K 14/47	4C084
C12P 21/02 (2006.01)	C12P 21/02 C	4C085
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 42 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2017-567102 (P2017-567102)
 (86) (22) 出願日 平成28年7月19日 (2016.7.19)
 (85) 翻訳文提出日 平成29年12月25日 (2017.12.25)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2016/067207
 (87) 国際公開番号 WO2017/013129
 (87) 国際公開日 平成29年1月26日 (2017.1.26)
 (31) 優先権主張番号 15177548.3
 (32) 優先日 平成27年7月20日 (2015.7.20)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

(71) 出願人 513311653
 ナフィゴ プロテインズ ゲゼルシャフト
 ミット ベシュレンクテル ハフツング
 Navigo Proteins GmbH
 ドイツ連邦共和国 06120 ハレ, ハイ
 ンリヒェーダメロウーシュトラーセ 1
 (74) 代理人 110001302
 特許業務法人北青山インターナショナル
 セッテル, フロリアン
 (72) 発明者
 ドイツ連邦共和国 06120 ハレ/ザ
 ーレ, ハインリヒェーダメロウーシュトラ
 ーセ 1, シー/オー ナフィゴ プロテイ
 ンズ ゲゼルシャフト ミット ベシュレ
 ンクテル ハフツング
 最終頁に続く

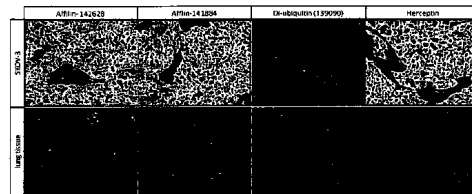
(54) 【発明の名称】 ジュピキチン変異タンパク質に基づくHer2結合タンパク質

(57) 【要約】

本発明は、ジュピキチン変異タンパク質に基づく新規のHer2結合分子に関する。本発明は更に、薬物動態を調節する部分に、又は治療若しくは診断活性成分に任意に融合又はコンジュゲートされたHer2結合タンパク質に関する。本発明は更に、これらのHer2結合タンパク質の医学における使用、好ましくは、癌の診断又は治療における使用に関する。

【選択図】 図11

FIG. 11



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

アミノ酸配列を具える Her 2 結合タンパク質において、ジユピキチン（配列番号：4）の R 4 2、I 4 4、H 6 8、V 7 0、R 7 2、L 7 3、R 7 4、K 8 2、L 8 4、Q 1 3 8、K 1 3 9、E 1 4 0、S 1 4 1、及び T 1 4 2 位から選択される 1 2、1 3、又は 1 4 のアミノ酸が置換され、前記 Her 2 結合タンパク質はジユピキチン（配列番号：4）に対して少なくとも 8 5 % の配列同一性を有し、前記 Her 2 結合タンパク質は Her 2 に対して 7 0 0 n M 未満の結合親和性（ K_D ）を有することを特徴とする Her 2 結合タンパク質。

【請求項 2】

請求項 1 に記載の Her 2 結合タンパク質において、ジユピキチン（配列番号：4）の 1、2、3、4、5、又は 6 の更なる置換を具えることを特徴とする Her 2 結合タンパク質。

【請求項 3】

請求項 1 又は 2 に記載の Her 2 結合タンパク質において、
 4 2 位から選択されるアミノ酸は極性アミノ酸により置換され、
 4 4 位から選択されるアミノ酸は疎水性又は極性アミノ酸により置換され、
 6 8 位から選択されるアミノ酸は芳香族アミノ酸により置換され、
 7 0 位から選択されるアミノ酸は芳香族アミノ酸により置換され、
 7 2 位から選択されるアミノ酸は極性又は芳香族アミノ酸により置換され、
 7 3 位から選択されるアミノ酸は塩基性又は酸性アミノ酸以外の任意のアミノ酸により置換され、
 7 4 位から選択されるアミノ酸は芳香族、塩基性又は極性アミノ酸により置換され、
 8 2 位から選択されるアミノ酸は塩基性又は酸性アミノ酸以外の任意のアミノ酸により置換され、
 8 4 位から選択されるアミノ酸は塩基性又は酸性アミノ酸により置換され、
 1 3 8 位から選択されるアミノ酸は塩基性又は酸性又は極性アミノ酸により置換され、
 1 3 9 位から選択されるアミノ酸は酸性又は疎水性アミノ酸又はグリシンにより置換され、
 1 4 0 位から選択されるアミノ酸は芳香族アミノ酸により置換され、
 1 4 1 位から選択されるアミノ酸は疎水性又は極性又は塩基性アミノ酸により置換され、及び / 又は
 1 4 2 位から選択されるアミノ酸は疎水性又は極性アミノ酸により置換されることを特徴とする Her 2 結合タンパク質。

【請求項 4】

請求項 3 に記載の Her 2 結合タンパク質において、前記アミノ酸は R 4 2 T、R 4 2 S、R 4 2 L、I 4 4 A、I 4 4 V、I 4 4 S、I 4 4 T、H 6 8 W、H 6 8 Y、H 6 8 F、V 7 0 Y、V 7 0 W、R 7 2 T、R 7 2 F、R 7 2 G、R 7 2 Y、L 7 3 W、L 7 3 S、L 7 3 V、L 7 3 I、R 7 4 Y、R 7 4 S、R 7 4 N、R 7 4 K、K 8 2 T、K 8 2 L、K 8 2 N、K 8 2 I、K 8 2 Y、L 8 4 H、L 8 4 D、L 8 4 E、L 8 4 S、Q 1 3 8 S、Q 1 3 8 R、Q 1 3 8 E、K 1 3 9 E、K 1 3 9 G、K 1 3 9 L、E 1 4 0 W、S 1 4 1 A、S 1 4 1 R、T 1 4 2 I、T 1 4 2 L、及び / 又は T 1 4 2 N から選択されることを特徴とする Her 2 結合タンパク質。

【請求項 5】

請求項 4 に記載の Her 2 結合タンパク質において、前記アミノ酸は Q 1 3 8 S、K 1 3 9 E、E 1 4 0 W、S 1 4 1 A、及び T 1 4 2 I；又は Q 1 3 8 R、K 1 3 9 G、E 1 4 0 W、及び T 1 4 2 L；又は Q 1 3 8 E、K 1 3 9 L、E 1 4 0 W、S 1 4 1 R、及び T 1 4 2 N から選択されることを特徴とする Her 2 結合タンパク質。

【請求項 6】

請求項 4 に記載の Her 2 結合タンパク質において、前記アミノ酸は R 4 2 T、I 4 4

10

20

30

40

50

A、H68W、V70Y、R72T、L73W、R74Y、K82T、及びL84Hから選択されることを特徴とするHer2結合タンパク質。

【請求項7】

請求項4に記載のHer2結合タンパク質において、前記アミノ酸はR42S、I44V、H68Y、V70Y、R72F、L73S、K82L、及びL84Dから選択されることを特徴とするHer2結合タンパク質。

【請求項8】

請求項1から7のいずれか一項に記載のHer2結合タンパク質において、前記アミノ酸配列は配列番号：5-38の前記アミノ酸配列のうち1つから選択されることを特徴とするHer2結合タンパク質。

10

【請求項9】

請求項1から8のいずれか一項に記載のHer2結合タンパク質において、前記Her2結合タンパク質は前記モノクローナル抗体トラスツズマブと異なる又は非重複のHer2エピトープに結合することを特徴とするHer2結合タンパク質。

【請求項10】

請求項1から9のいずれか一項に記載のHer2結合タンパク質が、好ましくは、(i)ポリエチレングリコール、ヒト血清アルブミン、アルブミン結合ペプチド、又は免疫グロブリン、又は免疫グロブリン断片、多糖から選択される薬物動態を調節する部分、及び(ii)任意に、モノクローナル抗体又はその断片、サイトカイン、ケモカイン、細胞毒性化合物、酵素、又はそれらの誘導体、又は放射性核種から選択される治療活性成分、及び(iii)任意に、蛍光化合物、光増感剤、タグ、酵素、又は放射性核種から選択される診断成分、からなる群(i)、(ii)、(iii)の少なくとも1員から選択される、少なくとも1つの追加の分子を更に具えることを特徴とするHer2結合タンパク質。

20

【請求項11】

請求項10に記載のHer2結合タンパク質において、EGFR特異性を有するモノクローナル抗体を具えることを特徴とする、Her2結合タンパク質。

【請求項12】

請求項1から11のいずれか一項に記載のHer2結合タンパク質において、診断又は医学において使用するための、好ましくは、癌の診断又は治療において使用するためであることを特徴とする、Her2結合タンパク質。

30

【請求項13】

請求項1から12のいずれか一項に記載のHer2結合タンパク質をコードする核酸分子。

【請求項14】

請求項13に記載の核酸分子を具えるベクター。

【請求項15】

請求項1から12のいずれか一項に記載のHer2結合タンパク質、請求項13に記載の核酸、及び/又は請求項14のベクターを具える宿主細胞又は非ヒト宿主。

【請求項16】

請求項1から12のいずれか一項に記載のHer2結合タンパク質、請求項13に記載の核酸、請求項14に記載のベクター、及び/又は請求項15に記載の宿主細胞を具える組成物。

40

【請求項17】

請求項1から12のいずれか一項に記載のHer2結合タンパク質の製造方法において、前記Her2結合タンパク質を得るために適切な条件下で請求項15の宿主細胞を培養するステップ、及び、任意に、前記Her2結合タンパク質を単離するステップを具えることを特徴とする方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

50

本発明は、ジユピキチン変異タンパク質に基づく新規のH e r 2 結合分子に関する。本発明は更に、薬物動態を調節する部分に、又は治療若しくは診断活性成分に任意に融合又はコンジュゲートされたH e r 2 結合タンパク質に関する。本発明は更に、これらのH e r 2 結合タンパク質の医学における使用、好ましくは、癌の診断又は治療における使用に関する。

【背景技術】

【0002】

膜結合した受容体型チロシンキナーゼH e r 2 は、多くの乳癌だけでなく、特に癌の攻撃形態を伴う卵巣、胃、及び子宮癌の発症及び進行において重要な役割を果たす。この発癌遺伝子の過剰発現が、悪性腫瘍、主として上皮由来の悪性腫瘍において報告され、癌の再発及び予後不良に関連している。3つのドメインタンパク質（細胞外、膜貫通、細胞内のチロシンキナーゼドメイン）は、細胞増殖を媒介し、アポトーシスを阻害している。リガンドがH e r 2 の細胞外ドメインに結合すると、H e r 2 は受容体と二量体を形成し、それによりH e r 2 の細胞内ドメインが活性化され、増殖、分化、移動、又はアポトーシス等の細胞プロセスを媒介する。従って、H e r 2 の機能を調節することは、癌治療の開発、特に、H e r 2 の細胞外ドメインに結合するモノクローナル抗体に基づくものにとって重要なアプローチである。トラスツズマブ又はペルツズマブ等の治療用の抗H e r 2 モノクローナル抗体は、癌、特に乳癌の治療に利用可能である。

10

【0003】

[本発明の技術的課題]

20

しかし、モノクローナル抗体は、複雑な分子構造、大きいサイズ、困難な製造方法等、大きな欠点を有する。更に、現在入手可能なH e r 2 結合分子で疾患を治療することは、全ての患者にとって有効ではなく、深刻な副作用をもたらす場合がある。

【0004】

特に効果的な腫瘍を標的とした治療及び診断において、改良した新規の薬剤で癌を効果的に治療することが強く医療で必要とされていることは言うまでもない。現在の治療及び診断に代わるものを見つける、つまりH e r 2 モノクローナル抗体を、非免疫グロブリンベースのH e r 2 結合薬剤等のより小さく且つより複雑でないH e r 2 特異的な分子により置換するという継続的な必要性が生じている。

30

【0005】

抗体の欠点を解消するために、診断及び治療用途に適した新規のH e r 2 結合分子は、H e r 2 への親和性、H e r 2 への特異性、及び高い安定性等の特性を含むべきである。

【0006】

従って、本発明の目的は、H e r 2 の過剰発現による癌の治療及び診断における新たな改良した方法において、新規のH e r 2 結合非免疫グロブリン分子を提供することである。特に、例えば簡易化した分子エンジニアリングを可能とするため、H e r 2 に対して高親和性及び特異性を有し、より複雑でない小さい構造と組み合わせられた、新規の結合タンパク質を提供することが目的である。

【0007】

非免疫グロブリン系結合薬剤等の小さいH e r 2 結合タンパク質により、特に、ユピキチン変異タンパク質に基づくH e r 2 結合分子（アフィリン（登録商標）分子としても知られる）により、解決法が本発明に提供される。

40

【0008】

抗体と比較して、本発明のH e r 2 結合タンパク質の大きな利点は、(i) 小さくされたサイズ（例えば、最大で152のアミノ酸）、(i i) 単純な分子構造（抗体の4つの鎖と比べて1つの鎖）、及び(i i i) 翻訳後の修飾は可能だが、完全な機能性のために必要ではない、ということに関して複雑性が軽減されたことである。本発明の結合タンパク質は、有利な物理化学的特性（安定性及び可溶性等）、高レベルの発現を有する分子フォーマットを提供し、容易な製造方法を可能とする。本発明のH e r 2 特異的アフィリン分子は、H e r 2 への高親和性により、H e r 2 への特異性により、及び高安定性により

50

特徴付けられ、新規の治療及び診断の可能性を提供する。

【0009】

上述の目的及び利点は、添付の独立項の主題により達成される。本発明は、ジユピキチンの少なくとも12のアミノ酸の位置で置換を有するジユピキチン変異タンパク質に基づく特異的Her2結合タンパク質に関する例を提供することで、上記で示した要件を満たす。本発明の好適な実施形態は、従属項、並びに以下の説明、実施例、及び図面に含まれる。上記の概要は、本発明により解決される全ての課題を必ずしも説明していない。

【発明の概要】

【0010】

第1の態様において、本発明はHer2結合タンパク質に関し、Her2結合タンパク質は、アミノ酸配列を具え、ジユピキチン(配列番号:4)のR42、I44、H68、V70、R72、L73、R74、K82、L84、Q138、K139、E140、S141、及びT142位から選択される少なくとも12のアミノ酸が置換され、Her2結合タンパク質はジユピキチン(配列番号:4)に対して少なくとも85%の配列同一性を有し、Her2結合タンパク質はHer2に関して700nM未満の結合親和性(K_D)を有し、好ましくは、結合親和性はELISAにより、又は表面プラズモン共鳴アッセイにより決定される。

10

【0011】

本発明の別の態様は、Her2結合タンパク質に関し、好ましくは、(i)例えばポリエチレングリコール、ヒト血清アルブミン(HSA)、ヒト血清アルブミン結合タンパク質、アルブミン結合ペプチド、又は免疫グロブリン、免疫グロブリン断片、多糖から選択される薬物動態を調節する部分、及び(ii)任意に、例えばモノクローナル抗体又はその断片、サイトカイン、ケモカイン、細胞毒性化合物、酵素、又はそれらの誘導體、又は放射性核種から選択される治療活性成分、及び(iii)任意に、例えば蛍光化合物、光増感剤、タグ、酵素、又は放射性核種から選択される診断成分、からなる群(i)、(ii)、(iii)の少なくとも1員から選択される、少なくとも1つの追加の分子を更に具える。

20

【0012】

本発明は、更なる態様において、本発明の結合タンパク質を含む又はそれからなるHer2結合タンパク質をコードする核酸又は複数の核酸、並びに当該核酸又は複数の核酸を含むベクター又は複数のベクター、及び当該ベクター又は複数のベクターを含む宿主細胞又は複数の宿主細胞を提供する。

30

【0013】

別の態様は、診断又は医学における使用のための、特に、癌の診断又は治療における使用のための当該Her2結合タンパク質、又は当該Her2結合タンパク質をコードする核酸分子、又は当該Her2結合タンパク質を具えるベクター、又は当該Her2結合タンパク質を具える宿主細胞、又は当該Her2結合タンパク質を具える非ヒト宿主に関する。

【0014】

別の態様は、本発明のHer2結合タンパク質、本発明の核酸分子、本発明のベクター、又は本発明の宿主細胞を具える、好ましくは、癌の診断又は治療における使用のための組成物に関する。

40

【0015】

本発明の別の態様は、本発明の前述の態様のいずれかのHer2結合タンパク質の製造方法に関し、適切な条件下で宿主細胞を培養するステップ、及び、任意に、その製造されたHer2結合タンパク質を単離するステップを具える。

【0016】

発明の概要は、必ずしも本発明の全ての特徴を説明するものではない。他の実施形態は、以下の詳細な説明から見て明らかになるだろう。

【図面の簡単な説明】

50

【 0 0 1 7 】

図面は以下を示す。

【図1】図1は、Her2結合アフィリン分子を示す。図1Aは、Her2結合タンパク質を生成するために置換されるジユピキチン(配列番号:4)の位置を列挙する。一列目には、対応するアミノ酸の位置が列挙される。全てのHer2結合タンパク質(例えば、配列番号:5-38)は少なくとも、配列番号:4のR42、I44、H68、V70、R72、L73、R74、K82、L84、Q138、K139、E140、S141、及びT142位から選択される12の位置において置換される。表中の「.」は、例えば、配列番号:6、31、33、34、35、36、及び37で例示のように野生型位置(変更なし)を指す。図1Bは、図1Aと同様のアミノ酸交換を示すが、交換は以下のコードにより翻訳され、アミノ酸を同様の生物物理特性でグループ化する。波線「~」は「極性アミノ酸(T、S、N、又はQ)」の記号であり、「H」は疎水性アミノ酸(例えば、A、M、L、V、I)の記号であり、「O」は芳香族アミノ酸(例えば、F、W、Y)の記号であり、「+」は塩基性アミノ酸(例えば、K、R、H)の記号であり、「-」は酸性アミノ酸(例えば、D、E)の記号であり、「G」はグリシンに対応する。図1Cは、更なる置換を列挙する。つまり、全てのHer2結合タンパク質は、配列番号:4のアミノ酸R42、I44、H68、V70、R72、L73、R74、K82、L84、Q138、K139、E140、S141、及びT142位から選択される少なくとも12の置換に加えて、0、1、2、3、4、5、又は6の更なる修飾を有する。図1Dは、図1Cと同様のアミノ酸交換を示すが、交換は図1Bで説明した同様の生物物理特性を有するアミノ酸をグループ化するコードに従って翻訳される。

10

20

【図2】図2は、Her2結合アフィリン分子(例えば、配列番号:5-38)の生化学的キャラクタライゼーションを示す。ここで示すのは、SPRアッセイ(Biacore; 表の3列目)及び温度安定性(DSF; 表の4列目)から得られる結合合親和性(K_D)である。

【図3】図3は、SPR(Biacore)を用いたラベルフリーの相互作用アッセイを介したHer2結合タンパク質の分析を示す。チップ(Biacore)上に固定されたHer2への結合について、アフィリタンパク質の異なる濃度(0、0.137、0.4115、1.2345、3.7037、11.11、及び33.33nM)が分析され、アフィリタンパク質とHer2との間の相互作用を分析した。図3Aは、アフィリン142628のHer2への結合キネティクスを示す。図3Bは、アフィリン144633のHer2への結合キネティクスを示す。

30

【図4】図4は、細胞のHer2への結合を確認するHer2結合タンパク質の機能的キャラクタライゼーションを示す。図は、FACS分析により決定した、外来性のHer2を発現するSkBr3細胞への結合を示す。Her2結合タンパク質(「アフィリン」)は、SkBr3細胞(ダークグレーのバー)上に50nMで結合を示し、HEK/293細胞上には活性を示さない(図4A及び図4Bを参照)。Her2を発現するSkBr3への弱い結合又は無結合が、アフィリン142655(「142655」という)、アフィリン141965、アフィリン142465(「142465」という)、アフィリン142502(「142502」という)、及びジユピキチン(「ジユピ」という)について見られた。

40

【図5】図5は、フローサイトメトリー分析により決定される、外来性のHer2を発現するSkBr3細胞へのHer2結合タンパク質の濃度依存性の機能的結合を示す。ここに示すのは、結合タンパク質の333nMから5.6pMの希釈系列である。アフィリン141926(図5A)及びアフィリン141890(図5B)は、SkBr3細胞上の濃度依存性結合を示す。

【図6】図6は、フローサイトメトリー分析により決定される、外来性のHer2を過剰発現するCHO-K1細胞への結合を確認するHer2結合タンパク質の機能的キャラクタライゼーションを示す。Her2結合タンパク質は、50nM、5nM、及び0.5nMの濃度でCHO-K1-Her2細胞上への結合を示す。図6Aは、アフィリン14

50

2627、アフィリン 142628、アフィリン 142654、及びアフィリン 141884のHer2結合を示す；図6Bは、アフィリン 144631、アフィリン 144632、アフィリン 144633、アフィリン 144634、アフィリン 144635、アフィリン 144636、アフィリン 144637の細胞のHer2結合を示し、図6Cはアフィリン 144567の細胞のHer2結合、及び500nMでの142502の低レベルのみの結合を示す。従って、細胞のHer2結合は、試験を行った最小の濃度でも142502を除く全ての結合分子について確認された。ジユピキチンはCHO-K1-Her2-細胞上で結合を示さなかった（例えば、図6Bに示す）。【図7】図7は、アフィリン 142628の濃度依存性結合を示す。図は、フローサイトメトリー（FACS分析）（対照：空ベクター CHO-K1-pEntry細胞）により決定される、外来性のHer2を発現するCHO-K1細胞へのアフィリン 142628の結合を示す。50nM、5nM、0.5nMの異なるアフィリンタンパク質濃度でのヒストグラムが、ジユピキチン139090（配列番号：4）と比較して示される。アフィリン 142628は、Her2過剰発現細胞株上での濃度依存性シフトを引き起こす。

10

【図8】図8は、フローサイトメトリーにより決定される、外来性のHer2を発現するSkBr3-細胞へのHer2結合タンパク質の濃度依存性の機能的結合を示す。Her2過剰発現SkBr3細胞との相互作用を分析するのに、アフィリン 142628の100nMから0.06pMの希釈系列が用いられた。図8は、アフィリン 142628の濃度依存性結合を示す。

20

【図9】図9は、免疫蛍光染色による、Her2-過剰発現SkBr3-細胞上の異なるHer2結合タンパク質の結合分析を示す。図9Aは、アフィリン 141884、アフィリン 142628、アフィリン 141926、アフィリン 144637、アフィリン 142418の50nMの濃度を示す。図9Bは、アフィリン 144567、ジユピキチン（139090）、PBS、及びトラスツズマブ（ハーセプチン）の50nMの濃度を示す。アフィリン 141884、アフィリン 142628、アフィリン 141926、アフィリン 144637、アフィリン 142418は、Her2-過剰発現細胞株上への強力な結合を示す一方、アフィリン 144567及びジユピキチン（139090）はSkBr3細胞上のHer2に結合しない。

30

【図10】図10は、Her2結合タンパク質がSKOV-3異種移植片腫瘍組織に結合することを確認する。ここで示されるのは、ヒトの卵巣腺癌細胞から由来したHer2-発現腫瘍組織上の50nMのアフィリン 141884及び50nMのアフィリン 142628の免疫組織学的な染色である。アフィリン 141884及びアフィリン 142628は、Her2を発現する組織上への強い結合を示す。ジユピキチン（139090）はSKOV-3組織スライドに結合しないことを示す。

40

【図11】図11は、Her2-発現SKOV-3-腫瘍組織スライド、及びHer2発現のない肺組織スライド上のHer2結合タンパク質の免疫組織学的結合分析を示す。アフィリン 141884及びアフィリン 142628はSKOV-3組織上の20nMの強力な結合を示す。肺組織への結合は見られなかった。更に、肝臓、心筋、及び卵巣から得られた組織へのアフィリン 141884及びアフィリン 142628の結合は見られなかった。

【図12】図12は、アフィリン 142628及びアフィリン 143692が異なるHer2エピトープに結合することを示す（競合分析；結合分析SPR）。これらのHer2結合タンパク質は、Her2結合に関して競合せず、従って、Her2と異なる又は非重複のエピトープを用いている。

【図13】図13は、Her2結合タンパク質アフィリン 142628及びアフィリン 143692がトラスツズマブ（ハーセプチン）以外の異なるHer2エピトープに結合することを示す。

【図14】図14は、二重特異性融合タンパク質のHer2及びEGFRへの同時結合を示す。Her2結合タンパク質のEGFR特異的モノクローナル抗体（セツキシマブ）へ

50

の融合は、融合タンパク質配列番号：44 - 47の例に示すように、二重特異的標的化を可能とする。

【図15】図15は、Her2過剰発現CHO K1細胞（図15B）上、及びEGFR過剰発現CHO K1細胞（図15B）上でのセツキシマブ（CL-14926；配列番号：44）の軽鎖のC末端に融合する、Her2特異的アフィリンを具える二重特異的融合タンパク質のフローサイトメトリック結合分析を示す。融合タンパク質は、両方の細胞外標的への結合を示す。図では、蛍光強度の中央値（MFI）を示し、示された濃度でのアフィリン抗体融合タンパク質のEGFR及びHer2発現細胞への結合を表す。

【発明を実施するための形態】

【0018】

本発明を以下でより詳細に説明する前に、本明細書に記載の特定の方法、プロトコル、及び試薬は変化することがあるため、本発明はこれらに限定されないことを理解すべきである。本明細書で用いられる用語は特定の実施例を説明する目的のためだけであり、添付の特許請求の範囲によってのみ限定される本発明の範囲を限定することを意図していない、ということも理解すべきである。特に定義がない限り、本明細書で用いられる全ての技術的及び科学的用語は、本発明が属する技術分野における通常の知識を有する者に共通に理解されるものと同様の意味を有する。

【0019】

好ましくは、本明細書で用いられる用語は、“A multilingual glossary of biotechnological terms: (IUPAC Recommendations)”, Leuenberger, H. G. W., Nagel, B. and Koelbl, H. eds. (1995), Helvetica Chimica Acta, CH-4010 Basel, Switzerland)に記載の通り定義される。

【0020】

以下に続く本明細書及び特許請求の範囲を通じて、文脈上必要とする場合を除き、“comprise”の語、及び“comprises”、“comprising”等の変形は、記載した整数若しくはステップ、又は整数若しくはステップの群を含むことを意味し、他の如何なる整数若しくはステップ、又は整数若しくはステップの群を排除することではないことが理解されるだろう。幾つかの文献（例えば、特許、特許出願、科学的刊物、製造業者の仕様書、指示書、GenBank Accession Number sequence submissions、等）が本願の明細書を通して引用される。記載したものは、本発明が先行発明によりそのような開示に先行する権利がないことの自認として構成されるべきではない。本明細書で引用される文献の一部は、「参照により組み込まれる」ものとしてみなされる。そのように組み込まれた参照の定義又は教示と、本明細書に記載の定義又は教示との間に不一致が生じる場合、本明細書の記載を優先する。

【0021】

本明細書で言及される全ての配列は、添付の配列表に開示され、その配列表は全ての内容及び開示とともに本明細書の一部である。

【0022】

[本願で用いられる重要な用語の一般的定義]

「タンパク質」及び「ポリペプチド」の用語は、ペプチド結合により連結された任意の2以上のアミノ酸鎖を指し、産物の特定の長さを指さない。従って、「ペプチド」、「タンパク質」、「アミノ酸鎖」、又は2以上のアミノ酸鎖を指すのに用いられる任意の他の用語は「ポリペプチド」の定義内に含まれ、「ポリペプチド」の用語は、これらの用語のいずれかに代わり又は置き換えて用いることができる。「ポリペプチド」の用語は、グリコシル化、アセチル化、リン酸化、アミド化、タンパク質分解切断、非天然アミノ酸による修飾、及び当技術分野で周知の同様の修飾を含むがこれらに限定されない、ポリペプチドの翻訳後修飾の産物を指すことをも意図している。従って、2以上のタンパク質部分を具える結合タンパク質も、「タンパク質」又は「ポリペプチド」の用語の定義に該当する

10

20

30

40

50

。

【0023】

「ユビキチン」又は「非修飾ユビキチン」の用語は、配列番号：1によるユビキチン、及び配列番号：2（標的への結合に影響しない45、75、76位での点変異）のよう少なくとも95%の同一性を有するタンパク質、配列番号：4によるユビキチン、配列番号：48によるジユビキチンのような少なくとも95%同一性を有するタンパク質、以下の定義によるタンパク質を指す。哺乳類、例えば、ヒト、霊長類、ブタ、及びげっ歯類からのユビキチン分子が特に好ましい。一方、ユビキチンの源は関連しない、というのは当技術分野によると、全ての真核生物ユビキチンは高度に保存され、これまで研究された哺乳類のユビキチンはアミノ酸配列について全く同一のためである。更に、任意の他の真核生物源を使用することが出来る。例えば、酵母のユビキチンは、野生型ヒトユビキチン（配列番号：1）と3つのアミノ酸が異なるのみである。

10

【0024】

「ジユビキチン」の用語は、ヘッドトウテールの方向に互いに連結される、2つの非修飾ユビキチン部分を含むタンパク質を指す。配列番号：4（野生型ユビキチンの45、75、76、151、152位の点変異；これらの点変異は標的への結合に影響しない；クローン139090）、及び配列番号：48で例を挙げる。配列番号：4と配列番号：48との間のアミノ酸配列同一性は96.7%である。本発明に係るジユビキチンは、2つのユビキチン部分からなる152のアミノ酸の人工タンパクであり、それらの2つのユビキチン部分はペプチドリンカーなしに互いに直接連結される。本明細書で理解されるジユビキチンは、配列番号：4と少なくとも95%の同一性を有するタンパク質である。

20

【0025】

「修飾ユビキチン」及び「ユビキチン変異タンパク質」及び「アフィリン（Affilin）」の用語は全て同義的に用いられ、置き換え可能である。本明細書で用いられる「修飾ユビキチン」又は「ユビキチン変異タンパク質」又は「アフィリン」は、ユビキチン変異タンパク質が、少なくとも10倍低い又は非修飾ユビキチンに存在しない標的エピトープ又は抗原に特異的な結合親和性を有する限り、アミノ酸交換、挿入、欠失、又はそれらの組み合わせによる当該非修飾ユビキチンとは異なるユビキチンの誘導体を指す。このユビキチン変異タンパク質（アフィリン；修飾ユビキチン）の機能特性は、*de novo*で作られた機能である。

30

【0026】

「アフィリン（登録商標）」（Scil Proteins GmbHの登録商標）の用語は、ユビキチン変異タンパク質に基づく非免疫グロブリン由来の結合タンパク質を指す。アフィリンタンパク質は、例えば配列番号：1に示すように、自然界に存在する又は自然界から単離された天然ユビキチンではない。本発明の範囲は、非修飾ユビキチンを除く。本発明に係るアフィリン分子はヘッドトウテール融合で互いに連結した2つの異なって修飾されたユビキチン部分、又は1つの修飾されたユビキチン部分を含む、本質的にそれからなる、若しくはそれからなるアフィリン分子のいずれかを具備する、本質的にそれからなる、若しくはそれからなる。「ヘッドトウテール融合」は、例えば本明細書に参照として組み込まれるEP2379581 B1に記載のように、（ヘッド）N C N C（テール）の方向に2つのタンパク質を連結することによりそれらのタンパク質を互いに融合するもの（タンデム分子）と理解すべきである。ヘッドの部分は第1部分として指定され、テールの部分は第2部分として指定される。このヘッドトウテール融合において、2つの部分はリンカーなしで直接連結されることがある（例えば、配列番号：5-38）。代替的に、2つのタンパク質の融合は、本明細書に記載のようにリンカー、例えばポリペプチドリンカーを介して行うことができる。

40

【0027】

「置換」は、「保存的」と「非保存的」置換とを含む。「保存的置換」は例えば、関与するアミノ酸残基の極性、電荷、サイズ、溶解性、疎水性、親水性、及び/又は両親媒性における類似性に基づいて行うことができる。アミノ酸は、以下の標準アミノ酸の群に分

50

けることが可能である：(1)疎水性側鎖：Ala(A)、Met(M)、Leu(L)、Val(V)、Ile(I)；(図1の「H」の記号)；(2)酸性極性側鎖：Asp(D)、Glu(E)；(図1の「-」の記号)；(3)塩基性側鎖極性：Lys(K)、Arg(R)、His(H)；(図1の「+」の記号)；(4)芳香族アミノ酸：Trp(W)、Tyr(Y)、Phe(F)；(図1の「O」の記号)；(5)極性アミノ酸：Thr(T)、Ser(S)、Asn(N)、Gln(Q)；(図1の「波」の記号)；(6)鎖配向に影響する残基：Gly(G)、Pro(P)；及び(7)Cys(C)。本明細書で用いられるように、「保存的置換」は、上記で示した標準アミノ酸の群の同一群内に列挙された別のアミノ酸によるアミノ酸の交換として定義される。例えば、GluによるAspの交換は、そのような修飾されたポリペプチドにおける1つの負電荷を保つ。更に、Gly及びProは、 α -ヘリックスを破壊できることに基づいて互いに置換可能である。上記の群内の一部の好ましい保存的置換は、以下の下位群内での交換である：(i)Ala、Val、Leu、及びIle；(ii)Ser及びThr；(iii)Asn及びGln；(iv)Lys及びArg；及び(v)Tyr及びPhe。既知の遺伝コード並びに、組み換え及び合成DNA技術を考慮すると、熟練した科学者は保存的アミノ酸変異体をコードするDNAを容易に構成することができる。本明細書で用いられるように、「非保存的置換」又は「非保存的アミノ酸交換」は、上記で示したアミノ酸の群(1)-(7)の異なる群に列挙した別のアミノ酸によるアミノ酸の交換と定義される。

10

【0028】

「挿入」の用語は、ユビキチンのオリジナルのアミノ酸配列へのアミノ酸の追加を具え、ここでユビキチンは顕著な構造変化を伴わずに安定したままである。当然、ループ領域は規則的な二次構造要素を連結する。ヒト非修飾ユビキチン(配列番号：1)の構造は、ベータシート及びアルファヘリックスのような二次構造要素を連結するアミノ酸領域8-11、17-22、35-40、45-47、及び50-63で6つのループを明らかにする。本発明の一実施例において、挿入と置換との組み合わせを有するユビキチン変異タンパク質を具えるHer2結合タンパク質が開示される。一実施例において、ユビキチン変異タンパク質は、好ましくはアミノ酸8-11内の最もN末端側ループ内に2-10のアミノ酸残基の挿入を有する。特に、挿入されるアミノ酸残基の数は、2、3、4、5、6、7、8、9、10で、好ましくは2-10のアミノ酸残基で、最も好ましくは6-9のアミノ酸残基である。

20

30

【0029】

本発明により用いられる「抗体」の用語は、2つの重鎖と2つの軽鎖(免疫グロブリン又はIgG抗体)とを有するモノクローナル抗体を具える。更に、結合特異性を保つそれらの断片又は誘導体も、「抗体」の用語に含まれる。「抗体」の用語は、キメラ(ヒト定常ドメイン、非ヒト可変ドメイン)、単鎖及びヒト化(非ヒトCDRを除くヒト抗体)抗体のような実施例も含む。2つの重鎖及び2つの軽鎖からなる全長IgG抗体が、本発明で最も好ましい。重鎖及び軽鎖は、非共有結合性の相互作用及びジスルフィド結合を介して連結される。

【0030】

本明細書において、「標的抗原」、「標的」、「抗原」、及び「結合パートナー」の用語は、全て同義的に用いられ、交換可能である。好ましくは、標的は、本明細書で以下に定義する複数の標的のうちの一つである。「抗原」の用語は、本明細書で用いられるように広い意味で解釈されるべきで、本発明の結合タンパク質の結合部分により結合される任意の標的部分を含む。

40

【0031】

本発明による「結合可能なタンパク質」又は「結合タンパク質」又は「結合Her2」又は「結合親和性」は、定義された標的抗原への結合能を具えるタンパク質を指す。「Her2結合タンパク質」の用語は、Her2に対する高親和性結合能を有するタンパク質を指す。

【0032】

50

「抗原結合部位」は、抗原との相互作用を提供する抗原結合分子の部位、つまり1以上のアミノ酸残基を指す。天然の免疫グロブリン分子は、典型的には2つの抗原結合部位を有し、Fab分子は、典型的には単一の抗原結合部位を有する。

【0033】

「エピトープ」の用語は、本明細書で定義されるような抗原結合タンパク質により結合可能な任意の分子決定基を含み、抗原を標的とする抗原結合タンパク質により結合される標的抗原の領域であり、抗原がタンパク質の場合、抗原結合タンパク質と直接接触する特定のアミノ酸を含んでよい。立体配座エピトープでは、アミノ酸残基が一次配列では分離するが、ポリペプチドが天然三次元構造に折りたためられると、分子の表面では互いに近くに位置する。リニアエピトープは、タンパク質鎖の単一のリニアセグメントに隣接して位置する2以上のアミノ酸残基により特徴付けられる。その他の場合、エピトープはグリシコル化、リン酸化、硫酸化、アセチル化、脂肪酸、又はその他のような標的タンパク質の翻訳後修飾からの決定基を含むことができる。

10

【0034】

「融合した」という語は、成分（例えば、アフィリン分子及びモノクローナル抗体、又はFabフラグメント）がペプチド結合により直接又はペプチドリinkerを介して連結されることを意味する。

【0035】

「融合タンパク質」の用語は、少なくとも第2のタンパク質に遺伝子的に結合する少なくとも第1のタンパク質を具えるタンパク質に関する。融合タンパク質は、もともと別個のタンパク質をコード化する2以上の遺伝子の結合を通じて作られる。従って、融合タンパク質は、単一のリニアポリペプチドとして発現する、異なる又は同一の結合タンパク質のマルチマーを具えることができる。それは、1、2、3、又はそれ以上の第1の及び/又は第2の結合タンパク質を具えることができる。本明細書で用いられる融合タンパク質は、例えばモノクローナル抗体又はその断片のような少なくとも第2の結合タンパク質と融合される少なくとも第1の結合タンパク質（例えば、アフィリン）を具える。そのような融合タンパク質は、例えば、多量体化部分、ポリペプチドタグ、ポリペプチドリinker等を含むがそれらに限定されない、標的の結合と関わりのない追加のドメインを更に具えることができる。

20

【0036】

本明細書で用いられる「コンジュゲート」という語は、第2のタンパク質又は非タンパク質性部分等の他の物質に化学的に付着した少なくとも第1のタンパク質を具える、又は本質的に第1のタンパク質からなるタンパク質に関する。コンジュゲーションは、有機合成により、又は酵素的な翻訳後修飾の自然過程を含む酵素の使用により行うことができる。タンパク質コンジュゲートの例は、糖タンパク質（炭水化物成分とコンジュゲートしたタンパク質）又はリポタンパク質（脂質成分とコンジュゲートしたタンパク質）である。分子は、例えば任意の形のリンカーを通して1又はいくつかの部位に付着可能である。化学結合は、置換（例えば、N-スクシンイミジル化学）、付加又は付加環化（例えば、マレイミド化学又はクリックケミストリー）又は酸化化学（例えば、ジスルフィド形成）を含む、当業者に周知の化学構造により行うことが可能である。本発明のタンパク質に化学的に付着した非タンパク質のポリマー分子のいくつかの例は、ヒドロキシエチルスターチ、ポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール、樹枝状ポリマー、又はポリオキシアルキレン、その他である。

30

40

【0037】

融合タンパク質又はタンパク質コンジュゲートは、1以上の反応基、又はリガンドのようなペプチド性又は非ペプチド性部分、又は放射性核種若しくはトキシンのような治療上或いは診断上関連する分子を更に具えてよい。また例えば、糖、オリゴ糖、多糖、脂肪酸等の小さい有機又は非アミノ酸ベースの化合物も具えてよい。対象のタンパク質をそのような非タンパク質成分に付着させる方法はこの技術分野で周知であり、従ってここでは更に詳細に説明しない。

50

【0038】

「二重特異性結合分子」又は「多重特異的な結合分子」の用語は、抗原結合分子が2又は多数の異なるエピトープに特異的に結合可能であることを意味する。典型的に、二重特異性抗原結合分子は2つの抗原結合部位を具え、各々が異なるエピトープに対して特異的である。特定の実施例において、二重特異性抗原結合分子は、2つのエピトープ、特に2つの異なる細胞上で発現される2つのエピトープに同時に結合することができる。「二重特異性結合分子」又は「二重特異性結合タンパク質」の用語は、本発明の結合タンパク質が2つの異なるエピトープに結合可能であることを意味する。また、本発明の二重特異性結合分子は、2つの異なるエピトープに同時に結合可能である。このことは、二重特異性コンストラクトは、少なくとも1つのエピトープ「A」及び少なくとも1つのエピトープ「B」に同時に結合可能であり、ここで「A」及び「B」は同一ではない。2つのエピトープは、同一又は異なる標的抗原に位置してよく、それは、本発明の融合分子が1つの標的を、2つの異なるエピトープ又は2つの標的抗原でそれぞれの1つのエピトープと結合できることを意味する。同様に、「多重特異性結合分子」は同時に複数のエピトープに結合可能で、ここでエピトープは同一又は異なる抗原に位置してよい。

10

【0039】

代替的に、当該結合タンパク質は、同一又は異なる標的分子上の異なる非重複エピトープに結合することができ、従って、例えばエピトープAB、BC、AD、ABC、又はABCDにそれぞれ結合する、 $\left(\begin{smallmatrix} A \\ B \end{smallmatrix} \right)$ 、 $\left(\begin{smallmatrix} B \\ C \end{smallmatrix} \right)$ 、 $\left(\begin{smallmatrix} A \\ D \end{smallmatrix} \right)$ 、 $\left(\begin{smallmatrix} A \\ B \\ C \end{smallmatrix} \right)$ 、 $\left(\begin{smallmatrix} A \\ B \\ C \\ D \end{smallmatrix} \right)$ という、二重特異性、三重特異性、多重特性等に分類される。例えば、Her2特異的アフィリン及び抗EGFR-モノクローナル抗体を有する融合タンパク質は、二重特異性である。

20

【0040】

「多量体結合分子」の用語は、結合タンパク質 $\left(\begin{smallmatrix} A \\ B \end{smallmatrix} \right)$ 、及び/又は $\left(\begin{smallmatrix} A \\ B \\ C \end{smallmatrix} \right)$ 等の2以上の部分（つまり、二価又は多価）、例えば、 $\left(\begin{smallmatrix} A \\ B \\ C \end{smallmatrix} \right)$ 、 $\left(\begin{smallmatrix} A \\ B \\ C \\ D \end{smallmatrix} \right)$ 、 $\left(\begin{smallmatrix} A \\ B \\ C \\ D \\ E \end{smallmatrix} \right)$ 、 $\left(\begin{smallmatrix} A \\ B \\ C \\ D \\ E \\ F \end{smallmatrix} \right)$ 等を含む、多価及び/又は多重特異性である融合タンパク質を指す。例えば、 $\left(\begin{smallmatrix} A \\ B \\ C \end{smallmatrix} \right)$ は三重特異性で、エピトープAに対して二価である。例えば、本明細書に記載のHer2特異的アフィリン及びモノクローナル抗体の融合タンパク質は、これらが少なくとも2つの結合タンパク質（例えば、アフィリン及びモノクローナル抗体）を具えるため、少なくとも「二価」である。当該結合タンパク質は、例えば、結合タンパク質の組成が、 $\left(\begin{smallmatrix} A \\ B \end{smallmatrix} \right)_2$ 、 $\left(\begin{smallmatrix} A \\ B \\ C \end{smallmatrix} \right)_3$ 、 $\left(\begin{smallmatrix} A \\ B \\ C \\ D \end{smallmatrix} \right)_4$ 、 $\left(\begin{smallmatrix} A \\ B \end{smallmatrix} \right)_2$ 、 $\left(\begin{smallmatrix} A \\ B \\ C \end{smallmatrix} \right)_3$ 、 $\left(\begin{smallmatrix} A \\ B \\ C \\ D \end{smallmatrix} \right)_4$ 等と記載される、標的抗原（単一特異的）上の同一又は重複エピトープに特異的に結合してよい。この場合、融合分子は単一特異性であるが、エピトープA又はエピトープBに対して二価、三価、四価、又は多価である。

30

【0041】

「アミノ酸配列同一性」の用語は、2以上のタンパク質のアミノ酸配列の同一性（又は差異）の定量的比較を指す。基準ポリペプチド配列に対する「パーセント（%）アミノ酸配列同一性」は、配列を並べて、必要に応じてギャップを導入して最大パーセント配列同一性を達成した後の、基準ポリペプチド配列におけるアミノ酸残基と同一である配列におけるアミノ酸残基のパーセンテージとして定義される。

【0042】

配列同一性を決定するために、クエリータンパク質の配列が基準タンパク質の配列に対して、例えば、配列番号：4（ジユピキチン）又は配列番号：1（ユピキチン）に対して並べられる。整列方法は、当分野において周知である。例えば、配列番号：4又は配列番号：1のアミノ酸配列に対する任意のポリペプチドのアミノ酸配列同一性の程度を決定するのに、好ましくはSIMローカル類似性プログラムが用いられ（Xiaoquin Huang and Webb Miller (1991), *Advances in Applied Mathematics*, vol. 12: 337-357）、無料で入手可能である（<http://www.expasy.org/tools/sim-prot.html>）についても参照のこと。多重整列分析については、好ましくは、ClustalWが用いられる（Thompson et al. (1994) Nu

40

50

c l e i c A c i d s R e s . , 2 2 (2 2) : 4 6 7 3 - 4 6 8 0) 。

【 0 0 4 3 】

本発明の文脈において、修飾配列と元となる配列（「親配列」ともいう）との配列同一性の程度は一般的に、明示的な示されない限りは、非修飾配列の全長に対して計算される。所定の位置の基準アミノ酸配列と異なるクエリー配列の各アミノ酸は、1つの相違として数えられる。クエリー配列における挿入又は欠失も1つの差異として数えられる。例えば、2つのユビキチン部分間でのリンカーの挿入は、基準配列と比較して1つの差異として数えられる。次に、相違の合計は、基準配列の長さに関連し、非同一のパーセンテージが得られる。同一性の定量的パーセンテージは、100から非同一性のパーセンテージを引いて計算される。非修飾ユビキチンに対して並べられたユビキチン変異タンパク質の同一性を決定する特定の事例において、特に45、75、及び/又は76位における差は、ユビキチン変異タンパク質の新規の結合能力に関係がないため、数えられない。ユビキチン部分は、アミノ酸残基45、75、及び/又は76で結合能に影響を与えることなく修飾可能だが、当該修飾は、恐らくは変異タンパク質の生化学的特性の修飾実現に関連する。一般的に、修飾の出発物質として用いられるユビキチンは、配列番号：1に対して少なくとも95%、少なくとも96%、又は少なくとも97%のアミノ酸同一性、又は少なくとも98%のアミノ酸配列同一性を有する。従って、例えば、基準配列に対して95%「同一」であるポリペプチドは、例えば、基準配列と比較して100のアミノ酸毎に5つの点変異又は4つの点変異及び1の挿入等をもつことができる。

10

【 0 0 4 4 】

「解離定数」又は「 K_D 」の用語は、特定の結合親和性を定義する。本明細書で用いられるように、「 K_D 」の用語（通常は「 mol/L 」で測定されるが、「 M 」と省略されることもある）は、第1の化合物と第2の化合物との特定の相互作用の解離平衡定数を指すことを意図している。本発明の文脈において、 K_D の用語は特に、Her2結合タンパク質とHer2との結合親和性を説明するのに用いられる。高親和性は、 K_D の低い値に対応する。従って、「少なくとも例えば $10^{-7} M$ の K_D 」という表現は、 $10^{-7} M$ 以下の値（より強く結合する）を意味する。 $1 \times 10^{-7} M$ は100 nMに対応する。 $10^{-5} M$ から $10^{-12} M$ までの値は、定量可能な結合親和性で見なすことができる。用途に応じて、 $10^{-7} M$ から $10^{-12} M$ の値は、クロマトグラフ的用途、又は診断若しくは治療的用途に好適である。本発明に従って、標的結合に対する親和性は、 $7 \times 10^{-7} M$ （700 nM）以下の範囲である。最終的な標的結合親和性は、 $10^{-9} M$ （1 nM）以下が理想である。

20

30

【 0 0 4 5 】

本発明の結合タンパク質は、リンカーなしに直接連結する2つのユビキチン変異タンパク質を具え、ジユビキチン（配列番号：4又は配列番号：48）の42、44、68、70、72、73、74、82、84、138、139、140、141、及び142から選択される少なくとも12、13又は14位での置換を有する特異的且つ高親和性Her2結合タンパク質であり、任意に、0、1、2、3、4、5又は6の更なる置換をもたらす。

【 0 0 4 6 】

本発明の結合タンパク質は、他の機能的タンパク質部分に、例えば遺伝子的に融合可能である。本発明のそのような融合タンパク質の文脈において、「リンカー」の用語は、単一のアミノ酸、又は少なくとも2つの他のタンパク質部分を共有結合的に連結するポリペプチドに指す。リンカーは、第1のタンパク質及び第2のタンパク質、又はタンパク質部分に例えば遺伝子的に融合され、単一のリニアポリペプチド鎖を生成する。リンカーの長さ及び組成は、少なくとも1から約50までのアミノ酸で変えてよい。好ましくは、リンカーの長さは、1から30のアミノ酸である。より好ましくは、ペプチドリナーは1から20のアミノ酸、例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19又は20のアミノ酸の長さを有している。ペプチドリナーのアミノ酸配列は、ヒトへの免疫原性がなく、プロテアーゼに対して安定

40

50

であり、任意に、二次構造を形成しないことが好ましい。グリシリン又はセリンのような小さいアミノ酸を含むリンカーを例とする。リンカーはグリシンに富むものとすることができる（例えば、リンカーの残基の50%以上をグリシン残基とすることができる）。グリシン及びセリン残基のみからなる可変長のグリシン セリン リンカーが好ましい。一般的には、構造 $(SGGG)_n$ のリンカー又はSGGGの順列、例えば $(GGGS)_n$ 、を用いることができ、ここでnは1から6の任意の数字、好ましくは1又は2又は3とすることができる。また、更なるアミノ酸を具えるリンカーも好ましい。タンパク質の遺伝的融合のための他のリンカーが当分野において周知で、それを用いることができる。本発明の一実施例において、第1の結合タンパク質（例えば、アフィリン）及び第2の結合タンパク質（例えば、モノクローナル抗体又はその断片）は、 $(G_3S)_4$ リンカーを介して連結される。

10

【0047】

本発明の結合タンパク質の化学コンジュゲートの場合、「リンカー」の用語は任意の化学部分、又はポリエチレングリコール、その他といった化学ポリマーを指す。その化学部分は、Her2結合タンパク質を他のタンパク質性又は非タンパク質性部分と、共有結合的に、又は非共有結合的に（例えば、水素結合、イオン性相互作用、又はファンデルワールス相互作用であり、2つの異なる部分に付着した2つの相補的核酸が互いにハイブリタイズするようなもの）結び付けるものである。そのようなリンカーは、タンパク質のアミノ酸側鎖、N末端 - アミノ又はC末端カルボキシル基を通じてタンパク質への化学的付着を可能とする反応基、を具えてよい。そのようなリンカー及び反応基は、当業者に周知であり、これ以上説明しない。

20

【0048】

Her2（ヒト上皮成長因子受容体2；同義名はErbB 2、Neu、CD340又はp185）は、1984年に最初に記述された185 kDaの受容体である（Schlechter et al. (1984) Nature 312:513-516）。この遺伝子の増幅又は過剰発現は、ある侵襲性の乳癌の発症及び進行で重要な役割を果たすことが示され、Her2は疾病の重要なバイオマーカー及び治療の標的として知られている。Her2が担う他の腫瘍は卵巣癌及び胃癌を含む。ヒトHer2は、NCBIアクセッション番号NP_004439により表され、Her2の細胞外領域（残基1-652）はユニプロットアクセッション番号p04626により表される。「Her2」の用語は、NP_004439に対して少なくとも70%、80%、85%、90%、95%、96%、又は97%以上、又は100%の配列同一性を示し、Her2の機能性を有する、全てのポリペプチドを具える。

30

【0049】

[発明の実施例の詳細な説明]

本発明のHer2結合タンパク質は、ヘッドトゥーテール方向でリンカーなしに直接結びついた、2つの異なって修飾されたユビキチン部分を具え、本質的にそれからなり、又はそれからなる。本発明のHer2結合タンパク質は、ジユビキチン（配列番号：4）に対して少なくとも85%のアミノ酸同一性を有し、つまり、Her2に対するジユビキチン（配列番号：4）の新規の結合特性を生成するのに、最大で23のアミノ酸がジユビキチン（配列番号：4）で修飾される（合計152のアミノ酸）。新規のHer2結合タンパク質の更に好ましいアミノ酸同一性は、ジユビキチン（配列番号：4）に対して少なくとも86%、少なくとも87%（修飾された20のアミノ酸に相当）、少なくとも88%、又は少なくとも89%、少なくとも90%（修飾された15のアミノ酸に相当）、少なくとも91%（修飾された14のアミノ酸に相当）、少なくとも92%（修飾された12のアミノ酸に相当）である。従って、本発明のHer2結合タンパク質は、ジユビキチンに対して85%から92%の同一性、より好ましくはジユビキチンに対して87%から91%の同一性を示す。Her2に対して700nM以下の結合親和性（ K_D ）を有する本発明のHer2結合タンパク質は、ジユビキチン（配列番号：4）によるアミノ酸配列を具え、本質的にそれからなり、又はそれからなる。ここで、ジユビキチン（配列番号：4

40

50

) の R 4 2、I 4 4、H 6 8、V 7 0、R 7 2、L 7 3、R 7 4、K 8 2、L 8 4、Q 1 3 8、K 1 3 9、E 1 4 0、S 1 4 1 及び T 1 4 2 位から選択される少なくとも 1 2、1 3、又は 1 4 のアミノ酸から選択されるアミノ酸が置換され、ここで、Her 2 結合タンパク質は、ジユピキチン（配列番号：4）に対して少なくとも 8 5 % の配列同一性を有する。本発明に記載される Her 2 結合タンパク質は、配列番号：4 に対して 9 2 % 以下の配列同一性を示す。好ましい Her 2 結合タンパク質は、R 4 2、I 4 4、H 6 8、V 7 0、R 7 2、L 7 3、R 7 4、K 8 2、L 8 4、Q 1 3 8、K 1 3 9、E 1 4 0、S 1 4 1 及び T 1 4 2 から選択される少なくとも 1 2、1 3、又は 1 4 のアミノ酸が置換される限り、ジユピキチン（配列番号：4）に対して少なくとも 8 5 % を有する 1 5 2 のアミノ酸を具える。全ての Her 2 結合タンパク質は、R 4 2、V 7 0、R 7 2、L 7 3、K 8 2、L 8 4、Q 1 3 8、K 1 3 9、E 1 4 0、及び T 1 4 2 位で、好ましくは I 4 4、H 6 8、R 7 4、及び S 1 4 1 位で置換を有する。驚くことに、配列番号：4 の当該 1 2、1 3 又は 1 4 位における置換の特定の組み合わせは、高親和性の Her 2 結合タンパク質をもたらす。これらのタンパク質は、de novo で作られた人工タンパク質である。本発明の Her 2 結合タンパク質は天然には存在しない。de novo で作られた Her 2 結合タンパク質の例は、配列番号：5 - 3 8 に提供される。

10

【0050】

Her 2 結合タンパク質は、ジユピキチン（配列番号：4）の 4 2、4 4、6 8、7 0、7 2、7 3、7 4、8 2、8 4、1 3 8、1 3 9、1 4 0、1 4 1 及び 1 4 2 位から選択される少なくとも 1 2 の位置で置換され、例えば、配列番号：2 9、3 3 では更なる置換を有さず、例えば配列番号：2 7、2 8、3 1、3 2 では 1 つの追加の置換を有し、例えば配列番号：1 4、1 6、2 1、2 5、2 6、3 0、3 5 は 2 つの追加の置換を有し、例えば配列番号：6、1 2、1 3、1 5、1 7、1 8、2 0、3 4、3 6 は 3 つの追加の置換を有し、例えば配列番号：1 0、1 1、1 9、2 2、2 3、2 4 は 4 つの追加の置換を有し、例えば配列番号：5、7、8、9 は 5 つの追加の置換を有し、配列番号：3 7 は 6 つの追加の置換を有する。例えば、配列番号：4 の 4 2、4 4、6 8、7 0、7 2、7 3、7 4、8 2、8 4、1 3 8、1 3 9、1 4 0、1 4 1 及び 1 4 2 位における少なくとも 1 2 の置換のほかにも更なる 1、2、3、4、5 又は 6 の置換は、好ましくは配列番号：4 の 6、1 0、1 1、1 5、2 0、2 1、2 3、2 7、2 8、3 1、3 4、3 6、4 0、4 6、4 8、4 9、5 2、5 8、6 2、6 3、7 5、7 8、8 8、9 2、9 5、9 6、9 8、1 1 4、1 2 0、1 2 4、1 3 1、1 3 3、1 4 4、及び / 又は 1 4 7 位から選択されてよい（図 1 及び表 1 を参照）。

20

30

【0051】

表1・本発明のHer2結合タンパク質 - 置換数及び配列番号4に対する同一性の程度

配列番号	42、44、68、70、72、73、74、82、84、138、139、140、141、及び142位における置換数	追加の置換数	置換の総数	配列番号4に対する同一性の%
5	14	6	20	86.8
7	14	6	20	86.8
8	14	6	20	86.8
9	14	6	20	86.8
10	14	5	19	87.5
11	14	5	19	87.5
19	14	5	19	87.5
22	14	5	19	87.5
23	14	5	19	87.5
24	14	5	19	87.5
12	14	4	18	88.2
13	14	4	18	88.2
15	14	4	18	88.2
17	14	4	18	88.2
18	14	4	18	88.2
20	14	4	18	88.2
14	14	3	17	88.9
16	14	3	17	88.9
21	14	3	17	88.9
25	14	3	17	88.9
26	14	3	17	88.9
30	14	3	17	88.9
25	14	3	17	88.9
6	13	4	17	88.9
36	13	4	17	88.9
27	14	2	16	89.5
28	14	2	16	89.5
32	14	2	16	89.5
34	12	4	16	89.5
29	14	1	15	90.3
31	13	2	15	90.3
33	12	1	13	91.4

10

20

30

40

50

【0052】

Her2結合タンパク質の多くの例が本発明で提供される（例えば、図1a、配列番号：5-38を参照）。本発明のHer2結合アフィリン分子は、700nM未満、500nM未満、100nM未満、20nM未満、10nM未満（例えば、配列番号：6、14、15、18、22、24、25、26、28、35、36、38）、及びより好ましくは1nM未満（例えば、配列番号：7、8、9、10、11、12、13、16、17、19、20、23）の計測可能な結合親和性（Biacoreにより決定された結合親和性；例えば図2を参照）をもって、Her2の単離された細胞外ドメインに結合する。ジユピキチン（配列番号：4）は本来、如何なる計測可能な結合親和性をもってもHer2に結合することはない。本発明の全てのHer2結合タンパク質は、高親和性をもって、Her2に対してde novoで生み出された結合を示す。

【0053】

ジユピキチン（配列番号：４）に基づくHer 2結合タンパク質の好ましい置換は、70及び140位から選択されるアミノ酸の芳香族アミノ酸による置換である。ジユピキチン（配列番号：４）に基づくHer 2結合タンパク質の更に好ましい置換は、42位から選択されるアミノ酸の極性アミノ酸による置換で、44位は疎水性又は極性アミノ酸により置換され、68位は芳香族アミノ酸により置換され、72位は極性又は芳香族アミノ酸により置換され、73位は塩基性又は酸性アミノ酸以外の任意のアミノ酸により置換され、74位は芳香族、塩基性又は極性アミノ酸により置換され、82位は塩基性又は酸性アミノ酸以外の任意のアミノ酸により置換され、84位は塩基性又は酸性アミノ酸により置換され、138位は塩基性又は酸性又は極性アミノ酸により置換され、139位は酸性又は疎水性アミノ酸又はグリシンにより置換され、141位は疎水性又は極性又は塩基性アミノ酸により置換され、及び/又は142位は疎水性又は極性アミノ酸により置換される。ジユピキチン（配列番号：４）に基づくHer 2結合タンパク質の好ましい置換は、R42T、R42S、R42L、I44A、I44V、I44S、I44T、H68W、H68Y、H68F、V70Y、V70W、R72T、R72F、R72G、R72Y、L73W、L73S、L73V、L73I、R74Y、R74S、R74N、R74K、K82T、K82L、K82N、K82I、K82Y、L84H、L84D、L84E、L84S、Q138S、Q138R、Q138E、K139E、K139G、K139L、E140W、S141A、S141R、T142I、T142L、及び/又はT142Nから選択される。更に好ましいのは、配列番号：４におけるアミノ酸置換の特定の組み合わせを有するHer 2結合タンパク質で、例えば、配列番号：7-29及び38において、例えば、少なくともR42T、I44A、H68W、V70Y、R72T、L73W、R74Y、K82T、L84Hである。

10

20

30

40

50

【0054】

ジユピキチン（配列番号：４）におけるアミノ酸置換の特定の組み合わせを有する他の好ましいHer 2結合タンパク質は、例えば、配列番号：34、35、36、37における、例えば、少なくともR42S、I44V、H68Y、V70Y、R72F、L73S、K82L、L84Dである。ジユピキチン（配列番号：４）におけるアミノ酸置換の特定の組み合わせを有するHer 2結合タンパク質で、例えば、Q138S、K139E、E140W、S141A、T142I（例えば、配列番号：5、7-29、33、36、37）、又はQ138R、K139G、E140W、T142L（例えば、配列番号：6、34、35）、又はQ138E、K139L、E140W、S141R、T142N（例えば、配列番号：30、31、32）は更に好ましい。

【0055】

本発明のHer 2結合タンパク質は、配列番号：5-38からなる群から選択されるアミノ酸配列を具える。本発明のHer 2結合タンパク質は、配列番号：5-38のアミノ酸配列のうち1以上に対して少なくとも85%、又は少なくとも87%、又は少なくとも91%、又は少なくとも94%、又は少なくとも96%の配列同一性を示すアミノ酸配列を具えることが好ましい。図1は、Her 2結合タンパク質の例を示す。

【0056】

更なる実施例において、配列番号：1に基づくHer 2結合タンパク質は、配列番号：1の62、63、64、65、66位における置換と、可能であれば、例えば、2、4、6、又は8位における更なる1、2、3、4、5、又は6の修飾とに加えて、天然ループ内で好ましくはN末端部の第1のループ内にアミノ酸の挿入を具える。配列番号：1に基づく好ましいHer 2結合タンパク質は、配列番号：1のアミノ酸領域62-66において置換を有する。その置換は、当該配列番号：1の天然ループ領域に、好ましくは領域8-11に、更に好ましくは配列番号：1に対応する9及び10位の間における、2-10のアミノ酸、好ましくは4-9のアミノ酸、更に好ましくは6、7、8、又は9のアミノ酸の挿入と組み合わせられる。例えば、Her 2結合アフィリン 144567（配列番号：39）は、配列番号：1（2R、4G、6G、62R、63F、64W、65K、66K）の2、4、6、62、63、64、65、66位での置換に加えて、配列番号：1の

9位で6アミノ酸(PYETQV、配列番号:42)の挿入を有する。Her2結合アフィリン 143692(配列番号:40)は、配列番号:1(2D、4D、6M、62H、63W、64I、65L、66N)の2、4、6、62、63、64、65、66位における置換に加えて、配列番号:1の9位で9のアミノ酸(AGNP SHMHH、配列番号:43)の挿入を有する。本発明のHer2結合タンパク質は、配列番号:39及び配列番号:40からなる群から選択されるアミノ酸配列を具える。Her2結合タンパク質は、少なくとも配列番号:39-40のアミノ酸配列のうち1以上に対して少なくとも85%、又は少なくとも87%、又は少なくとも91%、又は少なくとも94%、又は少なくとも96%の配列同一性を示すアミノ酸配列を具えることが好ましい。

【0057】

Her2結合タンパク質の更なる特徴は、可溶性タンパク質の形で行うことができる。適切な方法は、当業者に知られており、又は文献に記載されている。結合親和性を決定する方法は、それ自体が周知であり、例えば、当技術分野において知られる以下の方法から選択可能である:表面プラズモン共鳴(SPR)ベースの技術、バイオレイヤー干渉法(BLI)、酵素結合免疫吸着測定法(ELISA)、フローサイトメトリー、蛍光分光技術、等温滴定型カロリメトリー(ITC)、超遠心分離分析法、放射免疫測定法(RIA又はIRMA)、及び改良型化学発光(ECL)。これらの方法の一部が以下の実施例で説明される。

【0058】

安定性の分析について、例えば、化学的又は物理的アンフォールディングに関連して分光又は蛍光ベースの方法が当業者に知られている。Her2結合タンパク質の特徴に関する例示的な方法は、本発明の実施例の項目で概説する。

【0059】

例えば、生化学的な標的結合分析が、図2で要約され、実施例で更に説明される。本発明の全ての結合タンパク質は、SPRベースの技術により決定されるように、Her2に対して700nM未満の親和性を有する。第1の態様の実施例において、Her2結合タンパク質は、0.01nMから700nM、より好ましくは0.05nMから500nM、より好ましくは0.1nMから100nM、より好ましくは0.1nMから20nM、より好ましくは0.1nMから10nMの範囲でヒトHer2に対する解離定数 K_D を有する。解離定数 K_D は、ELISAにより、又は表面プラズモン共鳴アッセイにより決定可能である。典型的には、解離定数 K_D は、20、25、又は30で決定される。特段記載がない限り、本明細書に記載の K_D 値は、表面プラズモン共鳴により25で決定される。

【0060】

更に、温度安定性は、実施例において更に詳細に説明されて、図2で示されるように、示差走査蛍光定量法(DSF)により決定される。図2で示される結果に加えて、少なくとも80%の可溶性が、サイズ排除クロマトグラフィーにより全てのHer2結合分子に対して確認された;本発明のHer2結合分子で凝集を示すものはなかった。図3は、2つの異なるHer2結合タンパク質に対する結合キネティクスを示す。

【0061】

アフィリン分子を比較する競合的結合の実験は、異なるHer2結合タンパク質、例えばアフィリン 142628及びアフィリン 143692、により結合されるエピトープは同一でなく、又は非重複(図12を参照)であることを示す。

【0062】

これらのHer2結合タンパク質は、Her2結合に関して競合しない。更に、Her2結合タンパク質は、モノクローナル抗体トラスツマブと異なるHer2エピトープに結合する。図13は、アフィリン 142628及びアフィリン 143692が、トラスツマブと異なる又は非重複のHer2エピトープに結合することを示す。更に、アフィリン 141926(配列番号:28)、アフィリン 141884(配列番号:38)、アフィリン 141890(配列番号:30)、及びアフィリン 141975(配

10

20

30

40

50

列番号：37)は、トラスツズマブと異なる又は非重複のHer2のエピトープに結合する(表2)。表2に示す第1の K_D はHer2への結合を示し、表2の第2の K_D はトラスツズマブの存在下でのHer2への結合を示す。両方の値がほぼ同一のため、アフィリタンパク質はトラスツズマブと異なる又は非重複のエピトープに結合すると結論付けることができる。それに対して、トラスツズマブと類似又は重複のエピトープは、アフィリン141931(配列番号：27)、アフィリン141912(配列番号：31)、及びアフィリン141935(配列番号：32)を示す。

【0063】

表2. アフィリタンパク質のトラスツズマブとの競合

アフィリン	K_D (nM)	K_D (nM)
141884	4.9	4.6
141890	24.3	25.5
141926	6.5	8.9
141975	41.2	39.4

【0064】

追加の機能的特性解析は、Her2過剰発現細胞、例えば、SkBr3細胞及び遺伝子変換のCHO-K1細胞について細胞のHer2結合分析により行われた。アフィリン分子の異なる濃度が試験された。図4-9に示すように、Her2細胞標的結合が確認された。

【0065】

更に、アフィリン結合タンパク質はヒト由来の細胞からの腫瘍組織上のHer2への結合を示す(図10及び図11を参照)。特に、驚くことに、アフィリン分子はSKOV-3腫瘍組織で発現されたHer2に強い結合を示す。肺、肝臓、心筋、及び卵巣からの組織に結合は見られなかった。

【0066】

本発明の一実施例は、本発明のHer2結合タンパク質、及び少なくとも1つの追加のタンパク質又は分子を更に含む。追加のタンパク質は、第1の結合タンパク質としての抗原に対する同一又は異なる特異性を有する、第2の結合タンパク質であってよい。本発明の一実施例は、アフィリン抗体融合タンパク質又はコンジュゲートを含む融合タンパク質又はコンジュゲートを含み、任意に、群(i)、(ii)及び(iii)の少なくとも1員から好ましくは選択される部分に更に融合又はコンジュゲートされる。群は(i)ポリエチレングリコール(PEG)、ヒト血清アルブミン(HSA)、ヒト血清アルブミン、アルブミン結合ペプチド、又は免疫グロブリン(Ig)又はIg断片、多糖から選択される薬物動態を調節する部分、及び(ii)任意に、モノクローナル抗体又はその断片、サイトカイン、ケモカイン、細胞毒性化合物、酵素、又はその誘導体、又は放射性核種から選択される治療活性成分、及び(iii)任意に、蛍光化合物、光増感剤、タグ、酵素、放射性核種から選択される診断成分、からなる。コンジュゲート分子は、例えば、ペプチドリンカー配列又は担体分子を通じて1又はいくつかの部位に付着可能である。

【0067】

本発明によりタンパク質コンジュゲートを生成するためにタンパク質性又は非タンパク質性の部分と更に結合することは、技術分野で周知の化学的方法を適用して行うことが可能である。特に、システイン又はリジン残基の誘導体形成に特異的な結合化学を適用することができる。非天然アミノ酸の導入の場合、化学合成の更なる経路、例えば、「クリックケミストリー」又はアルデヒド特異的化學等が可能である。

【0068】

そのようにして得られたコンジュゲートは、以下の例のうち1以上から選択可能である：
 (i) リジン残基を介したタンパク質の結合、
 (ii) マレイミド化学を介したシステ

イン残基を介したタンパク質の結合；特にシステイン残基は特異的に導入でき、更なる部分の結合に適した任意の位置に配置できる、(i i i) ペプチド性又はタンパク質原生の結合。対象のタンパク質を他の機能成分に共有結合的又は非共有結合的に付着させるこれらの及び他の方法は、技術分野において周知であり、従ってここでは更に詳しく説明しない。

【 0 0 6 9 】

更なる実施例は、好ましくは、PEG、HSA又はIg若しくはIg断片、例えば、Fc断片から選択される薬物動態又は生体内分布を調節する部分を更に具える、本発明に係る結合タンパク質に関する。延長された半減期を有するタンパク質を製造するための幾つかの技術は、技術分野において知られている。

10

【 0 0 7 0 】

本発明の結合タンパク質は、モノクローナル抗体又はその断片を具える、又はそれからなる第2の結合タンパク質を具えることもできる。一実施例において、第2の結合タンパク質は、EGFRに対する特異性を有するモノクローナル抗体である。驚くことに、EGFRモノクローナル抗体及びHer2特異的なアフィリンからなる二重特異性の結合タンパク質は、EGFRとHer2との両方に特異的に結合可能であることが発見された。融合タンパク質のEGFR結合レベルは、驚くことにセツキシマブのEGFR結合レベルよりも高い。

【 0 0 7 1 】

本発明の幾つかの実施例において、Her2とEGFRとに同時に特異的に結合するポリペプチドを具える二重特異性の結合分子が提供される。図14は、二重特異性のアフィリン抗体結合タンパク質の両方の標的抗原(Her2及びEGFR)への同時結合を示す。図15は、Her2過剰発現細胞(図15a)及びEGFR過剰発現細胞(図15b)上のアフィリン抗体結合タンパク質(例えば、軽鎖へのC末端融合；CL-141926、配列番号：44)のフローサイトメトリー結合分析を示す。当該図は、平均蛍光強度を示し、アフィリン抗体融合タンパク質のHer2及びEGFR過剰発現細胞への濃度依存性結合を表す。

20

【 0 0 7 2 】

本発明の更なる態様において、Her2結合タンパク質又は融合タンパク質又はコンジュゲートが医学において、特に、好ましくは癌における医学的治療又は診察方法において用いられる。膜タンパク質Her2は、腫瘍細胞で上表制御されることが知られ、腫瘍細胞の非制御増殖及び転移の形成をもたらす。癌患者への新たな療法は、例えば、モノクローナル抗体トラスツズマブ(ハーセプチン(登録商標))又はベルツズマブ(パージェタ(登録商標))のような標的治療によるHer2の抑制を含む。T-DM1という抗体薬物複合体は、Her2を過剰発現する乳房、子宮、及び卵巣の癌肉腫に対して効果が高い。

30

【 0 0 7 3 】

Her2の過剰発現は、様々な癌について記載されている。例えば、Her2の過剰発現は、乳癌の約15% - 30%、及び胃/胃食道癌の10% - 30%で発生し、卵巣、子宮内膜、膀胱、肺、大腸、頭部及び首のような他の癌でも見られている。従って、本発明のHer2結合タンパク質を具える医薬組成物は、Her2が特に乳房、卵巣、胃に加えて、肺、頭部、首、頸部、前立腺、膵臓等をも含むがこれらに限定されない疾患の発症に関連する、癌の治療に用いることができる。

40

【 0 0 7 4 】

組成物は、本発明のHer2結合タンパク質の治療上又は診断上有効量を含む。投与されるタンパク質の量は、治療される生物、疾患の種類、患者の年齢及び体重、及びそれ自体が周知である更なる要因によって決まる。

【 0 0 7 5 】

本発明の一部の実施例は、Her2結合タンパク質を説明する。そのHer2結合タンパク質は、少なくとも700nMの高親和性をもってHer2の細胞外領域に結合するが

50

、細胞結合を有さないか、又は弱い細胞結合のみを有する。そのようなHer2結合タンパク質は、可溶性受容体と細胞に結合した受容体とをHer2結合タンパク質が識別する必要がある、特定の医学的応用に特に有益である。可溶性Her2は、癌患者の血液中に頻りに発見される。細胞に結合した受容体ではなく、可溶性のHer2（例えば、Biacoreアッセイのような）に結合するHer2結合タンパク質は、可溶性Her2が疾患進行の予測バイオマーカーとなる診断用途に用いることが可能である。更に、可溶性Her2にのみ結合するHer2結合アフィリタンパク質の特定の治療用途は、特に、可溶性受容体と細胞に結合した受容体とに結合する治療用抗体（例えば、トラスツズマブ）との組み合わせにおいて有用である。この場合、アフィリンは、好ましくは、可溶性Her2分子に結合し、細胞における治療介入に利用可能なより多くの抗体分子を残す。このことにより、心毒性の副作用が知られている抗体の量を少なくする機会が切り開かれる。そのようなHer2結合タンパク質の例が本発明で提供される（例えば、アフィリン142465、アフィリン142655、アフィリン142502、アフィリン141965、及びアフィリン144567）。

10

20

30

40

50

【0076】

本発明は、本発明のHer2結合タンパク質、融合タンパク質又はコンジュゲート又は核酸分子、本発明のベクター、及び/又は宿主細胞又はウイルス、及び薬学的に許容可能なキャリアを具える医薬組成物を含む。本発明は、本発明のHer2結合タンパク質又はコンジュゲート又は核酸分子、本発明のベクター、及び/又は診断上許容可能なキャリアを有する宿主細胞又は非ヒト宿主を具える診断剤を更に含む。組成物は、薬学的又は診断上許容可能なキャリアを含み、任意に、それ自体が知られている補助剤及び賦形剤を更に含むことができる。これらは、例えば、安定剤、界面活性剤、塩、緩衝剤、着色剤等を含むが、これらに限定されない。

【0077】

Her2結合タンパク質を具える医薬組成物は、液状製剤、凍結乾燥物、クリーム、局所投与用のローション、エアロゾルの形態、粉末、顆粒の形態、エマルジョン又はリポソーム製剤の形態とすることができる。組成物は、好ましくは、無菌、非発熱性及び等張であり、それ自体が知られている薬学的に従来型で許容可能な添加剤を含む。更に、米国薬局方、又はRemington's Pharmaceutical Sciences、Mac Publishing Companyの規則（1990）を参照する。ヒト及び家畜の医学療法及び予防において、本発明に係る少なくとも1つのHer2結合タンパク質を含む薬学的に有効な医薬は、それ自体が知られている方法により調剤可能である。ガレヌス調剤に応じて、これらの組成物は注射又は注入による非経口に、全身的に、腹腔内に、筋肉内に、皮下に、経皮的に、又は他の従来から採用される適用方法により投与可能である。製剤の種類は、治療される疾患の種類、投与ルート、疾患の重症度、治療が行われる患者、及び医学の分野で当業者に知られる他の要因に依る。

【0078】

更なる態様において、本発明は、特定の標的/抗原、又はそのアイソフォームに特異的に結合する、本発明に係るHer2結合タンパク質を具える診断用組成物を診断上許容可能なキャリアとともに開示する。増加したHer2発現は、腫瘍の悪性と相関するので、患者のHer2発現の状況についての情報を得るために、非侵襲型イメージングの診断法を開発することが望ましい。更に、Her2イメージングは、治療療法に対する患者の反応の評価に有用である。例えば、適切な放射性同位体又は蛍光色素分子で標識された本発明のタンパク質を使用することは、腫瘍及び転移の位置を決定するための非侵入型イメージングで採用することができる（参照に関して、例えば、Milenic et al. 2008 Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals 23:619-631; Hoeben et al. 2011, Int. Journal Cancer 129:870-878を参照）。それらの薬物動態の特性により、無傷の抗体は通常イメージングには適していない。それらのサイズが小さいこと及び親和性が高いことにより、本発明の放射性同位体又は蛍光色素分子標識した融合

タンパク質は、イメージング用診断薬としての使用により適すると考えられる。

【0079】

本発明のタンパク質は、治療に有利に適用可能であると考えられる。特に、分子は、優れた腫瘍標的効果及び所望の体内分布、従って低減した副作用を示すと考えられる。本発明の医薬組成物は、任意の従来の方法で製造してよい。

【0080】

特定の標的抗原に特異的に結合するユビキチン変異タンパク質を生成するユビキチンの誘導体生成が技術分野において記載されている。例えば、配列番号：4で示される配列が変更されたライブラリーを作成可能である。好ましくは、変更は、ジユビキチン（配列番号：4）のR42、I44、H68、V70、R72、L73、R74、K82、L84、Q138、K139、E140、S141、及びT142位から選択される少なくとも12のアミノ酸を具える。他の実施例において、ライブラリーが作成可能で、そこでは配列番号：1で示される配列は、N末端側部分のループの4-10のアミノ酸の延長と組み合わせで、少なくとも配列番号：1の62、63、64、65、66位に位置するアミノ酸で変更されている。Her2への新規の結合能を有するタンパク質を生成するため、追加の1、2、3、4、5、又は6のアミノ酸が置換可能である。

10

【0081】

選択されたアミノ酸の修飾のステップが、本発明に従って、好ましくは選択されたアミノ酸のランダム変異誘発により遺伝子レベルで行われる。好ましくは、ユビキチンの修飾は、それぞれのタンパク質に属するDNAの変更のための遺伝子工学の方法により行われる。

20

【0082】

好ましくは、変更は、技術分野で説明したような置換、挿入又は欠失である。ユビキチン由来の新規の結合タンパク質の生成のためのアミノ酸残基の置換は、任意の所望のアミノ酸で行うことが可能である。このことは、本明細書で参照によって組み込まれる、EP1626985B1、EP2379581B1、及びEP2721152で詳細に説明される。

【0083】

配列番号：4又は配列番号：1に基づく新規の結合タンパク質の生成のためのアミノ酸の置換は、任意の所望のアミノ酸で行うことができる。このことは、本明細書で参照によって組み込まれる、例えば、EP1626985B1及びEP2379581B1で詳細に説明される。例えば、14の位置で20の天然アミノ酸のランダム分布を仮定すると、20の14乗（ 20^{14} ）の理論上のユビキチン変異タンパク質のプールを生成し、それぞれが異なるアミノ酸組成、及び潜在的に異なる結合特性を有する。この遺伝子の大きなプールは、異なるアフィリン結合タンパク質のライブラリーを構成する。

30

【0084】

例によって、変異生成の起点は、例えば、配列番号：4及び1のタンパク質をコードするcDNA又はゲノムDNAであってよい。更に、配列番号：4及び1に示すタンパク質をコードする遺伝子も合成的に作製可能である。DNAは、当業者に知られる方法により作製、変更及び増幅可能である。部位特異的な変異生成の方法、ランダム変異生成の方法で、PCR又は同様の方法を用いる変異生成の方法等、それ自体が知られる手順が、変異生成に利用可能である。全ての方法は当業者に知られている。

40

【0085】

本発明の好適な実施例において、変異生成が行われるアミノ酸の位置が予め決められる。それぞれの場合において、異なる変異体のライブラリーは、一般的に、それ自体が知られる方法を用いて確立される。一般的に、修飾されるアミノ酸の事前選択は、修飾されるユビキチンタンパク質に関して利用可能な構造情報に基づいて行うことができる。ランダム化される異なるアミノ酸の異なるセットの選択は、異なるライブラリーをもたらす。

【0086】

上述のように得られた遺伝子プールライブラリーは、ディスプレイ方法等の選択方法の

50

ためのタンパク質の発現を可能とする適切な機能的遺伝要素と組み合わせることが可能である。発現したタンパク質は、結合親和性が存在する場合、パートナー同士の結合を可能とするため、本発明により標的分子と接触する。この方法は、標的分子への結合能を有するタンパク質の特定を可能とする。例えば、本明細書において参照によって組み込まれる、EP 2 3 7 9 5 8 1 B 1を参照のこと。

【0087】

本発明による接触は、好ましくは、ファージディスプレイ、リボソームディスプレイ、mRNAディスプレイ、細胞表面ディスプレイ、酵母表面ディスプレイ、又はバクテリア表面ディスプレイ方法等の適切な表示及び選択方法により、好ましくはファージディスプレイ方法により行われる。完全な開示のために、以下の文献も参照する：Hoes s , C 10
urr . Op in . Struc . Biol . 3 (1 9 9 3) , 5 7 2 - 5 7 9 ; Wel l s
and Lowmann , Curr . Op in . Struc t . Biol . 2 (1 9
9 2) , 5 9 7 - 6 0 4 ; ay et al / . Phage Display of P
eptides and Proteins - A Laboratory Manual
(1 9 9 6) , Academic Press . 上述の方法は、当業者に知られている。
ライブラリーは、ファージミドベクター（例えば、pCD87SA (Paschke , M
. and W . Hohne (2 0 0 5) . “ Gene 3 5 0 (1) : 7 9 - 8 8)) に
クローニング可能である。ライブラリーは、ファージ上にディスプレイされてよく、それ
ぞれの標的抗原に対するパニングのラウンドの繰り返しの対象としてよい。増強したファ
ージプールからのユビキチン変異タンパク質は、個々のタンパク質の発現のため、発現ベ
20
クターにクローニング化される。好ましくは、ユビキチン変異タンパク質の発現は、自動
化ハイスループットスクリーニングプラットフォーム上のELISA等、確立された方法
により特定の結合タンパク質のスクリーニングを可能とする。次に、所望の結合特性を有
する特定されたクローンは、アフィリン分子のアミノ酸配列を明らかにするためシーケン
シングされる。特定された結合タンパク質は、例えば、上述のような特定された配列の改
変及びファージディスプレイ、リボソームディスプレイ、パニング、及びスクリーニング
ステップの繰り返しの基づいて追加のライブラリーを生成することにより、更なる成熟ス
テップの対象とされてよい。

【0088】

本発明のHer2結合分子は、通常の有機合成法、固相を利用した合成法、断片ライゲ
ーション法等の多くの従来及び周知技術により、又は市販の自動合成器により作製可能で
ある。一方、それらは従来 of 組換え法単独で、又は従来 of 合成法との組み合わせによっ
ても作製可能である。更に、それらは無細胞のin vitro転写/翻訳によっても作製
可能である。本発明によるコンジュゲートは、本明細書で上述のように例えばリジン又は
システインベース化学のような化学的手法によって化合物を結合させるにより得ることが
30
できる。

【0089】

本発明の別の態様によると、本発明の結合タンパク質をコードする単離されたポリヌク
レオチドが提供される。本発明は、本発明のポリヌクレオチドによりコードされたポリペ
プチドも含む。本発明は、本発明の単離されたポリヌクレオチドを具える発現ベクター、
40
及び本発明の単離されたポリヌクレオチド又は発現ベクターを具える宿主細胞も更に提供
する。

【0090】

例えば、本発明のHer2結合タンパク質をコードする1以上のポリヌクレオチドは、
適切な宿主において発現されてよく、産生された結合タンパク質は単離可能である。当該
ポリヌクレオチドを具えるベクターは、本発明に含まれる。更なる実施例において、本発
明は、本発明の核酸分子を具えるベクターに関連する。ベクターは、タンパク質をコード
する情報を宿主細胞の中に移すのに用いられる任意の分子又は実体（例えば、核酸、プラ
スミド、バクテリオファージ、又はウイルス）を意味する。

【0091】

10

20

30

40

50

本発明は更に、本発明の核酸分子又は本発明のベクターを具える単離された細胞に関連する。適する宿主細胞は、原核生物又は真核生物を含む。様々な哺乳類又は昆虫細胞培養系も、組換えタンパク質を発現するために採用可能である。

【0092】

実施例において、本発明は、本発明のベクターを有する宿主細胞又は非ヒト宿主にも関連する。宿主細胞は、核酸配列により形質転換され、又は形質転換可能であり、それにより対象の遺伝子が発現する細胞である。その用語は、親細胞の子孫が、形態又は遺伝子的構成で元々の親細胞と同一であるか否かに関わらず、対象の遺伝子が存在する限りは、その子孫を含む。本発明に従って、宿主は、本発明のタンパク質が導入された、及び/又はそれを発現する遺伝子導入非ヒト動物であってよい。好ましい実施例において、遺伝子導入動物は非ヒト哺乳動物である。

10

【0093】

別の態様において、本発明の結合タンパク質を製造する方法が提供され、a)本発明の宿主細胞を、結合タンパク質の発現に適した条件下で培養するステップと、b)産生された結合タンパク質を単離するステップとを具える。本発明は、本発明の方法により産生された結合タンパク質も含む。原核生物又は真核生物を培養するための適切な条件は、当業者に周知である。

【0094】

本発明の一実施例は、上述の本発明による結合タンパク質の作製方法を対象とし、当該方法は、以下のステップ：(a)本発明の任意の態様に従ってHer2結合タンパク質をコードする核酸を作製するステップと；(b)当該核酸を発現ベクターに導入するステップと；(c)当該発現ベクターを宿主細胞に導入するステップと；(d)宿主細胞を培養するステップと；(e)宿主細胞を、Her2結合タンパク質が発現される培養条件の対象とし、それにより上述のようなHer2結合タンパク質を産生するステップと；(f)ステップ(e)で産生されたHer2結合タンパク質を任意に単離するステップと；(g)Her2結合タンパク質を上述のような更なる機能部分と任意にコンジュゲートさせるステップと、を具える。

20

【0095】

タンパク質産生を目的とした細胞の培養及びタンパク質発現は、少容量の振とうフラスコから大型の発酵槽に至るまで任意の規模で行うことが可能で、当業者に周知の技術を適用する。

30

【0096】

本発明に従って修飾されたユビキチンタンパク質の発現に続いて、それ自体が知られる方法により、更に精製及び濃縮が可能である。選択された方法は、当業者にそれ自体が周知である幾つかの要因、例えば使用される発現ベクター、宿主生物、対象使用分野、タンパク質のサイズ、及び他の要因に依存する。

【0097】

一般的に、精製タンパク質を培養混合物から単離することは、遠心分離法、沈殿、凝集、異なる態様のクロマトグラフィー、濾過、透析、濃縮、それらの組み合わせおよび他の当業者に周知の従来方法及び技術を適用して行うことができる。クロマトグラフィー法は当業者に周知であり、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー(サイズ排除クロマトグラフィー)、又はアフィニティクロマトグラフィーを具えるが、これらに限定されない。

40

【0098】

精製を簡素化するため、本発明により修飾されたタンパク質は、分離物質に対して増加した親和性を有する他のペプチド配列に融合可能である。好ましくは、ユビキチン変異タンパク質の機能性に悪影響がない、又は特定のプロテアーゼ切断部位の導入により精製後に単離可能である融合体が選択される。そのような方法も、当業者に知られている。

【実施例】

【0099】

50

本発明の更なる説明のため、以下の実施例が提供される。本発明は、Her2への結合をもたらす、ジユビキチン（配列番号：4又は48）、又は野生型ユビキチン（配列番号：1又は2）の特定の修飾により、特に例示される。しかし、本発明はそのことに限定されず、以下の実施例は、上記記載に基づく本発明の実行可能性を示すにすぎない。本発明の完全の開示のため、参照により本出願に完全に組み込まれる、本出願記載の文献も参照する。

【0100】

[実施例1 結合タンパク質の特定]

ライブラリー構築及びクローニング。バランス良く調整されたアミノ酸分布を実現するため、それぞれ7つのランダム化したアミノ酸の位置を具える2つのユビキチン部分が、トリプレット技術（MorphoSys Sionomics, Germany）により合成された。システインを除く19のアミノ酸をコードする予め作られた二重鎖のトリプレットの混合物が合成に用いられた。両方のユビキチン部分は、（それら2つのユビキチン部分の間のリンカーなしで）ヘッドトゥー方向で直接連結され、14のランダム化したアミノ酸の位置を有する152のアミノ酸のタンパク質をもたらす。14のランダム化した位置を有するジユビキチンの配列が、配列番号：3に示される：

MQIFVKTLTGKTITLEVEPSDTIENVKAKIQDKEGIPPDQ
 QXLXFA GKQLEDGRTLSDYNIQKESTLXLXLXAXAAMQIF
 VXTXTGKTITLEVEPSDTIENVKAKIQDKEGIPPDQQLI
 WAGKQLEDGRTLSDYNIXXXXXLHLVLRRAA。

【0101】

14のランダム化したアミノ酸は、ジユビキチンの42、44、68、70、72、73、74、82、84、138、139、140、141及び142位に対応する。ジユビキチンの配列が、配列番号：4に示される：

MQIFVKTLTGKTITLEVEPSDTIENVKAKIQDKEGIPPDQ
 QRLIFAGKQLEDGRTLSDYNIQKESTLHLVLRRAAMQIF
 VKTLTGKTITLEVEPSDTIENVKAKIQDKEGIPPDQQLI
 WAGKQLEDGRTLSDYNIQKESTLHLVLRRAA。

【0102】

そのコンストラクトは、当業者に知られる標準的な方法を用いて、修飾pCD87SAファージミド（本明細書ではpCD12という）でライゲートされた。pCD12ファージミドは、N末端の追加のアミノ酸なしにタンパク質のプロセッシングを実現するため、修飾されたtorAリーダー配列（アミノ酸配列QPAMAの欠失）を具える。ライゲーション混合物のアリコートが、大腸菌ER2738（Lucigen）のエレクトロポレーションに用いられた。そのライブラリーは、SPIFという。特に記載がない限り、例えば、Sambrook et al. に記載される、確立された組換え型遺伝子学的手法が用いられた。

【0103】

標的：組換え型ヒトHer2-Fcキメラが、R&D Systemsから購入された。ヒトHer2（ユニプロットアクセッション番号 p004626；残基1-652）の細胞外ドメインをコードするDNA配列が、C末端でヒトIgG1のFc領域と遺伝的に融合された。

【0104】

TATファージディスプレイ選択。選択システムとしてTATファージディスプレイを用いて、SPIFライブラリーは一定のタンパク質標的Her2に対して濃縮された。コンピテントなバクテリアER2738細胞（Lucigene）を、SPIFライブラリーを有するファージミドpCD12で形質転換した後、当業者に知られる標準的な方法を用いて、ファージ増幅及び精製が行われた。選択に関して、標的タンパク質が、Dyna

beads (登録商標) タンパク質 A 又は G 上に固定化された Fc - 融合タンパク質 (Her2 - Fc、R & D Systems) として提供された。ファージ培養中の標的濃度は、200 nM (第1のラウンド) から 50 nM (第3のラウンド) へと変化した。標的ファージ複合体が磁氣的に溶液から分離され、数回洗浄された。標的結合ファージは、トリプシンにより溶出された。Fc - 結合変異体のファージライブラリーを枯渇させるため、IgG1 (Athens Research & Technology) の固定された Fc - 断片によるファージの事前選択が、ラウンド 2 及び 3 の前に行われた。

【0105】

標的特異的ファージのプールを特定するため、それぞれの選択ラウンドで溶出及び再増幅されたファージを、ファージプール ELISA により分析した。媒体結合マイクロタイタープレート (Greiner bio-one) のウェルは、Her2 - Fc (2.5 µg/ml) 及び IgG1 の Fc - 断片 (5 µg/ml) でそれぞれコーティングされた。結合したファージは、M13 HRP - コンジュゲート抗体 (GE Healthcare) を用いて検出した。ラウンド 3 で溶出及び再増幅されたファージは、標的への特異的な結合を示し、次いで、エラープローン PCR によるプールの成熟に用いられた。単離したファージミドプールは、エラープローン PCR (GeneMorph II Random Mutagenesis Kit, Agilent Technologies) のテンプレートとして用いた。ライブラリーの位置に対して追加の置換を有する SPIF 変異体の増幅したプールは、ファージミド pCD12 に再度クローニングされ、ファージ増幅及び精製のため ER2738 に形質転換された。ファージは、上述のように再び 2 ラウンドのパニングの対象となった。標的は、ラウンド 1 及び 2 で、それぞれ 5 nM 及び 1 nM の濃度で用いられた。両方のラウンドについて、IgG1 の Fc - 断片による事前選択が行われた。特異的な標的結合について成熟及び選択したプールを分析するために、ファージプール ELISA が上述のように行われた。

【0106】

標的結合ファージプールの発現ベクターへのクローニング。選択手順が完了すると、成熟選択ラウンド 1 及び 2 の標的特異的な DNA のプールは、当業者に知られる方法に従って PCR により増幅され、適切な制限ヌクレアーゼで切り取られ、Strep - Tag I (IBA GmbH) を具える発現ベクター pET - 28a (Merck, Germany) の誘導体にライゲートされた。

【0107】

シングルコロニーヒット分析。BL21 (DE3) 細胞 (Merck, Germany) の形質転換後、カナマイシン耐性シングルコロニーを生育させた。標的結合の修飾ユビキチンの変異体の発現は、自己誘導培地 (Studier, 2005) を用いて、384 ウェルプレート (Greiner BioOne) での培養により達成した。細胞を採取し、続いて Bug Buster 試薬 (Novagen) により化学的又は酵素的に、又は凍結 / 融解サイクルにより機械的にそれぞれ溶解した。遠心分離後、結果として生じる上清を、高結合の 384 マイクロタイタープレート (Greiner BioOne) 上に固定された標的を用いて、ELISA によりスクリーニングした。結合タンパク質の検出は、TMB - Plus 基質 (Biotrend, Germany) との組み合わせた Strep - Tactin (登録商標) HRP コンジュゲート (IBA GmbH) により達成した。反応は、0.2 M H₂SO₄ 溶液を加えることにより停止し、プレートリーダーで 620 nm に対して 450 nm で測定した。

【0108】

[実施例 2 Her2 結合タンパク質の発現及び精製]

アフィリン分子を、当業者に知られる標準的な方法を用いて、発現ベクターにクローニングし、以下で述べるように精製及び分析した。全てのアフィリンタンパク質が発現され、アフィニティークロマトグラフィー及びゲル濾過により高純度に精製した。アフィニティークロマトグラフィー精製後、Aktasystem 及び Superdex (商標) 200 HiLoad 16 / 600 カラム (GE Healthcare) を用いてサイ

10

20

30

40

50

ズ排除クロマトグラフィー (SE HPLC又はSEC)を行った。カラムは、120 mlの容量を有し、2CVで平衡化された。サンプルへは、精製バッファを1ml/分の流速で注いだ。信号強度が10mAUに達するとフラクションコレクションが開始する。SDS-PAGE分析に続いて、陽性のフラクションをプールし、それらのタンパク質濃度を測定した。

【0109】

更なる分析には、SDS-PAGE、SE-HPLC、及びRP-HPLCが含まれる。タンパク質濃度は、モル吸光係数を用いて、280nmでの吸光測定により決定した。RPクロマトグラフィー (RP HPLC)は、Dionex HPLCシステム、及びVydac 214MS54 C4 (4.6x250mm、5µm、300)カラム (GE Healthcare)を用いて行った。

10

【0110】

[実施例3 Her2結合タンパク質の可溶性分析]

上清及び再懸濁されたペレットは、NuPage Novex 4-12% Bis-Tris SDS ゲルにより分析し、クマシにより染色した。タンパク質は、8M尿素の添加により、ペレットから回収した。Her2結合タンパク質は、少なくとも80%可溶 (配列番号: 5、27、30、37、38)、少なくとも90%可溶 (配列番号: 6、20、23、28、34)、少なくとも95%可溶 (配列番号: 7、9、10、11、22、29)、100%可溶 (配列番号: 8、12、13、14、15、16、17、18、19、21、25、26、33、35、36)という高い可溶性を示した。

20

【0111】

[実施例4 Her2結合タンパク質は高温で安定である]

本発明の結合タンパク質の熱安定性は、示差走査蛍光定量法 (DSF)により測定された。それぞれのプローブを、0.1µg/µLの濃度でMicroAmp Optical 384-ウェルプレートに移し、SYPROオレンジ染料を適切な希釈で添加した。25から95の温度勾配を毎分1の加熱速度でプログラムした (ViiA-7、Applied Biosystems)。蛍光は、520nmの励起波長及び623nmの発光波長で常に測定した (ViiA-7、Applied Biosystems)。熱アンフォールディング (Tm、融点)の転移中点を、選択された変異体について図2に示す。本発明のHer2結合タンパク質は、同様の融解温度を有する。全ての結合タンパク質の安定性は、対照タンパク質の安定性と同等である。

30

【0112】

[実施例5 Her2結合タンパク質の分析 (表面プラズモン共鳴、SPR)]

CM5センサーチップ (GE Healthcare)を、SPRランニングバッファで平衡化した。表面露出カルボキシルは、反応性エステル基を得るため、EDC及びNHSの混合物を通過することにより活性化した。700-1500RUのHer2-Fc (オン リガンド)をフローセル上に固定し、IgG-Fc (オフ リガンド)は別のフローセル上に、標的に対して1:3 (hIgG-Fc:標的)の比で固定化した。未反応のNHS基をブロックするため、リガンド固定化後にエタノールアミンの注入を用いた。リガンド結合に伴い、タンパク質分析物が表面に蓄積し、屈折率が増加した。この屈折率の変化をリアルタイムで計測し、レスポンス又はレゾナンス単位 (RU)対時間としてプロットした。分析物を、30µl/分の流速でチップに段階希釈して注いだ。会合を30秒間、解離を60秒間行った。各ランの後、チップの表面を、30µlの再生バッファで再生し、ランニングバッファで平衡化した。トラスツズマブの希釈系列は陽性対照として機能し、一方、非修飾ユビキチンの希釈系列は陰性対照を表す。対照サンプルを、30µl/分の流速でマトリックスに注入する一方、会合を60秒間、解離を120秒間行った。再生及び再平衡化が前述のとおり行われた。Biacore 3000 (GE Healthcare)を用いて結合の試験を行った; データ評価は、Langmuir 1:1モデル (R1=0)を用いて、製造業者により提供されたBIAevaluation 3.0ソフトウェアを介して行った。Her2への結合の結果を図2に示す。評価し

40

50

た解離定数 (K_D) はオフ ターゲットに対して標準化して、示した。

【0113】

[実施例6 機能のキャラクタライゼーション：細胞表面に発現したHer2への結合（フローサイトメトリー）]

Her2結合タンパク質の表面露出Her2との相互作用を分析するのに、フローサイトメトリーを用いた。Her2を過剰発現するヒト乳腺腺癌由来SkBr3細胞、Her2を過剰発現するトランスフェクトされたCHO-K1細胞（チャイニーズハムスター卵巣細胞）、Her2非発現のヒト胎児腎細胞株HEK/293、及び空ベクターの対照CHO-K1細胞を用いた。結果を図4-8に要約する。

【0114】

細胞をFCSを含む培地中でトリプシン処理及び再混濁して、予め冷却したFACSプロッキングバッファー中で洗浄及び染色した。 2×10^6 細胞/mlの細胞濃度を細胞染色のために作製し、96ウェルプレート（Greiner）に、各細胞株についてtriplicateで満たした。

【0115】

いくつかの実験で、異なる濃度のアフィリタンパク質を、Her2過剰発現細胞及び対照細胞に添加した。それぞれのアフィリン50nMを、SkBr3及びHer2陰性HEK/293-細胞について試験し（図4A及び4B）。333nMから5.6nMまでの希釈系列（図5）、及び100nMから0.06pMまでの希釈系列（図8）を、SkBr3細胞に添加した。Her2過剰発現CHO-K1細胞、及びHer2-陰性CHO-K1-pEntry細胞株について、500nMから0.5nMのアフィリン濃度（図6及び図7）を試験した。45分後に、上清を除去し、FACSプロッキングバッファーで1:300に希釈された、100 μ l/ウェルのウサギ抗Strep-Tag抗体（GenScript; A00626から入手）を添加した。一次抗体の除去後、ヤギ抗ウサギIgG Alexa Fluor 488抗体（Invitrogenから入手; A11008）が、1:1000希釈で加えた。フローサイトメトリー測定は、励起波長488nm及び発光波長525/30nmで、メルクミルポア社製のGuava easyCyte 5HT装置上で行った。アフィリン 141884、アフィリン 141890、アフィリン 141912、アフィリン 141926、アフィリン 141931、アフィリン 141935、アフィリン 141965、アフィリン 141975（図4A）、アフィリン 142418、アフィリン 142437、アフィリン 142465、アフィリン 142502、アフィリン 142609、アフィリン 142618、アフィリン 142620、アフィリン 142627、アフィリン 142628、アフィリン 142654、アフィリン 142665、アフィリン 142672、アフィリン 141884（図4B）、及びアフィリン 141926及びアフィリン 141890（図5）の結合について、SkBr3の結果を示す。アフィリン 142628、アフィリン 142654、アフィリン 141884、アフィリン 142627、アフィリン 144631、アフィリン 144632、アフィリン 144633、アフィリン 144634、アフィリン 144635、アフィリン 144636、アフィリン 144637、アフィリン 144567、及びアフィリン 142502の結合について、CHO-K1-Her2細胞の結果を、図6a-cに示す。（50nM-0.5nM）アフィリン 142628のCHO-K1-Her2細胞及びCHO-K1-pEntry細胞への濃度依存性結合を、図7に示す。同等量のジユビキチン（139090）を、実験において該当する場合（例えば、図4A、4B、6A、6B、及び7に示す実験において）、陰性対照として用いた。

【0116】

しかし、アフィリン 142465（配列番号：33）、アフィリン 142655（配列番号：34）、アフィリン 142502（配列番号：49）、及びアフィリン 141965（配列番号：50）は、Her2を過剰発現するSkBr3細胞には弱い結合しか示さなかった。配列番号：34、35、49、及び50は、少なくとも以下の置換を

10

20

30

40

50

有する：（ジユピキチンの）42S、44V、68Y、70Y、72F、73S、82L、84D、138R、139G、140W、142L。アフィリン 142418及びアフィリン 142655はそれぞれ、更に2つの置換（K63I、Q78R）又は更に4つの置換（Q31L、D58V、Q78R、P95S）を有する。Her2の細胞外ドメインに少なくとも700nMの高親和性で結合するが、細胞結合がない又は弱いHer2結合タンパク質は、特定の用途、例えば、細胞のHer2ではなく、可溶性のHer2のみに対して、高親和であるHer2結合タンパク質を要する特定の診断又は治療用途に、特に有用である。アフィリン 142418は、Her2を過剰発現するSkBr3細胞への結合を示す（図4b、図9）。

【0117】

[実施例7 細胞表面に発現したHer2への結合（免疫細胞化学及び蛍光顕微法）]
 外来性のヒトHer2を発現する細胞上で、本発明のタンパク質の結合が確認された。50nMのアフィリン 141884、アフィリン 142628、アフィリン 141926、アフィリン 144637、アフィリン 142418、及びアフィリン 144567が、Her2発現SkBr3細胞、及び陰性対照細胞株HEK/293について試験された。陰性対照としてジユピキチン（139090）が用いられ、10nMのトラスツズマブが、陽性対照として機能した。細胞は、 1×10^5 細胞/mlの濃度で、Lab-Tek（登録商標）チャンバースライド（Sigma Aldrich）に蒔いた。72時間を超える培養後、細胞を、メタノールで固定し（5分、20℃）、続いてブロッキング（PBSに5%のウマ胎児血清、1時間）、及び50nMのアフィリンで、常温で45分間インキュベーションを行った。1時間のウサギ抗Strept-Tag抗体（1：500）のインキュベーション、及び続いて1時間の抗ウサギIgG-Alexa488抗体（1：1000）のインキュベーションにより、アフィリン結合を検出した。トラスツズマブの結合は、抗ヒトIgG-Alexa488抗体（1：1000）で証明された。細胞核は、 $4 \mu\text{g/ml}$ DAPIで染色した。全てのインキュベーションステップは、室温で行った。図9Aは、アフィリン 141884、アフィリン 142628、アフィリン 141926、アフィリン 144637、及びアフィリン 142418の強い結合を示す。アフィリン 144567及びジユピキチンの弱い結合又は陰性結合を、図9Bに示す。同等の結合がトラスツズマブで検出された。Her2陰性細胞株HEK/293について非特異的結合は見られなかった。

【0118】

[実施例8 機能のキャラクタライゼーション：Her2結合タンパク質は、腫瘍細胞上に発現した細胞外Her2に結合する（免疫組織化学及び蛍光顕微法）]
 SKOV-3腫瘍、肺、肝臓、心筋、及び卵巣のクライオ組織セクションが、本発明の結合タンパク質を分析するのに用いられた。組織断片を、氷冷アセトンで10分間固定し、続いて、アフィリン 141884及びアフィリン 142628の異なる濃度（20nM及び50nM）、及び同等量の陰性対照としてジユピキチンクロン139090又は陽性対照として10nMのトラスツズマブを用いて1時間ブロック及びインキュベーションを行った。PBSで洗浄後、組織をウサギ抗Strept-Tag抗体（1：500）でもって室温で1時間インキュベーションを行い、続いて、トラスツズマブへの二次抗体として、ヤギ抗ウサギAlexa488（1：1000）又はヤギ抗ヒトIgG-Alexa594（1：1000）でインキュベーションを行った。細胞核は、DAPIで可視化した。チャンバースライドは覆われ、ガラススライドをMowiol及びカバーガラスで覆った。スライスは、Zeiss Axio Scopeで画像取得した。A1顕微鏡及び画像は、標準的なソフトウェアパッケージを用いて処理した。図10及び11は、非結合タンパク質クロン139090と比較した、SKOV-3腫瘍スライスへのアフィリン 141884及びアフィリン 142628の特異的結合を示す。肺組織上では結合は見られなかった（図11）。更なる組織スライス（肝臓、心筋、及び卵巣組織）を試験したが、特異的染色は見られなかった。

【0119】

[実施例 9 Her 2 結合アフィリン分子が、抗 Her 2 モノクローナル抗体トラスツズマブ以外のエピトープに結合するという競合分析]

特定のトラスツズマブの異なる Her 2 エピトープに結合するアフィリンタンパク質は、特定の医療実施例において有用である。本発明の単離された Her 2 結合タンパク質が、抗 Her 2 モノクローナル抗体トラスツズマブと競合可能であるか否かを調べるため、以下のアッセイを行った：(Acrobiosystems からの) Her 2 を NHS / EDC 化学により CM5 Biacore チップ上に固定し、1000 レスポンス単位 (RU) を得た。第 1 の実験では、全ての変異体は、1 つの定められた濃度 (2.5 μ M) で、30 μ l / 分 PBST 0.005% Tween 20 (図 12) の流速で注入した。第 2 の実験では、最初にチップの表面が飽和するまで、同一のフローチャンネルへトラスツズマブ (200 nM) を前投与した (図 13)。トラスツズマブを投与した後、変異体は実験 1 と同一の方法 (2.5 μ M) で注入した。より明確にするため、両方のセンソグラムのトレースは、最後に注入した Her 2 結合タンパク質に合わせた。

10

【0120】

Her 2 結合タンパク質の結合はトラスツズマブの存在により影響を受けなかったことが示された。従って、競合は見られず、これは、トラスツズマブ及び本発明の Her 2 結合タンパク質が、異なる又は重複しない Her 2 エピトープ、つまり、トラスツズマブ以外の異なる表面露出アミノ酸に結合することを意味する (図 13 を参照)。これは、アフィリン 142628 (配列番号：19)、アフィリン 143692 (配列番号：39)、アフィリン 141926 (配列番号：28)、アフィリン 141884 (配列番号：38)、アフィリン 141890 (配列番号：30)、及びアフィリン 141975 (配列番号：37) について見られた。これらの結合タンパク質は、トラスツズマブに対して一次及び獲得耐性があると報告されている癌治療において特に有用であろう。アフィリン 141931 (配列番号：27)、アフィリン 141912 (配列番号：31)、及びアフィリン 141935 (配列番号：32) は、トラスツズマブと同一の又は重複する Her 2 エピトープに結合する。

20

【0121】

[実施例 10 Her 2 結合タンパク質及び EGF R 抗体セツキシマブの二重特異性の融合タンパク質の結合分析]

Her 2 結合タンパク質を、抗 EGF R モノクローナル抗体セツキシマブの軽鎖又は重鎖の C 又は N 末端に連結した。融合タンパク質は、Her 2 結合タンパク質 (例えば、アフィリン 141926) をそれぞれ、抗 EGF R 抗体セツキシマブの重鎖の N 末端に融合 (NH141926、配列番号：47 という)、抗 EGF R 抗体セツキシマブの重鎖の C 末端に融合 (CH141926、配列番号：45 という)、抗 EGF R 抗体セツキシマブの軽鎖の N 末端に融合 (NL141926、配列番号：46 という)、及び、抗 EGF R 抗体セツキシマブの軽鎖の C 末端に融合 (ErbituX (登録商標)、CL141926、配列番号：44 という) することにより生成した。配列番号：44 - 47 の最初の 20 のアミノ酸までがシグナル配列である。融合タンパク質をコードする cDNA を、過度的に FreeStyle (登録商標) 293 - F 細胞にトランスフェクトし、無血清 / 無動物成分媒体中で発現した。発現は、Western Blot 分析により確認した。融合タンパク質は、AektaExpress (登録商標) (GE Healthcare) で Protein A アフィニティクロマトグラフィー (GE Healthcare cat no 17-0402-01) により上清から精製した。融合タンパク質の更なる精製は、ゲル濾過により達成した。更なる分析には、SDS-PAGE、SE-HPLC、及び RP-HPLC が含まれた。本発明の結合タンパク質の熱安定性は、上述のような示差走査型蛍光定量法により決定した。熱のアンプルディング (T_m 、融点) の転移中点を、融合タンパク質について決定した；全ての融合タンパク質は、 $T_m = 63.9$ から 67.9 の間の熱安定性を有する (表 3 を参照)。全ての結合タンパク質の安定性は、対照タンパク質の安定性と同等である。

30

40

【0122】

50

表 3：本発明の結合タンパク質、及び対照タンパク質の熱のアンフォールディングの転移中点

融合タンパク質又は対照	Tm [°C]
セツキシマブ	69.0
CH-141926	67.4
CL-141926	63.9
NH-141926	67.5
NL-141926	67.9

10

【 0 1 2 3 】

統合試験は、上述のように、及び図 1 4 に示すように、B i a c o r e (登録商標) 3 0 0 0 (G E H e a l t h c a r e) を用いて行った。更に、C H O - K 1 細胞で個別に発現する標的受容体への融合タンパク質の結合に関する F A C S 分析により、細胞への結合を確認した (図 1 5)。その結果を表 4 及び表 5 に要約する。

【 0 1 2 4 】

表 4：本発明のHer2ユビキチン変異タンパク質セツキシマブ結合タンパク質のEGFRに対する親和性データ(Biacore)

融合タンパク質	$k_{on} [M^{-1} \times s^{-1}]$	$k_{off} [s^{-1}]$	$K_D [M]$
セツキシマブ	6.21×10^9	6.29×10^{-4}	1.01×10^{-9}
CH-ユビキチン	7.28×10^9	6.72×10^{-4}	9.23×10^{-10}
CH-141926	4.66×10^9	1.65×10^{-4}	3.53×10^{-10}
CL-ユビキチン	7.96×10^9	7.12×10^{-4}	8.95×10^{-10}
CL-141926	5.84×10^9	5.91×10^{-4}	1.01×10^{-9}
NH-ユビキチン	3.02×10^9	6.5×10^{-4}	2.15×10^{-9}
NH-141926	3.79×10^9	4.12×10^{-4}	1.09×10^{-9}
NL-ユビキチン	2.79×10^9	1.54×10^{-5}	5.52×10^{-11}
NL-141926	1.08×10^9	1.72×10^{-4}	1.59×10^{-9}

20

30

【 0 1 2 5 】

表 5：本発明のHer2ユビキチン変異タンパク質セツキシマブ結合タンパク質のHer2 に対する親和性データ(Biacore)

融合タンパク質	$k_{on} [M^{-1} \times s^{-1}]$	$k_{off} [s^{-1}]$	$K_D [M]$
CH-141926	7.53×10^4	4.96×10^{-4}	6.58×10^{-9}
CL-141926	3.11×10^9	4.46×10^{-4}	1.43×10^{-9}
NH-141926	9.03×10^4	3.05×10^{-4}	3.37×10^{-9}
NL-141926	8.23×10^4	2.36×10^{-4}	2.87×10^{-9}

40

【 0 1 2 6 】

受容体タンパク質 E G F R 及び H e r 2 の様々な型の癌 (例えば、乳房、結腸、及び前立腺癌) における共発現は、患者の予後不良に関連することが知られている。図 1 4 では、細胞外ドメイン H e r 2 - F c を固定した B i a c o r e チップを用いた。二重特異性の融合タンパク質を注入し、350秒後、細胞外ドメイン E G F R - F c を濃度 100 n M から 25 n M の間で 1 : 2 の希釈系列で注入した。図 1 4 は、二重特異性のアフィリン抗体融合タンパク質の両方の標的への同時結合を示す。この効果により、分子イメージングにおける治療用途で、本発明の二重特異性の E G F R - H e r 2 融合タンパク質を具える生成物の選択性及び効率性が増大するであろう。図 1 5 は、変異体 C L 1 4 1 9 2 6

50

のフローサイトメトリー計測法により、2つの相互作用部分のそれぞれの標的への結合を、Her2(図15a)及びEGFR(図15b)を過剰発現するCHO細胞上で示す。

【図1-1】

FIG. 1

FIG. 1A

配列番号	アミノ酸	R42	I44	H68	V70	R72	L73	R74	K82	L84	Q138	K139	E140	S141	T142
5	142437	T	A	W	Y	T	W	N	T	H	S	E	W	A	I
6	142672	T	A	W	Y	T	W	Y	L	D	R	G	W	.	L
7	144637	T	A	W	Y	T	W	Y	T	H	S	E	W	A	I
8	144636	T	A	W	Y	T	W	Y	T	H	S	E	W	A	I
9	144635	T	A	W	Y	T	W	Y	T	H	S	E	W	A	I
10	144634	T	A	W	Y	T	W	Y	T	H	S	E	W	A	I
11	144633	T	A	W	Y	T	W	Y	T	H	S	E	W	A	I
12	144632	T	A	W	Y	T	W	Y	T	H	S	E	W	A	I
13	144631	T	A	W	Y	T	W	Y	T	H	S	E	W	A	I
14	142679	T	A	W	Y	T	W	Y	T	H	S	E	W	A	I
15	142658	T	A	W	Y	T	W	Y	T	H	S	E	W	A	I
16	142654	T	A	W	Y	T	W	Y	T	H	S	E	W	A	I
38	141884	T	A	W	Y	T	W	Y	T	H	S	E	W	A	I
17	142653	T	A	W	Y	T	W	Y	T	H	S	E	W	A	I
18	142645	T	A	W	Y	T	W	Y	T	H	S	E	W	A	I
19	142628	T	A	W	Y	T	W	Y	T	H	S	E	W	A	I
20	142620	T	A	W	Y	T	W	Y	T	H	S	E	W	A	I
21	142618	T	A	W	Y	T	W	Y	T	H	S	E	W	A	I
22	142617	T	A	W	Y	T	W	Y	T	H	S	E	W	A	I
23	142616	T	A	W	Y	T	W	Y	T	H	S	E	W	A	I
24	142451	T	A	W	Y	T	W	Y	T	H	S	E	W	A	I
25	142441	T	A	W	Y	T	W	Y	T	H	S	E	W	A	I
26	142439	T	A	W	Y	T	W	Y	T	H	S	E	W	A	I
27	141931	T	A	W	Y	T	W	Y	T	H	S	E	W	A	I
28	141899	T	A	W	Y	T	W	Y	T	H	S	E	W	A	I
29	141890	T	A	Y	Y	T	V	K	Y	H	E	L	W	R	N
30	141912	T	.	F	Y	V	S	L	D	E	L	W	R	N	
31	141935	T	T	Y	Y	G	I	S	I	S	E	L	W	R	N
32	142465	L	S	.	W	G	V	.	N	E	S	E	W	A	I
33	142655	S	V	Y	Y	F	S	.	L	D	R	G	W	.	L
34	142418	S	V	Y	Y	F	S	.	L	D	R	G	W	.	L
35	142627	S	V	Y	Y	F	S	.	L	D	S	E	W	A	I
36	141975	S	V	Y	Y	F	S	.	L	D	S	E	W	A	I
37	141975	S	V	Y	Y	F	S	.	L	D	S	E	W	A	I

【図1-2】

FIG. 1B

配列番号	アミノ酸	42	44	68	70	72	73	74	82	84	138	139	140	141	142	
5	142437	~	H	O	O	~	O	~	~	+	~	~	.	O	H	H
6	142672	~	H	O	O	~	O	O	H	-	+	G	O	~	H	
7	144637	~	H	O	O	~	O	O	~	+	~	~	.	O	H	H
8	144636	~	H	O	O	~	O	O	~	+	~	~	.	O	H	H
9	144635	~	H	O	O	~	O	O	~	+	~	~	.	O	H	H
10	144634	~	H	O	O	~	O	O	~	+	~	~	.	O	H	H
11	144633	~	H	O	O	~	O	O	~	+	~	~	.	O	H	H
12	144632	~	H	O	O	~	O	O	~	+	~	~	.	O	H	H
13	144631	~	H	O	O	~	O	O	~	+	~	~	.	O	H	H
14	142679	~	H	O	O	~	O	O	~	+	~	~	.	O	H	H
15	142658	~	H	O	O	~	O	O	~	+	~	~	.	O	H	H
16	142654	~	H	O	O	~	O	O	~	+	~	~	.	O	H	H
38	141884	~	H	O	O	~	O	O	~	+	~	~	.	O	H	H
17	142653	~	H	O	O	~	O	O	~	+	~	~	.	O	H	H
18	142645	~	H	O	O	~	O	O	~	+	~	~	.	O	H	H
19	142628	~	H	O	O	~	O	O	~	+	~	~	.	O	H	H
20	142620	~	H	O	O	~	O	O	~	+	~	~	.	O	H	H
21	142618	~	H	O	O	~	O	O	~	+	~	~	.	O	H	H
22	142617	~	H	O	O	~	O	O	~	+	~	~	.	O	H	H
23	142616	~	H	O	O	~	O	O	~	+	~	~	.	O	H	H
24	142451	~	H	O	O	~	O	O	~	+	~	~	.	O	H	H
25	142441	~	H	O	O	~	O	O	~	+	~	~	.	O	H	H
26	142439	~	H	O	O	~	O	O	~	+	~	~	.	O	H	H
27	141931	~	H	O	O	~	O	O	~	+	~	~	.	O	H	H
28	141926	~	H	O	O	~	O	O	~	+	~	~	.	O	H	H
29	141899	~	H	O	O	~	O	O	~	+	~	~	.	O	H	H
30	141890	~	H	O	O	~	H	+	O	+	.	H	O	+	~	
31	141912	~	H	O	O	O	H	~	H	-	.	H	O	+	~	
32	141935	~	~	O	G	H	~	H	~	.	H	O	+	~		
33	142465	H	~	+	O	G	H	~	~	.	~	.	O	H	H	
34	142655	~	H	O	O	O	~	+	H	-	+	G	O	~	H	
35	142418	~	H	O	O	O	~	+	H	-	+	G	O	~	H	
36	142627	~	H	O	O	O	~	+	H	-	.	O	H	H		
37	141975	~	H	O	O	O	~	+	H	-	.	O	H	H		

【 図 4 】

FIG. 4
FIG. 4A

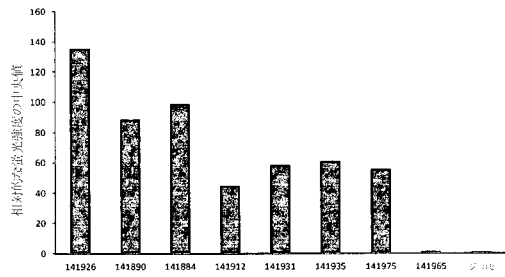
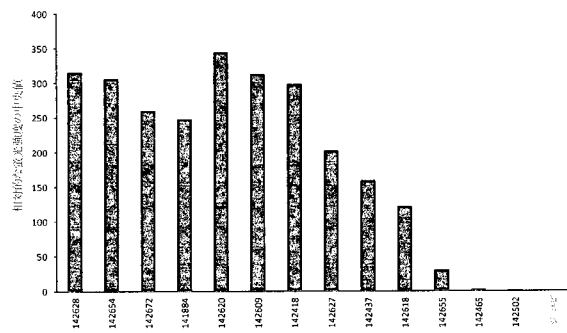


FIG. 4B



【 図 5 】

FIG. 5
FIG. 5A

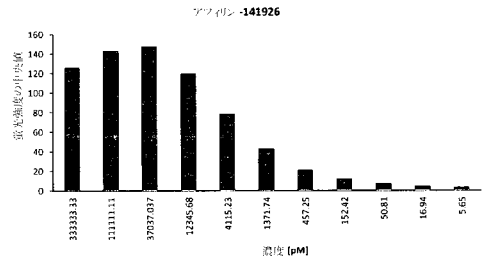
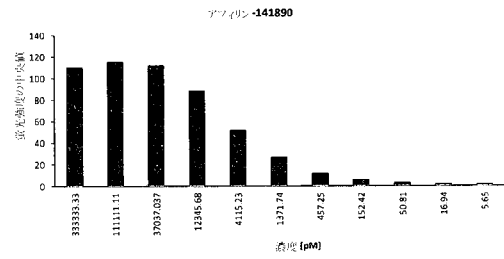
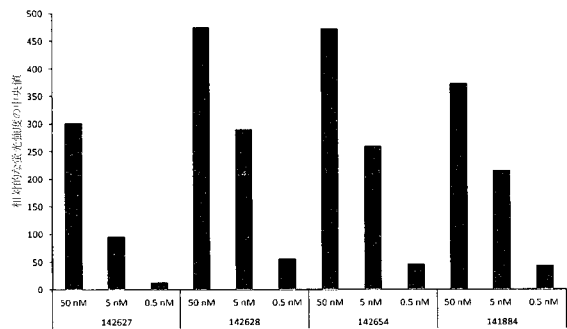


FIG. 5B



【 図 6 - 1 】

FIG. 6
FIG. 6A



【 図 6 - 2 】

FIG. 6C

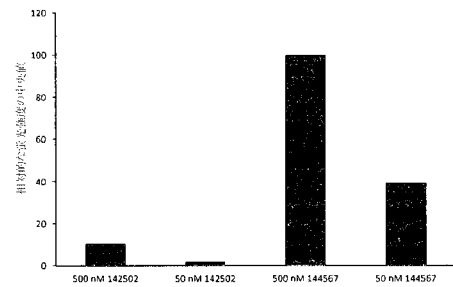
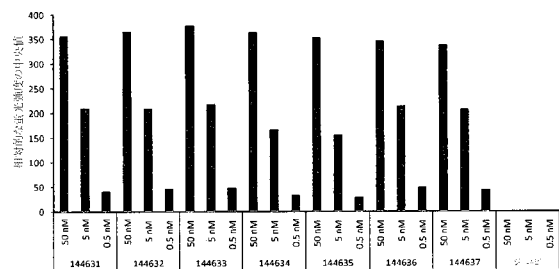
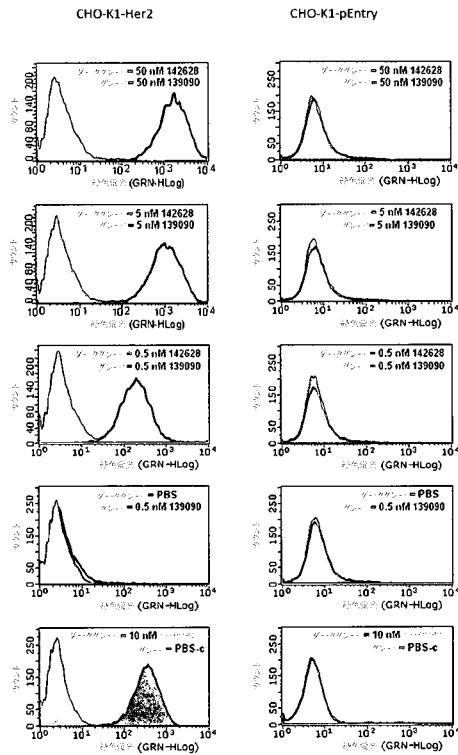


FIG. 6B



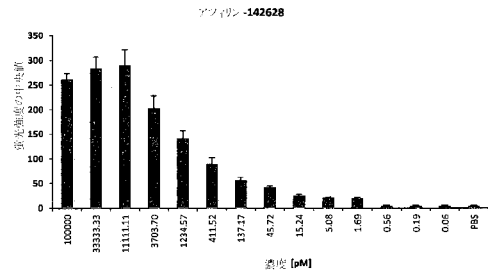
【 図 7 】

FIG. 7



【 図 8 】

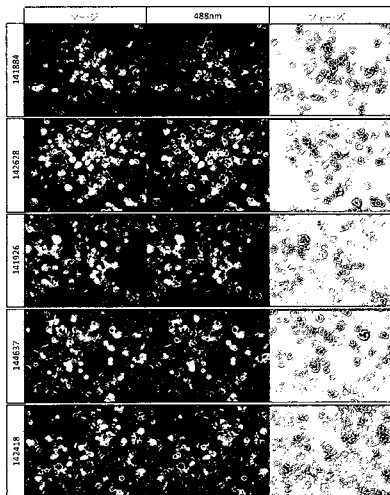
FIG. 8



【 図 9 - 1 】

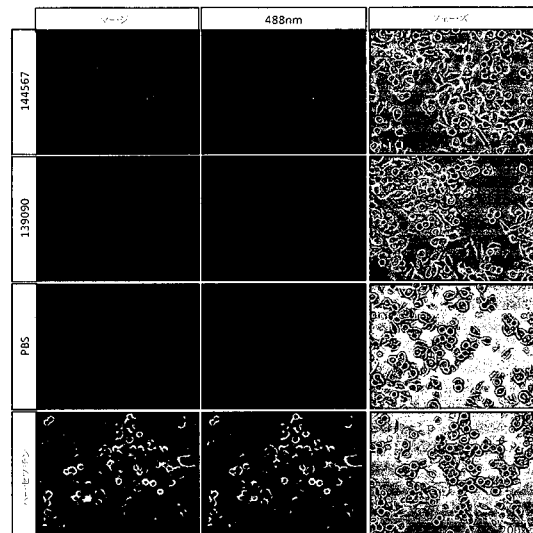
FIG. 9

FIG. 9A



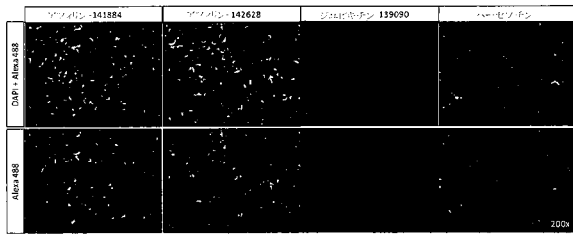
【 図 9 - 2 】

FIG. 9B



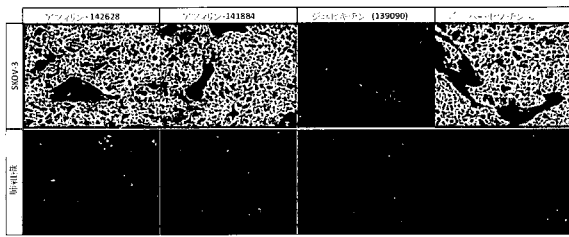
【 図 1 0 】

FIG. 10



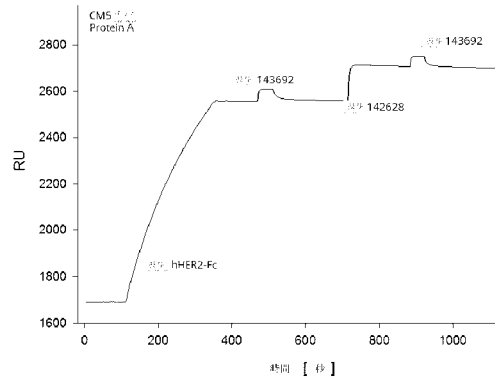
【 図 1 1 】

FIG. 11



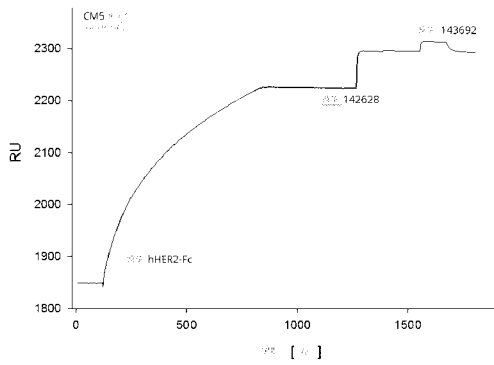
【 図 1 2 】

FIG. 12



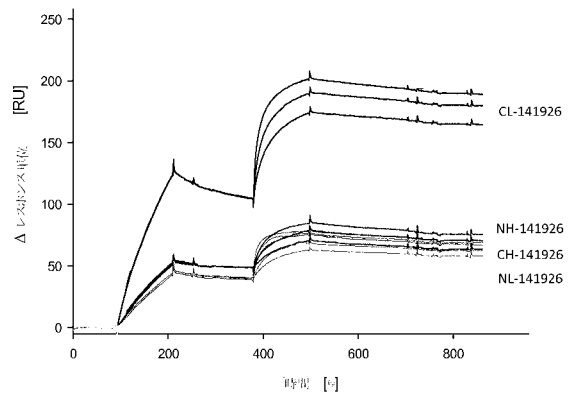
【 図 1 3 】

FIG. 13



【 図 1 4 】

FIG. 14



【 図 1 5 】

FIG. 15

FIG. 15A

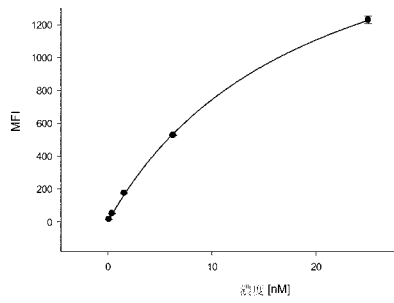
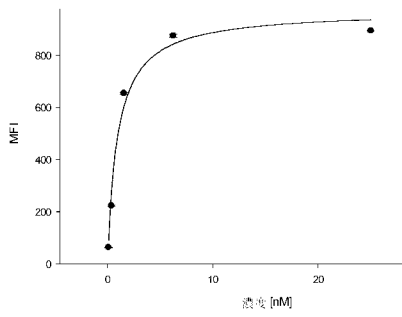


FIG. 15B



【 配 列 表 】

2018529310000001.app

【 手 続 補 正 書 】

【 提 出 日 】 平 成 29 年 12 月 25 日 (2017.12.25)

【 手 続 補 正 1 】

【 補 正 対 象 書 類 名 】 明 細 書

【 補 正 対 象 項 目 名 】 配 列 表

【 補 正 方 法 】 追 加

【 補 正 の 内 容 】

【 配 列 表 】

2018529310000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2016/067207

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C07K16/32 C07K14/47 ADD. C12N15/62		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, Sequence Search, EMBASE, CHEM ABS Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 2 738 180 A1 (MOLECULAR PARTNERS AG [CH]) 4 June 2014 (2014-06-04) paragraph [0018] - paragraph [0095]	1-17
X	WO 2014/094799 A1 (SCIL PROTEINS GMBH [DE]) 26 June 2014 (2014-06-26) cited in the application pages 2-8,; claim 19; sequence 3	1-17
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
21 September 2016		29/09/2016
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer
		Seranski, Peter

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP2016/067207

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of Item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
- a. forming part of the international application as filed:
- in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- on paper or in the form of an image file.
- b. furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- c. furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
- in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
- on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2016/067207

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 2738180	A1	04-06-2014	
		AU 2013351096 A1	09-07-2015
		CA 2892747 A1	05-06-2014
		CN 104918959 A	16-09-2015
		EP 2738180 A1	04-06-2014
		EP 2925784 A1	07-10-2015
		HK 1211297 A1	20-05-2016
		JP 2015537044 A	24-12-2015
		KR 20150091138 A	07-08-2015
		US 2015299265 A1	22-10-2015
		WO 2014083208 A1	05-06-2014

WO 2014094799	A1	26-06-2014	NONE

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 H 0 4 5
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 K 38/43 (2006.01)	A 6 1 K 38/43	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	E
A 6 1 K 49/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	T
A 6 1 K 51/08 (2006.01)	A 6 1 K 49/00	
A 6 1 K 47/64 (2017.01)	A 6 1 K 51/08	2 0 0
A 6 1 K 47/60 (2017.01)	A 6 1 K 47/64	
A 6 1 K 47/68 (2017.01)	A 6 1 K 47/60	
A 6 1 K 47/61 (2017.01)	A 6 1 K 47/68	
A 6 1 K 47/65 (2017.01)	A 6 1 K 47/61	
A 6 1 K 38/16 (2006.01)	A 6 1 K 47/65	
A 6 1 K 38/19 (2006.01)	A 6 1 K 38/16	2 0 0
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 38/19	
G 0 1 N 33/574 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	A 6 1 K 51/08	1 0 0
	G 0 1 N 33/574	A
	G 0 1 N 33/53	D

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, T J, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, R O, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, H N, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG , NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1 . T W E E N

- (72)発明者 ズワーグ, マドレン
ドイツ連邦共和国 0 6 1 2 0 ハレノザーレ, ハイブリヒ - ダメロウ - シュトラーセ 1, シー
ノオー ナフィゴ プロテインズ ゲゼルシャフト ミット ベシュレンクテル ハフツング
- (72)発明者 グローサー, マンヤ
ドイツ連邦共和国 0 6 1 2 0 ハレノザーレ, ハイブリヒ - ダメロウ - シュトラーセ 1, シー
ノオー ナフィゴ プロテインズ ゲゼルシャフト ミット ベシュレンクテル ハフツング
- (72)発明者 ボッセ - ドウネッケ, エヴァ
ドイツ連邦共和国 0 6 1 2 0 ハレノザーレ, ハイブリヒ - ダメロウ - シュトラーセ 1, シー
ノオー ナフィゴ プロテインズ ゲゼルシャフト ミット ベシュレンクテル ハフツング
- (72)発明者 フィードラー, エリク
ドイツ連邦共和国 0 6 1 2 0 ハレノザーレ, ハイブリヒ - ダメロウ - シュトラーセ 1, シー
ノオー ナフィゴ プロテインズ ゲゼルシャフト ミット ベシュレンクテル ハフツング
- (72)発明者 ハウプツ, ウルリッヒ
ドイツ連邦共和国 0 6 1 2 0 ハレノザーレ, ハイブリヒ - ダメロウ - シュトラーセ 1, シー

ノオー ナフィゴ プロテインズ ゲゼルシャフト ミット ベシュレンクテル ハフツング

Fターム(参考) 4B064 AG01 CA19 CE12 DA05 DA14

4B065 AA01X AA57X AA72X AA87X AA90Y AB01 BA02 CA24 CA44 CA46

4C076 AA95 CC27 CC41 EE59

4C084 AA02 AA03 AA12 AA17 BA01 BA08 BA21 BA22 BA23 BA41
BA44 CA47 CA53 DA01 DC01 DC32 NA13 NA14 ZB212 ZB261

4C085 AA13 AA14 CC23 EE01 HH03 HH11 HH20 KA03 KA04 KA27
KA29 KB82 LL18

4H045 AA10 AA20 AA30 BA10 BA41 BA53 BA57 BA71 BA72 CA40
EA28 EA51 FA74 GA26

专利名称(译)	Her2结合蛋白基于diubiquitin突变蛋白		
公开(公告)号	JP2018529310A	公开(公告)日	2018-10-11
申请号	JP2017567102	申请日	2016-07-19
[标]发明人	セッテルフロリアン ズワーグマドレン グローサーマンヤ ボッセドウネッケエヴァ フィードラーエリク ハウプツウルリッヒ		
发明人	セッテル,フロリアン ズワーグ,マドレン グローサー,マンヤ ボッセ-ドウネッケ,エヴァ フィードラー,エリク ハウプツ,ウルリッヒ		
IPC分类号	C12N15/12 C12N15/63 C07K19/00 C07K14/47 C12P21/02 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 A61P35/00 A61K38/43 A61K39/395 A61K49/00 A61K51/08 A61K47/64 A61K47/60 A61K47/68 A61K47/ /61 A61K47/65 A61K38/16 A61K38/19 A61K45/00 G01N33/574 G01N33/53		
CPC分类号	C07K14/47 C07K16/32 C07K2318/20 C07K16/2863 C07K2317/31 C07K2317/92 C07K2317/94 C07K2319/00		
FI分类号	C12N15/12.ZNA C12N15/63.Z C07K19/00 C07K14/47 C12P21/02.C C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 A61P35/00 A61K38/43 A61K39/395.E A61K39/395.T A61K49/00 A61K51/08.200 A61K47 /64 A61K47/60 A61K47/68 A61K47/61 A61K47/65 A61K38/16.200 A61K38/19 A61K45/00 A61K51/08. 100 G01N33/574.A G01N33/53.D		
F-TERM分类号	4B064/AG01 4B064/CA19 4B064/CE12 4B064/DA05 4B064/DA14 4B065/AA01X 4B065/AA57X 4B065 /AA72X 4B065/AA87X 4B065/AA90Y 4B065/AB01 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA44 4B065 /CA46 4C076/AA95 4C076/CC27 4C076/CC41 4C076/EE59 4C084/AA02 4C084/AA03 4C084/AA12 4C084/AA17 4C084/BA01 4C084/BA08 4C084/BA21 4C084/BA22 4C084/BA23 4C084/BA41 4C084 /BA44 4C084/CA47 4C084/CA53 4C084/DA01 4C084/DC01 4C084/DC32 4C084/NA13 4C084/NA14 4C084/ZB212 4C084/ZB261 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/CC23 4C085/EE01 4C085/HH03 4C085 /HH11 4C085/HH20 4C085/KA03 4C085/KA04 4C085/KA27 4C085/KA29 4C085/KB82 4C085/LL18 4H045/AA10 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA41 4H045/BA53 4H045/BA57 4H045 /BA71 4H045/BA72 4H045/CA40 4H045/EA28 4H045/EA51 4H045/FA74 4H045/GA26		
优先权	2015177548 2015-07-20 EP		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及基于双泛素突变蛋白的新型Her2结合分子。本发明进一步涉及Her2结合蛋白，其任选地融合或缀合至药代动力学调节部分或治疗或诊断活性成分。本发明进一步涉及这些Her2结合蛋白在医学中的用途，优选在癌症的诊断或治疗中的用途。[选择图]图11

FIG. 11

