

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5608368号  
(P5608368)

(45) 発行日 平成26年10月15日(2014.10.15)

(24) 登録日 平成26年9月5日(2014.9.5)

(51) Int.Cl.	F I
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A
C 1 2 P 21/02 (2006.01)	C 1 2 P 21/02 C
C O 7 K 14/47 (2006.01)	C O 7 K 14/47
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19

請求項の数 88 (全 87 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2009-522275 (P2009-522275)  
 (86) (22) 出願日 平成19年8月1日(2007.8.1)  
 (65) 公表番号 特表2009-545301 (P2009-545301A)  
 (43) 公表日 平成21年12月24日(2009.12.24)  
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2007/057971  
 (87) 国際公開番号 W02008/015239  
 (87) 国際公開日 平成20年2月7日(2008.2.7)  
 審査請求日 平成22年7月27日(2010.7.27)  
 (31) 優先権主張番号 60/821,073  
 (32) 優先日 平成18年8月1日(2006.8.1)  
 (33) 優先権主張国 米国(US)  
 (31) 優先権主張番号 60/912,013  
 (32) 優先日 平成19年4月16日(2007.4.16)  
 (33) 優先権主張国 米国(US)

(73) 特許権者 509029645  
 ビエリス アーゲー  
 ドイツ連邦共和国 85354 フライジ  
 ングーヴァイエンステファン リゼーマイ  
 トネルーストラッセ 30  
 (74) 代理人 100104721  
 弁理士 五十嵐 俊明  
 (72) 発明者 イェンセン、クリスチアン  
 ドイツ連邦共和国 81371 ミュンヘ  
 ン ダイゼルストラッセ 50  
 (72) 発明者 フーエルスメイエル、マルティン  
 ドイツ連邦共和国 85395 ヴォルフ  
 アスドルフ ローゼンストラッセ 18

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 涙りポカリンの突然変異タンパク質およびそれを得るための方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

ヒト涙りポカリンの所与の非天然リガンドに検出可能な結合親和性で結合する、ヒト涙りポカリンの突然変異タンパク質を生成するための方法であって、

(a) ヒト涙りポカリンをコードする核酸分子を、天然の成熟ヒト涙りポカリンの線状ポリペプチド配列のアミノ酸配列位置26~34、56~58、80、83、104~106および108のうちのいずれかの少なくとも12個のコドンでの突然変異誘発にさらすことにより、ヒト涙りポカリンの突然変異タンパク質をコードする複数の核酸を得るステップであって、前記成熟ヒト涙りポカリンの線状ポリペプチド配列の配列位置61および153でシステイン残基をコードするコドンの少なくとも1つが、任意の他のアミノ酸残基をコードするように突然変異されているステップ、

(b) (a) で得られた1つまたは複数の突然変異タンパク質核酸分子を発現系において発現させることにより、1つまたは複数の突然変異タンパク質を得るステップ、および

(c) (b) で得られた、ヒト涙りポカリンの所与の非天然リガンドに対する検出可能な結合親和性を有する前記1つまたは複数の突然変異タンパク質を選択するステップ、を含む方法。

【請求項2】

成熟ヒト涙りポカリンの前記線状ポリペプチド配列のアミノ酸配列位置26、27、28、29、30、31、32、33、34、56、57、58、80、83、104、105、106および108のコドンの18個すべてが突然変異されることを特徴とする請

求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

成熟ヒト淚リポカリンの前記線状ポリペプチド配列のアミノ酸配列位置 6 1 および 1 5 3 をコードするコドンの少なくとも 1 つが、位置 6 1 でアラニン、フェニルアラニン、リシン、アルギニン、トレオニン、アスパラギン、チロシン、メチオニン、セリン、プロリンもしくはトリプトファンおよび/または位置 1 5 3 でセリンもしくはアラニンをコードするように突然変異されることを特徴とする請求項 1 または請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

成熟ヒト淚リポカリンの前記線状ポリペプチド配列のアミノ酸配列位置 1 1 1 および 1 1 4 をコードするコドンが位置 1 1 1 でアルギニンおよび位置 1 1 4 でトリプトファンをコードするように突然変異されることを特徴とする請求項 1 ないし請求項 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

10

【請求項 5】

成熟ヒト淚リポカリンの前記線状ポリペプチド配列の位置 1 0 1 でシステインをコードするコドンが任意の他のアミノ酸をコードするように突然変異されることを特徴とする請求項 1 ないし請求項 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6】

成熟ヒト淚リポカリンの線状ポリペプチド配列の位置 1 0 1 でシステインをコードするコドンがセリンをコードするように突然変異されることを特徴とする請求項 5 に記載の方法。

20

【請求項 7】

ステップ ( c ) が、

( a ) 免疫学的ハプテン、ペプチド、タンパク質または他の高分子 ( m a c r o m o l e c u l e ) の特徴を示す遊離形態またはコンジュゲート形態の化学化合物から成る群から選択される化合物を所与のリガンドとして提供し、

( b ) 前記リガンドと、前記リガンドに対する結合親和性を有する突然変異タンパク質との複合体の形成を可能にするために、前記複数の突然変異タンパク質を前記リガンドと接触させ、および

( c ) 結合親和性を有していないまたは実質的に有していない突然変異タンパク質を除去する、

30

ことをさらに含むことを特徴とする請求項 1 ないし請求項 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8】

前記リガンドがタンパク質またはその断片 ( f r a g m e n t ) であることを特徴とする請求項 1 ないし請求項 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 9】

ステップ ( c ) における前記選択を競合的条件下で実行することを特徴とする請求項 1 ないし請求項 8 のいずれかに記載の方法。

【請求項 10】

少なくとも 1 つの突然変異タンパク質を所与のリガンドの結合について選択するために、突然変異誘発によって得られ、ヒト淚リポカリンの前記複数の突然変異タンパク質をコードする核酸を、M 1 3 ファミリーの糸状バクテリオファージのコートタンパク質 p I I I またはこのコートタンパク質の断片をコードする遺伝子と 3 ' 端で作動可能に融合することを特徴とする請求項 1 ないし請求項 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

40

【請求項 11】

請求項 1 ないし請求項 10 のいずれか 1 項に記載の方法によって入手可能であり、ヒト淚リポカリンの所与の非天然リガンドに対して検出可能な結合親和性を有するヒト淚リポカリンの突然変異タンパク質。

【請求項 12】

ヒト淚リポカリンの所与の非天然リガンドに対して検出可能な結合親和性を有するヒト

50

涙リポカリンの突然変異タンパク質において、野生型 ( w i l d - t y p e ) 涙リポカリンの配列位置 6 1 および 1 5 3 に存在する少なくとも 1 つのシステイン残基が他のアミノ酸と交換され、少なくとも 1 2 個の突然変異したアミノ酸残基が成熟ヒト涙リポカリンの前記線状ポリペプチド配列の配列位置 2 6 ~ 3 4、5 6 ~ 5 8、8 0、8 3、1 0 4 ~ 1 0 6 および 1 0 8 のうちのいずれかに存在することを特徴とする突然変異タンパク質。

【請求項 1 3】

配列位置 2 6、2 7、2 8、2 9、3 0、3 1、3 2、3 3、3 4、5 6、5 7、5 8、8 0、8 3、1 0 4、1 0 5、1 0 6 および 1 0 8 の 1 8 個すべてで突然変異したアミノ酸残基を含むことを特徴とする請求項 1 1 または請求項 1 2 に記載の突然変異タンパク質。

10

【請求項 1 4】

アミノ酸置換 C y s 6 1 A l a、P h e、L y s、A r g、T h r、A s n、T y r、M e t、S e r、P r o または T r p、および C y s 1 5 3 S e r または A l a の少なくとも 1 つを含むことを特徴とする請求項 1 1 ないし請求項 1 3 のいずれか 1 項に記載の突然変異タンパク質。

【請求項 1 5】

A r g 1 1 1 P r o および L y s 1 1 4 T r p から選択される少なくとも 1 つのさらなるアミノ酸置換を含むことを特徴とする請求項 1 1 ないし請求項 1 4 のいずれか 1 項に記載の突然変異タンパク質。

【請求項 1 6】

成熟ヒト涙リポカリンの前記配列の位置 1 0 1 でシステイン残基のアミノ酸置換をさらを含むことを特徴とする請求項 1 1 ないし請求項 1 5 のいずれか 1 項に記載の突然変異タンパク質。

20

【請求項 1 7】

突然変異 C y s 1 0 1 S e r を含むことを特徴とする請求項 1 6 に記載の突然変異タンパク質。

【請求項 1 8】

酵素、タンパク質もしくはタンパク質ドメイン、ペプチド、シグナル配列、および/またはアフィニティータグにその N 末端またはその C 末端で作動可能に融合されることを特徴とする請求項 1 1 ないし請求項 1 7 のいずれか 1 項に記載の突然変異タンパク質。

30

【請求項 1 9】

突然変異タンパク質の血清半減期を延長する成分 ( m o i e t y ) に融合されることを特徴とする請求項 1 1 ないし請求項 1 8 のいずれか 1 項に記載の突然変異タンパク質。

【請求項 2 0】

前記血清半減期を延長する成分が、免疫グロブリンの F c 部分、免疫グロブリンの C H 3 ドメイン、免疫グロブリンの C H 4 ドメイン、アルブミンまたはアルブミン断片、アルブミン結合ペプチド、アルブミン結合タンパク質およびトランスフェリンから成る群から選択されることを特徴とする請求項 1 9 に記載の突然変異タンパク質。

【請求項 2 1】

前記アルブミン結合タンパク質が、細菌アルブミン結合タンパク質、アルブミンに対する抗体もしくは抗体断片、またはアルブミンに対する結合活性を有するリポカリン突然変異タンパク質であることを特徴とする請求項 2 0 に記載の突然変異タンパク質。

40

【請求項 2 2】

前記細菌アルブミン結合タンパク質が連鎖球菌プロテイン G のアルブミン結合ドメインであることを特徴とする請求項 2 1 に記載の突然変異タンパク質。

【請求項 2 3】

前記アルブミン結合ペプチドが式 C y s - X a a <sub>1</sub> - X a a <sub>2</sub> - X a a <sub>3</sub> - X a a <sub>4</sub> - C y s を有し、X a a <sub>1</sub> が A s p、A s n、S e r、T h r または T r p であり；X a a <sub>2</sub> が A s n、G l n、H i s、I l e、L e u または L y s であり；X a a <sub>3</sub> が A l a、A s p、P h e、T r p または T y r であり；X a a <sub>4</sub> が A s p、G l y、L e u、P h

50

e、SerまたはThrであることを特徴とする請求項20に記載の突然変異タンパク質。

【請求項24】

有機分子、酵素標識(l a b e l)、放射性標識、蛍光性標識、発色標識、発光標識、ハプテン、ジゴキシゲニン、ビオチン、金属錯体、金属、コロイド金および突然変異タンパク質の血清半減期を延長する成分から成る群から選択される標識にコンジュゲートされることを特徴とする請求項11ないし請求項17のいずれか1項に記載の突然変異タンパク質。

【請求項25】

前記血清半減期を延長する成分が、ポリアルキレングリコール分子、ヒドロキシエチルデンプン、パルミチン酸または他の脂肪酸分子、免疫グロブリンのFc部分、免疫グロブリンのCH3ドメイン、免疫グロブリンのCH4ドメイン、アルブミンまたはアルブミン断片、アルブミン結合ペプチド、アルブミン結合タンパク質およびトランスフェリンから成る群から選択されることを特徴とする請求項24に記載の突然変異タンパク質。

10

【請求項26】

前記アルブミン結合タンパク質が、細菌アルブミン結合タンパク質またはアルブミンに対する結合活性を有するリボカリン突然変異タンパク質であることを特徴とする請求項25に記載の突然変異タンパク質。

【請求項27】

前記細菌アルブミン結合タンパク質が連鎖球菌プロテインGのアルブミン結合ドメインであることを特徴とする請求項26に記載の突然変異タンパク質。

20

【請求項28】

前記ポリアルキレングリコールがポリエチレン(PEG)またはその活性化誘導体であることを特徴とする請求項25に記載の突然変異タンパク質。

【請求項29】

前記アルブミン結合ペプチドが式Cys - Xaa<sub>1</sub> - Xaa<sub>2</sub> - Xaa<sub>3</sub> - Xaa<sub>4</sub> - Cysを有し、Xaa<sub>1</sub>がAsp、Asn、Ser、ThrまたはTrpであり；Xaa<sub>2</sub>がAsn、Gln、His、Ile、LeuまたはLysであり；Xaa<sub>3</sub>がAla、Asp、Phe、TrpまたはTyrであり；Xaa<sub>4</sub>がAsp、Gly、Leu、Phe、SerまたはThrであることを特徴とする請求項25に記載の突然変異タンパク質。

30

【請求項30】

前記非天然リガンドがタンパク質またはその断片であることを特徴とする請求項11ないし請求項29のいずれか1項に記載の突然変異タンパク質。

【請求項31】

前記タンパク質またはその断片が、血管内皮成長因子(VEGF)、血管内皮成長因子受容体2(VEGF-R2)およびインターロイキン4受容体アルファ鎖(IL-4受容体アルファ)の群から選択されることを特徴とする請求項30に記載の突然変異タンパク質。

【請求項32】

前記タンパク質がIL-4受容体アルファであることを特徴とする請求項31に記載の突然変異タンパク質。

40

【請求項33】

前記タンパク質がヒトIL-4受容体アルファであることを特徴とする請求項32に記載の突然変異タンパク質。

【請求項34】

前記タンパク質がIL-4受容体アルファの細胞外領域またはドメインであることを特徴とする請求項32または請求項33に記載の突然変異タンパク質。

【請求項35】

IL-4アンタゴニストとして作用することを特徴とする請求項32ないし請求項34

50

のいずれか 1 項に記載の突然変異タンパク質。

【請求項 3 6】

ヒト IL - 4 のアンタゴニストとして作用することを特徴とする請求項 3 5 に記載の突然変異タンパク質。

【請求項 3 7】

IL - 1 3 アンタゴニストとして作用することを特徴とする請求項 3 2 ないし請求項 3 6 のいずれか 1 項に記載の突然変異タンパク質。

【請求項 3 8】

ヒト IL - 1 3 のアンタゴニストとして作用することを特徴とする請求項 3 7 に記載の突然変異タンパク質。

10

【請求項 3 9】

カニクイザル IL - 4 受容体アルファと交差反応することを特徴とする請求項 3 2 ないし請求項 3 8 のいずれかに記載の突然変異タンパク質。

【請求項 4 0】

成熟ヒト涙リポカリンの前記アミノ酸配列に関して位置 2 6 ~ 3 4、5 6 ~ 5 8、8 0、8 3、1 0 4 ~ 1 0 6 および 1 0 8 のうちのいずれかでのシステイン残基による天然のアミノ酸の少なくとも 2 つのアミノ酸置換を含むことを特徴とする請求項 3 2 ないし請求項 3 9 のいずれか 1 項に記載の突然変異タンパク質。

【請求項 4 1】

IL - 4 受容体アルファの細胞外領域またはドメインに 2 0 0 n M 以下の  $K_D$  で結合することを特徴とする請求項 3 2 から 4 0 のいずれか一項に記載の突然変異タンパク質。

20

【請求項 4 2】

IL - 4 受容体アルファの細胞外領域またはドメインに 1 0 0 n M 以下の  $K_D$  で結合することを特徴とする請求項 4 1 に記載の突然変異タンパク質。

【請求項 4 3】

IL - 4 受容体アルファの細胞外領域またはドメインに 2 0 n M 以下の  $K_D$  で結合することを特徴とする請求項 4 2 に記載の突然変異タンパク質。

【請求項 4 4】

IL - 4 受容体アルファの細胞外領域またはドメインに 1 n M 以下の  $K_D$  で結合することを特徴とする請求項 4 3 に記載の突然変異タンパク質。

30

【請求項 4 5】

成熟ヒト涙リポカリンの前記アミノ酸配列に関して少なくとも 1 2 個のアミノ酸置換を含み、そのアミノ酸置換が、Arg 2 6 Ser, Pro; Glu 2 7 Arg; Phe 2 8 Cys; Glu 3 0 Arg; Met 3 1 Ala; Asn 3 2 Tyr, His; Leu 3 3 Tyr; Glu 3 4 Gly, Ser, Ala, Asp, Lys, Asn, Thr, Arg; Leu 5 6 Gln; Ile 5 7 Arg; Ser 5 8 Ile, Ala, Arg, Val, Thr, Asn, Lys, Tyr, Leu, Met; Asp 8 0 Ser; Lys 8 3 Arg; Glu 1 0 4 Leu; Leu 1 0 5 Cys; His 1 0 6 Pro; および Lys 1 0 8 Gln から成る群から選択されることを特徴とする請求項 3 2 ないし請求項 4 4 のいずれか 1 項に記載の突然変異タンパク質。

40

【請求項 4 6】

Met 3 9 Val; Thr 4 2 Met, Ala; Thr 4 3 Ile, Pro, Ala; Glu 4 5 Lys, Gly; Asn 4 8 Asp, His, Ser, Thr; Val 5 3 Leu, Phe, Ile, Ala, Gly, Ser; Thr 5 4 Ala, Leu; Met 5 5 Leu, Ala, Ile, Val, Phe, Gly, Thr, Tyr; Glu 6 3 Lys, Gln, Ala, Gly, Arg; Val 6 4 Gly, Tyr, Met, Ser, Ala, Lys, Arg, Leu, Asn, His, Thr, Ile; Ala 6 6 Ile, Leu, Val, Thr, Met; Glu 6 9 Lys, Gly; Lys 7 0 Arg, Gln, Glu; Thr 7 8 Ala; Ile 8 9 Val; Asp 9 5 Asn, Ala, Gly; and Tyr 1 0 0 His から成る群から選択さ

50

れる少なくとも1つのアミノ酸置換をさらに含むことを特徴とする請求項45に記載の突然変異タンパク質。

【請求項47】

アミノ酸置換：Arg26 Ser; Glu27 Arg; Phe28 Cys; Glu30 Arg; Met31 Ala; Leu33 Tyr; Leu56 Gln; Ile57 Arg; Asp80 Ser; Lys83 Arg; Glu104 Leu; Leu105 Cys; His106 Pro; and Lys108 Glnを含むことを特徴とする請求項45または請求項46に記載の突然変異タンパク質。

【請求項48】

アミノ酸置換の次のセット：

(1) Arg26 Ser; Glu27 Arg; Phe28 Cys; Glu30 Arg; Met31 Ala; Asn32 Tyr; Leu33 Tyr; Glu34 Gly; Leu56 Gln; Ile57 Arg; Ser58 Ile; Asp80 Ser; Lys83 Arg; Glu104 Leu; Leu105 Cys; His106 Pro; Lys108 Gln;

(2) Arg26 Ser; Glu27 Arg; Phe28 Cys; Glu30 Arg; Met31 Ala; Asn32 Tyr; Leu33 Tyr; Glu34 Lys; Leu56 Gln; Ile57 Arg; Ser58 Asn; Asp80 Ser; Lys83 Arg; Glu104 Leu; Leu105 Cys; His106 Pro; Lys108 Gln;

(3) Arg26 Ser; Glu27 Arg; Phe28 Cys, Glu30 Arg; Met31 Ala; Asn32 Tyr; Leu33 Tyr; Leu56 Gln; Ile57 Arg; Ser58 Arg; Asp80 Ser; Lys83 Arg; Glu104 Leu; Leu105 Cys; His106 Pro; Lys108 Gln;

(4) Arg26 Ser; Glu27 Arg; Phe28 Cys; Glu30 Arg; Met31 Ala; Asn32 Tyr; Leu33 Tyr; Glu34 Ser; Leu56 Gln; Ile57 Arg; Asp80 Ser; Lys83 Arg; Glu104 Leu; Leu105 Cys; His106 Pro; Lys108 Gln;

(5) Arg26 Ser; Glu27 Arg; Phe28 Cys; Glu30 Arg; Met31 Ala; Asn32 His; Leu33 Tyr; Glu34 Ser; Leu56 Gln; Ile57 Arg; Ser58 Ala; Asp80 Ser; Lys83 Arg; Glu104 Leu; Leu105 Cys; His106 Pro; Lys108 Gln;

(6) Arg26 Ser; Glu27 Arg; Phe28 Cys; Glu30 Arg; Met31 Ala; Asn32 Tyr; Leu33 Tyr; Glu34 Asp; Leu56 Gln; Ile57 Arg; Ser58 Lys; Asp80 Ser; Lys83 Arg; Glu104 Leu; Leu105 Cys; His106 Pro; Lys108 Gln; および

(7) Arg26 Ser; Glu27 Arg; Phe28 Cys; Glu30 Arg; Met31 Ala; Asn32 Tyr; Leu33 Tyr; Glu34 Gly; Leu56 Gln; Ile57 Arg; Asp80 Ser; Lys83 Arg; Glu104 Leu; Leu105 Cys; His106 Pro; Lys108 Gln

のうちの1つを含むことを特徴とする請求項45ないし請求項47のいずれか1項に記載の突然変異タンパク質。

【請求項49】

配列番号2～8またはその断片もしくは変異体のいずれか1つに記載されるアミノ酸配列を有することを特徴とする請求項32ないし請求項48のいずれか1項に記載の突然変

10

20

30

40

50

異タンパク質。

【請求項50】

配列番号5またはその断片もしくは変異体のアミノ酸配列を有することを特徴とする請求項49に記載の突然変異タンパク質。

【請求項51】

配列番号6またはその断片もしくは変異体のアミノ酸配列を有することを特徴とする請求項49に記載の突然変異タンパク質。

【請求項52】

前記リガンドがVEGF-R2であることを特徴とする請求項31に記載の突然変異タンパク質。

10

【請求項53】

前記リガンドがVEGF-R2の細胞外領域またはドメインであることを特徴とする請求項52に記載の突然変異タンパク質。

【請求項54】

VEGFアンタゴニストとして作用することを特徴とする請求項52または請求項53に記載の突然変異タンパク質。

【請求項55】

VEGF-R2に200nM以下の $K_D$ で結合することを特徴とする請求項52ないし請求項54のいずれか1項に記載の突然変異タンパク質。

【請求項56】

20

VEGF-R2に100nM以下の $K_D$ で結合することを特徴とする請求項55に記載の突然変異タンパク質。

【請求項57】

VEGF-R2に20nM以下の $K_D$ で結合することを特徴とする請求項56に記載の突然変異タンパク質。

【請求項58】

VEGF-R2に1nM以下の $K_D$ で結合することを特徴とする請求項57に記載の突然変異タンパク質。

【請求項59】

成熟ヒト涙リポカリンの前記アミノ酸配列に関して少なくとも12個のアミノ酸置換を含み、そのアミノ酸置換が、Arg26 Ser; Glu27 Ile; Glu30 Ser; Met31 Gly; Asn32 Arg; Leu33 Ile; Glu34 Tyr; Leu56 Lys, Glu, Ala, Met; Ile57 Phe; Ser58 Arg; Asp80 Ser, Pro; Lys83 Glu, Gly; Glu104 Leu; Leu105 Ala; His106 Val; およびLys108 Thrから成る群から選択されることを特徴とする請求項52ないし請求項58のいずれか1項に記載の突然変異タンパク質。

30

【請求項60】

Leu41 Phe; Glu63 Lys, Val64 Met; Asp72 Gly; Lys76 Arg, Glu; Ile88 Val, Thr; Ile89 Thr; Arg90 Lys; Asp95 Gly; Phe99 Leu; およびGly107 Arg, Lys, Gluから成る群から選択される少なくとも1つのアミノ酸置換をさらに含むことを特徴とする請求項59に記載の突然変異タンパク質。

40

【請求項61】

アミノ酸置換: Arg26 Ser; Glu27 Ile; Glu30 Ser; Met31 Gly; Asn32 Arg; Leu33 Ile; Glu34 Tyr; Ile57 Phe; Ser58 Arg; Lys83 Glu; Glu104 Leu; Leu105 Ala; His106 Val; およびLys108 Thrを含むことを特徴とする請求項59または請求項60に記載の突然変異タンパク質。

【請求項62】

50

アミノ酸置換の次のセット：

(1) Arg 26 Ser ; Glu 27 Ile ; Glu 30 Ser ; Met 31  
Gly ; Asn 32 Arg ; Leu 33 Ile ; Glu 34 Tyr ; Leu 56  
Lys ; Ile 57 Phe ; Ser 58 Arg ; Asp 80 Ser ; Lys 83  
Glu ; Glu 104 Leu ; Leu 105 Ala ; His 106 Val ; Lys  
108 Thr ;

(2) Arg 26 Ser ; Glu 27 Ile ; Glu 30 Ser ; Met 31  
Gly ; Asn 32 Arg ; Leu 33 Ile ; Glu 34 Tyr ; Leu 56  
Glu ; Ile 57 Phe ; Ser 58 Arg ; Asp 80 Ser ; Lys 83  
Glu ; Glu 104 Leu ; Leu 105 Ala ; His 106 Val ; Lys  
108 Thr ;

(3) Arg 26 Ser ; Glu 27 Ile ; Glu 30 Ser ; Met 31  
Gly ; Asn 32 Arg ; Leu 33 Ile ; Glu 34 Tyr ; Leu 56  
Ala ; Ile 57 Phe ; Ser 58 Arg ; Asp 80 Ser ; Lys 83  
Glu ; Glu 104 Leu ; Leu 105 Ala ; His 106 Val ; Lys  
108 Thr ; および

(4) Arg 26 Ser ; Glu 27 Ile ; Glu 30 Ser ; Met 31  
Gly ; Asn 32 Arg ; Leu 33 Ile ; Glu 34 Tyr ; Leu 56  
Glu ; Ile 57 Phe ; Ser 58 Arg ; Asp 80 Pro ; Lys 83  
Glu ; Glu 104 Leu ; Leu 105 Ala ; His 106 Val ; Lys  
108 Thr .

のうちの1つを含むことを特徴とする請求項59ないし請求項61のいずれか1項に記載の突然変異タンパク質。

【請求項63】

配列番号34～39のいずれか1つに記載されるアミノ酸配列を有することを特徴とする請求項52ないし請求項62のいずれかに記載の突然変異タンパク質。

【請求項64】

前記リガンドがVEGFまたはその断片であることを特徴とする請求項31に記載の突然変異タンパク質。

【請求項65】

VEGFのその受容体への結合を阻害することによってVEGFアンタゴニストとして作用し、VEGFに対する前記受容体はVEGF-R1、VEGF-R2およびニューロピリン-Iから成る群から選択されることを特徴とする請求項64に記載の突然変異タンパク質。

【請求項66】

VEGFに対する前記受容体がVEGF-R2であることを特徴とする請求項65に記載の突然変異タンパク質。

【請求項67】

VEGFに200nM以下の $K_D$ で結合することを特徴とする請求項64ないし請求項66のいずれか1項に記載の突然変異タンパク質。

【請求項68】

VEGFに100nM以下の $K_D$ で結合することを特徴とする請求項67に記載の突然変異タンパク質。

【請求項69】

VEGFに20nM以下の $K_D$ で結合することを特徴とする請求項68に記載の突然変異タンパク質。

【請求項70】

VEGFに1nM以下の $K_D$ で結合することを特徴とする請求項69に記載の突然変異タンパク質。

【請求項71】

10

20

30

40

50



成熟ヒト涙リポカリンの前記アミノ酸配列に関して少なくとも12個のアミノ酸置換を含み、そのアミノ酸置換が、Arg26 Ser, Pro, Val, Leu, Ile; Glu27 Gly; Phe28 Ala; Pro29 Leu; Glu30 Arg; Met31 Cys; Asn32 Leu; Leu33 Ala; Glu34 Gly; Leu56 His, Arg, Tyr, Gln; Ile57 Val, Thr, Leu; Ser58 Lys; Asp80 Ile; Lys83 Ile; Glu104 Cys; His106 Asn, Ser; およびLys108 Ala, Valから成る群から選択されることを特徴とする請求項64ないし請求項70のいずれか1項に記載の突然変異タンパク質。

## 【請求項72】

Val36 Ala; Thr37 Ala, Ile; Met39 Thr; Thr40 Ala, Ser; Asn48 Asp, Ala51 Val; Lys52 Arg; Thr54 Val; Met55 Val; Ser61 Pro; Lys65 Arg; Ala66 Val; Val67 Ile; Glu69 Gly, Ser, Thr; Lys76 Arg, Ile, Ala, Met, Pro; Tyr87 Arg, His, Lys, Gln; Ile89 Thr, Val, Gly, His, Met, Lys; Arg90 Gly; Ile98 Val; andGly107 Gluから成る群から選択される少なくとも1つのアミノ酸置換をさらに含むことを特徴とする請求項71に記載の突然変異タンパク質。

## 【請求項73】

アミノ酸置換: Glu27 Gly; Phe28 Ala; Pro29 Leu; Glu30 Arg; Met31 Cys; Asn32 Leu; Leu33 Ala; Glu34 Gly; Asp80 Ile; Lys83 Ile; Glu104 Cys; andLys108 Valを含むことを特徴とする請求項71または請求項72に記載の突然変異タンパク質。

## 【請求項74】

アミノ酸置換の次のセット:

(1) Arg26 Ser; Glu27 Gly; Phe28 Ala; Pro29 Leu; Glu30 Arg; Met31 Cys; Asn32 Leu; Leu33 Ala; Glu34 Gly; Leu56 His; Ser58 Lys; Asp80 Ile; Lys83 Ile; Glu104 Cys; His106 Asn; Lys108 Val;

(2) Arg26 Pro; Glu27 Gly; Phe28 Ala; Pro29 Leu; Glu30 Arg; Met31 Cys; Asn32 Leu; Leu33 Ala; Glu34 Gly; Leu56 His; Ser58 Glu; Asp80 Ile; Lys83 Ile; Glu104 Cys; His106 Ser; Lys108 Val;

(3) Arg26 Pro; Glu27 Gly; Phe28 Ala; Pro29 Leu; Glu30 Arg; Met31 Cys; Asn32 Leu; Leu33 Ala; Glu34 Gly; Leu56 His; Ser58 Lys; Asp80 Ile; Lys83 Ile; Glu104 Cys; His106 Asn; Lys108 Val;

(4) Arg26 Pro; Glu27 Gly; Phe28 Ala; Pro29 Leu; Glu30 Arg; Met31 Cys; Asn32 Leu; Leu33 Ala; Glu34 Gly; Leu56 Arg; Ser58 Lys; Asp80 Ile; Lys83 Ile; Glu104 Cys; His106 Ser; Lys108 Val;

(5) Arg26 Pro; Glu27 Gly; Phe28 Ala; Pro29 Leu; Glu30 Arg; Met31 Cys; Asn32 Leu; Leu33 Ala; Glu34 Gly; Leu56 His; Ser58 Lys; Asp80

10

20

30

40

50

I l e ; L y s 8 3 I l e ; G l u 1 0 4 C y s ; H i s 1 0 6 S e r ; L y s 1  
0 8 V a l ;

( 6 ) A r g 2 6 S e r ; G l u 2 7 G l y ; P h e 2 8 A l a ; P r o 2 9  
L e u ; G l u 3 0 A r g ; M e t 3 1 C y s ; A s n 3 2 L e u ; L e u 3 3  
A l a ; G l u 3 4 G l y ; L e u 5 6 H i s ; S e r 5 8 L y s ; A s p 8 0  
I l e ; L y s 8 3 I l e ; G l u 1 0 4 C y s ; H i s 1 0 6 S e r ; L y s 1  
0 8 V a l ;

( 7 ) A r g 2 6 V a l ; G l u 2 7 G l y ; P h e 2 8 A l a ; P r o 2 9  
L e u ; G l u 3 0 A r g ; M e t 3 1 C y s ; A s n 3 2 L e u ; L e u 3 3  
A l a ; G l u 3 4 G l y ; L e u 5 6 H i s ; S e r 5 8 L y s ; A s p 8 0  
I l e ; L y s 8 3 I l e ; G l u 1 0 4 C y s ; H i s 1 0 6 S e r ; L y s 1  
0 8 V a l ;

( 8 ) A r g 2 6 L e u ; G l u 2 7 G l y ; P h e 2 8 A l a ; P r o 2 9  
L e u ; G l u 3 0 A r g ; M e t 3 1 C y s ; A s n 3 2 L e u ; L e u 3 3  
A l a ; G l u 3 4 G l y ; L e u 5 6 H i s ; S e r 5 8 L y s ; A s p 8 0  
I l e ; L y s 8 3 I l e ; G l u 1 0 4 C y s ; H i s 1 0 6 S e r ; L y s 1  
0 8 V a l ; および

( 9 ) A r g 2 6 I l e ; G l u 2 7 G l y ; P h e 2 8 A l a ; P r o 2 9  
L e u ; G l u 3 0 A r g ; M e t 3 1 C y s ; A s n 3 2 L e u ; L e u 3 3  
A l a ; G l u 3 4 G l y ; L e u 5 6 H i s ; S e r 5 8 L y s ; A s p 8 0  
I l e ; L y s 8 3 I l e ; G l u 1 0 4 C y s ; H i s 1 0 6 S e r ; L y s 1  
0 8 V a l

のうちの1つを含むことを特徴とする請求項71ないし請求項73のいずれか1項に記載の突然変異タンパク質。

【請求項75】

配列番号26～33または44～47のいずれか1つに記載されるアミノ酸配列を有することを特徴とする請求項64ないし請求項74のいずれか1項に記載の突然変異タンパク質。

【請求項76】

請求項11ないし請求項75のいずれかに記載の突然変異タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含むことを特徴とする核酸分子。

【請求項77】

ベクター中に含まれることを特徴とする請求項76に記載の核酸分子。

【請求項78】

ファージミドベクター中に含まれることを特徴とする請求項77に記載の核酸分子。

【請求項79】

請求項76ないし請求項78のいずれか1項に記載の核酸分子を含有することを特徴とする宿主細胞。

【請求項80】

請求項11ないし請求項31のいずれか1項に記載のヒト涙リポカリンの突然変異タンパク質と、薬学的に許容可能な賦形剤とを含むことを特徴とする医薬組成物。

【請求項81】

請求項32ないし請求項51のいずれか1項に記載のヒト涙リポカリンの突然変異タンパク質と、薬学的に許容可能な賦形剤とを含むことを特徴とする医薬組成物。

【請求項82】

請求項52ないし請求項75のいずれか1項に記載のヒト涙リポカリンの突然変異タンパク質と、薬学的に許容可能な賦形剤とを含むことを特徴とする医薬組成物。

【請求項83】

請求項11ないし請求項75のいずれかに記載のヒト涙リポカリンの突然変異タンパク質を産生するための方法であって、前記突然変異タンパク質を、細菌または真核生物の宿

10

20

30

40

50

主生物中での遺伝子操作法によって該突然変異タンパク質をコードする核酸から開始して産生させ、この宿主生物またはその培養物から単離することを特徴とする方法。

【請求項 8 4】

ヒト淚リポカリンの所与の非天然リガンドを検出するための、請求項 1 1 ないし請求項 7 5 のいずれか 1 項に記載のヒト淚リポカリンの突然変異タンパク質の使用であって、

( a ) 前記突然変異タンパク質を、前記所与のリガンドを含有していると思われる試料と適切な条件下で接触させることにより、前記突然変異タンパク質と前記所与のリガンドとの複合体の形成を可能にするステップ、および

( b ) 前記複合突然変異タンパク質を適切なシグナルによって検出するステップ、を含むことを特徴とする使用。

10

【請求項 8 5】

ヒト淚リポカリンの所与の非天然リガンドを分離するための、請求項 1 1 ないし請求項 7 5 のいずれか 1 項に記載のヒト淚リポカリンの突然変異タンパク質の使用であって、

( a ) 前記突然変異タンパク質を、前記リガンドを含有すると推測される試料と適切な条件下で接触させることにより、前記突然変異タンパク質と前記所与のリガンドとの複合体の形成を可能にするステップ、および

( b ) 前記突然変異タンパク質 / リガンド複合体を試料から分離するステップ、を含むことを特徴とする使用。

【請求項 8 6】

前記突然変異タンパク質 / リガンド複合体が固形支持体上に結合されることを特徴とする請求項 8 4 または請求項 8 5 に記載の使用。

20

【請求項 8 7】

化合物をヒト以外の生物または組織中の事前に選択された部位にターゲティングするための、請求項 1 1 ないし請求項 7 5 のいずれか 1 項に記載のヒト淚リポカリンの突然変異タンパク質の使用であって、

( a ) 前記突然変異タンパク質を前記化合物とコンジュゲートさせるステップ、および

( b ) 前記突然変異タンパク質 / 化合物複合体を事前に選択された部位に送達するステップ、

を含むことを特徴とする使用。

【請求項 8 8】

30

ヒト淚リポカリンの所与の非天然リガンドとの複合体形成のための、請求項 1 1 ないし請求項 7 5 のいずれか 1 項に記載のヒト淚リポカリンの突然変異タンパク質の生体外での ( i n v i t r o ) 使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本出願は、2006年8月1日に出願された米国仮出願第60/821,073号および2007年4月16日に出願された米国仮出願第60/912,013号の優先権の利益を主張し、それぞれの内容は、すべての目的のためにその全体が参照によって本明細書に組み込まれる。

40

【0 0 0 2】

本発明は、所与の非天然リガンドに検出可能な親和性で結合する、ヒト淚リポカリンに由来する新規な突然変異タンパク質に関する。本発明はまた、そのような突然変異タンパク質をコードする対応する核酸分子およびそれらの生成方法にも関する。本発明は、そのような突然変異タンパク質を産生するための方法にさらに関する。最後に、本発明は、そのようなリポカリン突然変異タンパク質を含む医薬組成物および突然変異タンパク質の種々の使用を対象とする。

【背景技術】

【0 0 0 3】

リポカリンタンパク質ファミリーのメンバー ( P e r v a i z , S . および B r e w ,

50

K. (1987) FASEB J. 1, 209~214) は、様々な異なる分子認識特性：種々の、主に疎水性分子（レチノイド、脂肪酸、コレステロール、プロスタグランジン、ビリベルジン、フェロモン、味覚物質、および臭気物質等）に結合するためのそれらの能力、特異的な細胞表面受容体へのそれらの結合、ならびに高分子複合体のそれらの形成によって特徴付けられる、典型的に小さな分泌タンパク質である。それらは過去に主に輸送タンパク質として分類されたが、リポカリンは種々様々な生理機能を果たすことが現在明らかとなっている。これらは、レチノール輸送、嗅覚、フェロモンシグナル伝達、およびプロスタグランジンの合成での役割を含む。リポカリンはまた、免疫応答の調節および細胞の恒常性の媒介にも関係した（例えば、Flower, D. R. (1996) Biochem. J. 318, 1~14およびFlower, D. R.ら(2000) Biochim. Biophys. Acta 1482, 9~24で考察される）。

10

## 【0004】

リポカリンは、並外れて低レベルの全体的な配列保存を共有し、配列同一性が20%未満であることが多い。非常に対照的に、それらの全体的なフォールディングパターンは高度に保存されている。リポカリン構造の中央部は、それ自体で閉じた単一の8本鎖逆平行-シートから成り、連続的に水素結合した-バレルを形成する。バレルの一端は、その底面をわたるN末端ペプチドセグメントおよび-ストランドを結びつける3つのペプチドグループによって立体的にブロックされている。-バレルの他端は溶媒にさらされており、4つのペプチドグループによって形成される標的(target)結合部位を包含する。異なるサイズ、形状、および化学的特徴の標的を収容することがそれぞれ可能な種々様々な異なる結合モードをもたらすのは、他の部分では不変のリポカリン骨格中のループのこの多様性である（例えば、Flower, D. R. (1996)、前掲、Flower, D. R.ら(2000)、前掲、またはSkerra, A. (2000) Biochim. Biophys. Acta 1482, 337~350で考察される）。

20

## 【0005】

現在涙リポカリン(TLPCまたはTlc)と呼ばれるヒト涙プレアルブミンは、ヒト涙液の主要なタンパク質(全タンパク質含有量の約3分の1)として最初は記載されたが、また、近年、前立腺、鼻粘膜、および気管粘膜を含む他のいくつかの分泌組織中でも同定された。相同タンパク質はラット、ブタ、イヌ、およびウマで見つかった。涙リポカリンは、関連する不溶性脂質に対するその高度な無差別性およびこのタンパク質ファミリーの他のメンバーと異なる結合の特徴のゆえに珍しいリポカリンメンバーである(Redl, B. (2000) Biochim. Biophys. Acta 1482, 241~248で考察される)。脂肪酸、脂肪族アルコール、リン脂質、糖脂質、およびコレステロール等の異なる化学分類の著しい数の親油性化合物はこのタンパク質の内因性リガンドである。興味深いことには、他のリポカリンとは対照的に、リガンド(標的)結合の強度は、アルキルアミドおよび脂肪酸の両方についての炭化水素末部の長さとは相互に関連する。したがって、涙リポカリンは最も可溶性でない脂質に最も強く結合する(Glasgow, B. J.ら(1995) Curr. Eye Res. 14, 363~372、Gasymov, O. K.ら(1999) Biochim. Biophys. Acta 1433, 307~320)。

30

40

## 【0006】

ヒト涙リポカリンの正確な生物学的機能は今までのところ十分に解明されておらず、まだ論議事項である。涙液中で、ヒト涙リポカリンは、眼の粘膜表面から液相に脂質を移動させることによる涙液膜の完全性にとって最も重要であると思われる(Gasymov, O. K.ら(1999)、前掲で考察される)。しかしながら、ヒト涙リポカリンは、リポカリンの間で非常に珍しい*in vitro*でのさらなる活性、すなわちシステインプロテイナーゼの阻害および非特異的エンドヌクレアーゼ活性を呈する(van't Hof, W.ら(1997) J. Biol. Chem. 272, 1837~1841、Yusifov, T. N.ら(2000) Biochem. J. 347, 815~819)。近年、涙リポカリンは、*in vitro*でいくつかの脂質過酸化産物に結合することがで

50

きることが実証され、涙リポカリンは、潜在的に有害な親油性分子の、生理学的酸化ストレス誘発性の捕捉剤として機能するかもしれないといった仮説をもたらした (Lechner, M.ら (2001) *Biochem. J.* 356, 129~135)。

【0007】

非共有結合的相互作用を介してそれらの対応する標的に選択的に結合するタンパク質は、一般に、バイオテクノロジー、医学、生物学的分析、ならびに生物科学および生命科学で試薬として重大な役割を果たす。抗体、つまり免疫グロブリンはこの種のタンパク質の顕著な例である。リガンド/標的の認識、結合、および/または分離に関連するそのようなタンパク質の多種多様の必要性にもかかわらず、ほとんど排他的に免疫グロブリンが現在使用されている。明確なリガンド結合の特徴を有する他のタンパク質、例えばレクチンの適用は、特別の場合に制限されたままである。

10

【0008】

むしろ、近年、リポカリンファミリーのメンバーが、明確なリガンド結合特性を有するタンパク質に関する研究テーマになった。PCT公開公報WO99/16873号は、4つのペプチドループの領域に突然変異したアミノ酸位置を有するリポカリンファミリーのポリペプチドを開示し、これらのループは、結合ポケットを包含する円柱状の $\alpha$ -バレル構造の端に配置され、またこれらのループは、オオモンシロチョウのピリン結合タンパク質のアミノ酸位置28~45、58~69、86~99、および114~129を含む線状ポリペプチド配列中のそれらのセグメントに対応する。

【0009】

20

PCT公開公報WO00/75308号は、ジゴキシゲニンに特異的に結合するピリン結合タンパク質の突然変異タンパク質を開示し、国際特許出願WO03/029463号およびWO03/029471号は、それぞれヒト好中球ゼラチナーゼ関連性リポカリン(hNGAL)およびアポリタンパク質Dの突然変異タンパク質に関する。リポカリン変異体のリガンド親和性、特異性、およびフォールディング安定性をさらに改良し、うまく調整するために、さらなるアミノ酸残基の交換等の、リポカリンファミリーの異なるメンバーを使用する種々のアプローチが提唱された (Skerra, A. (2001) *Rev. Mol. Biotechnol.* 74, 257~275, Schlehuber, S. および Skerra, A. (2002) *Biophys. Chem.* 96, 213~228)。PCT公開公報WO2006/56464号は、低ナノモルの範囲でCTLA-4に対する結合親和性を有するヒト好中球ゼラチナーゼ関連性リポカリンの突然変異タンパク質を開示する。

30

【0010】

PCT公開公報WO2005/19256号は、異なるまたは同じ標的リガンドに対する少なくとも1つの結合部位を有する涙リポカリンの突然変異タンパク質を開示し、ヒト涙リポカリンのそのような突然変異タンパク質を生成するための方法を提供する。このPCT出願によれば、涙リポカリンの一次配列、特に、成熟ヒト涙リポカリンのアミノ酸7~14、24~36、41~49、53~66、69~77、79~84、87~98、および103~110を含むループ領域内のあるアミノ酸ストレッチは、結合親和性を有する突然変異タンパク質を生成するために突然変異誘発にさらされる。結果として生じる突然変異タンパク質は、ナノモルの範囲で、ほとんどの場合 $> 100$  nMで、選択されたリガンドに対する結合親和性( $K_D$ )を有する。

40

【0011】

この進歩にもかかわらず、単に、診断適用および治療適用でのヒト涙リポカリンの突然変異タンパク質の適合性をさらに改良するための理由で、例えばピコモルの範囲で選択された標的分子に対する改良された結合特性を有するヒト涙リポカリン突然変異タンパク質を生成するための方法を有することはなお望ましいと思われる。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0012】

50

したがって、本発明の目的は、所与の標的に対する高度な結合親和性を有するヒト涙リポカリン突然変異タンパク質を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0013】

この目的は、独立請求項の特徴を有するヒト涙リポカリン突然変異タンパク質を生成するための方法によって達成される。

【0014】

第1の態様では、本発明は、ヒト涙リポカリンの所与の非天然リガンドに検出可能な結合親和性で結合する、ヒト涙リポカリンの突然変異タンパク質を生成するための方法であって、

(a) ヒト涙リポカリンをコードする核酸分子を、天然の成熟ヒト涙リポカリンの線状ポリペプチド配列のアミノ酸配列位置26~34、56~58、80、83、104~106および108のうちのいずれかの少なくとも1つのコドンでの突然変異誘発にさらすことにより、ヒト涙リポカリンの突然変異タンパク質をコードする複数の核酸を得るステップであって、成熟ヒト涙リポカリンの線状ポリペプチド配列の配列位置61および153でシステイン残基をコードするコドンの少なくとも1つが、任意の他のアミノ酸残基をコードするように突然変異されているステップ、

(b) (a) で得られた1つまたは複数の突然変異タンパク質核酸分子を発現系において発現させることより、1つまたは複数の突然変異タンパク質を得るステップ、および

(c) ステップ(b) で得られた、ヒト涙リポカリンの所与の非天然リガンドに対する検出可能な結合親和性を有する1つまたは複数の突然変異タンパク質を選択および/または単離によって濃縮するステップ、を含む方法を提供する。

【0015】

これに関連して、本発明者らは、驚いたことに、システイン残基61および153によって形成される野生型涙リポカリンの構造的ジスルフィド結合の除去(それぞれのナイーブ核酸ライブラリーのレベルで)(Breustedtら(2005)、The 1.8-cryystal structure of human tear lipocalin reveals an extended branched cavity with capacity for multiple ligands.、J. Biol. Chem. 280、484~493を参照されたい)が、安定してフォールドされているだけではなく、さらに、低ピコモルの範囲で、親和性を有する所与の非天然リガンドに結合することもできる涙リポカリン突然変異タンパク質を提供することを見つけたことに注目されたい。理論によって束縛されることを望まなければ、構造的ジスルフィド結合の排除は、本発明の突然変異タンパク質中への非天然人工ジスルフィド結合の(自発的)生成または意図的な導入を考慮し(実施例を参照されたい)、それによって、例えば、突然変異タンパク質の安定性を増加させるというさらなる利点を提供することも考えられる。

【0016】

本明細書で使用される用語「突然変異誘発」は、実験条件が、ヒト涙リポカリン(Swiss-ProtデータバンクエントリーP31025)の所与の配列位置での自然発生のアミノ酸が、それぞれの天然のポリペプチド配列中のこの特異的な位置に存在しない少なくとも1つのアミノ酸によって置換され得るように選ばれることを意味する。用語「突然変異誘発」はまた、1つまたは複数のアミノ酸の欠失または挿入による配列セグメントの長さの(さらなる)改変をも含む。したがって、例えば、選ばれた配列位置の1つのアミノ酸が、3つのランダム突然変異のストレッチと交換され、野生型タンパク質のそれぞれのセグメントの長さと比較して2つのアミノ酸残基の挿入につながることは本発明の範囲内である。そのような挿入または欠失は、本発明で突然変異誘発にさらすことができるペプチドセグメントのうちのいずれかに互いに独立して導入されてもよい。本発明の例示的な一実施形態では、いくつかの突然変異の挿入は、選ばれたリポカリン骨格のループA

10

20

30

40

50

B中に導入されてもよい(本明細書にその全体が参照によって組み込まれる国際特許出願WO2005/019256号を参照されたい)。用語「ランダム突然変異誘発」は、所定のただ1つのアミノ酸(突然変異)も、ある配列位置に存在しないが、少なくとも2つのアミノ酸が突然変異誘発の間に既定の配列位置に、ある確率で組み込まれ得ることを意味する。

#### 【0017】

ヒト涙リボカリンのコード配列(Redl, B.ら(1992) *T. Biol. Chem.* 267, 20282~20287)は、本発明で選択されたペプチドセグメントの突然変異誘発のための出発点として使用される。詳述されたアミノ酸位置の突然変異誘発については、当業者は、部位特異的突然変異誘発のための種々の確立された標準の方法を自由に使うことができる(Sambrook, J.ら(1989)、前掲)。通常使用される技術は、所望の配列位置に縮重塩基組成物を運ぶ、合成オリゴヌクレオチドの混合物を使用するPCR(ポリメラーゼ連鎖反応)による突然変異の導入である。例えば、コドンNNKまたはNNS(N=アデニン、グアニンもしくはシトシン、またはチミンであり、K=グアニンまたはチミンであり、S=アデニンまたはシトシンである。)の使用は、突然変異誘発の間に、アンバー停止コドンを加えた20種のアミノ酸すべての組み込みを可能にするが、コドンVVSは、アミノ酸Cys、Ile、Leu、Met、Phe、Trp、Tyr、およびValがポリペプチド配列の選択された位置に組み込まれないようにするので、組み込まれる可能性のあるアミノ酸の数を12種に制限する。コドンNMS(M=アデニンまたはシトシン)の使用は、例えば、アミノ酸Arg、Cys、Gly、Ile、Leu、Met、Phe、Trp、およびValが選択された配列位置に組み込まれないようにするので、選択された配列位置での可能性のあるアミノ酸の数を11種に制限する。この点で、セレノシステインまたはピロリジン等の他のアミノ酸(通常20種の自然発生アミノ酸以外)についてのコドンも突然変異タンパク質の核酸中に組み込むことができることに注目されたい。Wang, L.ら(2001) *Science* 292, 498~500またはWang, L.およびSchultz, P.G.(2002) *Chem. Comm.* 1, 1~11によって記載されるように、他の珍しいアミノ酸、例えばo-メチル-L-チロシンまたはp-アミノフェニルアラニンを挿入するために停止コドンとして普通認識されるUAG等の「人工」コドンを使用することも可能である。

#### 【0018】

塩基対特異性が低下したヌクレオチド基本単位、例えばイノシン、8-オキソ-2'-デオキシグアノシン、または6(2-デオキシ-D-リボフラノシル)-3,4-ジヒドロ-8H-ピリミド-1,2-オキサジン-7-オンの使用(Zaccolloら(1996) *J. Mol. Biol.* 255, 589~603)は、選ばれた配列セグメント中への突然変異の導入のための他の選択肢である。

#### 【0019】

さらなる可能性としていわゆるトリプレット突然変異誘発がある。この方法は、コード配列中への組み込みのための、それぞれが1つのアミノ酸をコードする異なるヌクレオチドトリプレットの混合物を使用する(Virnekas B, Ge L, Pluckthun A, Schneider KC, Wellnhofner G, Moroney S E. 1994 *Trinucleotide phosphoramidites: ideal reagents for the synthesis of mixed oligonucleotides for random mutagenesis. Nucleic Acids Res* 22, 5600~5607)。

#### 【0020】

それぞれのポリペプチドの選択された領域中に突然変異を導入するための1つの可能性のある戦略は、それぞれが、突然変異されることとなる対応する配列セグメントの1つに部分的に由来する4つのオリゴヌクレオチドの使用に基づく。これらのオリゴヌクレオチドを合成する場合、当業者は、天然のアミノ酸すべてをコードするコドンがランダムに生じるように、突然変異されることとなるアミノ酸位置に対応するそれらのヌクレオチド

10

20

30

40

50

リプレットの合成のための核酸基本単位の混合物を使用することができ、最後にリポカリンペプチドライブラリーの生成をもたらす。例えば、第1のオリゴヌクレオチドは、その配列中で、リポカリンポリペプチドの最もN末端の位置で、突然変異されることとなるペプチドセグメントについてのコーディング鎖に、突然変異される位置から離れて対応する。したがって、第2のオリゴヌクレオチドは、そのポリペプチド配列に続く第2の配列セグメントについての非コーディング鎖に対応する。順に、第3のオリゴヌクレオチドは、対応する第3の配列セグメントについてのコーディング鎖に対応する。最後に、第4のオリゴヌクレオチドは第4の配列セグメントの非コーディング鎖に対応する。ポリメラーゼ連鎖反応は、それぞれの第1および第2のオリゴヌクレオチドを用いてならびに必要であれば別々にそれぞれの第3および第4のオリゴヌクレオチドを用いて行うことができる。

10

**【0021】**

これらの反応の両方の増幅産物は、種々の知られている方法によって、突然変異が選択された位置に導入された第1～第4の配列セグメントの配列を含む単一の核酸中に組み合わせることができる。このために、両方の産物は、例えば、側方オリゴヌクレオチドならびに第2および第3の配列セグメントの間の配列をもたらす1つまたは複数の介在物質である核酸分子を使用して新しいポリメラーゼ連鎖反応にかけることができる。突然変異誘発に使用されるオリゴヌクレオチドの配列内の数および配置の選好では、当業者は自由に多数の代替物を使うことができる。

**【0022】**

上記に定義される核酸分子は、リポカリンポリペプチドをコードする核酸の欠けている5'および3'配列ならびにノまたはベクターとのライゲーションによって結びつけることができ、知られている宿主生物中でクローニングすることができる。多くの確立された手順はライゲーションおよびクローニングに利用可能である(Sambrook, J.ら(1989)、前掲)。例えば、クローニングベクターの配列中にも存在する制限エンドヌクレアーゼに対する認識配列は、合成オリゴヌクレオチドの配列中に設計することができる。したがって、それぞれのPCR産物の増幅および酵素的な開裂の後に、結果として生じる断片は対応する認識配列を使用して容易にクローニングすることができる。

20

**【0023】**

突然変異誘発のために選択された、タンパク質をコードする遺伝子内のより長い配列セグメントも、例えばエラー率が増加した条件下でのポリメラーゼ連鎖反応の使用によって、化学的突然変異誘発によって、または細菌の突然変異誘発株の使用によって、知られている方法を介してランダム突然変異誘発にさらすことができる。そのような方法はまた、リポカリン突然変異タンパク質の標的親和性または特異性をさらに最適化するために使用することができる。実験突然変異誘発のセグメントの外側で起こる可能性のある突然変異は許容されることが多いまたはそれどころか、例えばそれらがりポカリン突然変異タンパク質のフォールディング能率またはフォールディング安定性の改善に寄与する場合、有利であると証明され得る。

30

**【0024】**

本明細書で使用される用語「ヒト涙リポカリン」は、SWISS-PROTデータベース受入番号P31025を有する成熟ヒト涙リポカリンを指す。

40

**【0025】**

用語「非天然リガンド」は、生理学的条件下で天然の成熟ヒト涙リポカリンに結合しない化合物を指す。標的(リガンド)は、免疫学的ハプテン、ステロイドホルモン等のホルモン、または任意の生体高分子もしくはその断片、例えばタンパク質もしくはタンパク質ドメイン、ペプチド、オリゴデオキシヌクレオチド、核酸、オリゴ糖もしくは多糖またはそのコンジュゲート、脂質、または他の高分子の特徴を示す遊離形態またはコンジュゲート形態の任意の化合物であってもよい。

**【0026】**

本発明の一実施形態では、ヒト涙リポカリンの突然変異タンパク質を生成するための方法は、成熟ヒト涙リポカリンの線状ポリペプチド配列のアミノ酸配列位置26～34、5

50



6～58、80、83、104～106および108のうちのいずれかのコドンの少なくとも2、3、4、5、6、8、10、12、14、15、16または17個を突然変異させることを含む。他の実施形態では、成熟ヒト涙リポカリンの線状ポリペプチド配列のアミノ酸配列位置26、27、28、29、30、31、32、33、34、56、57、58、80、83、104、105、106および108のコドンの18個すべてを突然変異させる。

【0027】

他の態様では、本発明は、ヒト涙リポカリンの所与の非天然リガンドに検出可能な結合親和性で結合する、ヒト涙リポカリンの突然変異タンパク質を生成するための方法であって、

(a) ヒト涙リポカリンをコードする核酸分子を、成熟ヒト涙リポカリンの線状ポリペプチド配列のアミノ酸配列位置34、80、および104のうちのいずれかの少なくとも1つのコドンでの突然変異誘発にさらすことにより、ヒト涙リポカリンの突然変異タンパク質をコードする複数の核酸を得るステップ、

(b) (a) で得られた1つまたは複数の突然変異タンパク質核酸分子を発現系において発現させることにより、1つまたは複数の突然変異タンパク質を得るステップ、および

(c) ステップ(b) で得られた、ヒト涙リポカリンの所与の非天然リガンドに対する検出可能な結合親和性を有する1つまたは複数の突然変異タンパク質を選択および/または単離によって濃縮するステップ、を含む方法を提供する。

【0028】

前に述べた方法の一実施形態では、成熟ヒト涙リポカリンの線状ポリペプチド配列のアミノ酸配列位置26～33、56～58、83、105～106および108のうちのいずれかのコドンのさらに少なくとも2、3、4、5、6、8、10、12、14または15個が突然変異される。

【0029】

本発明の別の実施形態では、本発明による方法は、成熟ヒト涙リポカリンの線状ポリペプチド配列中の位置61および153のシステインをコードするコドンの両方の突然変異を含む。一実施形態では、位置61は、ほんの少数の可能性を挙げると、アラニン、フェニルアラニン、リシン、アルギニン、トレオニン、アスパラギン、チロシン、メチオニン、セリン、プロリン、またはトリプトファン残基をコードするように突然変異される。位置153が突然変異される実施形態では、セリンまたはアラニン等のアミノ酸を位置153に導入することができる。

【0030】

本明細書に記載される本発明の他の実施形態では、成熟ヒト涙リポカリンの線状ポリペプチド配列のアミノ酸配列位置111および/または114をコードするコドンは、例えば位置111でアルギニンおよび位置114でトリプトファンをコードするように突然変異される。

【0031】

本発明の方法の他の実施形態は、成熟ヒト涙リポカリンの線状ポリペプチド配列の位置101でシステインをコードするコドンの突然変異誘発を、このコドンが任意の他のアミノ酸をコードするように含む。一実施形態では、位置101をコードする突然変異したコドンはセリンをコードする。したがって、いくつかの実施形態では、位置61、101、および153の2つまたは3つすべてのシステインコドンは他のアミノ酸のコドンと交換される。

【0032】

本発明の方法によれば、突然変異タンパク質はヒト涙リポカリンをコードする核酸から開始して得られる。そのような核酸は、突然変異誘発にさらされ、組換えDNA技術によって適切な細菌または真核生物の宿主生物中に導入される。涙リポカリンの核酸ライブラリーの獲得は、抗体のような特性を有するリポカリン突然変異タンパク質、つまり所与の

10

20

30

40

50

標的に対して親和性を有する突然変異タンパク質を生成するための当技術分野で知られている任意の適切な技術を使用して実行することができる。そのような組合せの方法の例は、例えば、国際特許出願WO99/16873号、WO00/75308号、WO03/029471号、WO03/029462号、WO03/029463号、WO2005/019254号、WO2005/019255号、WO2005/019256号、またはWO2006/56464号に詳細に記載される。これらの特許出願のそれぞれの内容は、その全体が本明細書に参照によって組み込まれる。適切な宿主中での、突然変異誘発にさらされた核酸配列の発現の後に、所与の標的に結合する複数のそれぞれのリポカリン突然変異タンパク質の遺伝情報を保有するクローンは、得られたライブラリーから選択することができる。ファージディスプレイ (Kay, B. K. ら (1996) 前掲、Lowman, H. B. (1997) 前掲、もしくはRodri, D. J. およびMakowski, L. (1999) 前掲で考察される)、コロニースクリーニング (Pini, A. ら (2002) Comb. Chem. High Throughput Screen. 5, 503~510で考察される)、リボソームディスプレイ (Amstutz, P. ら (2001) Curr. Opin. Biotechnol. 12, 400~405で考察される) もしくはWilson, D. S. ら (2001) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98, 3750~3755で報告されるmRNAディスプレイ、または、WO99/16873号、WO00/75308号、WO03/029471号、WO03/029462号、WO03/029463号、WO2005/019254号、WO2005/019255号、WO2005/019256号、もしくはWO2006/56464号に特に記載される方法等によく知られている技術はこれらのクローンの選択のために利用することができる。

#### 【0033】

本開示に従って、ステップ(c)は、上記の方法の他の実施形態で、

(i) 免疫学的ハプテン、ペプチド、タンパク質、または例えば多糖、核酸分子(例えばDNAもしくはRNA)、または完全ウイルス粒子もしくはウイロイド等の他の高分子の特徴を示す遊離形態またはコンジュゲート形態の化合物から成る群から選択される化合物を所与のリガンドとして提供すること、

(ii) 複数の突然変異タンパク質を上述のリガンドと接触させて、上述のリガンドと、上述のリガンドに対する結合親和性を有する突然変異タンパク質との複合体の形成を可能にすること、および

(iii) 結合親和性を有していないまたは実質的に有していない突然変異タンパク質を除去すること、  
をさらに含む。

#### 【0034】

本発明の一部の実施形態では、リガンドはタンパク質またはその断片であってもよい。これらの実施形態のうちの一つでは、ヒトT細胞共受容体CD4に結合する突然変異タンパク質は除外される。

#### 【0035】

本発明の方法の一実施形態では、ステップ(c)における選択は競合的条件下で実行する。本明細書で使用される競合的条件は、突然変異タンパク質の選択が、突然変異タンパク質およびヒト涙リポカリンの所与の非天然リガンド(標的)が、その標的への突然変異タンパク質の結合に伴って競合するさらなるリガンドの存在下で接触させられる少なくとも一つのステップを包含することを意味する。このさらなるリガンドは、本発明の突然変異タンパク質によって認識されるエピトープに対する少なくとも一つの重複するエピトープに結合し、したがって突然変異タンパク質の標的結合に干渉する標的の生理学的リガンド、過剰な標的それ自体、または標的の任意の他の非生理学的リガンドであってもよい。あるいは、さらなるリガンドは、アロステリック効果によって、標的への突然変異タンパク質の結合部位と別個のエピトープを複雑にすることによって、突然変異タンパク質の結合と競合する。

10

20

30

40

50

## 【0036】

テンプレート（溶原性）（temperent）M13ファージを使用するファージディスプレイ技術の実施形態（Kay, B. K.ら（1996）, 前掲、Lowman, H. B.（1997）前掲、またはRodri, D. J.およびMakowski, L.（1999）, 前掲で考察される）は、本発明で利用することができる選択方法の例として与えられる。本発明の突然変異タンパク質の選択に使用することができるファージディスプレイ技術の他の実施形態は、Brodersらによって記載されるハイパーファージによるファージ技術である（Brodersら（2003）「Hyperphage. Improving antibody presentation in phage display.」Methods Mol. Biol. 205: 295~302）。f1等の他のテンプレートファージまたはT7等の溶菌ファージも同様に利用されてもよい。例示的な選択方法については、N末端でのシグナル配列、好ましくはOmpAシグナル配列とのおよびC末端でのファージキャプシド中に組み込まれ得るファージM13のキャプシドタンパク質pIIIまたはその断片との融合タンパク質としての突然変異したリポカリン核酸配列の発現を可能にするM13ファージミドが産生される。野生型配列のアミノ酸217~406を含むファージキャプシドタンパク質のC末端断片pIIIは融合タンパク質を産生するために好ましくは使用される。位置201のシステイン残基が欠けているまたは他のアミノ酸と交換されるpIIIのC末端断片は一実施形態でとりわけ好まれる。

10

## 【0037】

したがって、本発明の方法の別の実施形態は、突然変異誘発によって得られる、ヒト涙リポカリンの複数の突然変異タンパク質をコードする核酸を、M13ファミリーの糸状バクテリオファージのコートタンパク質pIIIまたはこのコートタンパク質の断片をコードする遺伝子と3'端で作動可能に融合して、少なくとも1つの突然変異タンパク質を所与のリガンドの結合について選択することを含む。

20

## 【0038】

融合タンパク質は、融合タンパク質またはその部分の固定化、検出、および/または精製を可能にするアフィニータグ等のさらなる成分を含んでもよい。さらに、停止コドンは、リポカリンまたはその突然変異タンパク質をコードする配列領域およびファージキャプシド遺伝子またはその断片の間に位置させることができ、停止コドン、好ましくはアンバー停止コドンは、適切なサブレッサー株中での翻訳の間にアミノ酸に少なくとも部分的に翻訳される。

30

## 【0039】

例えば、本明細書に記載される、現在pTlc27とも呼ばれるファスミドベクターpTLC27は、ヒト涙リポカリン突然変異タンパク質をコードするファージミドライブラリーの調製に使用することができる。涙リポカリン突然変異タンパク質をコードする発明の核酸分子は2つのBstXI制限部位を使用してベクター中に挿入される。ライゲーションの後に、大腸菌XL1-Blue等の適切な宿主株は、多くの独立したクローンを得るために結果として生じる核酸混合物を用いて形質転換される。それぞれのベクターは、所望の場合、ハイパーファージミドライブラリーの調製のために生成することができる。

40

## 【0040】

結果として生じるライブラリーは、続いて、機能的ファージミドを産生するために、適切なM13ヘルパーファージまたはハイパーファージを用いて液体培養中で重複感染させる。組換えファージミドは、コートタンパク質pIIIまたはその断片との融合物としてその表面上にリポカリン突然変異タンパク質を表し、融合タンパク質のN末端シグナル配列は正常に切り離される。他方、それはまた、ヘルパーファージによって供給された天然のキャプシドタンパク質pIIIの1つまたは複数のコピーをも運び、したがって、受容株、一般にFプラスミドまたはF'プラスミドを保有する細菌株に感染することができる。ハイパーファージディスプレイの場合では、ハイパーファージミドは、それらの表面上

50

に、感染性コートタンパク質 p I I I を有するが、天然のキャプシドタンパク質を有していない融合物としてリポカリン突然変異タンパク質を表す。ヘルパーファージまたはハイパーファージを用いた感染の間にまたはその後、リポカリン突然変異タンパク質およびキャプシドタンパク質 p I I I の間の融合タンパク質の遺伝子発現は、例えばアンヒドロテトラサイクリンの添加によって誘発することができる。誘発条件は、得られたファージミドの実質的な画分がそれらの表面上に少なくとも1つのリポカリン突然変異タンパク質を表すように選ばれる。ハイパーファージディスプレイの場合では、誘発条件は、リポカリン突然変異タンパク質およびキャプシドタンパク質 p I I I から成る3つおよび5つの間の融合タンパク質を保有するハイパーファージミドの集団をもたらす。ポリエチレングリコールを用いた沈殿等の種々の方法がファージミドの単離で知られている。単離は、典型的に、6～8時間のインキュベーション期間の後に起こる。

10

## 【 0 0 4 1 】

次いで、単離されたファージミドは、所望の標的を用いるインキュベーションによる選択にかけることができ、標的は、それらのコート中に融合タンパク質として所望の結合活性を有する突然変異タンパク質を運ぶそれらのファージミドの少なくとも一時的な固定化を可能にする形態で提示される。当業者に知られている種々の実施形態の中で、標的は、例えば、血清アルブミン等の担体タンパク質とコンジュゲートすることができ、この担体タンパク質を介してタンパク質結合表面、例えばポリスチレンに結合することができる。E L I S A 技術またはいわゆる「イムノスティック」に適したマイクロタイタープレートは、標的のそのような固定化に好ましくは使用することができる。あるいは、ビオチン等の他の結合基との標的のコンジュゲートを使用することができる。次いで、標的は、この基に選択的に結合する表面、例えばストレプトアビジン、ニュートラビジン、またはアビジンでコートされたマイクロタイタープレートまたは常磁性粒子の上に固定化することができる。標的が免疫グロブリンの F c 部分に融合される場合、固定化はまた、表面、例えば、プロテイン A またはプロテイン G を用いてコートされたマイクロタイタープレートまたは常磁性粒子を用いて達成することができる。

20

## 【 0 0 4 2 】

表面上に存在する非特異的ファージミド結合部位は、ブロッキング溶液を用いて、それらが E L I S A 法で知られているように飽和させることができる。次いで、ファージミドは、生理学的バッファーの存在下で表面上に固定化された標的と典型的に接触させられる。非結合ファージミドは複数回の洗浄によって除去される。次いで、表面上に残存するファージミド粒子を溶出させる。溶出については、いくつかの方法が可能である。例えば、ファージミドは、プロテアーゼの添加によってまたは酸、塩基、洗浄剤、もしくはカオトロピック塩の存在下でまたは適度な変性条件下で溶出させることができる。好ましい方法は、p H 2 . 2 のバッファーを使用する溶出であり、溶出液は続いて中和される。あるいは、遊離標的の溶液は、ファージミドへの結合について固定化標的と競合させるために添加することができるまたは標的特異的ファージミドは、対象とする標的に特異的に結合する免疫グロブリンもしくは天然のリガンドタンパク質 ( l i g a n d i n g p r o t e i n s ) との競合によって溶出させることができる。

30

## 【 0 0 4 3 】

その後、大腸菌細胞は溶出したファージミドを用いて感染させる。あるいは、核酸は、溶出したファージミドから抽出し、配列分析、増幅、または他の様式での細胞の形質転換に使用することができる。このように得られた大腸菌クローンから開始して、新鮮なファージミドまたはハイパーファージミドは、上記に記載される方法に従って、M 1 3 ヘルパーファージまたはハイパーファージを用いた重複感染によって再び産生され、このように増幅されたファージミドは、固定化標的上での選択にもう一度かけられる。複数選択サイクルは、十分に濃縮された形態で本発明の突然変異タンパク質を有するファージミドを得るために必要であることが多い。選択サイクルの数は、好ましくは、続く機能分析で、研究されるクローンの少なくとも 0 . 1 % が、所与の標的に対して検出可能な親和性を有する突然変異タンパク質を産生するように選ばれる。サイズ、つまり利用されるライブラリ

40

50

一の複雑さに依存して、2～8サイクルがこのために典型的に必要とされる。

【0044】

選択された突然変異タンパク質の機能分析については、大腸菌株が選択サイクルから得られるファージミドを用いて感染され、対応する二重鎖ファスミドDNAが単離される。このファスミドDNAからまたは同様にファージミドから抽出された一重鎖DNAから開始して、本発明の選択された突然変異タンパク質の核酸配列を当技術分野で知られている方法によって決定することができ、アミノ酸配列をそれから推定することができる。突然変異した領域または全涙リポカリン突然変異タンパク質の配列は、他の発現ベクター上でサブクローニングすることができ、適切な宿主生物中で発現させることができる。例えば、現在pTlc26とも呼ばれるベクターpTLPc26は、大腸菌TG1等の大腸菌株中での発現に使用することができる。このように産生された涙リポカリンの突然変異タンパク質は種々の生化学的方法によって精製することができる。例えばpTlc26を用いて産生された涙リポカリン突然変異タンパク質は、それらのC末端に親和性ペプチドStreptagII (Schmidtら、前掲)を保有し、したがって、好ましくはストレプトアビジンアフィニティークロマトグラフィーによって精製することができる。

10

【0045】

選択はまた、他の方法によっても実行することができる。多くの対応する実施形態は、当業者に知られているまたは文献に記載されている。さらに、方法の組合せを適用することができる。例えば、「ファージディスプレイ」によって選択されたまたは少なくとも濃縮されたクローンは、さらに、「コロニースクリーニング」にかけることができる。この手順は、標的に対して検出可能な結合親和性を有する涙リポカリン突然変異タンパク質の産生に関して個々クローンを直接単離することができるという利点を有する。

20

【0046】

「ファージディスプレイ」技術または「コロニースクリーニング」法での宿主生物として大腸菌の使用に加えて、他の細菌株、酵母、または同様に昆虫細胞もしくは哺乳動物細胞をこの目的のために使用することができる。さらに上記に記載されるランダムライブラリーからの涙リポカリン突然変異タンパク質の選択については、限定突然変異誘発を含む進化的方法も、繰り返しのスクリーニングサイクルの後の標的に対する親和性または特異性に関して、標的に対していくらかの結合活性を既に有する突然変異タンパク質を最適化するために適用することができる。

30

【0047】

所与の標的に対する親和性を有する突然変異タンパク質は一度選択されると、さらに高度な親和性の変異体またはより高度な耐熱性、改善された血清安定性、熱力学的安定性、改善された溶解性、改善された単量体の挙動、熱変性、化学変性、タンパク質分解、もしくは洗浄剤に対する改善された抵抗性のような改善された特性を有する変異体を続いて選択するために、そのような突然変異タンパク質を他の突然変異誘発にさらすことがさらに可能である。このさらなる突然変異誘発は、より高度な親和性を目標にする場合には*in vitro*「親和性成熟」と見なすことができ、合理的な設計に基づいた部位特異的突然変異またはランダム突然変異によって達成することができる。より高度な親和性または改善された特性を得るための他の可能なアプローチは、エラーブローンPCRの使用であり、これは、リポカリン突然変異タンパク質の配列位置の選択された範囲にわたって点突然変異をもたらす。エラーブローンPCRは、Zaccoloら(1996) *J. Mol. Biol.* 255、589～603によって記載されるもの等の任意の知られているプロトコールに従って実行することができる。そのような目的のための適切なランダム突然変異誘発の他の方法は、Murakami, Hら(2002) *Nat. Biotechnol.* 20、76～81によって記載されるランダム挿入/欠失(RID)突然変異誘発またはBittker, J. Aら(2002) *Nat. Biotechnol.* 20、1024～1029によって記載される非相対的ランダム組換え(NRR)を含む。所望の場合、親和性成熟はまた、W000/75308号またはSchlehuber, S.ら、(2000) *J. Mol. Biol.* 297、1105～1120に記載される手順

40

50

に従って実行することができ、ここで、ジゴキシゲニンに対して高度な親和性を有するプリン結合タンパク質の突然変異タンパク質が得られる。

【0048】

別の態様では、本発明は、ヒト涙リポカリンの所与の非天然リガンドに対して検出可能な結合親和性を有するヒト涙リポカリンの突然変異タンパク質を対象とし、これは本発明の上記の詳細な方法によって入手可能であるまたは得られる。

【0049】

一実施形態では、上記の方法に従って得られたヒト涙リポカリンの突然変異タンパク質は、他のアミノ酸による、配列位置61および153のそれぞれに存在するシステイン残基の少なくとも一方または両方の置換ならびに成熟ヒト涙リポカリンの線状ポリペプチド配列の配列位置26~34、56~58、80、83、104~106、および108のうちいずれか1つの少なくとも1つのアミノ酸残基の突然変異を含む。涙リポカリンのβ-バレル構造の開放端の結合部位において、位置24~36はAβループに含まれ、位置53~66はCβループに含まれ、位置69~77はEβループに含まれ、位置103~110はGβループに含まれる。これらの4つのループの定義はFlowerに従って本明細書で使用される(Flower, D. R. (1996)、前掲およびFlower, D. R. (2000)、前掲)。普通、そのような突然変異タンパク質は、成熟ヒト涙リポカリンの線状ポリペプチド配列の配列位置26~34、56~58、80、83、104~106、および108に少なくとも2、3、4、5、6、8、10、12、14、15、16、17、または18個の突然変異したアミノ酸残基を含む。特定の実施形態では、突然変異タンパク質は、アミノ酸置換Cys61 Ala、Phe、Lys、Arg、Thr、Asn、Tyr、Met、Ser、ProまたはTrp、およびCys153 SerまたはAlaを含む。そのような置換は、Cys61およびCys153を連結する自然発生のジスルフィド架橋の形成を抑制し、したがって突然変異タンパク質の取扱いを容易にするのに有用であることがわかった。

【0050】

他の実施形態では、突然変異タンパク質は、Arg111 ProおよびLys114 Trpから選択される少なくとも1つのさらなるアミノ酸置換を含む。本発明の突然変異タンパク質は、他のアミノ酸によって置換された、天然の成熟ヒト涙リポカリンの配列の位置101のシステインをさらに含んでもよい。この置換は、例えば、突然変異Cys101 SerまたはCys101 Thrであってもよい。

【0051】

突然変異タンパク質が結合している非天然リガンドはタンパク質またはその断片であってもよい、ただし、一部の実施形態では、ヒトT細胞共受容体CD4は非天然標的として除外されてもよいということを条件とする。

【0052】

本発明のリポカリン突然変異タンパク質は、突然変異したアミノ酸配列位置の外側に野生型(天然)アミノ酸配列を含んでもよい。他方では、本明細書に開示されるリポカリン突然変異タンパク質はまた、アミノ酸突然変異が、突然変異タンパク質の結合活性およびフォールディングに干渉しない限り、突然変異誘発にさらされた配列位置の外側にこれらの突然変異を含有してもよい。そのような突然変異は、確立された標準の方法を使用して、DNAレベルで非常に容易に達成することができる(Sambrook, J. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第2版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY)。アミノ酸配列の可能な変更は、アミノ酸置換だけではなく挿入または欠失がある。そのような置換は保存的であってもよい、つまり、アミノ酸残基は化学的に類似するアミノ酸残基と交換される。保存的置換の例は次のグループのメンバーの中での交換とする: 1) アラニン、セリン、およびトレオニン; 2) アスパラギン酸およびグルタミン酸; 3) アスパラギンおよびグルタミン; 4) アルギニンおよびリシン; 5) イソロイシン、ロイシン、メチオニン、およびバリ

10

20

30

40

50

ン；ならびに6)フェニルアラニン、チロシン、およびトリプトファン。他方では、アミノ酸配列中に非保存的変更を導入することも可能である。さらに、単一のアミノ酸残基を交換する代わりに、涙りポカリンの一次構造の1つまたは複数の連続的なアミノ酸を挿入するまたは欠失させることも、これらの欠失または挿入が安定したフォールドまたは機能的突然変異タンパク質をもたらす限り、可能である。(例えば、切断されたN末端およびC末端を有する突然変異タンパク質が生成される実験のセクションを参照されたい)。

#### 【0053】

アミノ酸配列のそのような改変は、ある制限酵素に対する開裂部位を組み込むことにより突然変異したリポカリン遺伝子またはその部分のサブクローニングを簡単にするための単一のアミノ酸位置の特異的突然変異誘発を含む。さらに、これらの突然変異はまた、所与の標的に対するリポカリン突然変異タンパク質の親和性をさらに改善するために組み込むこともできる。さらに、突然変異は、必要であれば、フォールディング安定性、血清安定性、タンパク質抵抗性、もしくは水溶解性を改善するまたは凝集傾向を低下させる等のために突然変異タンパク質のある特徴を調整するために導入することができる。例えば、自然発生のシステイン残基は、ジスルフィド架橋形成を予防するために他のアミノ酸に突然変異させてもよい。しかしながら、例えばポリエチレングリコール(PEG)、ヒドロキシエチルデンプン(HES)、ビオチン、ペプチド、もしくはタンパク質等の他の化合物へのコンジュゲートのためにまたは非自然発生ジスルフィド連結の形成のために新しい反応基を導入するために、他のアミノ酸配列位置をシステインに故意に突然変異させることも可能である。ヒト涙りポカリン突然変異タンパク質のアミノ酸配列中にシステイン残基を導入するためのそのような突然変異の例示的な可能性としては、置換Thr40 Cys、Glu73 Cys、Arg90 Cys、Asp95 Cys、およびGlu131 Cysを含む。アミノ酸位置40、73、90、95、および/または131のうちのいずれかの側面に生成されたチオール成分は、例えば、それぞれの涙りポカリン突然変異タンパク質の血清半減期を増加させるために、突然変異タンパク質をPEG化するまたはHES化するよう使用されてもよい。システインが任意のこれらの配列位置に導入された突然変異タンパク質S236.1-A22(実施例46を参照されたい)は、本発明のそのような突然変異タンパク質の例証となる例である。

#### 【0054】

本発明はまた、上記に定義される突然変異タンパク質も包含し、成熟ヒト涙りポカリンの配列の最初の4つのN末端アミノ酸残基(His-His-Leu-Leu;位置1~4)および/または成熟ヒト涙りポカリンの配列の最後の2つのC末端アミノ酸残基(Ser-Asp;位置157~158)は欠失している(実施例および添付の配列表リストも参照されたい)。

#### 【0055】

本発明のリポカリン突然変異タンパク質は、所望の標的に検出可能な親和性で、つまり、少なくとも200nMの解離定数で結合することができる。目下、一部の実施形態では、少なくとも100、20、1nM、またはそれ以下の、所与の標的に対する解離定数で所望の標的に結合するリポカリン突然変異タンパク質が好ましい。所望の標的に対する突然変異タンパク質の結合親和性は、蛍光滴定、競合ELISA、または表面プラズモン共鳴(BIACore)等の多くの方法によって測定することができる。

#### 【0056】

複合体形成が、結合パートナーの濃度、競合物の存在、バッファー系のイオン強度等のような多くの因子に依存的であることは当業者に容易に明白となる。選択および濃縮は、所望の標的との複合体で、少なくとも200nMの解離定数を有するリポカリン突然変異タンパク質の単離を可能にする条件下で一般に行われる。しかしながら、洗浄および溶出のステップは変動するストリンジェンシー(stringency)下で実行することができる。反応速度の特徴に関しての選択も同様可能である。例えば、その選択は、標的からの遅い解離または言い換えれば、低 $k_{off}$ 速度を示す突然変異タンパク質との標的の複合体形成に有利である条件下で行うことができる。あるいは、選択は、突然変異タン

10

20

30

40

50

パク質と標的との複合体の速い形成、言い換えれば高 $k_{on}$ 速度に有利である条件下で行うことができる。さらに例証となる代替物として、スクリーニングは、突然変異タンパク質の改善された耐熱性について選択する条件下で行うことができる（野生型淚リポカリンまたは事前に選択された標的に対する親和性を既に有する突然変異タンパク質と比較して）。

【0057】

本発明の淚リポカリン突然変異タンパク質は典型的に単量体のタンパク質として存在する。しかしながら、発明のリポカリン突然変異タンパク質が自発的に二量体化するまたはオリゴマー形成することも可能である。安定した単量体を形成するリポカリン突然変異タンパク質の使用は、例えばより速い拡散およびより良好な組織浸透のゆえに、いくつかの適用にとって好ましいものとなり得るが、安定したホモ二量体または多量体を自発的に形成するリポカリン突然変異タンパク質の使用は、そのような多量体が所与の標的に対する（さらに）増加した親和性および/または結合力を提供することができるので、他の実例では有利となり得る。さらに、リポカリン突然変異タンパク質のオリゴマー形態は、より遅い解離速度または長期間の血清半減期を有することができる。安定した単量体を形成する突然変異タンパク質の二量体化または多量体化が所望される場合、これは、例えば、jun-fosドメインもしくはロイシンジッパー等のそれぞれのオリゴマー化ドメインを本発明の突然変異タンパク質に融合することによってまたは「Duocalin」の使用によって達成することができる（下記も参照されたい）。

【0058】

本発明の淚リポカリン突然変異タンパク質は所与の標的との複合体形成のために使用されてもよい。標的は非天然標的/リガンドであってもよい。標的（リガンド）は、免疫学的ハプテン、ステロイドホルモン等のホルモン、または任意の生体高分子もしくはその断片、例えばタンパク質もしくはタンパク質ドメイン、ペプチド、オリゴデオキシヌクレオチド、核酸、オリゴ糖もしくは多糖またはそのコンジュゲートの特徴を示す遊離形態またはコンジュゲート形態の任意の化合物であってもよい。本発明の一実施形態では、標的はタンパク質である、ただしヒトT細胞共受容体CD4は除外されることを条件とする。タンパク質は、任意の球状可溶性タンパク質または受容体タンパク質、例えば細胞シグナル伝達に関連する膜貫通タンパク質、MHC分子等の免疫系の成分、または特異的疾患を示す細胞表面受容体とすることができる。突然変異タンパク質はまたタンパク質の断片のみに結合することができてよい。例えば、突然変異タンパク質は、細胞表面受容体のドメインが細胞膜中につき留められた受容体の一部である場合、細胞表面受容体のドメインに結合することができ、ならびにこのドメインが可溶性タンパク質として同様に産生され得る場合、溶液中の同じドメインに結合することができる。しかしながら、本発明はそのような高分子標的に結合するのみの突然変異タンパク質に決して限定されない。しかし、突然変異誘発によって、ビオチン、フルオレセイン、またはジゴキシゲニン等の（より）低い分子量のリガンドへの特異的結合親和性を示す、淚リポカリンの突然変異タンパク質を得ることも可能である。

【0059】

本発明の一実施形態では、淚リポカリン突然変異タンパク質が結合するリガンドは、血管内皮成長因子（VEGF）、血管内皮成長因子受容体2（VEGF-R2）、およびインターロイキン4受容体アルファ鎖（IL-4受容体アルファ）もしくはその断片の群から選択されるタンパク質またはその断片である。リガンドとして、VEGF-R2またはIL-4受容体アルファの細胞外領域またはドメインも含まれる。これらのリガンドは典型的に哺乳動物起源である。一実施形態では、これらのリガンドはヒト起源であるが、ほんの少数の例証となる例を挙げると、それらは、マウス、ラット、ブタ、ウマ、イヌ、ネコ、もしくはウシまたはカニクイザル起源であってもよい。

【0060】

ヒトVEGFは、VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、およびVEGF-Dから成る群から選択されてもよく、SWISS PROTデータバンク受入番号P1569

10

20

30

40

50



2、P49765、P49767、およびO43915（配列番号22～25）に記載されるまたはその断片のアミノ酸配列を有していてもよい。そのような例示的な1つの断片はVEGF-Aのアミノ酸8～109から成る。ヒト血管内皮成長因子受容体2（VEGFR2）は、SWISSPROTデータベース受入番号P35968（配列番号21）のアミノ酸配列またはその断片を有していてもよい。そのような断片の例証となる例は、それぞれアミノ酸46～110、141～207、224～320、328～414、421～548、551～660、および667～753を含む、VEGFR2の細胞外Ig様C2型ドメイン1～7を含む。ヒトインターロイキン4受容体アルファ鎖は、SWISSPROTデータベース受入番号P24394（配列番号20）のまたはその断片のアミノ酸配列を有していてもよい。ヒトインターロイキン4受容体アルファ鎖の断片の例証となる例は、IL-4受容体アルファのアミノ酸26～232を含む。

10

**【0061】**

一般に、本発明の涙リポカリン突然変異タンパク質のタンパク質リガンドに関して本明細書で使用される用語「断片（fragment）」は、N末端および/またはC末端が短縮されたタンパク質またはペプチドのリガンドに関し、これらは、本発明による突然変異タンパク質が認識するおよび/または結合することとなる完全長リガンドの性能を保持する。

**【0062】**

したがって、本発明の他の態様は、成熟ヒト涙リポカリンの線状ポリペプチド配列の配列位置24～36、53～66、79～84、および103～110のうちの任意の2つ以上の少なくとも1つの突然変異したアミノ酸残基を含み、IL-4受容体アルファ、VEGFR2、またはVEGFに結合する、ヒト涙リポカリンの突然変異タンパク質を対象とする。

20

**【0063】**

IL-4受容体アルファに結合するヒト涙リポカリン突然変異タンパク質はIL-4アンタゴニストおよび/またはIL-13アンタゴニストとして作用してもよい。一実施形態では、ヒト涙リポカリン突然変異タンパク質はヒトIL-4および/またはIL-13のアンタゴニストとして作用する。他の実施形態では、突然変異タンパク質は、IL-4および/またはIL-13等のカニクイザルリガンドと交差反応し、それ自体としてカニクイザルIL-4受容体アルファのアンタゴニストとして作用する。

30

**【0064】**

IL-4受容体アルファに結合する本発明のヒト涙リポカリン突然変異タンパク質は、成熟ヒト涙リポカリンのアミノ酸配列に関して、天然の成熟ヒト涙リポカリンの位置26～34、56～58、80、83、104～106、および108のうちのいずれかでのシステイン残基による天然のアミノ酸残基の少なくとも2つのアミノ酸置換を含んでいてもよい。一般に、そのような突然変異タンパク質は、200nM以下、100nM以下、20nM以下、もしくは1nMの $K_D$ でまたはさらに低く、ピコモルの範囲の $K_D$ で、IL-4受容体アルファの細胞外領域またはドメインに結合する。したがって、本発明はまた、900pM以下、600pM以下、500pM以下、250pM、100pM以下、60pM以下、または40pM以下の $K_D$ でIL-4受容体に結合する涙リポカリン突然変異タンパク質を包含する。突然変異タンパク質リガンド複合体の $K_D$ 値を決定するための適切な方法は当業者らに知られており、蛍光滴定、競合ELISA、等温の滴定熱量測定（ITC）等の熱量測定法、および表面プラズモン共鳴を含む。そのような方法の例は下記に詳述される（例えば、実施例6、8、14、16、22、24、および27を参照されたい）。

40

**【0065】**

これに関連して、それぞれの突然変異タンパク質とそのリガンドとの複合体形成は、それぞれの結合パートナーの濃度、競合物の存在、pH、および使用されるバッファー系のイオン強度等の多くの異なる因子ならびに解離定数 $K_D$ の決定のために使用される実験方法（ほんの少数を挙げると、例えば蛍光滴定、競合ELISA、もしくは表面プラズモン

50

共鳴)または実験データの評価のために使用される数学的なアルゴリズムさえによっても影響を及ぼされることも注目されたい。

【0066】

したがって、本明細書に示される $K_D$ 値(それぞれの突然変異タンパク質およびそのリガンドの間で形成された複合体の解離定数)は、所与のリガンドに対する特定のリボカリン突然変異タンパク質の親和性を決定するのに使用される方法および実験装置に依存して、ある実験の範囲内で変動してもよいことは当業者に明らかである。これは、例えば、表面プラズモン共鳴(Biacore)または競合ELISAによって $K_D$ 値が決定されたかどうかに依存して、測定された $K_D$ 値にわずかな偏差または許容範囲があってもよいことを意味する。

10

【0067】

本発明の特定の実施形態では、そのような突然変異タンパク質は、成熟ヒト涙リボカリンのアミノ酸配列に関して、Arg26 Ser、Pro;Glu27 Arg;Phe28 Cys;Glu30 Arg;Met31 Ala;Asn32 Tyr、His;Leu33 Tyr;Glu34 Gly、Ser、Ala、Asp、Lys、Asn、Thr、Arg;Leu56 Gln;Ile57 Arg;Ser58 Ile、Ala、Arg、Val、Thr、Asn、Lys、Tyr、Leu、Met;Asp80 Ser;Lys83 Arg;Glu104 Leu;Leu105 Cys;His106 Pro;およびLys108 Glnから成る群から選択される少なくとも6、8、10、12、14、または16個のアミノ酸置換を含む。

20

【0068】

さらに、そのような突然変異タンパク質は、Met39 Val;Thr42 Met、Ala;Thr43 Ile、Pro、Ala;Glu45 Lys、Gly;Asn48 Asp、His、Ser、Thr;Val53 Leu、Phe、Ile、Ala、Gly、Ser;Thr54 Ala、Leu;Met55 Leu、Ala、Ile、Val、Phe、Gly、Thr、Tyr;Glu63 Lys、Gln、Ala、Gly、Arg;Val64 Gly、Tyr、Met、Ser、Ala、Lys、Arg、Leu、Asn、His、Thr、Ile;Ala66 Ile、Leu、Val、Thr、Met;Glu69 Lys、Gly;Lys70 Arg、Gln、Glu;Thr78 Ala;Ile89 Val;Asp95 Asn、Ala、Gly;およびTyr100 Hisから成る群から選択される少なくとも1つのアミノ酸置換をさらに含んでいてもよい。

30

【0069】

一実施形態では、IL-4受容体アルファに結合するヒト涙リボカリン突然変異タンパク質は、アミノ酸置換:Arg26 Ser;Glu27 Arg;Phe28 Cys;Glu30 Arg;Met31 Ala;Leu33 Tyr;Leu56 Gln;Ile57 Arg;Asp80 Ser;Lys83 Arg;Glu104 Leu;Leu105 Cys;His106 Pro;およびLys108 Glnを含む。

【0070】

他の実施形態では、IL-4受容体アルファに結合するヒト涙リボカリン突然変異タンパク質は、アミノ酸置換の次のセット:

(1) Arg26 Ser;Glu27 Arg;Phe28 Cys;Glu30 Arg;Met31 Ala;Asn32 Tyr;Leu33 Tyr;Glu34 Gly;Leu56 Gln;Ile57 Arg;Ser58 Ile;Asp80 Ser;Lys83 Arg;Glu104 Leu;Leu105 Cys;His106 Pro;Lys108 Gln;

(2) Arg26 Ser;Glu27 Arg;Phe28 Cys;Glu30 Arg;Met31 Ala;Asn32 Tyr;Leu33 Tyr;Glu34 Lys;Leu56 Gln;Ile57 Arg;Ser58 Asn;Asp80 S

40

50

er; Lys 83 Arg; Glu 104 Leu; Leu 105 Cys; His 106 Pro; Lys 108 Gln;

(3) Arg 26 Ser; Glu 27 Arg; Phe 28 Cys; Glu 30 Arg; Met 31 Ala; Asn 32 Tyr; Leu 33 Tyr; Leu 56 Gln; Ile 57 Arg; Ser 58 Arg; Asp 80 Ser; Lys 83 Arg; Glu 104 Leu; Leu 105 Cys; His 106 Pro; Lys 108 Gln;

(4) Arg 26 Ser; Glu 27 Arg; Phe 28 Cys; Glu 30 Arg; Met 31 Ala; Asn 32 Tyr; Leu 33 Tyr; Glu 34 Ser; Leu 56 Gln; Ile 57 Arg; Asp 80 Ser; Lys 83 Arg; Glu 104 Leu; Leu 105 Cys; His 106 Pro; Lys 108 Gln;

(5) Arg 26 Ser; Glu 27 Arg; Phe 28 Cys; Glu 30 Arg; Met 31 Ala; Asn 32 His; Leu 33 Tyr; Glu 34 Ser; Leu 56 Gln; Ile 57 Arg; Ser 58 Ala; Asp 80 Ser; Lys 83 Arg; Glu 104 Leu; Leu 105 Cys; His 106 Pro; Lys 108 Gln;

(6) Arg 26 Ser; Glu 27 Arg; Phe 28 Cys; Glu 30 Arg; Met 31 Ala; Asn 32 Tyr; Leu 33 Tyr; Glu 34 Asp; Leu 56 Gln; Ile 57 Arg; Ser 58 Lys; Asp 80 Ser; Lys 83 Arg; Glu 104 Leu; Leu 105 Cys; His 106 Pro; Lys 108 Gln; および

(7) Arg 26 Ser; Glu 27 Arg; Phe 28 Cys; Glu 30 Arg; Met 31 Ala; Asn 32 Tyr; Leu 33 Tyr; Glu 34 Gly; Leu 56 Gln; Ile 57 Arg; Asp 80 Ser; Lys 83 Arg; Glu 104 Leu; Leu 105 Cys; His 106 Pro; Lys 108 Glnのうちの一つを含む。

#### 【0071】

IL-4受容体アルファに結合するヒト涙リボカリン突然変異タンパク質は、配列番号2~8またはその断片もしくは変異体に記載されるアミノ酸配列のうちのいずれか一つを含んでいてもよい、本質的にそれから成る、またはそれから成る。一実施形態では、本発明による突然変異タンパク質は、配列番号5もしくは6またはその断片もしくは変異体に記載されるアミノ酸配列を含む、本質的にそれから成る、またはそれから成る。

#### 【0072】

本発明の突然変異タンパク質に関連して本発明で使用される用語「断片(fragment)」は、N末端および/またはC末端が短縮された、つまり、N末端および/またはC末端のアミノ酸のうち少なくとも1つを欠く、完全長成熟ヒト涙リボカリンに由来するタンパク質またはペプチドに関する。そのような断片は、成熟ヒト涙リボカリンの一次配列の好ましくは少なくとも10、より好ましくは20、最も好ましくは30個以上の連続したアミノ酸を含み、成熟ヒト涙リボカリンのイムノアッセイで普通検出可能である。

#### 【0073】

本発明で使用される用語「変異体(variant)」は、例えば、置換、欠失、挿入、または化学的修飾によるアミノ酸配列の改変を含むタンパク質またはペプチドの誘導体に関する。好ましくは、そのような改変は、タンパク質またはペプチドの機能性を低下させない。そのような変異体はタンパク質を含み、1つまたは複数のアミノ酸は、それらのそれぞれのD-立体異性体とまたは例えばオルニチン、ヒドロキシプロリン、シトルリン、ホモセリン、ヒドロキシリシン、ノルバリン等の、自然発生の20種のアミノ酸以外のアミノ酸と交換される。しかしながら、そのような置換はまた保存的であってもよい、つまり、アミノ酸残基は化学的に類似するアミノ酸残基と交換される。保存的置換の例は次のグループのメンバーの中での交換とする：1)アラニン、セリン、およびトレオニン；

2) アスパラギン酸およびグルタミン酸; 3) アスパラギンおよびグルタミン; 4) アルギニンおよびリシン; 5) イソロイシン、ロイシン、メチオニン、およびバリン; ならびに6) フェニルアラニン、チロシン、およびトリプトファン。

【0074】

別の態様では、本発明は、血管内皮成長因子受容体2 (VEGF-R2) またはその細胞外領域もしくはドメインに結合するヒト涙リポカリンの突然変異タンパク質を対象とする。普通、そのような突然変異タンパク質はVEGFアンタゴニストとして作用し、VEGF-R2の細胞外領域またはドメインに、200nM以下、100nM以下、20nM以下、15nM以下、10nM以下、またはさらに1nM以下の $K_D$ で結合する。

【0075】

そのような突然変異タンパク質は、成熟ヒト涙リポカリンのアミノ酸配列に関して、Arg26 Ser; Glu27 Ile; Glu30 Ser; Met31 Gly; Asn32 Arg; Leu33 Ile; Glu34 Tyr; Leu56 Lys、Glu、Ala、Met; Ile57 Phe; Ser58 Arg; Asp80 Ser、Pro; Lys83 Glu、Gly; Glu104 Leu; Leu105 Ala; His106 Val; およびLys108 Thrから成る群から選択される少なくとも6、8、10、12、14、または16個のアミノ酸置換を含んでいてもよく、Leu41 Phe; Glu63 Lys; Val64 Met; Asp72 Gly; Lys76 Arg、Glu; Ile88 Val、Thr; Ile89 Thr; Arg90 Lys; Asp95 Gly; Phe99 Leu; およびGly107 Arg、Lys、Gluから成る群から選択される少なくとも1つのアミノ酸置換をさらに含んでいてもよい。

【0076】

ひとつの特有の実施形態では、そのような突然変異タンパク質はアミノ酸置換: Arg26 Ser; Glu27 Ile; Glu30 Ser; Met31 Gly, Asn32 Arg; Leu33 Ile; Glu34 Tyr; Ile57 Phe, Ser58 Arg; Lys83 Glu; Glu104 Leu; Leu105 Ala; His106 Val; and Lys108 Thrを含む。

【0077】

VEGF-R2の細胞外領域またはドメインに検出可能な親和性で結合する本発明のヒト涙リポカリン突然変異タンパク質は、アミノ酸置換の次のセット:

(1) Arg26 Ser, Glu27 Ile, Glu30 Ser, Met31 Gly, Asn32 Arg, Leu33 Ile, Glu34 Tyr, Leu56 Lys, Ile57 Phe, Ser58 Arg, Asp80 Ser, Lys83 Glu, Glu104 Leu, Leu105 Ala, His106 Val, Lys108 Thr;

(2) Arg26 Ser, Glu27 Ile, Glu30 Ser, Met31 Gly, Asn32 Arg, Leu33 Ile, Glu34 Tyr, Leu56 Glu, Ile57 Phe, Ser58 Arg, Asp80 Ser, Lys83 Glu, Glu104 Leu, Leu105 Ala, His106 Val, Lys108 Thr;

(3) Arg26 Ser, Glu27 Ile, Glu30 Ser, Met31 Gly, Asn32 Arg, Leu33 Ile, Glu34 Tyr, Leu56 Ala, Ile57 Phe, Ser58 Arg, Asp80 Ser, Lys83 Glu, Glu104 Leu, Leu105 Ala, His106 Val, Lys108 Thr; および

(4) Arg26 Ser; Glu27 Ile; Glu30 Ser; Met31 Gly; Asn32 Arg; Leu33 Ile; Glu34 Tyr; Leu56 Glu; Ile57 Phe; Ser58 Arg; Asp80 Pro; Lys83 Glu; Glu104 Leu; Leu105 Ala; His106 Val; Lys1

10

20

30

40

50

08 Thrのうちの1つを含んでいてもよい。

【0078】

本発明の一実施形態では、VEGF-R2に結合する突然変異タンパク質は、配列番号34~39に記載されるアミノ酸配列のうちのいずれか1つを含む、本質的にそれから成る、またはそれから成る。

【0079】

さらに別の態様では、本発明は、血管内皮成長因子(VEGF)に結合するヒト淚リポカリンの突然変異タンパク質を対象とする。普通、そのような突然変異タンパク質は、VEGF受容体へのVEGFの結合を阻害することによってVEGFアンタゴニストとして作用し、200nM以下、100nM以下、20nM、5nM以下、またはさらに1nM以下のK<sub>D</sub>でVEGFに結合する。

10

【0080】

本発明の方法によって入手可能なそのような突然変異タンパク質は、成熟ヒト淚リポカリンのアミノ酸配列に関して、Arg26 Ser、Pro、Val、Leu、Ile; Glu27 Gly; Phe28 Ala; Pro29 Leu; Glu30 Arg; Met31 Cys; Asn32 Leu; Leu33 Ala; Glu34 Gly; Leu56 His、Arg、Tyr、Gln; Ile57 Val、Thr、Leu; Ser58 Lys; Asp80 Ile; Lys83 Ile、Val; Glu104 Cys; His106 Asn、Ser、Asp; およびLys108 Ala、Valから成る群から選択される少なくとも6、8、10、12、14、16個のアミノ酸置換を含んでいてもよく、Val36 Met; Thr37 Ala; Met39 Thr; Thr40 Ala、Ser; Asn48 Asp; Ala51 Val; Lys52 Arg; Thr54 Val; Met55 Val; Ser61 Pro; Lys65 Arg; Ala66 Val; Val67 Ile; Glu69 Gly、Ser、Thr; Lys76 Arg、Ile、Ala、Met、Pro; Tyr87 Arg、His、Lys、Gln; Ile89 Thr、Val、Gly、His、Met、Lys; Arg90 Gly; Ile98 Val; およびGly107 Gluから成る群から選択される少なくとも1つのアミノ酸置換をさらに含んでいてもよい。

20

【0081】

一実施形態では、VEGFに結合する、ヒト淚リポカリンのそのような突然変異タンパク質は、アミノ酸置換: Glu27 Gly; Phe28 Ala; Pro29 Leu; Glu30 Arg、Met31 Cys; Asn32 Leu; Leu33 Ala; Glu34 Gly、Asp80 Ile; Lys83 Ile; Glu104 Cys; and Lys108 Valを含む。

30

【0082】

他の特有の実施形態では、VEGFに結合するヒト淚リポカリンの突然変異タンパク質は、アミノ酸置換の次のセット:

(1) Arg26 Ser; Glu27 Gly; Phe28 Ala; Pro29 Leu; Glu30 Arg; Met31 Cys; Asn32 Leu; Leu33 Ala; Glu34 Gly; Leu56 His; Ser58 Lys; Asp80 Ile; Lys83 Ile; Glu104 Cys; His106 Asn; Lys108 Val;

40

(2) Arg26 Pro; Glu27 Gly; Phe28 Ala; Pro29 Leu; Glu30 Arg; Met31 Cys; Asn32 Leu; Leu33 Ala; Glu34 Gly; Leu56 His; Ser58 Glu; Asp80 Ile; Lys83 Ile; Glu104 Cys; His106 Ser; Lys108 Val;

(3) Arg26 Pro; Glu27 Gly; Phe28 Ala; Pro29 Leu; Glu30 Arg; Met31 Cys; Asn32 Leu; Leu33 Ala; Glu34 Gly; Leu56 His; Ser58 Lys; Asp80 I

50

I l e ; L y s 8 3 I l e ; G l u 1 0 4 C y s ; H i s 1 0 6 A s n ; L y s 1 0  
8 V a l ;

( 4 ) A r g 2 6 P r o ; G l u 2 7 G l y ; P h e 2 8 A l a ; P r o 2 9 L  
e u ; G l u 3 0 A r g ; M e t 3 1 C y s ; A s n 3 2 L e u ; L e u 3 3 A  
l a ; G l u 3 4 G l y ; L e u 5 6 A r g ; S e r 5 8 L y s ; A s p 8 0 I  
l e ; L y s 8 3 I l e ; G l u 1 0 4 C y s ; H i s 1 0 6 S e r ; L y s 1 0  
8 V a l ;

( 5 ) A r g 2 6 P r o ; G l u 2 7 G l y ; P h e 2 8 A l a ; P r o 2 9 L  
e u ; G l u 3 0 A r g ; M e t 3 1 C y s ; A s n 3 2 L e u ; L e u 3 3 A  
l a ; G l u 3 4 G l y ; L e u 5 6 H i s ; S e r 5 8 L y s ; A s p 8 0 I  
l e ; L y s 8 3 I l e ; G l u 1 0 4 C y s ; H i s 1 0 6 S e r ; L y s 1 0  
8 V a l ;

( 6 ) A r g 2 6 S e r ; G l u 2 7 G l y ; P h e 2 8 A l a ; P r o 2 9 L  
e u ; G l u 3 0 A r g ; M e t 3 1 C y s ; A s n 3 2 L e u ; L e u 3 3 A  
l a ; G l u 3 4 G l y ; L e u 5 6 H i s ; S e r 5 8 L y s ; A s p 8 0 I  
l e ; L y s 8 3 I l e ; G l u 1 0 4 C y s ; H i s 1 0 6 S e r ; L y s 1 0  
8 V a l ;

( 7 ) A r g 2 6 V a l ; G l u 2 7 G l y ; P h e 2 8 A l a ; P r o 2 9 L  
e u ; G l u 3 0 A r g ; M e t 3 1 C y s ; A s n 3 2 L e u ; L e u 3 3 A  
l a ; G l u 3 4 G l y ; L e u 5 6 H i s ; S e r 5 8 L y s ; A s p 8 0 I  
l e ; L y s 8 3 I l e ; G l u 1 0 4 C y s ; H i s 1 0 6 S e r ; L y s 1 0  
8 V a l ;

( 8 ) A r g 2 6 L e u ; G l u 2 7 G l y ; P h e 2 8 A l a ; P r o 2 9 L  
e u ; G l u 3 0 A r g ; M e t 3 1 C y s ; A s n 3 2 L e u ; L e u 3 3 A  
l a ; G l u 3 4 G l y ; L e u 5 6 H i s ; S e r 5 8 L y s ; A s p 8 0 I  
l e ; L y s 8 3 I l e ; G l u 1 0 4 C y s ; H i s 1 0 6 S e r ; L y s 1 0  
8 V a l ; および

( 9 ) A r g 2 6 I l e ; G l u 2 7 G l y ; P h e 2 8 A l a ; P r o 2 9 L  
e u ; G l u 3 0 A r g ; M e t 3 1 C y s ; A s n 3 2 L e u ; L e u 3 3 A  
l a ; G l u 3 4 G l y ; L e u 5 6 H i s ; S e r 5 8 L y s ; A s p 8 0 I  
l e ; L y s 8 3 I l e ; G l u 1 0 4 C y s ; H i s 1 0 6 S e r ; L y s 1 0  
8 V a l のうちの1つを含んでいてもよい。

#### 【 0 0 8 3 】

本発明の一実施形態では、V E G F に結合する突然変異タンパク質は、配列番号 2 6 ~ 3 3 または配列番号 4 4 ~ 4 7 に記載されるアミノ酸配列のうちのいずれか1つを含む、本質的にそれから成る、またはそれから成る。

#### 【 0 0 8 4 】

それらの潜在的な免疫原性に関して変更された上記の突然変異タンパク質も本発明の範囲に含まれる。

#### 【 0 0 8 5 】

細胞障害性 T 細胞は、主要組織適合複合体クラス I ( M H C ) 分子と連携して抗原提示細胞の細胞表面上でペプチド抗原を認識する。ペプチドが M H C 分子に結合する能力は対立遺伝子特異的であり、それらの免疫原性と相互に関連する。所与のタンパク質の免疫原性を低下させるために、タンパク質中のどのペプチドが所与の M H C 分子に結合する可能性を有するかを予測するための能力は非常に価値がある。潜在的な T 細胞エピトープを同定するためにコンピュータによるスレッディングアプローチを利用するアプローチは、M H C クラス I 分子への所与のペプチド配列の結合を予測するために以前に記載された ( A l t u v i a ら ( 1 9 9 5 ) J . M o l . B i o l . 2 4 9 : 2 4 4 ~ 2 5 0 ) 。

#### 【 0 0 8 6 】

そのようなアプローチはまた、本発明の突然変異タンパク質中の潜在的な T 細胞エピト

10

20

30

40

50

ープを同定するためにかつその意図した使用に依存して、その予測される免疫原性に基づいて特異的な突然変異タンパク質を選択するために利用されてもよい。T細胞エピトープを含有すると予測されたペプチド領域をさらなる突然変異誘発にさらして、これらのT細胞エピトープを減らすまたは排除し、したがって免疫原性を最小限にすることはさらに可能であり得る。遺伝的に操作された抗体からの両親媒性エピトープの除去は記載されており(Mateoら(2000)Hybridoma 19(6):463~471)、本発明の突然変異タンパク質に適応させてもよい。

**【0087】**

したがって得られた突然変異タンパク質は、以下に記載されるもの等の、治療適用および診断適用でのそれらの使用に望ましい最小限の免疫原性を有していてもよい。

10

**【0088】**

いくつかの適用については、標識形態の本発明の突然変異タンパク質を利用することも有用である。したがって、本発明はまた、酵素標識、放射性標識、有色標識、蛍光性標識、発色標識、発光標識、ハプテン、ジゴキシゲニン、ビオチン、金属錯体、金属、およびコロイド金から成る群から選択される標識にコンジュゲートされるリポカリン突然変異タンパク質をも対象とする。突然変異タンパク質はまた有機分子にコンジュゲートされてもよい。本明細書で使用される用語「有機分子」は、少なくとも2つの炭素原子を含むが、回転可能な炭素結合は好ましくは7または12個以下であり、100および2000ダルトンの間の、好ましくは100および1000ダルトンの間の範囲の分子量を有し、1または2つの金属原子を任意選択で含む有機分子を好ましくは示す。

20

**【0089】**

一般に、化学的、物理的、光学的、または酵素的な反応中で検出可能な化合物またはシグナルを直接または間接的に生成する任意の適切な化学物質または酵素でリポカリン突然変異タンパク質を標識することは可能である。物理的な反応および同時に光学的な反応/マーカの例は、照射に際しての蛍光発光の放出または放射性標識を使用する場合のX線の放出である。アルカリホスファターゼ、ホースラディッシュペルオキシダーゼ、またはガラクトシダーゼは、発色反応産物の形成を触媒する酵素標識(および同時に光学的な標識)の例である。一般に、抗体(免疫グロブリンのFc部分中の糖成分のみで使用されるものを除く)に通常使用されるすべての標識も本発明の突然変異タンパク質へのコンジュゲートに使用することができる。本発明の突然変異タンパク質はまた、例えば所与の細胞、組織、もしくは器官へのそのような作用物質の標的送達のためにまたは周囲の正常細胞に影響を与えることなく細胞を、例えば腫瘍細胞を選択的に標的にするために任意の適切な治療的活性剤とコンジュゲートしてもよい。そのような治療的活性剤の例は、放射性核種、毒素、小さな有機分子、および治療ペプチド(細胞表面受容体のアゴニスト/アンタゴニストとして作用するペプチドまたは所与の細胞標的上のタンパク質結合部位に対して競合するペプチド等)を含む。しかしながら、本発明のリポカリン突然変異タンパク質はまた、アンチセンス核酸分子、低分子干渉RNA、マイクロRNA、またはリボザイム等の治療的に活性のある核酸とコンジュゲートされてもよい。そのようなコンジュゲートは当技術分野でよく知られている方法によって産生することができる。

30

**【0090】**

一実施形態では、本発明の突然変異タンパク質はまた、身体内の所望の領域またはエリアに発明の突然変異タンパク質を送達するために、特定の身体領域を標的とする標的成分につながれてもよい。そのような改変が望ましいものであり得る1つの例は血液脳関門の横断である。血液脳関門を横断するために、本発明の突然変異タンパク質は、この関門を横切る能動輸送を容易にする成分につながれてもよい(Gaillard PJら、Diphtheria-toxin receptor-targeted brain drug delivery. International Congress Series. 2005 1277:185~198またはGaillard PJら、Targeted delivery across the blood-brain barrier. Expert Opin Drug Deliv. 2005 2(2):29

40

50

9 ~ 309を参照されたい。そのような成分は、例えば、商標名2B - Trans (商標) (to - BBB technologies BV、Leiden、NL)で入手可能である。

#### 【0091】

上記に示されるように、本発明の突然変異タンパク質は一部の実施形態では突然変異タンパク質の血清半減期を延長する成分にコンジュゲートされてもよい(この点に関して、そのようなコンジュゲート戦略が、CTLA - 4に対する結合親和性を有するヒト好中球ゼラチナーゼ関連性リポカリンの突然変異タンパク質への言及と共に記載されるPCT公開公報WO2006/56464号も参照されたい)。血清半減期を延長する成分は、ほんの少数を挙げると、ポリアルキレングリコール分子、ヒドロキシエチルデンプン、パルミチン酸等の脂肪酸分子(Vajo & Duckworth 2000、Pharmacol. Rev. 52、1~9)、免疫グロブリンのFc部分、免疫グロブリンのCH3ドメイン、免疫グロブリンのCH4ドメイン、アルブミンもしくはその断片、アルブミン結合ペプチドもしくはアルブミン結合タンパク質、トランスフェリンであってもよい。アルブミン結合タンパク質は、細菌アルブミン結合タンパク質、抗体、ドメイン抗体を含む抗体断片(例えば、米国特許第6,696,245号を参照されたい)、またはアルブミンに対する結合活性を有するリポカリン突然変異タンパク質であってもよい。したがって、本発明のリポカリン突然変異タンパク質の半減期の延長に適したコンジュゲートパートナーは、アルブミン(Osborn, B. L.ら(2002) Pharmacokinetic and pharmacodynamic studies of a human serum albumin - interferon - alpha fusion protein in cynomolgus monkeys J. Pharmacol. Exp. Ther. 303、540~548)またはアルブミン結合タンパク質、例えば、連鎖球菌プロテインGのうちの1つ等の細菌アルブミン結合ドメイン(Konig, T.およびSkerra, A.(1998) Use of an albumin-binding domain for the selective immobilisation of recombinant capture antibody fragments on ELISA plates. J. Immunol. Methods 218、73~83)を含む。コンジュゲートパートナーとして使用することができるアルブミン結合ペプチドの他の例は、米国特許出願第2003/0069395号またはDennisら(Dennis, M. S.、Zhang, M.、Meng, Y. G.、Kadkhodayan, M.、Kirchhofer, D.、Combs, D. & Damico, L. A.(2002).「Albumin binding as a general strategy for improving the pharmacokinetics of proteins.」J Biol. Chem 277、35035~35043)に記載されるように、例えば、Cys - Xaa<sub>1</sub> - Xaa<sub>2</sub> - Xaa<sub>3</sub> - Xaa<sub>4</sub> - Cysコンセンサス配列を有するものであり、Xaa<sub>1</sub>はAsp、Asn、Ser、Thr、またはTrpであり、Xaa<sub>2</sub>は、Asn、Gln、His、Ile、Leu、またはLysであり、Xaa<sub>3</sub>はAla、Asp、Phe、Trp、またはTyrであり、Xaa<sub>4</sub>は、Asp、Gly、Leu、Phe、Ser、またはThrである。

#### 【0092】

他の実施形態では、アルブミンそれ自体またはアルブミンの生物学的活性断片は、本発明のリポカリン突然変異タンパク質のコンジュゲートパートナーとして使用することができる。用語「アルブミン」は、ヒト血清アルブミンまたはウシ血清アルブミンまたはラットアルブミン等のすべての哺乳動物アルブミンを含む。アルブミンまたはその断片は、米国特許第5,728,553号または欧州特許出願第0330451号および第0361991号に記載されるように組換えで産生することができる。組換えヒトアルブミン(Recombunin(登録商標))Novozymes Delta Ltd.(Nottingham、UK)は、突然変異タンパク質の半減期を延長するためにリポカリン突

10

20

30

40

50



然変異タンパク質にコンジュゲートするまたは融合することができる。

【0093】

アルブミン結合タンパク質が抗体断片である場合、それはドメイン抗体であってもよい。ドメイン抗体 (dAb) は、最適な安全性および効力製品プロファイルを作り出すために生物物理的特性および *in vivo* 半減期に対して正確な制御を可能にするように操作される。ドメイン抗体は、例えば、Domantis Ltd. (Cambridge、UK および MA、USA) から市販で入手可能である。

【0094】

本発明の突然変異タンパク質の血清半減期を延長するために成分としてトランスフェリンを使用して、突然変異タンパク質は、非グリコシル化トランスフェリンのN末端もしくはC末端または両方に遺伝子的に融合することができる。非グリコシル化トランスフェリンは、14~17日の半減期を有し、トランスフェリン融合タンパク質は、同様に、延長された半減期を有するであろう。トランスフェリン担体はまた、高度な生物学的利用率、体内分布、および循環安定性をも提供する。この技術は、BioRexis (BioRexis Pharmaceutical Corporation、PA、USA) から市販で入手可能である。タンパク質安定剤/半減期延長パートナーとして使用される組換えヒトトランスフェリン (Delta Ferrin (商標)) も、Novozymes Delta Ltd. (Nottingham、UK) から市販で入手可能である。

【0095】

免疫グロブリンのFc部分が本発明の突然変異タンパク質の血清半減期を延ばすための目的に使用される場合、Syntonix Pharmaceuticals, Inc (MA、USA) から市販で入手可能なSynFusion (商標) 技術が使用されてもよい。このFc融合技術の使用は、長時間作用性の生物製剤の生成を可能にし、例えば、薬物動態、溶解性、および産生効率を改善するために抗体のFc領域に連結された突然変異タンパク質の2つのコピーから成ってもよい。

【0096】

さらに、本発明の突然変異タンパク質の半減期を延ばすための他の代替案は、本発明の突然変異タンパク質のN末端またはC末端に、長く、構造化されていない、柔軟性のグリシンリッチ配列を融合することである (例えば、約20~80個の連続したグリシン残基を有するポリグリシン)。WO2007/038619号に開示されるこのアプローチは、例えば、「rPEG」(組換えPEG)とも名付けられている。

【0097】

ポリアルキレングリコールがコンジュゲートパートナーとして使用される場合、ポリアルキレングリコールは置換されたもの、非置換のもの、線状のもの、分岐したのもであってもよい。それはまた活性化ポリアルキレン誘導体とすることもできる。適切な化合物の例は、インターフェロンに関してWO99/64016号に、米国特許第6,177,074号に、もしくは米国特許第6,403,564号に記載されるようにまたはPEG修飾アスパラギナーゼ、PEG-アデノシンデアミナーゼ (PEG-ADA)、もしくはPEG-スーパーオキシドジスムターゼ等の他のタンパク質について記載されるようにポリエチレングリコール (PEG) 分子である (例えば、Fuertgesら (1990) The Clinical Efficacy of Poly (Ethylene Glycol) - Modified Proteins J. Control. Release 11, 139~148を参照されたい)。そのようなポリマー、好ましくはポリエチレングリコールの分子量は約300~約70,000ダルトンの範囲であってもよく、例えば、約10,000、約20,000、約30,000、または約40,000ダルトンの分子量を有するポリエチレングリコールを含む。さらに、例えば、米国特許第6,500,930号または第6,620,413号に記載されるように、デンプンまたはヒドロキシエチルデンプン (HES) 等の炭水化物オリゴマーおよびポリマーは血清半減期延長の目的で本発明の突然変異タンパク質にコンジュゲートすることができる。

【0098】

上記の成分のうちの1つが本発明のヒト涙リポカリン突然変異タンパク質にコンジュゲートされる場合、アミノ酸側鎖へのコンジュゲートは有利になり得る。適切なアミノ酸側鎖は、ヒト涙リポカリンのアミノ酸配列中の自然に存在していてもよくまたは突然変異誘発によって導入されてもよい。適切な結合部位が突然変異誘発を介して導入される場合、1つの可能性としては、システイン残基による、適切な位置でのアミノ酸の交換がある。一実施形態では、そのような突然変異は、Thr 40 Cys、Glu 73 Cys、Arg 90 Cys、Asp 95 Cys、またはGlu 131 Cys置換の少なくとも1つを含む。これらの位置のうちのいずれかで新しく作り出されたシステイン残基は、PEGまたはその活性化誘導体等の、突然変異タンパク質の血清半減期を延ばす成分に突然変異タンパク質をコンジュゲートするために下記のもので利用することができる。

10

## 【0099】

他の実施形態では、本発明の突然変異タンパク質に上記の成分のうちの1つをコンジュゲートするのに適したアミノ酸側鎖を提供するために、人工アミノ酸が突然変異誘発によって導入されてもよい。一般に、そのような人工アミノ酸は、より反応性であり、したがって、所望の成分へのコンジュゲートを容易にするように設計される。人工tRNAを介して導入されてもよいそのような人工アミノ酸の1つの例は、パラ-アセチル-フェニルアラニンである。

## 【0100】

本明細書に開示される突然変異タンパク質のいくつかの適用については、有利には、それらを融合タンパク質の形態で使用することができる。一部の実施形態では、発明のヒト涙リポカリン突然変異タンパク質は、タンパク質、タンパク質ドメイン、またはシグナル配列および/もしくはアフィニティータグ等のペプチドにそのN末端またはそのC末端で融合される。

20

## 【0101】

医薬品適用については、本発明の突然変異タンパク質は、突然変異タンパク質の *in vivo* 血清半減期を延長する融合パートナーに融合されてもよい（なおまた、適切な融合パートナーが、CTLA-4に対する結合親和性を有するヒト好中球ゼラチナーゼ関連性リポカリンの突然変異タンパク質への言及と共に記載されるPCT公開公報WO 2006/56464号を参照されたい）。上記に記載されるコンジュゲートと同様に、融合パートナーは、ほんの少数を挙げると、免疫グロブリンのFc部分、免疫グロブリンのCH3ドメイン、免疫グロブリンのCH4ドメイン、アルブミン、アルブミン結合ペプチド、またはアルブミン結合タンパク質であってもよい。さらに、アルブミン結合タンパク質は、細菌アルブミン結合タンパク質またはアルブミンに対する結合活性を有するリポカリン突然変異タンパク質であってもよい。したがって、本発明のリポカリン突然変異タンパク質の半減期の延長に適した融合パートナーは、アルブミン（Osborn, B. L.ら（2002）前掲、J. Pharmacol. Exp. Ther. 303, 540~548）またはアルブミン結合タンパク質、例えば連鎖球菌プロテインGのうちの1つ等の細菌アルブミン結合ドメイン（Konig, T.およびSkerra, A.（1998）前掲、J. Immunol. Methods 218, 73~83）を含む。Xaa<sub>1</sub>はAsp、Asn、Ser、Thr、またはTrpであり、Xaa<sub>2</sub>は、Asn、Gln、His、Ile、Leu、またはLysであり、Xaa<sub>3</sub>は、Ala、Asp、Phe、Trp、またはTyrであり、Xaa<sub>4</sub>は、Asp、Gly、Leu、Phe、Ser、またはThrであるCys-Xaa<sub>1</sub>-Xaa<sub>2</sub>-Xaa<sub>3</sub>-Xaa<sub>4</sub>-Cysコンセンサス配列を有するDennisら、前掲（2002）または米国特許出願第2003/0069395号に記載されるアルブミン結合ペプチドも融合パートナーとして使用することができる。本発明のリポカリン突然変異タンパク質の融合パートナーとしてアルブミン自体またはアルブミンの生物学的活性断片を使用することも可能である。用語「アルブミン」は、ヒト血清アルブミンまたはウシ血清アルブミンまたはラット血清アルブミン等のすべての哺乳動物アルブミンを含む。アルブミンまたはその断片の組換え産生は当技術分野でよく知られており、例えば、米国特許第5,728,553号、欧州特許出願第0330

30

40

50

451号、または第0361991号に記載される。

【0102】

融合パートナーは、他の分子に対する酵素活性または結合親和性等の新しい特徴を発明のリポカリン突然変異タンパク質に付与してもよい。適切な融合タンパク質の例は、アルカリホスファターゼ、ホースラディッシュペルオキシダーゼ、グルタチオン-Sトランスフェラーゼ、プロテインGのアルブミン結合ドメイン、プロテインA、抗体断片、オリゴマー化ドメイン、同じまたは異なる結合特異性のリポカリン突然変異タンパク質(「Duocalin」の形成をもたらす。Schlehuber, S. および Skerra, A. (2001)、Duocalins, engineered ligand-binding proteins with dual specificity derived from the lipocalin fold. Biol. Chem. 382、1335~1342を参照されたい)、または毒素である。

10

【0103】

特に、結果として生じる融合タンパク質の両方の「成分(component)」が所与の治療標的に共に作用するように、本発明のリポカリン突然変異タンパク質を別々の酵素活性部位と融合することは可能であり得る。リポカリン突然変異タンパク質の結合ドメインは疾患の原因となる標的に付き、酵素ドメインが標的の生物学的機能を消滅させるのを可能にする。

【0104】

Strep-tag (登録商標) もしくは Strep-tag (登録商標) II 等のアフィニータグ (Schmidt, T. G. M. ら (1996) J. Mol. Biol. 255、753~766)、myc タグ、FLAG タグ、His<sub>6</sub> タグ、もしくは HA タグまたはグルタチオン-S-トランスフェラーゼ等のタンパク質も組換えタンパク質の容易な検出および/または精製を可能にし、さらに、好ましい融合パートナーの例となる。最後に、緑色蛍光タンパク質 (GFP) または黄色蛍光タンパク質 (YFP) 等の発色特性または蛍光特性を有するタンパク質は、同様に、本発明のリポカリン突然変異タンパク質に適した融合パートナーである。

20

【0105】

本明細書で使用される用語「融合タンパク質 (fusion protein)」はまた、シグナル配列を含有する本発明によるリポカリン突然変異タンパク質を含む。ポリペプチドのN末端のシグナル配列は、特定の細胞コンパートメント、例えば大腸菌の周辺質または真核細胞の小胞体にこのポリペプチドをターゲティングする。多くのシグナル配列は当技術分野で知られている。大腸菌の周辺質中へのポリペプチドの分泌のための好ましいシグナル配列は OmpA シグナル配列である。

30

【0106】

本発明はまた、本明細書に記載される突然変異タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含む核酸分子 (DNA および RNA) に関する。遺伝子コードの縮重は、同じアミノ酸を指定する他のコドンによるあるコドンの置換を可能にするので、本発明は、本発明の突然変異タンパク質をコードする特定の核酸分子に限定されることはなく、機能的突然変異タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含むすべての核酸分子を含む。

40

【0107】

したがって、本発明はまた、天然の成熟ヒト涙リポカリンの線状ポリペプチド配列のアミノ酸配列位置 26~34、56~58、80、83、104~106、および108のうちいずれかの少なくとも1つのコドンに突然変異を含む本発明による突然変異タンパク質をコードする核酸配列をも含み、成熟ヒト涙リポカリンの線状ポリペプチド配列の配列位置 61 および 153 でシステイン残基の少なくとも1つをコードするコドンは任意の他のアミノ酸残基をコードするように突然変異させられる。

【0108】

本明細書に開示される本発明はまた、実験的な突然変異誘発の示される配列位置の外側にさらなる突然変異を含む涙リポカリン突然変異タンパク質をコードする核酸分子をも含

50

む。そのような突然変異は許容されることが多く、それどころか、例えばそれらが突然変異タンパク質のフォールディング能率、血清安定性、熱安定性、またはリガンド結合親和性の改善に寄与する場合、有利であると証明され得る。

【0109】

本出願に開示される核酸分子は、この核酸分子の発現を可能にするために、調節配列（複数可）に「作動可能に連結され（operably linked）」てもよい。

【0110】

DNA等の核酸分子は、核酸分子が転写調節および/または翻訳調節に関係する情報を含む配列エレメントを含み、そのような配列が、ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列に「作動可能に連結される」場合、「核酸分子を発現することができる」または「ヌクレオチド配列の発現を可能にすること」ができるといわれる。作動可能な連結は、調節配列エレメントおよび発現されることとなる配列が遺伝子発現を有効にする方法で結びつけられる連結である。遺伝子発現に必要な調節領域の正確な性質は、種の中で変動するかもしれないが、一般に、これらの領域は、原核生物で、プロモーターそれ自体、つまり転写の開始を指示するDNAエレメントおよびRNAに転写された場合に、翻訳の開始をシグナル伝達するであろうDNAエレメントの両方を含有するプロモーターを含む。そのようなプロモーター領域は、原核生物の-35/-10ボックスおよびShine-Dalgarnoエレメントまたは真核生物のTATAボックス、CAAT配列、および5'キャッピングエレメント等の、転写および翻訳の開始に関連する5'非コーディング配列を通常含む。これらの領域はまた、エンハンサーエレメントまたはリプレッサーエレメントならびに宿主細胞の特定のコンパートメントに天然のポリペプチドをターゲティングするための翻訳されたシグナル配列およびリーダー配列を含むこともできる。

【0111】

さらに、3'非コーディング配列は、転写終結、ポリアデニル化、またはその他同種のものに関連する調節エレメントを含有していてもよい。しかしながら、これらの終結配列が特定の宿主細胞で十分機能的ではない場合、それらはその細胞で機能的なシグナルと置換されてもよい。

【0112】

したがって、本発明の核酸分子は、調節配列、好ましくはプロモーター配列を含むことができる。他の好ましい実施形態では、本発明の核酸分子はプロモーター配列および転写終結配列を含む。適切な原核生物のプロモーターは、例えば、tetプロモーター、lacUV5プロモーター、またはT7プロモーターである。真核細胞の発現に有用であるプロモーターの例は、SV40プロモーターまたはCMVプロモーターである。

【0113】

本発明の核酸分子はまた、ベクターまたはプラスミド、ファージミド、ファージ、バキュロウイルス、コスミド、もしくは人工染色体等の任意の他の種類のクローニング媒体の一部とすることもできる。

【0114】

一実施形態では、核酸分子はファスミド中に含まれる。ファスミドベクターは、対象とするcDNAに融合された、M13またはf1等のテンプレートファージの遺伝子間領域またはその機能的部分をコードするベクターを示す。そのようなファージミドベクターおよび適切なヘルパーファージ（例えば、M13K07、VCS-M13、またはR408）を用いた細菌宿主細胞の重複感染の後で、完全なファージ粒子が産生され、それによって、ファージ表面上に示されたその対応するポリペプチドへの、コードされた異種のcDNAの物理的なつながりを可能にする（例えば、Kay, B. K.ら（1996）Phage Display of Peptides and Proteins - A Laboratory Manual、第1版、Academic Press、New York NY、Lowman, H. B.（1997）Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 26、401~424、またはRodi, D. J.およびMakowski, L.（1999）Curr. Opin. Biotechnol. 1

10

20

30

40

50

0、87～93で考察される)。

【0115】

そのようなクローニング媒体は、上記に記載される調節配列および本発明のリポカリン突然変異タンパク質をコードする核酸配列とは別に、発現に使用される宿主細胞と適合性の種に由来する複製配列および制御配列ならびに形質転換された細胞または形質移入された細胞に選択可能な表現型を付与する選択マーカを含むことができる。多くの適切なクローニングベクターは当技術分野で知られており、市販で入手可能である。

【0116】

本発明のリポカリン突然変異タンパク質をコードするDNA分子および特にそのようなリポカリン突然変異タンパク質のコード配列を含有するクローニングベクターは、遺伝子を発現することができる宿主細胞中に形質転換することができる。形質転換は標準の技術を使用して行うことができる(Sambrook, J.ら(1989)、前掲)。したがって、本発明はまた、本明細書に開示される核酸分子を含有する宿主細胞をも対象とする。

10

【0117】

形質転換された宿主細胞は、本発明の融合タンパク質をコードするヌクレオチド配列の発現に適した条件下で培養される。適切な宿主細胞は、エシェリヒア・コリ(E. coli、大腸菌)やバチルス・サブチリス(Bacillus subtilis、枯草菌)等の原核生物またはサッカロマイセス・セレビジエ(Saccharomyces cerevisiae、出芽酵母)、ピキア・パストリス(Pichia pastoris)等の真核生物、SF9またはHigh5昆虫細胞、不死化哺乳動物細胞系(例えば、HeLa細胞やCHO細胞)または初代哺乳動物細胞とすることができる。

20

【0118】

本発明はまた、本発明の突然変異タンパク質の産生のための方法にも関し、突然変異タンパク質、突然変異タンパク質の断片、または突然変異タンパク質および他のポリペプチドの融合タンパク質は、遺伝子操作法によって突然変異タンパク質をコードする核酸から開始して産生される。方法はin vivoで実行することができ、突然変異タンパク質は、例えば、細菌または真核生物の宿主生物中で産生し、次いで、この宿主生物またはその培養物から単離することができる。in vitroで、例えばin vitro翻訳系の使用によって、タンパク質を産生することも可能である。

30

【0119】

突然変異タンパク質をin vivoで産生する場合、本発明の突然変異タンパク質をコードする核酸は、組換えDNA技術によって適切な細菌または真核生物の宿主生物中に導入される(既に上記に概説される)。この目的のために、宿主細胞は、確立された標準の方法を使用して、本発明の突然変異タンパク質をコードする核酸分子を含むクローニングベクターを用いて最初に形質転換される(Sambrook, J.ら(1989)、前掲)。次いで、宿主細胞は、異種のDNAの発現を可能にし、したがって対応するポリペプチドの合成を可能にする条件下で培養される。続いて、ポリペプチドは細胞または培養培地のいずれかから回収される。

【0120】

本発明のいくつかの涙リポカリン突然変異タンパク質では、Cys61およびCys153の間の自然発生のジスルフィド結合が除去される。したがって、そのような突然変異タンパク質(または分子内ジスルフィド結合を含まない任意の他の涙リポカリン突然変異タンパク質)は、例えば、グラム陰性菌の細胞質中の還元性レドックス環境を有する細胞コンパートメント中で産生することができる。本発明のリポカリン突然変異タンパク質が分子内ジスルフィド結合を含む場合、好ましくは、適切なシグナル配列を使用して、酸化レドックス環境を有する細胞コンパートメントに新生ポリペプチドをターゲティングすることができる。そのような酸化環境は、大腸菌等のグラム陰性菌の周辺質によって、グラム陽性菌の細胞外環境中に、または真核細胞の小胞体の内腔中に提供されてもよく、普通、構造的ジスルフィド結合の形成に有利である。しかしながら、宿主細胞、好ましくは大

40

50

腸菌の細胞質ゾルで本発明の突然変異タンパク質を産生することも可能である。この場合、ポリペプチドは、可溶性でフォールドされた状態で直接得ること、または、封入体の形態で回収することができ、その後に *in vitro* での復元が続く。さらなる選択肢は、酸化細胞内環境を有する特異的な宿主株の使用であり、これは、したがって、細胞質ゾル中でのジスルフィド結合の形成を可能にし得る (Venturi M, Seifert C, Hunte C. (2002) 「High level production of functional antibody Fab fragments in an oxidizing bacterial cytoplasm.」 *J. Mol. Biol.* 315、1~8)。

【0121】

しかしながら、本発明の突然変異タンパク質は、遺伝子操作の使用のみによって必ずしも生成または産生されなくてもよい。むしろ、リボカリン突然変異タンパク質は、Merrifield固相ポリペプチド合成等の化学合成によって、または、*in vitro* 転写および翻訳によっても得ることができる。例えば、見込みのある突然変異を分子モデリングを使用して同定し、次いで、*in vitro* で、望まれる(設計された)ポリペプチドを合成し、所与の標的に対する結合活性を調査することは可能である。タンパク質の固相および/または液相合成のための方法は当技術分野でよく知られている(例えばLloyd-Williams, P.ら(1997) *Chemical Approaches to the Synthesis of Peptides and Proteins*. CRC Press, Boca Raton, Fields, G. B.およびColowick, S. P. (1997) *Solid-Phase Peptide Synthesis*. Academic Press, San Diego, またはBruckdorfer, T.ら(2004) *Curr. Pharm. Biotechnol.* 5、29~43で考察される)。

【0122】

他の実施形態では、本発明の突然変異タンパク質は、当業者らに知られている十分に確立された方法を利用して、*in vitro* 転写/翻訳によって産生されてもよい。

【0123】

本発明はまた、ヒト涙リボカリンの少なくとも1つの発明の突然変異タンパク質またはその融合タンパク質もしくはコンジュゲートおよび薬学的に許容し得る賦形剤を含む医薬組成物にも関する。

【0124】

本発明によるリボカリン突然変異タンパク質は、タンパク質性の薬剤にとって治療的に有効な任意の腸管外または非腸管外(経腸)経路を介して投与することができる。腸管外適用法は、例えば、注射液、注入液、またはチンキ剤の形態での例えば、皮内、皮下、筋肉内、気管内、鼻腔内、硝子体内、または静脈内の注射および注入技術、ならびに、例えばエアロゾル混合物、スプレー、または散剤の形態でのエアロゾルの導入および吸入を含む。肺薬剤送達、つまり、エアロゾル(また鼻腔内投与で使用することもできる)の吸入または気管内導入のいずれかを介した肺薬剤送達に関する概要は、例えばJ. S. Pattonら、*The lungs as a portal of entry for systemic drug delivery*. *Proc. Amer. Thoracic Soc.* 2004 第1巻338~344ページ)によって示される。非腸管外送達モードは、例えば、経口的、例えば丸剤、錠剤、カプセル剤、液剤、もしくは懸濁剤の形態、または、直腸的、例えば坐薬の形態とする。本発明の突然変異タンパク質は、所望されたとおりに、従来の無毒な薬学的に許容し得る賦形剤または担体、添加剤、および媒体を含有する製剤で全身にまたは局所的に投与することができる。

【0125】

本発明の一実施形態では、医薬品は、哺乳動物に、特にヒトに腸管外に投与される。対応する投与方法は、例えば、注射液、注入液、またはチンキ剤の形態での例えば皮内、皮下、筋肉内、気管内、または静脈内の注射および注入技術、ならびに、例えばエアロゾル

10

20

30

40

50

混合物、スプレー、または散剤の形態のエアロゾルの導入および吸入を含むが、これらに限定されない。静脈内および皮下の注入および/または注射の組合せであれば、比較的短い血清半減期を有する化合物の場合に最も好都合である。医薬組成物は、水溶液、水中油型乳剤、または油中水型乳剤であってもよい。

【0126】

この点に関して、Meidan VMおよびMichniak BB 2004 Am. J. Ther. 11(4):312~316に記載される、経皮送達技術、例えばイオン導入、超音波導入、またはマイクロニードルによって増強された送達は、また、本明細書に記載される突然変異タンパク質の経皮送達にも使用することができることに注目されたい。非腸管外送達モードは、例えば、経口的、例えば丸剤、錠剤、カプセル剤、液剤、もしくは懸濁剤の形態、または、直腸投与、例えば坐薬の形態とする。本発明の突然変異タンパク質は、種々様々な従来の無毒な薬学的に許容し得る賦形剤または担体、添加剤、および媒体を含有する製剤で全身にまたは局所的に投与することができる。

10

【0127】

適用される突然変異タンパク質の投薬量は、所望の予防効果または治療効果を達成するために広い範囲内で変動してもよい。それは、例えば、選ばれたリガンドに対する化合物の親和性ならびに*in vivo*での突然変異タンパク質とリガンドとの複合体の半減期に依存するであろう。さらに、最適な投薬量は、突然変異タンパク質またはその融合タンパク質もしくはそのコンジュゲートの体内分布、投与のモード、治療されている疾患/障害の重症度、および患者の医学的状態に依存するであろう。例えば、局所的な適用のために軟膏で使用される場合、高濃度の涙りポカリン突然変異タンパク質を使用することができる。しかしながら、望まれる場合、突然変異タンパク質はまた、徐放性製剤、例えばリポソーム分散液またはPoly Active (商標)またはOctoDEX (商標)のようなヒドロゲルベースのポリマーマイクロスフェアで与えられてもよい(Bosら、Business Briefing: Pharmatech 2003:1~6を参照されたい)。入手可能な他の徐放性製剤は、例えばPLGAベースのポリマー(Pharmaceuticals)、PLA-PEGベースのヒドロゲル(Medincell)、およびPEAベースのポリマー(Medivas)である。

20

【0128】

したがって、本発明の突然変異タンパク質は、薬学的に許容し得る成分および調製の確立された方法を使用して組成物に製剤することができる(Gennaro, A.L.およびGennaro, A.R.(2000) Remington: The Science and Practice of Pharmacy、第20版、Lippincott Williams & Wilkins、Philadelphia, PA)。医薬組成物を調製するために、薬学的に不活性の無機または有機賦形剤を使用することができる。例えば丸剤、散剤、ゼラチンカプセル、または坐薬を調製するために、例えばラクトース、タルク、ステアリン酸およびその塩、脂肪、ろう、固体または液体ポリオール、天然油および硬化油を使用することができる。使用の前の、液剤またはエアロゾル混合物への再構成のための液剤、懸濁剤、乳剤、エアロゾル混合物、または散剤の産生に適した賦形剤は、水、アルコール、グリセロール、ポリオール、およびその適切な混合物ならびに植物油を含む。

30

40

【0129】

医薬組成物はまた、例えば、増量剤、結合剤、湿潤剤、滑剤、安定剤、防腐剤、乳化剤、およびさらに溶剤もしくは可溶化剤または貯蔵効果を達成するための作用物質等の添加剤を含有していてもよい。最後のものは、リポソームおよびマイクロカプセル等の遅放性もしくは徐放性送達系または標的送達系に融合タンパク質が組み込まれてもよいことである。

【0130】

製剤は、細菌保持フィルターを通しての濾過を含む多数によってまたは使用の直前に滅菌水もしくは他の滅菌培地中で溶解させるもしくは分散させることができる滅菌固形組成

50

物の形態の滅菌剤を組み込むことによって滅菌することができる。

【0131】

本発明の他の態様は、疾患または障害を治療する方法であって、それを必要とする対象に上記に定義される突然変異タンパク質を含む医薬組成物を投与することを含む方法に関する。

【0132】

そのような治療を必要とする対象は、ほんの少数の例証となる例を挙げると、ヒト、イヌ、マウス、ラット、ブタ、サイモロガス ( c y m o l o g o u s ) 等の類人猿等の哺乳動物であってもよい。

【0133】

本発明の方法に従って治療されることとなる疾患および障害の正確な性質は、利用される突然変異タンパク質が結合しようとするリガンドに依存する。したがって、本発明の突然変異タンパク質は、疾患または障害の発達に関連することで知られている標的分子が、本発明の核酸ライブラリーの発現産物に対して提示され得るまたはそうでなければ、涙リポカリンの得られた突然変異タンパク質に対して提示され得る限り、任意の疾患を治療するために使用することができる。

【0134】

高度な親和性を有する I L - 4 受容体アルファに結合する上記の突然変異タンパク質またはそれらを含む医薬組成物は、T h 2 免疫応答の増加に関連する疾患または障害を治療する方法に利用されてもよい。そのような疾患または障害は、例えばアレルギー反応またはアレルギー性炎症であってもよい。アレルギー性炎症は、その結果として、アレルギー性喘息、鼻炎、結膜炎、または皮膚炎に関連していてもよい ( H a g e ら、C r y s t a l S t r u c t u r e o f t h e I n t e r l e u k i n - 4 R e c e p t o r a l p h a c h a i n c o m p l e x r e v e a l s a m o s a i c b i n d i n g i n t e r f a c e、C e l l、第97巻、271~281、1999年4月16日またはM u e l l e r ら、S t r u c t u r e , b i n d i n g a n d a n t a g o n i s t s i n t h e I L - 4 / I L - 13 r e c e p t o r s y s t e m、B i o c h e m i c a e t B i o p h y s i c a A c t a ( 2 0 0 2 )、237~250を参照されたい)。

【0135】

これに関連して、種々様々な腫瘍細胞が、正常細胞よりも多数の高度な親和性の I L - 4 受容体を発現することに注目されたい。そのような細胞は、例えば黒色腫等の固形ヒト腫瘍、乳癌、卵巣癌、中皮腫、膠芽腫、星状細胞腫、腎細胞癌、頭頸部癌腫、A I D S 関連性カポジ肉腫 = A I D S K S、ホルモン依存性および非依存性前立腺癌細胞、ならびに、前立腺腫瘍からの初代培養物を含む ( G a r l a n d L、G i t l i t z B ら、J o u r n a l o f I m m u n o t h e r a p y . 2 8 : 3 7 6 ~ 3 8 1、第4号、2005年7月~8月、R a n d R W、K r e i t m a n R J ら、C l i n i c a l C a n c e r R e s e a r c h . 6 : 2 1 5 7 ~ 2 1 6 5、2000年6月、H u s a i n S R、K r e i t m a n R J ら、N a t u r e M e d i c i n e . 5 : 8 1 7 ~ 8 2 2、1999年7月、P u r i R K、H o o n D S ら、C a n c e r R e s e a r c h . 5 6 : 5 6 3 1 ~ 5 6 3 7、1996年12月15日、10、D e b i n s k i W、P u r i R らもしくはH u s a i n S R、B e h a r i N ら、C a n c e r R e s e a r c h . 5 8 : 3 6 4 9 ~ 3 6 5 3、1998年8月15日、K a w a k a m i K、L e l a n d P ら、C a n c e r R e s e a r c h . 6 0 : 2 9 8 1 ~ 2 9 8 7、2000年6月1日、またはS t r o m e S E、K a w a k a m i K ら、C l i n i c a l C a n c e r R e s e a r c h . 8 : 2 8 1 ~ 2 8 6、2002年1月を例として参照されたい。I L - 4 受容体の過剰発現の文書を伴う細胞の特定の例は、限定されるものではないが、バーキットリンパ腫細胞系 J i j o y e ( B 細胞リンパ腫)、前立腺癌 ( L N C a P、D U 1 4 5 )、頭頸部癌腫 ( S C C、K C C T 8 7 3 )、膵癌 ( P A N C - 1 細胞系)、S C C - 2 5 : 1 3 , 0 0 0 ( ± 5 0 0 ) h 頭頸部癌細胞

10

20

30

40

50



胞系 (ATCC) を含む。IL4R アルファ鎖は IL4 内部移行に主要な役割を果たす。したがって、毒素に融合されたまたはコンジュゲートされた場合、IL-4 受容体アルファ鎖に結合する涙リポカリン突然変異タンパク質はまた、腫瘍 (癌) の治療のために使用することもできる。適切な毒素の例は、シュードモナス外毒素、百日咳毒素、ジフテリア毒素、リシン、サポリン、シュードモナス外毒素、カリチアマイシンまたはその誘導体、タキソイド、マイタンシノイド、チューブリジン (tubuly sin)、およびドラスタチン類似体を含む。ドラスタチン類似体の例は、オーリスタチン E、モノメチルオーリスタチン E、オーリスタチン P Y E、およびオーリスタチン P H E を含むが、これらに限定されない。

【0136】

10

癌の治療については、IL-4 受容体アルファ鎖に結合する突然変異タンパク質を細胞分裂阻害剤にコンジュゲートさせることも可能である。そのような細胞分裂阻害剤の例は、シスプラチン、カルボプラチン、オキサリプラチン、5-フルオロウラシル、タキソテル (ドセタキセル)、パクリタキセル、アントラサイクリン (ドキシソルピシン)、メトトレキサート、ピンブラスチン、ピンクリスチン、ピンデシン、ビノレルビン、ダカルバジン、シクロホスファミド、エトポシド、アドリアマイシン、カンプトテシン、コンプレタスタチン A-4 関連化合物、スルホンアミド、オキサジアゾリン、ベンゾ [b] チオフェン合成スピロケタールピラン、モノテトラヒドロフラン化合物、キュラシンおよびキュラシン誘導体、メトキシエストラジオール誘導体、ならびにロイコボリンを含む。

【0137】

20

この関連で、毒素または細胞分裂阻害剤と本発明の涙リポカリン突然変異タンパク質との融合物またはコンジュゲートは、IL-4 受容体アルファ鎖に対する親和性を有する突然変異タンパク質にももちろん限定されないことも示される。むしろ、当業者にとって直ちに明白となるが、癌細胞の表面上に発現された受容体に結合する任意の涙リポカリン突然変異タンパク質は、癌の治療のために融合タンパク質またはコンジュゲートの形態で使用することができる。

【0138】

高度な親和性で VEGF-R2 や VEGF に結合するヒト涙リポカリン突然変異タンパク質またはそれらを含む医薬組成物は、癌、新生血管滲出型加齢黄斑変性 (AMD)、糖尿病性網膜症もしくは糖尿病性黄斑浮腫、未熟児網膜症、または網膜静脈閉塞等の血管新生の増加に結びつけられる疾患または障害の治療のための方法で使用されてもよい。そのような癌は、ほんの少数の例証となる例を挙げると、胃腸管、直腸、結腸、前立腺、卵巣、膵臓、乳房、膀胱、腎臓、子宮内膜、および肺の癌腫、白血病、ならびに黒色腫から成る群から選択されてもよい。

30

【0139】

上記の開示から明白なように、本発明の突然変異タンパク質またはその融合タンパク質もしくはコンジュゲートは、多くの用途で利用することができる。一般に、そのような突然変異タンパク質は、Fc 部分のグリコシル化に特に頼る用途を除いて、抗体が使用されるすべての用途で使用することができる。

【0140】

40

したがって、本発明の他の態様では、ヒト涙リポカリンの発明された突然変異タンパク質は、ヒト涙リポカリンの所与の非天然リガンドの検出のために使用される。そのような使用は、突然変異タンパク質を、所与のリガンドを含有していると思われる試料と適切な条件下で接触させることにより、突然変異タンパク質と所与のリガンドとの複合体の形成を可能にするステップ、および複合突然変異タンパク質を適切なシグナルによって検出するステップを含む。

【0141】

検出可能なシグナルは、上記に説明されるように標識によってまたは結合、つまり複合体形成自体による物理的特性の変化によってもたすことができる。1つの例は表面プラズモン共鳴であり、その値は、一方が金箔等の表面上に固定化される結合パートナーの結

50

合の間に变化する。

【0142】

本明細書に開示されるヒト涙リボカリンの突然変異タンパク質はまた、ヒト涙リボカリンの所与の非天然リガンドの分離のために使用されてもよい。そのような使用は、突然変異タンパク質を、上述のリガンドを含有すると推測される試料と適切な条件下で接触させることにより、突然変異タンパク質と所与のリガンドとの複合体の形成を可能にするステップ、および突然変異タンパク質/リガンド複合体を試料から分離するステップを含んでいてもよい。

【0143】

所与の非天然リガンドの検出および所与のリガンドの分離のための突然変異タンパク質の使用の両方で、突然変異タンパク質および/または標的は適切な固相上に固定化されてもよい。

【0144】

本発明のヒト涙リボカリン突然変異タンパク質はまた、化合物を事前に選択された部位にターゲティングするために使用されてもよい。そのような目的のために、突然変異タンパク質は、対象とする化合物と接触させて、複合体形成を可能にする。次いで、突然変異タンパク質および対象とする化合物を含む複合体を、事前に選択された部位に送達する。この使用は、薬剤で治療されると推測される感染した身体部分、組織、または器官等の生物中の事前に選択された部位に（選択的に）薬剤を送達するのに特に適しているが、これに制限されない。突然変異タンパク質と対象とする化合物との複合体の形成の他に、突然変異タンパク質はまた、所与の化合物と反応させて、突然変異タンパク質および化合物のコンジュゲートを得ることができる。上記の複合体と同様に、そのようなコンジュゲートは、事前に選択された標的部位に化合物を送達するのに適し得る。突然変異タンパク質および化合物のそのようなコンジュゲートはまた、突然変異タンパク質および化合物を互いに共有結合させるリンカーを含んでいてもよい。任意選択で、そのようなリンカーは血流中で安定しているが、細胞環境中で開裂可能である。

【0145】

したがって、本明細書に開示される突然変異タンパク質およびその誘導体は、抗体またはその断片と同様に、多くの分野で使用することができる。支持体に結合して、所与の突然変異タンパク質の標的またはこの標的のコンジュゲートもしくは融合タンパク質が固定化されるまたは分離されるのを可能にするためのそれらの使用に加えて、突然変異タンパク質は、酵素、抗体、放射性物質、または生物化学的活性もしくは定義された結合の特徴を有する任意の他の基を用いて標識するために使用することができる。そうすることによって、それらのそれぞれの標的またはそのコンジュゲートもしくは融合タンパク質を検出することができるまたはそれらに接触させることができる。例えば、本発明の突然変異タンパク質は、確立された分析法（例えば、ELISAやウェスタンブロット）または顕微鏡検査もしくは免疫センサーによって化学構造を検出するのに貢献することができる。ここで、検出シグナルは、適切な突然変異タンパク質コンジュゲートもしくは融合タンパク質の使用によって直接または抗体を介して結合した突然変異タンパク質の免疫化学的検出によって間接的に生成することができる。

【0146】

発明の突然変異タンパク質についての多数の可能性のある用途はまた医学にも存在する。診断および薬剤送達（ドラッグデリバリー）でのそれらの使用に加えて、例えば、組織または腫瘍特異的細胞表面分子に結合する本発明の突然変異体ポリペプチドを生成することができる。そのような突然変異タンパク質は、例えば、コンジュゲート形態でまたは「腫瘍イメージング」のための融合タンパク質としてまたは癌療法のために直接使用してもよい。

【0147】

したがって、本発明はまた、所与の非天然リガンドとの複合体形成のための本発明のヒト涙リボカリン突然変異タンパク質の使用をも含む。

10

20

30

40

50

## 【0148】

本明細書に記載される突然変異タンパク質の他の関係する好ましい使用は、標的検証、つまり、疾患または障害の発達または進行に関連すると仮定されたポリペプチドが実際に何らかの形でその疾患または障害の原因となるかどうかの分析である。薬理的薬剤標的としてタンパク質を検証するためのこの使用は、その天然のコンホメーションのタンパク質の表面エリアを特異的に認識する、つまり天然のエピトープに結合する本発明の突然変異タンパク質の能力を利用する。この点で、この能力は、限られた数の組換え抗体についてのみ報告されたことに注目されたい。しかしながら、薬剤標的の検証のための発明の突然変異タンパク質の使用は、標的としてのタンパク質の検出に限定されず、タンパク質ドメイン、ペプチド、核酸分子、有機分子、または金属錯体の検出も含む。

10

## 【0149】

本発明は、次の非限定的な実施例および添付の図面によってさらに示される。

## 【図面の簡単な説明】

## 【0150】

【図1】発現ベクター p T L P C 1 0 (配列番号1)の地図 (map) を示す図である。

【図2】S 1 4 8 . 3 J 1 4、I L - 4 受容体アルファに対する結合親和性を有するヒト涙リボカリンの突然変異タンパク質のポリペプチド配列を示す図である。

【図3】E L I S A を介しての親和性スクリーニングの方法および I L - 4 受容体アルファに対する親和性を有する突然変異タンパク質について得られた結果を示す図である。

【図4】I L - 4 受容体アルファに対する最も高度な親和性を有する突然変異タンパク質のポリペプチド配列を示す図である (配列番号3 ~ 8)。

20

【図5】本発明のヒト涙リボカリン突然変異タンパク質 (S 1 4 8 . 3 J 1 4 ; 配列番号2) が I L - 4 受容体アルファに結合する B I A c o r e 測定値を示す図である。

【図6】本発明のヒト涙リボカリン突然変異タンパク質 (S 1 9 1 . 5 K 1 2 ; 配列番号3) が I L - 4 受容体アルファに結合する B I A c o r e 測定値を示す図である。

【図7】本発明のヒト涙リボカリン突然変異タンパク質 (S 1 4 8 . 3 J 1 4 A M 2 C 2 ; 配列番号4) が I L - 4 受容体アルファに結合する B I A c o r e 測定値を示す図である。

【図8】本発明のヒト涙リボカリン突然変異タンパク質 (S 1 9 1 . 4 B 2 4 ; 配列番号5) が I L - 4 受容体アルファに結合する B I A c o r e 測定値を示す図である。

30

【図9】本発明のヒト涙リボカリン突然変異タンパク質 (S 1 9 1 . 4 K 1 9 ; 配列番号6) が I L - 4 受容体アルファに結合する B I A c o r e 測定値を示す図である。

【図10】本発明のヒト涙リボカリン突然変異タンパク質 (S 1 9 1 . 5 H 1 6 ; 配列番号7) が I L - 4 受容体アルファに結合する B I A c o r e 測定値を示す図である。

【図11】本発明のヒト涙リボカリン突然変異タンパク質 (S 1 9 7 . 8 D 2 2 ; 配列番号8) が I L - 4 受容体アルファに結合する B I A c o r e 測定値を示す図である。

【図12】本発明のヒト涙リボカリン突然変異タンパク質 (S 1 4 8 . 3 J 1 4 ; 配列番号2) が I L - 4 受容体アルファに結合する競合 E L I S A 測定値を示す図である。

【図13】本発明のヒト涙リボカリン突然変異タンパク質 (S 1 9 1 . 5 K 1 2 ; 配列番号3) が I L - 4 受容体アルファに結合する競合 E L I S A 測定値を示す図である。

40

【図14】本発明のヒト涙リボカリン突然変異タンパク質 (S 1 4 8 . 3 J 1 4 A M 2 C 2 ; 配列番号4) が I L - 4 受容体アルファに結合する競合 E L I S A 測定値を示す図である。

【図15】本発明のヒト涙リボカリン突然変異タンパク質 (S 1 9 1 . 4 B 2 4 ; 配列番号5) が I L - 4 受容体アルファに結合する競合 E L I S A 測定値を示す図である。

【図16】本発明のヒト涙リボカリン突然変異タンパク質 (S 1 9 1 . 4 K 1 9 ; 配列番号6) が I L - 4 受容体アルファに結合する競合 E L I S A 測定値を示す図である。

【図17】本発明のヒト涙リボカリン突然変異タンパク質 (S 1 9 1 . 5 H 1 6 ; 配列番号7) が I L - 4 受容体アルファに結合する競合 E L I S A 測定値を示す図である。

【図18】本発明のヒト涙リボカリン突然変異タンパク質 (S 1 9 7 . 8 D 2 2 ; 配列

50

番号 8) が I L - 4 受容体アルファに結合する競合 E L I S A 測定値を示す図である。

【図 19】I L - 4 または I L - 13 および本発明のヒト涙リポカリン突然変異タンパク質 ( S 191.5 K12、S 148.3 J14AM2C2、S 191.4 B24、S 191.4 K19、S 191.5 H16、および S 197.8 D22 [ 配列番号 3 ~ 8 ] ) の存在下での T F - 1 細胞増殖アッセイを示す図である。

【図 20】発現ベクター p T L P C 27 ( 配列番号 9 ) の地図を示す図である。

【図 21】ヒト V E G F 165 および本発明のヒト涙リポカリン突然変異タンパク質 ( S 209.2 C23、S 209.2 D16、S 209.2 N9、S 209.6 H7、S 209.6 H10、S 209.2 M17、S 209.2 O10 [ 配列番号 27 ~ 33 ] )、野生型涙リポカリン ( p T L P C 10 の遺伝子産物；コントロール)、または A v a s t i n ( 登録商標 ) ( R o c h e ; コントロール) の存在下での、ヒト臍静脈 ( H U V E C ) から培養した内皮細胞を用いた増殖アッセイを示す図である。

【図 22】本発明の P E G 化ヒト涙リポカリン突然変異タンパク質 ( S 148.3 J14 ; 配列番号 2 ) が I L - 4 受容体アルファに結合する B I A c o r e 測定値を示す図である。

【図 23】本発明のヒト涙リポカリン突然変異タンパク質 ( S 236.1 - A 22、配列番号 44 ) が固定化された V E G F <sub>8-109</sub> に結合する B I A c o r e 測定値を示す図である。

【図 24】h V E G F <sub>8-109</sub>、h V E G F <sub>121</sub>、スライス形態 h V E G F <sub>165</sub>、およびそれぞれのマウスオルソログ m V E G F <sub>164</sub> がヒト涙リポカリン突然変異タンパク質 S 236.1 - A 22 ( 配列番号 44 ) に結合する B I A c o r e 測定値を示す図である。

【図 25】ヒト血漿および硝子体液中の涙リポカリン突然変異タンパク質 S 236.1 - A 22 ( 配列番号 44 ) の安定性試験の結果 ( 図 25 A ) およびアルブミン結合ドメイン ( A B D ) との突然変異タンパク質 S 236.1 - A 22 の融合タンパク質 ( 配列番号 51 ) の安定性試験の結果 ( 図 25 B ) を示す図である。

【図 26】O m p A シグナル配列 ( O m p A )、アルブミン結合ドメイン ( a b d ) に融合され、その後 S t r e p タグ I I が続く突然変異したヒト涙リポカリン ( T l c ) を含む融合タンパク質をコードする発現ベクター p T L P C 51 を示す図である。

【図 27】涙リポカリン突然変異タンパク質 S 236.1 - A 22 ( 配列番号 44 ) および A B D との突然変異タンパク質 S 236.1 - A 22 の融合タンパク質 ( 配列番号 51 ) が組換え V E G F に結合する B I A c o r e 測定値を示す図である。

【図 28】ヒト血清アルブミン ( H S A ) の存在下または非存在下での A B D を有する S 236.1 - A 22 ( 配列番号 51 ) による V E G F 誘発性の H U V E C 増殖の阻害を示す図である。

【図 29】A v a s t i n ( 登録商標 ) および野生型涙リポカリンによって達成される阻害と比較した、リポカリン突然変異タンパク質 S 236.1 - A 22 ( 配列番号 44 ) による、ヒト臍静脈 ( H U V E C ) から培養した内皮細胞の V E G F 誘発性の増殖の阻害を示す図である。

【図 30】A v a s t i n ( 登録商標 ) によって達成される阻害と比較した、リポカリン突然変異タンパク質 S 236.1 - A 22 ( 配列番号 44 ) による、H U V E C 中の V E G F 媒介性の M A P キナーゼ活性化の阻害を示す図である。

【図 31】A v a s t i n ( 登録商標 ) および野生型涙リポカリンと比較した、涙リポカリン突然変異タンパク質 S 209.2 \_ O 10 ( 配列番号 33 ) の局所投与を用いた血管透過性アッセイの結果を示す図である。

【図 32】涙リポカリン突然変異タンパク質 S 209.2 \_ O 10 ( 配列番号 33 ) および A v a s t i n ( 登録商標 ) および野生型涙リポカリンについての中央値の血管形成指数を比較する C A M アッセイの結果を示す図である。

【図 33】涙リポカリン突然変異タンパク質 S 236.1 - A 22 ( 配列番号 44 ) および A B D との突然変異タンパク質 S 236.1 - A 22 の融合タンパク質 ( 配列番号 51

10

20

30

40

50

）についてのNMR Iマウスの血漿中のリポカリン突然変異タンパク質の濃度を示す図である。

【図34】野生型涙リポカリン、PBSバッファー、およびAvastin（登録商標）と比較した、ABDとの涙リポカリン突然変異タンパク質S236.1-A22の融合タンパク質（配列番号51）の全身投与の後の血管透過性アッセイの結果を示す図である。

【図35】野生型涙リポカリン、PBSバッファー、およびAvastin（登録商標）と比較したABDとの涙リポカリン突然変異タンパク質S236.1-A22の融合タンパク質（配列番号51）の腹腔内投与についての腫瘍異種移植モデル（スイスヌードマウス）の結果を示す図である。

【図36】増加性の濃度のIL-4受容体アルファ結合突然変異タンパク質S191.4 B24（配列番号4）の存在下または非存在下での、IL-4またはIL-13を用いて刺激したA549細胞を用いたエオタキシン-3分泌アッセイの結果を示す図である。

【図37】増加性の濃度のIL-4受容体アルファ結合突然変異タンパク質S191.4 B24（配列番号4）の存在下または非存在下での刺激された末梢血単核細胞（PBMC）上でのIL-4/IL-13誘発性のCD23発現を示す図である。

【図38】IL-4受容体アルファ結合突然変異タンパク質S191.4 B24（配列番号4）のSchild分析の結果を示す図である。

【図39】ヒト初代B細胞に対する、IL-4受容体アルファ結合突然変異タンパク質S191.4 B24（配列番号4）の親和性判定の結果を示す図である。

【図40】静脈内、皮下、または気管内投与の後の、IL-4受容体アルファ結合突然変異タンパク質S191.4 B24の生物学的利用率試験の結果を示す図である。

【図41】VEGF刺激HUVEC増殖アッセイでの、PEG20、PEG30、またはPEG40を用いたPEG化を有するおよび有していない突然変異タンパク質S236.1-A22（配列番号44）の*in vitro*作用強度判定を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0151】

図1は、OmpAシグナル配列（OmpA）、T7アフィニティータグ、および突然変異したヒト涙リポカリン（Tlc）を含み、その後StrepタグIIが続く融合タンパク質をコードする発現ベクターpTLP C10を示す。突然変異した遺伝子カセットのクローニングのために使用されるBstXI制限部位および構造遺伝子の側方に位置する制限部位の両方を標識する。遺伝子発現は、テトラサイクリンプロモーター/オペレーター（tet<sup>P/O</sup>）の制御下とする。転写はリポタンパク質転写ターミネーター（t<sub>lp</sub><sub>p</sub>）で終結される。ベクターは、複製開始点（ori）、線状ファージf1の遺伝子間領域（f1-IG）、アンピシリン耐性遺伝子（amp）、およびテトラサイクリン抑制遺伝子（tetR）をさらに含む。pTLP C10の核酸配列の関係のあるセグメントは、配列番号1として配列表リスト中のコードされたアミノ酸配列と共に再産生される。そのセグメントは、XbaI制限部位で始まり、HindIII制限部位で終わる。この領域の外側のベクターエレメントはベクターpASK75と同一であり、その完全なヌクレオチド配列は、ドイツ特許公報DE4417598A1号に示される。

【0152】

図2は、IL-4受容体アルファに対する結合親和性を示す本発明のヒト涙リポカリン突然変異タンパク質（S148.3 J14）の一次構造を示す。最初の21残基（下線）はシグナル配列を構成し、これは周辺質の発現に際して開裂する。N末端T7タグ（イタリック体）およびC末端Strep-tag-II（ボールド）は特徴付けられるタンパク質の一部である。図2は、また、4つのN末端アミノ酸残基（H1 H2 L3 A4）ならびに2つの最後のC末端アミノ酸残基（S157およびD158）が本発明のこの例証となる突然変異タンパク質中で欠失していることも示す。

【0153】

図3は、親和性スクリーニング実験からの結果を示す。モノクローナル抗StrepTag抗体（Qiagen）は、ヒト涙リポカリンの発現突然変異タンパク質を捕捉するた

10

20

30

40

50

めにELISAプレート上にコートし、捕捉された突然変異タンパク質へのIL-4受容体アルファ-Fc (R&D Systems; 3 nMおよび0.75 nM)の結合は、IL-4受容体アルファ-FcのFcドメインに対するホースラディッシュペルオキシダーゼ(HRP)コンジュゲートポリクローナル抗体を使用して検出した。親和性が改善されたクローンはより高度なシグナルを発する(左)。IL-4をELISAプレート上にコートし、IL-4受容体アルファ-Fc(3 nM)を発現突然変異タンパク質と共にインキュベートした。非占有IL-4結合部位を有するIL-4受容体アルファ-Fcの結合は、IL-4受容体アルファ-FcのFcドメインに対するHRPコンジュゲートポリクローナル抗体を使用して検出した。アンタゴニスト親和性が改善されたクローンはより低いシグナルを発する(右)。本発明の突然変異タンパク質S148.3 J14(配列番号2)に対応するシグナルは、矢を用いて表し、個々のクローンからのシグナルは菱形によって表す。

#### 【0154】

図4は、配列番号2(S148.3 J14)の親和性成熟によって得られたIL-4受容体アルファに対する最も高度な結合親和性を有するヒト涙リポカリンの6つの突然変異タンパク質のポリペプチド配列(S191.5 K12、S148.3 J14 AM2 C2、S191.4 B24、S191.4 K19、S191.5 H16、およびS197.8 D22[配列番号3~8])を示す。表された一次構造の最初の21残基(下線)はシグナル配列を構成し、これは周辺質の発現に際して開裂する。C末端Streptag-II(ボールド)は特徴付けられたタンパク質の一部である。図4はまた、例えば、最初の4つのN末端アミノ酸残基(HHLA)および2つの最後のC末端アミノ酸残基(SD)は、タンパク質の生物学的機能に影響を与えることなく、本発明の涙リポカリン突然変異タンパク質中で欠失させることができることも示す。

#### 【0155】

図5~11は、IL-4受容体アルファに対する親和性を有するヒト涙リポカリンの突然変異タンパク質(S148.3 J14、S191.5 K12、S148.3 J14 AM2 C2、S191.4 B24、S191.4 K19、S191.5 H16、およびS197.8 D22[配列番号2~8])のBiacore測定値を示す。約400 RUのIL-4受容体アルファ-Fcは、抗ヒトFcモノクローナル抗体を用いて事前にコートしたCM-5チップ上で捕捉された。続いて、異なる濃度(図5: 20 nM; 40 nM; 80 nM; 160 nM; 320 nM)または単一濃度の25 nM(図6~11)の突然変異タンパク質をフローセルに通過させ、共鳴ユニットの変化を記録した。IL-4受容体アルファ-Fcをまったく有していないことを除いて等しく処理したフローセルからの基準シグナルを差し引き、結果として生じるデータをBIAevaluationソフトウェアを使用して1:1 Langmuir(ラングミュア)モデルにあてはめた。図6~11に示される実験での相互作用の遅い解離反応速度のために、IL-4受容体アルファ-Fcをまったく有していないことを除いて等しく処理したフローセルからのシグナルを差し引くことおよび試料バッファのみを注入した実験からのシグナルを差し引くことによって、二重参照を使用した。結果として生じるデータは、BIAevaluationソフトウェアを使用して、物質輸送制限と共に1:1 Langmuirモデルにあてはめた。図6~11では、5回の実験からの1つの代表的な結果を示す。

#### 【0156】

図12は、IL-4受容体アルファに対する結合親和性を有するヒト涙リポカリン突然変異タンパク質(S148.3 J14; 配列番号2)の競合ELISA測定値を示す。IL-4(20 µg/ml)をELISAプレート上にコートし、IL-4受容体アルファ-Fc(15 nM)を、室温で1時間、種々の濃度のヒト涙リポカリン突然変異タンパク質またはIL-4受容体特異的モノクローナル抗体(MAB230、R&D Systems)と共にインキュベートした。IL-4受容体アルファ-Fcおよび突然変異タンパク質の混合物を外界温度で30分間、IL-4をコートしたプレートに与えた。結合したIL-4受容体アルファ-Fcをやぎ抗ヒトFc-HRP-コンジュゲート抗体を用い

10

20

30

40

50

て検出した。データを式： $0.5 * (-m_0 + m_2 - m_1 + \sqrt{(-m_0 + m_2 - m_1)^2 + 4 * m_1 * m_2})$  にあてはめた。K<sub>i</sub> は変数 m<sub>1</sub> によって示される。3 回の実験からの 1 つの代表的な結果を示す。

【0157】

図13～18は、IL-4受容体アルファに対する結合親和性を有するヒト涙リポカリン突然変異タンパク質およびコントロールとしての野生型涙リポカリン(TLPC10; pTLPC10の遺伝子産物)の競合ELISA測定値を示す。IL-4受容体に対するIL-4受容体アルファ特異的モノクローナル抗体MAB230(R&D Systems)をELISAプレート上にコートし、ビオチン化IL-4受容体アルファ(IL-4Rアルファ-bio; 0.5nM)を外界温度で1時間、種々の濃度の発明された突然変異タンパク質またはTLPC10と共にインキュベートした。IL-4Rアルファ-bioおよび突然変異タンパク質の混合物を外界温度で30分間、MAB230でコートしたプレート中でインキュベートした。結合したIL-4Rアルファ-bioは、Extraavidin-HRPを用いて検出した。データは式： $0.5 * (-m_0 + m_2 - m_1 + \sqrt{(-m_0 + m_2 - m_1)^2 + 4 * m_1 * m_2})$  にあてはめた。K<sub>D</sub> は変数 m<sub>1</sub> によって示される。3 回の実験からの 1 つの代表的な結果を示す。

10

【0158】

図19は、TF-1細胞増殖アッセイの結果を示す。TF-1細胞は、72時間の0.8ng/ml IL-4(a、b)または12ng/ml IL-13(c、d)の添加の前に、希釈系列の示された突然変異タンパク質、IL-4受容体アルファ特異的モノクローナル抗体、またはIgG2a抗体アイソタイプコントロールと共に37℃で1時間インキュベートした。増殖は<sup>3</sup>Hチミジン取り込みによって測定した。

20

【0159】

図20は、OmpAシグナル配列(OmpA)、StreptagIIが後に続くTlc、およびアミノ酸217～406を含むM13コートタンパク質pIIIの切断された形態(pIII)を含む融合タンパク質をコードするファスミドベクターpTLPC27を示す。SupEアンバーサプレッサー宿主株中でGlnに部分的に翻訳されるアンバー停止コドンは、StreptagIIを含むTlcコード領域および切断されたファージコートタンパク質pIIIのコード領域の間に位置し、非サプレッサー大腸菌株を利用する場合にM13コートタンパク質pIIIを伴わないでTlc突然変異タンパク質の可溶性発現を可能にする。突然変異した遺伝子カセットのクローニングのために使用されるBstXI制限部位および構造遺伝子の側方に位置する制限部位の両方を標識する。遺伝子発現は、テトラサイクリンプロモーター/オペレーター(tet<sup>P/O</sup>)の制御下とする。転写はリポタンパク質転写ターミネーター(t<sub>lpp</sub>)で終結される。ベクターは、複製開始点(ori)、線状ファージf1の遺伝子間領域(f1-IG)、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼをコードするクロラムフェニコール耐性遺伝子(cat)、およびテトラサイクリン抑制遺伝子(tetR)をさらに含む。pTLPC27の核酸配列の関係のあるセグメントは、配列番号9としての配列リスト中のコードされたアミノ酸配列と共に再産生される。

30

【0160】

図21は、ヒトVEGFに対する結合親和性を有するヒト涙リポカリン突然変異タンパク質、野生型涙リポカリン(TLPC10)、またはVEGF特異的治療抗体Avastin(登録商標)を利用する増殖アッセイの結果を示す。約1,400個のHUVEC細胞を完全培地中に接種し、37℃での一晚のインキュベーションの後、細胞を洗浄し、0.5%FCs、ヒドロコルチゾン、およびゲンタマイシン/アンホテリシンを含有する基本培地を添加した。VEGF特異的突然変異タンパク質S209.2-C23、S209.2-D16、S209.2-N9、S209.6-H7、S209.6-H10、S209.2-M17、S209.2-O10(配列番号27～33)、野生型涙リポカリン(pTLPC10の遺伝子産物; コントロール)、または治療VEGF特異的モノクローナル抗体Avastin(登録商標)(Roche; コントロール)を3通りのウェル中

40

50

に示す濃度で添加した。30分後、VEGFによって誘発されない増殖のコントロールとしてのヒトVEGF165またはヒトFGF-2(示さず)を添加し、細胞の生存率を、Cell Titer 96 Aqueous One発色アッセイ(Promega)を用いて6日後に判定した。

#### 【0161】

図22は、IL-4受容体アルファに対する親和性を有するヒト涙リポカリンのPEG化突然変異タンパク質S148.3 J14(配列番号2)のBiacore測定値を示す。約400RUのIL-4受容体アルファ-Fcは、抗ヒトFcモノクローナル抗体を用いて事前にコートしたCM-5チップ上で捕捉された。続いて、異なる濃度(200nM; 67nM; 22nMの突然変異タンパク質をフローセルに通過させ、共鳴ユニットの変化を記録した。IL-4受容体アルファ-Fcをまったく有していないことを除いて等しく処理したフローセルからの基準シグナルを差し引き、結果として生じるデータをBLA Evaluationソフトウェアを使用して1:1Langmuirモデルにあてはめた。

10

#### 【0162】

図23は、ヒト涙リポカリン突然変異タンパク質S236.1-A22(配列番号44)が固定化されたVEGF<sub>8-109</sub>に結合する例示的なBiacore測定値を示す。VEGF<sub>8-109</sub>は標準のアミンの化学的性質を使用してCM5チップ上に固定化した。リポカリン突然変異タンパク質S236.1-A22は、500nM~16nMの6つの濃度で30μl/分の流速で加えた。センサーグラムの評価は、突然変異タンパク質の $k_{on}$ 、 $k_{off}$ 、および $K_D$ を決定するためにBIAT100ソフトウェアを用いて行った。

20

#### 【0163】

図24は、異なる形態のVEGFとの、センサーチップ上に固定化された突然変異タンパク質S236.1-A22(配列番号44)の親和性測定値を示す。親和性測定値は、突然変異タンパク質が固定化され、異なるVEGF変異体を含有する70μlの試料を250nMの濃度で注入した改変を伴って、WO2006/56464号の実施例9に記載されるように本質的に行った。結果の定性的比較は、切断された形態hVEGF<sub>8-109</sub>およびhVEGF<sub>121</sub>が基本的に同一のセンサーグラムを示すことを示し、涙リポカリン突然変異タンパク質S236.1-A22(配列番号44)に親和性が類似していることを示す。スプライス形態hVEGF<sub>165</sub>もリポカリン突然変異タンパク質に対する強い結合を示すが、それぞれのマウスオルソログmVEGF<sub>164</sub>は親和性がわずかに低下している。

30

#### 【0164】

図25は、利用した濃度を1mg/mlとしたことを除いて国際特許出願WO2006/056464号の実施例15に記載されるように本質的に行った、PBSおよびヒト血清中での37でのVEGF結合突然変異タンパク質S236.1-A22の安定性試験を示す。突然変異タンパク質の変化は、HPLC-SECによって判断されるようにPBS中での7日間のインキュベーション期間の間に検出することができなかった(データ示さず)。ヒト血清中でのリポカリン突然変異タンパク質のインキュベーションは、基準と比較しておよそ70%まで7日後に親和性の低下をもたらした(図25a)。ヒト血清中でのS236.1-A22のABD融合物(配列番号51)の安定性も上記に記載されるように試験した。活性の損失は7日間のインキュベーション期間の間に検出することができなかった(図25b)。

40

#### 【0165】

図26は、OmpAシグナル配列(OmpA)、アルブミン結合ドメイン(abd)に融合され、その後StreptagIIが続く突然変異したヒト涙リポカリン(Tlc)を含む融合タンパク質をコードする発現ベクターpTLP51を示す。突然変異した遺伝子カセットのクローニングのために使用されるBstXI制限部位および構造遺伝子の側方に位置する制限部位の両方を標識する。遺伝子発現は、テトラサイクリンプロモーター

50



ノオペレーター (tet<sup>P</sup>/°) の制御下とする。転写はリポタンパク質転写ターミネーター (t<sub>lpp</sub>) で終結される。ベクターは、複製開始点 (ori)、線状ファージ f1 の遺伝子間領域 (f1-IG)、アンピシリン耐性遺伝子 (amp)、およびテトラサイクリン抑制遺伝子 (tetR) をさらに含む。pTLP C51 の核酸配列の関係のあるセグメントは、配列番号 48 および 49 として配列表リスト中のコードされたアミノ酸配列と共に再産生される。そのセグメントは、XbaI 制限部位で始まり、HindIII 制限部位で終わる。この領域の外側のベクターエレメントはベクター pASK75 と同一であり、その完全なヌクレオチド配列は、ドイツ特許公報 DE 44 175 98 A 1 号に示される。

#### 【0166】

図 27 は、表面プラズモン共鳴 (Biacore) を使用する、組換え VEGF<sub>8-109</sub> に対する涙リポカリン突然変異タンパク質 S236.1-A22 の ABD 融合物 (A22-ABD) (配列番号 51) (200 pM) の親和性測定値を示す。親和性測定値は、約 250 RU の組換え VEGF<sub>8-109</sub> が標準のアミンの化学的性質を使用してセンサーチップに直接つながれた改変を伴って、WO 2006/56464 号の実施例 9 に記載されるように本質的に行った。40 μl の突然変異タンパク質を 400 nM の濃度で注入した。親和性は基本的に変化していないことがわかり、260 pM と測定された。

#### 【0167】

図 28 は、VEGF 誘発性の HUVEC 増殖を阻害するためのその能力を判定することによる、ヒト血清アルブミンの存在下でのリポカリン突然変異タンパク質 A22-ABD (S236.1-A22 の ABD 融合物) の機能性の試験を示す。HUVEC (Promocell) はゼラチンをコートした皿上で増し、継代 P2 および P8 の間に使用した。1 日目、1400 個の細胞を、完全培地中の 96 ウェルプレート中にウェル毎に接種した。2 日目、細胞を洗浄し、0.5% FCS、ヒドロコルチゾン、およびゲンタマイシン/アンホテリシンを含有する 100 μl の基本培地を添加した。増殖は、リポカリン突然変異タンパク質 S236.1-A22-ABD (配列番号 51) と混合し、30 分間インキュベートし、ウェルに添加した 20 ng/ml VEGF<sub>165</sub> または 10 ng/ml FGF-2 を用いて刺激した。生存率は 6 日目に決定し、結果は阻害%として表現した。示される場合に、ヒト血清アルブミン (HSA、5 μM) を添加した。5 μM HSA で、>99.8% の A22-ABD が任意の所与の時間に HSA と結合する。

#### 【0168】

図 29 は、本発明の突然変異タンパク質による、VEGF 誘発性の HUVEC 増殖の阻害を示す。HUVEC (Promocell) はゼラチンをコートした皿 (dish) 上で増し、継代 P2 および P8 の間に使用した。1 日目、1400 個の細胞を、完全培地中に 96 ウェルプレート中にウェル毎に接種した。2 日目、細胞を洗浄し、0.5% FCS、ヒドロコルチゾン、およびゲンタマイシン/アンホテリシンを含有する 100 μl の基本培地を添加した。増殖は、リポカリン突然変異タンパク質 S236.1-A22 (配列番号 44) と混合し、30 分間インキュベートし、ウェルに添加した 20 ng/ml VEGF<sub>165</sub> または 10 ng/ml FGF-2 を用いて刺激した。生存率は 6 日目に決定し、結果は阻害%として表現した。

#### 【0169】

図 30 は、本発明の突然変異タンパク質による HUVEC 中の VEGF 媒介性の MAPキナーゼ活性化の阻害を示す。HUVEC は、標準の培地 (Promocell、Heidelberg) 中にウェル当たり 1,400 個の細胞で 96 ウェルプレート中に接種した。翌日、FCS を 0.5% に低下させ、培養を 16 時間継続した。次いで、細胞を 5 時間基本培地中 0.5% BSA 中で飢餓状態にした。HUVEC は、用量応答曲線を得るために、増加性の濃度の涙リポカリン突然変異タンパク質 A22 または Avastin (ペバシズマブ、Genentech/Roche) の存在下で 10 分間 VEGF<sub>165</sub> (Reliatech、Braunschweig) を用いて刺激した。MAPキナーゼ ERK1 および ERK2 のリン酸化は、メーカーのマニュアル (Active Motif、

10

20

30

40

50

Rixensart, Belgium) に従って ELISA を使用して定量化した。IC<sub>50</sub> 値は突然変異タンパク質 A22 (配列番号 44) について 4.5 nM および Avastin (登録商標) について 13 nM であると決定された。

【0170】

図31は、涙りポカリン突然変異タンパク質の局所投与を用いた血管透過性アッセイを示す。体重が  $350 \pm 50$  g の Duncan-Hartley モルモットは、肩および背を剪毛した。動物は、1 ml の 1% Evan's Blue 色素の耳静脈を介しての静脈内注射を受けた。30分後、20 ng VEGF<sub>165</sub> (Calbiochem) を10倍のモル過剰で試験物質またはコントロール物と混合し、3×4グリッド上に皮内に注射した。30分後、動物はCO<sub>2</sub> 窒息によって安楽死させた。VEGF注射の1時間後に、グリッドパターンを含有する皮膚を摘出し、結合組織をきれいにした。色素血管外遊出のエリアは、画像解析器 (Image Pro Plus 1.3, Media Cybernetics) の使用によって定量化した。

10

【0171】

図32はヒヨコ漿尿膜 (CAM) アッセイを示す。示されるように FGF-2 (500 ng)、VEGF (150 ng)、および涙りポカリン突然変異タンパク質 (1.35 μg) または Avastin (10 μg) を含有するコラーゲンオンプラント (onplant) を10日目のニワトリ胚 (4つ/動物、10匹の動物/グループ) のCAMの上に置いた。24時間目に、涙りポカリン突然変異タンパク質または Avastin を同じ用量でオンプラントに局所的に再び加えた。72時間後に、オンプラントを収集し、画像を保存した。少なくとも1つの血管を含有するポジティブグリッドの百分率を盲検化した観察者によって決定した。中央値の血管形成指数は、VEGFアンタゴニストである S209.2-010 (配列番号 33) および Avastin (登録商標) ならびにポジティブグリッドの画分としての野生型涙りポカリンコントロールについて報告する。

20

【0172】

図33は、マウス中の A22 および A22-ABD についての薬物動態 (PK) パラメータの決定を示す。i.v. の後の涙りポカリン突然変異タンパク質 S236.1 A22 (配列番号 44) (4 mg/kg) および i.v. または i.p. 単一ボラス投与の後での ABD との突然変異タンパク質 S236.1 A22 の融合タンパク質 (配列番号 51) (5.4 mg/kg) についての薬物動態 (PK) パラメータ (半減期血漿濃度、生物学的利用率) を NMRI マウスで決定した。血漿は、事前に決めた時点で採取した末端血液試料から調製し、リポカリン突然変異タンパク質の濃度は ELISA によって決定した。結果は、WinNonlin ソフトウェア (Pharsight Corp., Mountain View, USA) を使用して分析した。T<sub>1/2</sub> A22 i.v. : 0.42 時間; T<sub>1/2</sub> A22-ABD i.v. : 18.32 時間; T<sub>1/2</sub> A22-ABD i.p. : 20.82 時間。融合タンパク質 A22-ABD の i.p. 投与の後での生物学的利用率は 82.5% であった。

30

【0173】

図34は、涙りポカリン突然変異タンパク質の全身投与を用いた血管透過性アッセイを示す。実験の12時間前に、試験物質またはコントロールをグループ当たり3匹の動物に静脈内に注射した。グループ1: PBS 媒体; グループ2: Avastin、10 mg/kg; グループ3: 突然変異タンパク質 S236.1 A22-ABD、6.1 mg/kg; グループ4: TLPC51: 6.1 mg/kg。時間 = 0 に、Evan's Blue を注射した。30分後に、4つの用量の VEGF (5、10、20、または 40 ng) を 3×4グリッド上に皮内に3通り注射した。VEGF注射の30分後に、動物を犠牲死させ、色素血管外遊出を、画像解析器 (Image Pro Plus 1.3, Media Cybernetics) の使用によって定量化した。

40

【0174】

図35は、腫瘍異種移植モデルでの本発明の突然変異タンパク質の効果を示す。照射 (2.5 Gy、Co<sup>60</sup>) スイスヌードマウスは、右側腹部中に、マトリゲル中の 1×10

50

7 A 6 7 3 横紋筋肉腫細胞 ( A T T C ) を皮下に接種した ( グループ当たり  $n = 12$  ) 。治療薬を腹腔内に投与し、同日に開始し、21日間継続した。グループ1: P B S 媒体、毎日; グループ2: A v a s t i n ( ベバシズマブ、G e n e n t e c h / R o c h e ) 、 $5 \text{ mg / kg}$ 、3日毎; グループ3: リポカリン突然変異タンパク質 A 2 2 - A B D ( 配列番号 5 1 ) 、毎日、 $3.1 \text{ mg / kg}$ ; グループ4: T L P C 5 1 、毎日、 $3.1 \text{ mg / kg}$ 。リポカリン突然変異タンパク質 A 2 2 - A B D の用量は、マウスでの A 2 2 - A B D P K データおよび抗体の推算された血清半減期に基づいて突然変異タンパク質および A v a s t i n の V E G F 結合部位の等モル数が一定に存在することを達成するように選んだ。腫瘍サイズはカリパスを用いて毎週2回測定し、腫瘍量は式 ( 長さ  $\times$  幅<sup>2</sup> ) / 2 によって推算した。腫瘍量が  $2,000 \text{ mm}^3$  を超過した場合に、マウスを犠牲死させた。

10

## 【 0 1 7 5 】

図 3 6 は、A 5 4 9 細胞を用いたエオタキシン - 3 分泌アッセイの結果を示す。A 5 4 9 細胞は、増加性の濃度の I L - 4 受容体アルファ結合突然変異タンパク質 S 1 9 1 . 4 B 2 4 ( 配列番号 4 ) の存在下または非存在下でそれぞれ  $0.7 \text{ nM}$  I L - 4 または  $0.83 \text{ nM}$  I L - 1 3 を用いて刺激した。エオタキシン - 3 分泌を、市販で入手可能なキットを使用して細胞培養上澄液中のエオタキシン 3 濃度を測定することによって72時間後に判定した。

## 【 0 1 7 6 】

図 3 7 は、増加性の濃度の I L - 4 受容体アルファ結合突然変異タンパク質 S 1 9 1 . 4 B 2 4 ( 配列番号 4 ) の存在下または非存在下での、48時間後の、刺激された末梢血単核細胞 ( P B M C ) 上での I L - 4 / I L - 1 3 誘発性の C D 2 3 発現を示す。全ヒト P B M C をバッフィーコートから単離した。増加性の濃度の I L - 4 受容体アルファ結合突然変異タンパク質 S 1 9 1 . 4 B 2 4 を添加し、細胞は、それぞれ  $1.0 \text{ nM}$  または  $2.5 \text{ nM}$  の最終濃度で I L - 4 または I L - 1 3 を用いて刺激した。48時間後、活性化された C D 2 3 発現 C D 1 4 + 単球は、フローサイトメトリーによって定量化した。

20

## 【 0 1 7 7 】

図 3 8 は、I L - 4 受容体アルファ結合突然変異タンパク質 S 1 9 1 . 4 B 2 4 ( 配列番号 4 ) の S c h i l d 分析の結果を示す。T F - 1 細胞の I L - 4 用量依存的増殖を、いくつかの固定濃度の I L - 4 受容体アルファ結合突然変異タンパク質 S 1 9 1 . 4 B 2 4 の存在下または非存在下で判定した ( 図 3 8 A ) 。得られた結果の S c h i l d 分析 ( 図 3 8 B ) から、 $192 \text{ pM}$  ( 線形回帰 ) および  $116 \text{ pM}$  ( 非線形回帰 ) の  $K_d$  を得た。

30

## 【 0 1 7 8 】

図 3 9 は、ヒト初代 B 細胞に対する、I L - 4 受容体アルファ結合突然変異タンパク質 S 1 9 1 . 4 B 2 4 ( 配列番号 4 ) の親和性判定の結果を示す。P B M C をヒト血液から単離し、異なる濃度の I L - 4 受容体アルファ結合ヒト涙リポカリン突然変異タンパク質 S 1 9 1 . 4 B 2 4 または野生型ヒト涙リポカリン ( T L P C 2 6 ) と共にインキュベートした。次いで、細胞は、抗 C D 2 0 - F I T C モノクローナル抗体およびビオチン化抗リポカリン抗血清、その後streptavidin - P E を用いて染色した。野生型リポカリンおよび I L - 4 受容体アルファ結合リポカリン突然変異タンパク質 S 1 9 1 . 4 B 2 4 についての結果を図 3 9 A および B にそれぞれ示す。P E ポジティブ B 細胞について決定した百分率をリポカリンの濃度に対してあてはめ ( 図 3 9 C ) 、 $E C_{50}$  を得られた曲線から算出した。I L - 4 受容体アルファ結合突然変異タンパク質 S 1 9 1 . 4 B 2 4 ( 配列番号 4 ) の  $E C_{50}$  は  $105 \text{ pM}$  として算出された。

40

## 【 0 1 7 9 】

図 4 0 は、静脈内、皮下、または気管内投与の後の、I L - 4 受容体アルファ結合突然変異タンパク質 S 1 9 1 . 4 B 2 4 の生物学的利用率試験の結果を示す。S p r a g u e - D a w l e y ラットは、示された経路を介して  $4 \text{ mg / kg}$  の、単一容量の突然変異タンパク質 S 1 9 1 . 4 B 2 4 を受けた。気管内投与はマイクロスプレー投薬デバイス

50

(Penn Century, USA)を用いて行った。血漿試料を所定の時点で得て、機能的活性突然変異タンパク質の残存濃度を決定するためにサンドイッチELISA分析にかけた。濃度は非コンパートメントPK分析によって分析した。生物学的利用率は皮下投与後に100%、気管内送達の後で13.8%であった。

【0180】

図41は、ヒト涙リポカリンwtと比較した、非PEG化またはPEG20、PEG30、もしくはPEG40を用いてPEG化した突然変異タンパク質S236.1-A22(配列番号44)の*in vitro*作用強度判定を示す。IC<sub>50</sub>値は、VEGF刺激HUVEC増殖アッセイでのそれぞれのヒト涙リポカリン突然変異タンパク質の滴定を介して決定し、増殖阻害を決定した。

10

【実施例】

【0181】

他に示されない限り、組換え遺伝子技術の確立された方法は、例えばSambrookら(前掲)に記載されるように使用した。

【0182】

(実施例1:  $2 \times 10^9$ 個の独立したT1c突然変異タンパク質を用いたライブラリーの生成)

高度に複雑な、涙リポカリン(T1c)のランダムライブラリーは、成熟野生型ヒト涙リポカリンの18個の選択されたアミノ酸位置26、27、28、29、30、31、32、33、34、56、57、58、80、83、104、105、106、および108の協奏的突然変異誘発によって調製した。このために、対応するコドンが標的様式でランダム化された遺伝子カセットを、先に記載された戦略に従って、2ステップで、縮重プライマーオリゴデオキシヌクレオチドを用いたポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を介して構築した(Skerra, A. (2001)「Anticalins»: a new class of engineered-ligand-binding proteins with antibody-like properties. J. Biotechnol. 74, 257~275)。このライブラリー設計では、涙リポカリンの野生型配列の最初の4つのN末端アミノ酸残基(HHLA)および最後の2つのC末端アミノ酸残基(SD)を欠失させた(この理由で、添付の配列リストに示されるすべての涙リポカリン突然変異タンパク質は、N末端残基として野生型配列のAla5およびC末端残基としてGly156を有する(例えば、後者はアフィニティータグに任意選択で融合される))。

20

30

【0183】

ランダムライブラリーの生成の第1のステップでは、T1cの第1および第2の露出ループについての、ランダム化コドンを含むPCR断片は、プライマーTL46(配列番号10)およびTL47(配列番号11)を使用して調製し、一方、T1cの第3および第4の露出ループについての、ランダム化コドンを含む他のPCR断片はプライマーTL48(配列番号12)およびTL49(配列番号13)を使用して並行して調製した。第2のステップでは、これらの2つのPCR断片は連結オリゴデオキシヌクレオチドを用いて組み合わせ、プライマーAN-14(配列番号14)、TL50bio(配列番号15)、およびTL51bio(配列番号16)を用いたPCR反応での鋳型として使用し、構築されたランダム化遺伝子カセットを得た。

40

【0184】

第1のステップについての2つのPCR反応(1aおよび1b)は、従来のホスホラミダイト法によって合成された50pmolの各ペアのプライマー(それぞれTL46およびTL47またはTL48およびTL49)と共に、鋳型として各反応につき10ng pTLP10プラスミドDNA(図1)を使用して100μlの容量でそれぞれ行った。さらに、反応混合物は10μl 10xTaq反応バッファー(100mM Tris/HCl pH9.0, 500mM KCl, 15mM MgCl<sub>2</sub>, 1% v/v TritonX-100)、および2μl dNTPミックス(10mM dATP、dCT

50

P、dGTP、dTTP)を含有した。水で容量を増した後、5u Taq DNAポリメラーゼ(5u/μl、Promega)を添加し、94で1分間、58で1分間、および72で1.5分間の20サイクルを加熱した蓋を有するプログラム可能なサーモサイクラー(Eppendorf)中で実行し、その後、完了させるために60での5分間のインキュベーションを続けた。それぞれ135bpおよび133bpの所望のサイズを有する増幅産物は、GTQアガロース(Roth)およびWizard DNA抽出キット(Promega)を使用して、調製用アガロースゲル電気泳動によって単離した。

#### 【0185】

第2のPCRステップについては、1000μl混合物を調製し、PCR反応1aなら  
びに1bからの約500fmolの両方の断片を、500pmolのそれぞれの側方プライ  
マーTL50bio(配列番号15)およびTL51bio(配列番号16)ならびに  
媒介プライマーAN-14(配列番号14)の10pmolの存在下で鋳型として使用し  
た。両方の側方プライマーはそれらの5'端にビオチン基を保有し、したがって、ストレ  
プトアビジンをコートした常磁性ビーズを介しての、不完全に消化された産物からの、B  
stXI開裂の後のPCR産物の分離を可能にした。さらに、反応ミックスは、100μ  
l 10xTaqバッファー、20μl dNTPミックス(10mM dATP、dC  
TP、dGTP、dTTP)、50u Taq DNAポリメラーゼ(5u/μl、Pr  
omega)、および反応ミックスの最終容量を1000μlとするための水含有した  
。混合物を100μlの一定分量に分け、PCRを、94での1分間、57での1分  
間、72での1.5分間の20サイクルを用いて行い、その後、60での5分間の最  
終インキュベーションを続けた。PCR産物はE.Z.N.A.Cycle-Pure  
Kit(PeqLab)を使用して精製した。

#### 【0186】

続くクローニングについては、核酸形態のTlc突然変異タンパク質のライブラリーの  
中央部を表すこの断片は、メーカーの指示に従って制限酵素BstXI(Promega)  
を用いて最初にカットし、次いで、上記に記載されるように調製用アガロースゲル電気  
泳動によって精製し、サイズが301塩基対の二重鎖DNA断片がもたらされた。

#### 【0187】

消化されていないまたは不完全に消化されたDNA断片は、ストレプトアビジンをコー  
トした常磁性ビーズ(Merck)を使用して、それらの5'ビオチンタグを介して除去  
した。このために、ストレプトアビジンをコートした常磁性粒子の市販で入手可能な懸濁  
液の150μl(10mg/mlの濃度)は、100μl TEバッファー(10mM  
Tris/HCl pH8.0、1mM EDTA)を用いて3回洗浄した。次いで、粒  
子は磁石の助けを借りて水気を切り、室温で15分間100μl TEバッファー中で7  
0pmolの消化されたDNA断片と混合した。次いで、常磁性粒子は磁石を用いてE  
ppendorf管の壁に収集し、精製され、十分に消化されたDNA断片を含有する上清  
を、次のライゲーション反応での使用のために回収した。

#### 【0188】

ベクターpTLPc27(図20)はメーカーの指示に従って制限酵素BstXI(P  
romega)を用いてカットし、得られた大きなベクター断片を、上記に記載されるよ  
うに調製用アガロースゲル電気泳動によって精製し、ベクターバックボーンを表す、サイ  
ズが3772塩基対の二重鎖DNA断片がもたらされた。

#### 【0189】

ライゲーション反応については、40pmolのPCR断片および40pmolのベク  
ター断片(pTLPc27)を、16で、48時間、10.76mlの全容量(50m  
M Tris/HCl pH7.8、10mM MgCl<sub>2</sub>、10mM DTT、1mM  
ATP、50μg/ml BSA)中で1074WeissユニットのT4 DNAリ  
ガーゼ(Promega)の存在下でインキュベートした。次いで、ライゲーション混合  
物中のDNAは、267μl酵母tRNA(H<sub>2</sub>O中10mg/mlの溶液(Roche

10

20

30

40

50

))、10.76 ml 5 M 酢酸アンモニウム、および42.7 ml エタノールを添加することにより1.5時間沈殿させた。沈殿の後、DNAペレットは70% EtOHを用いて洗浄し、次いで乾燥させた。終わりに、DNAは、538  $\mu$ lの水の全容量中200  $\mu$ g/mlの最終濃度まで溶解させた。

#### 【0190】

大腸菌株XL1-Blueのエレクトロコンピテント細菌細胞の調製(Bullockら、前掲)は、TungおよびChow(Trends Genet. 11(1995)、128~129)によってならびにHengen(Trends Biochem. Sci. 21(1996)、75~76)によって記載される方法に従って実行した。1 l LB培地(10 g/L Bactoトリプトン、5 g/L Bacto酵母抽出物、5 g/L NaCl、pH 7.5)を、XL1-Blueの一晩の培養物の添加によって、600 nmの $OD_{600} = 0.08$ の光学密度に合わせ、2 l Erlenmeyer(アーレンマイヤー)フラスコ中で140 rpmおよび26°Cでインキュベートした。 $OD_{600} = 0.6$ に達した後、培養物を氷上で30分間冷却し、続いて、4000 gおよび4°Cで15分間遠心分離した。細胞を500 ml 氷冷10% w/vグリセロールを用いて2回洗浄し、最後に、2 mlの氷冷GYT培地(10% w/vグリセロール、0.125% w/v酵母抽出物、0.25% w/vトリプトン)中に再度懸濁させた。次いで、細胞を等分し(200  $\mu$ l)、液体窒素中でショック凍結させ、-80°Cで保存した。

#### 【0191】

エレクトロポレーションは、4°Cで、Micro Pulserシステム(BioRad)を同じベンダーからのキュベットと共に用いて行った(電極距離2 mm)。ライゲーションしたDNA溶液(1  $\mu$ g DNAを含有する)の10  $\mu$ lの一定分量を、100  $\mu$ lの細胞懸濁液と混合し、最初に氷上で1分間インキュベートし、次いで、事前に冷やしたキュベットに移した。エレクトロポレーションは、5 msおよび12.5 kV/cmの電界強度のパラメーターを使用して行い、懸濁液を、そのすぐ後に2 ml 氷冷SOC培地(オートクレーブした20 g/L Bactoトリプトン、5 g/L Bacto酵母抽出物、10 mM NaCl、2.5 mM KCl、pH 7.5、エレクトロポレーションの前に、20 ml/L 20% グルコースを有する10 ml/L 1 M  $MgCl_2$ および1 M  $MgSO_4$ を添加した)中で希釈し、その後37°Cおよび140 rpmでの60分間のインキュベーションを続けた。その後、培養物は、100  $\mu$ g/mlクロラムフェニコールを含有する2 l 2xYT培地(16 g/L Bactoトリプトン、10 g/L Bacto酵母抽出物、5 g/L NaCl、pH 7.5)(2YT/Cam)中に希釈し、0.26の $OD_{550}$ がもたらされた。培養物は、 $OD_{550}$ が0.6ユニットさらに増すまで、37°Cでインキュベートした。

#### 【0192】

54回のエレクトロポレーションの実行で、合計107.6  $\mu$ gのライゲーションしたDNAを利用することによって、合計約 $2.0 \times 10^9$ 個の形質転換体を得た。形質転換体は、融合タンパク質としてT1c突然変異タンパク質のライブラリーをコードするファージミドの調製のためにさらに使用した。

#### 【0193】

ファージミドライブラリーの調製については、上記からの4 lの培養物を、 $1.3 \times 10^{12}$  pfu VCS-M13ヘルパーファージ(Stratagene)を用いて感染させた。45分間37°Cでの攪拌の後、インキュベーション温度を26°Cに下げた。10分間の温度平衡の後、25  $\mu$ g/lアンヒドロテトラサイクリンを、T1c突然変異タンパク質およびファージコートタンパク質の間の融合タンパク質の遺伝子発現を誘発するために添加した。ファージミド産生を26°Cで11時間可能にした。遠心分離による細菌の除去の後、ファージミドは、20% (w/v) ポリエチレングリコール8000(Fluka)、15% (w/v) NaClを用いて培養上清から2回沈殿させ、最後に、PBS(4 mM  $KH_2PO_4$ 、16 mM  $Na_2HPO_4$ 、115 mM NaCl)中に溶解させた。

## 【0194】

(実施例2：IL-4受容体アルファに対する親和性を有するT1c突然変異タンパク質のファージミド提示および選択)

ファージミドディスプレイおよび選択は、次の改変を有するWO2006/56464号の実施例2に記載されるように本質的に、実施例1から得られたファージミドを利用して行った：標的タンパク質(IL-4受容体アルファ、Peprotech)は200nMの濃度で利用し、ビオチン化タンパク質としてライブラリーに提示し、ストレプトアビジンビーズ(Dynal)を使用するファージ-標的複合体の捕捉を続けた。あるいは、標的タンパク質は、200nMの濃度でFc融合タンパク質(IL-4受容体アルファ-Fc、R&D Systems)として利用し、メーカーの指示に従って、プロテインG  
10  
ビーズ(Dynal)を使用するおよび抗ヒトFc捕捉抗体(Jackson Immuno Research)をコートしたイムノスティック(Nunc)上でのFc融合タンパク質の固定化によるファージ-標的複合体の捕捉を続けた。3または4回の選択を行った。

## 【0195】

(実施例3：ハイスループットELISAスクリーニングを使用するIL-4受容体アルファ特異的突然変異タンパク質の同定)

実施例2に従って選択された突然変異タンパク質のスクリーニングは、次の改変を有するWO2006/56464号の実施例3に記載されるように本質的に行った：発現ベクターはpTLP10(図1)とした。使用した標的タンパク質は、共に2μg/mlの  
20  
IL-4受容体アルファ-Fc(R&D Systems)およびIL-4受容体アルファ(Peprotech)とした。

## 【0196】

実施例2に記載されるように選択された5632個のクローンのスクリーニングは、2294個のプライマリーヒットの同定につながり、ライブラリーからの突然変異タンパク質の単離がうまく行われたことを示す。このアプローチを使用して、クローンS148.3  
3 J14(配列番号2)を同定した。S148.3 J14の配列はまた図2にも表す。

## 【0197】

(実施例4：エラープライムPCRを使用する突然変異タンパク質S148.3 J14  
30  
の親和性成熟)

突然変異タンパク質S148.3 J14(配列番号2)に基づいた変異体のライブラリーの生成は、オリゴヌクレオチドTL50bio(配列番号15)およびTL51bio(配列番号16)を使用して、WO2006/56464号の実施例5に記載されるように本質的に  
30  
行い、平均で構造遺伝子当たり3つの置換を有するライブラリーがもたらされた。

## 【0198】

ファージミド選択は実施例2に記載されるように実行したが、限られた標的濃度(IL-4受容体アルファの2nM、0.5nM、および0.1nM、Peprotech Ltd)、IL-4受容体アルファに対するアンタゴニストモノクローナル抗体との、洗浄時間の延長(MAB230、R&D Systems; 1時間の洗浄時間および2時間の洗浄時間)または短いインキュベーション時間(30秒間、1分間、および5分間)を利用した。3または4回の選択を行った。  
40

## 【0199】

(実施例5：部位特異的ランダムアプローチを使用する突然変異タンパク質S148.3 J14の親和性成熟)

突然変異タンパク質S148.3 J14(配列番号2)に基づいた変異体のライブラリーは、位置34、53、55、58、61、64、および66のランダム化によって設計し、これらの位置ですべての20種のアミノ酸を考慮した。ライブラリーは、デオキシヌクレオチドTL70(配列番号17)、TL71(配列番号18)、およびTL72(

10

20

30

40

50

配列番号19)をそれぞれTL46、TL47、およびAN-14の代わりに使用した改変を伴って、実施例1に記載されるように本質的に構築した。

#### 【0200】

ファージミド選択は、それぞれIL-4受容体アルファに対する競合的モノクローナル抗体との洗浄時間の延長(MAB230、R&D Systems; 1時間の洗浄)または短いインキュベーション時間(10分間)と組み合わせた限られた標的濃度(IL-4受容体アルファの0.5 nMおよび0.1 nM、Peprotech)を使用して、実施例2に記載されるように実行した。3または4回の選択を行った。

#### 【0201】

(実施例6:ハイスループットELISAスクリーニングを使用するIL-4受容体アルファ結合突然変異タンパク質の親和性スクリーニング)

スクリーニングは、3 nM IL-4受容体アルファ-Fc(R&D Systems)の濃度を使用したといった改変ならびにi)モノクローナル抗Strepタグ抗体(Qiagen)は産生された突然変異タンパク質を捕捉するためにELISAプレート上にコートし、涙りポカリンの捕捉された突然変異タンパク質に対するIL-4受容体アルファ-Fc(R&D Systems、3 nMおよび0.75 nM)の結合は、IL-4受容体アルファ-FcのFcドメインに対するHRP(ホースラディッシュペルオキシダーゼ)コンジュゲートポリクローナル抗体を使用して検出したといった追加を伴って、実施例3に記載されるように行った。さらに、代替スクリーニング設定では、ii)IL-4はELISAプレート上にコートし、IL-4受容体アルファ-Fc(R&D Systems、3 nM)は発現突然変異タンパク質と共にインキュベートし、非占有IL-4結合部位を有するIL-4受容体アルファ-Fcの結合は、IL-4受容体アルファ-FcのFcドメインに対するHRPコンジュゲートポリクローナル抗体を使用して検出した。

#### 【0202】

そのようなスクリーンからの結果を図3に表す。実施例4および5に記載されるように選択された多くの突然変異タンパク質は、親和性成熟のためのベースとして貢献した突然変異タンパク質S148.3 J14(配列番号2)と比較して、IL-4受容体アルファに対する改善された親和性を有するとして同定された。このアプローチを使用して、突然変異タンパク質S191.5 K12、S191.4 B24、S191.4 K19、S191.5 H16、S197.8 D22、およびS148.3 J14AM2C2(配列番号3~8)を同定した。S191.5 K12、S191.4 B24、S191.4 K19、S191.5 H16、S197.8 D22、およびS148.3 J14AM2C2の配列も図4に表す。

#### 【0203】

(実施例7:IL-4受容体アルファ結合突然変異タンパク質の産生)

IL-4受容体アルファ特異的突然変異タンパク質の調製用の産生については、発現ベクターpTLP10(図1)上にコードされたそれぞれの突然変異タンパク質を収容している大腸菌K12株JM83を、Schlehuber、S.ら(J.Mol.Biol.(2000)、297、1105~1120)に記載されるプロトコールに従ってLBアンピシリン培地中で2L振盪フラスコ培養物中で増殖させた。大量のタンパク質を必要とする場合、それぞれの発現ベクターを収容している大腸菌株W3110を、Schweck、W.およびSkerra、A.Proteins(1995)23、561~565)に記載されるプロトコールに基づいて、1lまたは10l管中でのベンチトップ発酵槽培養を介しての周辺質の産生のために使用した。

#### 【0204】

突然変異タンパク質は、Skerra、A.& Schmidt、T.G.M.(2000)(Use of the Strep-tag and streptavidin for detection and purification of recombinant proteins. Methods Enzymol. 326A、271~304)によって記載される手順に従って適切なベッド容量のカラムを使用してスト

10

20

30

40

50



レプトアビジンアフィニティークロマトグラフィーを介して単一ステップで周辺質の画分から精製した。高純度を達成し、あらゆる凝集した組換えタンパク質を除去するために、突然変異タンパク質のゲル濾過を、PBSバッファーの存在下でSuperdex 75 HR 10/30カラム(24mlベッド容量、Amersham Pharmacia Biotech)上で最後に実行した。単量体のタンパク質画分をプールし、SDS-PAGEによって純度を確認し、さらに生化学的キャラクタリゼーションに使用した。

【0205】

(実施例8：Biacoreを使用する親和性測定)

親和性測定は、約400RUのIL-4受容体アルファ-Fc(R&D Systems)を固定化し(WO2006/56464号で標的として使用される2000RUのヒトCTLA-4またはネズミCTLA-4-Fcの代わりに)、100µlの突然変異タンパク質を25nMの濃度で注射した(WO2006/56464号で使用される、5~0.3µMの濃度の、40µl試料精製リポカリン突然変異タンパク質の代わりに)といった改変を伴って、WO2006/56464号の実施例9に記載されるように本質的に行った。

10

【0206】

S148.3 J14、S191.5 K12、S191.4 B24、S191.4 K19、S191.5 H16、S197.8 D22、およびS148.3 J14 AM2C2を利用する親和性測定からの結果を図5~11に表し、表1に要約する。表1は、Biacoreによって決定される、IL-4受容体アルファに対する本発明の選択された突然変異タンパク質の親和性を示し、5回の実験の平均(標準の偏差)を示す。

20

【0207】

【表1】

クローン	親和性 Biacore(pM)	$k_{on}$ (1/Ms x 10 <sup>5</sup> )	$k_{off}$ (1/s x 10 <sup>-5</sup> )
S148.3 J14	37500	1.4	517
S191.5 K12	13.5 (2.9)	58 (27)	7.7 (3.3)
S148.3 AM2C2	17.9 (2.7)	23 (1.7)	4.2 (0.7)
S191.4 B24	19.3 (3.3)	26 (6.7)	4.9 (1.0)
S191.4 K19	20.1 (14)	17 (2.7)	3.6 (2.8)
S191.5 H16	24.3 (12)	17 (1.8)	4.1 (1.6)
S197.8 D22	55.8 (4.2)	11 (1.3)	6.3 (1.0)

30

【0208】

(実施例9：阻害ELISAを使用するIL-4のアンタゴニストの同定)

選択された突然変異タンパク質による、IL-4およびIL-4受容体アルファの間の相互作用の阻害を阻害ELISAで評価した。したがって、一定濃度のIL-4受容体アルファ(0.5nMビオチン化IL-4受容体アルファ、Peprotechまたは15nM IL-4受容体アルファ-Fc、R&D Systems)を希釈系列の涙リポカリン突然変異タンパク質とインキュベートし、非占有IL-4結合部位を有するIL-4受容体アルファの量を、プレートをIL-4またはアンタゴニスト抗IL-4受容体アルファモノクローナル抗体でコートしたELISAで定量化した。結合したビオチン化IL-4受容体アルファはHRPコンジュゲートExtravidin(Sigma)を使用して検出し、ビオチン化IL-4受容体アルファの規定量の標準曲線と比較した。S148.3 J14、S191.5 K12、S191.4 B24、S191.4 K19、S191.5 H16、S197.8 D22、およびS148.3 J14 AM2C2の突然変異タンパク質を利用する測定からの結果を図12~18に表し、表2に要約す

40

50

る。表2は、競合ELISAによって決定される、本発明の選択された涙りポカリン突然変異タンパク質のアンタゴニスト能力およびIL-4受容体アルファに対する親和性を示し、3回の実験の平均(標準の偏差)を示す。

【0209】

【表2】

クローン	親和性競合ELISA (pM)
S148.3 J14	17300
S191.5 K12	25.3 (9.9)
S148.3 AM2C2	40.7 (14.8)
S191.4 B24	49.2 (14)
S191.4 K19	120 (32)
S191.5 H16	61.7 (11.4)
S197.8 D22	140 (37)

10

【0210】

(実施例10: TF-1増殖アッセイを使用するIL-4およびIL-13のシグナル伝達のアンタゴニストの同定)

20

IL-4およびIL-13刺激TF-1細胞増殖アッセイを、Lefortらに記載されるように本質的に行った(Lefort S., Vita N., Reeb R., Caput D., Ferrara P. (1995) F E B S L e t t . 3 6 6 ( 2 ~ 3 ) , 1 2 2 ~ 1 2 6 ) 。 T F - 1 増殖アッセイからの結果を図19に表す、またその結果は、高度な親和性の変異体S191.5 K12、S191.4 B24、S191.4 K19、S191.5 H16、S197.8 D22、およびS148.3 J14 AM2C2がIL-4およびIL-13誘発性のシグナル伝達および増殖の強力なアンタゴニストであることを示す。

【0211】

30

(実施例11: ヒト涙りポカリンの抗IL-4受容体アルファ突然変異タンパク質はSTAT6媒介性の経路を阻害する)

TF-1細胞は、10%加熱不活性化ウシ胎仔血清、2 mM L-グルタミン、100 ユニット/ml ペニシリン、100 μg/ml ストレプトマイシンを含有し、2 ng/ml 組換えヒト顆粒球マクロファージコロニー刺激因子を補足したRPMI 1640中で培養した。細胞は、直径100 mmの組織培養皿中に20 ml 培地の全容量で5 × 10<sup>4</sup> 細胞/mlで接種し、分割し、2~3日毎にこの濃度で再接種し、5% CO<sub>2</sub>の加湿大気中で37 °Cで培養した。

【0212】

40

TF-1細胞を5分間1200 rpmで遠心分離によって収集し、1%加熱不活性化ウシ胎仔血清、2 mM L-グルタミン、100 ユニット/ml ペニシリン、および100 μg/ml ストレプトマイシン(RPMI-1% FCS)を含有するRPMI 1640中で5分間1200 rpmで遠心分離によって2回洗浄した。細胞を、RPMI-1% FCS中に1 × 10<sup>6</sup> 細胞/mlで再懸濁させ、24ウェルプレート中に1 mlで配置し、一晚培養した。翌日、TF-1細胞を、20 μg/mlのIL-4受容体アルファ特異的突然変異タンパク質またはネガティブコントロール突然変異タンパク質と共に1時間培養した。さらに、細胞の一定分量を、空気中5% CO<sub>2</sub>の加湿大気中で37 °Cで1時間培地のみで培養した。続いて、ヒト組換えIL-4またはIL-13を、それぞれ0.8 ng/mlまたは12 ng/mlの最終濃度で添加し、培養物を、空気中5% CO<sub>2</sub>の加湿大気中で37 °Cで10分間インキュベートした。

50

## 【0213】

細胞は、42  $\mu$ l の37%ホルムアルデヒド(1.5%の最終濃度)の添加によって室温(RT)で10分間固定し、5ml丸底ポリスチレンチューブ(BD Falcon)に移した。細胞を1%FCSを含有する2mlPBS(PBS-FCS)を用いて洗浄し、5分間1200rpmで遠心分離によってペレット化し、上清を捨てた。細胞は、勢いよくボルテックス(vortex)する間に500  $\mu$ l氷冷メタノールを添加することによって透過処理した。4での10分間のインキュベーションの後、細胞を2mlのPBS-FCSを用いて5分間1200rpmで遠心分離によって2回洗浄した。細胞は、100  $\mu$ lのPBS-FCS中に再懸濁させ、光から保護して、RTで30分間、20  $\mu$ lの抗リン酸化STAT-6フィコエリトリン(PE)標識抗体(クローンY641; BD Biosciences)を用いて染色した。最後に、細胞は、5分間1200rpmで遠心分離によって2mlのPBS-FCSを用いて2回洗浄し、500  $\mu$ lのPBS-FCS中で再懸濁させた。細胞は、FACScalibur血球計数器(BD Biosciences)を使用してフローサイトメトリーによって分析した。データは、少なくとも10000個のゲート細胞から収集した。

10

## 【0214】

TF-1細胞中でのIL-4およびIL-13媒介性のSTAT-6リン酸化を阻害するためのIL-4受容体アルファ特異的突然変異タンパク質S191.4 B24(配列番号5)およびS191.4 K19(配列番号6)の能力をフローサイトメトリーによって測定した。ゲートは、細胞サイズ(前方散乱; FSC)および細胞粒度(側方散乱; SSC)に基づいて、コントロールTF-1細胞(非刺激および非染色)を使用して、FL2値(チャンネル2 蛍光; PE強度)に基づいて99%のコントロール非染色集団を除外するために無処置細胞に設定した。非刺激細胞のさらなる一定分量を抗リン酸化STAT-6 PE標識抗体を用いて染色した。

20

## 【0215】

STAT-6リン酸化アッセイの結果は、IL-4受容体アルファ特異的突然変異タンパク質S191.4 B24およびS191.4 K19がTF-1細胞中でIL-4およびIL-13誘発性のSTAT-6リン酸化を著しく阻害するといったことを明らかに示す(データを表3に要約)。表3では、IL-4およびIL-13によってTF細胞中で誘発されたSTAT-6リン酸化を阻害するS191.4 B24およびS191.4 K19(配列番号5および6)の能力をフローサイトメトリーによって測定し、STAT-6リン酸化についてポジティブに染まったゲート細胞の百分率およびすべてのゲート細胞の中央値の蛍光強度(MFI)を表す。

30

## 【0216】

【表 3】

処理	ポジティブ%	MFI
非染色	1	3.8
染色 非刺激	6	5.8
IL-4	75	15.8
IL-13	77	16.4
pTLPC10 + IL-4(ネガティブコントロール)	72	13.1
pTLPC10 + IL-13 (ネガティブ コントロール)	84	18.6
S191.4 K19 + IL-4	6	4.9
S191.4 K19 + IL-13	8	5.0
S191.4 B24 + IL-4	6	4.8
S191.4 B24 + IL-13	11	5.5

10

## 【 0 2 1 7 】

(実施例 12 : 抗ヒト IL - 4 受容体アルファ突然変異タンパク質はカニクイザル末梢血リンパ球に対して交差反応する)

20

健常なヒトボランティアからの全血を 9 ml リチウムヘパリンチューブ中に Astra Zeneca (Macclesfield, UK) の臨床薬理部 (CPU) によって収集した。カニクイザル由来のヘパリン処理した全血の試料 (最低 2 匹の動物からプール) は、Harlan Sera-Lab (Bicester, UK) または Band K Universal Ltd (Hull, UK) から得た。

## 【 0 2 1 8 】

ヒトおよびカニクイザルの全血は、赤血球溶解バッファー (0.15 M NH<sub>4</sub>Cl、1.0 mM KHCO<sub>3</sub>、0.1 mM EDTA、pH 7.2 ~ 7.4) を用いて 1 : 5 に希釈し、反転した後で 10 分間室温でインキュベートした。細胞を 5 分間 1200 rpm で遠心分離し、上清を除去した。細胞を溶解バッファー中に再懸濁させ、上清がヘモグロビンを含有しなくなるまで手順を繰り返した。細胞は、血液の元の容量と同じ容量の凍結培地 (1 : 10、ジメチルスルホキシド : ウシ胎仔血清) 中に再懸濁させ、低温バイアルに移した。各バイアルは 1 ml の血液からの細胞を含有した。細胞を - 80 で一晩凍結させ、保管のために液体窒素に移した。

30

## 【 0 2 1 9 】

凍結した末梢血細胞を、37 で急速解凍し、FACS バッファー (PBS / 1% FCS) を用いて洗浄した。細胞ペレットは、FACS バッファー (1 ml バッファー / バイアル) 中に再懸濁させた。100 μl の一定分量を 96 ウェル丸底プレート中に置き、100 μl の FACS バッファーをウェルあたりに添加し、プレートを 4 で 5 分間 1200 rpm で遠心分離し、上清を捨てた。続いて、細胞を低い速度でボルテックスすることにより再懸濁させ、100 μl の希釈した一次抗体 (抗 CD 124 もしくは IgG 1 アイソタイプコントロール、eBioscience、10 μg / ml) または抗 IL - 4 受容体アルファ突然変異タンパク質 (10 μg / ml) を添加し、細胞を 30 分間氷上でインキュベートした。細胞を、100 μl FACS バッファーの添加および 4 での 5 分間の 1200 rpm での遠心分離によって一度洗浄し、上清を捨て、細胞を低い速度でボルテックスすることによって再懸濁させた。これは、細胞を洗浄するために 200 μl の FACS バッファーを使用してもう 2 回繰り返した。最後の遠心分離の後、細胞ペレットを、5 μg / ml の適切な二次抗体の 100 μl 中に再懸濁させ (ビオチン化抗ヒトリポカリン - 1 抗体 (R & D Systems) またはビオチン化ラット抗マウス IgG (

40

50

Insight Biotechnology Ltd))、細胞を30分間氷上でインキュベートした。細胞を、4 での5分間の1200rpmでの遠心分離によって100  $\mu$ lのFACSバッファ中で一度洗浄し、上清を捨て、細胞を低い速度でボルテックスすることによって再懸濁させた。2回のさらなる洗浄を、200  $\mu$ lのFACSバッファおよび4 での5分間の1200rpmでの遠心分離を使用して行った。最後の遠心分離の後、細胞ペレットは、100  $\mu$ lの検出試薬(フィコエリトリン[PE]標識ストレプトアビジン(eBioscience); 1.25  $\mu$ g/ml)中に再懸濁させ、暗中で氷上で30分間インキュベートした。先のような3回のさらなる洗浄ステップの後、細胞を、200  $\mu$ l FACSバッファ中に採取し、40  $\times$  6mm試験管に移し、FACS Calibur血球計算器を使用してフローサイトメトリーによって分析した。コントロール細胞は非染色とした。非染色コントロール細胞を使用して、無処置リンパ球細胞のゲートを細胞サイズ(前方散乱; FSC)および細胞粒度(側方散乱; SSC)に設定した(Chrest, F. J.ら(1993). Identification and quantification of apoptotic cells following anti-CD3 activation of murine G0 T cells. Cytometry 14: 883~90)。この領域は同日に分析した試料の間で変更しなかった。マーカーは、コントロール非染色集団でのFL2(チャンネル2 蛍光; PE強度)値に基づいて、IL-4受容体アルファ<sup>+</sup>およびIL-4受容体アルファ<sup>-</sup>集団を区別するために設けた; マーカー1(M1)IL-4R<sup>+</sup>細胞は非染色集団の99%の排除に基づいて設定した。各試料について、少なくとも1  $\times$  10<sup>4</sup>個の細胞からのデータを取得した。

10

20

## 【0220】

突然変異タンパク質S191.5 K12、S.148.3 J14-AM2C2、S.191.4 B24、S.191.4 K19、およびS.197.8 D22(配列番号3~6および8)は、カニクイザルリンパ球に対して高度なレベルで結合することを表し、IL-4受容体アルファ<sup>+</sup>細胞は61%および80%の間で変動し、MFI値は6.0および9.2の間で変動した(表2)。変異体S.191.5 H16(配列番号7)もカニクイザルリンパ球に特異的に結合するが、残りの突然変異タンパク質と比較して親和性は低下する(41%IL-4受容体アルファ<sup>+</sup>細胞; MFI値4.1)。

## 【0221】

並行して、これらのIL-4受容体アルファ特異的突然変異タンパク質が1人のヒトドナーからの末梢血リンパ球に結合する能力もフローサイトメトリーによって分析した。すべての抗IL-4受容体アルファ突然変異タンパク質は、pTLP C10ネガティブコントロールについて観察されたレベルよりもかなりより高度なレベルでヒト細胞に結合することを示した。IL-4受容体アルファ<sup>+</sup>細胞は60%および76%の間で変動し、MFI値は7.4および9.7の間で変動した。pTLP C10ネガティブコントロールを用いて染色した細胞は低レベルの非特異的結合を表し、9%の細胞がIL-4受容体アルファ<sup>+</sup>として記録され、MFI値は3.2であった。突然変異タンパク質S191.5 K12、S.191.4 B24、およびS.191.4 K19(配列番号 3、5、および6)は、第2のヒトドナーの末梢血リンパ球に対して類似する結合親和性を表した(データ示さず)。表4は、フローサイトメトリーによって分析した、IL-4受容体アルファ特異的突然変異タンパク質がヒトおよびカニクイザルの末梢血リンパ球に結合する能力を示し、IL-4受容体アルファについてポジティブに染まったゲート細胞の百分率およびすべてのゲート細胞の中央値の蛍光強度(MFI)を示す。

30

40

## 【0222】

【表 4】

処理	ヒト末梢血細胞		カニクイザル末梢血細胞	
	ポジティブ%	MFI	ポジティブ%	MFI
非染色	1	2.4	1	1.7
pTLPC10 (ネガティブ コントロール)	9	3.2	5	1.9
S.191.4 K19	72	8.9	65	6.6
S.191.5 K12	74	9.7	78	9.0
S.191.4 B24	74	9.3	80	9.2
S.148.3 J14-AM2C2	76	9.6	68	6.8
S.191.5 H16	72	9.0	42	4.1
S.197.8 D22	72	9.3	70	7.1

10

## 【0223】

(実施例13: ヒトVEGFに対する親和性を有するT1c突然変異タンパク質のファージミド提示および選択)

20

実施例1から得られたファージミドを利用するファージミドディスプレイおよび選択は、次の改変を伴って、実施例2に記載されるように本質的に行った: 標的タンパク質、つまりヒトVEGF-Aの組換え断片(VEGF<sub>8-109</sub>、成熟ポリペプチド鎖のアミノ酸8~109)を200nMの濃度で利用し、ビオチン化タンパク質としてファージミドライブラリーに提示し、メーカーの指示に従ってストレプトアビジンビーズ(Dynal)を使用するファージ-標的複合体の捕捉を続けた。4回の選択を行った。

## 【0224】

標的タンパク質は、発現ベクターpET11c(Novagen)中へのヒトVEGF A(SWISS PROTデータバンク受入番号P15692)の成熟ポリペプチド鎖のアミノ酸8~109をコードする核酸を導入することによって得た。したがって、BamHIおよびNdeIの制限部位を、ヒトVEGF断片のcDNAの3'および5'端にそれぞれ導入し、VEGF遺伝子断片のサブクローニングに使用した。

30

## 【0225】

大腸菌BL21(DE3)を結果として生じる発現プラスミドを用いて形質転換し、VEGF<sub>8-109</sub>の細胞質内産生は、37°Cでの3時間のIPTGを有するアンピシリン含有LB培地中での発現培養物の誘発の後で達成した。20分間の5000gでの遠心分離の後、細胞ペレットを培養ブロスの各2Lについて200mL PBS中に再懸濁させ、一晩にわたる20°Cでのインキュベーション前に10分間5000gでさらに遠心分離した。500mL培養ブロスから得た各細胞ペレットを20mL 20mM Tris-HCl(pH7.5)、5mM EDTA中に再懸濁させ、10秒間4回、氷上で超音波処理した。4°Cでの10000gでの10分間の遠心分離の後に、封入体は、15mLの事前に冷やしたIBバッファー(2M尿素、20mM Tris-HCl(pH7.5)、0.5M NaCl)を用いて可溶化し、超音波処理し、上記のように遠心分離した。その後、細胞ペレットは20mL IBバッファーを用いて可溶化し、25mL可溶化バッファー(7.5M尿素、20mM Tris-HCl(pH7.5)、4mM DTT)中での可溶化前に上記のようにさらに遠心分離した。細胞懸濁液は外界温度で2時間攪拌し、4°Cで15分間40000gで遠心分離し、組換えVEGFを含有する上清を濾過した(0.45μm)。リフォールディングは、5Lバッファー1(20mM Tris-HCl(pH8.4)、400mM NaCl、1mMシステイン)に対して一晩にわ

40

50

たる外界温度での透析(3.5 kDa分子量カットオフ)、その後続く5 lバッファ-2(20 mM Tris-HCl (pH 8.4)、1 mMシステイン)に対する透析および5 lバッファ-3(20 mM Tris-HCl (pH 8.4))を用いた2回の続く透析ステップによって達成された。遠心分離(40000 g、20分間、4 )および濃縮の後、組換えVEGF断片は、続くイオン交換クロマトグラフィー(Q-Sepharose)およびサイズ排除クロマトグラフィー(Superdex 75)による標準の方法論に従って精製した。

**【0226】**

(実施例14:ハイスループットELISAスクリーンを使用する、VEGF結合突然変異タンパク質の同定)

実施例13で得られたT1c突然変異タンパク質のスクリーニングは、実施例11から得た組換え標的タンパク質VEGF<sub>8-109</sub>を5 μg/mlで利用し、マイクロタイタープレートに直接コートしたといった改変を伴って、実施例3に記載されるように本質的に行った。合計して2124個のクローンのスクリーニングは、972個の初代ヒットの同定につながり、ライブラリーからの突然変異タンパク質の単離がうまく行われたことを示す。このアプローチを使用して、T1c突然変異タンパク質S168.4-L01(配列番号26)を同定した。

**【0227】**

(実施例15:エラーブローンPCRを使用するT1c突然変異タンパク質S168.4-L01の親和性成熟)

突然変異タンパク質S168.4-L01に基づいた変異体のライブラリーの生成は、オリゴヌクレオチドTL50bio(配列番号15)およびTL51bio(配列番号16)を使用して、実施例4に記載されるように本質的に行い、平均で構造遺伝子当たり5つの置換を有するライブラリーがもたらされた。

**【0228】**

ファージミド選択は、限られた標的濃度(10 nM、1 nM、および0.2 nM VEGF<sub>8-109</sub>)または標的濃度の制限を伴うもしくは伴わない(10 nM、100 nM)短いインキュベーション時間(1および5分間)を使用して、実施例13に記載されるように実行した。4回の選択を行った。

**【0229】**

(実施例16:ハイスループットELISAスクリーンを使用するVEGF結合突然変異タンパク質の親和性スクリーニング)

実施例15で選択された突然変異タンパク質のスクリーニングは、モノクローナル抗T7タグ抗体(Novagen)は産生された突然変異タンパク質を捕捉するためにELISAプレート上にコートし、捕捉されたT1c突然変異タンパク質に対するビオチン化VEGF<sub>8-109</sub>(500 nMおよび50 nM)の結合はHRPコンジュゲートExtravidinを使用して検出したといった改変を伴って、実施例14に記載されるように行った。

**【0230】**

多くのクローンは、親和性成熟のためのベースとして貢献した突然変異タンパク質S168.4-L01と比較して、改善された親和性を有するとして同定された。このアプローチを使用して、クローンS209.2-C23、S209.2-D16、S209.2-N9、S209.6-H7、S209.6-H10、S209.2-M17、S209.2-O10(配列番号27~33)を同定した。

**【0231】**

(実施例17:VEGF結合突然変異タンパク質の産生)

産生は実施例7に記載されるように本質的に行った。

**【0232】**

(実施例18:Biacoreを利用するVEGF特異的突然変異タンパク質の親和性決定)

10

20

30

40

50

親和性測定値は、約250RUの組換えVEGFが標準のアミンの化学的性質を使用してセンサーチップに直接つながれた改変を伴って、実施例8に記載されるように本質的に行った。実施例15から得た40 $\mu$ lのT1c突然変異タンパク質を400nMの濃度で注入した。

【0233】

突然変異タンパク質S209.2-C23、S209.2-D16、S209.2-N9、S209.6-H7、S209.6-H10、S209.2-M17、およびS209.2-O10（配列番号27~33）の親和性決定からの結果を表5に要約する。表5は、25でのBiacore測定によって決定される、VEGFに対する本発明の選択された突然変異タンパク質の親和性を示す。

10

【0234】

【表5】

クローン	$k_{on}$ [10 <sup>4</sup> 1/Ms]	$k_{off}$ [10 <sup>-5</sup> 1/s]	親和性 [nM]
S209.2-C23	3.6	1.3	0.37
S209.2-D16	3.8	3	0.79
S209.2-N9	5.9	7.1	1.2
S209.6-H7	6.4	4.4	0.68
S209.6-H10	4.6	4.4	0.97
S209.2-M17	2.8	2.0	0.72
S209.2-O10	3.2	0.67	0.21

20

【0235】

（実施例19：阻害ELISAを使用するVEGFのアンタゴニストの同定）

VEGFおよびVEGF受容体2（VEGF-R2）の間の相互作用の阻害を阻害ELISAで評価した。このために、一定濃度のビオチン化VEGF<sub>8-109</sub>（1nM）を希釈系列のそれぞれのT1c突然変異タンパク質とインキュベートし、非占有VEGF-R2結合部位を有するVEGFの量を、VEGF/VEGF-R2相互作用に干渉する抗VEGF抗体（MAB293、R&D Systems）をコートしたELISAで定量化した。結合したVEGFはHRPコンジュゲートExtravidin（Sigma）を使用して検出し、VEGFの規定量の標準曲線と比較した。突然変異タンパク質S209.2-C23、S209.2-D16、S209.2-N9、S209.6-H7、S209.6-H10、S209.2-M17、およびS209.2-O10（配列番号27~33）を利用する測定からの結果を表6に要約する。表6は、競合ELISAによって決定される、本発明の選択された涙りポカリン突然変異タンパク質のアンタゴニスト能力およびVEGFに対する親和性を示す。

30

40

【0236】



【表 6】

クローン	親和性競合 ELISA
	Ki [nM]
S209.2-C23	2.3
S209.2-D16	3.9
S209.2-N9	2.8
S209.6-H7	2.4
S209.6-H10	1.3
S209.2-M17	2.0
S209.2-O10	0.83

10

## 【0237】

(実施例20: HUVEC増殖アッセイを使用するVEGFアンタゴニストの同定)

VEGFおよびFGF-2刺激HUVEC細胞増殖の阻害は、次の改変を伴って、以前に記載されるように本質的に判定した(Korherr C., Gillet H, Schaffer R., Koenig-Hoffmann K., Dixelius J., Egland K.A., Pastan I., およびBrinkmann U. (2006) Proc. Natl. Acad. Sci (USA) 103(11)4240~4245): HUVEC細胞(Promocell)はメーカーの推奨に従って成長させ、継代2および6の間に使用した。1日目、1,400個の細胞を完全培地(Promocell)中に接種した。翌日、細胞を洗浄し、0.5% FCS、ヒドロコルチゾン、およびゲンタマイシン/アンホテリシンを含有するが他の栄養剤を含有しない基本培地(Promocell)を添加した。VEGF特異的突然変異タンパク質S209.2-C23、S209.2-D16、S209.2-N9、S209.6-H7、S209.6-H10、S209.2-M17、S209.2-O10(配列番号27~33)、野生型涙リポカリン(pTLP C10の遺伝子産物;コントロール)、またはVEGF特異的治療モノクローナル抗体Avastin(登録商標)(Roche;コントロール)を3通りのウェル中に示す濃度で希釈系列で添加し、30分後、ヒトVEGF165(R&D Systems)またはヒトFGF-2(Reliatech)を添加した。細胞の生存率を、メーカーの指示に従ってCell Titer 96 Aqueous One(Promega)を用いて6日後に判定した。

20

30

## 【0238】

突然変異タンパク質S209.2-C23、S209.2-D16、S209.2-N9、S209.6-H7、S209.6-H10、S209.2-M17、およびS209.2-O10(配列番号27~33)を利用する測定からの結果を図21に示す。本発明のすべての突然変異タンパク質は、HUVEC細胞のVEGF誘発性の増殖の著しい阻害を示し、これはAvastin(登録商標)誘発性の阻害に匹敵するまたはそれよりも優れているが、野生型涙リポカリンはVEGF誘発性の細胞増殖を阻害しない。FGF-2誘発性細胞増殖は、VEGF特異的突然変異タンパク質、TLP C10、またはAvastin(登録商標)のうちのいずれによっても影響を与えられない(示さず)。

40

## 【0239】

(実施例21: VEGF-R2に対するTlc突然変異タンパク質のファージミド提示および選択)

実施例1から得られたファージミドを利用するファージミドディスプレイおよび選択は、次の改変を伴って、実施例2に記載されるように本質的に行った: 標的タンパク質VE

50

GF-R2-Fc (R&D Systems) を 200 nM の濃度で利用し、Fc 融合タンパク質としてライブラリーに提示し、メーカーの指示に従ってプロテイン G ビーズ (Dyna1) を使用するファージ-標的複合体の捕捉を続けた。4 回の選択を行った。

【0240】

(実施例 22: ハイスループット ELISA スクリーンを使用する VEGF-R2 結合突然変異タンパク質の同定)

スクリーニングは、標的タンパク質 VEGF-R2-Fc (R&D Systems) を 2.5 µg/ml の濃度で使用したといった改変を伴って実施例 3 に記載されるように本質的に行った。

【0241】

実施例 21 に記載される手順から得られた 1416 個のクローンのスクリーニングは、593 個のプライマリーヒットの同定につながり、本発明のライブラリーからの突然変異タンパク質の単離がうまく行われたことを示す。このアプローチを使用して、突然変異タンパク質 S175.4 H11 (配列番号 34) を同定した。

【0242】

(実施例 23: エラーブローン PCR を使用する VEGF-R2 特異的突然変異タンパク質 S175.4 H11 の親和性成熟)

突然変異タンパク質 S175.4 H11 に基づいた変異体のライブラリーの生成は、オリゴデオキシヌクレオチド TL50bio (配列番号 15) および TL51bio (配列番号 16) を使用して、実施例 4 に記載されるように本質的に行い、平均で構造遺伝子当たり 2 つの置換を有するライブラリーがもたらされた。

【0243】

ファージミド選択は、限られた標的濃度 (VEGF-R2-Fc の 5 nM、1 nM、および 0.2 nM)、競合組換え VEGF<sub>8-109</sub> (100 nM) の存在下での洗浄時間の延長 (1 時間)、または標的濃度の制限を伴うもしくは伴わない (10 nM、100 nM) 短いインキュベーション時間 (2 および 5 分間) を使用して実施例 21 に記載されるように実行した。4 回の選択を行った。

【0244】

(実施例 24: ハイスループット ELISA スクリーンを使用する VEGF-R2 結合突然変異タンパク質の親和性スクリーニング)

スクリーニングは、モノクローナル抗 T7 タグ抗体 (Novagen) を産生された T1c 突然変異タンパク質を捕捉するために ELISA プレート上にコートし、捕捉された突然変異タンパク質への VEGF-R2-Fc (R&D Systems、3 nM および 1 nM) の結合を VEGF-R2-Fc の Fc ドメインに対する HRP コンジュゲート抗体を使用して検出したといった改変を伴って、実施例 3 に記載されるように行った。

【0245】

多くのクローンは、親和性成熟のためのベースとして貢献した突然変異タンパク質 S175.4 H11 と比較して、改善された親和性を有するとして同定された。このアプローチを使用して、クローン S197.7-N1、S197.2-I18、S197.2-L22、S197.7-B6、および S197.2-N24 (配列番号 35~39) を同定した。

【0246】

(実施例 25: VEGF-R2 結合突然変異タンパク質の産生)

産生は実施例 7 に記載されるように本質的に行った。

【0247】

(実施例 26: Biacore を使用する VEGF-R2 特異的突然変異タンパク質の親和性決定)

親和性測定は、約 500 RU の VEGF-R2-Fc (R&D Systems) を捕捉したといった改変を伴って実施例 8 に記載されるように本質的に行い、80 µl の突然変異タンパク質を 1.5 µM の濃度で注入した。

10

20

30

40

50

## 【 0 2 4 8 】

S 1 7 5 . 4 - H 1 1、S 1 9 7 . 7 - N 1、S 1 9 7 . 2 - I 1 8、S 1 9 7 . 2 - L 2 2、S 1 9 7 . 7 - B 6、およびS 1 9 7 . 2 - N 2 4（配列番号35～39）を利用する測定からの結果を表7に要約する。表7は、B i a c o r e測定によって決定される、V E G F - R 2に対する本発明の選択された突然変異タンパク質の親和性を示す。

## 【 0 2 4 9 】

## 【表7】

クローン	$k_{on}$	$k_{off}$	親和性
	$[10^4 \text{ 1/Ms}]$	$[10^{-5} \text{ 1/s}]$	$[\text{nM}]$
S175.4-H11	0.9	36	35
S197.7-N1	2.1	11	5.5
S197.2-I18	2.7	8.3	3.1
S197.2-L22	1.2	2.4	3.3
S197.7-B6	2.3	13	6
S197.2-N24	2.4	6.4	2.7

10

## 【 0 2 5 0 】

（実施例27：阻害ELISAを使用するVEGFのアンタゴニストの同定）

VEGF-R2特異的突然変異タンパク質による、VEGFおよびVEGF-R2の間の相互作用の阻害を阻害ELISAで評価した。したがって、一定濃度のVEGF-R2（4 nM VEGF-R2-Fc、R & D Systems）を希釈系列のそれぞれの突然変異タンパク質とインキュベートし、非占有VEGF結合部位を有するVEGF-R2の量をVEGF<sub>8-109</sub>をコートしたELISAで定量化した。結合したVEGF-R2はHRPコンジュゲート抗ヒトFc抗体（Dianova）を使用して検出し、VEGF-R2-Fcの特定量の標準曲線と比較した。S 1 7 5 . 4 - H 1 1、S 1 9 7 . 7 - N 1、S 1 9 7 . 2 - I 1 8、S 1 9 7 . 2 - L 2 2、S 1 9 7 . 7 - B 6、およびS 1 9 7 . 2 - N 2 4（配列番号35～39）の測定からの結果を表8に要約する。表8は、競合ELISAによって決定される、本発明の選択された涙りポカリン突然変異タンパク質のアンタゴニスト能力およびVEGF-R2に対する親和性を示す。

20

30

## 【 0 2 5 1 】

## 【表8】

クローン	親和性競合 ELISA
	$K_i$ [nM]
S175.4-H11	12.9
S197.7-N1	12
S197.2-I18	5.5
S197.2-L22	3.5
S197.7-B6	3.8
S197.2-N24	2.3

40

50

## 【0252】

(実施例28：ポリエチレングリコール(PEG)を用いた、IL-4受容体アルファ特異的突然変異タンパク質の部位特異的修飾)

不對システイン残基は、活性化PEGとつなぐための反応基を提供するために、IL-4受容体アルファ特異的突然変異タンパク質S148.3 J14(配列番号2)の位置131のアミノ酸Gluの代わりに点突然変異(point mutation)によって導入した。遊離Cys残基を保有する組換え突然変異タンパク質を、実施例7に記載されるように大腸菌中で続いて産生した。

## 【0253】

PEGとの突然変異タンパク質S148.3 J14のつながりについては、5.1mgポリエチレングリコールマレイミド(平均分子量20kDa、線状炭素鎖;NOF)をPBS中で3mgのタンパク質と混合し、外界温度で3時間攪拌した。反応は、85μMの最終濃度までのベータ-メルカプトエタノールの添加によって停止した。10mM Tris-HCl(pH7.4)に対する透析の後、反応混合物をHiTrap Q-XL Sepharose カラム(Amersham)にかけ、通過した物を捨てた。PEG化突然変異タンパク質は、0mM~100mMのNaClの直線塩勾配にかけながら溶出し、未反応タンパク質から分離した。

## 【0254】

(実施例29：Biacoreを使用する、PEG化突然変異タンパク質S148.3 J14の親和性測定)

親和性測定は、約500RUのIL-4受容体アルファ-Fc(R&D Systems)を固定化し、80μlの精製されたPEG化突然変異タンパク質を200nM、67nM、および22nMの濃度で注入したといった改変を伴って、実施例8に記載されるように本質的に行った。測定の結果を図22に表し、表9に要約する。そのPEG化形態(約30nM)の突然変異タンパク質S148.3 J14の親和性は、PEG化されていない突然変異タンパク質(約37nM、実施例8を参照されたい)と比較してほとんど不変である。表9は、Biacoreによって決定される、IL-4受容体アルファに対する本発明のPEG化突然変異タンパク質S148.3 J14の親和性を示す。

## 【0255】

## 【表9】

クローン	$k_{on}$	$k_{off}$	親和性
	$[10^5 \text{ 1/Ms}]$	$[10^{-3} \text{ 1/s}]$	$[\text{nM}]$
S148.3 J14-PEG	1.64	4.93	30

## 【0256】

(実施例30：部位特異的ランダムアプローチを使用する突然変異タンパク質S209.6-H10の親和性成熟)

突然変異タンパク質S209.6-H10(配列番号30)に基づいた変異体のライブラリーは、位置26、69、76、87、89、および106のランダム化によって設計し、これらの位置ですべての20種のアミノ酸を考慮した。ライブラリーは、デオキシヌクレオチドTL107(カバー位置26)、TL109(カバー位置87および89)、TL110(カバー位置106)、ならびにTL111(カバー位置69および76)を、TL46、TL47、TL48、ならびにTL49の代わりにそれぞれ使用したといった改変を伴って、実施例1に記載されるように本質的に構築した。ファージミド選択は、限られた標的濃度(VEGF<sub>8-109</sub>の10pMおよび2pMおよび0.5pM)を使用してまたはVEGFに対する競合的モノクローナル抗体(Avastin(登録商標))と組み合わせて、実施例13に記載されるように本質的に実行した。4回の選択を行った。

T L 1 0 7 ( 配 列 番 号 4 0 ) : G A A G G C C A T G A C G G T G G A C N N S G G C  
G C G C T G A G G T G C C T C

T L 1 0 9 ( 配 列 番 号 4 1 ) : G G C C A T C G G G G G C A T C C A C G T G G C A  
N N S A T C N N S A G G T C G C A C G T G A A G G A C

T L 1 1 0 ( 配 列 番 号 4 2 ) : C A C C C C T G G G A C C G G G A C C C C S N N C  
A A G C A G C C C T C A G A G

T L 1 1 1 ( 配 列 番 号 4 3 ) : C C C C C G A T G G C C G T G T A S N N C C C C G  
G C T C A T C A G T T T S N N C A G G A C G G C C C T C A C C T C

【 0 2 5 7 】

( 実 施 例 3 1 : ハ イ ス ル ー プ ッ ト E L I S A ス ク リ ー ニング を 使 用 す る V E G F 結 合 突 然  
変 異 タ ン パ ク 質 の 親 和 性 ス ク リ ー ニング ) 10

ス ク リ ー ニング は、 1 μ g / m l V E G F の 濃 度 を 使 用 し た と い っ た 修 飾 な ら び に

i ) モ ノ ク ロ ー ナ ル 抗 T 7 タ グ 抗 体 ( N o v a g e n ) は 産 生 さ れ た 突 然 変 異 タ ン パ ク  
質 を 捕 捉 す る た め に E L I S A プ レ ー ト 上 に コ ー ト し、 涙 リ ポ カ リ ン の 捕 捉 さ れ た 突 然 変  
異 タ ン パ ク 質 へ の ビ オ チ ン 化 V E G F ( 3 n M お よ び 1 n M ) の 結 合 は H R P ( ホ ー ス ラ  
デ ィ ッ シ ュ ペ ル オ キ シ ダ ー ゼ ) コ ン ジ ュ ゲ ー ト e x t r a v i d i n を 使 用 し て 検 出 し た  
と い っ た 追 加 を 伴 っ て、 実 施 例 1 4 に 記 載 さ れ る よ う に 行 っ た。 さ ら に、 代 替 ス ク リ ー  
ニ ング 設 定 で は、

i i ) ヒ ト V E G F <sub>8-109</sub> の 代 わ り に、 マ ウ ス V E G F <sub>164</sub> ( R & D S y s t  
e m s ) を マ イ ク ロ タ イ タ ー プ レ ー ト ( 1 μ g / m l ) に 直 接 コ ー ト し た。 20

i i i ) V E G F 結 合 突 然 変 異 タ ン パ ク 質 を 含 有 す る 抽 出 物 を 1 時 間 で 6 0 ° C に 加 熱 し  
た。

i v ) m A B 2 9 3 ( R & D S y s t e m s、 5 μ g / m l ) を E L I S A プ レ ー ト  
上 に コ ー ト し、 ビ オ チ ン 化 V E G F <sub>8-109</sub> を 発 現 突 然 変 異 タ ン パ ク 質 と プ レ イ ン キ ュ  
ベ ー ト し た。 m A B 2 9 3 へ の V E G F <sub>8-109</sub> の 結 合 は、 H R P ( ホ ー ス ラ デ ィ ッ シ  
ュ ペ ル オ キ シ ダ ー ゼ ) コ ン ジ ュ ゲ ー ト e x t r a v i d i n を 使 用 し て 検 出 し た。

【 0 2 5 8 】

多 くの ク ロ ー ン は、 親 和 性 成 熟 の た め の ベ ー ス と し て 貢 献 し た 突 然 変 異 タ ン パ ク 質 S 2  
0 9 . 6 - H 1 0 と 比 較 し て、 改 善 さ れ た 親 和 性 を 有 す る と し て 同 定 さ れ た。 こ の ア プ ロ  
ー チ を 使 用 し て、 ク ロ ー ン S 2 3 6 . 1 - A 2 2、 S 2 3 6 . 1 - J 2 0、 S 2 3 6 . 1  
- M 1 1、 お よ び S 2 3 6 . 1 - L 0 3 ( 配 列 番 号 4 4 ~ 4 7 ) を 同 定 し た。 30

【 0 2 5 9 】

こ れ に 関 連 し て、 本 発 明 の 突 然 変 異 タ ン パ ク 質 中 の 涙 リ ポ カ リ ン の 最 初 の 4 つ の ア ミ  
ノ 酸 の 欠 失 の た め に、 ア ミ ノ 酸 配 列 は、 涙 リ ポ カ リ ン の 委 託 さ れ た 野 生 型 涙 リ ポ カ リ ン 配 列  
の 配 列 位 置 5 ( ア ラ ニ ン ) か ら 開 始 し て 表 さ れ、 こ の た め A 1 a 5 が N 末 端 ア ミ ノ 酸 と し  
て 表 さ れ る こ と に 注 目 さ れ た い。 さ ら に、 野 生 型 涙 リ ポ カ リ ン の C 末 端 ア ミ ノ 酸 A s p 1  
5 8 は ア ラ ニ ン 残 基 と 交 換 さ れ る ( 配 列 番 号 4 4 ~ 4 7 の 残 基 1 5 4、 配 列 番 号 2 6 ~ 4  
0 等 の 本 発 明 の 他 の 突 然 変 異 タ ン パ ク 質 も 参 照 さ れ た い )。 さ ら に 実 施 例 1 の ナ イ ー ブ ラ  
イ ブ ラ リ ー の 構 築 の た め に 涙 リ ポ カ リ ン の C 末 端 に 融 合 さ れ る S T R E P - T A G ( 登 録  
商 標 ) I I を 有 す る 突 然 変 異 タ ン パ ク 質 S 2 3 6 . 1 - A 2 2、 S 2 3 6 . 1 - J 2 0、 40  
S 2 3 6 . 1 - M 1 1、 お よ び S 2 3 6 . 1 - L 0 3 の ア ミ ノ 酸 配 列 を 配 列 番 号 5 2 ( S  
2 3 6 . 1 - A 2 2 - s t r e p )、 配 列 番 号 5 3 ( S 2 3 6 . 1 - J 2 0 - s t r e p )、  
配 列 番 号 5 4 ( S 2 3 6 . 1 - M 1 1 - s t r e p )、 お よ び 配 列 番 号 5 5 ( S 2 3  
6 . 1 - L 0 3 - s t r e p ) に 示 す。 こ れ は ま た、 示 さ れ た 突 然 変 異 し た 位 置 / 突 然 変 異  
以 外 に、 V E G F も し く は V E G F - R 2 ま た は イ ン タ ー ロ イ キ ン 4 受 容 体 ア ル ファ 鎖 ( I L - 4 受 容 体 ア ル ファ ) 等 の 所 与 の 標 的 に 特 異 的 に 結 合 す る た め の 能 力 を 有 す る そ れ ぞ  
れ の 突 然 変 異 タ ン パ ク 質 を 提 供 す る の に 必 要 で あ る、 本 発 明 の 涙 リ ポ カ リ ン 突 然 変 異 タ ン  
パ ク 質 の 配 列 の 変 異 性 を 示 す。

【 0 2 6 0 】

( 実 施 例 3 2 : V E G F 結 合 突 然 変 異 タ ン パ ク 質 の 産 生 ) 50

産生は実施例 7 に記載されるように本質的に行った。

【 0 2 6 1 】

( 実施例 3 3 : B i a c o r e を利用する V E G F 特異的突然変異タンパク質の親和性決定 )

親和性測定は実施例 1 8 に記載されるように本質的に行った ( 固定化された V E G F <sub>8-109</sub> へのヒト涙リポカリン突然変異タンパク質 S 2 3 6 . 1 - A 2 2 ( 配列番号 4 4 ) の結合の B i a c o r e 測定を示す図 2 3 も参照されたい ) 。手短かに言えば、V E G F <sub>8-109</sub> は標準のアミンの化学的性質を使用して C M 5 チップ上に固定化した。リポカリン突然変異タンパク質は、5 0 0 n M ~ 1 6 n M の 6 つの濃度で 3 0 μ l / 分の流速で加えた。センサーグラムの評価は、それぞれの突然変異タンパク質の  $k_{on}$ 、 $k_{off}$ 、および  $KD$  を決定するために B I A T 1 0 0 ソフトウェアを用いて行った。表 1 0 は、2 5 ° C での B i a c o r e 測定によって決定される、V E G F に対する本発明の選択された突然変異タンパク質の親和性を示す。

10

【 0 2 6 2 】

【表 1 0】

突然変異タンパク質	$k_{on}$ [10 <sup>4</sup> 1/Ms]	$k_{off}$ [10 <sup>-5</sup> 1/s]	親和性 [nM]
S236.1-A22	8,8	2,2	0,25
S236.1-J20	7,9	2,2	0,28
S236.1-L03	6,8	4,4	0,64
S236.1-M11	7,3	2,3	0,31

20

【 0 2 6 3 】

( 実施例 3 4 : 阻害 E L I S A を使用する V E G F のアンタゴニストの同定 )

V E G F および V E G F 受容体 2 ( V E G F - R 2 ) の間の相互作用の阻害は、1 時間 のインキュベーション時間を 1 0 分間に減らした改変を伴って、本質的に実施例 1 9 に記載されるように阻害 E L I S A で評価した。阻害定数を下表 1 1 に要約する。表 1 1 は、競合 E L I S A によって決定される、本発明の選択された涙リポカリン突然変異タンパク質のアンタゴニスト能力および V E G F に対する親和性を示す。

30

【 0 2 6 4 】

【表 1 1】

突然変異タンパク質	親和性競合 ELISA Ki [nM]
S236.1-A22	5,8
S236.1-J20	6,3
S236.1-L03	9,4
S236.1-M11	6,4

40

【 0 2 6 5 】

( 実施例 3 5 : B i a c o r e を使用する、V E G F 特異的突然変異タンパク質 S 2 3 6 . 1 - A 2 2 の交差反応性の決定 )

親和性測定は、突然変異タンパク質 S 2 3 6 . 1 - A 2 2 ( 配列番号 4 4 ) をセンサーチップ上に固定化したといった改変を伴って実施例 1 8 に記載されるように本質的に行っ

50

た。70  $\mu$ l の試料を 250 nM の濃度で注入した。

【0266】

図24に示される結果の定性的比較は、切断された形態 hVEGF<sub>8~109</sub> および hVEGF<sub>121</sub> が基本的に同一のセンサーグラムを示すことを示し、涙りポカリン突然変異タンパク質 S236.1-A22 (配列番号44) に対する親和性が類似していることを示す。スプライス形態 hVEGF<sub>165</sub> もりポカリン突然変異タンパク質に対する強い結合を示すが、それぞれのマウスオルソログ mVEGF<sub>164</sub> は親和性がわずかに低下している。アイソフォーム VEGF-B、VEGF-C、および VEGF-D ならびに関連するタンパク質 PIGF は、この実験で結合しないことを示す (データ示さず)。

【0267】

(実施例36: CD分光法の使用による VEGF 結合突然変異タンパク質の熱変性の決定)

円二色性測定は、使用した波長を 228 nM とする改変を伴って国際特許出願 WO 2006/056464号の実施例14に記載されるように本質的に行った。例えば、涙りポカリン突然変異タンパク質 S236.1-A22 (配列番号44) の融解温度  $T_m$  は、75 であると決定された。

【0268】

(実施例37: S236.1-A22の安定性試験)

PBS およびヒト血清中での37 での VEGF 結合突然変異タンパク質 S236.1-A22 の安定性は、利用した濃度を 1 mg/ml としたことを除いて、国際特許出願 WO 2006/056464号の実施例15に記載されるように本質的に試験した。突然変異タンパク質の変化は、HPLC-SECによって判断されるようにPBS中での7日間のインキュベーション期間の間に検出することができなかった (データ示さず)。ヒト血清中のリポカリン突然変異タンパク質のインキュベーションは、基準と比較しておよそ70%まで7日後に親和性の低下をもたらした (図25aも参照されたい)。

【0269】

(実施例38: アルブミン結合ドメインとの抗 VEGF 突然変異タンパク質の融合)

血清半減期延長目的については、抗 VEGF 突然変異タンパク質をアルブミン結合ドメイン (ABD) とC末端で融合した。発現に使用した遺伝子構築物を pTLP C51-S236.1-A22 (配列番号50) と名付けた。(図26を参照されたい)

【0270】

VEGF 特異的突然変異タンパク質-ABD融合物または T1c-ABD (コントロールとして) の調製用の産生は、実施例7に記載されるように本質的に行った。

【0271】

表面プラズモン共鳴 (Biacore) を使用する親和性測定は実施例18に記載されるように本質的に行った。組換え VEGF に対する涙りポカリン突然変異タンパク質 S236.1-A22 の ABD 融合物 (A22-ABD) (配列番号51) (200 pM) の親和性は基本的に変化がないことがわかり、260 pM であると測定された (図27を参照されたい)。

【0272】

さらに、ABDドメインの完全性は、約850 RUのヒト血清アルブミンを標準のアミンの化学的性質を使用してセンサーチップに直接つないだ改変を伴って、実施例8に記載されるものと同じ方法によって試験した。60  $\mu$ l の突然変異タンパク質-ABD融合物 (A22-ABD (配列番号51) または野生型 T1c-ABD (配列番号49)) を 500 nM の濃度で注入した。それらの親和性はおよそ20 nM であると測定された。

【0273】

ヒト血清中の S236.1-A22 の ABD 融合物 (配列番号51) の安定性は実施例37に記載されるように本質的に試験した。活性の損失は7日間のインキュベーション期間の間に検出することができなかった。(図25bを参照されたい)。

【0274】

10

20

30

40

50

ヒト血清アルブミンの存在下でのリポカリン突然変異タンパク質 A 2 2 - A B D ( S 2 3 6 . 1 - A 2 2 の A B D 融合物 ) の機能性は、 V E G F 誘発性の H U V E C 増殖を阻害するためのその能力によって試験した。アッセイは、示される場合にヒト血清アルブミン ( H S A 、 5  $\mu$  M ) を添加したことを除いて、実施例 3 9 に記載されるように行った。5  $\mu$  M H S A で、 > 9 9 . 8 % の A 2 2 - A B D は、 H S A に対する A 2 2 - A B D のナノモルの親和性により、任意の所与の時間に H S A と結合する ( 図 2 8 を参照されたい ) 。 I C 5 0 値は以下のとおり決定された :

S 2 3 6 . 1 - A 2 2 - A B D I C 5 0 : 7 6 0 p M

S 2 3 6 . 1 - A 2 2 - A B D ( + H S A ) I C 5 0 : 4 7 0 p M

【 0 2 7 5 】

( 実施例 3 9 : V E G F 誘発性の H U V E C 増殖の阻害 )

H U V E C ( P r o m o c e l l ) はゼラチンをコートした皿上で増し、継代 P 2 および P 8 の間に使用した。1日目、1400個の細胞を、完全培地中に96ウェルプレート中にウェル毎に接種した。2日目、細胞を洗浄し、0.5% F C S、ヒドロコルチゾン、およびゲンタマイシン/アンホテリシンを含有する100  $\mu$  l の基本培地を添加した。増殖は、リポカリン突然変異タンパク質 S 2 3 6 . 1 - A 2 2 ( 配列番号 4 4 ) と混合し、30分間インキュベートし、ウェルに添加した20 ng / m l V E G F 1 6 5 または10 ng / m l F G F - 2 を用いて刺激した。生存率は6日目に決定し、結果は阻害%として表現する。I C 5 0 値は以下のとおり決定された ( 図 2 9 も参照されたい ) 。 F G F - 2 媒介性の刺激は V E G F アンタゴニストによって影響を与えられなかった ( データ示さず ) 。

S 2 3 6 . 1 - A 2 2 I C 5 0 : 0 . 5 1 n M

A v a s t i n I C 5 0 : 0 . 5 6 n M

【 0 2 7 6 】

( 実施例 4 0 : H U V E C 中での V E G F 媒介性の M A P キナーゼ活性化の阻害 )

H U V E C は、標準の培地 ( P r o m o c e l l 、 H e i d e l b e r g ) 中にウェル当たり 1 , 4 0 0 個の細胞で96ウェルプレート中に接種した。翌日、F C S を 0 . 5 % に低下させ、培養を16時間継続した。次いで、細胞を5時間基本培地中0.5% B S A 中で飢餓状態にした。H U V E C は、用量応答曲線を得るために、増加性の濃度の涙リポカリン突然変異タンパク質 A 2 2 または A v a s t i n ( ベバシズマブ、 G e n e n t e c h / R o c h e ) の存在下で10分間 V E G F <sub>165</sub> ( R e l i a t e c h 、 B r a u n s c h w e i g ) を用いて刺激した。M A P キナーゼ E R K 1 および E R K 2 のリン酸化は、メーカーのマニュアル ( A c t i v e M o t i f 、 R i x e n s a r t 、 B e l g i u m ) に従って E L I S A を使用して定量化した。I C 5 0 値は突然変異タンパク質 A 2 2 ( 配列番号 4 4 ) について 4 . 5 n M および A v a s t i n ( 登録商標 ) について 1 3 n M であると決定された ( 図 3 0 を参照されたい ) 。

【 0 2 7 7 】

( 実施例 4 1 : 涙リポカリン突然変異タンパク質の局所投与を用いた血管透過性アッセイ )

体重が 3 5 0  $\pm$  5 0 g の D u n c a n - H a r t l e y モルモットは、肩および背を剪毛した。動物は、1 ml の 1 % E v a n ' s B l u e 色素の耳静脈を介しての静脈内注射を受けた。30分後、20 ng V E G F <sub>165</sub> ( C a l b i o c h e m ) を10倍のモル過剰で試験物質またはコントロール物と混合し、3  $\times$  4 グリッド上に皮内に注射した。30分後、動物は C O <sub>2</sub> 窒息によって安楽死させた。V E G F 注射の1時間後に、グリッドパターンを含有する皮膚を摘出し、結合組織をきれいにした。色素血管外遊出のエリアは、画像解析器 ( I m a g e P r o P l u s 1 . 3 、 M e d i a C y b e r n e t i c s ) の使用によって定量化した ( 図 3 1 を参照されたい ) 。

【 0 2 7 8 】

( 実施例 4 2 : C A M ( ヒヨコ漿尿膜 ) アッセイ )

示されるように F G F - 2 ( 5 0 0 n g ) 、 V E G F ( 1 5 0 n g ) 、 および涙リポカ

10

20

30

40

50



リン突然変異タンパク質 (1.35 µg) または Avastin (10 µg) を含有するコラーゲンオンプラント (onplant) を 10 日目のニワトリ胚 (4 つ / 動物、10 匹の動物 / グループ) の CAM の上に置いた。24 時間目に、涙リポカリン突然変異タンパク質または Avastin を同じ用量でオンプラントに局所的に再び適用した。72 時間後に、オンプラントを収集し、画像を保存した。少なくとも 1 つの血管を含有するポジティブグリッドの百分率を盲検化した観察者によって決定した。中央値の血管形成指数は、VEGF アンタゴニストである S209.2-010 (配列番号 33) および Avastin (登録商標) ならびに陽性グリッドの画分としての野生型涙リポカリンコントロールについて報告する (図 32 を参照されたい)。

【0279】

(実施例 43 : マウス中の A22 および A22 - ABD についての薬物動態 (PK) パラメーターの決定)

i.v. の後の涙リポカリン突然変異タンパク質 S236.1 A22 (配列番号 44) (4 mg / kg) および i.v. または i.p. 単一ボラス投与の後での ABD との突然変異タンパク質 S236.1 A22 の融合タンパク質 (配列番号 51) (5.4 mg / kg) についての薬物動態 (PK) パラメーター (半減期血漿濃度、生物学的利用率) を NMRI マウスで決定した。血漿は、事前に決めた時点で採取した末端血液試料から調製し、リポカリン突然変異タンパク質の濃度は ELISA によって決定した。結果は、WinNonlin ソフトウェア (Pharsight Corp., Mountain View, USA) を使用して分析した。 $T_{1/2}$  A22 i.v. : 0.42 時間 ;  $T_{1/2}$  A22 - ABD i.v. : 18.32 時間 ;  $T_{1/2}$  A22 - ABD i.p. : 20.82 時間。融合タンパク質 A22 - ABD の i.p. 投与の後での生物学的利用率は 82.5 % であった (図 33 を参照されたい)。

【0280】

(実施例 44 : 涙リポカリン突然変異タンパク質の全身投与を用いた血管透過性アッセイ)

実験の 12 時間前に、試験物質またはコントロールをグループ当たり 3 匹の動物に静脈内に注射した。グループ 1 : PBS 媒体 ; グループ 2 : Avastin、10 mg / kg ; グループ 3 : 突然変異タンパク質 S236.1 A22 - ABD、6.1 mg / kg ; グループ 4 : TLP C51 : 6.1 mg / kg。時間 = 0 に、Evan's Blue を注射した。30 分後に、4 つの用量の VEGF (5、10、20、または 40 ng) を 3 × 4 グリッド上に皮内に 3 通り注射した。VEGF 注射の 30 分後に、動物を犠牲死させ、色素血管外遊出を上記のように定量化した (図 34 を参照されたい)。

【0281】

(実施例 45 : 腫瘍異種移植モデル)

照射 (2.5 Gy、Co<sup>60</sup>) スイスヌードマウスは、右側腹部中に、マトリゲル中の  $1 \times 10^7$  A673 横紋筋肉腫細胞 (ATTC) を皮下に接種した (グループ当たり n = 12)。治療薬を腹腔内に投与し、同日に開始し、21 日間継続した。グループ 1 : PBS 媒体、毎日 ; グループ 2 : Avastin (ベバシズマブ、Genentech / Roche)、5 mg / kg、3 日毎 ; グループ 3 : 突然変異タンパク質 A22 - ABD (配列番号 51)、毎日、3.1 mg / kg ; グループ 4 : TLP C51、毎日、3.1 mg / kg。リポカリン A22 - ABD の用量は、マウスでの A22 - ABD PK データ および抗体の推算された血清半減期に基づいて突然変異タンパク質および Avastin の VEGF 結合部位の等モル数が一定に存在することを達成するように選んだ。腫瘍サイズはカリパスを用いて毎週 2 回測定し、腫瘍量は式 (長さ × 幅<sup>2</sup>) / 2 によって推算した。腫瘍量が 2,000 mm<sup>3</sup> を超過した場合に、マウスを犠牲死させた (図 35 を参照されたい)。

【0282】

(実施例 46 : リポカリン突然変異タンパク質 - Cys 変異体のスクリーニング)

例えば活性化 PEG とつなぐための反応基を提供するために、不対システイン残基を部

10

20

30

40

50

位特異的突然変異誘発によって導入した。遊離Cys残基を保有する組換え突然変異タンパク質を、実施例7に記載されるように大腸菌中で続いて産生し、発現収量を決定し、親和性を実施例14に記載されるようにELISAによって本質的に測定した。

【0283】

例示的に、VEGF特異的突然変異タンパク質S236.1-A22(配列番号44)のCysスクリーニングからの結果を下表に示す。システインは、次のオリゴヌクレオチドを使用してアミノ酸Thr40、Glu73、Asp95、Arg90、およびGlu131の代わりに導入した。表12は、ELISAによって決定される、VEGFに対する突然変異タンパク質S236.1-A22およびそのThr40 Cys(配列番号66)、Glu73 Cys(配列番号67)、Asp95 Cys(配列番号68)、Arg90 Cys(配列番号69)、およびGlu131 Cys(配列番号70)突然変異体の親和性を示す。

A22\_D95Cフォワード：GAGGTCGCACGTGAAGTGCCACTACA  
ATCTTTTACTCTGAGG(配列番号56)、

A22\_D95Cリバーズ：CCTCAGAGTAAAAGATGTAGTGGCAC  
TTCACGTGCGACCTC(配列番号57)、

A22\_T40Cフォワード：GGGTCGGTGATACCCACGTGCCTCA  
CGACCTTGGAAAGGG(配列番号58)、

A22\_T40Cリバーズ：CCCTTCCAGGGTCTGTGAGGCACGTGG  
GTATCACCGACCC(配列番号59)、

A22\_E73Cフォワード：CCGTCCTGAGCAA AACTGATTGCC  
GGGGATCTACACGG(配列番号60)、

A22\_E73Cリバーズ：CCGTGTAGATCCCCGGGCAATCAGTT  
TTGCTCAGGACGG(配列番号61)、

A22\_E131Cフォワード：GCCTTGGAGGACTTTTGTAAAGCC  
GCAGGAG(配列番号62)、

A22\_E131Cリバーズ：CTCCTGCGGCTTTACAAAAGTCCTC  
CAAGGC(配列番号63)、

A22\_R90Cフォワード：CGTGGCAAAGATCGGGTGCTCGCAC  
GTGAAGGACC(配列番号64)、および

A22\_R90Cリバーズ：GGTCCTTCAACGTGCGAGCACCCGATC  
TTTGCCACG(配列番号65)。

【0284】

【表12】

クローン	収量	親和性
	[ $\mu\text{g/L}$ ]	[nM]
S236.1-A22	1000	10
S236.1-A22 T40C	420	14
S236.1-A22 E73C	300	13
S236.1-A22 D95C	750	10
S236.1-A22 R90C	470	10
S236.1-A22 E131C	150	> 100

【0285】

(実施例47：エオタキシン-3分泌アッセイ)

エオタキシン-3分泌アッセイを72時間にわたってA549細胞上で行った。A549細胞等の肺上皮細胞は、IL-4/IL-13刺激に際してエオタキシン-3を分泌す

る。したがって、A549細胞は、増加性の濃度のIL-4受容体アルファ結合突然変異タンパク質S191.4 B24（配列番号4）を用いて処理し、それぞれ0.7 nM IL-4または0.83 nM IL-13を用いて刺激した。エオタキシン-3分泌は市販のサンドイッチELISA（R&D Systems）を使用して72時間後に判定した。結果（図36）は、IL-4受容体アルファ結合突然変異タンパク質S191.4 B24が、それぞれ32および5.1 nMのIC<sub>50</sub>値で、A549細胞中でIL-4およびIL-13媒介性のエオタキシン-3分泌を阻害することを実証する（表13）。表13は、A549細胞中でのIL-4およびIL-13媒介性のエオタキシン-3分泌に対するS191.4 B24のIC<sub>50</sub>値を示す。

【0286】

【表13】

	IC <sub>50</sub> (nM)
IL-4	32
IL-13	5.1

【0287】

（実施例48：末梢血単核細胞上でのIL-4/IL-13媒介性のCD23誘発）

全ヒトPBMCをバツフィーコートから単離した。PBMCを、増加性の濃度のIL-4受容体アルファ結合突然変異タンパク質S191.4 B24を用いて処理し、IL-4またはIL-13を、それぞれ、1.0 nMおよび2.5 nMの最終濃度まで添加した。PBMCを10% FCSを含有するRPMI培地中で48時間培養した。細胞を抗CD14-FITC抗体および抗CD23-PE抗体を用いて染色し、フローサイトメトリーによって分析した。各時点について、すべてのCD14ポジティブ単球の中からのダブルポジティブ細胞の百分率を決定し、突然変異タンパク質濃度の関数としてプロットした。

【0288】

得られた結果から、単球上でのIL-4およびIL-13媒介性のCD23発現を阻害するための突然変異タンパク質S191.4 B24のIC<sub>50</sub>値を算出した（表14）。表14は、PBMC中でのIL-4およびIL-13媒介性のCD23発現に対するS191.4 B24のIC<sub>50</sub>値を示す。

【0289】

【表14】

	IC <sub>50</sub> (nM)
IL-4	905
IL-13	72

【0290】

（実施例49：IL-4受容体アルファ結合突然変異タンパク質S191.4 B24の親和性についてのSchild分析）

Schild分析は、突然変異タンパク質の仮定された競合的結合モードを確かめ、かつ細胞上でのK<sub>d</sub>を決定するために実行した。TF-1細胞は、固定濃度のIL-4受容体アルファ結合突然変異タンパク質S191.4 B24（0、4.1、12.3、37、111.1、333.3、または1000 nM）を用いて処理し、IL-4を用いて滴定し、細胞生存率を4日後に判定した（図38A）。EC<sub>50</sub>値を非線形回帰によって決定した。得られた結果の従来のSchild分析（図38B）から192 pMのK<sub>d</sub>を得（線形回帰）、より正確な非線形回帰から116 pMを得た。1.084のSchildの傾きは拮抗的阻害を示す、つまり、突然変異タンパク質およびIL-4はIL-4受容

10

20

30

40

50

体アルファ結合について競合する。

【0291】

(実施例50：初代B細胞への突然変異タンパク質S191.4 B24のピコモルの結合)

PBMCをヒト血液から単離し、異なる濃度のIL-4受容体アルファ結合ヒト涙リポカリン突然変異タンパク質S191.4 B24または野生型ヒト涙リポカリン(TLPC26)と共にインキュベートした。次いで、細胞は、抗CD20-FITCモノクローナル抗体およびビオチン化リポカリン抗血清、その後streptavidin-PEを用いて染色した。野生型リポカリンおよびIL-4受容体アルファ結合リポカリン突然変異タンパク質S191.4 B24についての結果を図39AおよびBにそれぞれ示す。PE

10

【0292】

(実施例51：皮下および気管内投与の後の突然変異タンパク質の生物学的利用率)

IL-4受容体アルファ結合突然変異タンパク質S191.4 B24の生物学的利用率は、ラットでの4mg/kgのボラス注射(bolus injection)の後に4時間、突然変異タンパク質S191.4 B24の血漿濃度を監視することによって、静脈内、皮下、または気管内投与の後に決定した。気管内投与は、シリンジに付けられた長く薄いチューブの先端からのエアロゾルを生成する、市販で入手可能な気管内投薬デバイス(MicroSprayer(登録商標)、Penn-Century Inc、Philadelphia、PA、USA)を使用して実行した。エアロゾルサイズは約20µmとした。非コンパートメント薬物動態(PK)分析の結果は、皮下注射に際しての100%の生物学的利用率および抗体とは対照的に、ヒト涙リポカリン突然変異タンパク質の肺送達の実現可能なように思われることを実証する。得られた結果を表15に示す。表15は、静脈内(i.v.)、皮下(s.c.)、および気管内(i.t.)投与の後のS191.4 B24の半減期および生物学的利用率を示す。

20

【0293】

【表15】

30

	<b>i.v.</b>	<b>s.c.</b>	<b>i.t.</b>
<b>t<sub>1/2</sub> [h]</b>	<b>0.78</b>	<b>1.6</b>	<b>2.36</b>
生物学的利用率 (AUC <sub>last</sub> )	n/a	97.2%	10%
生物学的利用率 (AUC <sub>inf</sub> )	n/a	119%	13.8%

【0294】

(実施例52：HUVEC増殖アッセイを使用する、PEG化VEGFアンタゴニストのin vitro作用強度)

40

VEGF刺激HUVEC細胞増殖の阻害は、次の改変を伴って実施例20に記載されるように本質的に判定した：VEGF特異的突然変異タンパク質S236.1-A22(配列番号44)は、上記実施例28に記載されるように、位置95CでPEG20、PEG30、またはPEG40につないだ。突然変異タンパク質、そのPEG化誘導体、および野生型涙リポカリン(pTLPC26の遺伝子産物；コントロールとして)をVEGF165に希釈系列で添加し、室温で30分間インキュベートした。混合物を3通りのウェル中のHUVEC細胞に添加して、示されるように20ng/ml VEGFの最終濃度ならびに0.003nMおよび2,000nMの間の濃度を得た。細胞の生存率を、メーカーの指示に従ってCellTiter-Glo(Promega)を用いて6日後に判定した。

50

## 【 0 2 9 5 】

前述の突然変異タンパク質を利用する測定からの結果を図 4 1 に示す。S 2 3 6 . 1 - A 2 2 ( 配列番号 4 4 ) およびその P E G 化誘導体は、付けられた P E G 成分の分子量が減少すると共に H U V E C 細胞の V E G F 誘発性の増殖の著しい阻害を示したが、野生型 浚りポカリンは V E G F 誘発性の細胞増殖を阻害しない ( 表 1 6 )。表 1 6 は、H U V E C 細胞増殖阻害についての、S 2 3 6 . 1 - A 2 2 ( 配列番号 4 4 ) および P E G 2 0、P E G 3 0、または P E G 4 0 を用いて P E G 化したその誘導体の  $IC_{50}$  値を示す。

## 【 0 2 9 6 】

## 【表 1 6】

	$IC_{50}$ (nM)
S236.1-A22	0.4
S236.1-A22-PEG20	0.53
S236.1-A22-PEG30	2.13
S236.1-A22-PEG40	3.27

10

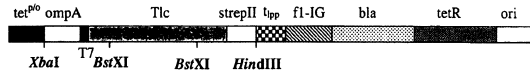
## 【 0 2 9 7 】

本明細書に例証的に記載される本発明は、本明細書に特に開示されていない任意の 1 つまたは複数のエレメント、1 つまたは複数の限定の非存在下で適切に実施されてもよい。したがって、例えば用語「含む (comprising)」、「包含する (including)」、「含有する (containing)」等は、広範囲にかつ限定を伴うことなく解釈されるものとする。さらに、本明細書で利用される用語および表現は、説明の用語として使用され、限定するものではない。また、そのような用語および表現の使用に、示され、かつ記載される特徴のあらゆる等価物またはその部分を除外する意図はないが、種々の改変は主張される本発明の範囲内で可能であることが認識される。したがって、本発明は好ましい実施形態および任意の特徴によって特に開示されるが、本明細書に開示された、そこに具体化された本発明の改変および変形は当業者らによって採られてもよく、そのような改変および変形は本発明の範囲内であると考えられることを理解されたい。本発明は広く包括的に本明細書に記載されている。属の開示の範囲内であるそれぞれの下位の種および亜属のグループ分けも本発明の一部を形成する。これは、属から任意の主題を除去する条件のまたはその負の限定を有する本発明の属の説明を、削除された物質が本明細書に特に詳述されているかどうかにかかわらず含む。さらに、本発明の特徴または態様がマーカッシュグループに関して記載される場合、当業者らは、本発明がまた、それによって、マーカッシュグループのあらゆる個々のメンバーまたはメンバーのサブグループに関して記載されることを認識するであろう。本発明のさらなる実施形態は次の請求項から明白になるであろう。

20

30

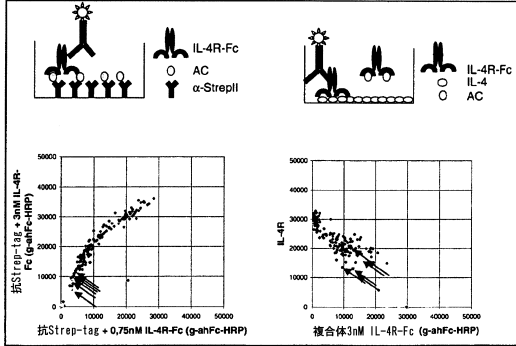
【 1 】



【 2 】

MKKTALIAIV ALAGFATVAQ ADA<sup>SMTGGQQ</sup> NGASDEEIQD VSGTWYKAM  
 TVDSRCPRAY YGSVTPMTLT TLEGGNLEAK VTMQRIGRSQ EVKAVLEKTD  
 EPGKYTAGG RHVAYIIRSH VKDHYIFPSE GLCPGQVPG VMLVGRDPKN  
 NLEALEDFEK AAGARLSTE SILIPRQSET SSPGSAWSHP QFEK

【 3 】



【 4 】

S191.5 K12:  
 MKKTALIAIV ALAGFATVAQAASDEEIQDVSGTWYKAMTVDSRCPRAYYSVTPMTLTLEGGNLEAKFTAQ  
 RNRWQELKLVLEKTDPEPKYASGGRHVAYIIRSHVKDHYIFPSEGLCPGQVPGVWLVGRDPKNNLEALEDFE  
 KAAGARLSTESILIPRQSETSSPGSAWSHPQFEK

S148.3 J14M2C2:  
 MKKTALIAIV ALAGFATVAQAASDEEIQDVSGTWYKAMTVDSRCPRAYYSVTPMTLTLEGGNLEAKFTAQ  
 RRGWQEGKLVLEKTDPEPKYASGGRHVAYIIRSHVKDHYIFPSEGLCPGQVPGVWLVGRDPKNNLEALEDFE  
 KAAGARLSTESILIPRQSETSSPGSAWSHPQFEK

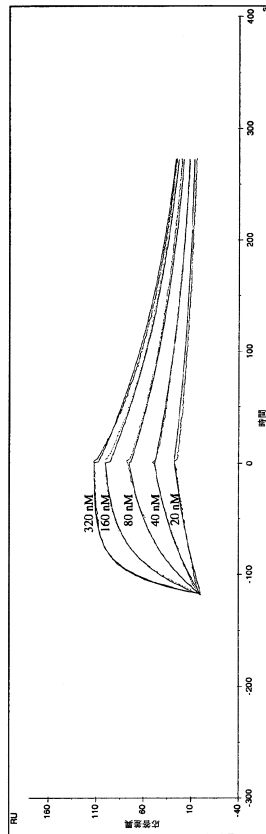
S191.4 B24:  
 MKKTALIAIV ALAGFATVAQAASDEEIQDVSGTWYKAMTVDSRCPRAYYSVTPMTLTLEGGNLEAKFTAQ  
 RSGRWQEKLVLEKTDPEPKYASGGRHVAYIIRSHVKDHYIFPSEGLCPGQVPGVWLVGRDPKNNLEALEDFE  
 KAAGARLSTESILIPRQSETSSPGSAWSHPQFEK

S191.4 K19:  
 MKKTALIAIV ALAGFATVAQAASDEEIQDVSGTWYKAMTVDSRCPRAYYSVTPMTLTLEGGNLEAKFTAQ  
 RAGRWQEGKLVLEKTDPEPKYASGGRHVAYIIRSHVKDHYIFPSEGLCPGQVPGVWLVGRDPKNNLEALEDFE  
 KAAGARLSTESILIPRQSETSSPGSAWSHPQFEK

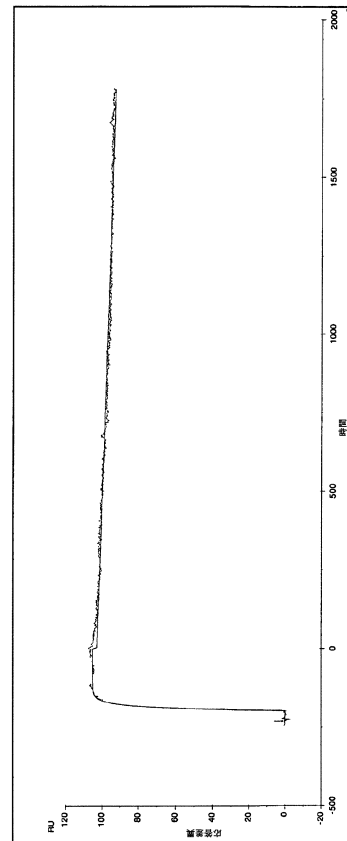
S191.5 H16:  
 MKKTALIAIV ALAGFATVAQAASDEEIQDVSGTWYKAMTVDSRCPRAYYSVTPMTLTLEGGNLEAKFTAQ  
 RGRWQEKLVLEKTDPEPKYASGGRHVAYIIRSHVKDHYIFPSEGLCPGQVPGVWLVGRDPKNNLEALEDFE  
 KAAGARLSTESILIPRQSETSSPGSAWSHPQFEK

S197.8 D22:  
 MKKTALIAIV ALAGFATVAQAASDEEIQDVSGTWYKAMTVDSRCPRAYYSVTPMTLTLEGGNLEAKFTAQ  
 RSGRWQEKLVLEKTDPEPKYASGGRHVAYIIRSHVKDHYIFPSEGLCPGQVPGVWLVGRDPKNNLEALEDFE  
 KAAGARLSTESILIPRQSETSSPGSAWSHPQFEK

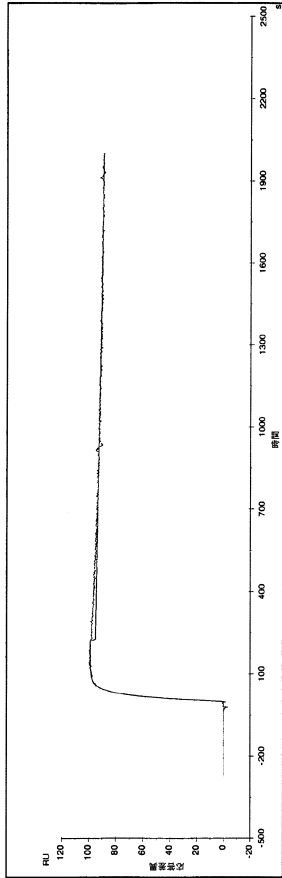
【 5 】



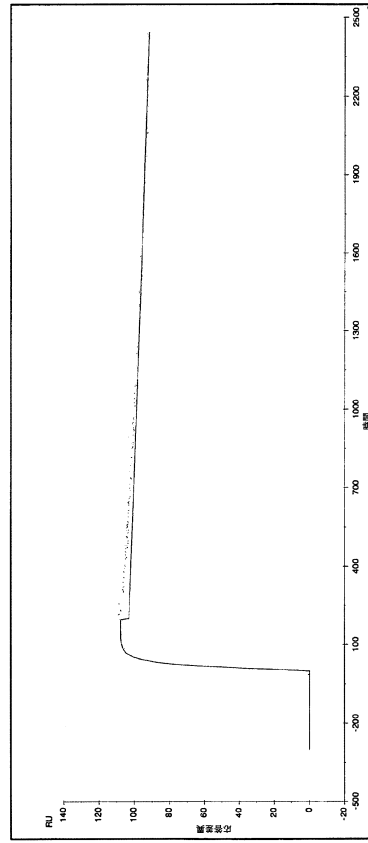
【 6 】



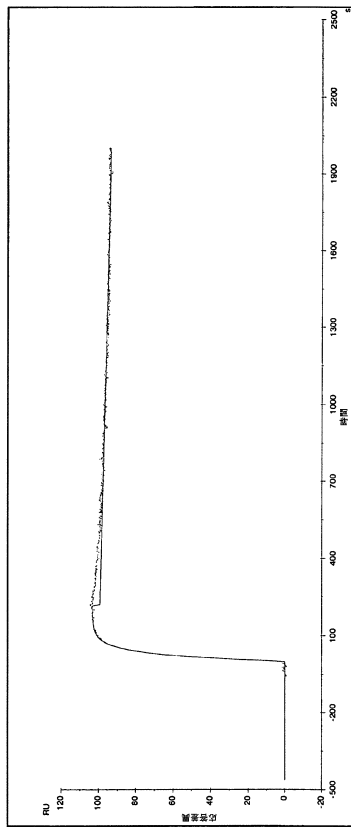
【 7 】



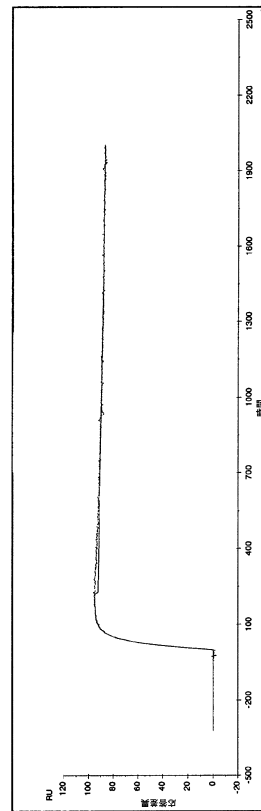
【 8 】



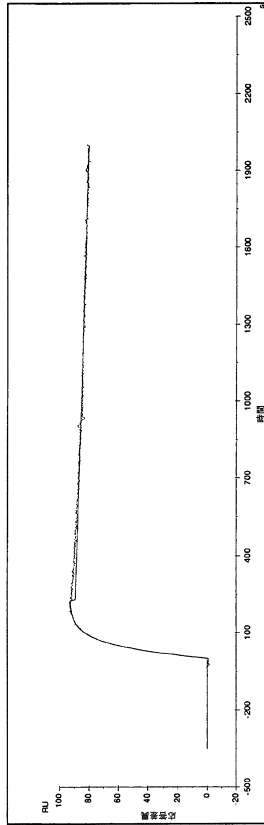
【 9 】



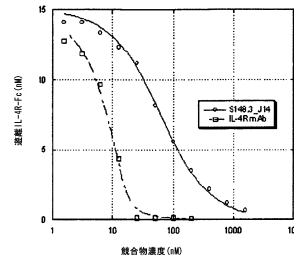
【 10 】



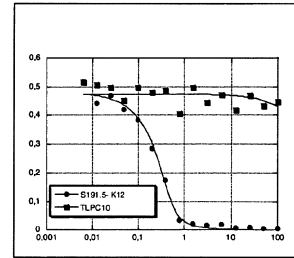
【 1 1 】



【 1 2 】



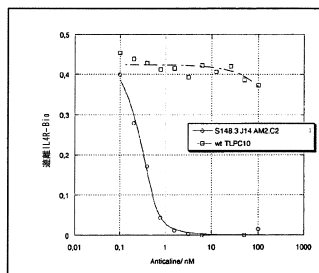
【 1 3 】



$$y = 0.5 \cdot (-m0 + m2 - m1 + \sqrt{(-m0 + m2 - m1)^2 + 4 \cdot m0 \cdot m2}) / 2$$

	値	誤差
m1	0.03715	0.012294
m2	0.47887	0.0082153
カイ二乗	0.0045061	NA
R	0.99618	NA

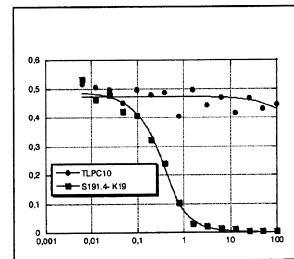
【 1 4 】



$$y = 0.5 \cdot (-m0 + m2 - m1 + \sqrt{(-m0 + m2 - m1)^2 + 4 \cdot m0 \cdot m2}) / 2$$

	値	誤差
m1	0.037134	0.0082609
m2	0.47752	0.0089865
カイ二乗	0.00098348	NA
R	0.99744	NA

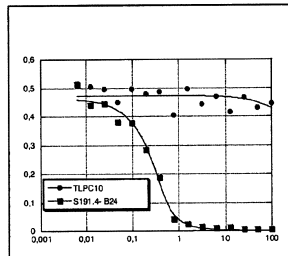
【 1 6 】



$$y = 0.5 \cdot (-m0 + m2 - m1 + \sqrt{(-m0 + m2 - m1)^2 + 4 \cdot m0 \cdot m2}) / 2$$

	値	誤差
m1	0.10445	0.020528
m2	0.49068	0.0683334
カイ二乗	0.0043991	NA
R	0.99645	NA

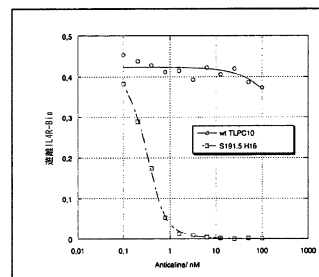
【 1 5 】



$$y = 0.5 \cdot (-m0 + m2 - m1 + \sqrt{(-m0 + m2 - m1)^2 + 4 \cdot m0 \cdot m2}) / 2$$

	値	誤差
m1	0.052369	0.01679
m2	0.46505	0.0095265
カイ二乗	0.0058732	NA
R	0.99474	NA

【 1 7 】

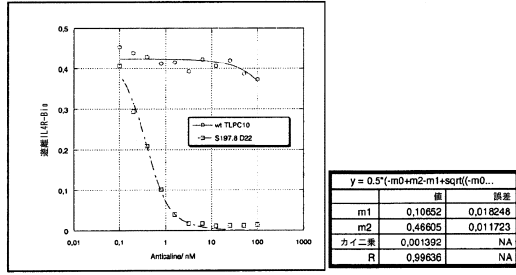


$$y = 0.5 \cdot (-m0 + m2 - m1 + \sqrt{(-m0 + m2 - m1)^2 + 4 \cdot m0 \cdot m2}) / 2$$

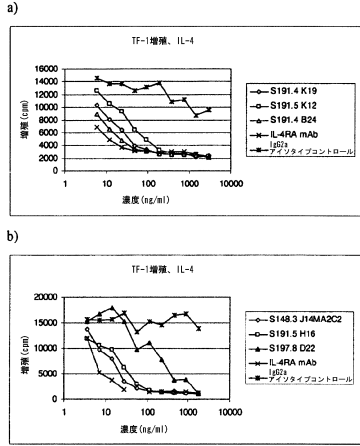
	値	誤差
m1	0.048704	0.0040592
m2	0.46864	0.0039151
カイ二乗	0.00017517	NA
R	0.99953	NA



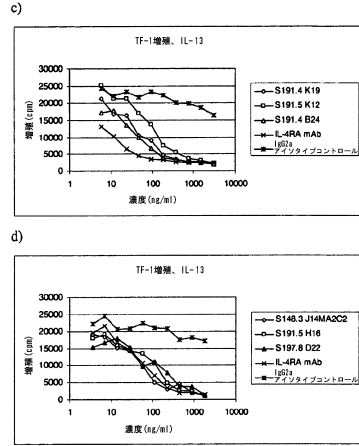
【 図 18 】



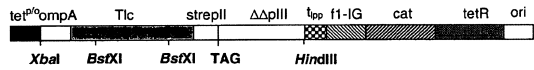
【 図 19 ( a ) - ( b ) 】



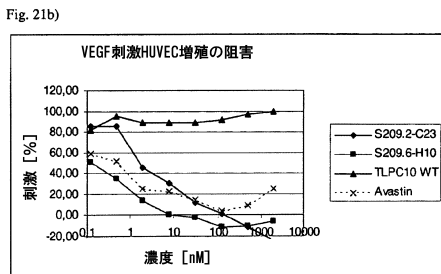
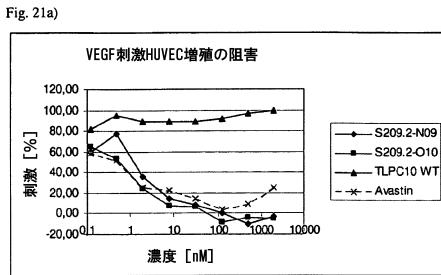
【 図 19 ( c ) - ( d ) 】



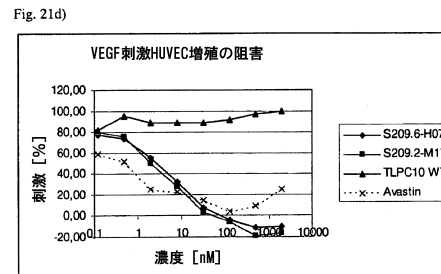
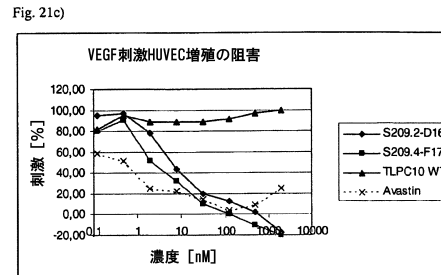
【 図 20 】



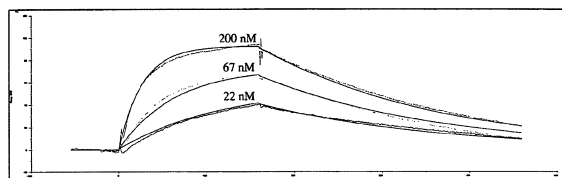
【 図 21 ( a ) - ( b ) 】



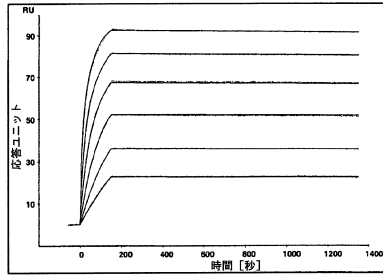
【 図 21 ( c ) - ( d ) 】



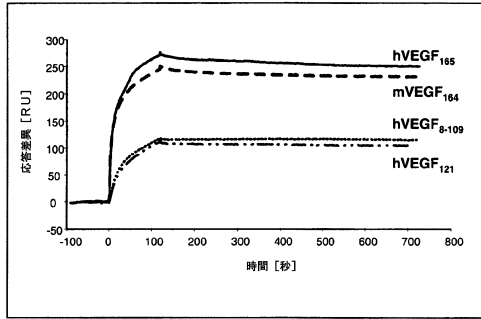
【 図 22 】



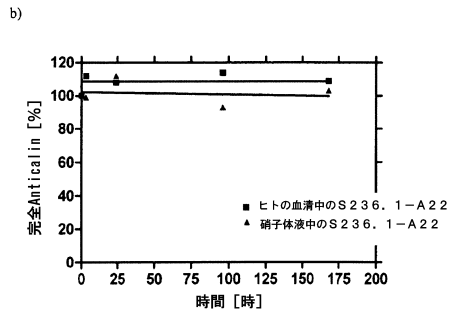
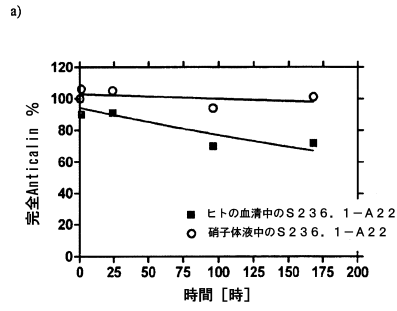
【図23】



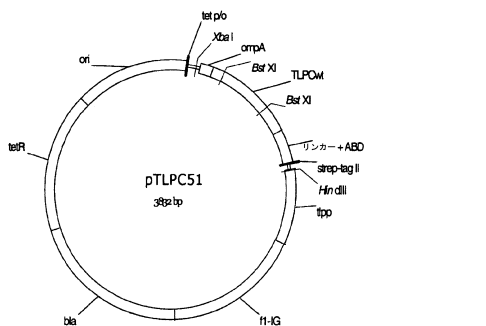
【図24】



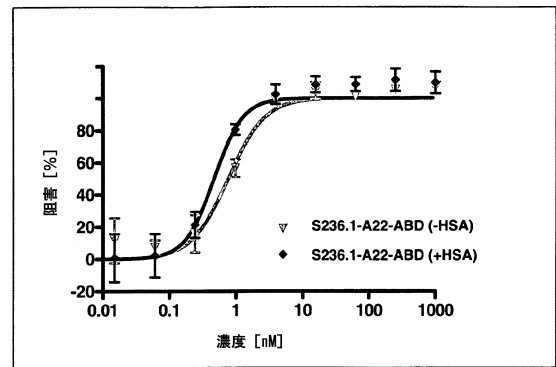
【図25】



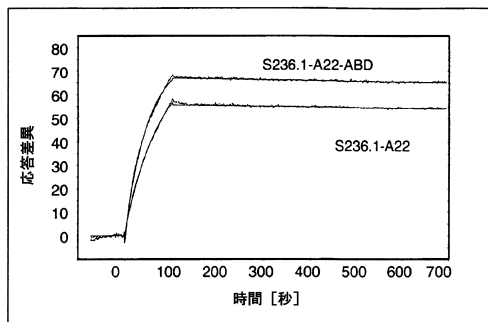
【図26】



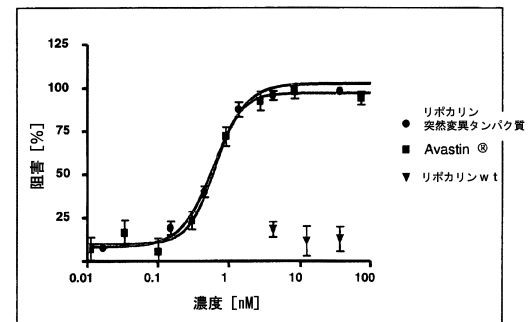
【図28】



【図27】



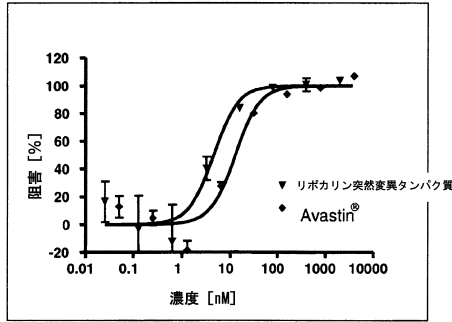
【図29】



Biacore測定値  
 S236.1-A22 (裸リボカリン突然変異タンパク質) KD: 200pM  
 S236.1-A22-ABD (裸リボカリン突然変異タンパク質-ABD) KD: 260pM

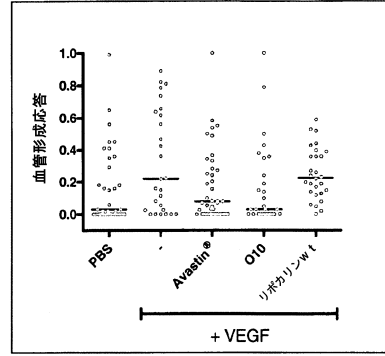
化合物 IC50 [nM]  
 S236.1-A22 (リボカリン突然変異タンパク質) 0.51  
 Avastin 0.56

【 図 3 0 】

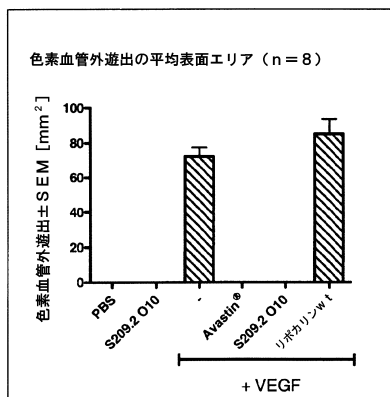


化合物	IC50 [nM]
S236.1-A22 (lipocalin mutein)	4.5
Avastin	13

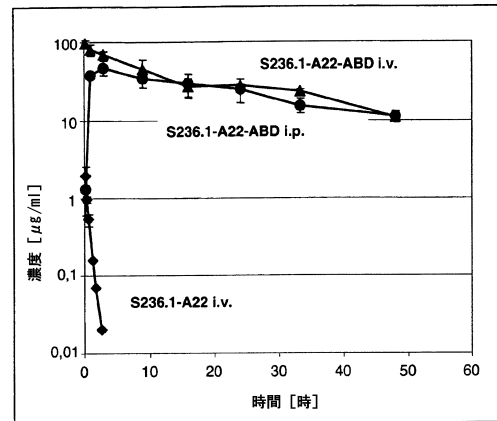
【 図 3 2 】



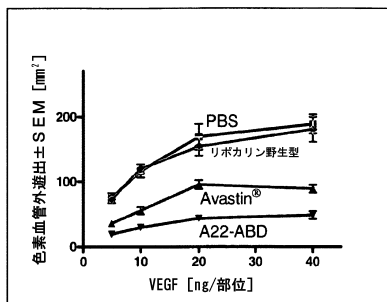
【 図 3 1 】



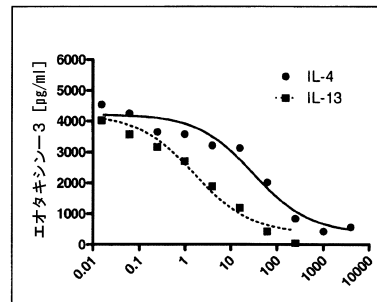
【 図 3 3 】



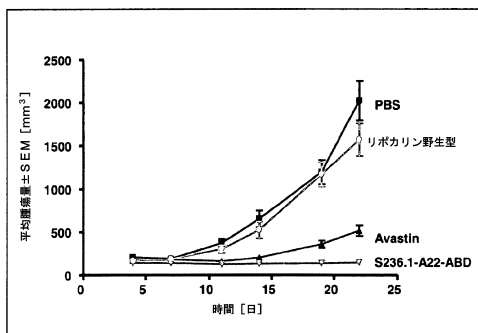
【 図 3 4 】



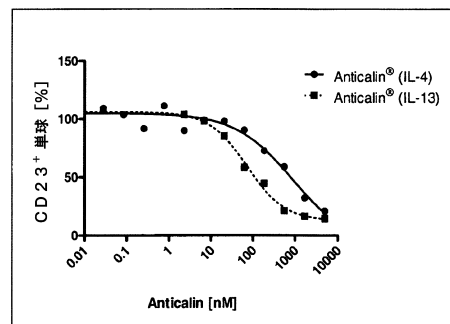
【 図 3 6 】



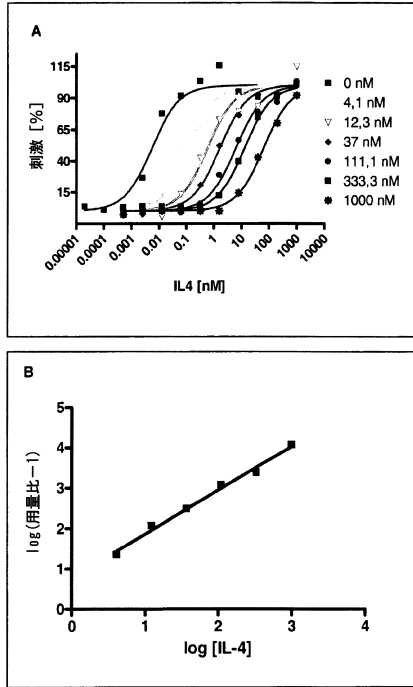
【 図 3 5 】



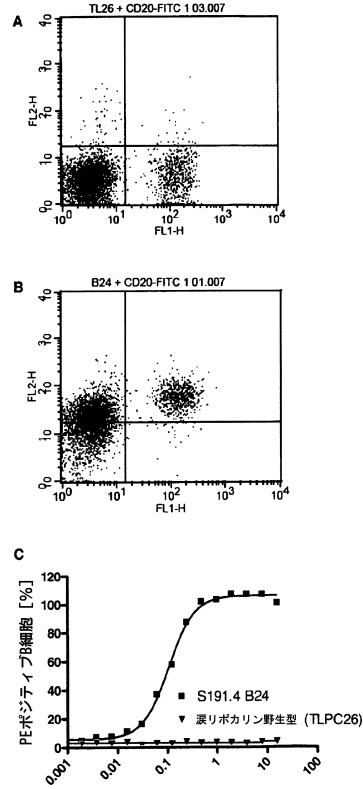
【 図 3 7 】



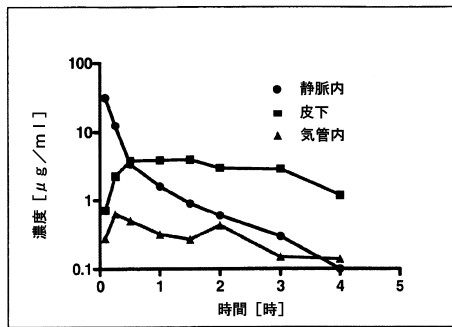
【 図 3 8 】



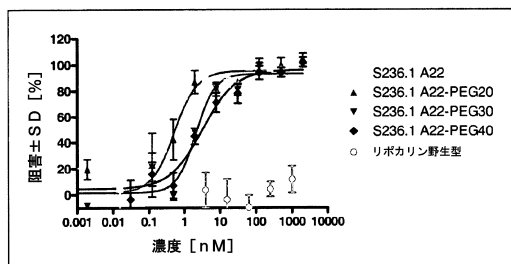
【 図 3 9 】



【 図 4 0 】



【 図 4 1 】



**【配列表】**

0005608368000001.app

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
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	5/00 A
C 0 7 K	14/705 (2006.01)	C 0 7 K	14/705
G 0 1 N	33/68 (2006.01)	G 0 1 N	33/68
A 6 1 K	38/00 (2006.01)	A 6 1 K	37/02
A 6 1 P	37/02 (2006.01)	A 6 1 P	37/02
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00
A 6 1 P	37/08 (2006.01)	A 6 1 P	37/08
A 6 1 P	29/00 (2006.01)	A 6 1 P	29/00
A 6 1 P	11/06 (2006.01)	A 6 1 P	11/06
A 6 1 P	27/16 (2006.01)	A 6 1 P	27/16
A 6 1 P	27/02 (2006.01)	A 6 1 P	27/02
A 6 1 P	43/00 (2006.01)	A 6 1 P	43/00 1 0 5
A 6 1 P	35/02 (2006.01)	A 6 1 P	35/02

- (72)発明者 シュレファーベル、ステフェン  
ドイツ連邦共和国 8 5 4 1 6 ランゲンバッハ フームラ ストラッセ 7
- (72)発明者 ホールバウム、アンドレアス  
ドイツ連邦共和国 8 5 3 0 7 パウンツハウゼン ライヒェルトシャウゼナ ストラッセ 4エ  
イ
- (72)発明者 スケラ、アルネ  
ドイツ連邦共和国 8 5 3 5 4 フライジング マックス-レーネル-ストラッセ 19
- (72)発明者 ボウドル、エリック  
アメリカ合衆国 ノースカロライナ 2 7 7 0 9 リサーチ トライアングル パーク 3 0 5 4  
コーンウォリス ロード シンジエンタ パイオテクノロジー インコーポレーテッド
- (72)発明者 ジョーンズ、リチャード シイ  
スイス連邦 ツェーハー - 4 0 5 8 バーゼル シュヴァルトツヴァルダリイ 2 1 5 シンジエン  
タ
- (72)発明者 キンバー、イアン  
イギリス マックスフィールド チェシャイア エスケイ 1 0 4 ティージェイ アルダリイ  
パーク シンジエンタ セントラル トキシコロジー ラボラトリイ
- (72)発明者 ディアーマン、レベッカ  
イギリス マックスフィールド チェシャイア エスケイ 1 0 4 ティージェイ アルダリイ パ  
ーク シンジエンタ セントラル トキシコロジー ラボラトリイ

審査官 名和 大輔

- (56)参考文献 国際公開第 2 0 0 5 / 0 1 9 2 5 6 (WO, A 1)  
国際公開第 2 0 0 6 / 0 5 6 4 6 4 (WO, A 1)  
国際公開第 2 0 0 7 / 1 0 7 5 6 3 (WO, A 1)  
特表 2 0 0 7 - 5 3 1 5 0 3 (JP, A)

## (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0  
C 0 7 K 1 4 / 0 0 - 1 4 / 8 2 5  
CAplus/MEDLINE/BIOSIS/WPIDS  
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

