

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2021-525897

(P2021-525897A)

(43) 公表日 令和3年9月27日 (2021.9.27)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
G O 1 N 33/50 (2006.01)	G O 1 N 33/50	Z 2 G O 4 5
C 1 2 P 21/00 (2006.01)	C 1 2 P 21/00	C 4 B O 6 4
C O 7 K 1/00 (2006.01)	C O 7 K 1/00	4 C O 7 6
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	4 C O 8 4
A 6 1 P 37/08 (2006.01)	A 6 1 P 37/08	4 H O 4 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 33 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2021-517519 (P2021-517519)	(71) 出願人	520468324
(86) (22) 出願日	令和1年5月29日 (2019.5.29)		バイスクルアールディー
(85) 翻訳文提出日	令和3年1月25日 (2021.1.25)		B I C Y C L E R D
(86) 国際出願番号	PCT/EP2019/064094		イギリス国, シービー22・3エイティー
(87) 国際公開番号	W02019/229182		, ケンブリッジ, バイブラハム・リサーチ
(87) 国際公開日	令和1年12月5日 (2019.12.5)		・キャンパス, ビルディング ビー900
(31) 優先権主張番号	1808835.1	(74) 代理人	100099623
(32) 優先日	平成30年5月30日 (2018.5.30)		弁理士 奥山 尚一
(33) 優先権主張国・地域又は機関	英国 (GB)	(74) 代理人	100107319
			弁理士 松島 鉄男
		(74) 代理人	100125380
			弁理士 中村 綾子
		(74) 代理人	100142996
			弁理士 森本 聡二
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 リガンドおよびそのようなリガンドの結合標的を選択する方法

(57) 【要約】

本発明は、リガンドの標的を選択する方法であって、前記リガンドが、少なくとも2つのループ配列によって隔てられている少なくとも3つの反応性基を含むポリペプチドと分子足場とを含み、前記分子足場が、少なくとも2つのポリペプチドループが前記分子足場上に形成されるような、前記ポリペプチドの反応性基との共有結合を形成する、方法を提供する。本発明はまた、前記標的、前記リガンド、ならびにそのような標的およびリガンドを使用する方法および製造する方法を提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

少なくとも 2 つのループ配列によって隔てられている少なくとも 3 つの反応性基を含むポリペプチドと分子足場とを含むリガンドであって、前記分子足場が、少なくとも 2 つのポリペプチドループが前記分子足場上に形成されるような、前記ポリペプチドの反応性基との共有結合を形成する、リガンドの標的を選択する方法であって、

(a) (i) 約 $1000 \sim 3000$ 3 の容積、

(ii) 少なくとも 1 つの溶媒露出末端

という特徴を備えるポケットの存在について、1 つまたは複数のタンパク質をスクリーニングするステップと、

(b) (a) に定義されたポケットを少なくとも 1 つ有する少なくとも 1 つのタンパク質を選択するステップと

を含む方法。

【請求項 2】

(a) に定義されたポケットが、 $(10 \sim 30) \times (10 \sim 30) \times (5 \sim 30)$ の内部寸法をさらに備える、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

少なくとも 2 つのループ配列によって隔てられている少なくとも 3 つの反応性基を含むポリペプチドと分子足場とを含むリガンドであって、前記分子足場が、少なくとも 2 つのポリペプチドループが前記分子足場上に形成されるような前記ポリペプチドの反応性基との共有結合を形成する、リガンドを選択する方法であって、

(a) 請求項 1 または請求項 2 に定義されたポケットの存在について、1 つまたは複数のタンパク質をスクリーニングし、少なくとも 1 つのそのようなポケットを有する少なくとも 1 つのタンパク質を選択するステップと、

(b) 前記少なくとも 1 つのタンパク質を前記リガンドのうちの 1 つまたは複数と接触させ、前記タンパク質に結合する少なくとも 1 つのリガンドを選択するステップとを含む方法。

【請求項 4】

少なくとも 2 つのループ配列によって隔てられている少なくとも 3 つの反応性基を含むポリペプチドと分子足場とを含むリガンドであって、前記分子足場が、少なくとも 2 つのポリペプチドループが前記分子足場上に形成されるような、前記ポリペプチドの反応性基との共有結合を形成する、リガンドを調製する方法であって、

(a) 請求項 2 に従って選択されたりガンドの、ポリペプチド成分のアミノ酸配列を決定するステップと、

(b) (a) において決定された配列を有するポリペプチドを合成するステップと、

(c) 前記ポリペプチドを分子足場と反応させて、前記リガンドを生成させるステップとを含む方法。

【請求項 5】

ポケットが、さらなるタンパク質とのタンパク質 - タンパク質相互作用に關与するタンパク質ドメイン中に位置するかどうかを、決定することをさらに含む、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6】

標的タンパク質を請求項 1 に定義されたりガンドのライブラリーに暴露し、前記標的タンパク質に結合する 1 つまたは複数のリガンドを選択することをさらに含む、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7】

分子足場が、前記分子足場をポリペプチドに付着させる共有結合の数と対応する分子対称性を有する、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8】

10

20

30

40

50

分子足場が、3回対称の分子対称性を有し、分子足場が、3つの共有結合によってポリペプチドに付着される、請求項7に記載の方法。

【請求項9】

分子足場が構造的に強固な化学基を含む、請求項1から8のいずれか1項に記載の方法。

【請求項10】

分子足場が、トリス-(プロモメチル)ベンゼン(TBMB)、1,3,5-トリアクリロイル-1,3,5-トリアジナン(TATA)、N,N',N''-(ベンゼン-1,3,5-トリイル)-トリス(2-プロモアセトアミド)(TBAB)、および/またはN,N',N''-ベンゼン-1,3,5-トリイルトリスプロパ-2-エナミド(TABB)を含む、請求項9に記載の方法。

10

【請求項11】

前記ポリペプチドがシステイン残基を含み、前記ポリペプチドへの前記分子足場の付着のための前記3つの共有結合のうちの少なくとも1つが、前記システイン残基への結合を含む、請求項1~10のいずれか1項に記載の方法。

【請求項12】

少なくとも2つのループ配列によって隔てられている少なくとも3つの反応性基を含むポリペプチドと分子足場とを含むリガンドであって、前記分子足場が、少なくとも2つのポリペプチドループが前記分子足場上に形成されるような、前記ポリペプチドの反応性基との共有結合を形成し、前記リガンドが、請求項1(a)に定義されたポケットを有するがカリクレイン、MDM2、カテプシンGから選択されるポリペプチドではない標的に結合する、リガンド。

20

【請求項13】

少なくとも2つのループ配列によって隔てられている少なくとも3つの反応性基を含むポリペプチドと分子足場とを含むリガンドであって、前記分子足場が、少なくとも2つのポリペプチドループが前記分子足場上に形成されるような、前記ポリペプチドの反応性基との共有結合を形成し、前記リガンドが、

アルファ-2-マクログロブリン；ATP結合カセット、サブファミリーB(MDR/TAP)、メンバー6；ADAMメタロペプチダーゼドメイン17；ADAMメタロペプチダーゼドメイン33；ADAMメタロペプチダーゼドメイン9；アディポネクチン、C1Qおよびコラーゲンドメイン含有；アデノシンA(3)受容体；ベータ3アドレナリン受容体；アグーチ関連タンパク質ホモログ(マウス)；アンギオテンシンII受容体、1型；活性化白血球細胞接着分子；アポリタンパク質E；アポリタンパク質H(ベータ2グリコプロテインI)；アミロイドベータ(A4)前駆体タンパク質；アクアポリン4；アクアポリン5；アミロイド前駆体タンパク質ベータサイト切断酵素1；殺菌性透過性増強タンパク質；補体第1成分、q垂成分、B鎖；補体第1成分、q垂成分、C鎖；補体第1成分、r垂成分；補体第1成分、s垂成分；補体第2成分；補体第6成分；補体第7成分；補体第8成分、ベータポリペプチド；炭酸脱水酵素XII；炭酸脱水酵素IV；炭酸脱水酵素VI；CARTプレプロペプチド；コレシストキニンB受容体；ケモカインCCL11；CD3e分子、イプシロン(CD3-TCR複合体)；CD3g分子、ガンマ(CD3-TCR複合体)；CD40分子、TNF受容体スーパーファミリーメンバー5；CD8a分子；シチジンデアミナーゼ；カドヘリン13、H-カドヘリン(心臓)；カドヘリン関連23；補体因子B；補体因子D(アディプシン)；補体因子H；絨毛性ゴナドトロピン、ベータポリペプチド；チキナーゼ3様1(軟骨糖タンパク質-39)；チキナーゼ、酸性；チキナーゼ1(キトトリオシダーゼ)；キマーゼ1、マスト細胞；カルノシンジペプチダーゼ1(メタロペプチダーゼM20ファミリー)；コンタクチン1；カテコール-O-メチルトランスフェラーゼ；カルボキシペプチダーゼA4；カルボキシペプチダーゼB2(血漿)；セルロプラスミン(フェロキシダーゼ)；カルボキシペプチダーゼN、ポリペプチド1；補体成分(3d/エプスタイン・バーウイルス)受容体2；カテプシンB；カテプシンD；ケモカインCXCR受容体4；上皮増殖因子受容体；エラスター

30

40

50

ぜ、好中球が発現；E P H受容体 A 2；v - e r b - b 2 赤芽球白血病ウイルス癌遺伝子
 ホモログ 2、神経 / 神経膠芽細胞種由来癌遺伝子ホモログ (トリ)；v - e r b - b 2 赤
 芽球白血病ウイルス癌遺伝子ホモログ 3 (トリ)；v - e r b - a 赤芽球白血病ウイルス
 癌遺伝子ホモログ 4 (トリ)；凝固第 X 因子；凝固第 X I 因子；凝固第 X I I I 因子、A
 1 ポリペプチド；凝固第 I I 因子 (トロンビン)；凝固第 I I 因子 (トロンビン) 受容体
 ；凝固第 I I I 因子 (トロンボプラスチン、組織因子)；凝固第 V I I 因子 (血清プロト
 ロンビン転換促進因子)；凝固第 V I I I 因子、凝血促進成分；凝固第 I X 因子；I g E
 の F c フラグメント、低親和性 I I、(C D 2 3) の受容体；I g G の F c フラグメント、
 高親和性 I a、受容体 (C D 6 4)；I g G の F c フラグメント、受容体、トランスポ
 ーター、アルファ；フィコリン (コラーゲン / フィブリノーゲンドメイン含有レクチン)
 2 (フコリン)；フィコリン (コラーゲン / フィブリノーゲンドメイン含有) 3 (ハカタ
 抗原)；葉酸ヒドロラーゼ (前立腺特異膜抗原) 1；濾胞刺激ホルモン、ベータポリペ
 チド；ガンマ - アミノ酪酸 (G A B A) B 受容体、2；U D P - N - アセチル - アルファ
 - D - ガラクトサミン：ポリペプチド - N - アセチルガラクトサミン転移酵素 2 (G a l
 N A c - T 2)；増殖停止特異的 6；群特異成分 (ビタミン D 結合タンパク質)；ガンマ
 - グルタミルヒドロラーゼ (コンジュガーゼ、ホリルポリ - ガンマ - グルタミルヒドロラ
 ーゼ)；成長ホルモン 1；成長ホルモン受容体；グレリン / オベスタチンプレプロペプチ
 ド；胃内因子 (ビタミン B 合成)；胃抑制ポリペプチド受容体；ギャップ結合タンパク質
 、ベータ 2、2 6 k D a；糖タンパク質 I b (血小板)、アルファポリペプチド；糖タン
 パク質 I b (血小板)、ベータポリペプチド；糖タンパク質 V I (血小板)；グルコース
 - 6 - リン酸イソメラーゼ；グルタミン酸受容体、イオンチャネル型、カイニン酸 1；グ
 ルタミン酸受容体、イオンチャネル型、カイニン酸 2；グルタミン酸受容体、代謝型 1；
 グルタミン酸受容体、代謝型 3；グルタミン酸受容体、代謝型 5；グルタミン酸受容体、
 代謝型 7；ゲルゾリン；ヘモクロマトーシス；肝細胞増殖因子 (ヘパポイエチン A；散乱
 係数)；ヘッジホッグ相互作用タンパク質；主要組織適合性複合体、クラス I、G；ヘパ
 ラン硫酸プロテオグリカン 2；H t r A セリンペプチダーゼ 1；ヒアルロノグルコサミニ
 ダーゼ 1；インスリン分解酵素；インターフェロン (アルファ、ベータ、およびオメガ)
 受容体 1；インターフェロン (アルファ、ベータ、およびオメガ) 受容体 2；インターフ
 ェロン、ガンマ；インターフェロンガンマ受容体 1；インスリン様成長因子 1 (ソマトメ
 ジン C)；インスリン様成長因子 1 受容体；インスリン様成長因子 2 (ソマトメジン A)
 ；インスリン様成長因子 2 受容体；インスリン様成長因子結合タンパク質 1；免疫グロブ
 リン重鎖定常部アルファ 1；免疫グロブリン重鎖定常部ガンマ 1 (G 1 m マーカー)；免
 疫グロブリン重鎖定常部ガンマ 2 (G 2 m マーカー)；免疫グロブリン重鎖定常部ガンマ
 4 (G 4 m マーカー)；免疫グロブリン重鎖定常部ミュー；免疫グロブリンカッパ定常部
 ；免疫グロブリンラムダ様ポリペプチド 1；インディアンヘッジホッグ；インターロイキ
 ン 1 0；インターロイキン 1 0 受容体、アルファ；インターロイキン 1 2 A (ナチュラル
 キラー細胞刺激因子 1、細胞傷害性リンパ球成熟因子 1、p 3 5)；インターロイキン 1
 2 B (ナチュラルキラー細胞刺激因子 2、細胞傷害性リンパ球成熟因子 2、p 4 0)；イン
 ターロイキン 1 7 A；インターロイキン 1 7 F；インターロイキン 1 7 受容体 A；イン
 ターロイキン 1 受容体、I 型；インターロイキン 1 受容体アンタゴニスト；インターロイ
 キン 2 1 受容体；インターロイキン 2 受容体、アルファ；インターロイキン 2 受容体、ガ
 ンマ；インターロイキン 3 (コロニー刺激因子、マルチ)；インターロイキン 4 受容体；
 インターロイキン 6 受容体；インターロイキン 7 受容体；インテグリン結合キナーゼ；イン
 スリン受容体；i t c h y E 3 ユビキチン・タンパク質リガーゼ；インテグリン、アル
 ファ 2 b (I I b / I I I a 複合体の血小板糖タンパク質 I I b、抗原 C D 4 1)；イン
 テグリン、アルファ 4 (抗原 C D 4 9 D、V L A - 4 受容体のアルファ 4 サブユニット
)；インテグリン、ベータ 3 (血小板糖タンパク質 I I I a、抗原 C D 6 1)；j a g g
 e d 1；リジル - t R N A 合成酵素；キナーゼ挿入ドメイン受容体 (I I I 型受容体型
 チロシンキナーゼ)；キラー細胞免疫グロブリン様受容体、2 つのドメイン、長い細胞質
 側末端、1；キラー細胞免疫グロブリン様受容体、2 つのドメイン、長い細胞質側末端、

10

20

30

40

50

2 ; キラー細胞免疫グロブリン様受容体、2つのドメイン、長い細胞質側末端、3 ; キラー細胞免疫グロブリン様受容体、3つのドメイン、長い細胞質側末端、1 ; k i n o f I R R E l i k e 3 (ショウジョウバエ) ; K I T リガンド ; v - キットハーディ・ズッカーマン4ネコ肉腫ウイルス癌遺伝子ホモログ ; カリクレイン関連ペプチダーゼ3 ; K R I T 1、アンキリンリピート含有 ; 低密度リボタンパク質受容体 ; レブチン受容体 ; 白血球抑制因子 ; 白血球抑制因子受容体アルファ ; レクチン、マンノース結合、1 ; 低密度リボタンパク質受容体関連タンパク質6 ; マトリックスメタロペプチダーゼ12 (マクロファージエラストラーゼ) ; マトリックスメタロペプチダーゼ13 (コラゲナーゼ3) ; マトリックスメタロペプチダーゼ14 (膜挿入型) ; マトリックスメタロペプチダーゼ1 (間質コラゲナーゼ) ; マトリックスメタロペプチダーゼ7 (マトリライシン、子宮) 10 ; マトリックスメタロペプチダーゼ8 (好中球コラゲナーゼ) ; ミエロペルオキシダーゼ ; ニューロナビゲーター2 ; 細胞傷害誘発受容体3 ; ニューロリギン4、X連鎖 ; ノギン ; 副甲状腺ホルモン1受容体 ; プロテインチロシンホスファターゼ、受容体型、D ; プロテインチロシンホスファターゼ、受容体型、F ; ポリオウイルス受容体 ; レニン ; リボヌクレアーゼ、R N アーゼ A ファミリー、3 ; レナラーゼ、F A D 依存性アミノオキシダーゼ ; セマフォリン7 A、G P I 膜アンカー (J o h n M i l t o n H a g e n 血液型) ; セルピンペプチダーゼインヒビター、クレードA (アルファ - 1 抗プロテイナーゼ、アンチトリプシン)、メンバー10 ; セルピンペプチダーゼインヒビター、クレードC (アンチトロンビン)、メンバー1 ; セルピンペプチダーゼインヒビター、クレードF (アルファ - 2 抗プラスミン、色素上皮由来因子)、メンバー1 ; セルピンペプチダーゼインヒビター、クレードI (ニューロセルピン)、メンバー1 ; スーパーオキシドジスムターゼ3、細胞外 ; ソルビトールデヒドロゲナーゼ ; ソマトスタチン ; s u p p r e s s i o n o f t u m o r i g e n i c i t y 14 (結腸癌) ; シナプシンI I I ; トランスコバラミンI (ビタミンB 12 結合タンパク質、R バインダーファミリー) ; トランスコバラミンI I ; T E K チロシンキナーゼ、内皮 ; トランスフェリン受容体 (p 9 0、C D 7 1) ; トランスフェリン ; 形質転換増殖因子、ベータ1 ; 形質転換増殖因子、ベータ2 ; 形質転換増殖因子、ベータ3 ; 形質転換増殖因子、ベータ受容体1 ; 形質転換増殖因子、ベータ受容体I I (7 0 / 8 0 k D a) ; T I M P メタロペプチダーゼ阻害因子1 ; T I M P メタロペプチダーゼ阻害因子2 ; T I M P メタロペプチダーゼ阻害因子3 ; トロイド様1 ; T o l l 様受容体1 ; T o l l 様受容体2 ; T o l l 様受容体3 ; T o l l 様受容体4 ; T o l l 様受容体5 ; 腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリー、メンバー10 b ; 腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリー、メンバー13 C ; 腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリー、メンバー1 A ; 腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリー、メンバー1 B ; 腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリー、メンバー4 ; 腫瘍壊死因子 ; トリプターゼベータ2 (遺伝子 / 偽遺伝子) ; 甲状腺刺激ホルモン受容体 ; トランスサイレチン ; タビーホモログ (マウス) ; タビー様タンパク質1 ; 血管細胞接着分子1 ; 血管作動性腸ペプチド受容体2 ; プレB細胞1 ; V セットおよび免疫グロブリンドメイン含有4 ; キサンチンデヒドロゲナーゼ ; ならびにチロシル - t R N A 合成酵素 20 ; からなる群から選択される標的に結合する、リガンド。

【請求項14】

請求項3に記載の方法によって調製される場合の、請求項12または13に記載のリガンド。

【請求項15】

疾患、好ましくは、炎症状態、アレルギー性過敏症、がん、細菌性もしくはウイルス感染、または自己免疫障害の治療における、請求項12～14のいずれか1項に記載のリガンドの使用。

【請求項16】

標的に結合することができる請求項12～15のいずれか1項に記載のリガンドを、同定する方法であって、

(i) 複数の請求項12～15のいずれか1項に記載のリガンドを用意するステップと

10

20

30

40

50

、

(i i) 前記複数のリガンドを、標的と接触させるステップと、および

(i i i) 前記標的に結合するこれらのリガンドを選択するステップとを含む方法。

【請求項 17】

前記リガンドのポリペプチド成分の配列決定することをさらに含む、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 18】

前記標的に結合することができるものとして単離されたりガンドを大量に製造するステップをさらに含む、請求項 16 または 17 に記載の方法。

10

【請求項 19】

請求項 14 または請求項 15 の方法に従って単離された、または同定されたポリペプチド - 分子足場コンジュゲートリガンドを大量に製造するステップをさらに含み、前記製造が分子足場をポリペプチドに付着させることを含み、前記ポリペプチドが遺伝子組換えによって発現される、または化学的に合成される、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 20】

ポリペプチドの N 末端または C 末端の 1 つまたは複数においてポリペプチドを伸長させるステップをさらに含む、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 21】

前記ポリペプチド - 分子足場コンジュゲートリガンドをさらなるポリペプチドにコンジュゲートさせるステップをさらに含む、請求項 19 または 20 に記載の方法。

20

【請求項 22】

前記コンジュゲーションが、

(i) ポリペプチドに、分子足場への結合の後、さらなるシステインを付加するステップと、および

(i i) 前記ポリペプチドを、前記さらなるシステインへのジスルフィド結合を介して前記さらなるポリペプチドにコンジュゲートするステップとによって実行される、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 23】

少なくとも 2 つのループ配列によって隔てられている少なくとも 3 つの反応性基を含むポリペプチドと分子足場とを含むリガンドであって、前記分子足場が、少なくとも 2 つのポリペプチドループが前記分子足場上に形成されるような、前記ポリペプチドの反応性基との共有結合を形成する、リガンドの標的を選択する、コンピューターにより実現される方法であって、

30

(a) (i) 約 1 0 0 0 ~ 3 0 0 0 ³ の容積、および

(i i) 少なくとも 1 つの溶媒露出末端

によって定義される、少なくとも 1 つのポケットを含むタンパク質を同定するために、ポリペプチド構造のデータベースを調べるステップと、

(b) 前記データベースにおいて、少なくとも 1 つの、(a) に定義されたポケットを含むタンパク質の第 1 のセットを同定するステップと、

40

(c) タンパク質の前記第 1 のセットを、タンパク質 - タンパク質相互作用に関与するタンパク質ドメインのデータベースと比較するステップと、

(d) タンパク質の前記第 1 のセットにおいて、別のタンパク質との相互作用に寄与すると推定されているドメイン中に位置する少なくとも 1 つのポケットを含む 1 つまたは複数のタンパク質を同定するステップとを含む方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

50

本発明は、ポリペプチドリガンド、そのようなりガンドを選択する方法、およびそのようなりガンドの結合標的を選択する方法の分野に関する。特に、本発明は、少なくとも2つのループ配列によって隔てられている少なくとも3つの反応性基と；分子足場とを含むポリペプチドリガンドであって、前記分子足場が、少なくとも2つのポリペプチドループが前記分子足場上に形成されるような、ポリペプチドの反応性基との共有結合を形成する、ポリペプチドリガンドの結合標的を選択することに関する。

【背景技術】

【0002】

環状ペプチドは、アミノ末端とカルボキシル末端、アミノ末端と側鎖、カルボキシル末端と側鎖、または側鎖と側鎖とが、環を生成する共有結合によって結合しているポリペプチドである。

10

【0003】

環状ペプチドは、高い親和性および標的特異性を有してタンパク質標的に結合することができ、したがって治療法の開発のために魅力的な分子類である。実際に、幾つかの環状ペプチド、例えば抗菌ペプチドバンコマイシン、免疫抑制剤シクロスポリン、または抗がん剤オクレオチドなどは、臨床における使用に成功している(Driggers, et al., Nat Rev Drug Discov 2008, 7(7), 608-24)。良好な結合特性は、ペプチドと標的との間に形成される比較的大きな相互作用表面および環状構造の構造的柔軟性の低さに起因する。典型的には、大環状分子は、例えば、環状ペプチドCXCR4アンタゴニストCVX15(400²; Wu, B., et al., Science, 330(6007), 1066-71)、インテグリン $\alpha V \beta 3$ に結合するArg-Gly-Aspモチーフを有する環状ペプチド(355²)(Xiong, J. P., et al., Science, 2002, 296(5565), 151-5)、またはウロキナーゼ型プラスミノゲン活性化因子に結合する環状ペプチド阻害剤ウpain-1(upain-1)(603²; Zhao, G., et al., J Struct Biol, 2007, 160(1), 1-10)のように、数百平方オングストロームの面に結合する。

20

【0004】

ペプチド大環状分子は、環状構成であるため、線状ペプチドに比べて柔軟性が低く、これにより、標的への結合に関するエントロピーの損失がより小さくなり、より高い結合親和性がもたらされる。柔軟性の低さはまた、標的特異的立体構造を固定し、線状ペプチドと比較して結合特異性を高める。この作用は、マトリックスメタロプロテイナーゼ8(MMP-8)の強力で選択的な阻害剤が、その環が開かれると、他のMMPと比べてその選択性を失ったことによって実証されている(Cherney, R. J., et al., J Med Chem, 1998, 41(11), 1749-51)。大環状化によって獲得された好ましい結合特性は、例えばバンコマイシン、ナイシン、またはアクチノマイシンのような、複数のペプチド環を有する多環ペプチドではよりいっそう顕著である。

30

【0005】

様々な研究チームが、既に、システイン残基を有するポリペプチドを合成分子構造に繋げている(Kemp, D. S. and McNamara, P. E., J. Org. Chem, 1985; Timmerman, P. et al., ChemBioChem, 2005)。Meloenと共同研究者らは、タンパク質表面の構造的模倣のために、トリス(プロモメチル)ベンゼンおよび関連分子を使用して、多重ペプチドループを合成足場上へ迅速かつ定量的に環状化した(Timmerman, P. et al., ChemBioChem, 2005)。システイン含有ポリペプチドを例えばトリス(プロモメチル)ベンゼンのような分子足場に結合させることによる、候補薬剤化合物の生成方法が、WO2004/077062およびWO2006/078161に開示されている。

40

【0006】

WO2004/077062は、候補薬剤化合物を選択する方法を開示している。詳細には、この文書では、第1および第2の反応性基を含む様々な足場分子、および前記足場

50

をさらなる分子と接触させて、カップリング反応において前記足場とさらなる分子との間に少なくとも2つの結合を形成することが開示されている。

【0007】

WO2006/078161は、結合化合物、免疫原性化合物、およびペプチド模倣薬を開示している。この文献では、存在するタンパク質から得たペプチドの様々なコレクションの人工合成が開示されている。これらのペプチドは、次いで、コンビナトリアルライブラリーを作製するために、導入された幾つかのアミノ酸変化を有する定常部合成ペプチドと組み合わされる。化学結合を介してこの多様性を導入して、様々なアミノ酸変化を特徴とするペプチドを分離することによって、望ましい結合活性を発見できる機会を増やすことができる。ここで開示された構築物は、典型的にはシステイン残基を含む-SH基をもつペプチド、および典型的には足場上のビス-またはトリス-プロモフェニルベンゼンなどのベンジリックハロゲン置換基を含む複素環式芳香族基に、典型的には依存している。そのような基は、反応して、ペプチドと足場との間にチオエーテル結合を形成する。

10

【0008】

Heinisらが、最近、ファージディスプレイをベースとしたコンビナトリアル手法を開発して、目的の標的に対して二環ペプチドの大規模なライブラリーを作製し、スクリーニングした(Heinis, et al., Nat Chem Biol, 2009, 5(7), 502-7; 国際特許出願WO2009/098450もまた参照されたい)。簡潔に述べると、3つのシステイン残基およびランダムな6アミノ酸の2つの領域を含有する線状ペプチド(Cys-(Xaa)₆-Cys-(Xaa)₆-Cys)のコンビナトリアルライブラリーを、ファージ上にディスプレイさせ、システイン側鎖を低分子(トリス-(プロモメチル)ベンゼン)に共有結合させることによって環化させた。ヒトプロテアーゼカテプシンGおよび血漿カリクレイン(PK)に対する親和性の選択において単離された二環性ペプチドは、ナノモルの阻害定数を有していた。最良の阻害剤であるPK15は、3 nMのK_iでヒトPK(hPK)を阻害する。幾つかの単離された二環性ペプチドのアミノ酸配列における類似性は、両方のペプチドループが結合に寄与することを示唆していた。PK15は、試験した最高濃度において(10 mM)、ラットPK(81%配列同一性)、相同なヒトセリンプロテアーゼ第XI因子a(hfXIa; 69%配列同一性)、またはトロンビン(36%配列同一性)のいずれも阻害しなかった(Heinis, et al., Nat Chem Biol, 2009, 5(7), 502-7)。この知見は、二環性阻害剤が、その標的に対する高い親和性を有しており、特異性が高いことを示唆するものである。

20

30

【0009】

新たな用途を特定するために、ペプチドリガンドの、特に環状ペプチドの標的を同定する改良された方法が必要である。具体的には、リガンドの特異的標的への結合によって、前記リガンドを好適な薬物様分子とみなすことができる。特異的リガンドの標的を、速く、安価に、かつ/またはより効率的に同定する能力によって、薬物創製の流れが速まり、医療用に好適な分子のより迅速な認可が可能となるはずである。前記リガンドはまた、それらの使用の容易さおよび適合性を高める、可変性のプロテアーゼ安定性および溶解度プロファイルを有し得る。ポリペプチドリガンドは、注射、吸入、経鼻、点眼、経口、または局所投与のために使用することもできる。ポリペプチドリガンド、特に環状ペプチドまたはBicyclic(登録商標)ペプチドの使用は、安価に生産でき使用しやすいため、さらに好都合である。

40

【発明の概要】

【0010】

したがって、一態様において、本発明は、少なくとも2つのループ配列によって隔てられている少なくとも3つの反応性基を含むポリペプチドと分子足場とを含むリガンドであって、前記分子足場が、少なくとも2つのポリペプチドループが前記分子足場上に形成されるような、前記ポリペプチドの反応性基との共有結合を形成する、リガンドの標的を選択する方法であって、

50

(a)(i) 約 1000 ~ 3000³ の容積、および

(ii) 少なくとも 1 つの溶媒露出末端

の特徴を備えるポケットの存在について、1 つまたは複数のタンパク質をスクリーニングするステップと、ならびに

(b) (a) に定義されたポケットを少なくとも 1 つ有する少なくとも 1 つのタンパク質を選択するステップとを含む方法を提供する。

【0011】

好ましくは、(a) に定義されたポケットはまた、(10 ~ 30) × (10 ~ 30) × (5 ~ 30) の内部寸法を備える。

10

【0012】

好ましくは、ポリペプチドリガンドは、環状ペプチドであり、最も好ましくは二環性ペプチドである。

【0013】

ポケットの溶媒露出面積は、好ましくは、二環の面積に少なくとも等しく、すなわち、少なくとも 900 ~ 1300² である。

【0014】

ポケットの溶媒露出末端は、好ましくは、タンパク質の開口部を介して、少なくとも 5 幅で露出している。

20

【0015】

一実施形態において、リガンドは、標的の阻害剤として作用する。さらなる実施形態において、リガンドは、標的のアゴニストとして作用する。別の実施形態において、リガンドは、標的に対して中立的な（活性の変化がない）作用を有する。

【0016】

第 2 の態様において、本発明は、少なくとも 2 つのループ配列によって隔てられている少なくとも 3 つの反応性基を含むポリペプチドと分子足場とを含むリガンドであって、前記分子足場が、少なくとも 2 つのポリペプチドループが前記分子足場上に形成されるような、前記ポリペプチドの反応性基との共有結合を形成する、リガンドを選択する方法であって、

(a) 上記の本発明の第 1 の態様に従って、ポケットの存在について、1 つまたは複数のタンパク質をスクリーニングし、少なくとも 1 つのそのようなポケットを有する少なくとも 1 つのタンパク質を選択するステップと、

30

(b) 前記少なくとも 1 つのタンパク質を前記リガンドのうちの 1 つまたは複数と接触させ、前記タンパク質に結合する少なくとも 1 つのリガンドを選択するステップとを含む方法を提供する。

【0017】

第 3 の態様において、本発明はまた、少なくとも 2 つのループ配列によって隔てられている少なくとも 3 つの反応性基を含むポリペプチドと分子足場とを含むリガンドであって、前記分子足場が、少なくとも 2 つのポリペプチドループが前記分子足場上に形成されるような、前記ポリペプチドの反応性基との共有結合を形成する、リガンドを調製する方法であって、

40

(a) 上記の第 2 の態様に記載された方法に従って選択されたりリガンドの、ポリペプチド成分のアミノ酸配列を決定するステップと、

(b) (a) において決定された配列を有するポリペプチドを合成するステップと、

(c) 前記ポリペプチドを分子足場と反応させて、前記リガンドを生成させるステップとを含む方法を提供する。

【0018】

本発明の方法はまた、ポケットが、さらなるタンパク質とのタンパク質 - タンパク質相互作用に關与するタンパク質ドメイン中に位置するかどうかを、決定するステップをさら

50

に含んでもよい。

【0019】

本発明の方法はまた、標的タンパク質を請求項1に定義されたりガンドのライブラリーに暴露し、標的タンパク質に結合する1つまたは複数のリガンドを選択するステップをさらに含んでもよい。

【0020】

本発明の方法において、分子足場は、好ましくは、分子足場をポリペプチドに付着させる共有結合の数と対応する分子対称性を有する。一部の実施形態において、分子足場は、3回対称の分子対称性を有し、分子足場は、3つの共有結合によってポリペプチドに付着している。

10

【0021】

本発明の方法において、分子足場は、構造的に強固な化学基を含んでいてもよい。好ましい実施形態において、分子足場は、トリス-（プロモメチル）ベンゼン（TBM B）、1, 3, 5-トリアクリロイル-1, 3, 5-トリアジナン（TATA）、N, N', N''-（ベンゼン-1, 3, 5-トリイル）-トリス（2-プロモアセトアミド）（TBAB）、および/またはN, N', N''-ベンゼン-1, 3, 5-トリイルトリスプロパ-2-エナミド（TAA B）を含む。

【0022】

本発明の幾つかの実施形態において、ポリペプチドは、システイン残基を含み、前記分子足場がポリペプチドに付着するための前記3つの共有結合のうちの少なくとも1つは、前記システイン残基への結合を含む。

20

【0023】

さらなる態様において、本発明は、少なくとも2つのループ配列によって隔てられている少なくとも3つの反応性基を含むポリペプチドと分子足場とを含むリガンドであって、前記分子足場が、少なくとも2つのポリペプチドループが前記分子足場上に形成されるような、前記ポリペプチドの反応性基との共有結合を形成し、前記リガンドが、前記請求項1(a)に定義されたポケットを有するガリクレイン、MDM2、カテプシンGから選択されるポリペプチドではない標的に結合する、リガンドを含む。

【0024】

一実施形態において、本発明の前記リガンドは、少なくとも2つのループ配列によって隔てられている少なくとも3つの反応性基を含むポリペプチドと分子足場とを含み、前記分子足場は、少なくとも2つのポリペプチドループが前記分子足場上に形成されるような、前記ポリペプチドの反応性基との共有結合を形成し、前記リガンドは、

30

アルファ-2-マクログロブリン；ATP結合カセット、サブファミリーB（MDR / TAP）、メンバー6；ADAMメタロペプチダーゼドメイン17；ADAMメタロペプチダーゼドメイン33；ADAMメタロペプチダーゼドメイン9；アディポネクチン、C1Qおよびコラーゲンドメイン含有；アデノシンA（3）受容体；ベータ3アドレナリン受容体；アグーチ関連タンパク質ホモログ（マウス）；アンギオテンシンII受容体、1型；活性化白血球細胞接着分子；アポリポタンパク質E；アポリポタンパク質H（ベータ2グリコプロテインI）；アミロイドベータ（A4）前駆体タンパク質；アクアポリン4；アクアポリン5；アミロイド前駆体タンパク質ベータサイト切断酵素1；殺菌性透過性増強タンパク質；補体第1成分、q垂成分、B鎖；補体第1成分、q垂成分、C鎖；補体第1成分、r垂成分；補体第1成分、s垂成分；補体第2成分；補体第6成分；補体第7成分；補体第8成分、ベータポリペプチド；炭酸脱水酵素XII；炭酸脱水酵素IV；炭酸脱水酵素VI；CARTプレプロペプチド；コレシストキニンB受容体；ケモカインCCL11；CD3e分子、イブシロン（CD3-TCR複合体）；CD3g分子、ガンマ（CD3-TCR複合体）；CD40分子、TNF受容体スーパーファミリーメンバー5；CD8a分子；シチジンデアミナーゼ；カドヘリン13、H-カドヘリン（心臓）；カドヘリン関連23；補体因子B；補体因子D（アディプシン）；補体因子H；絨毛性ゴナドトロピン、ベータポリペプチド；チキナーゼ3様1（軟骨糖タンパク質-39）；チキ

40

50

ナーゼ、酸性；チキナーゼ 1（キトトリオシダーゼ）；キマーゼ 1、マスト細胞；カルノ
 シンジペプチダーゼ 1（メタロペプチダーゼ M 2 0 ファミリー）；コンタクチン 1；カテ
 コール - O - メチルトランスフェラーゼ；カルボキシペプチダーゼ A 4；カルボキシペプ
 チダーゼ B 2（血漿）；セルロプラスミン（フェロキシダーゼ）；カルボキシペプチダー
 ゼ N、ポリペプチド 1；補体成分（3 d / エプスタイン・バーウイルス）受容体 2；カテ
 プシン B；カテプシン D；ケモカイン C X C 受容体 4；上皮増殖因子受容体；エラスター
 ゼ、好中球が発現；E P H 受容体 A 2；v - e r b - b 2 赤芽球白血病ウイルス癌遺伝子
 ホモログ 2、神経 / 神経膠芽細胞種由来癌遺伝子ホモログ（トリ）；v - e r b - b 2 赤
 芽球白血病ウイルス癌遺伝子ホモログ 3（トリ）；v - e r b - a 赤芽球白血病ウイルス
 癌遺伝子ホモログ 4（トリ）；凝固第 X 因子；凝固第 X I 因子；凝固第 X I I I 因子、A
 1 ポリペプチド；凝固第 I I 因子（トロンビン）；凝固第 I I 因子（トロンビン）受容体
 ；凝固第 I I I 因子（トロンボプラスチン、組織因子）；凝固第 V I I 因子（血清プロト
 ロンビン転換促進因子）；凝固第 V I I I 因子、凝血促進成分；凝固第 I X 因子；I g E
 の F c フラグメント、低親和性 I I、（C D 2 3）の受容体；I g G の F c フラグメント
 、高親和性 I a、受容体（C D 6 4）；I g G の F c フラグメント、受容体、トランスポ
 ーター、アルファ；フィコリン（コラーゲン / フィブリノーゲンドメイン含有レクチン）
 2（フコリン（h u c o l i n））；フィコリン（コラーゲン / フィブリノーゲンドメイ
 ン含有）3（ハカタ抗原）；葉酸ヒドロラーゼ（前立腺特異膜抗原）1；濾胞刺激ホルモ
 ン、ベータポリペプチド；ガンマ - アミノ酪酸（G A B A）B 受容体、2；U D P - N -
 アセチル - アルファ - D - ガラクトサミン；ポリペプチド - N - アセチルガラクトサミン
 転移酵素 2（G a l N A c - T 2）；増殖停止特異的 6；群特異成分（ビタミン D 結合タ
 ンパク質）；ガンマ - グルタミルヒドロラーゼ（コンジュガーゼ、ホリルポリ - ガンマ -
 グルタミルヒドロラーゼ）；成長ホルモン 1；成長ホルモン受容体；グレリン / オベスタ
 チンプレプロペプチド；胃内因子（ビタミン B 合成）；胃抑制ポリペプチド受容体；ギャ
 ップ結合タンパク質、ベータ 2、2 6 k D a；糖タンパク質 I b（血小板）、アルファポリ
 ペプチド；糖タンパク質 I b（血小板）、ベータポリペプチド；糖タンパク質 V I（血
 小板）；グルコース - 6 - リン酸イソメラーゼ；グルタミン酸受容体、イオンチャネル型
 、カイニン酸 1；グルタミン酸受容体、イオンチャネル型、カイニン酸 2；グルタミン酸
 受容体、代謝型 1；グルタミン酸受容体、代謝型 3；グルタミン酸受容体、代謝型 5；グ
 ルタミン酸受容体、代謝型 7；ゲルゾリン；ヘモクロマトーシス；肝細胞増殖因子（ヘパ
 ポイエチン A（h e p a p o i e t i n A）；散乱係数）；ヘッジホッグ相互作用タン
 パク質（h e d g e h o g i n t e r a c t i n g p r o t e i n）；主要組織適合
 性複合体、クラス I、G；ヘパラン硫酸プロテオグリカン 2；H t r A セリンペプチダー
 ゼ 1；ヒアルロノグルコサミニダーゼ 1；インスリン分解酵素；インターフェロン（アル
 ファ、ベータ、およびオメガ）受容体 1；インターフェロン（アルファ、ベータ、および
 オメガ）受容体 2；インターフェロン、ガンマ；インターフェロンガンマ受容体 1；イン
 スリン様成長因子 1（ソマトメジン C）；インスリン様成長因子 1 受容体；インスリン様
 成長因子 2（ソマトメジン A）；インスリン様成長因子 2 受容体；インスリン様成長因子
 結合タンパク質 1；免疫グロブリン重鎖定常部アルファ 1；免疫グロブリン重鎖定常部ガ
 ンマ 1（G 1 m マーカー）；免疫グロブリン重鎖定常部ガンマ 2（G 2 m マーカー）；免
 疫グロブリン重鎖定常部ガンマ 4（G 4 m マーカー）；免疫グロブリン重鎖定常部ミュー
 ；免疫グロブリンカッパ定常部；免疫グロブリンラムダ様ポリペプチド 1；インディアン
 ヘッジホッグ；インターロイキン 1 0；インターロイキン 1 0 受容体、アルファ；インタ
 ーロイキン 1 2 A（ナチュラルキラー細胞刺激因子 1、細胞傷害性リンパ球成熟因子 1、
 p 3 5）；インターロイキン 1 2 B（ナチュラルキラー細胞刺激因子 2、細胞傷害性リン
 パ球成熟因子 2、p 4 0）；インターロイキン 1 7 A；インターロイキン 1 7 F；インタ
 ーロイキン 1 7 受容体 A；インターロイキン 1 受容体、I 型；インターロイキン 1 受容体
 アンタゴニスト；インターロイキン 2 1 受容体；インターロイキン 2 受容体、アルファ；
 インターロイキン 2 受容体、ガンマ；インターロイキン 3（コロニー刺激因子、マルチ）
 ；インターロイキン 4 受容体；インターロイキン 6 受容体；インターロイキン 7 受容体；

10

20

30

40

50

インテグリン結合キナーゼ；インスリン受容体；i t c h y E 3 ユビキチン・タンパク質リガーゼ；インテグリン、アルファ2b (I I b / I I I a 複合体の血小板糖タンパク質 I I b、抗原 C D 4 1) ；インテグリン、アルファ4 (抗原 C D 4 9 D、V L A - 4 受容体のアルファ4サブユニット) ；インテグリン、ベータ3 (血小板糖タンパク質 I I I a、抗原 C D 6 1) ；j a g g e d 1 ；リジル - t R N A 合成酵素；キナーゼ挿入ドメイン受容体 (I I I 型受容体型チロシンキナーゼ) ；キラー細胞免疫グロブリン様受容体、2つのドメイン、長い細胞質側末端、1 ；キラー細胞免疫グロブリン様受容体、2つのドメイン、長い細胞質側末端、2 ；キラー細胞免疫グロブリン様受容体、2つのドメイン、長い細胞質側末端、3 ；キラー細胞免疫グロブリン様受容体、3つのドメイン、長い細胞質側末端、1 ；k i n o f I R R E l i k e 3 (ショウジョウバエ) ；K I T リガンド；v - キットハーディ・ズッカーマン4ネコ肉腫ウイルス癌遺伝子ホモログ；カリクレイン関連ペプチダーゼ3 ；K R I T 1、アンキリンリピート含有；低密度リボタンパク質受容体；レプチン受容体；白血抑制因子；白血抑制因子受容体アルファ；レクチン、マンノース結合、1 ；低密度リボタンパク質受容体関連タンパク質6 ；マトリックスメタロペプチダーゼ12 (マクロファージエラストラーゼ) ；マトリックスメタロペプチダーゼ13 (コラゲナーゼ3) ；マトリックスメタロペプチダーゼ14 (膜挿入型) ；マトリックスメタロペプチダーゼ1 (間質コラゲナーゼ) ；マトリックスメタロペプチダーゼ7 (マトリライシン、子宮) ；マトリックスメタロペプチダーゼ8 (好中球コラゲナーゼ) ；ミエロペルオキシダーゼ；ニューロンナビゲーター2 ；細胞傷害誘発受容体3 ；ニューロリギン4、X連鎖；ノギン；副甲状腺ホルモン1受容体；プロテインチロシンホスファターゼ、受容体型、D ；プロテインチロシンホスファターゼ、受容体型、F ；ポリオウイルス受容体；レニン；リボヌクレアーゼ、R N アーゼAファミリー、3 ；レナラーゼ、F A D 依存性アミノキシダーゼ；セマフォリン7A、G P I 膜アンカー (J o h n M i l t o n H a g e n 血液型) ；セルピンペプチダーゼインヒビター、クレードA (アルファ - 1 抗プロテイナーゼ、アンチトリプシン)、メンバー10 ；セルピンペプチダーゼインヒビター、クレードC (アンチトロンビン)、メンバー1 ；セルピンペプチダーゼインヒビター、クレードF (アルファ - 2 抗プラスミン、色素上皮由来因子)、メンバー1 ；セルピンペプチダーゼインヒビター、クレードI (ニューロセルピン)、メンバー1 ；スーパーオキシドジスムターゼ3、細胞外；ソルビトールデヒドロゲナーゼ；ソマトスタチン；s u p p r e s s i o n o f t u m o r i g e n i c i t y 14 (結腸癌) ；シナプシン I I I ；トランスコバラミン I (ビタミン B 1 2 結合タンパク質、R バインダーファミリー) ；トランスコバラミン I I ；T E K チロシンキナーゼ、内皮；トランスフェリン受容体 (p 9 0、C D 7 1) ；トランスフェリン；形質転換増殖因子、ベータ1 ；形質転換増殖因子、ベータ2 ；形質転換増殖因子、ベータ3 ；形質転換増殖因子、ベータ受容体1 ；形質転換増殖因子、ベータ受容体 I I (7 0 / 8 0 k D a) ；T I M P メタロペプチダーゼ阻害因子1 ；T I M P メタロペプチダーゼ阻害因子2 ；T I M P メタロペプチダーゼ阻害因子3 ；トロイド様1 ；T o l l 様受容体1 ；T o l l 様受容体2 ；T o l l 様受容体3 ；T o l l 様受容体4 ；T o l l 様受容体5 ；腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリー、メンバー10b ；腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリー、メンバー13C ；腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリー、メンバー1A ；腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリー、メンバー1B ；腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリー、メンバー4 ；腫瘍壊死因子；トリプターゼベータ2 (遺伝子 / 偽遺伝子) ；甲状腺刺激ホルモン受容体；トランスサイレチン；タビーホモログ (t u b b y h o m o l o g) (マウス) ；タビー様タンパク質1 (t u b b y l i k e p r o t e i n 1) ；血管細胞接着分子1 ；血管作動性腸ペプチド受容体2 ；プレB細胞1 ；Vセットおよび免疫グロブリンドメイン含有4 ；キサンチンデヒドロゲナーゼ；およびチロシル - t R N A 合成酵素からなる群から選択される標的に結合する。

【0025】

さらなる態様において、前記リガンドは、上記の第3の態様の方法に従って調製される。

。

10

20

30

40

50

【0026】

さらなる態様において、本発明はまた、疾患、好ましくは炎症状態、アレルギー性過敏症、がん、細菌性もしくはウイルス感染、または自己免疫障害の治療における上記のリガンドの使用も企図する。

【0027】

本発明はまた、標的に結合することができる上記のようなリガンドを同定する方法であって、

- (i) 複数の上記のようなリガンドを用意するステップと、
- (ii) 前記複数のリガンドを、標的と接触させるステップと、
- (iii) 前記標的に結合するこれらのリガンドを選択するステップと

を含む方法を含む。

10

【0028】

リガンドを同定する前記方法は、前記リガンドのポリペプチド成分の配列を決定するステップをさらに含んでもよい。

【0029】

リガンドを同定する前記方法は、前記標的に結合することができるものとして単離されたりガンドを大量に製造するステップをさらに含んでもよい。上記のようなリガンドを同定する方法によって単離されたまたは同定されたポリペプチド - 分子足場コンジュゲートリガンドを大量に製造するさらなるステップを追加してもよい。前記製造は、分子足場をポリペプチドに付着させるステップを含み、前記ポリペプチドは、遺伝子組換えによって発現される、または化学的に合成される。前記方法は、ポリペプチドのN末端またはC末端の1つまたは複数においてポリペプチドを伸長させるステップをさらに含んでもよい。前記方法は、前記ポリペプチド - 分子足場コンジュゲートリガンドをさらなるポリペプチドにコンジュゲートさせるステップをさらに含んでもよい。

20

【0030】

ポリペプチド - 分子足場コンジュゲートリガンドのさらなるポリペプチドへのコンジュゲーションは、

- (i) ポリペプチドに、分子足場への結合の後、さらなるシステインを付加するステップと、
 - (ii) 前記ポリペプチドを、前記さらなるシステインへのジスルフィド結合を介して、前記さらなるポリペプチドにコンジュゲートさせるステップと
- によって実施してもよい。

30

【0031】

本発明のさらなる態様は、少なくとも2つのループ配列によって隔てられている少なくとも3つの反応性基を含むポリペプチドと分子足場とを含むリガンドであって、前記分子足場が、少なくとも2つのポリペプチドループが前記分子足場上に形成されるような、前記ポリペプチドの反応性基との共有結合を形成する、リガンドの標的を選択する、コンピューターにより実現される方法であって、

- (a) (i) 約1000 ~ 3000³の容積、および

- (ii) 少なくとも1つの溶媒露出末端

の特徴を備える、少なくとも1つのポケットを含むタンパク質を同定するために、ポリペプチド構造のデータベースを調べるステップと、

- (b) 前記データベースにおいて、(a)に定義されたポケットを少なくとも1つ含むタンパク質の第1のセットを同定するステップと、

- (c) タンパク質の前記第1のセットを、タンパク質 - タンパク質相互作用に關与するタンパク質ドメインのデータベースと比較するステップと、

- (d) タンパク質の前記第1のセットにおいて、別のタンパク質との相互作用に寄与すると推定されているドメイン中に位置する少なくとも1つのポケットを含む1つまたは複数のタンパク質を同定するステップと

を含む方法を含む。

40

50

【0032】

本発明はまた、上記のリガンドの標的を選択する、コンピューターにより実現される方法を実行するシステムも企図する。

【0033】

本発明はまた、製薬としての本発明のポリペプチドリガンドの使用も企図する。

【0034】

本発明はまた、治療または診断の方法における本発明のポリペプチドリガンドの使用も企図する。

【発明を実施するための形態】

【0035】

別段の定義がない限り、本明細書において使用する技術および科学用語はすべて、ペプチド化学、細胞培養およびファージディスプレイ、核酸化学、ならびに生化学などの技術分野の技術者によって一般的に理解される意味と同じ意味を有する。分子生物学、遺伝的および生化学的方法については、参照により本明細書に組み込まれている標準的技術を使用する(Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd ed., 2001, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Ausubel et al., Short Protocols in Molecular Biology (1999) 4th ed., John Wiley & Sons, Inc.を参照されたい)。

10

20

【0036】

本発明は、ポリペプチドリガンドの標的を選択する方法、前記標的、前記リガンド、ならびに前記標的およびリガンドの使用方法および製造方法に関する。

【0037】

最も好ましい実施形態において、本発明は、少なくとも2つのループ配列によって隔てられている少なくとも3つの反応性基を含むポリペプチドと分子足場とを含むリガンドであって、前記分子足場が、少なくとも2つのポリペプチドループが前記分子足場上に形成されるような、前記ポリペプチドの反応性基との共有結合を形成する、リガンドの標的を選択する方法であって、

(a)(i)約1000~3000³の容積、および

(ii)少なくとも1つの溶媒露出末端

の特徴を備えるポケットの存在について、1つまたは複数のタンパク質をスクリーニングするステップと、

(b)(a)に定義されたポケットを少なくとも1つ有する少なくとも1つのタンパク質を選択するステップとを含む方法に関する。

30

【0038】

<リガンド>

本明細書において使用する場合、「リガンド」という用語は、任意の分子、分子の一部、イオン、原子、モチーフ、抗体、エピトープ、受容体、またはそれらの任意の部分に結合する、イオンまたは分子を指す。本発明において使用されるリガンドは、好ましくはペプチドを含み、またはペプチドからなり、ほとんどの実施形態ではポリペプチドである。

40

【0039】

(ポリ)ペプチド「リガンド」または(ポリ)ペプチド「コンジュゲート」(本明細書において、文脈上、単に「ペプチド」または「ポリペプチド」呼ばれることもある)は、本明細書において言及される場合、分子足場に共有結合したポリペプチドを指す。典型的には、そのようなポリペプチドは、足場への共有結合を形成することができる2つ以上の反応性基と、ペプチドが足場に結合される際にループを形成するため「ループ配列」と呼ばれる、前記反応性基間に内在する配列とを含む。本発明の場合、ポリペプチドリガンドは、少なくとも3つの反応性基を含み、足場上で少なくとも2つのループを形成する。

50

【 0 0 4 0 】

本発明のポリペプチドリガンドは、天然に存在し得る。好ましくは、本発明のポリペプチドリガンドは、合成されたものであり、または天然に存在するポリペプチドリガンドから改変されたものである。

【 0 0 4 1 】

本明細書で使用される「タンパク質」という用語は、技術分野における一般的な意味をとり、誘導体化されたタンパク質、膜タンパク質、細胞骨格タンパク質、および細胞質タンパク質を含む。タンパク質は、天然アミノ酸および合成アミノ酸を含む、任意の数のアミノ酸を含む。いずれのポリペプチドもまた、タンパク質に相当する。

【 0 0 4 2 】

10

好ましくは、ポリペプチドリガンドは、B i c y c l e（登録商標）である。

【 0 0 4 3 】

一実施形態において、本発明の方法において使用されるペプチドリガンドは、少なくとも1000～2500³、より好ましくは、少なくとも1250～2500³、最も好ましくは、少なくとも1400～2200³の容積を有する標的ポケットと相互作用する。

【 0 0 4 4 】

一実施形態において、本発明の方法において使用されるペプチドリガンドは、少なくとも700～1500²、最も好ましくは900～1300²の面積を有する。

【 0 0 4 5 】

20

本明細書において使用する場合「反応性基」という用語は、分子足場と共有結合を形成することができる基を指す。典型的には、反応性基は、ペプチドリガンド上のアミノ酸側鎖上に存在する。例としては、システイン、リジン、およびセレノシステインなどのアミノ含有基がある。

【 0 0 4 6 】

「特異性」という用語は、本明細書の文脈において、リガンドが、その同系の標的に類似する実体を除いて、該標的と結合する能力またはそうでなければ相互作用する能力を指す。例えば、特異性は、リガンドが、様々な種由来の相同な酵素ではなくヒト酵素の相互作用を阻害する能力を指すことができる。本明細書に記載の手法を使用して、リガンドが目的の標的のホモログまたはパラログとより多くまたはより少なく相互作用できるように、特異性を調節する、すなわち高め、または低めることができる。特異性は、活性、親和性、または結合力と同義であるとは意図されておらず、標的に対するリガンドの作用の能力（例えば、結合親和性または阻害のレベルなど）は、必ずしもその特異性に関連しない。

30

【 0 0 4 7 】

「結合活性」という用語は、本明細書において使用される場合、結合アッセイから得られた定量的な結合測定値を指す。したがって、結合活性は、所定の標的濃度で結合するペプチドリガンドの量を指す。好ましい標的結合は、主要な結合アッセイにおいて10～20マイクロモル程度である。開発され親和性成熟した分子は、向上した親和性を有して結合することができる。

40

【 0 0 4 8 】

結合活性またはその他の所望の活性などの活性に関するスクリーニングは、当技術分野で公知の方法、例えばファージディスプレイ技術に基づく方法に従って行われる。例えば、固相に固定化した標的を使用して、レパートリーの結合メンバーを同定し、単離することができる。スクリーニングによって、所望の特性に応じてレパートリーのメンバーを選択することが可能となる。

【 0 0 4 9 】

ポケットの存在についてのタンパク質のスクリーニングは、まず、インシリコによって行うことができる。

【 0 0 5 0 】

50

多重特異性は、2つ以上の標的に結合する能力である。典型的には、結合ペプチドは、それらの立体構造の性質によって、抗体の場合のエピトープなど、1つの標的に結合することができる。しかしながら、ペプチドは、2つ以上の標的に結合することができる、例えば二重特異性抗体として開発することができる。本発明において、ペプチドリガンドは、2つ以上の標的に結合可能であり得、したがって、多重特異性である。好ましくは、それらは、2つの標的に結合し、二重特異性である。この結合は、独立的であってもよく、これは、ペプチド上の標的への結合部位が、どちらかの標的の結合によって構造上妨害されないことを意味することになる。この場合、両標的は、独立して結合され得る。より一般的には、一方の標的の結合は、他方の結合を少なくとも部分的に妨害することが予想される。

10

【0051】

本明細書において使用され、さらに下記に定義される「分子足場」という用語は、本発明において使用されるようなペプチドリガンドと多数箇所て結合して、ペプチドリガンドに1つまたは複数の構造的特徴を付与することができるあらゆる分子を指す。これは、単にジスルフィド結合を置換するのみならず、ペプチドに2つ以上の付着箇所を提供するという点で、クロスリンカーではない。好ましくは、分子足場は、足場反応性基と呼ばれる、ペプチドの付着箇所を少なくとも3つ含む。これらの基は、ペプチド上の反応性基と反応して、共有結合を形成することができる。分子足場のための好ましい構造を以下に説明する。

20

【0052】

< 標的 >

標的 - リガンド複合体は、広い範囲の分子間および分子内 - H - 結合を示す。β - ヘアピンおよびγ - ターンは、前記複合体に共通の構造的モチーフである。結合のためにポケットへ二環を組み込ませるために、少なくとも1つの溶媒露出末端の利用が可能である。

【0053】

本発明の標的は、少なくとも2つのループ配列によって隔てられている少なくとも3つの反応性基を含むポリペプチドと分子足場とを含むリガンドであって、前記分子足場が、少なくとも2つのポリペプチドループが前記分子足場上に形成されるような、前記ポリペプチドの反応性基との共有結合を形成する、リガンドに、結合し、またはそうでなければ相互作用する。具体的には、標的は、別のリガンドに結合し、そうでなければB i c y c l e (登録商標) ペプチドと相互作用する。

30

【0054】

最も好ましくは、標的は、下記に定義されるポケットを有する。

【0055】

好ましくは、標的は、酵素、受容体、増殖因子、補体成分、細胞壁構成成分、ホルモン、凝固因子、抗体、エピトープ、インターロイキン、増殖因子、メタロペプチダーゼ、壊死因子もしくは壊死因子受容体、またはそれらの任意の部分である。

【0056】

最も好ましくは、標的は、

アルファ - 2 - マクログロブリン; A T P 結合カセット、サブファミリー B (M D R / T A P)、メンバー 6; A D A M メタロペプチダーゼドメイン 17; A D A M メタロペプチダーゼドメイン 33; A D A M メタロペプチダーゼドメイン 9; アディポネクチン、C 1 Q およびコラーゲンドメイン含有; アデノシン A (3) 受容体; ベータ 3 アドレナリン受容体; アグーチ関連タンパク質ホモログ (マウス); アンギオテンシン I I 受容体、1 型; 活性化白血球細胞接着分子; アポリポタンパク質 E; アポリポタンパク質 H (ベータ 2 グリコプロテイン I); アミロイドベータ (A 4) 前駆体タンパク質; アクアポリン 4; アクアポリン 5; アミロイド前駆体タンパク質ベータサイト切断酵素 1; 殺菌性透過性増強タンパク質; 補体第 1 成分、q 垂成分、B 鎖; 補体第 1 成分、q 垂成分、C 鎖; 補体第 1 成分、r 垂成分; 補体第 1 成分、s 垂成分; 補体第 2 成分; 補体第 6 成分; 補体第 7 成分; 補体第 8 成分、ベータポリペプチド; 炭酸脱水酵素 X I I; 炭酸脱水酵素 I V; 炭

40

50

酸脱水酵素 V I ; C A R T プレプロペプチド ; コレシストキニン B 受容体 ; ケモカイン C
 C L 1 1 ; C D 3 e 分子、イプシロン (C D 3 - T C R 複合体) ; C D 3 g 分子、ガンマ
 (C D 3 - T C R 複合体) ; C D 4 0 分子、 T N F 受容体スーパーファミリーメンバー 5
 ; C D 8 a 分子 ; シチジンデアミナーゼ ; カドヘリン 1 3、 H - カドヘリン (心臓) ; カ
 ドヘリン関連 2 3 ; 補体因子 B ; 補体因子 D (アディプシン) ; 補体因子 H ; 絨毛性ゴナ
 ドトロピン、ベータポリペプチド ; チキナーゼ 3 様 1 (軟骨糖タンパク質 - 3 9) ; チキ
 ナーゼ、酸性 ; チキナーゼ 1 (キトトリオシダーゼ) ; キマーゼ 1、マスト細胞 ; カルノ
 シンジペプチダーゼ 1 (メタロペプチダーゼ M 2 0 ファミリー) ; コンタクチン 1 ; カテ
 コール - O - メチルトランスフェラーゼ ; カルボキシペプチダーゼ A 4 ; カルボキシペプ
 チダーゼ B 2 (血漿) ; セルロプラスミン (フェロキシダーゼ) ; カルボキシペプチダー
 ゼ N、ポリペプチド 1 ; 補体成分 (3 d / エプスタイン・バーウイルス) 受容体 2 ; カテ
 プシン B ; カテプシン D ; ケモカイン C X C 受容体 4 ; 上皮増殖因子受容体 ; エラスター
 ゼ、好中球が発現 ; E P H 受容体 A 2 ; v - e r b - b 2 赤芽球白血病ウイルス癌遺伝子
 ホモログ 2、神経 / 神経膠芽細胞種由来癌遺伝子ホモログ (トリ) ; v - e r b - b 2 赤
 芽球白血病ウイルス癌遺伝子ホモログ 3 (トリ) ; v - e r b - a 赤芽球白血病ウイルス
 癌遺伝子ホモログ 4 (トリ) ; 凝固第 X 因子 ; 凝固第 X I 因子 ; 凝固第 X I I 因子、 A
 1 ポリペプチド ; 凝固第 I I 因子 (トロンビン) ; 凝固第 I I 因子 (トロンビン) 受容体
 ; 凝固第 I I I 因子 (トロンボプラスチン、組織因子) ; 凝固第 V I I 因子 (血清プロト
 ロンビン転換促進因子) ; 凝固第 V I I I 因子、凝血促進成分 ; 凝固第 I X 因子 ; I g E
 の F c フラグメント、低親和性 I I、 (C D 2 3) の受容体 ; I g G の F c フラグメント
 、高親和性 I a、受容体 (C D 6 4) ; I g G の F c フラグメント、受容体、トランスポ
 ーター、アルファ ; フィコリン (コラーゲン / フィブリノーゲンドメイン含有レクチン)
 2 (フコリン) ; フィコリン (コラーゲン / フィブリノーゲンドメイン含有) 3 (ハカタ
 抗原) ; 葉酸ヒドロラーゼ (前立腺特異膜抗原) 1 ; 濾胞刺激ホルモン、ベータポリペ
 チド ; ガンマ - アミノ酪酸 (G A B A) B 受容体、 2 ; U D P - N - アセチル - アルファ
 - D - ガラクトサミン : ポリペプチド - N - アセチルガラクトサミン転移酵素 2 (G a l
 N A c - T 2) ; 増殖停止特異的 6 ; 群特異成分 (ビタミン D 結合タンパク質) ; ガンマ
 - グルタミルヒドロラーゼ (コンジュガーゼ、ホリルポリ - ガンマ - グルタミルヒドロラ
 ーゼ) ; 成長ホルモン 1 ; 成長ホルモン受容体 ; グレリン / オベスタチンプレプロペプ
 チド ; 胃内因子 (ビタミン B 合成) ; 胃抑制ポリペプチド受容体 ; ギャップ結合タンパク質
 、ベータ 2、 2 6 k D a ; 糖タンパク質 I b (血小板)、アルファポリペプチド ; 糖タン
 パク質 I b (血小板)、ベータポリペプチド ; 糖タンパク質 V I (血小板) ; グルコース
 - 6 - リン酸イソメラーゼ ; グルタミン酸受容体、イオンチャネル型、カイニン酸 1 ; グ
 ルタミン酸受容体、イオンチャネル型、カイニン酸 2 ; グルタミン酸受容体、代謝型 1 ;
 グルタミン酸受容体、代謝型 3 ; グルタミン酸受容体、代謝型 5 ; グルタミン酸受容体、
 代謝型 7 ; ゲルゾリン ; ヘモクロマトーシス ; 肝細胞増殖因子 (ヘパポイエチン A ; 散乱
 係数) ; ヘッジホッグ相互作用タンパク質 ; 主要組織適合性複合体、クラス I、 G ; ヘパ
 ラン硫酸プロテオグリカン 2 ; H t r A セリンペプチダーゼ 1 ; ヒアルロノグルコサミニ
 ダーゼ 1 ; インスリン分解酵素 ; インターフェロン (アルファ、ベータ、およびオメガ)
 受容体 1 ; インターフェロン (アルファ、ベータ、およびオメガ) 受容体 2 ; インターフ
 ェロン、ガンマ ; インターフェロンガンマ受容体 1 ; インスリン様成長因子 1 (ソマトメ
 ジン C) ; インスリン様成長因子 1 受容体 ; インスリン様成長因子 2 (ソマトメジン A)
 ; インスリン様成長因子 2 受容体 ; インスリン様成長因子結合タンパク質 1 ; 免疫グロブ
 リン重鎖定常部アルファ 1 ; 免疫グロブリン重鎖定常部ガンマ 1 (G 1 m マーカー) ; 免
 疫グロブリン重鎖定常部ガンマ 2 (G 2 m マーカー) ; 免疫グロブリン重鎖定常部ガンマ
 4 (G 4 m マーカー) ; 免疫グロブリン重鎖定常部ミュー ; 免疫グロブリンカップ定常部
 ; 免疫グロブリンラムダ様ポリペプチド 1 ; インディアンヘッジホッグ ; インターロイキ
 ン 1 0 ; インターロイキン 1 0 受容体、アルファ ; インターロイキン 1 2 A (ナチュラル
 キラー細胞刺激因子 1、細胞傷害性リンパ球成熟因子 1、 p 3 5) ; インターロイキン 1
 2 B (ナチュラルキラー細胞刺激因子 2、細胞傷害性リンパ球成熟因子 2、 p 4 0) ; イ

ンターロイキン17A；インターロイキン17F；インターロイキン17受容体A；インターロイキン1受容体、I型；インターロイキン1受容体アンタゴニスト；インターロイキン21受容体；インターロイキン2受容体、アルファ；インターロイキン2受容体、ガンマ；インターロイキン3（コロニー刺激因子、マルチ）；インターロイキン4受容体；インターロイキン6受容体；インターロイキン7受容体；インテグリン結合キナーゼ；インスリン受容体；i t c h y E3ユビキチン・タンパク質リガーゼ；インテグリン、アルファ2b（I I b / I I I a複合体の血小板糖タンパク質I I b、抗原C D 4 1）；インテグリン、アルファ4（抗原C D 4 9 D、V L A - 4受容体のアルファ4サブユニット）；インテグリン、ベータ3（血小板糖タンパク質I I I a、抗原C D 6 1）；j a g g e d 1；リジル - t R N A合成酵素；キナーゼ挿入ドメイン受容体（I I I型受容体型チロシンキナーゼ）；キラー細胞免疫グロブリン様受容体、2つのドメイン、長い細胞質側末端、1；キラー細胞免疫グロブリン様受容体、2つのドメイン、長い細胞質側末端、2；キラー細胞免疫グロブリン様受容体、2つのドメイン、長い細胞質側末端、3；キラー細胞免疫グロブリン様受容体、3つのドメイン、長い細胞質側末端、1；k i n o f I R R E l i k e 3（ショウジョウバエ）；K I Tリガンド；v - キットハーディ・ズッカーマン4ネコ肉腫ウイルス癌遺伝子ホモログ；カリクレイン関連ペプチダーゼ3；K R I T 1、アンキリンリピート含有；低密度リボタンパク質受容体；レプチン受容体；白血病抑制因子；白血病抑制因子受容体アルファ；レクチン、マンノース結合、1；低密度リボタンパク質受容体関連タンパク質6；マトリックスメタロペプチダーゼ12（マクロファージエラストラーゼ）；マトリックスメタロペプチダーゼ13（コラゲナーゼ3）；マトリックスメタロペプチダーゼ14（膜挿入型）；マトリックスメタロペプチダーゼ1（間質コラゲナーゼ）；マトリックスメタロペプチダーゼ7（マトリライシン、子宮）；マトリックスメタロペプチダーゼ8（好中球コラゲナーゼ）；ミエロペルオキシダーゼ；ニューロンナビゲーター2；細胞傷害誘発受容体3；ニューロリギン4、X連鎖；ノギン；副甲状腺ホルモン1受容体；プロテインチロシンホスファターゼ、受容体型、D；プロテインチロシンホスファターゼ、受容体型、F；ポリオウイルス受容体；レニン；リボヌクレアーゼ、R NアーゼAファミリー、3；レナラーゼ、F A D依存性アミノキシダーゼ；セマフォリン7A、G P I膜アンカー（J o h n M i l t o n H a g e n血液型）；セルピンペプチダーゼインヒビター、クレードA（アルファ - 1抗プロテイナーゼ、アンチトリプシン）、メンバー10；セルピンペプチダーゼインヒビター、クレードC（アンチトロンビン）、メンバー1；セルピンペプチダーゼインヒビター、クレードF（アルファ - 2抗プラスミン、色素上皮由来因子）、メンバー1；セルピンペプチダーゼインヒビター、クレードI（ニューロセルピン）、メンバー1；スーパーオキシドジスムターゼ3、細胞外；ソルビトールデヒドロゲナーゼ；ソマトスタチン；s u p p r e s s i o n o f t u m o r i g e n i c i t y 14（結腸癌）；シナプシンI I I；トランスコバラミンI（ビタミンB 12結合タンパク質、Rバインダーファミリー）；トランスコバラミンI I；T E Kチロシンキナーゼ、内皮；トランスフェリン受容体（p 9 0、C D 7 1）；トランスフェリン；形質転換増殖因子、ベータ1；形質転換増殖因子、ベータ2；形質転換増殖因子、ベータ3；形質転換増殖因子、ベータ受容体1；形質転換増殖因子、ベータ受容体I I（7 0 / 8 0 k D a）；T I M Pメタロペプチダーゼ阻害因子1；T I M Pメタロペプチダーゼ阻害因子2；T I M Pメタロペプチダーゼ阻害因子3；トロイド様1；T o l l様受容体1；T o l l様受容体2；T o l l様受容体3；T o l l様受容体4；T o l l様受容体5；腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリー、メンバー10b；腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリー、メンバー13C；腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリー、メンバー1A；腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリー、メンバー1B；腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリー、メンバー4；腫瘍壊死因子；トリプターゼベータ2（遺伝子/偽遺伝子）；甲状腺刺激ホルモン受容体；トランスサイレチン；タビーホモログ（マウス）；タビー様タンパク質1；血管細胞接着分子1；血管作動性腸ペプチド受容体2；プレB細胞1；Vセットおよび免疫グロブリンドメイン含有4；キサンチンデヒドロゲナーゼ；ならびにチロシル - t R N A合成酵素

10

20

30

40

50

からなる群から選択される。

【0057】

標的は、上記のリストから選択される任意の分子の分子全体、それらの基、またはそれらの一部（活性部位またはエピトープなど）であってもよい。

【0058】

好ましくは、ペプチドリガンドは、標的の活性部位と相互作用し、最も好ましくは、前記活性部位に対して結合する。

【0059】

標的は、ポリペプチドリガンドのための複数の結合部位を有していてもよい。標的は、1つ、または複数の、2つ以上の、3つ以上の、4つ以上の、5つ以上のペプチドリガンドと結合してもよい。前記複数のリガンドは、異なるものであっても、同じものであってもよい。異なるペプチドリガンドの結合は、標的への異なる影響を有していてもよく、または同じ影響を有していてもよい。標的に結合するペプチドリガンドの数を増やすことによって、標的へのペプチドリガンドの作用を高め、または低めることができる。例えば、アゴニストまたはアンタゴニスト作用が、高められ、または低められ得る。

10

【0060】

一実施形態において、標的へのポリペプチドリガンドの結合は、アゴニスト作用を有する。別の実施形態において、前記結合は、阻害またはアンタゴニスト作用を有する。別の実施形態において、前記結合は、中立的な作用を有する。

20

【0061】

< ポケット >

本明細書において使用する場合、「ポケット」という用語は、標的分子の三次元（二次、三次、または四次）構造における切れ込み、窪み、孔、または空間を指す（Ryan G. Coleman and Kim A. Sharp, J Chem Inf Model, 2010, 26; 50(4): 589-603. doi: 10.1021/ci900397tを参照されたい）。前記ポケットは、1つまたは複数のリガンドに対する結合親和性を有する。結合は、水素結合、共有結合、イオン結合、またはそれらの任意の組合せなどの、あらゆる種類の結合または会合を介して生じ得る。

【0062】

本発明のポケットは、特異的な物理的特徴を備えている。

30

【0063】

本発明のポケットは、ペプチドリガンドの幾つかの部分を包含するよう、十分に大きくなければならない。好ましくは、ポケットは、すべてまたはほとんどのペプチドリガンドを包含するよう、十分に大きい。すなわち、ペプチドリガンドは、ポケット内に、少なくとも部分的に、好ましくは完全に、適合することができる。リガンドは、標的と結合する際、ポケットに少なくとも部分的に埋め込まれる。

【0064】

一実施形態において、本発明の方法の標的のポケットは、少なくとも $1000 \sim 2500$ ³、より好ましくは、少なくとも $1250 \sim 2500$ ³、最も好ましくは、少なくとも $1400 \sim 2200$ ³ の容積を備える。

40

【0065】

一実施形態において、本発明の方法の標的のポケットは、少なくとも $700 \sim 1500$ ²、最も好ましくは、少なくとも $900 \sim 1300$ ² の面積を備える。

【0066】

一実施形態において、本発明の方法の標的のポケットは、少なくとも $30 \times 30 \times (5 \sim 10)$ の寸法を備える。

【0067】

一実施形態において、ポケットは、少なくとも 900 ²、好ましくは、少なくとも 1000 ²、好ましくは、少なくとも 1300 ²、最も好ましくは、少なくとも 1500 ² の溶媒露出面積を備える。

50

【0068】

「溶媒露出表面積 (solvent accessible surface area)」という句は、溶媒との接触が可能な、タンパク質の二次、三次、または四次構造などの分子の三次元構造の領域を指す。好ましくは、前記溶媒は、液体溶媒、最も好ましくは水性液であり、好ましくは、そのような接触は結合をもたらす。

【0069】

一実施形態において、ポケットは、少なくとも1つの溶媒露出末端を備える。一部の実施形態において、リガンドは、少なくとも1つの溶媒露出末端を備える。

【0070】

上述のように、本発明のリガンドは、本発明のポケットと相互作用する際、好ましくは、ポケット内に少なくとも部分的に埋め込まれる。好ましくは、リガンドの溶媒露出面積の1/3～2/3がポケットに埋め込まれる。

10

【0071】

ポケットは、標的の様々なドメイン中に位置し得る。標的のポケットは、生物学的な関連性がある傾向がある。例えば、ポケットは、酵素活性部位またはそれらの部分、他のもしくは複数のリガンドのための結合部位またはそれらの部分、およびタンパク質-タンパク質相互作用部位またはそれらの部分を含み得る。

【0072】

本発明の一態様は、ポケットが、別のタンパク質とのタンパク質-タンパク質相互作用に関与するタンパク質ドメイン中に位置するかどうかを、決定するステップを含む方法である。この決定は、例えばNMR、質量分析法、X線結晶学、振動分光法、電子顕微鏡法、クライオ電子顕微鏡法、もしくはバイオインフォマティクス(インシリコ)法、またはそのような方法の任意の組合せを含む、当技術分野における任意の妥当な方法によって行ってもよい。

20

【0073】

<方法の説明において使用されるその他の用語>

本明細書において使用される「接触させる」という用語は、ある分子を、好ましくは溶媒を介して、別の分子と物理的に接触させるという、当技術分野において一般的な意味をもつ。

【0074】

本発明において使用され、または創製される任意のリガンド、標的、またはその他のタンパク質の、任意のポリペプチド成分のアミノ酸配列の決定は、任意の好適な技術を使用して行うことができる。技術には、質量分析法、エドマン分解法、およびバイオインフォマティクス法が含まれる。

30

【0075】

本発明の任意の態様において使用され、同定され、または創製されるポリペプチド、タンパク質、アミノ酸、またはその他の分子を「合成すること」は、任意の好適な技術を使用して行うことができる。ポリペプチドは、生物学的に合成してもよい。ペプチド合成は、好ましくは、Peptide Instruments製のSymphonyペプチド合成装置を使用する、Fmoc化学に基づく。

40

【0076】

本明細書において使用される「反応する」という用語は、あらゆる化学反応を指す。好ましくは、化学反応は、化学結合、好ましくは水素または共有結合を形成する反応である。

【0077】

本明細書において使用される「製造する」という用語は、該用語が適用される品目を作製または創製することを指す。

【0078】

<ライブラリー>

一実施形態において、本発明は、標的タンパク質を、(好ましくは請求項1に定義され

50

た)リガンドのライブラリーに暴露し、標的タンパク質に結合する1つまたは複数のリガンドを選択するステップを含む方法を提供する。

【0079】

本明細書において使用される「ライブラリー」という用語は、異種のポリペプチドまたは核酸の混合物を指す。ライブラリーは、同一ではないメンバーから構成される。この程度まで、ライブラリーは、レパートリーと同義である。ライブラリーメンバー間の配列の違いが、ライブラリー中に存在する多様性を担っている。ライブラリーは、ポリペプチドまたは核酸の単純な混合物の形態をとっていてもよく、または、核酸のライブラリーで形質転換された、例えば、細菌、ウイルス、動物、または植物細胞などの生物または細胞の形態であってもよい。好ましくは、個々の生物または細胞は、それぞれ、1つまたは限定された数のライブラリーメンバーだけを含有する。

10

【0080】

一実施形態において、核酸によってコードされているポリペプチドを発現させるために、核酸は、発現ベクターに組み込まれる。好ましい態様において、したがって、ライブラリーは、宿主生物の集団の形態をとっていてもよく、それぞれの生物は、対応するポリペプチドメンバーを産生するために発現させることができる核酸形態で、ライブラリーの1つのメンバーを含有する発現ベクターの1つまたは複数のコピーを含有している。よって、宿主生物の集団は、遺伝学的に多様なポリペプチドバリエーションの大きなレパートリーをコードする潜在力を有する。

【0081】

一実施形態において、核酸のライブラリーは、ポリペプチドのレパートリーをコードする。ライブラリーの各核酸メンバーは、好ましくは、ライブラリーの1つまたは複数のその他のメンバーに関連した配列を有する。関連した配列とは、ライブラリーの少なくとも1つのその他のメンバーに対して、少なくとも50%同一性、例えば少なくとも60%同一性、例えば少なくとも70%同一性、例えば少なくとも80%同一性、例えば少なくとも90%同一性、例えば少なくとも95%同一性、例えば少なくとも98%同一性、例えば少なくとも99%同一性を有するアミノ酸配列を意味する。同一性は、参照配列の、少なくとも3アミノ酸、例えば少なくとも4、5、6、7、8、9、もしくは10アミノ酸、例えば少なくとも12アミノ酸、例えば少なくとも14アミノ酸、例えば少なくとも16アミノ酸、例えば少なくとも17アミノ酸が連続した区分または全長にわたって判断され得る。

20

30

【0082】

本発明において使用されるライブラリーは、例えばWO2004/077062に記載の当技術分野において既知の技術、または本明細書に記載したようなファージベクターシステムを含む生物学的システムを使用して構築してもよい。その他のベクターシステムが当技術分野において既知であり、その他のファージ(例えば、ファージラムダ)、細菌性プラスミド発現ベクター、酵母ベクターを含む真核細胞ベースの発現ベクターなどが挙げられる。例えば、WO2009/098450またはHeinisch, et al., Nat Chem Biol 2009, 5(7), 502-7を参照されたい。

【0083】

<分子足場>

分子足場は、例えば、WO2009/098450およびその中で引用された参考文献、特にWO2004077062およびWO2006078161に記載されている。

40

【0084】

上述のように、「分子足場」という用語は、本発明において使用されるペプチドリガンドを複数箇所において結合させて、ペプチドリガンドに1つまたは複数の構造的特徴を付与することができるあらゆる分子を指すために、本明細書において使用される。

【0085】

分子足場は、小さな有機分子などの低分子であってもよい。

【0086】

50

一実施形態において、分子足場は、ヌクレオシド、糖、またはステロイドなどの天然の単量体であってもよく、またはこれらに基づいていてもよい。例えば、分子足場は、そのような実体の二量体または三量体などの短い重合体を含んでいてもよい。

【0087】

一実施形態において、分子足場は、毒性が既知である、例えば低毒性の化合物である。好適な化合物の例としては、コレステロール、ヌクレオチド、ステロイド、またはテマゼパムなどの既存の薬物が挙げられる。

【0088】

一実施形態において、分子足場は、高分子であってもよい。一実施形態において、分子足場は、アミノ酸、ヌクレオチド、または炭水化物から構成される高分子である。

10

【0089】

一実施形態において、分子足場は、ポリペプチドの官能基と反応して共有結合を形成することができる反応性基を含む。

【0090】

分子足場は、アミン、チオール、アルコール、ケトン、アルデヒド、ニトリル、カルボン酸、エステル、アルケン、アルキン、アジド、無水物、スクシンイミド、マレイミド、ハロゲン化アルキル、およびハロゲン化アシルのような化学基を含んでいてもよい。

【0091】

一実施形態において、分子足場は、トリス(ブROMOメチル)ベンゼン、特に1, 3, 5 - トリス(ブROMOメチル)ベンゼン(「T B M B」)、またはそれらの誘導体を含んでいてもよく、またはそれらからなってもよい。

20

【0092】

一実施形態において、分子足場は、2, 4, 6 - トリス(ブROMOメチル)メシチレンである。これは、1, 3, 5 - トリス(ブROMOメチル)ベンゼンと同様であるが、ベンゼン環に付着した3つのメチル基を追加的に含有する。このことは、追加されたメチル基がポリペプチドとのさらなる接触を形成し、よってさらなる構造的制約を付与することができるという利点を有する。

【0093】

その他の分子足場としては、1, 3, 5 - トリアクリロイル - 1, 3, 5 - トリアジナン(T A T A)、N, N', N'' - (ベンゼン - 1, 3, 5 - トリイル) - トリス(2 - ブROMOアセトアミド)(T B A B)、およびN, N', N'' - ベンゼン - 1, 3, 5 - トリイルトリスプロパ - 2 - エナミド(T A A B)が挙げられる。Chen et al., ChemBioChem 2012, 13, 1032 - 1038を参照されたい。好ましくは、分子足場は、構造的に強固な化学基を含む。

30

【0094】

本発明の方法において使用される分子足場は、本発明の方法において使用されるリガンドのポリペプチドの官能基が分子足場との共有結合を形成できるようにさせる、化学基を含有する。前記化学基は、アミン、チオール、アルコール、ケトン、アルデヒド、ニトリル、カルボン酸、エステル、アルケン、アルキン、無水物、スクシンイミド、マレイミド、アジド、ハロゲン化アルキル、およびハロゲン化アシルを含む幅広い範囲の官能性から選択される。

40

【0095】

分子足場は、好ましくは、分子足場をポリペプチドに付着させる共有結合の数と対応する分子対称性を有する。好ましくは、分子足場は3回対称の分子対称性を有し、分子足場は3つの共有結合によってポリペプチドに付着される。

【0096】

< コンピューターによる実現 >

本発明は、コンピューターにより実現される方法を含む。好ましくは、少なくとも2つのループ配列によって隔てられている少なくとも3つの反応性基を含むポリペプチドと分子足場とを含むリガンドであって、前記分子足場が、少なくとも2つのポリペプチドルー

50

ブが前記分子足場上に形成されるような、前記ポリペプチドの反応性基との共有結合を形成する、リガンドの標的を選択する、コンピューターにより実現される方法は、

(a)(i) 約 1000 ~ 3000³ の容積、および

(ii) 少なくとも 1 つの溶媒露出末端

の特徴を備える、少なくとも 1 つの前記ポケットを含むタンパク質を同定するために、ポリペプチド構造のデータベースを調べるステップと、

(b) 前記データベースにおいて、(a) に定義された少なくとも 1 つのポケットを含むタンパク質の第 1 のセットを同定するステップと、

(c) タンパク質の前記第 1 のセットを、タンパク質 - タンパク質相互作用に關与するタンパク質ドメインのデータベースと比較するステップと、

(d) タンパク質の前記第 1 のセットにおいて、別のタンパク質との相互作用に寄与すると推定されているドメイン中に位置する少なくとも 1 つのポケットを含む 1 つまたは複数のタンパク質を同定するステップと

を含む。

【0097】

本発明のその他の方法もまた、コンピューターにより実現され得る。

【0098】

< 医学的使用 >

本発明の方法は、疾患、疾患症状、および病状を、治療し、予防し、抑制し、かつ / または改善するために、また診断においても使用してもよい。

【0099】

本発明において使用されるペプチドリガンドは、典型的には、炎症状態、アレルギー性過敏症、がん、細菌性またはウイルス感染、および自己免疫障害 (I 型糖尿病、乾癬、多発性硬化症、関節リウマチ、全身性エリテマトーデス、クローン病、および重症筋無力症を含むが、それらに限定されるわけではない) の予防、抑制、または治療において使用が可能となる。そのようなリガンドの標的を同定するために本発明の方法を使用することは、また、リガンドを使用して治療し、予防し、かつ / または改善され得る疾患を同定することを支援する。

【0100】

施用において、「予防」という用語は、疾患の誘発前の防御組成物の投与を含む。「抑制」とは、誘導事象の後であるが、疾患の臨床的出現の前の、該組成物の投与を指す。「治療」とは、疾患症状が現れた後の防御組成物の投与を含む。

【0101】

本発明のリガンドの標的を選択する方法、または該リガンドを選択する方法を実行した後、病状の症状を治療し、改善し、または回復させるさらなるステップ。好ましくは、これは、ヒトまたは動物の患者を該リガンドで処置することによって実行され得る。本発明のリガンドは、薬物または薬物様分子として使用してもよい。該リガンドは、注射、吸入、経鼻、点眼、経口、または局所投与用に製剤化してもよい。

【0102】

本発明は、したがって、少なくとも 2 つのループ配列によって隔てられている少なくとも 3 つの反応性基を含むポリペプチドと分子足場とを含むリガンドであって、前記分子足場が、少なくとも 2 つのポリペプチドループが前記分子足場上に形成されるような、前記ポリペプチドの反応性基との共有結合を形成する、リガンドの標的を選択する方法であって、

(a)(i) 約 1000 ~ 3000³ の容積、および

(ii) 少なくとも 1 つの溶媒露出末端

の特徴を備えるポケットの存在について、1 つまたは複数のタンパク質をスクリーニングするステップと、

(b) (a) に定義されたポケットを少なくとも 1 つ有する少なくとも 1 つのタンパク質を選択するステップと、

10

20

30

40

50

(c) 医学的処置または診断の方法において、標的に結合するまたは標的と相互作用するリガンドを使用するステップとを含む方法を含む。

【0103】

本発明の方法を、下記にてさらに考察する。前記方法は、好ましくは、インビトロで行われる。本発明の方法は、インビボで行ってもよい。

【0104】

本発明の方法は、ヒトまたは動物の患者から採取した試料に対して行ってもよい。そのような試料は、例えば、血液、粘液、皮膚、または血漿であってもよい。そのような方法は、好ましくは、診断の方法であり、好ましくは、インビトロで行われ、ヒトまたは動物の体に対して直接実施されるものではない。

【0105】

本発明はまた、医薬における、本発明の方法によって選択されたりガンドの使用も企図する。

【0106】

一般的には、ペプチドリガンドは、薬理学的に適切な担体と共に、精製された形態で利用されることとなる。典型的には、これらの担体には、生理食塩水および/または緩衝化媒体を含む、水性もしくはアルコール性/水溶液、乳濁液、または懸濁液が含まれる。非経口ビヒクルには、塩化ナトリウム溶液、リングルデキストロース、デキストロースおよび塩化ナトリウム、ならびに乳酸加リンゲル液が含まれる。ポリペプチド複合体を懸濁液中で保つ必要がある場合、好適な生理学的許容アジュバントは、カルボキシメチルセルロース、ポリビニルピロリドン、ゼラチン、およびアルギン酸などの増粘剤から選択され得る。

【0107】

静脈内ビヒクルには、リングルデキストロースに基づくビヒクルなどの、液体ならびに栄養補液および電解質補液が含まれる。防腐剤、ならびに抗生物質、酸化防止剤、キレート剤、および不活性ガスなどのその他の添加剤も、存在し得る (Mack (1982) Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th Edition)。

【0108】

本発明のペプチドリガンドは、個々に投与される組成物として、またはその他の薬剤と組み合わせて使用してもよい。これらは、抗体、抗体フラグメント、ならびにシクロスポリン、メトトレキサート、アドリアマイシン、またはシスプラチン、および免疫毒素などの様々な免疫療法薬を含み得る。医薬組成物は、本発明の選択された抗体、受容体、もしくはそれらの結合タンパク質と組み合わせた様々な細胞傷害性薬剤またはその他の薬剤の「カクテル」、または異なる標的リガンドを使用して選択されたポリペプチドなど、選択された、異なる特異性を有する本発明によるポリペプチドの組合せを、それらが投与の前にプールされているかどうかに関わりなく含み得る。

【0109】

本発明はまた、疾患、疾患症状、および病状の、治療、予防、抑制、および/または改善のための医薬の製造における本発明のリガンドの使用も企図する。

【0110】

< 方法 >

本発明の方法は、当技術分野において既知の任意の技術および/または装置を使用して行ってもよい。好ましくは、前記方法は、実験技術を使用して行われる。

【0111】

本発明の第1の方法は、少なくとも2つのループ配列によって隔てられている少なくとも3つの反応性基を含むポリペプチドと分子足場とを含むリガンドであって、前記分子足場が、少なくとも2つのポリペプチドループが前記分子足場上に形成されるような、前記ポリペプチドの反応性基との共有結合を形成する、リガンドの標的を選択する方法であっ

10

20

30

40

50

て、

(a)(i) 約 1000 ~ 3000³ の容積、および

(ii) 少なくとも 1 つの溶媒露出末端

の特徴を備えるポケットの存在について、1 つまたは複数のタンパク質をスクリーニングするステップと、

(b) (a) に定義されたポケットを少なくとも 1 つ有する少なくとも 1 つのタンパク質を選択するステップと

を含む方法である。

【0112】

また、本明細書において、少なくとも 2 つのループ配列によって隔てられている少なくとも 3 つの反応性基を含むポリペプチドと分子足場とを含むリガンドであって、前記分子足場が、少なくとも 2 つのポリペプチドループが前記分子足場上に形成されるような、前記ポリペプチドの反応性基との共有結合を形成する、リガンドを選択する方法であって、

(a) 請求項 1 または請求項 2 に定義されたポケットの存在について、1 つまたは複数のタンパク質をスクリーニングし、少なくとも 1 つのそのようなポケットを有する少なくとも 1 つのタンパク質を選択するステップ、および

(b) 前記少なくとも 1 つのタンパク質を前記リガンドのうちの 1 つまたは複数と接触させ、前記タンパク質に結合する少なくとも 1 つのリガンドを選択するステップを含む方法も企図される。

【0113】

本発明の一実施形態は、少なくとも 2 つのループ配列によって隔てられている少なくとも 3 つの反応性基を含むポリペプチドと分子足場とを含むリガンドであって、前記分子足場が、少なくとも 2 つのポリペプチドループが前記分子足場上に形成されるような、前記ポリペプチドの反応性基との共有結合を形成する、リガンドを調製する方法であって、

(a) 上記の方法のうちの 1 つに従って選択されたりガンドの、ポリペプチド成分のアミノ酸配列を決定するステップと、

(b) (a) において決定された配列を有するポリペプチドを合成するステップと、

(c) 前記ポリペプチドを分子足場と反応させて、前記リガンドを生成させるステップと

を含む方法を含む。

【0114】

標的に結合することができる、上述の方法のいずれかによるリガンドを同定する方法もまた企図される。前記方法は、

(i) 先の方法のいずれかに従って、複数のリガンドを用意するステップと、

(ii) 前記複数のリガンドを、標的と接触させるステップと、

(iii) 前記標的に結合するこれらのリガンドを選択するステップとを含む。

【0115】

前記方法は、本方法によって単離されたまたは同定されたポリペプチド - 分子足場コンジュゲートリガンドを大量に製造するステップをさらに含んでもよく、好ましくは、前記製造は、分子足場をポリペプチドに付着させることを含み、好ましくは、前記ポリペプチドは、遺伝子組換えによって発現される、または化学的に合成される。

【0116】

リガンドを同定する前記方法は、ポリペプチドの N 末端または C 末端の 1 つまたは複数においてポリペプチドを伸長させるステップを、さらに含んでもよい。

【0117】

リガンドを同定する前記方法は、前記ポリペプチド - 分子足場コンジュゲートリガンドをさらなるポリペプチドにコンジュゲートするステップを、さらに含んでもよい。好ましくは、前記コンジュゲーションは、

(i) ポリペプチドに、分子足場への結合の後、さらなるシステインを付加するステッ

10

20

30

40

50

ブと、

(i i) 前記ポリペプチドを、前記さらなるシステインへのジスルフィド結合を介して前記さらなるポリペプチドにコンジュゲートするステップと
によって行われる。

【 0 1 1 8 】

本発明の方法は、好ましくは、インビトロで行われる。

【 0 1 1 9 】

本発明の方法は、あらゆる試料に対して行うことができる。好ましくは、前記試料は、体液試料である。本発明の方法はまた（上記のような）ライブラリーから標的を選択するために使用してもよい。

10

【 0 1 2 0 】

本発明の方法、または前記方法の幾つかのステップは、コンピューターによって実現され得る。

【 0 1 2 1 】

本発明の記載された方法およびシステムの様々な修正および変形は、当業者には本発明の範囲から逸脱することなく明らかとなるであろう。本発明を特定の好ましい実施形態に関連して説明してきたが、特許請求の範囲に記載の発明はそのような特定の実施形態に不当に限定されるべきではないことを理解されたい。実際に、生化学およびバイオテクノロジーまたは関連分野における当業者には明らかな、本発明を実施するための記載された態様の様々な修正は、以下の特許請求の範囲内にあるものとする。

20

【 0 1 2 2 】

本発明を、以下の実施例によってさらに説明する。

【 0 1 2 3 】

参考文献

Driggers, et al., *Nat Rev Drug Discov* 2008, 7 (7), 608-24

Wu, B., et al., *Science* 330 (6007), 1066-71

Xiong, J. P., et al., *Science* 2002, 296 (5565), 151-5

Zhao, G., et al., *J Struct Biol* 2007, 160 (1), 1-10

30

Cherney, R. J., et al., *J Med Chem* 1998, 41 (11), 1749-51

Kemp, D. S. and McNamara, P. E., *J. Org. Chem*, 1985

Timmerman, P. et al., *ChemBioChem*, 2005

WO 2004/077062

WO 2006/078161

40

Heinis, et al., *Nat Chem Biol* 2009, 5 (7), 502-7

WO2009/098450

Mack (1982) Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th Edition

Chen et al.. *ChemBioChem* 2012. 13. 1032 – 1038

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2019/064094

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. G16B15/30
ADD. G16C20/50

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

G16B G16C

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CHEN L. ET AL: "The Bicycle platform: an efficient technology to generate high affinity, high selectivity molecules (Bicycles) with unique drug like properties that are amenable to conjugation", 13th Annual Protein Engineering Summit (PEGS), May 01-05, 2017, Boston, Massachusetts, USA Conference abstract, 30 April 2017 (2017-04-30), XP055622533, Retrieved from the Internet: URL:https://www.bicycletherapeutics.com/wp-content/uploads/16_PEGS-Bicycle_-30-04-2017-poster.pdf [retrieved on 2020-04-17] the whole document ----- -/--	1-14, 16-23

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

13 May 2020

Date of mailing of the international search report

03/06/2020

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Godzina, Przemysław

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2019/064094

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	LANI R. ET AL: "Identification of high affinity, highly selective bicyclic peptides (Bicycles) to transmembrane proteins using phage display screening on whole cells", 13th Annual Protein Engineering Summit (PEGS), May 01-05, 2017, Boston, Massachusetts, USA Conference abstract, 30 April 2017 (2017-04-30), XP055488174, Retrieved from the Internet: URL:https://www.bicycletherapeutics.com/wp-content/uploads/19_PEGS-Bicycle-Phage_-30-04-2017-Poster..pdf [retrieved on 2018-06-27] the whole document -----	1-14, 16-23
X	WO 2010/089115 A1 (MEDICAL RES COUNCIL [GB]; WINTER GREGORY PAUL [GB] ET AL.) 12 August 2010 (2010-08-12) the whole document -----	1-14, 16-23
X	WO 2013/050615 A1 (BICYCLE THERAPEUTICS LTD [GB]; TITE JOHN [GB] ET AL.) 11 April 2013 (2013-04-11) the whole document -----	1-14, 16-23
A	PÉROT S. ET AL: "Druggable pockets and binding site centric chemical space: a paradigm shift in drug discovery", DRUG DISCOVERY TODAY, vol. 15, no. 15-16, 1 August 2010 (2010-08-01), pages 656-667, XP055689343, AMSTERDAM, NL ISSN: 1359-6446, DOI: 10.1016/j.drudis.2010.05.015 abstract page 656, left-hand column, line 13 - page 657, right-hand column, line 44 page 659, left-hand column, line 14 - right-hand column, line 16 page 665, left-hand column, line 30 - right-hand column, line 4 figures 1,2; tables 1,2 ----- -/--	1-14, 16-23

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2019/064094

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	DURRANT J. D. ET AL: "POVME 2.0: An Enhanced Tool for Determining Pocket Shape and Volume Characteristics", JOURNAL OF CHEMICAL THEORY AND COMPUTATION: JCTC, vol. 10, no. 11, 15 October 2014 (2014-10-15), pages 5047-5056, XP055685794, US ISSN: 1549-9618, DOI: 10.1021/ct500381c the whole document -----	1-14, 16-23
A	COLEMAN R. G. ET AL: "Protein Pockets: Inventory, Shape, and Comparison", JOURNAL OF CHEMICAL INFORMATION AND MODELING, vol. 50, no. 4, 5 March 2010 (2010-03-05), pages 589-603, XP055685810, US ISSN: 1549-9596, DOI: 10.1021/ci900397t the whole document -----	1-14, 16-23
A	WO 2013/050617 A1 (BICYCLE THERAPEUTICS LTD [GB]; TITE JOHN [GB]; TEUFEL DANIEL [GB]) 11 April 2013 (2013-04-11) the whole document -----	1-14, 16-23
A	VULPETTI A. ET AL: "Sequence and structural analysis of kinase ATP pocket residues", IL FARMACO, ELSEVIER FRANCE * EDITIONS SCIENTIFIQUES ET MEDICALES, FR, vol. 59, no. 10, 1 October 2004 (2004-10-01), pages 759-765, XP027080931, ISSN: 0014-827X, DOI: 10.1016/J.FARMAC.2004.05.010 [retrieved on 2004-10-08] abstract page 759, right-hand column, lines 15-24 page 760, left-hand column, paragraph 1-17 page 764, left-hand column, paragraph 34-48 figures 1,2 ----- -/--	1,2,5,23

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2019/064094

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EYRISCH S. ET AL: "Transient Pockets on Protein Surfaces Involved in Protein-Protein Interaction", JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY, vol. 50, no. 15, 1 July 2007 (2007-07-01), pages 3457-3464, XP055689335, US ISSN: 0022-2623, DOI: 10.1021/jm070095g abstract page 3457, right-hand column, lines 9-25 page 3458, right-hand column, lines 13-17 page 3462, right-hand column, line 56 - page 3463, left-hand column, line 67 figure 2; table 1 -----	1,2,5,23
A	TEUFEL D. P. ET AL: "Stable and Long-Lasting, Novel Bicyclic Peptide Plasma Kallikrein Inhibitors for the Treatment of Diabetic Macular Edema", JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY, vol. 61, no. 7, 8 March 2018 (2018-03-08), pages 2823-2836, XP055468371, US ISSN: 0022-2623, DOI: 10.1021/acs.jmedchem.7b01625 the whole document -----	4,7-14, 16-22
A	HEINIS C. ET AL: "Phage-encoded combinatorial chemical libraries based on bicyclic peptides", NATURE CHEMICAL BIOLOGY, vol. 5, no. 7, 31 May 2009 (2009-05-31), pages 502-507, XP007913181, DOI: 10.1038/nchembio.184 the whole document -----	1-14, 16-23

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2019/064094

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2010089115 A1	12-08-2010	AU 2010211282 A1	18-08-2011
		AU 2010211283 A1	11-08-2011
		CA 2750969 A1	12-08-2010
		CA 2751505 A1	12-08-2010
		CN 102405059 A	04-04-2012
		CN 102405060 A	04-04-2012
		DK 2393520 T3	26-10-2015
		EP 2393518 A1	14-12-2011
		EP 2393519 A1	14-12-2011
		EP 2393520 A1	14-12-2011
		ES 2551580 T3	20-11-2015
		PL 2393520 T3	29-01-2016
		SG 173169 A1	29-09-2011
		SG 173460 A1	29-09-2011
		SG 10201503705U A	29-06-2015
		US 2012101253 A1	26-04-2012
		US 2012101256 A1	26-04-2012
		US 2012142541 A1	07-06-2012
		US 2014163201 A1	12-06-2014
		US 2016046928 A1	18-02-2016
		WO 2010089115 A1	12-08-2010
		WO 2010089116 A1	12-08-2010
		WO 2010089117 A1	12-08-2010
WO 2013050615 A1	11-04-2013	AU 2012320407 A1	22-05-2014
		BR 112014008156 A2	11-04-2017
		CA 2849948 A1	11-04-2013
		CN 103906865 A	02-07-2014
		DK 2764140 T3	04-12-2017
		EP 2764140 A1	13-08-2014
		EP 3299377 A1	28-03-2018
		ES 2650625 T3	19-01-2018
		HK 1252864 A1	06-06-2019
		JP 6254527 B2	27-12-2017
		JP 6568161 B2	28-08-2019
		JP 2014528245 A	27-10-2014
		JP 2018012703 A	25-01-2018
		JP 2019218358 A	26-12-2019
		NO 2764140 T3	27-01-2018
		NZ 623518 A	24-06-2016
		PL 2764140 T3	30-04-2018
		PT 2764140 T	07-12-2017
		RU 2014118461 A	20-11-2015
		RU 2017132824 A	07-02-2019
		SG 11201400888T A	28-04-2014
		US 2014249292 A1	04-09-2014
		US 2014256596 A1	11-09-2014
		WO 2013050615 A1	11-04-2013
		WO 2013050616 A1	11-04-2013
WO 2013050617 A1	11-04-2013	NONE	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International application No.
PCT/EP2019/064094

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 15
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
The subject-matter of claim 15 is directed to a method for treatment of the human or animal body by therapy, in particular, the use of a compound/ligand in a treatment, and therefore is exempted from patentability (Rule 39.1(iv) PCT).
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

フロントページの続き

(51) Int.Cl.		F I		テーマコード (参考)
A 6 1 P 35/00 (2006.01)		A 6 1 P 35/00		
A 6 1 P 31/12 (2006.01)		A 6 1 P 31/12		
A 6 1 P 31/04 (2006.01)		A 6 1 P 31/04		
A 6 1 P 37/02 (2006.01)		A 6 1 P 37/02		
A 6 1 K 38/02 (2006.01)		A 6 1 K 38/02		
A 6 1 K 47/64 (2017.01)		A 6 1 K 47/64		
G 0 1 N 33/15 (2006.01)		G 0 1 N 33/15	Z	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)		G 0 1 N 33/53	D	

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

(74) 代理人 100166268

弁理士 田中 祐

(74) 代理人 100170379

弁理士 徳本 浩一

(74) 代理人 100180231

弁理士 水島 亜希子

(74) 代理人 100096769

弁理士 有原 幸一

(72) 発明者 チェン, リウホン

イギリス国, シービー 2 2 ・ 3 エイティール, ケンブリッジ, ベイブラハム・リサーチ・キャンパス, ビルディング ビー 9 0 0 , バイスクールアールディー・リミテッド内

(72) 発明者 ボニー, クリストフ

スイス国, アヴァンシュ 1 5 8 0 , アン・ヴェルノール 2

F ターム (参考) 2G045 AA40 DA20 DA36 FB03

4B064 AG01 CC24 DA01

4C076 AA95 CC04 CC07 CC27 CC32 CC35 CC41 EE41 EE59

4C084 AA02 AA03 BA03 BA25 BA31 CA59 DC50 NA05 NA13 ZB071

ZB072 ZB111 ZB112 ZB131 ZB132 ZB261 ZB262 ZB331 ZB332 ZB351

ZB352

4H045 AA10 AA20 AA30 EA20 FA20 FA74