(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2021-511013
(P2021-511013A)
(43)公表日　令和3年5月6日(2021.5.6)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C12N 15/62	(2006.01)	C12N	15/62	Z	4B050
C07K 19/00	(2006.01)	C07K	19/00	ZNA	4B064
C12N 9/78	(2006.01)	C12N	9/78		4B065
C07K 16/30	(2006.01)	C07K	16/30		4C076
C07K 16/18	(2006.01)	C07K	16/18		4C084

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 74 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2020-532877 (P2020-532877)
(86)(22)出願日　平成31年1月4日(2019.1.4)
(85)翻訳文提出日　令和2年6月15日(2020.6.15)
(86)国際出願番号　PCT/IB2019/000013
(87)国際公開番号　WO2019/135159
(87)国際公開日　令和1年7月11日(2019.7.11)
(31)優先権主張番号　62/613,653
(32)優先日　平成30年1月4日(2018.1.4)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(71)出願人　515060447
シャンハイ　ルーモサ　セラピューティクス　カンパニー　リミテッド
中華人民共和国　２００１３１　シャンハイ　シャンハイ・パイロット・フリー・トレード・ゾーン　ファースト・イースト・フュート・ロード　ナンバー・１４６　ビルディング・１　サード・フロアー　ルーム・３０２６
(71)出願人　517413638
ルモサ　セラピューティクス　カンパニー，　リミテッド
台湾　１１５０３　タイペイ，　ナンガン　ディストリクト，　パーク　ストリート，　ナンバー　３－２，　４エフ
最終頁に続く

(54)【発明の名称】シングルドメイン抗体－シトシンデアミナーゼ融合タンパク質

(57)【要約】
本開示は、融合タンパク質、融合タンパク質の製造方法、及び融合タンパク質の使用方法に関し、この融合タンパク質は、任意にペプチドリンカーを介して連結された、機能的シングルドメイン抗体（ｓｄＡｂ）又はその機能的変異体、及びシトシンデアミナーゼ（ＣＤ）タンパク質又はその機能的変異体を含む。また、本開示の融合タンパク質は、ＣＤ活性を有する。本開示は、このような融合タンパク質と薬学的に許容できる賦形剤とを含む医薬組成物又は処方物、及びこれらの融合タンパク質の医学的使用にも関する。
【選択図】図２Ａ

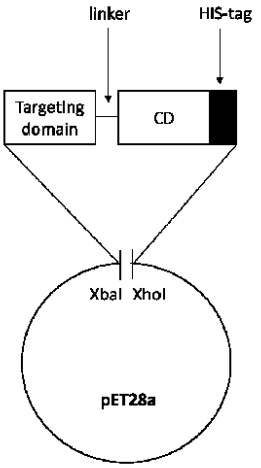


FIG. 2A

【特許請求の範囲】
【請求項１】
式Ｉ又は式ＩＩを含む融合タンパク質であって、
式Ｉは、Ｎ－（Ｌ）ｎ－Ｃであり、
式ＩＩは、Ｃ－（Ｌ）ｎ－Ｎであり、
前記式中、Ｎは、シングルドメイン抗体（ｓｄＡｂ）又はその機能的変異体であり、Ｌはペプチドリンカーであり、ｎは０～５０であり、Ｃは、シトシンデアミナーゼ（ＣＤ）タンパク質又はその機能的変異体である融合タンパク質。
【請求項２】
ｎが０である請求項１に記載の融合タンパク質。
【請求項３】
ｎが１である請求項１に記載の融合タンパク質。
【請求項４】
ｎが２である請求項１に記載の融合タンパク質。
【請求項５】
前記融合タンパク質が、実質的に式Ｉ又は式ＩＩからなる請求項１から請求項４のいずれか一項に記載の融合タンパク質。
【請求項６】
前記融合タンパク質が、式Ｉ又は式ＩＩからなる請求項１から請求項５のいずれか一項に記載の融合タンパク質。
【請求項７】
前記ｓｄＡｂ又はその機能的変異体が標的に結合し、前記標的が、任意に、細胞膜分子、分泌された分子、及び細胞内分子からなる群から選択される請求項１から請求項６のいずれか一項に記載の融合タンパク質。
【請求項８】
前記標的が、腫瘍関連抗原又は腫瘍特異的抗原である請求項７に記載の融合タンパク質。
【請求項９】
前記標的が、ＥＧＦＲ、５Ｔ４、Ａ３３、ＡＦＰ、β－カテニン、ＢＲＣＡ１、ＢＲＣＡ２、Ｃ２４２、ＣＣＲ４、ＣＤ１５２、ＣＤ１９、ＣＤ２０、ＣＤ２００、ＣＤ２２、ＣＤ２２１、ＣＤ２３、ＣＤ３０、ＣＤ３、ＣＤ３７、ＣＤ４０、ＣＤ４４、ＣＤ５、ＣＤ５１、ＣＤ５２、ＣＤ５６、ＣＤ６４、ＣＤ７４、ＣＤ８０、ＣＤＣＰ１、ｃ－ＫＩＴ、ＣＯＸ－２、ｃＭＥＴ、ＣＳＦ１Ｒ、ＣＴＬＡ－４、ＥＧＦ２、ＥｒｂＢ２、ＥｒｂＢ３、ＦＧＦＲ１、ＦＧＦＲ２、ＦＧＦＲ３、ＦＬＴ３、ＨＥＲ２、ＨＥＲ３、ＨＩＦ－Ｉａ、ＨＬＡ－ＤＲ、ＩＧＦ－ＩＲ、ｍＴＯＲ、ＮＰＣ－１Ｃ、Ｐ５３、ＰＤＧＦＲα、ＰＤＧＦＲβ、ＰＬＧＦ、ＰＳＡ、ＲＧＭａ、ＲｏＮ、ＴＮＦ、ＴＰ５３、ＴＰＤ５２、ＶＥＧＦＲ１、ＶＥＧＦＲ２、ＶＥＧＦＲ３、ＣＡ－ＩＸ、αｖβ３、α５β１、ＦＡＰ、糖タンパク質７５、ＴＡＧ－７２、ＭＵＣ１６、ＮＲ－ＬＵ－１３、ＳＬＡＭＦ７、ＥＧＰ４０、ＢＡＦＦ、ＰＲＬ－３、癌胎児性抗原（ＣＥＡ）、前立腺特異的膜抗原、ＭＡＲＴ－１、ｇｐ１００、癌精巣（ＣＴ）抗原（例えばＮＹ－ＥＳＯ－１、ＭＡＧＥ－Ａ３、ＭＡＧＥ－Ａ１）、ｈＴＥＲＴ、メソテリン、ＭＣＣ、Ｍｕｍ－１、ＥＲＢＢ２ＩＰ、ＥｐＣＡＭ、ＴｆＲ、インテグリンα６β４、ＨＧＦＲ、ＰＴＰ－ＬＡＲ、ＣＤ１４７、ＣＤＣＰ１、ＣＥＡＣＡＭ６、ＪＡＭ１、インテグリンα３β１、インテグリンαｖβ３、ＰＤ－Ｌ１、ＡＸＬ、ＣＤＨ６、ＤＬＬ３、ＥＤＮＲＢ、ＥＦＮＡ４、ＮＥＰＰ３、ＥＰＨＡ２、ＦＯＬＲ１、ＬｅｗｉｓＹ、ＧＰＮＭＢ、ＧＵＣＹ２Ｃ、ＨＡＶＣＲ１、インテグリンα、ＬＹＰＤ３、ＭＵＣ１、ＮＥＣＴＩＮ４、ＮＯＴＣＨ３、ＰＴＫ７、ＳＬＣ３４Ａ２、ＳＬＣ３９Ａ６、ＳＬＣ４４Ａ４、ＳＬＩＴＲＫ６、ＳＴＥＡＰ１、ＴＡＣＳＴＤ２、ＴＰＢＧ、ＴＩＭ－１、ＧＤ２、及びニコチン性アセチルコリン受容体（ｎＡＣｈＲ）からなる群から選択される請求項７又は請求項８に記載の融合タンパク質。
【請求項１０】

前記標的が、ＥＧＦＲ、ｃ－ＫＩＴ、ｃＭＥＴ、ＨＥＲ２、ＨＥＲ３、ＦＧＦＲ１、ＦＧＦＲ２、ＦＧＦＲ３、ＩＧＦ－ＩＲ、Ｐ５３、ＰＤＧＦＲα、ＶＥＧＦＲ１、ＶＥＧＦＲ２、ＶＥＧＦＲ３、ＣＡ－ＩＸ、αｖβ３、α５β１、ＭＵＣ１６、癌胎児性抗原（ＣＥＡ）、前立腺特異的膜抗原、癌精巣（ＣＴ）抗原（例えば、ＮＹ－ＥＳＯ－１、ＭＡＧＥ－Ａ３、ＭＡＧＥ－Ａ１）、メソテリン、ＥｐＣＡＭ、インテグリンα６β４、ＣＥＡＣＡＭ６、インテグリンα３β１、インテグリンαｖβ３、ＰＤ－Ｌ１、ＡＸＬ、ＣＤＨ６、ＤＬＬ３、ＥＤＮＲＢ、ＥＦＮＡ４、ＮＥＰＰ３、ＥＰＨＡ２、ＦＯＬＲ１、ＬｅｗｉｓＹ、ＧＰＮＭＢ、ＧＵＣＹ２Ｃ、ＨＡＶＣＲ１、インテグリンα、ＬＹＰＤ３、ＭＵＣ１、ＮＥＣＴＩＮ４、ＮＯＴＣＨ３、ＰＴＫ７、ＳＬＣ３４Ａ２、ＳＬＣ３９Ａ６、ＳＬＣ４４Ａ４、ＳＬＩＴＲＫ６、ＳＴＥＡＰ１、ＴＡＣＳＴＤ２、ＴＰＢＧ、ＴＩＭ－１、ＧＤ２、及びニコチン性アセチルコリン受容体（ｎＡＣｈＲ）からなる群から選択される請求項７又は請求項８に記載の融合タンパク質。

【請求項１１】

前記標的がＶＥＧＦＲ２、ＥＧＦＲ、ＣＥＡ、ＨＥＲ２、又はＨＥＲ３である請求項７から請求項１０のいずれか一項に記載の融合タンパク質。

【請求項１２】

前記標的がＶＥＧＦＲ２である請求項１１に記載の融合タンパク質。

【請求項１３】

前記標的がＥＧＦＲである請求項１１に記載の融合タンパク質。

【請求項１４】

前記ｓｄＡｂ又はその機能的変異体が、配列番号２８、配列番号３１及び配列番号３４からなる群から選択される相補性決定領域１（ＣＤＲ１）、配列番号２９、配列番号３２及び配列番号３５からなる群から選択されるＣＤＲ２、並びに配列番号３０、配列番号３３及び配列番号３６からなる群から選択されるＣＤＲ３を含む請求項１１又は請求項１２に記載の融合タンパク質。

【請求項１５】

前記ｓｄＡｂ又はその機能的変異体が、配列番号２３（３ＶＧＲ１９）のアミノ酸配列を含む請求項１４に記載の融合タンパク質。

【請求項１６】

前記ｓｄＡｂ又はその機能的変異体が、配列番号２４（４ＶＧＲ１７）のアミノ酸配列を含む請求項１４に記載の融合タンパク質。

【請求項１７】

前記ｓｄＡｂ又はその機能的変異体が、配列番号２５（４ＶＧＲ３８）のアミノ酸配列を含む請求項１４に記載の融合タンパク質。

【請求項１８】

前記ｓｄＡｂ又はその機能的変異体が、配列番号３７及び配列番号４０からなる群から選択されるＣＤＲ１、配列番号３８及び配列番号４１からなる群から選択されるＣＤＲ２、並びに配列番号３９及び配列番号４２からなる群から選択されるＣＤＲ３を含む請求項１１又は請求項１３に記載の融合タンパク質。

【請求項１９】

前記ｓｄＡｂ又はその機能的変異体が、配列番号２６（ＶＨＨ１２２）のアミノ酸配列を含む請求項１８に記載の融合タンパク質。

【請求項２０】

前記ｓｄＡｂ又はその機能的変異体が、配列番号２７（７Ｄ１２）のアミノ酸配列を含む請求項１８に記載の融合タンパク質。

【請求項２１】

前記ｓｄＡｂ又はその機能的変異体が、配列番号１９９、配列番号２０２及び配列番号２０５からなる群から選択されるＣＤＲ１、配列番号２００、配列番号２０３及び配列番号２０６からなる群から選択されるＣＤＲ２、並びに配列番号２０１、配列番号２０４及び配列番号２０７からなる群から選択されるＣＤＲ３を含む請求項１１に記載の融合タン

パク質。
【請求項２２】
前記ｓｄＡｂ又はその機能的変異体が、配列番号６９（２Ｄ３）のアミノ酸配列を含む請求項２１に記載の融合タンパク質。
【請求項２３】
前記ｓｄＡｂ又はその機能的変異体が、配列番号７０（５Ｆ７）のアミノ酸配列を含む請求項２１に記載の融合タンパク質。
【請求項２４】
前記ｓｄＡｂ又はその機能的変異体が、配列番号７１（４７Ｄ５）のアミノ酸配列を含む請求項２１に記載の融合タンパク質。
【請求項２５】
前記ｓｄＡｂ又はその機能的変異体が、配列番号２０８のＣＤＲ１、配列番号２０９のＣＤＲ２、及び配列番号２１０のＣＤＲ３を含む請求項１１に記載の融合タンパク質。
【請求項２６】
前記ｓｄＡｂ又はその機能的変異体が、配列番号７５（ＢＣＤ０９０－Ｍ２）のアミノ酸配列を含む請求項２５に記載の融合タンパク質。
【請求項２７】
前記ｓｄＡｂ又はその機能的変異体が、配列番号２１１及び配列番号２１４からなる群から選択されるＣＤＲ１、配列番号２１２及び配列番号２１５からなる群から選択されるＣＤＲ２、並びに配列番号２１３及び配列番号２１６からなる群から選択されるＣＤＲ３を含む請求項１１に記載の融合タンパク質。
【請求項２８】
前記ｓｄＡｂ又はその機能的変異体が、配列番号７７（ＡＢＳ２９５４４．１）のアミノ酸配列を含む請求項２７に記載の融合タンパク質。
【請求項２９】
前記ｓｄＡｂ又はその機能的変異体が、配列番号７９（ＮｂＣＥＡ５）のアミノ酸配列を含む請求項２７に記載の融合タンパク質。
【請求項３０】
少なくとも１つのペプチドリンカーが、配列番号１、配列番号４、配列番号５、又は配列番号１８８のアミノ酸配列を含む請求項１及び請求項３から請求項２９のいずれか一項に記載の融合タンパク質。
【請求項３１】
前記ＣＤタンパク質又はその機能的変異体が、（ｉ）細菌性ＣＤタンパク質若しくはその機能的変異体、又は（ｉｉ）酵母由来ＣＤ若しくはその機能的変異体である請求項１から請求項３０のいずれか一項に記載の融合タンパク質。
【請求項３２】
前記ＣＤタンパク質又はその機能的変異体が、配列番号２１、配列番号２２、配列番号１８６及び配列番号１８７からなる群から選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも９０％同一、少なくとも９１％同一、少なくとも９２％同一、少なくとも９３％同一、少なくとも９４％同一、少なくとも９５％同一、少なくとも９６％同一、少なくとも９７％同一、少なくとも９８％同一、少なくとも９９％同一、又は１００％同一であるアミノ酸配列を含む請求項３１に記載の融合タンパク質。
【請求項３３】
前記ＣＤタンパク質又はその機能的変異体が、配列番号２１、配列番号２２、配列番号１８６及び配列番号１８７からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む請求項３２に記載の融合タンパク質。
【請求項３４】
前記ＣＤタンパク質又はその機能的変異体が、配列番号２１、配列番号２２、配列番号１８６及び配列番号１８７からなる群から選択されるアミノ酸配列からなる請求項３２に記載の融合タンパク質。

【請求項３５】
前記ＣＤタンパク質又はその機能的変異体が、配列番号２１、配列番号２２、配列番号１８６及び配列番号１８７からなる群から選択される開始アミノ酸配列の機能的変異体であり、前記開始アミノ酸配列が配列番号２１又は配列番号２２である場合に、前記機能的変異体が、Ｙ８４Ａ、Ｙ８４Ｈ、Ｔ８５Ｄ、Ｔ８６Ｅ、Ｍ９２Ｎ、Ｍ９２Ａ、Ｍ９２Ｋ、Ｍ９２Ｑ、Ｖ１２８Ａ、Ｖ１２８Ｔ、Ｖ１２９Ａ、Ｖ１２９Ｌ、Ｖ１２９Ｉ、Ｖ１２９Ｔ、Ｖ１３０Ａ、及びＶ１３０Ｔからなる群から選択される少なくとも１つの変異を含み、前記開始アミノ酸配列が配列番号１８６又は配列番号１８７である場合に、前記機能的変異体が、Ｙ８５Ａ、Ｙ８５Ｈ、Ｔ８６Ｄ、Ｔ８７Ｅ、Ｍ９３Ｎ、Ｍ９３Ａ、Ｍ９３Ｋ、Ｍ９３Ｑ、Ｖ１２９Ａ、Ｖ１２９Ｔ、Ｖ１３０Ａ、Ｖ１３０Ｌ、Ｖ１３０Ｉ、Ｖ１３０Ｔ、Ｖ１３１Ａ、及びＶ１３１Ｔからなる群から選択される少なくとも１つの変異を含む請求項３１又は請求項３２に記載の融合タンパク質。
【請求項３６】
抗ＶＥＧＦＲ２　ｓｄＡｂ又はその機能的変異体と、ＣＤタンパク質又はその機能的変異体とを含む請求項１から請求項１２のいずれか一項に記載の融合タンパク質。
【請求項３７】
（ｉ）配列番号７、
（ｉｉ）配列番号７のアミノ酸１～２９７、
（ｉｉｉ）配列番号９、
（ｉｖ）配列番号９のアミノ酸１～２９７、
（ｖ）配列番号１１、及び
（ｖｉ）配列番号１１のアミノ酸１～２９７
からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む請求項３６に記載の融合タンパク質。
【請求項３８】
抗ＥＧＦＲ　ｓｄＡｂ又はその機能的変異体と、ＣＤタンパク質又はその機能的変異体とを含む請求項１から請求項１１及び請求項１３のいずれか一項に記載の融合タンパク質。
【請求項３９】
（ｉ）配列番号１３、
（ｉｉ）配列番号１３のアミノ酸１～２９７、
（ｉｉｉ）配列番号１５、
（ｉｖ）配列番号１５のアミノ酸１～２９７、
（ｖ）配列番号１７、及び
（ｖｉ）配列番号１９
からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む請求項３８に記載の融合タンパク質。
【請求項４０】
抗ＨＥＲ２　ｓｄＡｂ又はその機能的変異体と、ＣＤタンパク質又はその機能的変異体とを含む請求項１から請求項１１のいずれか一項に記載の融合タンパク質。
【請求項４１】
（ｉ）配列番号７２、
（ｉｉ）配列番号７２のアミノ酸１～２９７、
（ｉｉｉ）配列番号７３、
（ｉｖ）配列番号７３のアミノ酸１～２９１、
（ｖ）配列番号７４、及び
（ｖｉ）配列番号７４のアミノ酸１～２９２
からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む請求項４０に記載の融合タンパク質。
【請求項４２】
抗ＨＥＲ３　ｓｄＡｂ又はその機能的変異体と、ＣＤタンパク質又はその機能的変異体とを含む請求項１から請求項１１のいずれか一項に記載の融合タンパク質。
【請求項４３】

（ｉ）配列番号７６、及び
（ｉｉ）配列番号７６のアミノ酸１～３００
からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む請求項４２に記載の融合タンパク質。
【請求項４４】
抗ＣＥＡ　ｓｄＡｂ又はその機能的変異体と、ＣＤタンパク質又はその機能的変異体とを含む請求項１から請求項１１のいずれか一項に記載の融合タンパク質。
【請求項４５】
（ｉ）配列番号７８、
（ｉｉ）配列番号７８のアミノ酸１～２９３、
（ｉｉｉ）配列番号８０、及び
（ｉｖ）配列番号８０のアミノ酸１～２９６
からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む請求項４４に記載の融合タンパク質。
【請求項４６】
前記融合タンパク質が、少なくとも１つのＴ細胞エピトープに少なくとも１つの脱免疫変異を含み、前記少なくとも１つのＴ細胞エピトープが、エピトープ１（配列番号６３）、エピトープ２（配列番号６４）、エピトープ３（配列番号６５）、エピトープ４（配列番号６６）、エピトープ５（配列番号６７）、及びエピトープ６（配列番号６８）からなる群から選択される請求項１から請求項４５のいずれか一項に記載の融合タンパク質。
【請求項４７】
実質的に、配列番号１７、配列番号１９、配列番号９３～配列番号１８５のいずれか１つのアミノ酸配列、又は配列番号９３～配列番号１８１のいずれか１つのアミノ酸１～２９７からなる請求項１に記載の融合タンパク質。
【請求項４８】
実質的に、配列番号１９、配列番号１８２、配列番号１８３、配列番号１８４、及び配列番号１８５からなる群から選択されるアミノ酸配列からなる請求項４７に記載の融合タンパク質。
【請求項４９】
有効量の請求項１から請求項４８のいずれか一項に記載の少なくとも１種の融合タンパク質と、少なくとも１種の薬学的に許容できる担体又は賦形剤とを含む医薬組成物。
【請求項５０】
必要とする対象において癌を処置する方法であって、前記対象に、請求項１から請求項４８のいずれか一項に記載の少なくとも１種の融合タンパク質又は請求項４９に記載の医薬組成物を投与する工程を備える方法。
【請求項５１】
前記少なくとも１種の融合タンパク質又は前記医薬組成物が非経口投与される請求項５０に記載の方法。
【請求項５２】
前記対象に、有効量のシトシンデアミナーゼに対する基質を投与する工程をさらに含む請求項５０又は請求項５１に記載の方法。
【請求項５３】
前記基質が、５－フルオロウラシルのプロドラッグを含む請求項５２に記載の方法。
【請求項５４】
前記５－フルオロウラシルのプロドラッグが、５－フルオロシトシン（５－ＦＣ）、Ｔｏｃａ　ＦＣ、５－ＦＣのアナログ、及び光で活性化されうる化合物、その塩又はエステルからなる群から選択される請求項５３に記載の方法。
【請求項５５】
前記プロドラッグが５－ＦＣである請求項５４に記載の方法。
【請求項５６】
前記癌が、結腸癌、胃癌、膵臓癌、乳癌、基底細胞癌、ボーエン病、子宮頸癌、眼表面扁平上皮新生物、黒色腫、腎細胞癌、肺癌、膀胱癌、胆嚢癌、喉頭癌、肝癌、甲状腺癌、

唾液腺癌、前立腺癌、結直腸癌、頭頸部癌、胆管細胞癌、食道癌、骨癌、子宮内膜癌、卵巣癌、軟部肉腫、及びメルケル細胞癌からなる群から選択される請求項５０から請求項５５のいずれか一項に記載の方法。

【請求項５７】

前記癌が固形腫瘍である請求項５０から請求項５６のいずれか一項に記載の方法。

【請求項５８】

前記固形腫瘍が、結腸癌、結直腸癌、膵臓癌、又は頭頸部癌である請求項５７に記載の方法。

【請求項５９】

請求項１から請求項４８のいずれか一項に記載の融合タンパク質をコードする核酸配列を含む核酸分子であって、任意に、コドン最適化核酸配列を含む核酸分子。

【請求項６０】

実質的に、配列番号８、配列番号１０、配列番号１２、配列番号１４、配列番号１６、配列番号１８、配列番号２０、配列番号１９５、配列番号１９６、配列番号１９７、及び配列番号１９８からなる群から選択される核酸配列からなる請求項５９に記載の核酸分子。

【請求項６１】

請求項５９又は請求項６０に記載の核酸分子を含むベクター。

【請求項６２】

請求項６１に記載のベクターを含む宿主細胞。

【請求項６３】

非哺乳類細胞である請求項６２に記載の宿主細胞。

【請求項６４】

酵母細胞又はバクテリア細胞である請求項６３に記載の宿主細胞。

【請求項６５】

大腸菌細胞、古細菌細胞、又は放線菌細胞である請求項６４に記載の宿主細胞。

【請求項６６】

ジスルフィド結合形成のための細胞質内環境を提供する大腸菌株である請求項６５に記載の宿主細胞。

【請求項６７】

前記大腸菌株が、細胞質ジスルフィド結合イソメラーゼの染色体コピーを構成的に発現する請求項６６に記載の宿主細胞。

【請求項６８】

前記細胞質ジスルフィド結合イソメラーゼがＤｓｂＣである請求項６７に記載の宿主細胞。

【請求項６９】

前記大腸菌株が、ＳＨｕｆｆｌｅ（登録商標）Ｔ７、ＳＨｕｆｆｌｅ（登録商標）Ｔ７　Ｅｘｐｒｅｓｓ、ＳＨｕｆｆｌｅ（登録商標）Ｅｘｐｒｅｓｓ、Ｏｒｉｇａｍｉ（商標）、又はＲｏｓｅｔｔａ－ｇａｍｉ（商標）である請求項６６に記載の宿主細胞。

【請求項７０】

融合タンパク質の製造方法であって、宿主細胞において請求項５９又は請求項６０に記載の核酸を発現する工程を備える方法。

【請求項７１】

前記宿主細胞が、前記融合タンパク質の活性、細胞質内での産生、及び／又は安定性を向上するように操作されている請求項７０に記載の方法。

【請求項７２】

前記融合タンパク質の前記活性、細胞質内での産生、及び／又は安定性が、同じ宿主細胞の非操作版により産生される前記融合タンパク質と比べて２倍、５倍、１０倍、２０倍、５０倍、又は１００倍向上している、ジスルフィド結合を有する融合タンパクを与える請求項７１に記載の方法。

【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
関連出願
本願は、２０１８年１月４日出願の米国仮出願第６２／６１３，６５３号に基づく優先権を主張し、この仮出願は、参照によりその全体が援用される。
【０００２】
電子データで提出した配列表への参照
配列表の公式コピーが、ファイル名１３０７５＿０００３＿ＳＬ．ｔｘｔで、２０１９年１月３日に作成され、３８５，７３４バイトのサイズを有するＡＳＣＩＩフォーマットの配列表として、ＥＦＳ－Ｗｅｂを介して電子データで提出されている。このＡＳＣＩＩフォーマットの文書に含まれる配列表は明細書の一部であり、参照によりその全体を本明細書に援用したものとする。
【０００３】
分野
本開示は、融合タンパク質、融合タンパク質の製造方法、及び融合タンパク質の使用方法に関する。より具体的には、本開示は、任意にペプチドリンカーを介して連結された、細胞タンパク質に対する機能的シングルドメイン抗体（ｓｄＡｂ）（例えば、ＶＨＨ又はナノボディ）又はその機能的変異体、及びシトシンデアミナーゼ（ＣＤ）タンパク質、又はその機能的変異体を含む融合タンパク質に関する。このｓｄＡｂ又はその機能的変異体は、ＣＤタンパク質又はその機能的変異体のＮ末端又はＣ末端に、任意にペプチドリンカーを介して連結されてもよい。本開示の融合タンパク質は、ＣＤ活性も有する。本開示は、このような融合タンパク質と薬学的に許容できる賦形剤とを含む医薬組成物又は処方物、及びこれらの融合タンパク質の医学的使用にも関する。
【背景技術】
【０００４】
化学療法薬５－フルオロウラシル（５－ＦＵ）は、癌治療において広く使用されてきているが、５－ＦＵを用いる全身治療は重篤な毒性副作用を伴う。この薬剤は、転写を妨害することにより細胞成長を阻害し、癌及び他の増殖性疾患の処置（治療）において有用でありうる。シトシンデアミナーゼ（ＣＤ）は、無毒なプロドラッグ５－フルオロシトシン（５－ＦＣ）を細胞傷害性薬物（細胞毒）５－フルオロウラシルに変換する。ヒト細胞ではＣＤを欠くため、５－ＦＣは、ヒト細胞にとっては毒性はない。５－フルオロシトシンプロドラッグと同時投与されるシトシンデアミナーゼ遺伝子は、癌遺伝子治療における最も幅広く試験された自殺システムのうちの１つである。腫瘍内でのＣＤ遺伝子の発現は、その対象の５－ＦＣ処置の後、局所的な５－フルオロウラシルの生成を誘導して、腫瘍内化学療法をもたらすことができる。５－ＦＣ及びＣＤの投与を組み合わせることは、全身毒性を伴うことが多い。それゆえ、増殖性疾患の処置においてＣＤ／５－ＦＣ組み合わせ戦略を利用するための代替手段に対するニーズがある。
【０００５】
抗体指向性酵素プロドラッグ療法（ａｎｔｉｂｏｄｙ－ｄｉｒｅｃｔｅｄ　ｅｎｚｙｍｅ－ｐｒｏｄｒｕｇ　ｔｈｅｒａｐｙ：ＡＤＥＰＴ）は、この制約を克服するために開発された。活性化酵素は、腫瘍特異的抗体に結合されて、腫瘍細胞へ送達され、その後に、酵素によって活性化されるまで不活性なプロドラッグが投与される。こうして、全身毒性を回避することができる。
【０００６】
Ｐａｒｋらは、ＴＳＧ－６のヒアルロナン結合ドメイン（リンク）及び酵母由来シトシンデアミナーゼ（ＣＤ）を含有する組換え融合タンパク質を開示した。Ｐａｒｋらの研究では、ＧＳＴタグ、（Ｇｌｙ４Ｓｅｒ）３（配列番号１８８）リンカー等、種々のリンク－ＣＤ構築物が、ＢＬ２１－Ｃｏｄｏｎ　Ｐｌｕｓ（登録商標）（ＤＥ３）ＲＩＰＬ大腸菌細胞の中で発現された。可溶性タンパク質の蓄積を増大させる努力にもかかわらず、発

現されたタンパク質のほとんどは、封入体の中で凝集した。平均で、培地１リットルあたり、可溶部から約５００μｇ／Ｌの精製タンパク質が回収された（Ｍｏｌ　Ｐｈａｒｍ．２００９；６（３）：８０１－８１２）。

【０００７】

Ｄｅｃｋｅｒｔらは、Ａ３３ｓｃＦｖ－シトシンデアミナーゼ組換えタンパク質を開示し、その特異的抗原結合活性及び酵素活性を実証した。Ａ３３ｓｃＦｖ－ＣＤは、ＢＬ２１大腸菌λＤＥ３溶原菌を使用するＴ７－ＲＮＡポリメラーゼ制御の細菌系によって発現された。融合タンパク質は、約１００μｇ／Ｌの最終培養収率で封入体として発現された（Ｂｒｉｔｉｓｈ　Ｊｏｕｒｎａｌ　ｏｆ　Ｃａｎｃｅｒ（２００３）　８８、９３７－９３９）。

【０００８】

ヒト抗体配列及び細菌性酵素からなる異種起源タンパク質を単一の発現系で発現することは困難である。Ｃｏｅｌｈｏらは、生産のための高収率クローンを選択するために、Ａ３３ｓｃＦｖ－シトシンデアミナーゼ組換えタンパク質をピキア・パストリス（Ｐｉｃｈｉａ　Ｐａｓｔｏｒｉｓ）において産生することを試みた。Ｃｏｅｌｈｏらの研究では、高生産性ｐＰＩＣＺαＡ形質転換体ピキア（Ｐｉｃｈｉａ）クローンが選択された。標的タンパク質を培養液上清へと分泌させることができる。精製後の全体収率は約１．０ｍｇ／Ｌであった（Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ　Ｊｏｕｒｎａｌ　ｏｆ　Ｏｎｃｏｌｏｇｙ　３１：９５１－９５７、２００７）。

【０００９】

これらの結果は、すべて、腫瘍特異的抗体又は抗原結合断片とＣＤとの融合は工業生産には好適ではないということを示した。それゆえ、工業的使用のための有望な生産収率を有し、特異的抗原結合活性及び酵素活性を実証するＣＤ融合タンパク質に対するニーズがある。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【００１０】

【非特許文献１】Ｍｏｌ　Ｐｈａｒｍ．２００９；６（３）：８０１－８１２

【非特許文献２】Ｂｒｉｔｉｓｈ　Ｊｏｕｒｎａｌ　ｏｆ　Ｃａｎｃｅｒ（２００３）８８、９３７－９３９

【非特許文献３】Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ　Ｊｏｕｒｎａｌ　ｏｆ　Ｏｎｃｏｌｏｇｙ　３１：９５１－９５７、２００７

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【００１１】

本開示は、融合タンパク質、融合タンパク質の製造方法、及び融合タンパク質の使用方法を提供する。以下は、本開示の非限定的な例示的な実施形態である。

【００１２】

本開示のいくつかの実施形態では、当該融合タンパク質は、式Ｉ又は式ＩＩを含む。

Ｎ－（Ｌ）ｎ－Ｃ（式Ｉ）；

Ｃ－（Ｌ）ｎ－Ｎ（式ＩＩ）；

上記式中、Ｎは、シングルドメイン抗体（ｓｄＡｂ）又はその機能的変異体であり、Ｌはペプチドリンカーであり、ｎは０～５０であり、Ｃは、シトシンデアミナーゼ（ＣＤ）タンパク質又はその機能的変異体である。

【００１３】

これらの実施形態のいくつかの態様では、当該融合タンパク質は、式Ｉを含み、ペプチドリンカーのＣ末端又はｓｄＡｂ若しくはその機能的変異体のＣ末端は、ＣＤタンパク質又はその機能的変異体のＮ末端に融合されている。例えば、いくつかの態様では、ペプチドリンカーは存在せず、ｓｄＡｂ又はその機能的変異体のＣ末端は、ＣＤタンパク質又はその機能的変異体のＮ末端に融合されている。いくつかの態様では、少なくとも１つのペ

プチドリンカーが存在し、ｓｄＡｂ又はその機能的変異体のＣ末端は、ペプチドリンカーのＮ末端に融合されており、ペプチドリンカーのＣ末端は、別のペプチドリンカーのＮ末端又はＣＤタンパク質若しくはその機能的変異体のＮ末端に融合されている。

【００１４】

これらの実施形態の他の態様では、当該融合タンパク質は、式ＩＩを含み、ペプチドリンカーのＣ末端又はＣＤタンパク質若しくはその機能的変異体のＣ末端は、ｓｄＡｂ又はその機能的変異体のＮ末端に融合されている。例えば、いくつかの態様では、ペプチドリンカーは存在せず、ＣＤタンパク質又はその機能的変異体のＣ末端は、ｓｄＡｂ又はその機能的変異体のＮ末端に融合されている。いくつかの態様では、少なくとも１つのペプチドリンカーが存在し、ＣＤタンパク質又はその機能的変異体のＣ末端は、ペプチドリンカーのＮ末端に融合されており、ペプチドリンカーのＣ末端は、別のペプチドリンカーのＮ末端又はｓｄＡｂ又はその機能的変異体のＮ末端に融合されている。

【００１５】

いくつかの実施形態では、当該融合タンパク質は、実質的に式Ｉからなる。いくつかの実施形態では、当該融合タンパク質は式Ｉである。

【００１６】

いくつかの実施形態では、当該融合タンパク質は、実質的に式ＩＩからなる。いくつかの実施形態では、当該融合タンパク質は式ＩＩである。

【００１７】

いくつかの実施形態では、上記ｓｄＡｂ又はその機能的変異体は標的に結合し、この標的は、細胞膜分子、分泌された分子及び細胞内分子からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、標的は、腫瘍関連抗原又は腫瘍特異的抗原である。

【００１８】

いくつかの実施形態では、上記標的は、ＥＧＦＲ、５Ｔ４、Ａ３３、ＡＦＰ、β－カテニン、ＢＲＣＡ１、ＢＲＣＡ２、Ｃ２４２、ＣＣＲ４、ＣＤ１５２、ＣＤ１９、ＣＤ２０、ＣＤ２００、ＣＤ２２、ＣＤ２２１、ＣＤ２３、ＣＤ３０、ＣＤ３、ＣＤ３７、ＣＤ４０、ＣＤ４４、ＣＤ５、ＣＤ５１、ＣＤ５２、ＣＤ５６、ＣＤ６４、ＣＤ７４、ＣＤ８０、ＣＤＣＰ１、ｃ－ＫＩＴ、ＣＯＸ－２、ｃＭＥＴ、ＣＳＦ１Ｒ、ＣＴＬＡ－４、ＥＧＦ２、ＥｒｂＢ２、ＥｒｂＢ３、ＦＧＦＲ１、ＦＧＦＲ２、ＦＧＦＲ３、ＦＬＴ３、ＨＥＲ２、ＨＥＲ３、ＨＩＦ－Ｉａ、ＨＬＡ－ＤＲ、ＩＧＦ－ＩＲ、ｍＴＯＲ、ＮＰＣ－１Ｃ、Ｐ５３、ＰＤＧＦＲα、ＰＤＧＦＲβ、ＰＬＧＦ、ＰＳＡ、ＲＧＭａ、ＲｏＮ、ＴＮＦ、ＴＰ５３、ＴＰＤ５２、ＶＥＧＦＲ１、ＶＥＧＦＲ２、ＶＥＧＦＲ３、ＣＡ－ＩＸ、αｖβ３、α５β１、ＦＡＰ、糖タンパク質７５、ＴＡＧ－７２、ＭＵＣ１６、ＮＲ－ＬＵ－１３、ＳＬＡＭＦ７、ＥＧＰ４０、ＢＡＦＦ、ＰＲＬ－３、癌胎児性抗原（ＣＥＡ）、前立腺特異的膜抗原、ＭＡＲＴ－１、ｇｐ１００、癌精巣（ＣＴ）抗原（例えばＮＹ－ＥＳＯ－１、ＭＡＧＥ－Ａ３、ＭＡＧＥ－Ａ１）、ｈＴＥＲＴ、メソテリン、ＭＣＣ、Ｍｕｍ－１、ＥＲＢＢ２ＩＰ、ＥｐＣＡＭ、ＴｆＲ、インテグリンα６β４、ＨＧＦＲ、ＰＴＰ－ＬＡＲ、ＣＤ１４７、ＣＤＣＰ１、ＣＥＡＣＡＭ６、ＪＡＭ１、インテグリンα３β１、インテグリンαｖβ３、ＰＤ－Ｌ１、ＡＸＬ、ＣＤＨ６、ＤＬＬ３、ＥＤＮＲＢ、ＥＦＮＡ４、ＮＥＰＰ３、ＥＰＨＡ２、ＦＯＬＲ１、ＬｅｗｉｓＹ、ＧＰＮＭＢ、ＧＵＣＹ２Ｃ、ＨＡＶＣＲ１、インテグリンα、ＬＹＰＤ３、ＭＵＣ１、ＮＥＣＴＩＮ４、ＮＯＴＣＨ３、ＰＴＫ７、ＳＬＣ３４Ａ２、ＳＬＣ３９Ａ６、ＳＬＣ４４Ａ４、ＳＬＩＴＲＫ６、ＳＴＥＡＰ１、ＴＡＣＳＴＤ２、ＴＰＢＧ、ＴＩＭ－１、ＧＤ２、及びニコチン性アセチルコリン受容体（ｎＡＣｈＲ）からなる群から選択される。

【００１９】

いくつかの実施形態では、上記標的は、ＥＧＦＲ、ｃ－ＫＩＴ、ｃＭＥＴ、ＨＥＲ２、ＨＥＲ３、ＦＧＦＲ１、ＦＧＦＲ２、ＦＧＦＲ３、ＩＧＦ－ＩＲ、Ｐ５３、ＰＤＧＦＲα、ＶＥＧＦＲ１、ＶＥＧＦＲ２、ＶＥＧＦＲ３、ＣＡ－ＩＸ、αｖβ３、α５β１、ＭＵＣ１６、癌胎児性抗原（ＣＥＡ）、前立腺特異的膜抗原、癌精巣（ＣＴ）抗原（例えば、ＮＹ－ＥＳＯ－１、ＭＡＧＥ－Ａ３、ＭＡＧＥ－Ａ１）、メソテリン、ＥｐＣＡＭ、イン

テグリンα６β４、ＣＥＡＣＡＭ６、インテグリンα３β１、インテグリンαｖβ３、ＰＤ－Ｌ１、ＡＸＬ、ＣＤＨ６、ＤＬＬ３、ＥＤＮＲＢ、ＥＦＮＡ４、ＮＥＰＰ３、ＥＰＨＡ２、ＦＯＬＲ１、ＬｅｗｉｓＹ、ＧＰＮＭＢ、ＧＵＣＹ２Ｃ、ＨＡＶＣＲ１、インテグリンα、ＬＹＰＤ３、ＭＵＣ１、ＮＥＣＴＩＮ４、ＮＯＴＣＨ３、ＰＴＫ７、ＳＬＣ３４Ａ２、ＳＬＣ３９Ａ６、ＳＬＣ４４Ａ４、ＳＬＩＴＲＫ６、ＳＴＥＡＰ１、ＴＡＣＳＴＤ２、ＴＰＢＧ、ＴＩＭ－１、ＧＤ２、及びニコチン性アセチルコリン受容体（ｎＡＣｈＲ）からなる群から選択される。

【００２０】

いくつかの実施形態では、上記標的はＶＥＧＦＲ２、ＥＧＦＲ、ＣＥＡ、ＨＥＲ２、又はＨＥＲ３である。

【００２１】

いくつかの実施形態では、上記標的はＶＥＧＦＲ２である。いくつかの実施形態では、標的はＥＧＦＲである。

【００２２】

いくつかの実施形態では、上記ｓｄＡｂ又はその機能的変異体は、配列番号２８、配列番号３１及び配列番号３４からなる群から選択される相補性決定領域１（ＣＤＲ１）、配列番号２９、配列番号３２及び配列番号３５からなる群から選択されるＣＤＲ２、並びに配列番号３０、配列番号３３及び配列番号３６からなる群から選択されるＣＤＲ３を含む。いくつかの態様では、上記ｓｄＡｂ又はその機能的変異体は、実質的に、配列番号２８、配列番号３１及び配列番号３４からなる群から選択されるＣＤＲ１、配列番号２９、配列番号３２及び配列番号３５からなる群から選択されるＣＤＲ２、並びに配列番号３０、配列番号３３及び配列番号３６からなる群から選択されるＣＤＲ３からなる。いくつかの態様では、上記ｓｄＡｂ又はその機能的変異体は、配列番号２８、配列番号３１及び配列番号３４からなる群から選択されるＣＤＲ１、配列番号２９、配列番号３２及び配列番号３５からなる群から選択されるＣＤＲ２、並びに配列番号３０、配列番号３３及び配列番号３６からなる群から選択されるＣＤＲ３からなる。

【００２３】

いくつかの実施形態では、上記ｓｄＡｂ又はその機能的変異体は、配列番号２３（３ＶＧＲ１９）のアミノ酸配列を含む。いくつかの態様では、上記ｓｄＡｂ又はその機能的変異体は、実質的に、配列番号２３（３ＶＧＲ１９）のアミノ酸配列からなる。いくつかの態様では、上記ｓｄＡｂ又はその機能的変異体は、配列番号２３（３ＶＧＲ１９）のアミノ酸配列からなる。

【００２４】

いくつかの実施形態では、上記ｓｄＡｂ又はその機能的変異体は、配列番号２４（４ＶＧＲ１７）のアミノ酸配列を含む。いくつかの態様では、上記ｓｄＡｂ又はその機能的変異体は、実質的に、配列番号２４（４ＶＧＲ１７）のアミノ酸配列からなる。いくつかの態様では、上記ｓｄＡｂ又はその機能的変異体は、配列番号２４（４ＶＧＲ１７）のアミノ酸配列からなる。いくつかの実施形態では、上記ｓｄＡｂ又はその機能的変異体は、配列番号２５（４ＶＧＲ３８）のアミノ酸配列を含む。いくつかの態様では、上記ｓｄＡｂ又はその機能的変異体は、実質的に、配列番号２５（４ＶＧＲ３８）のアミノ酸配列からなる。いくつかの態様では、上記ｓｄＡｂ又はその機能的変異体は、配列番号２５（４ＶＧＲ３８）のアミノ酸配列からなる。

【００２５】

いくつかの実施形態では、上記ｓｄＡｂ又はその機能的変異体は、配列番号３７及び配列番号４０からなる群から選択されるＣＤＲ１、配列番号３８及び配列番号４１からなる群から選択されるＣＤＲ２、並びに配列番号３９及び配列番号４２からなる群から選択されるＣＤＲ３を含む。いくつかの態様では、上記ｓｄＡｂ又はその機能的変異体は、実質的に、配列番号３７及び配列番号４０からなる群から選択されるＣＤＲ１、配列番号３８及び配列番号４１からなる群から選択されるＣＤＲ２、並びに配列番号３９及び配列番号４２からなる群から選択されるＣＤＲ３からなる。いくつかの態様では、上記ｓｄＡｂ又

はその機能的変異体は、配列番号３７及び配列番号４０からなる群から選択されるＣＤＲ１、配列番号３８及び配列番号４１からなる群から選択されるＣＤＲ２、並びに配列番号３９及び配列番号４２からなる群から選択されるＣＤＲ３からなる。

【００２６】

いくつかの実施形態では、上記ｓｄＡｂ又はその機能的変異体は、配列番号２６（ＶＨＨ１２２）のアミノ酸配列を含む。いくつかの態様では、上記ｓｄＡｂ又はその機能的変異体は、実質的に、配列番号２６（ＶＨＨ１２２）のアミノ酸配列からなる。いくつかの態様では、上記ｓｄＡｂ又はその機能的変異体は、配列番号２６（ＶＨＨ１２２）のアミノ酸配列からなる。いくつかの実施形態では、上記ｓｄＡｂ又はその機能的変異体は、配列番号２７（７Ｄ１２）のアミノ酸配列を含む。いくつかの態様では、上記ｓｄＡｂ又はその機能的変異体は、実質的に、配列番号２７（７Ｄ１２）のアミノ酸配列からなる。いくつかの態様では、上記ｓｄＡｂ又はその機能的変異体は、配列番号２７（７Ｄ１２）のアミノ酸配列からなる。

【００２７】

いくつかの実施形態では、上記ｓｄＡｂ又はその機能的変異体は、配列番号１９９、配列番号２０２及び配列番号２０５からなる群から選択されるＣＤＲ１、配列番号２００、配列番号２０３及び配列番号２０６からなる群から選択されるＣＤＲ２、並びに配列番号２０１、配列番号２０４及び配列番号２０７からなる群から選択されるＣＤＲ３を含む。いくつかの実施形態では、上記ｓｄＡｂ又はその機能的変異体は、実質的に、配列番号１９９、配列番号２０２及び配列番号２０５からなる群から選択されるＣＤＲ１、配列番号２００、配列番号２０３及び配列番号２０６からなる群から選択されるＣＤＲ２、並びに配列番号２０１、配列番号２０４及び配列番号２０７からなる群から選択されるＣＤＲ３からなる。いくつかの実施形態では、上記ｓｄＡｂ又はその機能的変異体は、配列番号１９９、配列番号２０２及び配列番号２０５からなる群から選択されるＣＤＲ１、配列番号２００、配列番号２０３及び配列番号２０６からなる群から選択されるＣＤＲ２、並びに配列番号２０１、配列番号２０４及び配列番号２０７からなる群から選択されるＣＤＲ３からなる。

【００２８】

いくつかの実施形態では、上記ｓｄＡｂ又はその機能的変異体は、配列番号６９（２Ｄ３）のアミノ酸配列を含む。いくつかの態様では、上記ｓｄＡｂ又はその機能的変異体は、実質的に、配列番号６９（２Ｄ３）のアミノ酸配列からなる。いくつかの態様では、上記ｓｄＡｂ又はその機能的変異体は、配列番号６９（２Ｄ３）のアミノ酸配列からなる。いくつかの実施形態では、上記ｓｄＡｂ又はその機能的変異体は、配列番号７０（５Ｆ７）のアミノ酸配列を含む。いくつかの態様では、上記ｓｄＡｂ又はその機能的変異体は、実質的に、配列番号７０（５Ｆ７）のアミノ酸配列からなる。いくつかの態様では、上記ｓｄＡｂ又はその機能的変異体は、配列番号７０（５Ｆ７）のアミノ酸配列からなる。いくつかの実施形態では、上記ｓｄＡｂ又はその機能的変異体は、配列番号７１（４７Ｄ５）のアミノ酸配列を含む。いくつかの態様では、上記ｓｄＡｂ又はその機能的変異体は、実質的に、配列番号７１（４７Ｄ５）のアミノ酸配列からなる。いくつかの態様では、上記ｓｄＡｂ又はその機能的変異体は、配列番号７１（４７Ｄ５）のアミノ酸配列からなる。

【００２９】

いくつかの実施形態では、上記ｓｄＡｂ又はその機能的変異体は、配列番号２０８のＣＤＲ１、配列番号２０９のＣＤＲ２、及び配列番号２１０のＣＤＲ３を含む。いくつかの実施形態では、上記ｓｄＡｂ又はその機能的変異体は、実質的に、配列番号２０８のＣＤＲ１、配列番号２０９のＣＤＲ２、及び配列番号２１０のＣＤＲ３からなる。いくつかの実施形態では、上記ｓｄＡｂ又はその機能的変異体は、配列番号２０８のＣＤＲ１、配列番号２０９のＣＤＲ２、及び配列番号２１０のＣＤＲ３からなる。

【００３０】

いくつかの実施形態では、上記ｓｄＡｂ又はその機能的変異体は、配列番号７５（ＢＣ

Ｄ０９０－Ｍ２）のアミノ酸配列を含む。いくつかの態様では、上記ｓｄＡｂ又はその機能的変異体は、実質的に、配列番号７５（ＢＣＤ０９０－Ｍ２）のアミノ酸配列からなる。いくつかの態様では、上記ｓｄＡｂ又はその機能的変異体は、配列番号７５（ＢＣＤ０９０－Ｍ２）のアミノ酸配列からなる。

【００３１】

いくつかの実施形態では、上記ｓｄＡｂ又はその機能的変異体は、配列番号２１１及び配列番号２１４からなる群から選択されるＣＤＲ１、配列番号２１２及び配列番号２１５からなる群から選択されるＣＤＲ２、並びに配列番号２１３及び配列番号２１６からなる群から選択されるＣＤＲ３を含む。いくつかの実施形態では、上記ｓｄＡｂ又はその機能的変異体は、実質的に、配列番号２１１及び配列番号２１４からなる群から選択されるＣＤＲ１、配列番号２１２及び配列番号２１５からなる群から選択されるＣＤＲ２、並びに配列番号２１３及び配列番号２１６からなる群から選択されるＣＤＲ３からなる。いくつかの実施形態では、上記ｓｄＡｂ又はその機能的変異体は、配列番号２１１及び配列番号２１４からなる群から選択されるＣＤＲ１、配列番号２１２及び配列番号２１５からなる群から選択されるＣＤＲ２、並びに配列番号２１３及び配列番号２１６からなる群から選択されるＣＤＲ３からなる。

【００３２】

いくつかの実施形態では、上記ｓｄＡｂ又はその機能的変異体は、配列番号７７（ＡＢＳ２９５４４．１）のアミノ酸配列を含む。いくつかの態様では、上記ｓｄＡｂ又はその機能的変異体は、実質的に、配列番号７７（ＡＢＳ２９５４４．１）のアミノ酸配列からなる。いくつかの態様では、上記ｓｄＡｂ又はその機能的変異体は、配列番号７７（ＡＢＳ２９５４４．１）のアミノ酸配列からなる。いくつかの実施形態では、上記ｓｄＡｂ又はその機能的変異体は、配列番号７９（ＮｂＣＥＡ５）のアミノ酸配列を含む。いくつかの態様では、上記ｓｄＡｂ又はその機能的変異体は、実質的に、配列番号７９（ＮｂＣＥＡ５）のアミノ酸配列からなる。いくつかの態様では、上記ｓｄＡｂ又はその機能的変異体は、配列番号７９（ＮｂＣＥＡ５）のアミノ酸配列からなる。

【００３３】

いくつかの実施形態では、少なくとも１つのペプチドリンカーが、存在して、アミノ酸配列（ＧＧＧＧＳ）ｎ（配列番号１）を含み、式中、ｎは１、２、３、４、５又は６である。いくつかの実施形態では、少なくとも１つのペプチドリンカーが存在して、配列番号４又は配列番号５のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも１つのペプチドリンカーが、存在して、アミノ酸配列（ＧＧＧＧＳ）３（配列番号１８８）を含む。

【００３４】

いくつかの実施形態では、上記ＣＤタンパク質又はその機能的変異体は、細菌性ＣＤタンパク質若しくはその機能的変異体、又は酵母由来ＣＤタンパク質若しくはその機能的変異体である。

【００３５】

いくつかの実施形態では、上記ＣＤタンパク質又はその機能的変異体は、配列番号２１、配列番号２２、配列番号１８６及び配列番号１８７からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。いくつかの態様では、上記ＣＤタンパク質又はその機能的変異体は、実質的に、配列番号２１、配列番号２２、配列番号１８６及び配列番号１８７からなる群から選択されるアミノ酸配列からなる。いくつかの態様では、上記ＣＤタンパク質又はその機能的変異体は、配列番号２１、配列番号２２、配列番号１８６及び配列番号１８７からなる群から選択されるアミノ酸配列からなる。いくつかの態様では、上記ＣＤは、配列番号２２のアミノ酸配列を含むか、実質的にこれからなるか、又はこれからなる。いくつかの態様では、上記ＣＤは、配列番号１８７のアミノ酸配列を含むか、実質的にこれからなるか、又はこれからなる。

【００３６】

いくつかの実施形態では、上記ＣＤタンパク質又はその機能的変異体は、配列番号２１

、配列番号２２、配列番号１８６又は配列番号１８７のいずれか１つに対して少なくとも９０％同一、少なくとも９１％同一、少なくとも９２％同一、少なくとも９３％同一、少なくとも９４％同一、少なくとも９５％同一、少なくとも９６％同一、少なくとも９７％同一、少なくとも９８％同一、少なくとも９９％同一、又は１００％同一であるアミノ酸配列を含む。

【００３７】

いくつかの実施形態では、当該融合タンパク質は、配列番号２１又は配列番号２２の開始アミノ酸配列を有するＣＤタンパク質の機能的変異体を含み、この機能的変異体は、Ｙ８４Ａ、Ｙ８４Ｈ、Ｔ８５Ｄ、Ｔ８６Ｅ、Ｍ９２Ｎ、Ｍ９２Ａ、Ｍ９２Ｋ、Ｍ９２Ｑ、Ｖ１２８Ａ、Ｖ１２８Ｔ、Ｖ１２９Ａ、Ｖ１２９Ｌ、Ｖ１２９Ｉ、Ｖ１２９Ｔ、Ｖ１３０Ａ、及びＶ１３０Ｔからなる群から選択される、上記開始配列と比べた少なくとも１つの変異を含む。いくつかの実施形態では、当該融合タンパク質は、配列番号１８６又は配列番号１８７の開始アミノ酸配列を有するＣＤタンパク質の機能的変異体を含み、この機能的変異体は、Ｙ８５Ａ、Ｙ８５Ｈ、Ｔ８６Ｄ、Ｔ８７Ｅ、Ｍ９３Ｎ、Ｍ９３Ａ、Ｍ９３Ｋ、Ｍ９３Ｑ、Ｖ１２９Ａ、Ｖ１２９Ｔ、Ｖ１３０Ａ、Ｖ１３０Ｌ、Ｖ１３０Ｉ、Ｖ１３０Ｔ、Ｖ１３１Ａ、及びＶ１３１Ｔからなる群から選択される、上記開始配列と比べた少なくとも１つの変異を含む。

【００３８】

いくつかの実施形態では、上記ＣＤの機能的変異体は、配列番号２２、配列番号１８７、配列番号１８９、配列番号１９０、配列番号１９１、配列番号１９２、配列番号１９３及び配列番号１９４から選択されるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、上記ＣＤの機能的変異体は、実質的に、配列番号２２、配列番号１８７、配列番号１８９、配列番号１９０、配列番号１９１、配列番号１９２、配列番号１９３及び配列番号１９４から選択されるアミノ酸配列からなる。いくつかの実施形態では、上記ＣＤの機能的変異体は、配列番号２２、配列番号１８７、配列番号１８９、配列番号１９０、配列番号１９１、配列番号１９２、配列番号１９３及び配列番号１９４から選択されるアミノ酸配列からなる。

【００３９】

いくつかの実施形態では、当該融合タンパク質は、抗ＶＥＧＦＲ２　ｓｄＡｂ又はその機能的変異体と、ＣＤタンパク質又はその機能的変異体とを含む。これらの実施形態のいくつかの態様では、当該融合タンパク質は、配列番号７、ＨＩＳタグなしの配列番号７（すなわち、配列番号７のアミノ酸１～２９７）、配列番号９、ＨＩＳタグなしの配列番号９（すなわち、配列番号９のアミノ酸１～２９７）、配列番号１１、及びＨＩＳタグなしの配列番号１１（すなわち、配列番号１１のアミノ酸１～２９７）からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。

【００４０】

いくつかの実施形態では、当該融合タンパク質は、抗ＥＧＦＲ　ｓｄＡｂ又はその機能的変異体と、ＣＤタンパク質又はその機能的変異体とを含む。これらの実施形態のいくつかの態様では、当該融合タンパク質は、配列番号１３、ＨＩＳタグなしの配列番号１３（すなわち、配列番号１３のアミノ酸１～２９７）、配列番号１５、ＨＩＳタグなしの配列番号１５（すなわち、配列番号１５のアミノ酸１～２９７）、配列番号１７、及びＨＩＳタグなしの配列番号１７（すなわち、配列番号１７のアミノ酸１～２９７、すなわち配列番号１９）からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。

【００４１】

いくつかの実施形態では、当該融合タンパク質は、抗ＨＥＲ２　ｓｄＡｂ又はその機能的変異体と、ＣＤタンパク質又はその機能的変異体とを含む。これらの実施形態のいくつかの態様では、当該融合タンパク質は、配列番号７２、ＨＩＳタグなしの配列番号７２（すなわち、配列番号７２のアミノ酸１～２９７）、配列番号７３、ＨＩＳタグなしの配列番号７３（すなわち、配列番号７３のアミノ酸１～２９１）、配列番号７４、及びＨＩＳタグなしの配列番号７４（すなわち、配列番号７４のアミノ酸１～２９２）からなる群か

ら選択されるアミノ酸配列を含む。

【００４２】

いくつかの実施形態では、当該融合タンパク質は、抗ＨＥＲ３　ｓｄＡｂ又はその機能的変異体と、ＣＤタンパク質又はその機能的変異体とを含む。これらの実施形態のいくつかの態様では、当該融合タンパク質は、配列番号７６及びＨＩＳタグなしの配列番号７６（すなわち、配列番号７６のアミノ酸１～３００）のアミノ酸配列を含む。

【００４３】

いくつかの実施形態では、当該融合タンパク質は、抗ＣＥＡ　ｓｄＡｂ又はその機能的変異体と、ＣＤタンパク質又はその機能的変異体とを含む。これらの実施形態のいくつかの態様では、当該融合タンパク質は、配列番号７８、ＨＩＳタグなしの配列番号７８（すなわち、配列番号７８のアミノ酸１～２９３）、配列番号８０、及びＨＩＳタグなしの配列番号８０（すなわち、配列番号８０のアミノ酸１～２９６）からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。

【００４４】

いくつかの実施形態では、当該融合タンパク質は、脱免疫化ｓｄＡｂ（例えば、１以上の脱免疫変異を有するｓｄＡｂの機能的変異体）及び／又は脱免疫化ＣＤ（例えば、１以上の脱免疫変異を有するＣＤの機能的変異体）を含む。例えば、いくつかの実施形態では、当該融合タンパク質は、エピトープ１（配列番号６３）、エピトープ２（配列番号６４）、エピトープ３（配列番号６５）、エピトープ４（配列番号６６）、エピトープ５（配列番号６７）、及びエピトープ６（配列番号６８）からなる群から選択される少なくとも１つのＴ細胞エピトープに少なくとも１つの脱免疫変異を含む。いくつかの実施形態では、当該融合タンパク質は、配列番号９３～配列番号１８５から選択されるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、当該融合タンパク質は、実質的に、配列番号９３～配列番号１８５から選択されるアミノ酸配列からなる。いくつかの実施形態では、当該融合タンパク質は、配列番号９３～配列番号１８５から選択されるアミノ酸配列からなる。

【００４５】

いくつかの実施形態では、当該融合タンパク質は、配列番号９３～配列番号１８１からなる群から選択されるアミノ酸配列のアミノ酸１～２９７を含む。いくつかの実施形態では、当該融合タンパク質は、実質的に配列番号９３～配列番号１８１からなる群から選択されるアミノ酸配列のアミノ酸１～２９７からなる。いくつかの実施形態では、当該融合タンパク質は、配列番号９３～配列番号１８１からなる群から選択されるアミノ酸配列のアミノ酸１～２９７からなる。

【００４６】

いくつかの実施形態では、当該融合タンパク質は、実質的に、配列番号１８２～配列番号１８５から選択されるアミノ酸配列からなる。

【００４７】

いくつかの実施形態では、当該融合タンパク質は、配列番号１９のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、当該融合タンパク質は、実質的に、配列番号１９のアミノ酸配列からなる。いくつかの実施形態では、当該融合タンパク質は、配列番号１９のアミノ酸配列からなる。

【００４８】

いくつかの実施形態では、当該融合タンパク質は、実質的に、配列番号１９、配列番号１８２、配列番号１８３、配列番号１８４及び配列番号１８５から選択されるアミノ酸配列からなる。

【００４９】

いくつかの態様では、本開示は、少なくとも１種の本開示の融合タンパク質を含む医薬組成物又は医薬処方物に関する。いくつかの態様では、当該医薬組成物又は医薬処方物は、少なくとも１種の本開示の融合タンパク質と、少なくとも１種の薬学的に許容できる担体又は賦形剤とを含む。

【００５０】

いくつかの態様では、本開示は、必要とする対象において癌を処置（治療）する方法であって、上記対象に、有効量の本開示の少なくとも１種の融合タンパク質又は医薬組成物を投与する工程を備える方法に関する。いくつかの実施形態では、当該少なくとも１種の融合タンパク質又は当該医薬組成物は非経口投与される。

【００５１】

いくつかの実施形態では、必要とする対象において癌を処置する当該方法は、上記対象に、有効量のシトシンデアミナーゼに対する基質を投与する工程をさらに備える。いくつかの実施形態では、この基質は、５－フルオロウラシルのプロドラッグを含む。いくつかの実施形態では、この５－フルオロウラシルのプロドラッグは、５－フルオロシトシン（５－ＦＣ）、Ｔｏｃａ　ＦＣ、５－ＦＣのアナログ、及び光で活性化されうる化合物、その塩又はエステルからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、上記対象に投与されるプロドラッグは５－ＦＣである。

【００５２】

いくつかの実施形態では、上記癌は、結腸癌、胃癌、膵臓癌、乳癌、基底細胞癌、ボーエン病、子宮頸癌、眼表面扁平上皮新生物、黒色腫、腎細胞癌、肺癌、膀胱癌、胆嚢癌、喉頭癌、肝癌、甲状腺癌、唾液腺癌、前立腺癌、結直腸癌、頭頸部癌、胆管細胞癌、食道癌、骨癌、子宮内膜癌、卵巣癌、軟部肉腫、及びメルケル細胞癌からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、上記癌は固形腫瘍である。いくつかの実施形態では、上記固形腫瘍は結腸癌、結直腸癌、膵臓癌、又は頭頸部癌である。

【００５３】

いくつかの態様では、本開示は、先行する実施形態のいずれか１つの融合タンパク質をコードする核酸配列を含む核酸分子に関する。

【００５４】

いくつかの態様では、本開示は、先行する実施形態のいずれか１つの任意の融合タンパク質のｓｄＡｂ又はその機能的変異体をコードするコドン最適化核酸配列を含む核酸分子に関する。いくつかの態様では、本開示は、先行する実施形態のいずれか１つの任意の融合タンパク質のＣＤ又はその機能的変異体をコードするコドン最適化核酸配列を含む核酸分子に関する。

【００５５】

いくつかの実施形態では、当該核酸分子は、配列番号８の核酸配列を含む。いくつかの実施形態では、当該核酸分子は、配列番号１０の核酸配列を含む。いくつかの実施形態では、当該核酸分子は、配列番号１２の核酸配列を含む。いくつかの実施形態では、当該核酸分子は、配列番号１４の核酸配列を含む。いくつかの実施形態では、当該核酸分子は、配列番号１６の核酸配列を含む。いくつかの実施形態では、当該核酸分子は、配列番号１８の核酸配列を含む。いくつかの実施形態では、当該核酸分子は、配列番号２０の核酸配列を含む。いくつかの実施形態では、当該核酸分子は、配列番号１９５の核酸配列を含む。いくつかの実施形態では、当該核酸分子は、配列番号１９６の核酸配列を含む。いくつかの実施形態では、当該核酸分子は、配列番号１９７の核酸配列を含む。いくつかの実施形態では、当該核酸分子は、配列番号１９８の核酸配列を含む。

【００５６】

いくつかの態様では、本開示は、先行する実施形態のいずれかの融合タンパク質をコードする核酸を含むベクターに関する。

【００５７】

いくつかの態様では、本開示は、先行する実施形態のいずれかの融合タンパク質をコードするベクター又は核酸を含む宿主細胞に関する。

【００５８】

いくつかの態様では、本開示は、先行する実施形態のいずれか１つに係る融合タンパク質の製造方法であって、上記融合タンパク質をコードする核酸を宿主細胞において発現する工程を備える方法に関する。いくつかの実施形態では、この宿主細胞は、ジスルフィド結合を有するタンパク質の活性、細胞質内での産生、及び／又は安定性を向上するように

操作されている。
【００５９】
いくつかの実施形態では、開示された融合タンパク質の製造方法は、同じ宿主細胞の非操作版により産生される融合タンパク質と比べて２倍、５倍、１０倍、２０倍、５０倍、及び１００倍から選択される量だけ、活性、細胞質内での産生、及び／又は安定性が向上しているジスルフィド結合を有する融合タンパク質を与える。
【００６０】
いくつかの実施形態では、上記宿主細胞は非哺乳類細胞である。いくつかの実施形態では、宿主細胞は酵母細胞又はバクテリア細胞である。いくつかの実施形態では、宿主細胞は、大腸菌細胞、古細菌細胞又は放線菌細胞である。いくつかの実施形態では、宿主細胞は、ジスルフィド結合形成のための細胞質内環境を提供する大腸菌株である。いくつかの態様では、この細胞質内環境は、チオレドキシン経路及び／若しくはグルタチオン経路を最適化することにより、並びに／又は細胞質ジスルフィド結合イソメラーゼを発現することにより成し遂げられる。いくつかの実施形態では、宿主細胞は、細胞質ジスルフィド結合イソメラーゼの染色体コピーを構成的に発現する大腸菌株である。これらの実施形態のいくつかの態様では、上記細胞質ジスルフィド結合イソメラーゼはＤｓｂＣである。いくつかの態様では、上記大腸菌株は、ＳＨｕｆｆｌｅ（登録商標）Ｔ７、ＳＨｕｆｆｌｅ（登録商標）Ｔ７　Ｅｘｐｒｅｓｓ、ＳＨｕｆｆｌｅ（登録商標）Ｅｘｐｒｅｓｓ、Ｏｒｉｇａｍｉ（商標）、又はＲｏｓｅｔｔａ－ｇａｍｉ（商標）である。
【図面の簡単な説明】
【００６１】
図面は、本開示の例示的な実施形態を示すにすぎず、それゆえ、本開示の範囲を限定しない。
【００６２】
【図１Ａ】図１Ａは、完全抗体（ｆｕｌｌ－ａｎｔｉｂｏｄｙ）－ＣＤ－ＣＤ融合タンパク質のタンパク質設計を示す。
【図１Ｂ】図１Ｂは、哺乳類細胞において発現された完全抗体－ＣＤ融合タンパク質のタンパク質設計及び発現プロファイルを示す。
【図２Ａ】図２Ａは、抗原標的化ドメイン－ＣＤ融合タンパク質のベクター設計を示す。
【図２Ｂ】図２Ｂは、試験された融合タンパク質の発現プロファイル及び機能分析結果を要約する；ｖ＝検証済み；Ｎ／Ｄ＝検出されず；Ｎ／Ａ＝適用なし。
【図２Ｃ】図２Ｃは、本開示のいくつかのＶＨＨ－ＣＤ融合タンパク質の発現プロファイルを示す。Ｉ０：誘導前の大腸菌培養物。Ｉ５：誘導から５時間後の大腸菌培養物。サイトゾル（Ｃ）：細胞可溶化物の可溶部。封入体（Ｉ）：細胞可溶化物の不溶部。
【図２Ｄ】図２Ｄは、本開示のいくつかのＶＨＨ－ＣＤ融合タンパク質の発現プロファイルを示す。Ｉ０：誘導前の大腸菌培養物。Ｉ５：誘導から５時間後の大腸菌培養物。サイトゾル（Ｃ）：細胞可溶化物の可溶部。封入体（Ｉ）：細胞可溶化物の不溶部。Ｍ：マーカー。
【図３】図３は、小スケール精製からのいくつかのｓｄＡｂ－ＣＤ融合タンパク質のＳＤＳ－ＰＡＧＥ分析を示す。Ｍ＝マーカー。
【図４Ａ】図４Ａは、いくつかのｓｄＡｂ－ＣＤ融合タンパク質のサイズ排除クロマトグラフィー分析を示す。
【図４Ｂ】図４Ｂは、ｓｄＡｂ－ＣＤ融合タンパク質のサイズ排除クロマトグラフィー分析を示す。
【図５Ａ】図５Ａは、いくつかのｓｄＡｂ－ＣＤ融合タンパク質のシトシンデアミナーゼ（ＣＤａｓｅ）活性を示す。
【図５Ｂ】図５Ｂは、いくつかのｓｄＡｂ－ＣＤ融合タンパク質のシトシンデアミナーゼ（ＣＤａｓｅ）活性を示す。
【図６Ａ】図６Ａは、ヒト由来ＶＥＧＦＲ２及びヒト由来ＥＧＦＲに対するｓｄＡｂ－ＣＤ融合タンパク質の結合能力を実証するＥＬＩＳＡアッセイを示す。ＯＤ＝光学密度。

【図６Ｂ】図６Ｂは、ヒト由来ＨＥＲ２、ＨＥＲ３及びＣＥＡに対するｓｄＡｂ－ＣＤ融合タンパク質の結合能力を実証するＥＬＩＳＡアッセイを示す。ＯＤ＝光学密度。
【図７Ａ】図７Ａは、ａｄＡｂ－ＣＤ融合タンパク質３ＶＧＲ１９－ＣＤ－Ｈの大スケール精製からの精製プロファイルを示す。ＬＳ＝低速上清；Ｆ１＝Ｎｉセファロースカラムの素通り画分１；Ｆ２＝Ｎｉ－セファロースカラムの素通り画分２；Ｍ＝マーカー；Ｑ１＝第１Ｑ－セファロースカラム；Ｑ２＝第２Ｑ－セファロースカラム；ＱＦ１＝第１Ｑ－セファロースカラムの素通り画分；ＱＦ２＝第２Ｑ－セファロースカラムの素通り画分；Ｘ１＝画分１；Ｘ２＝画分２。
【図７Ｂ】図７Ｂは、ａｄＡｂ－ＣＤ融合タンパク質７Ｄ１２－ＣＤｏｍｅ３の大スケール精製からの精製プロファイルを示す。ＬＳ＝低速上清；Ｆ１＝Ｎｉセファロースカラムの素通り画分１；Ｆ２＝Ｎｉ－セファロースカラムの素通り画分２；Ｍ＝マーカー；Ｑ１＝第１Ｑ－セファロースカラム；Ｑ２＝第２Ｑ－セファロースカラム；ＱＦ１＝第１Ｑ－セファロースカラムの素通り画分；ＱＦ２＝第２Ｑ－セファロースカラムの素通り画分；Ｘ１＝画分１；Ｘ２＝画分２。
【図８】図８は、ＳＨｕｆｆｌｅ（登録商標）Ｔ７　Ｅｘｐｒｅｓｓ細胞及びＴ７　Ｅｘｐｒｅｓｓ細胞におけるｓｄＡｂ－ＣＤ（３ＶＧＲ１９－ＣＤ）融合タンパク質の発現プロファイルを示す。Ｓ＝上清（サイトゾル）；Ｐ＝ペレット（封入体）；Ｍ＝マーカー；$Ｉ_{0}$＝誘導前の大腸菌培養物；$Ｉ_{5}$＝誘導から５時間後の大腸菌培養物。上記融合タンパク質に対応するバンドは矢印で示されている。
【図９Ａ】図９Ａ（ＭＤＡ－ＭＢ－２３１）は、抗原発現細胞におけるいくつかの本開示の融合タンパク質を用いた細胞ベースの細胞毒性アッセイの結果を示す。
【図９Ｂ】図９Ｂ（Ａ４３１）は、抗原発現細胞におけるいくつかの本開示の融合タンパク質を用いた細胞ベースの細胞毒性アッセイの結果を示す。
【図１０Ａ】図１０Ａは、ＥＧＦＲ発現細胞における融合タンパク質ＣＤｏｅｍ３－Ｈ及び７Ｄ１２－ＣＤｏｅｍ３－Ｈを用いた細胞ベースの細胞毒性アッセイの結果を示す。ＮＰ＝陰性タンパク質対照（ＣＤｏｅｍ３－Ｈ）。
【図１０Ｂ】図１０Ｂは、ＥＧＦＲ発現細胞における融合タンパク質ＣＤｏｅｍ３及び７Ｄ１２－ＣＤｏｅｍ３を用いた細胞ベースの細胞毒性アッセイの結果を示す。ＮＰ＝陰性タンパク質対照（ＣＤｏｅｍ３－Ｈ）。
【図１１Ａ】図１１Ａは、７Ｄ１２－ＣＤｏｅｍ３－Ｈ及び７Ｄ１２－ＣＤｏｅｍ３を５－フルオロシトシン（５－ＦＣ）と組み合わせて用いた処置後のＡ４３１異種移植モデルの腫瘍成長曲線を示す。
【図１１Ｂ】図１１Ｂは、７Ｄ１２－ＣＤｏｅｍ３－Ｈ及び７Ｄ１２－ＣＤｏｅｍ３を５－ＦＣと組み合わせて用いた処置後のＡ４３１異種移植モデルの腫瘍重量を示す。
【図１２】図１２は、７Ｄ１２－ＣＤｏｅｍ３－Ｈの単一変異変異体についての発現プロファイル及び機能分析結果を示す。
【図１３Ａ】図１３Ａは、７Ｄ１２－ＣＤｏｅｍ３－Ｈの多変異変異体の発現プロファイル及び機能分析結果を示す。
【図１３Ｂ】図１３Ｂは、７Ｄ１２－ＣＤｏｅｍ３－Ｈの多変異変異体の発現プロファイル及び機能分析結果を示す。
【図１４】図１４は、７Ｄ１２－ＣＤｏｅｍ３及び７Ｄ１２－ＣＤｏｅｍ３変異体のＴ細胞増殖及びＩＬ－２　ＥＬＩＳｐｏｔ応答の要約を示す。
【図１５】図１５は、７Ｄ１２－ＣＤｏｅｍ３及び７Ｄ１２－ＣＤｏｅｍ３変異体のヒト由来ＥＧＦＲへのシトシンデアミナーゼ活性及び結合能力を示す。
【発明を実施するための形態】
【００６３】
本開示は、シングルドメイン抗体（ｓｄＡｂ）又はその機能的変異体とシトシンデアミナーゼ（ＣＤ）又はその機能的変異体とを含む二重機能融合タンパク質を提供する。当該融合タンパク質は、本明細書に記載される方法を使用して、商業的な使用に受け容れられる良好な生物活性及び優良な収率（例えば、約１ｇ／Ｌ）で製造される。本開示の融合タ

ンパク質は、大腸菌の中で細胞質タンパク質として高収率で発現されることが可能であり、タンパク質安定性は、細胞質の中でのジスルフィド結合形成を最適化するように操作された大腸菌株の中でさらに向上させることができる。本開示の融合タンパク質の組成物、並びに癌及び他の増殖性疾患の処置（治療）における使用方法も本明細書に提示される。

【００６４】

本開示は、本開示に係る種々のｓｄＡｂ－ＣＤ融合タンパク質が安定であり、癌細胞に対して細胞傷害効果を有するということを明らかにする。可溶性タンパク質は、ＳＤＳ－ＰＡＧＥにより検出され、当該融合タンパク質の相対的高純度は、ＳＥＣ－ＨＰＬＣにより示される。当該融合タンパク質のＣＤ部分及びｓｄＡｂ部分は、いずれも、産生された融合タンパク質のすべてにおいてそのもとの機能を維持していた。ＣＤ活性は、５－ＦＣから５－ＦＵへの変換アッセイによって明らかにされ、ヒト由来のＶＥＧＦＲ２、ＥＧＦＲ、ＨＥＲ３、ＨＥＲ２又はＣＥＡへの当該融合タンパク質の結合は、ＥＬＩＳＡによって示された。癌細胞株に対する細胞毒性試験を通して、上記ｓｄＡｂ－ＣＤ融合タンパク質は、ＶＥＧＦＲ２及びＥＧＦＲを標的としてそれらに結合し、無毒な５－ＦＣを毒性の５－ＦＵに変換し、これにより抗原発現癌細胞をさせる死滅させる能力を証明した。Ａ４３１マウス異種移植モデルにおいて、このｓｄＡｂ－ＣＤ融合タンパク質は、腫瘍成長を阻害し抑制することにより機能することを証明した。

【００６５】

本明細書に記載される方法を使用するいくつかの本開示の融合タンパク質の発現は、商業的な使用に受け容れられる良好な生物活性及び優良な収率（例えば、約１ｇ／Ｌ）で融合タンパク質を与える。

【００６６】

本開示は、生産のために安定でありかつＣＤ活性及び抗原結合活性を示す脱免疫化ｓｄＡｂ－ＣＤ融合タンパク質も提供する。

【００６７】

特段の記載がないかぎり、又は文脈から明らかでないかぎり、本明細書で使用する場合、用語「ｏｒ（又は、若しくは）」は、包含的であると理解される。特段の記載がないかぎり、又は文脈から明らかでないかぎり、本明細書で使用する場合、用語「ａ」、「ａｎ」、及び「ｔｈｅ」は単数又は複数であると理解される。

【００６８】

さらには、本明細書で使用される場合の「及び／又は」は、２つの特定された特徴又は構成要素の各々を、他方のものを伴い又は伴わずに、具体的な開示したものと解釈されるものとする。従って、本明細書中で「Ａ及び／又はＢ」等の語句で使用される用語「及び／又は」は、「Ａ及びＢ」、「Ａ又はＢ」、「Ａ」（単独）及び「Ｂ」（単独）を含むことが意図されている。

【００６９】

特段の記載がないかぎり、又は文脈から明らかでないかぎり、本明細書で使用する場合、用語「約」は、当該技術分野で通常の許容値の範囲内、例えば平均（例えば、示された値）の２標準偏差以内として理解される。「約」は、示された値の１０％、９％、８％、７％、６％、５％、４％、３％、２％、１％、０．５％、０．１％、０．０５％、又は０．０１％以内と理解することもできる。文脈から明らかでないかぎり、本明細書に提示されるすべての数値は、用語「約」により修飾されている。

【００７０】

本明細書に提示される任意の組成物又は方法は、本明細書に提示される他の組成物及び方法のいずれの１以上とも組み合わせることができる。

【００７１】

酵素の「活性」は、反応を触媒する、すなわち「機能する」能力の指標であり、反応生成物が生成される速度として表現されてもよい。例えば、酵素活性は、単位時間あたり又は酵素の単位（例えば、濃度又は重量）あたりに生成される生成物の量として、又は親和定数若しくは解離定数によって表すことができる。本明細書中でほとんど同義で使用され

るように、「シトシンデアミナーゼ活性」、「シトシンデアミナーゼの生物活性」、又は「シトシンデアミナーゼの機能活性」は、標準的な技法に従ってインビボ又はインビトロで決定される、ＣＤ又はその機能的変異体によって、又は本開示の融合タンパク質によってＣＤ基質に対して奏される活性を指す。ＣＤ活性を測定するためのアッセイは当該技術分野で公知である。例えば、ＣＤ活性は、５－ＦＣから５－ＦＵ、又はシトシンからウラシルへの変換の速度を決定することにより測定することができる。５－ＦＣ、５－ＦＵ、シトシン、及びウラシルの検出は、実施例の節に記載される方法によって、クロマトグラフィーによって、及び／又は当該技術分野で公知の他の方法によって実施することができる。

【００７２】

本開示において、「ｃｏｎｓｉｓｔｉｎｇ　ｅｓｓｅｎｔｉａｌｌｙ　ｏｆ（実質的に、…からなる）」又は「ｃｏｎｓｉｓｔｓ　ｅｓｓｅｎｔｉａｌｌｙ　ｏｆ（実質的に、…からなる）」は、記載されたものの基本的で又は新規な特徴は、記載されたもの以外のものの存在によって変化しないが先行技術の実施形態を排除するかぎり、記載されたもの以外のものの存在を許容する。例えば、「実質的に、」記載された配列「からなる」ポリペプチド／タンパク質又は核酸配列は、それぞれ、記載された配列の生物活性を破壊しない１以上のさらなるアミノ酸又は核酸を含んでもよい。

【００７３】

本明細書で使用する場合、「融合ポリペプチド」又は「融合タンパク質」は、天然では同じタンパク質に存在しない２以上の異なるポリペプチド又はその活性な断片（フラグメント）を含むタンパク質を指す。融合タンパク質は、単一の連続するポリペプチド骨格を有し、任意にその２以上の異なるポリペプチドのいずれかの間にペプチドリンカーを有する。融合タンパク質は、インフレームの２以上の遺伝子を単一の核酸配列へと連結するための分子生物学における従来の技法を使用し、次いでその核酸を、適切な宿主細胞の中で融合タンパク質が産生される条件下にて発現させて調製することができる。

【００７４】

本明細書で使用する場合、「機能的変異体」は、ポリペプチド又はタンパク質の変異体であって、そのポリペプチド又はタンパク質に対して実質的な又は顕著な配列同一性を有し、そのポリペプチド又はタンパク質の生物活性のうちの少なくとも１つを保持する変異体を指す。ポリペプチド又はタンパク質の機能的変異体は、本開示を考慮して当該技術分野で公知の手段によって調製することができる。機能的変異体は、ポリペプチド又はタンパク質のアミノ酸配列に対する１以上の改変を含むことができる。いくつかの実施形態では、この改変は、例えば、ポリペプチド又はタンパク質の熱安定性を向上すること、基質特異性を変更すること、最適ｐＨを変えること、免疫原性を低下させることなどにより、そのポリペプチド又はタンパク質の１以上の物理化学的特性を変える。いくつかの実施形態では、この改変は、改変がそのポリペプチド又はタンパク質の生物活性のすべてを破壊しないか又は無効にしないかぎり、ポリペプチド又はタンパク質の生物活性の１以上を変更する。

【００７５】

本発明のいくつかの実施形態によれば、ポリペプチド又はタンパク質の機能的変異体は、そのポリペプチド又はタンパク質に対して、そのポリペプチド又はタンパク質の生物活性に重大な影響を及ぼさない１以上のアミノ酸置換、好ましくは保存的アミノ酸置換を含む。保存的アミノ酸置換としては、塩基性アミノ酸（アルギニン、リジン及びヒスチジン）の群の中のアミノ酸置換、酸性アミノ酸（グルタミン酸及びアスパラギン酸）の群の中のアミノ酸置換、極性アミノ酸（グルタミン及びアスパラギン）の群の中のアミノ酸置換、疎水性アミノ酸（ロイシン、イソロイシン及びバリン）の群の中のアミノ酸置換、芳香族アミノ酸（フェニルアラニン、トリプトファン及びチロシン）の群の中のアミノ酸置換、並びに小さいアミノ酸（グリシン、アラニン、セリン、トレオニン、及びメチオニン）の群の中のアミノ酸置換が挙げられるが、これらに限定されない。標準的ではないアミノ酸又は非天然アミノ酸（４－ヒドロキシプロリン、６－Ｎ－メチルリジン、２－アミノイ

ソ酪酸、イソバリン、及びα－メチルセリン等）も同様に又は代替的に使用されて、ポリペプチド又はタンパク質の中の標準的なアミノ酸残基を置換してもよい。

【００７６】

本発明のいくつかの実施形態によれば、ポリペプチド又はタンパク質の機能的変異体は、ポリペプチド又はタンパク質に対する１以上のアミノ酸の欠失及び／又は挿入を含む。例えば、ＣＤの機能的変異体は、ＣＤに対する１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、又はこれより多いアミノ酸の欠失及び／又は挿入を含むことができる。例えば、ｓｄＡｂの機能的変異体は、ｓｄＡｂに対する１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、又はこれより多いアミノ酸の欠失及び／又は挿入を含むことができる。いくつかの実施形態では、ｓｄＡｂの機能的変異体は、ｓｄＡｂのフレームワーク（ＦＲ）領域に対する１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、又はこれより多いアミノ酸の欠失及び／又は挿入を含むことができる。いくつかの実施形態では、ポリペプチド又はタンパク質の機能的変異体は、第１メチオニンの欠失を含む。

【００７７】

本発明のいくつかの実施形態によれば、ポリペプチド又はタンパク質の機能的変異体は、親タンパク質に対する置換並びに欠失及び／又は挿入を含む。いくつかの態様では、この置換は保存的な置換であり、かつ／又は欠失及び／若しくは挿入は小さい欠失及び／若しくは小さい挿入である。

【００７８】

本明細書で使用する場合、「シングルドメイン抗体」、「ｓｄＡｂ」、「ｓｄＡｂタンパク質」、「ＶＨＨ」（重鎖抗体の可変ドメイン）、及び「ナノボディ」はほとんど同義で使用される。本明細書で使用する場合、「ＣＤ」、「ＣＤａｓｅ」、及び「ＣＤタンパク質」はほとんど同義で使用される。

【００７９】

２以上の核酸又はポリペプチドに関して、用語「同一（の）」又はパーセント「同一性」は、最大対応のために（必要に応じてギャップを導入して）比較しアラインメントしたときに、保存的アミノ酸置換を配列同一性の部分として考慮せず、同じであるか、又は同じであるヌクレオチド若しくはアミノ酸残基の特定された百分率を有する２以上の配列又は部分配列を指す。用語「実質的に同一（の）」は、後述するデフォルトパラメータを用いたＢＬＡＳＴ又はＢＬＡＳＴ　２．０配列比較アルゴリズムを使用して、又は手作業によるアラインメント及び目視検査により測定した場合に、同じであるアミノ酸残基又はヌクレオチドの特定された百分率（すなわち、比較ウィンドウ又は指定された領域にわたる最大対応のために比較しアラインメントしたときに、特定された領域にわたる少なくとも約６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、又はこれより高い同一性）を有する２以上の配列又は部分配列を指す。この定義は、欠失及び／又は付加を有する配列、並びに置換を有する配列を包含する。後述するように、アルゴリズムは、ギャップ等を考慮することができる。特定されない場合、同一性又は実質同一性は、参照配列の長さ全体にわたって決定される。特定される場合、同一性は、長さが少なくとも約１０アミノ酸若しくは約１０ヌクレオチド、長さが少なくとも約２５アミノ酸若しくは約２５ヌクレオチドである領域にわたって、又は長さが５０～１００アミノ酸若しくは５０～１００ヌクレオチドである領域にわたって決定されてもよい。

【００８０】

パーセント同一性は、配列比較ソフトウェア若しくはアルゴリズムを使用して、又は目視検査により決定することができる。アミノ酸配列又はヌクレオチド配列のアラインメントを得るために使用することができる種々のアルゴリズム及びソフトウェアは当該技術分

野で公知であり（例えば、Ｋａｒｌｉｎら、１９９０、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ、８７：２２６４－２２６８、及びその改変版であるＫａｒｌｉｎら、１９９３、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ、９０：５８７３－５８７７を参照）、ＮＢＬＡＳＴ及びＸＢＬＡＳＴプログラムに組み込まれている（Ａｌｔｓｃｈｕｌら、１９９１、Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．、２５：３３８９－３４０２）。ある実施形態では、Ａｌｔｓｃｈｕｌら、１９９７、Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．２５：３３８９－３４０２に記載されているように、Ｇａｐｐｅｄ ＢＬＡＳＴを使用することができる。ＢＬＡＳＴ－２、ＷＵ－ＢＬＡＳＴ－２（Ａｌｔｓｃｈｕｌら、１９９６、Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ、２６６：４６０－４８０）、ＡＬＩＧＮ、ＡＬＩＧＮ－２（ジェネンテック（Ｇｅｎｅｎｔｅｃｈ）、サウスサンフランシスコ（Ｓｏｕｔｈ Ｓａｎ Ｆｒａｎｃｉｓｃｏ）、カリフォルニア州）、又はＭｅｇＡｌｉｇｎ（ＤＮＡＳＴＡＲ）。

【００８１】

用語「単離（された）」は、タンパク質又は核酸を説明するために使用される場合、天然環境において存在する他の要素を実質的に含まない分子を指す。例えば、単離されたタンパク質は、そのタンパク質が由来する細胞又は組織の供給源からの細胞物質又は他のタンパク質を実質的に含まない。用語「単離（された）」は、単離されたタンパク質が医薬組成物として投与されるに十分純粋である、又は少なくとも７０～８０％（ｗ／ｗ）純粋、より好ましくは少なくとも８０～９０％（ｗ／ｗ）純粋、さらにより好ましくは９０～９５％純粋、最も好ましくは少なくとも９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、又は１００％（ｗ／ｗ）純粋である場合の調製物も指す。

【００８２】

本明細書で使用する場合、比較データに関する「基準」は、比較の標準を指す。

【００８３】

本明細書で使用する場合、「特異的に結合する」は、分子（例えば、ＶＥＧＦＲ２、ＥＧＦＲ）を認識してそれに結合するが、試料中の他の分子、例えば、生物試料中の他の分子を実質的に認識せずそれに結合もしない剤（因子）（例えば、ｓｄＡｂ又はその機能的変異体）を指す。例えば、特異的に結合する２つの分子は、生理的条件下で比較的安定な複合体を形成する。特異的結合は、中程度～多数の結合部位を伴う低い親和性を通常は有する非特異的な結合とは区別されるとおり、高い親和性及び少数～中程度の数の結合部位を特徴とする。本明細書で使用する場合、用語「…に特異的に結合する」又は「…に特異的である」は、生物学的分子を含む異種起源の分子の集団の存在下で標的の存在を決定する、標的と抗体（例えば、ｓｄＡｂ又はその機能的変異体）との結合等の測定可能で再現性のある相互作用を指す。例えば、標的（エピトープであってもよい）に特異的に結合するｓｄＡｂ又はその機能的変異体は、そのｓｄＡｂ又はその機能的変異体が他の標的に結合するよりも、より大きい親和性、結合活性（アヴィディティ）で、より容易に、及び／又はより長い継続時間でこの標的に結合するｓｄＡｂ又はその機能的変異体である。いくつかの実施形態では、関連しない標的へのｓｄＡｂ又はその機能的変異体の結合の程度は、例えば、ラジオイムノアッセイ（放射免疫測定法）（ＲＩＡ）によって測定する場合、標的への上記ｓｄＡｂ又はその機能的変異体の結合の約１０％未満である。ある実施形態では、標的に特異的に結合するｓｄＡｂ又はその機能的変異体は、＜1×10^{-6}Ｍ、＜1×10^{-7}Ｍ、＜1×10^{-8}Ｍ、＜1×10^{-9}Ｍ、又は＜1×10^{-10}Ｍ、＜1×10^{-11}Ｍ、＜1×10^{-12}Ｍの解離定数（K_D）を有する。ある実施形態では、ｓｄＡｂ又はその機能的変異体は、異なる種由来のタンパク質の間で保存されているタンパク質にあるエピトープに特異的に結合する。いくつかの実施形態では、特異的結合は、排他的な結合（すなわち、それは１つのタンパク質のみに結合することができる）を含むことができるが、これを必要とはしない。

【００８４】

本明細書で使用する場合、「対象」は哺乳動物を指し、この哺乳動物としては、ヒト又はウシ、ウマ、イヌ、ヒツジ又はネコ等の非ヒト哺乳動物が挙げられるが、これらに限定

されない。

【００８５】

本明細書に提示される範囲は、省略表現であると考えられるべきであり、従ってその範囲内の値のすべてを包含する。例えば、１～５０の範囲は、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３１、３２、３３、３４、３５、３６、３７、３８、３９、４０、４１、４２、４３、４４、４５、４６、４７、４８、４９、又は５０（その非整数を含む）から選ばれるあらゆる数、数の組み合わせ又は部分範囲を含むと理解される。

【００８６】

用語「腫瘍」又は「新生物」は、新生物細胞を含有する組織の異常な腫瘤を指す。新生物及び腫瘍は、良性、前悪性又は悪性であってよい。

【００８７】

用語「癌」又は「悪性新生物」は、制御されない成長、隣接組織への浸潤、及び多くの場合、身体の他の場所への転移を示す細胞を指す。これは、血液の癌及びリンパ系の癌を含む。

【００８８】

用語「結合親和性」は、一般に、（例えば、ｓｄＡｂの）分子の単一の結合部位とその結合パートナー（例えば、抗原）との非共有結合相互作用の総体の強さを指す。特段の記載がない限り、本明細書で使用する場合、「結合親和性」、「…に結合する（ｂｉｎｄ　ｔｏ）」、「…に結合する（ｂｉｎｄｓ　ｔｏ）」、又は「…に結合する（ｂｉｎｄｉｎｇ　ｔｏ）」は、結合性のペアのメンバー（例えば、抗体Ｆａｂ断片及び抗原）どうしの１：１相互作用を反映する内因性の結合親和性を指す。パートナーＹに対する分子Ｘの親和性は、一般に、解離定数（K_D）によって表すことができる。親和性は、本明細書に記載される方法を含めて当該技術分野で公知の一般的方法によって測定することができる。低親和性抗体は、一般に抗原にゆっくりと結合し、容易に解離する傾向があるのに対して、高親和性抗体は、一般に速く抗原に結合し、より長く結合して留まる傾向がある。結合親和性を測定する様々な方法が当該技術分野で公知であり、そのいずれも、本発明の目的のために使用することができる。結合親和性、例えば、結合強度を測定するための具体的な例証的で例示的な実施形態は以降に記載される。

【００８９】

種々の刊行物、論文及び特許が、背景技術及び明細書全体にわたって引用され、又は記載される。これらの参考文献の各々は、参照によりその全体を本明細書に援用したものとする。本明細書に含まれている文献、行為、材料、装置、論文等の論述・考察は、本発明についての内容を提供するという目的のためのものである。そのような論述・考察は、これらの事項のいずれか又はすべてが、いずれかの開示された発明又は請求項に記載された発明に対して先行技術の一部を形成するということを認めたものではない。

【００９０】

本開示は、式（Ｉ）又は式（ＩＩ）を含む融合タンパク質を提供する。

Ｎ－（Ｌ）ｎ－Ｃ（式Ｉ）；

Ｃ－（Ｌ）ｎ－Ｎ（式ＩＩ）；

上記式中、Ｎは、シングルドメイン抗体（ｓｄＡｂ）又はその機能的変異体であり、Ｌはペプチドリンカーであり、ｎは０～５０であり、Ｃは、シトシンデアミナーゼ（ＣＤ）タンパク質又はその機能的変異体である。いくつかの実施形態では、当該融合タンパク質は、実質的に式Ｉからなる。いくつかの実施形態では、当該融合タンパク質は、式Ｉからなる。いくつかの実施形態では、当該融合タンパク質は、実質的に式ＩＩからなる。いくつかの実施形態では、当該融合タンパク質は式ＩＩからなる。

【００９１】

いくつかの実施形態では、当該融合タンパク質は、式Ｉを含み、従って、上記ペプチドリンカーのＣ末端又は上記ｓｄＡｂ又はその機能的変異体のＣ末端は、上記ＣＤタンパク

質又はその機能的変異体のＮ末端に融合されている。例えば、いくつかの態様では、ペプチドリンカーは存在せず、上記ｓｄＡｂ又はその機能的変異体のＣ末端は、上記ＣＤタンパク質又はその機能的変異体のＮ末端に融合されている。いくつかの態様では、ペプチドリンカーは存在し、上記ｓｄＡｂ又はその機能的変異体のＣ末端はペプチドリンカーのＮ末端に融合されており、ペプチドリンカーのＣ末端は上記ＣＤタンパク質又はその機能的変異体のＮ末端に融合されている。

【００９２】

他の実施形態では、当該融合タンパク質は、式ＩＩを含み、従って、上記ペプチドリンカーのＣ末端又は上記ＣＤタンパク質若しくはその機能的変異体のＣ末端は、上記ｓｄＡｂ又はその機能的変異体のＮ末端に融合されている。例えば、いくつかの態様では、ペプチドリンカーは存在せず、上記ＣＤタンパク質又はその機能的変異体のＣ末端は、上記ｓｄＡｂ又はその機能的変異体のＮ末端に融合されている。いくつかの態様では、ペプチドリンカーは存在し、上記ＣＤタンパク質又はその機能的変異体のＣ末端はペプチドリンカーのＮ末端に融合されており、ペプチドリンカーのＣ末端は上記ｓｄＡｂ又はその機能的変異体のＮ末端に融合されている。

【００９３】

本開示の融合タンパク質の例示的なシングルドメイン抗体

ｓｄＡｂは、３つの相補性決定領域（ＣＤＲ）を有する単一可変ドメインを持つ一本鎖を含む。シングルドメイン抗体は、従来、ラクダ科の動物の重鎖のみの抗体（ＨｃＡｂｓ）の可変断片、すなわち重鎖抗体の重鎖の可変ドメイン、ＶＨＨを含む。いくつかのＶＨＨポリペプチドは、商標登録名Ｎａｎｏｂｏｄｙ（登録商標）（Ｎｂ；アブリンクス（Ａｂｌｙｎｘ））とも呼ばれる。しかしながら、本開示では、ナノボディとの用語の使用は、シングルドメイン抗体をアブリンクス（Ａｂｌｙｎｘ）によって提供されるＮａｎｏｂｏｄｙ（登録商標）に限定しない。いくつかの実施形態では、上記ｓｄＡｂ又はその機能的変異体は、ラクダ、アルパカ又はラマの重鎖のみのＩｇＧクラス抗体から選択される。いくつかの実施形態では、上記ｓｄＡｂ又はその機能的変異体は、ＣＤＲグラフティングによって生成される操作されたポリペプチドである。例えば、上記ｓｄＡｂ又はその機能的変異体は、ラクダ科の動物由来のｓｄＡｂのＣＤＲ領域のすべて又はいくつかを所望の標的を有する他の既知の抗体のＣＤＲ領域で置換することによって生成される。いくつかの実施形態では、上記ｓｄＡｂ又はその機能的変異体は、サメで見いだされた重鎖のみ抗体の組換え誘導体である。いくつかの実施形態では、上記ｓｄＡｂ又はその機能的変異体は、当該技術分野で周知の技術を使用して合成的に生成される。ある実施形態では、ｓｄＡｂ又はその機能的変異体は、ヒト由来ｓｄＡｂである（ドマンティス（Ｄｏｍａｎｔｉｓ，Ｉｎｃ．）、ウォルサム（Ｗａｌｔｈａｍ）、マサチューセッツ州；例えば、米国特許第６，２４８，５１６Ｂ１号明細書を参照）。

【００９４】

いくつかの実施形態では、上記ｓｄＡｂ又はその機能的変異体は、ラクダ科の動物由来のヒト化ＶＨＨである。本明細書で使用する場合、用語「ヒト化」ｓｄＡｂは、天然のＶＨＨ配列のアミノ酸配列の中の１以上のアミノ酸残基を、ヒト由来の従来の４本鎖抗体からのＶＨドメインの中の対応する位置で現れる１以上のアミノ酸残基によって置き換えたｓｄＡｂを意味する。この置換は、当該技術分野で周知である方法によって実施することができる。例えば、ｓｄＡｂのフレームワーク領域（ＦＲ）は、ヒト可変ＦＲによって置き換えられてもよい。

【００９５】

ＣＤＲは、ｓｄＡｂ又はその機能的変異体のエピトープ認識にとって最重要である。上記ｓｄＡｂ又はその機能的変異体がその同族のエピトープを認識してそれに結合する能力を妨害することがなければ、ＣＤＲを構成するアミノ酸残基に対して、変更が加えられてもよい。例えば、標的エピトープ認識に影響を及ぼさないがそのエピトープに対する上記ｓｄＡｂ又はその機能的変異体の結合親和性を高める変更が加えられてもよい。いくつかの実施形態では、これらの変更は、保存的アミノ酸置換及び／又は小さい欠失若しくは小

さい挿入である。

【００９６】

いくつかの実施形態では、ｓｄＡｂ又はその機能的変異体は、重鎖のみＩｇＧクラスの抗体のうちのいずれか１つの抗体の可変ドメインを含む。単一可変ドメインは、３つの相補性決定領域（ＣＤＲ）を含む。ｓｄＡｂ又はその機能的変異体は、（一般）構造ＦＲ１－ＣＤＲ１－ＦＲ２－ＣＤＲ２－ＦＲ３－ＣＤＲ３－ＦＲ４（式中、ＦＲ１、ＦＲ２、ＦＲ３、及びＦＲ４はそれぞれフレームワーク領域１、２、３及び４を指し、ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３はそれぞれ相補性決定領域１、２及び３を指す）を有する免疫グロブリン及び／又はポリペプチドであることができる。ｓｄＡｂ又はその機能的変異体のアミノ酸残基の番号付けは、Ｋａｂａｔら（「Ｓｅｑｕｅｎｃｅ ｏｆ ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｏｆ ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ ｉｎｔｅｒｅｓｔ」、ＵＳ Ｐｕｂｌｉｃ Ｈｅａｌｔｈ Ｓｅｒｖｉｃｅｓ、ＮＩＨ、ベセスダ（Ｂｅｔｈｅｓｄａ）、メリーランド州、Ｐｕｂｌｉｃａｔｉｏｎ Ｎｏ．９１）によって与えられた、ＶＨドメインについての一般的な番号付けに従う。この番号付けによれば、ｓｄＡｂのＦＲ１は位置１～３０のアミノ酸残基を含み、ｓｄＡｂ又はその機能的変異体の相補性決定領域１（ＣＤＲ１）は、位置３１～３５のアミノ酸残基を含み、ｓｄＡｂ又はその機能的変異体のＦＲ２は、位置３６～４９のアミノ酸を含み、ｓｄＡｂ又はその機能的変異体のＣＤＲ２は、位置５０～６５のアミノ酸残基を含み、ｓｄＡｂ又はその機能的変異体のＦＲ３は、位置６６～９４のアミノ酸残基を含み、ｓｄＡｂ又はその機能的変異体のＣＤＲ３は、位置９５～１０２のアミノ酸残基を含み、ｓｄＡｂ又はその機能的変異体のＦＲ４は、位置１０３～１１３のアミノ酸残基を含む。

【００９７】

いくつかの実施形態では、上記ｓｄＡｂ又はその機能的変異体は半減期延長ｓｄＡｂである。ポリペプチドの半減期を延長する方法は当該技術分野で周知である。

【００９８】

治療薬としての本開示の融合タンパク質の有効性は、適切なｓｄＡｂ標的の選択に依存する。この標的は、現在公知の任意の種類のもの、又は公知になる任意の種類のものであってよく、ペプチド及び非ペプチド（例えば、細胞表面脂質、グリカン又は他の翻訳後修飾物）を含む。

【００９９】

いくつかの実施形態では、本開示のｓｄＡｂ又はその機能的変異体は、癌細胞の表面上の細胞外標的に結合する。いくつかの実施形態では、上記ｓｄＡｂ又はその機能的変異体は標的に結合し、この標的は、細胞膜分子、分泌された分子、及び細胞内分子から選択される。

【０１００】

いくつかの実施形態では、標的は、ＥＧＦＲ、５Ｔ４、Ａ３３、ＡＦＰ、β－カテニン、ＢＲＣＡ１、ＢＲＣＡ２、Ｃ２４２、ＣＣＲ４、ＣＤ１５２、ＣＤ１９、ＣＤ２０、ＣＤ２００、ＣＤ２２、ＣＤ２２１、ＣＤ２３、ＣＤ３０、ＣＤ３、ＣＤ３７、ＣＤ４０、ＣＤ４４、ＣＤ５、ＣＤ５１、ＣＤ５２、ＣＤ５６、ＣＤ６４、ＣＤ７４、ＣＤ８０、ＣＤＣＰ１、ｃ－ＫＩＴ、ＣＯＸ－２、ｃＭＥＴ、ＣＳＦ１Ｒ、ＣＴＬＡ－４、ＥＧＦ２、ＥｒｂＢ２、ＥｒｂＢ３、ＦＧＦＲ１、ＦＧＦＲ２、ＦＧＦＲ３、ＦＬＴ３、ＨＥＲ２、ＨＥＲ３、ＨＩＦ－Ｉａ、ＨＬＡ－ＤＲ、ＩＧＦ－ＩＲ、ｍＴＯＲ、ＮＰＣ－１Ｃ、Ｐ５３、ＰＤＧＦＲα、ＰＤＧＦＲβ、ＰＬＧＦ、ＰＳＡ、ＲＧＭａ、ＲｏＮ、ＴＮＦ、ＴＰ５３、ＴＰＤ５２、ＶＥＧＦＲ１、ＶＥＧＦＲ２、ＶＥＧＦＲ３、ＣＡ－ＩＸ、αｖβ３、α５β１、ＦＡＰ、糖タンパク質７５、ＴＡＧ－７２、ＭＵＣ１６、ＮＲ－ＬＵ－１３、ＳＬＡＭＦ７、ＥＧＰ４０、ＢＡＦＦ、ＰＲＬ－３、癌胎児性抗原（ＣＥＡ）、前立腺特異的膜抗原、ＭＡＲＴ－１、ｇｐ１００、癌精巣（ＣＴ）抗原（例えばＮＹ－ＥＳＯ－１、ＭＡＧＥ－Ａ３、ＭＡＧＥ－Ａ１）、ｈＴＥＲＴ、ＭＣＣ、Ｍｕｍ－１、ＥＲＢＢ２ＩＰ、ＥｐＣＡＭ、ＴｆＲ、インテグリンα６β４、ＨＧＦＲ、ＰＴＰ－ＬＡＲ、ＣＤ１４７、ＣＤＣＰ１、ＣＥＡＣＡＭ６、ＪＡＭ１、インテグリンα３β１、インテグリンα

ｖβ３、ＰＤ－Ｌ１、ＡＸＬ、ＣＤＨ６、ＤＬＬ３、ＥＤＮＲＢ、ＥＦＮＡ４、ＮＥＰＰ３、ＥＰＨＡ２、ＦＯＬＲ１、ＬｅｗｉｓＹ、ＧＰＮＭＢ、ＧＵＣＹ２Ｃ、ＨＡＶＣＲ１、インテグリンα、ＬＹＰＤ３、メソテリン、ＭＵＣ１、ＮＥＣＴＩＮ４、ＮＯＴＣＨ３、ＰＴＫ７、ＳＬＣ３４Ａ２、ＳＬＣ３９Ａ６、ＳＬＣ４４Ａ４、ＳＬＩＴＲＫ６、ＳＴＥＡＰ１、ＴＡＣＳＴＤ２、ＴＰＢＧ、ＴＩＭ－１、ＧＤ２、及びニコチン性アセチルコリン受容体（ｎＡＣｈＲ）からなる群から選択される。

【０１０１】

いくつかの実施形態では、上記標的は、ＥＧＦＲ、ｃ－ＫＩＴ、ｃＭＥＴ、ＨＥＲ２、ＨＥＲ３、ＦＧＦＲ１、ＦＧＦＲ２、ＦＧＦＲ３、ＩＧＦ－ＩＲ、Ｐ５３、ＰＤＧＦＲα、ＶＥＧＦＲ１、ＶＥＧＦＲ２、ＶＥＧＦＲ３、ＣＡ－ＩＸ、αｖβ３、α５β１、ＭＵＣ１６、癌胎児性抗原（ＣＥＡ）、前立腺特異的膜抗原、癌精巣（ＣＴ）抗原（例えば、ＮＹ－ＥＳＯ－１、ＭＡＧＥ－Ａ３、ＭＡＧＥ－Ａ１）、メソテリン、ＥｐＣＡＭ、インテグリンα６β４、ＣＥＡＣＡＭ６、インテグリンα３β１、インテグリンαｖβ３、ＰＤ－Ｌ１、ＡＸＬ、ＣＤＨ６、ＤＬＬ３、ＥＤＮＲＢ、ＥＦＮＡ４、ＮＥＰＰ３、ＥＰＨＡ２、ＦＯＬＲ１、ＬｅｗｉｓＹ、ＧＰＮＭＢ、ＧＵＣＹ２Ｃ、ＨＡＶＣＲ１、インテグリンα、ＬＹＰＤ３、ＭＵＣ１、ＮＥＣＴＩＮ４、ＮＯＴＣＨ３、ＰＴＫ７、ＳＬＣ３４Ａ２、ＳＬＣ３９Ａ６、ＳＬＣ４４Ａ４、ＳＬＩＴＲＫ６、ＳＴＥＡＰ１、ＴＡＣＳＴＤ２、ＴＰＢＧ、ＴＩＭ－１、ＧＤ２、及びニコチン性アセチルコリン受容体（ｎＡＣｈＲ）からなる群から選択される。

【０１０２】

ある実施形態では、上記標的はＶＥＧＦＲ２、ＥＧＦＲ、ＣＥＡ、ＨＥＲ２、又はＨＥＲ３である。

【０１０３】

ある実施形態では、本開示の融合タンパク質のｓｄＡｂ又はその機能的変異体はＥＧＦＲを標的とする。いくつかの実施形態では、上記ｓｄＡｂ又はその機能的変異体は、Ｊ．Ｂｉｏｍｏｌ．Ｓｃｒｅｅｎ．　２００９年１月；１４（１）：７７－８５に記載されているＶＨＨ１２２に由来する。いくつかの実施形態では、上記ｓｄＡｂ又はその機能的変異体は、Ｓｔｒｕｃｔｕｒｅ　２１、１２１４－１２２４、２０１３年７月２日、ＰＤＢ：４ＫＲＭ＿Ｉ、及び米国特許出願公開第２００９／０２５２６８１号明細書として記載されている７Ｄ１２に由来する。

【０１０４】

ある実施形態では、本開示の融合タンパク質のｓｄＡｂ又はその機能的変異体はＶＥＧＦＲ２を標的とする。いくつかの実施形態では、上記ｓｄＡｂ又はその機能的変異体は、Ｍｏｌ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．２０１２年２月；５０（１－２）：３５－４１に記載されている３ＶＧＲ１９に由来する。いくつかの実施形態では、上記ｓｄＡｂ又はその機能的変異体は、Ｍｏｌ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．２０１２年２月；５０（１－２）：３５－４１に記載されている４ＶＧＲ１７に由来する。いくつかの実施形態では、上記ｓｄＡｂ又はその機能的変異体は、Ｍｏｌ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．２０１２年２月；５０（１－２）：３５－４１に記載されている４ＶＧＲ３８に由来する。

【０１０５】

ある実施形態では、本開示の融合タンパク質のｓｄＡｂ又はその機能的変異体はＨＥＲ２を標的とする。いくつかの実施形態では、上記ｓｄＡｂ又はその機能的変異体は、米国特許出願公開第２０１１／００５９０９０号明細書に記載されている２Ｄ３、５Ｆ７、又は４７Ｄ５に由来する。

【０１０６】

ある実施形態では、本開示の融合タンパク質のｓｄＡｂ又はその機能的変異体はＨＥＲ３を標的とする。いくつかの実施形態では、上記ｓｄＡｂ又はその機能的変異体は、Ｖｅｒｓｉｏｎ　２．Ｆ１０００Ｒｅｓ．２０１８；７：５７に記載されているＢＣＤ０９０－Ｍ２（ＰＤＢ　ＩＤ：６ＥＺＷ）に由来する。

【０１０７】

ある実施形態では、本開示の融合タンパク質のｓｄＡｂ又はその機能的変異体はＣＥＡに結合する。いくつかの実施形態では、上記ｓｄＡｂ又はその機能的変異体は、米国特許出願公開第２０１６０２８０７９５Ａ１号明細書、ＦＥＢＳ　Ｊ．２００９年７月；２７６（１４）：３８８１－９３及びＪ　Ｎｕｃｌ　Ｍｅｄ．２０１０年７月；５１（７）：１０９９－１０６に記載されているＡＢＳ２９５４４．１又はＮｂＣＥＡ５に由来する。

【０１０８】

本開示の融合タンパク質のｓｄＡｂ又はその機能的変異体の生物活性は、例えば、標的又はそのエピトープに対するｓｄＡｂ又はその機能的変異体の結合親和性を決定することによって評価することができる。いくつかの実施形態では、標的又はそのエピトープに対する当該融合タンパク質の上記ｓｄＡｂ又はその機能的変異体の親和性は、例えば、約１ピコモル濃度（ｐＭ）～約１００マイクロモル濃度（μＭ）（例えば、約１ピコモル濃度（ｐＭ）～約１ナノモル濃度（ｎＭ）、約１ｎＭ～約１マイクロモル濃度（μＭ）、又は約１μＭ～約１００μＭ）であることができる。いくつかの実施形態では、当該融合タンパク質の上記ｓｄＡｂ又はその機能的変異体は、１ナノモル濃度以下（例えば、０．９ｎＭ、０．８ｎＭ、０．７ｎＭ、０．６ｎＭ、０．５ｎＭ、０．４ｎＭ、０．３ｎＭ、０．２ｎＭ、０．１ｎＭ、０．０５ｎＭ、０．０２５ｎＭ、０．０１ｎＭ、０．００１ｎＭ、又は上記の値のうちのいずれか２つによって定められる範囲）のK_Dで標的（例えば、ＶＥＧＦＲ２、ＥＧＦＲ、ＨＥＲ２、ＨＥＲ３、又はＣＥＡ）に結合することができる。いくつかの実施形態では、本開示の融合タンパク質の上記ｓｄＡｂ又はその機能的変異体は、２００ｐＭ以下（例えば、１９０ｐＭ、１７５ｐＭ、１５０ｐＭ、１２５ｐＭ、１１０ｐＭ、１００ｐＭ、９０ｐＭ、８０ｐＭ、７５ｐＭ、６０ｐＭ、５０ｐＭ、４０ｐＭ、３０ｐＭ、２５ｐＭ、２０ｐＭ、１５ｐＭ、１０ｐＭ、５ｐＭ、１ｐＭ、又は上記の値のうちのいずれか２つによって定められる範囲）のK_Dで上記標的に結合することができる。注目する抗原又はエピトープに対する本明細書に開示される融合タンパク質のｓｄＡｂ又はその機能的変異体の親和性は、当該技術分野で認識されている任意のアッセイを使用して測定することができる。このような方法としては、例えば、蛍光活性化セルソーティング（ｆｌｕｏｒｅｓｃｅｎｃｅ　ａｃｔｉｖａｔｅｄ　ｃｅｌｌ　ｓｏｒｔｉｎｇ：ＦＡＣＳ）、分離可能なビーズ（例えば、磁気ビーズ）、表面プラスモン共鳴（ｓｕｒｆａｃｅ　ｐｌａｓｍｏｎ　ｒｅｓｏｎａｎｃｅ：ＳＰＲ）、溶液相競合（ＫＩＮＥＸＡ（商標））、抗原パンニング、及び／又はＥＬＩＳＡが挙げられる（例えば、Ｊａｎｅｗａｙら（編）、Ｉｍｍｕｎｏｂｉｏｌｏｇｙ、第５版、Ｇａｒｌａｎｄ　Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ、Ｎｅｗ　Ｙｏｒｋ、Ｎ．Ｙ．、２００１を参照）。

【０１０９】

本開示の融合タンパク質を製造するために使用されるｓｄＡｂ（又はその機能的変異体）及び核酸は、後述する実施例に記載されるように、又は当業者に公知の任意の方法によって調製することができる。

【０１１０】

いくつかの実施形態では、上記ｓｄＡｂ又はその機能的変異体は、配列番号２８、配列番号３１及び配列番号３４からなる群から選択されるＣＤＲ１、配列番号２９、配列番号３２及び配列番号３５からなる群から選択されるＣＤＲ２、並びに配列番号３０、配列番号３３及び配列番号３６からなる群から選択されるＣＤＲ３を含むか、実質的にこれらからなるか、又はこれらからなる。

【０１１１】

いくつかの実施形態では、上記ｓｄＡｂ又はその機能的変異体は、配列番号３７及び配列番号４０からなる群から選択されるＣＤＲ１、配列番号３８及び配列番号４１からなる群から選択されるＣＤＲ２、並びに配列番号３９及び配列番号４２からなる群から選択されるＣＤＲ３を含むか、実質的にこれらからなるか、又はこれらからなる。

【０１１２】

いくつかの実施形態では、上記ｓｄＡｂ又はその機能的変異体は、配列番号１９９、配列番号２０２及び配列番号２０５からなる群から選択されるＣＤＲ１、配列番号２００、

配列番号２０３及び配列番号２０６からなる群から選択されるＣＤＲ２、並びに配列番号２０１、配列番号２０４及び配列番号２０７からなる群から選択されるＣＤＲ３を含むか、実質的にこれらからなるか、又はこれらからなる。

【０１１３】

いくつかの実施形態では、上記ｓｄＡｂ又はその機能的変異体は、配列番号２０８のＣＤＲ１、配列番号２０９のＣＤＲ２及び配列番号２１０のＣＤＲ３を含むか、実質的にこれらからなるか、又はこれらからなる。

【０１１４】

いくつかの実施形態では、上記ｓｄＡｂ又はその機能的変異体は、配列番号２１１及び配列番号２１４からなる群から選択されるＣＤＲ１、配列番号２１２及び配列番号２１５からなる群から選択されるＣＤＲ２、並びに配列番号２１３及び配列番号２１６からなる群から選択されるＣＤＲ３を含むか、実質的にこれらからなるか、又はこれらからなる。

【０１１５】

いくつかの実施形態では、上記ｓｄＡｂ又はその機能的変異体は、実施例に開示される抗ＶＥＧＦＲ２　ｓｄＡｂ、つまり３ＶＧＲ１９（配列番号２３）、４ＶＧＲ１７（配列番号２４）、及び４ＶＧＲ３８（配列番号２５）の群から選択される。いくつかの実施形態では、上記ｓｄＡｂ又はその機能的変異体は、実施例に開示される抗ＥＧＦＲ　ｓｄＡｂ、つまりＶＨＨ１２２（配列番号２６）及び７Ｄ１２（配列番号２７）の群から選択される。いくつかの実施形態では、上記ｓｄＡｂ又はその機能的変異体は、実施例に開示される抗ＨＥＲ２　ｓｄＡｂ、つまり２Ｄ３（配列番号６９）、５Ｆ７（配列番号７０）及び４７Ｄ５（配列番号７１）の群から選択される。いくつかの実施形態では、上記ｓｄＡｂ又はその機能的変異体は、実施例に開示される抗ＨＥＲ３　ｓｄＡｂ、つまりＢＣＤ０９０－Ｍ２（配列番号７５）の群から選択される。いくつかの実施形態では、上記ｓｄＡｂ又はその機能的変異体は、実施例に開示される抗ＣＥＡ　ｓｄＡｂ、つまり抗ＣＥＡ　ｓｄＡｂ（ＡＢＳ２９５４４．１）（配列番号７７）及びＮｂＣＥＡ５（配列番号７９）から選択される。

【０１１６】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるｓｄＡｂ又はその機能的変異体のいずれも、配列番号２１（野生型ＣＤ、Ｎ末端メチオニンを有しない）、配列番号２２（点変異Ａ２２Ｌ／Ｖ１０７Ｉ／Ｉ１３９Ｌを有する配列番号２１の変異体）、配列番号１８６（野生型ＣＤ、Ｎ末端メチオニンを含む）、配列番号１８７（点変異Ａ２３Ｌ／Ｖ１０８Ｉ／Ｉ１４０Ｌを有する配列番号１８６の変異体）のアミノ酸配列、又は上記のアミノ酸配列のうちのいずれかのアミノ酸配列の機能的変異体を含む酵母由来ＣＤタンパク質又はその機能的変異体と融合される。

【０１１７】

ある実施形態では、当該融合タンパク質は、Ｃ末端にヒスチジンタグ（ＨＩＳタグ）、例えば６－ＨＩＳタグ（配列番号６）を含む。いくつかの実施形態では、当該融合タンパク質は、ペプチドリンカー（例えば、ＧＳＳ）を介してＨＩＳタグに連結されている。

【０１１８】

いくつかの実施形態では、本開示の融合タンパク質のｓｄＡｂ又はその機能的変異体は、上記ｓｄＡｂの標的の存在と明らかに関連する状態の予防及び／又は治療において使用するために、部分的に又は完全にヒト化することができる。一般に、ヒト化は、ｓｄＡｂ又はその機能的変異体のラクダ科の動物由来のフレームワーク領域及び可変領域のすべて又はいくつかをヒト由来の対応配列で置換することを伴う。その目的は、治療への応用において、ｓｄＡｂの免疫原性を低減することである。いくつかの例では、ラクダ科の動物の免疫グロブリンのＦＲ残基は、対応するヒト由来の残基で置換される。

【０１１９】

ある実施形態では、上記ｓｄＡｂ又はその機能的変異体は、以下のＴ細胞エピトープに１以上の変異を含む。

【０１２０】

【表１】

エピトープ	HLA-DR 制限エピトープ	配列番号
エピトープ１	SVQTGGSLRL	63
エピトープ２	LKPEDTAIY	64
エピトープ３	IYYCAAAAGS	65

【０１２１】

ある実施形態では、上記ｓｄＡｂ又はその機能的変異体は、エピトープ１（配列番号６３）から改変された配列$X_1X_2QX_3X_4GX_5LRL$（式中、X_1はＶによって置換されてもよく、X_2はＡによって置換されてもよく、X_3はＶによって置換されてもよく、X_4はＤによって置換されてもよく、及び／又はX_5はＤ若しくはＥによって置換されてもよい）を含む。ある実施形態では、上記ｓｄＡｂ又はその機能的変異体は、エピトープ２（配列番号６４）から改変された配列$LX_1X_2EDX_3X_4X_5Y$（式中、X_1はＲ、Ａ、Ｄ、Ｓ、若しくはＴによって置換されてもよく、X_2はＡ、Ｄ若しくはＥによって置換されてもよく、X_3はＤ、Ｅ、Ｇ、Ｈ若しくはＱによって置換されてもよく、X_4はＤ若しくはＥによって置換されてもよく、及び／又はX_5はＶ、Ａ、Ｔ、Ｒ、Ｑ若しくはＮによって置換されてもよい）を含む。ある実施形態では、上記ｓｄＡｂ又はその機能的変異体は、エピトープ３（配列番号６５）から改変された配列X_1ＹＹＣＡＡＡＡＧＳ（式中、X_1はＶ、Ａ、Ｔ、Ｒ、Ｑ又はＮによって置換されてもよい）を含む。

【０１２２】

ある実施形態では、上記ｓｄＡｂ又はその機能的変異体は、エピトープ１（配列番号６３）から改変された配列$X_1X_2QX_3X_4GSLRL$（式中、X_1はＶによって置換されてもよく、X_2はＡによって置換されてもよく、X_3はＶによって置換されてもよく、及び／又はX_4はＤによって置換されてもよい）を含む。ある実施形態では、上記ｓｄＡｂ又はその機能的変異体は、エピトープ２（配列番号６４）から改変された配列$LX_1X_2EDTAX_5Y$（式中、X_1はＲ又はＴによって置換されてもよく、X_2はＡによって置換されてもよく、及び／又はX_5はＶ若しくはＲによって置換されてもよい）を含む。ある実施形態では、上記ｓｄＡｂ又はその機能的変異体は、エピトープ３（配列番号６５）から改変された配列X_1ＹＹＣＡＡＡＡＧＳ（式中、X_1はＶ又はＲによって置換されてもよい）を含む。

【０１２３】

ある実施形態では、上記ｓｄＡｂ又はその機能的変異体は、配列$ESGGGX_1X_2QX_3GGSL$（式中、X_1はＳ又はＶであり、X_2はＶ又はＡであり、X_3はＡ、Ｔ又はＶである）を有するＦＲ１配列を含む。ある実施形態では、上記ｓｄＡｂ又はその機能的変異体は、改変配列$MNSLX_1X_2EDTAX_3YYCAA$（式中、X_1はＫ、Ｒ又はＴであり、X_2はＰ又はＡであり、X_3はＲ又はＶである）を含むＦＲ３配列を含む。

【０１２４】

シングルドメイン抗体のアミノ酸配列は、ヒトファミリーＩＩＩ　ＶＨアミノ酸配列に密に関連する。従って、いくつかの実施形態では、「ヒト化」ｓｄＡｂ形態が生成される。いくつかの実施形態では、ｓｄＡｂ又はその機能的変異体は、内在性マウス抗体の発現が排除されてヒト由来の導入遺伝子が導入された遺伝子導入マウスを標的ペプチドで免疫することによって産生されるＨＣＡｂに由来する。ＨＣＡｂマウスは、米国特許第８，８８３，１５０号明細書、米国特許第８，９２１，５２４号明細書、米国特許第８，９２１，５２２号明細書、米国特許第８，５０７，７４８号明細書、米国特許第８，５０２，０１４号明細書、米国特許出願公開第２０１４／０３５６９０８号明細書、米国特許出願公開第２０１４／００３３３３５明細書、米国特許出願公開第２０１４／００３７６１６明細書、米国特許出願公開第２０１４／０３５６９０８明細書、米国特許出願公開第２０１３／０３４４０５７明細書、米国特許出願公開第２０１３／０３２３２３５明細書、米国特許出願公開第２０１１／０１１８４４４明細書、及び米国特許出願公開第２００９／０

３０７７８７明細書に開示されており、これらのすべては、それらが重鎖のみ抗体及び遺伝子導入マウスにおけるその産生に関して開示するすべてについて、参照により本明細書に援用したものとする。ＨＣＡｂマウスは免疫され、得られる準備刺激された脾臓細胞は、マウスの骨髄腫細胞と融合されて、ハイブリドーマを形成する。得られるＨＣＡｂは、次に、マウスのＣＨ２領域及びＣＨ３領域を対応するヒト由来配列で置換することにより完全ヒト化することができる。

【０１２５】

本開示の融合タンパク質のためのｓｄＡｂ又はその機能的変異体を製造するためのさらなる方法は、当該技術分野で周知である。例えば、ｓｄＡｂ又はその機能的変異体を得るための１つの方法は、（ａ）ラクダ科の動物を１以上の抗原で免疫する工程と、（ｂ）その免疫されたラクダ科の動物から末梢リンパ球を単離し、全ＲＮＡを得て、対応するｃＤＮＡを合成する工程と、（ｃ）ｓｄＡｂドメインをコードするｃＤＮＡ断片のライブラリーを構築する工程と、（ｄ）工程（ｃ）で得られたｓｄＡｂドメインコードｃＤＮＡを、ＰＣＲを用いてｍＲＮＡへと転写し、そのｍＲＮＡをリボソーム又はファージディスプレイフォーマットへと変換し、リボソームディスプレイ又はファージディスプレイパンニングによって上記ｓｄＡｂドメインを選択する工程と、（ｅ）ｓｄＡｂドメインを好適なベクターの中で発現し、任意に、発現されたｓｄＡｂドメインを精製する工程とを備える。他の例示的な方法は、Ｒｅｖｅｔｓら、２０１５ Ｅｘｐｅｒｔ Ｏｐｉｎ．Ｂｉｏｌ．Ｔｈｅｒ．（２００５） ５（１）：１１１－１２４、「Ｇｅｎｅｒａｔｉｏｎ ａｎｄ ｐｒｏｄｕｃｔｉｏｎ ｏｆ ｒｅｃｏｍｂｉｎａｎｔ ｎａｎｏｂｏｄｉｅｓ」に提供された参考文献のいずれか１つに記載されている。加えて、ハーバー・バイオメド（Ｈａｒｂｏｕｒ Ｂｉｏｍｅｄ）は、米国特許第９，３５３，１７９号明細書、米国特許第９，３４６，８７７号明細書、及び米国特許第８，９２１，５２２号明細書、並びに欧州特許１７７６３８３号明細書及び欧州特許１８６４９９８号明細書（これらのすべては、参照により本明細書に援用したものとする）に記載されるヒト重鎖齧歯動物技術及びヒト重鎖構築物のプラットフォームを提供する。アブリンクス（Ａｂｌｙｎｘ）も、本開示の化合物を製造するために使用することができるナノボディのソースを提供する。

【０１２６】

ナノボディのさらなる説明については、以下の参考文献（それらの各々は、参照により本明細書に援用したものとする）を参照されたい：Ｍｕｙｌｄｅｒｍａｎｓによる総説（Ｒｅｖｉｅｗｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ ７４：２７７－３０２、２００１）、並びに一般的な背景技術として言及される下記の特許出願：Ｖｒｉｊｅ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｅｉｔ Ｂｒｕｓｓｅｌの国際公開第９４／０４６７８号パンフレット、国際公開第９５／０４０７９号パンフレット、及び国際公開第９６／３４１０３号パンフレット；Ｕｎｉｌｅｖｅｒの国際公開第９４／２５５９１号パンフレット、国際公開第９９／３７６８１号パンフレット、国際公開第００／４０９６８号パンフレット、国際公開第００／４３５０７号パンフレット、国際公開第００／６５０５７号パンフレット、国際公開第０１／４０３１０号パンフレット、国際公開第０１／４４３０１号パンフレット、欧州特許出願公開第１１３４２３１号明細書、及び国際公開第０２／４８１９３号パンフレット；ｔｈｅ Ｖｌａａｍｓ Ｉｎｓｔｉｔｕｕｔ ｖｏｏｒ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅ（ＶＩＢ）の国際公開第９７／４９８０５号パンフレット、国際公開第０１／２１８１７号パンフレット、国際公開第０３／０３５６９４号パンフレット、国際公開第０３／０５４０１６号パンフレット、及び国際公開第０３／０５５５２７号パンフレット；Ａｌｇｏｎｏｍｉｃｓ Ｎ．Ｖ．及びＡｂｌｙｎｘ Ｎ．Ｖ．の国際公開第０３／０５０５３１号パンフレット；カナダ国立研究機関（Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｒｅｓｅａｒｃｈ Ｃｏｕｎｃｉｌ ｏｆ Ｃａｎａｄａ）による国際公開第０１／９０１９０号パンフレット；Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ ｏｆ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓによる国際公開第０３／０２５０２０号パンフレット（欧州特許出願公開第１４３３７９３号明細書に対応する）；並びにＡｂｌｙｎｘ Ｎ．Ｖ．による国際公開第０４／０４１８６７号パンフレット、国際公開第０４／０４１８６２号パンフレット、国際公開第０４／０４１８６５号パ

ンフレット、国際公開第０４／０４１８６３号パンフレット、国際公開第０４／０６２５５１号パンフレット、国際公開第０５／０４４８５８号パンフレット、国際公開第０６／４０１５３号パンフレット、国際公開第０６／０７９３７２号パンフレット、国際公開第０６／１２２７８６号パンフレット、国際公開第０６／１２２７８７号パンフレット、及び国際公開第０６／１２２８２５号パンフレット、並びにＡｂｌｙｎｘ　Ｎ．Ｖ．によるさらなる公開された特許出願。これらの出願において言及されたさらなる技術、特に国際公開第０６／０４０１５３号パンフレットの４１～４３頁で言及された参考文献のリスト（このリスト及び参考文献は参照により本明細書に援用したものとする）も参照される。これらの参考文献に記載されているように、ナノボディ（特に、ＶＨＨ配列及び部分的にヒト化されたナノボディ）は、特に、フレームワーク配列の１以上における１以上の「特徴残基」の存在によって特徴づけることができる。ナノボディ（ナノボディのヒト化及び／又はラクダ化を含む）、並びに他の改変、部分又は断片、誘導体又は「ナノボディ融合物」、多価構築物（リンカー配列のいくつかの非限定的な例を含む）並びにナノボディ及びその調製物の半減期を延長するための他の改変のさらなる説明は、例えば、国際公開第０８／１０１９８５号パンフレット及び国際公開第０８／１４２１６４号パンフレットに見出すことができる。ナノボディのさらなる一般的な記載については、国際公開第０８／０２００７９号パンフレット（１６頁、６１頁２４行～９８頁３行）を参照されたい。

【０１２７】

本開示の融合タンパク質の例示的なリンカー

本明細書で使用する場合の用語「リンカー」、「ペプチドリンカー」、「リンカードメイン」、及び「リンカー領域」（「Ｌ」と略される）は、ほとんど同義で使用され、本開示の融合タンパク質のポリペプチド（例えば、上記ｓｄＡｂ又はその機能的変異体、及び上記ＣＤタンパク質又はその機能的変異体）を一緒に連結する約１～１００アミノ酸長のオリゴペプチド又はポリペプチドの領域を指す。本開示の融合タンパク質は、１つ、又は複数のリンカーを含んでもよい。リンカーは、隣接するタンパク質ドメインが互いに対して自由に動けるように、グリシン及びセリンのような柔軟な残基から構成されていてもよい。いくつかの実施形態では、このリンカーは、１～２０、１～１５、１～１０又は１～９個のアミノ酸を含む。いくつかの実施形態では、リンカーは、１～９個のアミノ酸、例えば、１、２、３、４、５、６、７、８、又は９個のアミノ酸を含む。いくつかの実施形態では、リンカーは、約６～約３０アミノ酸長の範囲のペプチドである。これらの実施形態のいくつかの態様では、上記ペプチドリンカーは、例えば、少なくとも６、少なくとも７、少なくとも８、少なくとも９、少なくとも１０、少なくとも１１、少なくとも１２、少なくとも１３、少なくとも１４、少なくとも１５、少なくとも１６、少なくとも１７、少なくとも１８、少なくとも１９、少なくとも２０、少なくとも２１、少なくとも２２、少なくとも２３、少なくとも２４、少なくとも２５、少なくとも２６、少なくとも２７、少なくとも２８、少なくとも２９又は３０アミノ酸長であることができる。これらの実施形態の他の態様では、上記ペプチドリンカーは、例えば、多くとも６、多くとも７、多くとも８、多くとも９、多くとも１０、多くとも１１、多くとも１２、多くとも１３、多くとも１４、多くとも１５、多くとも１６、多くとも１７、多くとも１８、多くとも１９、多くとも２０、多くとも２１、多くとも２２、多くとも２３、多くとも２４、多くとも２５、多くとも２６、多くとも２７、多くとも２８、多くとも２９、又は多くとも３０アミノ酸長であることができる。これらの実施形態の他の態様では、上記ペプチドリンカーは、例えば、約６～約８、約６～約１０、約６～約１２、約６～約１４、約６～約１６、約６～約１８、約６～約２０、約６～約２２、約６～約２４、約６～約２６、約６～約２８、約６～約３０、約８～約１０、約８～約１２、約８～約１４、約８～約１６、約８～約１８、約８～約２０、約８～約２２、約８～約２４、約８～約２６、約８～約２８、約８～約３０、約１０～約１２、約１０～約１４、約１０～約１６、約１０～約１８、約１０～約２０、約１０～約２２、約１０～約２４、約１０～約２６、約１０～約２８、約１０～約３０、約１２～約１４、約１２～約１６、約１２～約１８、約１２～約２０、約１２～約２２、約１２～約２４、約１２～約２６、約１２～約２８、約１２～約３０、約１４

～約１６、約１４～約１８、約１４～約２０、約１４～約２２、約１４～約２４、約１４～約２６、約１４～約２８、約１４～約３０、約１６～約１８、約１６～約２０、約１６～約２２、約１６～約２４、約１６～約２６、約１６～約２８、約１６～約３０、約１８～約２０、約１８～約２２、約１８～約２４、約１８～約２６、約１８～約２８、約１８～約３０、約２０～約２２、約２０～約２４、約２０～約２６、約２０～約２８、約２０～約３０、約２２～約２４、約２２～約２６、約２２～約２８、約２２～約３０、約２４～約２６、約２４～約２８、約２４～約３０、約２６～約２８、約２６～約３０、又は約２６～約３０アミノ酸長であることができる。いくつかの実施形態では、リンカー領域は、１～５０個のアミノ酸を含む。

【０１２８】

上記リンカーは、天然アミノ酸又は非天然アミノ酸を含むことができる。いくつかの実施形態では、リンカーは、任意のアミノ酸、異なるアミノ酸の組み合わせ、又は同じアミノ酸を含む。このリンカーは、列状に１回以上又は他の配列と交互に一緒に連結された異なる種類のペプチド配列であってもよい。リンカーは、反復しているペプチド配列であってもよい。いくつかの実施形態では、ペプチド配列全体が１～５０回反復している。２つの隣接するドメインが互いに立体的に干渉しないことを確保することが望ましい場合、より長いリンカーが使用されてもよい。

【０１２９】

いくつかの実施形態では、リンカーは、（ＧＧＧＧＳ）ｎ（式中、ｎは１、２、３、４、５又は６である）（配列番号１）である。いくつかの実施形態では、リンカーは、ＧＳＧＧ（配列番号２）、ＧＧＧＧＳＧＧＧＧＳ（配列番号３）、及び／又は１以上のＧＳＧのうちの１以上である。いくつかの実施形態では、リンカーは、ＫＥＳＧＳＶＳＳＥＱＬＡＱＦＲＳＬＤ（配列番号４）又はＥＧＫＳＳＧＳＧＳＥＳＫＳＴ（配列番号５）である。いくつかの実施形態では、リンカーは、（ＧＧＧＧＳ）３（配列番号１８８）である。リンカーにおいて使用するための例示的なアミノ酸残基としては、グリシン、トレオニン、アルギニン、セリン、アラニン、アスパラギン、グルタミン、アスパラギン酸、プロリン、グルタミン酸、及び／又はリジンが挙げられる。融合タンパク質のために使用することができる他のリンカーの例は当該技術分野で周知であり、いくつかは、参照によりその全体を本明細書に援用したものとするＣｈｅｎ，Ｘ．ら、Ａｄｖ Ｄｒｕｇ Ｄｅｌｉｖ．Ｒｅｖ．２０１３年１０月１５日；６５（１０）：１３５７－１３６９に見出すことができる。本開示の融合タンパク質に好適なさらなるリンカーは、参照によりその全体を本明細書に援用したものとするＫｌｅｉｎら、Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｅｎｇ．Ｄｅｓ．Ｓｅｌ．２０１４年１０月；２７（１０）：３２５－３３０にも見出すことができる。

【０１３０】

いくつかの実施形態では、本開示の融合タンパク質は、ｓｄＡｂ又はその機能的変異体とＣＤタンパク質又はその機能的変異体との間に１つのリンカーを含む。いくつかの実施形態では、当該融合タンパク質は、ｓｄＡｂ又はその機能的変異体とＣＤタンパク質又はその機能的変異体との間に少なくとも１つのリンカーを含む。例えば、いくつかの態様では、当該融合タンパク質は、ｓｄＡｂ又はその機能的変異体とＣＤタンパク質又はその機能的変異体との間に２つのリンカーを含む。

【０１３１】

いくつかの実施形態では、ｓｄＡｂ又はその機能的変異体、及びＣＤタンパク質又はその機能的変異体は、（例えば、接続するリンカーを有さずに）直接融合される。

【０１３２】

本開示の融合タンパク質の例示的なシトシンデアミナーゼ（ＣＤ）タンパク質

シトシンデアミナーゼ（ＣＤ）は、比較的無害な５－フルオロシトシン（５－ＦＣ）プロドラッグを５－フルオロウラシル（５－ＦＵ）に変換することができる酵素であり、５－フルオロウラシル（５－ＦＵ）は、細胞毒性化合物であり、特に５－フルオロシトシン（５－ＦＣ）プロドラッグが５－フルオロウリジン５’－一リン酸（５－ＦｄＵＭＰ）に変換されるとき、細胞毒性である。従って、本開示の融合タンパク質は、本開示のｓｄＡ

ｂ又はその機能的変異体の標的を発現する細胞に結合することになり、当該融合タンパク質のＣＤタンパク質又はその機能的変異体は５－ＦＣを５－ＦＵへと変換し、これにより標的細胞を死滅させることになる。いくつかの実施形態では、標的細胞は癌細胞である。いくつかの実施形態では、標的細胞は、バイスタンダー効果を通して死滅する。Ａｎｔｉｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．１９９８年９～１０月；１８（５Ａ）：３３９９－４０６；Ａｍ Ｊ Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．２０１５；５（９）：２６８６－２６９６。

【０１３３】

いくつかの実施形態では、ＣＤ又はその機能的変異体は、酵母由来ＣＤ又はその機能的変異体であってもよい。いくつかの実施形態では、ＣＤ又はその機能的変異体は、細菌性ＣＤ又はその機能的変異体であってもよい。いくつかの実施形態では、ＣＤ又はその機能的変異体は、大腸菌由来シトシンデアミナーゼ又はその機能的変異体である。例えば、いくつかの実施形態では、ＣＤ又はその機能的変異体は、ＮＣＢＩ参照配列：ＮＰ＿４１４８７１．１によって表される大腸菌由来シトシンデアミナーゼである。いくつかの実施形態では、ＣＤ又はその機能的変異体は、ＧｅｎＢａｎｋ受入番号ＡＡＢ６７７１３．１によって表される酵母由来シトシンデアミナーゼである。それぞれの種の生物のＣＤをコードする、サッカロマイセス・セレビシエ（出芽酵母、Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ）のＦＣＹ１遺伝子及び大腸菌のｃｏｄａ遺伝子は公知であり、それらの配列は公開されている（欧州特許出願公開第４０２１０８号明細書；Ｅｒｂｓら、１９９７、Ｃｕｒｒ．Ｇｅｎｅｔ．３１、１－６；国際公開第９３／０１２８１号パンフレット）。

【０１３４】

ある実施形態では、上記ＣＤタンパク質又はその機能的変異体は、配列番号２１の配列を含む。ある実施形態では、上記ＣＤタンパク質又はその機能的変異体は、配列番号１８６の配列を含む。ある実施形態では、シトシンデアミナーゼに対応する配列は、１以上の変更を含む。いくつかの実施形態では、この変更は、野生型ＣＤの機能的変異体を生じる。好ましくは、ＣＤドメインにおける変更は、安定化変異である。例えば、いくつかの実施形態では、ＣＤの機能的変異体は、配列番号２１と比べてＡ２２Ｌ／Ｖ１０７Ｉ／Ｉ１３９Ｌを有する配列番号２２の配列を含む。いくつかの実施形態では、ＣＤの機能的変異体は、配列番号１８６と比べてＡ２３Ｌ／Ｖ１０８Ｉ／Ｉ１４０Ｌを有する配列番号１８７の配列を含む。

【０１３５】

本開示は、配列番号２１、配列番号２２、配列番号１８６又は配列番号１８７に少なくとも８０％、９０％、９５％、９８％又は９９％同一である配列を含むＣＤポリペプチドを含む融合タンパク質も提供し、このポリペプチドは、シトシンデアミナーゼ活性を有し、従って「機能的変異体」と呼ばれる。

【０１３６】

いくつかの実施形態では、ＣＤタンパク質の機能的変異体は、免疫原性を低減するための脱免疫化形態であることができる。ある実施形態では、上記ＣＤタンパク質又はその機能的変異体は、以下のＴ細胞エピトープに１以上の変異を含む。

【０１３７】

【表２】

エピトープ	HLA-DR 制限エピトープ	配列番号
エピトープ 4	YTTLSPCDM	66
エピトープ 5	MCTGAIIMY	67
エピトープ 6	VVVVDDERCKK	68

【０１３８】

ある実施形態では、上記ＣＤタンパク質又はその機能的変異体は、エピトープ４（配列番号６６）から改変された配列$X_1X_2X_3LSPCDX_4$（式中、X_1はＡ又はＨによ

って置換されてもよく、X_2はＤによって置換されてもよく、X_3はＥによって置換されてもよく、X_4はＮ、Ａ、Ｋ又はＱによって置換されてもよい）を含む。ある実施形態では、上記ＣＤタンパク質又はその機能的変異体は、エピトープ５（配列番号６７）から改変された配列X_1ＣＴＧＡＩＩＭＹ（式中、X_1はＮ、Ａ、Ｋ、又はＱによって置換されてもよい）を含む。ある実施形態では、上記ＣＤタンパク質又はその機能的変異体は、エピトープ６（配列番号６８）から改変された配列$X_1X_2X_3$ＶＤＤＥＲＣＫＫ（式中、X_1はＡ又はＴによって置換されてもよく、X_2はＡ、Ｌ、Ｉ又はＴによって置換されてもよく、X_3はＡ又はＴによって置換されてもよい）を含む。

【０１３９】

ある実施形態では、上記ＣＤタンパク質又はその機能的変異体は、エピトープ６（配列番号６８）から改変された配列X_1X_2ＶＶＤＤＥＲＣＫＫ（式中、X_1はＡによって置換されてもよく、X_2はＴによって置換されてもよい）を含む。

【０１４０】

いくつかの実施形態では、ＣＤ機能的変異体は、配列番号２１又は配列番号２２の変異体であり、この変異体は、Ｙ８４Ａ、Ｙ８４Ｈ、Ｔ８５Ｄ、Ｔ８６Ｅ、Ｍ９２Ｎ、Ｍ９２Ａ、Ｍ９２Ｋ、Ｍ９２Ｑ、Ｖ１２８Ａ、Ｖ１２８Ｔ、Ｖ１２９Ａ、Ｖ１２９Ｌ、Ｖ１２９Ｉ、Ｖ１２９Ｔ、Ｖ１３０Ａ、及びＶ１３０Ｔから選択される少なくとも１つの変異を含む。いくつかの実施形態では、ＣＤ機能的変異体は、配列番号１８６又は配列番号１８７の変異体であり、この変異体は、Ｙ８５Ａ、Ｙ８５Ｈ、Ｔ８６Ｄ、Ｔ８７Ｅ、Ｍ９３Ｎ、Ｍ９３Ａ、Ｍ９３Ｋ、Ｍ９３Ｑ、Ｖ１２９Ａ、Ｖ１２９Ｔ、Ｖ１３０Ａ、Ｖ１３０Ｌ、Ｖ１３０Ｉ、Ｖ１３０Ｔ、Ｖ１３１Ａ、及びＶ１３１Ｔから選択される少なくとも１つの変異を含む。

【０１４１】

ある実施形態では、上記ＣＤタンパク質の機能的変異体は、配列番号２２、配列番号１８７、配列番号１８９、配列番号１９０、配列番号１９１、配列番号１９２、配列番号１９３及び配列番号１９４からなる群から選択される。ある実施形態では、上記ＣＤタンパク質の機能的変異体は、配列番号２２、配列番号１８９、配列番号１９１及び配列番号１９３からなる群から選択される。

【０１４２】

シトシンデアミナーゼ活性を測定するためのアッセイは当該技術分野で公知である。例えば、シトシンデアミナーゼ活性は、５－ＦＣから５－ＦＵへの、又はシトシンからウラシルへの変換速度を決定することにより測定することができる。５－ＦＣ、５－ＦＵ、シトシン及びウラシルの検出は、実施例の節に記載される方法によって、クロマトグラフィーによって、及び／又は当該技術分野で公知の他の方法によって実施することができる。

【０１４３】

本開示の例示的な融合タンパク質

本開示は、後述するように、いくつかの融合タンパク質の例を提供する。

【０１４４】

本開示は、式（Ｉ）又は式（ＩＩ）を含む融合タンパク質を提供する。

Ｎ－（Ｌ）ｎ－Ｃ（式Ｉ）；

Ｃ－（Ｌ）ｎ－Ｎ（式ＩＩ）；

上記式中、Ｎは、シングルドメイン抗体（ｓｄＡｂ）又はその機能的変異体であり、Ｌはペプチドリンカーであり、ｎは０～５０であり、Ｃは、シトシンデアミナーゼ（ＣＤ）タンパク質又はその機能的変異体である。いくつかの実施形態では、当該融合タンパク質は、実質的に式Ｉからなる。いくつかの実施形態では、当該融合タンパク質は、式Ｉからなる。いくつかの実施形態では、当該融合タンパク質は、実質的に式ＩＩからなる。いくつかの実施形態では、当該融合タンパク質は式ＩＩからなる。

【０１４５】

いくつかの実施形態では、当該融合タンパク質は、式Ｉを含み、従って、上記ペプチドリンカーのＣ末端又は上記ｓｄＡｂ又はその機能的変異体のＣ末端は、上記ＣＤタンパク

質又はその機能的変異体のＮ末端に融合されている。例えば、いくつかの態様では、ペプチドリンカーは存在せず、上記ｓｄＡｂ又はその機能的変異体のＣ末端は、上記ＣＤタンパク質又はその機能的変異体のＮ末端に融合されている。いくつかの態様では、ペプチドリンカーは存在し、上記ｓｄＡｂ又はその機能的変異体のＣ末端はペプチドリンカーのＮ末端に融合されており、ペプチドリンカーのＣ末端は上記ＣＤタンパク質又はその機能的変異体のＮ末端に融合されている。

【０１４６】

他の実施形態では、当該融合タンパク質は、式ＩＩを含み、従って、上記ペプチドリンカーのＣ末端又は上記ＣＤタンパク質若しくはその機能的変異体のＣ末端は、上記ｓｄＡｂ又はその機能的変異体のＮ末端に融合されている。例えば、いくつかの態様では、ペプチドリンカーは存在せず、上記ＣＤタンパク質又はその機能的変異体のＣ末端は、上記ｓｄＡｂ又はその機能的変異体のＮ末端に融合されている。いくつかの態様では、ペプチドリンカーは存在し、上記ＣＤタンパク質又はその機能的変異体のＣ末端はペプチドリンカーのＮ末端に融合されており、ペプチドリンカーのＣ末端は上記ｓｄＡｂ又はその機能的変異体のＮ末端に融合されている。

【０１４７】

本開示は、本明細書に記載される標的抗原のいずれかが挙げられるがこれらに限定されない細胞外標的抗原に向けられたｓｄＡｂを含み、このｓｄＡｂが本明細書に記載されるシトシンデアミナーゼのいずれかに融合されている融合タンパク質も提供する。

【０１４８】

例えば、いくつかの実施形態では、当該融合タンパク質は、配列番号７、配列番号９、配列番号１１、配列番号１３、配列番号１５、配列番号１７のアミノ酸配列、又は上記の配列のうちのいずれかの配列のアミノ酸１～２９７を含む。いくつかの実施形態では、当該融合タンパク質は、実質的に、配列番号７、配列番号９、配列番号１１、配列番号１３、配列番号１５、配列番号１７のアミノ酸配列、又は上記の配列のうちのいずれかの配列のアミノ酸１～２９７からなる。いくつかの実施形態では、当該融合タンパク質は、配列番号７、配列番号９、配列番号１１、配列番号１３、配列番号１５、配列番号１７のアミノ酸配列、又は上記の配列のうちのいずれかの配列のアミノ酸１～２９７からなる。

【０１４９】

いくつかの実施形態では、当該融合タンパク質は、配列番号１７、配列番号１９及び配列番号９３～配列番号１８５からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、当該融合タンパク質は、実質的に、配列番号１７、配列番号１９及び配列番号９３～配列番号１８５からなる群から選択されるアミノ酸配列からなる。いくつかの実施形態では、当該融合タンパク質は、配列番号１７、配列番号１９及び配列番号９３～配列番号１８５からなる群から選択されるアミノ酸配列からなる。

【０１５０】

いくつかの実施形態では、当該融合タンパク質は、配列番号９３～配列番号１８１からなる群から選択されるアミノ酸配列のアミノ酸１～２９７を含む。いくつかの実施形態では、当該融合タンパク質は、実質的に、配列番号９３～配列番号１８１からなる群から選択されるアミノ酸配列のアミノ酸１～２９７からなる。いくつかの実施形態では、当該融合タンパク質は、配列番号９３～配列番号１８１からなる群から選択されるアミノ酸配列のアミノ酸１～２９７からなる。

【０１５１】

いくつかの実施形態では、当該融合タンパク質は、配列番号１９、配列番号１８２、配列番号１８３、配列番号１８４及び配列番号１８５からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、当該融合タンパク質は、実質的に、配列番号１９、配列番号１８２、配列番号１８３、配列番号１８４及び配列番号１８５からなる群から選択されるアミノ酸配列からなる。いくつかの実施形態では、当該融合タンパク質は、配列番号１９、配列番号１８２、配列番号１８３、配列番号１８４及び配列番号１８５からなる群から選択されるアミノ酸からなる。

【０１５２】
本開示は、複数のｓｄＡｂ若しくはその機能的変異体又はＣＤタンパク質若しくはその機能的変異体を含む融合タンパク質も提供する。例えば、当該融合タンパク質は、下記式ＩＩＩ又は式ＩＶを有してもよい。
Ｎ１－［（Ｌ１）$_{n}$－Ｎ２］$_{n1}$－（Ｌ２）$_{n}$－（Ｃ）－［（Ｌ３）$_{n}$－Ｃ］$_{n2}$（式ＩＩＩ）；
（Ｃ）－［（Ｌ１）$_{n}$－Ｃ］$_{n2}$－（Ｌ２）$_{n}$　Ｎ１－［（Ｌ３）$_{n}$－Ｎ２］$_{n1}$（式ＩＶ）；
上記式中、Ｎ１及びＮ２は、各々、ｓｄＡｂ又はその機能的変異体であり、Ｎ１及びＮ２は同じであるか又は異なるｓｄＡｂ若しくはその機能的変異体であってもよく、ｎ１は０～１０であり、Ｌ１、Ｌ２、及びＬ３は、各々、ペプチドリンカーであり、ｎは０～５０であり、Ｃは、シトシンデアミナーゼ（ＣＤ）タンパク質又はその機能的変異体であり、ｎ２は０～１０である。
【０１５３】
例えば、当該融合タンパク質は、下記式を有してもよい。
Ｎ１－Ｌ１－Ｎ２－Ｌ２－Ｃ；
Ｎ１－Ｌ１－Ｎ２－Ｌ２－Ｃ－Ｌ３－Ｃ；
Ｎ１－Ｎ２－Ｌ－Ｃ；
Ｎ１－Ｎ２－Ｌ－Ｃ；又は
Ｎ１－Ｌ１－Ｃ－Ｎ２－Ｌ２－Ｃ；
上記式中、Ｎ１及びＮ２は同じであってもよいし異なっていてもよく、Ｌ１、Ｌ２、及びＬ３のいずれも同じであってもよいし異なっていてもよい。
【０１５４】
いくつかの実施形態では、当該融合タンパク質は、２つの異なるｓｄＡｂ又はその機能的変異体を含む二価の融合タンパク質である（すなわち、当該融合タンパク質は２つの異なる標的又は同じ標的の中の２つの異なるエピトープに結合する）。いくつかの実施形態では、当該融合タンパク質は、一価の融合タンパク質である。
【０１５５】
本開示の融合タンパク質は、精製における容易さのために、部分、例えばペプチドタグとさらに融合することもできる。例えば、国際公開第９３／２１２３２号パンフレット；欧州特許出願公開第４３９，０９５号明細書；Ｎａｒａｍｕｒａら、Ｉｍｍｕｎｏｌ Ｌｅｔｔ ３９：９１（１９９４）；米国特許第５，４７４，９８１号明細書；Ｇｉｌｌｉｅｓら、Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ ＵＳＡ ８９：１４２８（１９９２）；及びＦｅｌｌら、Ｊ Ｉｍｍｕｎｏｌ １４６：２４４６（１９９１）を参照。いくつかの実施形態では、このペプチドタグはヒスチジン（ＨＩＳ）タグである。例えば、いくつかの実施形態では、ペプチドタグは、ヘキサヒスチジンペプチド（配列番号６）である。このヘキサヒスチジンタグは、ｐＱＥベクター（キアゲン（ＱＩＡＧＥＮ，Ｉｎｃ．）、チャッツワース（Ｃｈａｔｓｗｏｒｔｈ）、カリフォルニア州）、又は多くは市販されている別のベクターにおいて提供されるタグであってよい。Ｇｅｎｔｚら、Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ Ｓｃｉ ＵＳＡ ８６：８２１（１９８９）。精製のために有用な他のペプチドタグとしては、インフルエンザヘマグルチニンタンパク質由来のエピトープに対応する「ＨＡ」タグ（Ｗｉｌｓｏｎら、Ｃｅｌｌ ３７：７６７（１９８４））及び「ＦＬＡＧ（商標）」タグが挙げられるが、これらに限定されない。このペプチドタグは、当該融合タンパク質のＮ末端、当該融合タンパク質のＣ末端、又は当該融合タンパク質の機能ドメイン間（例えば、ｓｄＡｂとＣＤ又はその機能的変異体（複数可）との間）に位置することができる。ペプチドタグは、ペプチドリンカーによって当該融合タンパク質に連結されることが可能である。例えば、この融合タンパク質及びタグ（例えば、ＨＩＳタグ）を連結するペプチドリンカーはＧＳＳであってもよい。
【０１５６】
本開示は、例えば、細胞毒性部分／化学療法的部分及び／又は放射標識を含めた化学部

分に結合される融合タンパク質をさらに包含する。本開示の融合タンパク質との併用治療のための本明細書に記載される細胞傷害性薬物及び化学療法剤のいずれも、本開示の融合タンパク質に化学的に結合されてもよい。いくつかの実施形態では、この細胞傷害性薬物又は化学療法剤は、共有結合で当該融合タンパク質に結合される。いくつかの実施形態では、細胞傷害性薬物又は化学療法剤は、非共有結合で当該融合タンパク質に結合される。

【０１５７】

いくつかの実施形態では、細胞傷害性薬物又は化学療法剤への本開示の融合タンパク質の結合は、ジスルフィド基、チオエーテル基、酸解離性基、光解離性基、ペプチダーゼ解離性基、及びエステラーゼ解離性基からなる群から選択されるリンカーを介する。

【０１５８】

いくつかの実施形態では、本開示の融合タンパク質は、細胞傷害性薬物及び／又は細胞分裂抑制剤に結合される。これらの実施形態のいくつかの態様では、この細胞傷害性薬物及び／又は細胞分裂抑制剤は、当該融合タンパク質のｓｄＡｂ又はその機能的変異体に結合される。これらの実施形態のいくつかの態様では、細胞傷害性薬物及び／又は細胞分裂抑制剤は、当該融合タンパク質のＣＤタンパク質又はその機能的変異体に結合される。

【０１５９】

他の実施形態では、当該融合タンパク質は、サイトカイン、超抗原及び／又は毒素に（化学的に若しくは遺伝子的に）結合又は連結される。

【０１６０】

いくつかの実施形態では、当該融合タンパク質の半減期を含めた当該融合タンパク質の薬物動態は、ポリ（アルキレン）グリコールの付加、例えばポリ（エチレン）グリコールの付加（「ペグ化」）、ポリＰＥＧ、ＰＡＳ化（ＰＡＳｙｌａｔｉｏｎ）等の化学修飾により、又はリポソームへの組み込みにより改善することができる。いくつかの実施形態では、当該融合タンパク質（例えば、上記ｓｄＡｂ又はその機能的変異体）は、ペグ化を可能にし、かつ／又はペグ化を容易にする１以上のさらなるアミノ酸残基（例えば、ＰＥＧ基を容易に取り付けるためのさらなるシステイン残基）を含む。いくつかの実施形態では、当該融合タンパク質の半減期は、ポリシアル酸（ＰＳＡ）、ヒドロキシエチルデンプン（ＨＥＳ）、アルブミン結合リガンド又は炭水化物シールドを当該融合タンパク質に取り付けることにより、アルブミン、ＩｇＧ、ＦｃＲｎ、及び／若しくはトランスフェリン等の血清タンパク質に結合するタンパク質への遺伝子融合により、アルブミン若しくはアルブミンのドメインへの、若しくはアルブミン結合タンパク質への遺伝子融合により、又はナノ担体、徐放処方物若しくは医療装置への当該融合タンパク質の組み込みにより、延長される。

【０１６１】

いくつかの実施形態では、当該融合タンパク質は、グリコシル化、アセチル化、リン酸化、アミド化、公知の保護基／ブロック基による誘導体化、及び／又はタンパク質分解性切断によって修飾することができる。これらの修飾は、特異的な化学的切断、アセチル化、ホルミル化、及び当該技術分野で公知の他の技法が挙げられるが、これらに限定されない公知の技法によって実施されてもよい。加えて、当該融合タンパク質は、１以上の非古典的なアミノ酸を含んでもよい。

【０１６２】

例えば診断又はアッセイ目的（例えば、治療の監視又は当該融合タンパク質の分布の追跡を可能にするためのイメージング等）のいくつかの実施形態では、当該融合タンパク質は、検出可能な標識を含むことができる。好適な検出可能な標識及びタンパク質を標識する方法は、当該技術分野で周知である。好適な検出可能な標識としては、例えば、放射性同位体（例えば、インジウム－１１１、テクネチウム－９９ｍ又はヨウ素－１３１）、陽電子放出性標識（例えば、フッ素－１９）、常磁性イオン（例えば、ガドリニウム（ＩＩＩ）、マンガン（ＩＩ））、エピトープ標識（タグ）、親和性標識（例えば、ビオチン、アビジン）、スピン標識、酵素、蛍光性基、又は化学発光性基が挙げられる。標識が用いられない場合、（例えば、当該融合タンパク質と標的との間の）複合体形成は、表面プラ

スモン共鳴、ＥＬＩＳＡ、ＦＡＣＳ、又は当該技術分野で公知の他の好適な方法によって判定することができる。

【０１６３】

本開示のタンパク質をコードする核酸

ｓｄＡｂｓ、リンカー、ＣＤタンパク質、ｓｄＡｂ及び／若しくはＣＤタンパク質の機能的変異体、融合タンパク質、又は本明細書に記載される上記のもののいずれかの機能的等価物をコードするヌクレオチド配列を含めた核酸は、バクテリア細胞（菌体）等の適切な宿主細胞中での本開示の融合タンパク質の発現を導く組換えＤＮＡ分子において使用される。本明細書で使用する場合、用語「核酸分子」又は「ポリヌクレオチド」は、ＤＮＡ分子（例えば、ｃＤＮＡ又はゲノムＤＮＡ）及びＲＮＡ分子（例えば、ｍＲＮＡ）並びにヌクレオチドアナログを使用して生成されるＤＮＡ又はＲＮＡのアナログを包含することが意図されている。核酸分子は、一本鎖又は二本鎖であることができる。

【０１６４】

いくつかの態様では、本開示は、シトシンデアミナーゼ若しくは変異体（ミュータント）シトシンデアミナーゼポリペプチド又はそれらの生物活性部分をコードするポリヌクレオチド、ｓｄＡｂ又はその生物活性変異体をコードするポリヌクレオチド、本開示の１以上のリンカーをコードするポリヌクレオチド、及び本開示の融合タンパク質をコードするポリヌクレオチドに関する。

【０１６５】

いくつかの実施形態では、ＣＤ又はその機能的変異体をコードするポリヌクレオチドは、コドン最適化ポリヌクレオチドである。いくつかの実施形態では、ＣＤポリヌクレオチド又はコドン最適化ポリヌクレオチドは、生物、例えば細菌株又は酵母株から単離された天然に存在する核酸の組換え体、遺伝子操作された形態、又は単離された形態を含む。例示的なＣＤポリヌクレオチドとしては、配列番号２１、配列番号２２、配列番号１８６又は配列番号１８７に示されるポリペプチドをコードするポリヌクレオチドが挙げられる。本開示の実施例で使用される核酸は、実施形態の範囲内にある。

【０１６６】

いくつかの実施形態では、ＣＤ又はｓｄＡｂポリヌクレオチド（コドン最適化ポリヌクレオチドを含む）は、１以上の天然に存在するか、単離されたか、若しくは組換えのＣＤ又はｓｄＡｂポリヌクレオチド配列を多様化すること、例えば、組み換える及び／又は変異させることにより生成される。本明細書中の他所により詳細に記載されるように、優れた機能的特質、例えば、多様化プロセスにおいて基質又は親として使用される未修飾のＣＤ又はｓｄＡｂポリヌクレオチドよりも向上した触媒機能、向上した安定性、又は高い発現レベルを有する、ＣＤ又はｓｄＡｂポリペプチド（例えば、ＣＤ又はｓｄＡｂの機能的変異体）をコードする多様なＣＤ又はｓｄＡｂポリヌクレオチドを生成することが可能である。遺伝コードの縮重に起因して、実質的に同じ又は機能的に等価なアミノ酸配列をコードする種々の核酸配列を、本開示の融合タンパク質をクローニング及び／又は発現するために使用することができる。

【０１６７】

本開示のポリヌクレオチドは、例えば、本開示の融合タンパク質の組換え体産生（すなわち、発現）並びにさらなる多様性生成、例えば、新しい及び／又は改善された変異体等を生成するための再結合反応又は変異反応、のための基質として様々な用途を有する。

【０１６８】

本開示のＣＤ及びシングルドメイン抗体ポリヌクレオチドの特定の特異的な、実質的な、及び信頼性が高い有用性のため、そのポリヌクレオチドが、実質的なＣＤ活性、又はさらには変異体ＣＤ活性、又はｓｄＡｂ活性（例えば、標的結合）を有するポリペプチドをコードすることを必要としない。例えば、活性酵素をコードしないＣＤポリヌクレオチドは、望ましい機能特性（例えば、高ｋｃａｔ又はｋｃａｔ／Ｋｍ、低Ｋｍ、熱又は他の環境因子に対する高い安定性、高い転写又は翻訳の速度、タンパク質分解性切断に対する抵抗性、高められた抗原結合、高められた抗原特異性、低下した免疫原性）を持つＣＤポリ

ヌクレオチド変異体、又は非ＣＤポリヌクレオチドに到達するための多様化手順において使用するための親ポリヌクレオチドの貴重な供給源であることができる。

【０１６９】

いくつかの実施形態では、ｓｄＡｂ又はその機能的変異体をコードするポリヌクレオチドは、コドン最適化ポリヌクレオチドである。いくつかの実施形態では、ｓｄＡｂポリヌクレオチド又はｓｄＡｂコドン最適化ポリヌクレオチドは、生物、例えば、ヒトコブラクダ、ラクダ、ラマ、アルパカ又はサメから単離された天然に存在する核酸の組換え体、遺伝子操作された形態、又は単離された形態を含む。

【０１７０】

本開示の融合タンパク質をコードする例示的なポリヌクレオチドとしては、配列番号８、配列番号１０、配列番号１２、配列番号１４、配列番号１６、配列番号１８、配列番号２０及び配列番号１９５～配列番号１９８に示されるポリヌクレオチドが挙げられる。

【０１７１】

本明細書で使用する場合の用語「宿主細胞」は、核酸構築物を用いた形質転換を受けやすい任意の細胞を含む。用語「形質転換」は、宿主細胞が導入された遺伝子又は配列を発現して所望の物質、典型的にはその導入された遺伝子又は配列によってコードされるタンパク質又は酵素を産生するように、外来の（すなわち、外因性又は細胞外の）遺伝子、ＤＮＡ又はＲＮＡ配列を宿主細胞に導入することを意味する。導入された遺伝子又は配列は、開始、終止、プロモーター、シグナル、分泌、又は細胞の遺伝機構によって使用される他の配列等の調節配列又は制御配列を含んでもよい。導入されたＤＮＡ又はＲＮＡを受け取り発現する宿主細胞は、「形質転換されて」おり、「形質転換体」又は「クローン」である。宿主細胞に導入されるＤＮＡ又はＲＮＡは、宿主細胞と同じ属若しくは種の細胞、又は異なる属若しくは種の細胞、又は遺伝子合成による等、任意の供給源に由来することができる。

【０１７２】

用語「コドン最適化配列」は、一般に、約２０％未満の使用頻度を有する任意のコドンを置換することにより特定の宿主種について最適化されているヌクレオチド配列を指す。例えば、偽性ポリアデニル化配列の除去、エクソン／イントロンスプライシングシグナルの除去、トランスポゾン様リピートの除去、及び／又はＧＣ含有量の最適化をコドン最適化に加えて行うことにより所与の宿主種における発現について最適化されているヌクレオチド配列は、本明細書中では、「発現増強配列」と呼ばれる。

【０１７３】

本開示は、開示されたＣＤタンパク質若しくはその機能的変異体、ｓｄＡｂ若しくはその機能的変異体、リンカー、及び／又は融合タンパク質をコードする１以上の核酸配列を含むベクターをさらに提供する。このベクターは、例えば、プラスミド、エピソーム、コスミド、ウイルスベクター（例えば、レトロウイルス若しくはアデノウイルス）、又はファージであることができる。好適なベクター及びベクター調製方法は当該技術分野で周知である（例えば、Ｓａｍｂｒｏｏｋら、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ，ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ、第４版、Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｐｒｅｓｓ、Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ、Ｎ．Ｙ．（２０１２）、及びＡｕｓｕｂｅｌら、Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ、Ｇｒｅｅｎｅ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ Ａｓｓｏｃｉａｔｅｓ及びＪｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ＆ Ｓｏｎｓ、Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ、Ｎ．Ｙ．（１９９４年、及びオンラインで利用できる更新された章）を参照）。

【０１７４】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示される１以上のアミノ酸配列をコードする１以上の核酸を含むベクターは、それによりコードされるポリペプチド／タンパク質を発現することができる宿主細胞（任意の好適な原核細胞又は真核細胞を含む）に導入されてよい。従って、本開示は、開示されたベクターを含む細胞（単離された細胞を含む）を提供する。好ましい宿主細胞は、容易にかつ信頼性高く成長することができ、妥当に大きい成

長速度を有し、十分に特徴づけられた発現系を有し、容易にかつ効率よく形質転換又はトランスフェクションすることができる宿主細胞である。

【０１７５】

好適な原核宿主細胞の例としては、バチルス（Ｂａｃｉｌｌｕｓ）属（例えば、バチルス・スブチリス（枯草菌、Ｂａｃｉｌｌｕｓ ｓｕｂｔｉｌｉｓ）及びバチルス・ブレビス（Ｂａｃｉｌｌｕｓ ｂｒｅｖｉｓ）、エシェリキア（Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ）属（例えば、大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ））、シュードモナス（Ｐｓｅｕｄｏｍｏｎａｓ）属，ストレプトマイセス（Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ）属、サルモネラ（Ｓａｌｍｏｎｅｌｌａ）属、及びエルウィニア（Ｅｒｗｉｎｉａ）属由来の細胞が挙げられるが、これらに限定されない。さらなる好適な原核宿主細胞としては、大腸菌（Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ ｃｏｌｉ）の種々の菌株（例えば、Ｋ１２、ＨＢ１０１（ＡＴＣＣ番号３３６９４）、ＤＨ５、ＤＨ１０、ＭＣ１０６１（ＡＴＣＣ番号５３３３８）、及びＣＣ１０２）が挙げられる。いくつかの実施形態では、宿主細胞は、Ｔｕｎｅｒ（商標）（ノバジェン（Ｎｏｖａｇｅｎ））、ＡＤ４９４（ノバジェン（Ｎｏｖａｇｅｎ））、ＨＭＳ１７４（ノバジェン（Ｎｏｖａｇｅｎ））、ＮｏｖａＢｌｕｅ（ノバジェン（Ｎｏｖａｇｅｎ））、ＢＬＲ（ノバジェン（Ｎｏｖａｇｅｎ））、Ｃ４１（ルシジェン（Ｌｕｃｉｇｅｎ））、Ｃ４３（ルシジェン（Ｌｕｃｉｇｅｎ））、Ｌｅｍｏ２１（ＮＥＢ）、ＮｉＣｏ２１（ＮＥＢ）、ＢＬ２１、ＢＬ２１（ＤＥ３）、又はＴ７ Ｅｘｐｒｅｓｓ（ＮＥＢ）である。

【０１７６】

いくつかの実施形態では、宿主細胞は、ジスルフィド結合形成のための細胞質内環境を提供する大腸菌株である。例えば、この細胞質内環境は、チオレドキシン経路及び／若しくはグルタチオン経路を最適化することにより、並びに／又は細胞質ジスルフィド結合イソメラーゼを発現することにより成し遂げられる。いくつかの実施形態では、宿主細胞は、細胞質ジスルフィド結合イソメラーゼ（例えば、ＤｓｂＣ）の染色体コピーを構成的に発現する大腸菌株である。いくつかの実施形態では、原核宿主細胞は、ＳＨｕｆｆｌｅ（登録商標）Ｅｘｐｒｅｓｓ（ＮＥＢ番号Ｃ３０２８）細胞（ニューイングランドバイオラボ（Ｎｅｗ Ｅｎｇｌａｎｄ Ｂｉｏｌａｂｓ））である。いくつかの実施形態では、原核宿主細胞は、ＳＨｕｆｆｌｅ（登録商標）Ｔ７（ＮＥＢ番号Ｃ３０２６）又はＳＨｕｆｆｌｅ（登録商標）Ｅｘｐｒｅｓｓ Ｔ７ ＬｙｓＹ（ＮＥＢ番号Ｃ３０３０）細胞である。ＳＨｕｆｆｌｅ（登録商標）は、ジスルフィド結合が細胞質中で形成されるのを可能にするグルタレドキシンレダクターゼ及びチオレドキシンレダクターゼについての遺伝子の欠失を有する（ΔｇｏｒΔｔｒｘＢ）。この変異の組み合わせは、通常は致死的であるが、致死性は、ペルオキシレドキシン酵素（ａｈｐＣ＊）をコードする遺伝子における変異によって抑制されている。加えて、ＳＨｕｆｆｌｅ（登録商標）は、そのシグナル配列を欠くペリプラズム（周辺質）ジスルフィド結合イソメラーゼＤｓｂＣのバージョンを発現し、ＤｓｂＣを細胞質に保持する。この酵素は、複数のジスルフィド結合を有するタンパク質に対して作用して、誤って酸化された結合を修正し適正なフォールディングを促進することが示されている。これらの特性（例えば、ジスルフィド結合形成のための細胞質内環境を提供すること）を有する他の細胞株はいずれも、本開示の化合物を調製するために使用することができる。いくつかの実施形態では、原核宿主細胞はＯｒｉｇａｍｉ（商標）又はＲｏｓｅｔｔａ－ｇａｍｉ（商標）である。

【０１７７】

酵母真核生物発現系の例としては、サッカロマイセス（酵母菌属、Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ）属、ピキア（Ｐｉｃｈｉａ）属、クリベロマイセス（Ｋｌｕｙｖｅｒｏｍｙｃｅｓ）属、ハンゼヌラ（Ｈａｎｓｅｎｕｌａ）属、及びヤロウイア（Ｙａｒｒｏｗｉａ）属が挙げられるが、これらに限定されない。

【０１７８】

好適な昆虫宿主細胞は、例えば、Ｋｉｔｔｓら、Ｂｉｏｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ、１４：８１０－８１７（１９９３）；Ｌｕｃｋｌｏｗ、Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．、４：５６４－５７２（１９９３）；及びＬｕｃｋｌｏｗら、Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．、

６７：４５６６－４５７９（１９９３）に記載されている。例示的な昆虫宿主細胞としては、Ｓｆ－９及びＨＩ５（インビトロジェン（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）、カールスバッド（Ｃａｒｌｓｂａｄ）、カリフォルニア州）が挙げられる。

【０１７９】

インビトロタンパク質発現の例としては、大腸菌溶解液、ウサギ網状赤血球細胞溶解液（ＲＲＬ）、コムギ胚芽エキス、及び昆虫細胞溶解液（ＳＦ９又はＳＦ２１溶解液等）が挙げられるが、これらに限定されない。無細胞発現系は、タンパク質合成が培養細胞内ではなく細胞可溶化物中で起こる組換えタンパク質の産生である。無細胞発現系は、より高速の産生速度等の従来のインビボ方法を補完するいくつかの利点及び特徴をもたらすことができる。というのも、無細胞発現系は、遺伝子トランスフェクション、細胞培養、又は入念なタンパク質精製を必要としないからである。

【０１８０】

他の薬物を用いる併用治療

本開示の融合タンパク質は、単独で、又は他の薬物と組み合わせて（例えば、アジュバント（佐剤）として）投与することができる。例えば、多くの化学療法薬、とりわけ抗悪性腫瘍薬、は、本開示の融合タンパク質との組み合わせのために利用できる。ほとんどの化学療法薬は、アルキル化剤、代謝拮抗薬、アントラサイクリン、植物アルカロイド、トポイソメラーゼ阻害剤、抗体、及び他の抗腫瘍薬に分類することができる。

【０１８１】

本明細書で使用する場合、補助投与又は併用投与（同時投与）は、同じ剤形又は異なる剤形における融合タンパク質及び別の薬物の同時の投与、又は融合タンパク質及び別の薬物の別個の投与（例えば、連続投与）を含む。

【０１８２】

ある実施形態では、本開示の融合タンパク質は、ＤＮＡを傷害するか又はＤＮＡ修復を妨害する抗悪性腫瘍薬と同時投与される。いくつかの実施形態では、本開示の融合タンパク質及び抗悪性腫瘍薬は相乗的に作用する。いくつかの実施形態では、本開示の融合タンパク質は、抗悪性腫瘍薬に対する細胞の感受性を、例えば、少なくとも１０％、１５％、２０％、２５％、３０％、３５％、４０％、４５％又は５０％高める。ＤＮＡを傷害するか又はＤＮＡ修復を阻害する抗悪性腫瘍薬の非限定的な例としては、カルボプラチン、カルムスチン、クロラムブシル、シスプラチン、シクロホスファミド、ダカルバジン、ダウノルビシン、ドキソルビシン、エピルビシン、イダルビシン、イホスファミド、ロムスチン、メクロレタミン、ミトキサントロン、オキサリプラチン、プロカルバジン、テモゾロミド、及びバルルビシンが挙げられる。いくつかの実施形態では、抗悪性腫瘍薬は、神経膠芽腫に対して一般に使用されるＤＮＡ傷害性のアルキル化剤であるテモゾロミドである。いくつかの実施形態では、抗悪性腫瘍薬は、ＤＮＡ損傷の塩基除去修復における工程を阻害するＰＡＲＰ阻害剤（例えば、ＫＵ００５８９４８、ＡＢＴ－８８８（ベリパリブ）、オラパリブ、ＫＵ－５９４３６、ＡＺＤ－２２８１、ＡＧ－０１４６９９、ＢＳＩ－２０１、ＢＧＰ－１５、ＩＮＯ－１００１、ＯＮＯ－２２３１）である。いくつかの実施形態では、抗悪性腫瘍薬は、転写レベルでＤＮＡ修復を抑制しクロマチン構造を崩壊させるヒストンデアセチラーゼ阻害剤（例えば、ボリノスタット；ロミデプシン；チダミド（ｃｈｉｄａｍｉｄｅ）；パノビノスタット；バルプロ酸；ベリノスタット；モセチノスタット；アベキシノスタット；エンチノスタット；ＳＢ９３９（プラシノスタット（ｐｒａｃｉｎｏｓｔａｔ））；レスミノスタット；ギビノスタット；キシノスタット；チオウレイドブチロニトリル（Ｋｅｖｅｔｒｉｎ（商標））；ＣＵＤＣ－１０；ＣＨＲ－２８４５（テフィノスタット）；ＣＨＲ－３９９６；４ＳＣ－２０２；ＣＧ２００７４５；ＡＣＹ－１２１５（ロシリノスタット（ｒｏｃｉｌｉｎｏｓｔａｔ））；ＭＥ－３４４；スルホラファン）である。いくつかの実施形態では、抗悪性腫瘍薬は、細胞においてユビキチン代謝を崩壊させることによりＤＮＡ修復を抑制するプロテアソーム阻害剤（例えば、ボルテゾミブ；カルフィルゾミブ；エポキソミシン；イキサゾミブ；サリノスポラミドＡ）である。ユビキチンは、ＤＮＡ修復を調節するシグナル伝達分子である。いくつかの実施形態

では、抗悪性腫瘍薬は、ＤＮＡ損傷応答シグナル伝達経路を変化させることによりＤＮＡ修復を抑制する、キナーゼ阻害剤（例えば、ＡＴＭ阻害剤（ＣＰ４６６７２２又はＫＵ－５５９３３）；ＣＨＫ１阻害剤（ＸＬ－８４４、ＵＣＮ－０１、ＡＺＤ７７６２又はＰＦ００４７７７３６）、又はＣＨＫ２阻害剤（ＸＬ－８４４、ＡＺＤ７７６２、又はＰＦ００４７７７３６））である。

【０１８３】

本開示の融合タンパク質と組み合わせることができる抗悪性腫瘍薬のさらなる例としては、アルキル化剤（例えばテモゾロミド、シスプラチン、カルボプラチン、オキサリプラチン、メクロレタミン、シクロホスファミド、クロラムブシル、ダカルバジン、ロムスチン、カルムスチン、プロカルバジン、クロラムブシル及びイホスファミド）、代謝拮抗薬（例えばゲムシタビン、メトトレキサート、シトシンアラビノシド、フルダラビン、及びフロクスウリジン）、有糸分裂阻害薬、ビンカアルカロイド（ビンクリスチン、ビンブラスチン、ビノレルビン、及びビンデシン等）、アントラサイクリン（ドキソルビシン、ダウノルビシン、バルルビシン、イダルビシン、及びエピルビシン、並びにアクチノマイシンＤ等のアクチノマイシン類を含む）、細胞毒性抗生物質（マイトマイシン、プリカマイシン及びブレオマイシン等）、並びにトポイソメラーゼ阻害剤（トポテカン等のカンプトテシン、並びにアムサクリン、エトポシド、エトポシドリン酸塩及びテニポシド等のエピポドフィロトキシンの誘導体を含む）が挙げられるが、これらに限定されない。

【０１８４】

本開示の融合タンパク質と組み合わせて投与されてもよい他の化学療法剤の例としては、チオテパ及びシクロホスファミド等のアルキル化剤；ブスルファン、インプロスルファン、及びピポスルファン等のアルキルスルホネート；ベンゾドーパ、カルボコン、メツレドーパ（ｍｅｔｕｒｅｄｏｐａ）、及びウレドーパ（ｕｒｅｄｏｐａ）等のアジリジン類；アルトレタミン、トリエチレンメラミン、トリエチレンホスホルアミド、トリエチレンチオホスホルアミド及びトリメチロールメラミンを含むエチレンイミン類及びメチルメラミン類；アセトゲニン類（例えば、ブラタシン及びブラタシノン）；δ－９－テトラヒドロカンナビノール（ドロナビノール）；β－ラパコン；ラパコール；コルヒチン；ベツリン酸；カンプトテシン（合成アナログトポテカン（ＣＰＴ－１１（イリノテカン）、アセチルカンプトテシン、スコポレチン（ｓｃｏｐｏｌｅｃｔｉｎ）、及び９－アミノカンプトテシンを含む）；ブリオスタチン；ペメトレキセド；カリスタチン（ｃａｌｌｙｓｔａｔｉｎ）；ＣＣ－１０６５（そのアドゼレシン、カルゼルシン、及びビセレシン合成アナログを含む）；ポドフィロトキシン；ポドフィリン酸；テニポシド；クリプトフィシン類（例えば、クリプトフィシン（ｃｒｙｐｔｏｐｈｙａｎ）１及びクリプトフィシン８）；ドラスタチン；デュオカルマイシン（合成アナログ、ＫＷ－２１８９及びＣＢ１－ＴＭ１を含む）、エリュテロビン；パンクラチスタチン；ＴＬＫ－２８６；ＣＤＰ３２３、経口用α－４インテグリン阻害剤；サルコジクチイン（ｓａｒｃｏｄｉｃｔｙｉｎ）；スポンジスタチン；クロラムブシル、クロマファジン（ｃｈｌｏｍａｐｈａｚｉｎｅ）、コロホスファミド（ｃｈｏｌｏｐｈｏｓｐｈａｍｉｄｅ）、エストラムスチン、イホスファミド、メクロレタミン、メクロレタミンオキシド塩酸塩、メルファラン、ノボエンビキン（ｎｏｖｅｍｂｉｃｈｉｎ）、フェネステリン（ｐｈｅｎｅｓｔｅｒｉｎｅ）、プレドニムスチン、トロホスファミド、及びウラシルマスタード等のナイトロジェンマスタード；カルムスチン、クロロゾトシン、ホテムスチン、ロムスチン、ニムスチン、及びラニムスチン等のニトロソウレア；エンジイン型抗生物質（例えば、カリケアマイシン、とりわけカリケアマイシンガンマｌｌ、及びカリケアマイシンオメガｌｌ（例えば、Ｎｉｃｏｌａｏｕら、Ａｎｇｅｗ．Ｃｈｅｍ　Ｉｎｔｌ．Ｅｄ．Ｅｎｇｌ．、３３：１８３－１８６（１９９４）を参照）；ダイナミクスＡを含むダイネマイシン（ｄｙｎｅｍｉｃｉｎ）；エスペラミシン；ネオカルジノスタチンクロモフォア及び関連する色素タンパク質エンジイン型抗生物質クロモフォア；アクラシノマイシン類；アクチノマイシン；アントラマイシン；アザセリン；ブレオマイシン；カクチノマイシン；カラビシン（ｃａｒａｂｉｃｉｎ）；カルミノマイシン；カルジノフィリン；クロモマイシン（ｃｈｒｏｍｏｍｙｃｉｎｉｓ）

；ダクチノマイシン；ダウノルビシン；デトルビシン（ｄｅｔｏｒｕｂｉｃｉｎ）；６－ジアゾ－５－オキソ－Ｌ－ノルロイシン；ドキソルビシン（モルホリノ－ドキソルビシン、シアノモルホリノ－ドキソルビシン、２－ピロリノ－ドキソルビシン、ドキソルビシンＨＣｌリポソーム注射剤及びデオキシドキソルビシンを含む）；エピルビシン；エソルビシン；イダルビシン；マルセロマイシン；マイトマイシンＣ等のマイトマイシン類、ミコフェノール酸、ノガラマイシン、オリボマイシン、ペプロマイシン、ポトフィロマイシン（ｐｏｔｆｉｒｏｍｙｃｉｎ）、ピューロマイシン、グエラマイシン（ｇｕｅｌａｍｙｃｉｎ）、ロドルビシン（ｒｏｄｏｒｕｂｉｃｉｎ）、ストレプトニグリン、ストレプトゾシン、ツベルシジン、ウベニメクス、ジノスタチン、及びゾルビシン等の抗生物質；メトトレキサート、ゲムシタビン、テガフール、カペシタビン、エポチロン及び５－フルオロウラシル（５－ＦＵ）等の代謝拮抗薬；デノプテリン、メトトレキサート、プテロプテリン、及びトリメトレキサート等の葉酸アナログ；フルダラビン、６－メルカプトプリン、チアミプリン、及びチオグアニン等のプリンアナログ；アンシタビン、アザシチジン、６－アザウリジン、カルモフール、シタラビン、ジデオキシウリジン、ドキシフルリジン、エノシタビン、フロクスウリジン、及びイマチニブ（２－フェニルアミノピリミジン誘導体）、並びに他のｃ－Ｋｉｔ阻害剤等のピリミジンアナログ；アミノグルテチミド、ミトタン、トリロスタン等の副腎阻害薬（ａｎｔｉ－ａｄｒｅｎａｌ）；フォリン酸（ｆｒｏｌｉｎｉｃ　ａｃｉｄ）等の葉酸補充薬；アセグラトン；アルドホスファミドグリコシド；アミノレブリン酸；エニルウラシル；アムサクリン；ベストラブシル；ビスアントレン；エダトレキサート；デフォファミン（ｄｅｆｏｆａｍｉｎｅ）；デメコルチン；ジアジコン；エルフォミチン（ｅｌｆｏｍｉｔｈｉｎｅ）；エリプチニウム酢酸塩；エトグルシド；硝酸ガリウム；ヒドロキシ尿素；レンチナン；ロニダイニン（ｌｏｎｉｄａｉｎｉｎｅ）；マイタンシン及びアンサミトシン等のマイタンシノイド；ミトグアゾン；ミトキサントロン；モピダモール；ニトラエリン（ｎｉｔｒａｅｒｉｎｅ）；ペントスタチン；フェナメット（ｐｈｅｎａｍｅｔ）；ピラルビシン；ロソキサントロン；２－エチルヒドラジド；プロカルバジン；ＰＳＫ．ＲＴＭ．多糖複合体（ＪＨＳ　Ｎａｔｕｒａｌ　Ｐｒｏｄｕｃｔｓ、ユージーン（Ｅｕｇｅｎｅ）、オレゴン州）；ラゾキサン；リゾキシン；シゾフィラン；スピロゲルマニウム；テヌアゾン酸、トリアジコン；２，２，２－トリクロロテチルアミン（ｔｒｉｃｈｌｏｒｏｔｈｅｔｈｙｌａｍｉｎｅ）；トリコテセン（例えば、Ｔ－２毒素、ベラクリンＡ（ｖｅｒｒａｃｕｒｉｎ　Ａ）、ロリジンＡ、及びアングイジン）；ウレタン；ビンデシン；ダカルバジン；マンノムスチン；ミトブロニトール；ミトラクトール；ピポブロマン；ガシトシン（ｇａｃｙｔｏｓｉｎｅ）；アラビノシド（「Ａｒａ－Ｃ」）；チオテパ；タキソイド、例えば、パクリタキセル、パクリタキセルのアルブミン処理（ａｌｂｕｍｉｎ－ｅｎｇｉｎｅｅｒｅｄ）ナノ粒子処方物、及びドセタキセル；クロラムブシル（ｃｈｌｏｒａｎｂｕｃｉｌ）；６－チオグアニン；メルカプトプリン；メトトレキサート；シスプラチン及びカルボプラチン等の白金アナログ；ビンブラスチン；白金；エトポシド（ＶＰ－１６）；イホスファミド；ミトキサントロン；ビンクリスチン；オキサリプラチン；ロイコボリン（ｌｅｕｃｏｖｏｖｉｎ）；ビノレルビン；ノバントロン；エダトレキサート；ダウノマイシン；アミノプテリン；イバンドロン酸；トポイソメラーゼ阻害剤ＲＦＳ２０００；ジフルオロメチルオルニチン（ｄｉｆｌｕｏｒｏｍｅｔｈｙｌｏｍｉｔｈｉｎｅ）（ＤＭＦＯ）；レチノイン酸等のレチノイド；上記の化学療法剤のうちのいずれかの薬学的に許容できる塩、酸又は誘導体；並びにシクロホスファミド、ドキソルビシン、ビンクリスチン及びプレドニゾロンの併用療法の略語であるＣＨＯＰ、並びに５－ＦＵ及びロイコボリン（ｌｅｕｃｏｖｏｖｉｎ）と組み合わせたオキサリプラチンを用いる治療レジメンの略号であるＦＯＬＦＯＸ等の上記のもののうちの２以上の化学療法剤の組み合わせが挙げられる。本開示の融合タンパク質と組み合わせて使用されてもよい他の治療薬としては、クロドロン酸、ＮＥ－５８０９５、ゾレドロン酸／ゾレドロネート、アレンドロン酸、パミドロン酸、チルドロン酸、又はリセドロン酸等のビスホスホネート類；並びにトロキサシタビン（１，３－ジオキソランヌクレオシドシトシンアナログ）、アンチセンスオリゴヌクレオチド、特に、例えば、ＰＫＣ－α、Ｒ

ａｆ、Ｈ－Ｒａｓ、及び上皮成長因子受容体（ＥＧＦＲ）等の異常な細胞増殖に関与するシグナル伝達経路における遺伝子の発現を阻害する治療薬；Ｓｔｉｍｕｖａｘワクチン、Ｔｈｅｒａｔｏｐｅワクチン及び遺伝子治療ワクチン、例えば、Ａｌｌｏｖｅｃｔｉｎワクチン、Ｌｅａｖｅｃｔｉｎワクチン、及びＶａｘｉｄワクチン等のワクチン；トポイソメラーゼ１阻害剤；フルベストラント等の抗エストロゲン薬；イマチニブ又はＥＸＥＬ－０８６２（チロシンキナーゼ阻害剤）等のＫｉｔ阻害剤；エルロチニブ又はセツキシマブ等のＥＧＦＲ阻害剤；ベバシズマブ等の抗ＶＥＧＦ阻害剤；アリノテカン；ｒｍＲＨ；ラパチニブ及びラパチニブトシル酸塩（ＧＷ５７２０１６としても知られるＥｒｂＢ－２及びＥＧＦＲ二重チロシンキナーゼ小分子阻害剤）；１７ＡＡＧ（熱ショックタンパク質（Ｈｓｐ）９０毒であるゲルダナマイシン誘導体）、並びに上記の治療薬のうちのいずれかの薬学的に許容できる塩、酸又は誘導体が挙げられる。

【０１８５】

いくつかの実施形態では、本明細書に開示される融合タンパク質又は医薬組成物は、５－フルオロウラシル（５－ＦＵ）と同時投与される。いくつかの実施形態では、当該融合タンパク質又はその医薬組成物は、５－ＦＵ含有レジメン、例えばＦＯＬＦＵＨＤ（５－ＦＵ及びロイコボリン、ｓＬＶ５ＦＵ２（５－ＦＵ及びロイコボリン）、ＩＦＬ（イリノテカン、ロイコボリン、及び５－ＦＵ）、ＦＬＯＸ（５－ＦＵ、ロイコボリン、及びオキサリプラチン）、ｍＦＯＬＦＯＸ６（オキサリプラチン、ロイコボリン、及び５－ＦＵ）、ＦＯＬＦＯＸ４（オキサリプラチン、ロイコボリン、及び５－ＦＵ）、ＦＯＬＦＯＸ７（オキサリプラチン、ロイコボリン及び５－ＦＵ）、ＦＯＬＦＩＲＩ（イリノテカン、ロイコボリン、及び５－ＦＵ）、ＦＯＬＦＯＸＩＲＩ（イリノテカン、オキサリプラチン、ロイコボリン、及び５－ＦＵ）、ＦＯＬＦＩＲＩＮＯＸ（ロイコボリンカルシウム、フルオロウラシル、イリノテカン塩酸塩、及びオキサリプラチン）、又はＣＭＦ（シクロホスファミド、メトトレキサート、及び５－ＦＵ）と同時投与される。いくつかの実施形態では、当該融合タンパク質又はその医薬組成物は、５－ＦＣ含有レジメンと同時投与される。例えば、いくつかの実施形態では、任意の上述の５－ＦＵ含有レジメンの５－ＦＵ成分は、５－ＦＣで置き換えられる（例えば、５－ＦＣ及びロイコボリン；５－ＦＣ、ロイコボリン、及びイリノテカン；５－ＦＣ、ロイコボリン、及びオキサリプラチン；５－ＦＵ、ロイコボリン、イリノテカン、及びオキサリプラチン；５－ＦＵ、ロイコボリンカルシウム、イリノテカン塩酸塩、及びオキサリプラチン；５－ＦＣ、シクロホスファミド、及びメトトレキサート）。

【０１８６】

いくつかの実施形態では、本開示の融合タンパク質又は医薬組成物は、５－ＦＵの細胞傷害効果を増強する１以上の物質と組み合わせる、又は同時投与することができる。５－ＦＵの細胞傷害効果を増強する物質としては、ピリミジンのデノボ生合成の酵素を阻害する薬物；及び５－ＦＵの代謝の産物（５－ＦｄＵＭＰ）の存在下で、チミジル酸シンターゼの阻害を高め、その結果として複製のために必要とされるｄＴＭＰのプールの減少をもたらす薬物、例えばロイコボリン（Ｗａｘｍａｎら、１９８２、Ｅｕｒ．Ｊ．Ｃａｎｃｅｒ　Ｃｌｉｎ．Ｏｎｃｏｌ．１８、６８５－６９２）；及びジヒドロ葉酸レダクターゼを阻害しＰＲＰＰ（ホスホリボシルピロリン酸）のプールを増加させることにより、細胞内ＲＮＡへの５－ＦＵの組み込みの増加をもたらす薬物、例えばメトトレキサート（Ｃａｄｍａｎら、１９７９、Ｓｃｉｅｎｃｅ　２５０、１１３５－１１３７）が挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、５－ＦＵの細胞傷害効果を増強する物質は、５－ＦＵの分解を阻害する。例えば、いくつかの実施形態では、その物質はギメラシルである。いくつかの実施形態では、５－ＦＵの細胞傷害効果を増強する物質は、５－ＦＵの副作用（複数種可）を低減する。例えば、いくつかの実施形態では、その物質はオテラシルカリウムである。いくつかの実施形態では、５－ＦＵの細胞傷害効果を増強する物質は、ジヒドロピリミジンデヒドロゲナーゼを阻害することにより、５－ＦＵの代謝を阻害する。例えば、いくつかの実施形態では、その物質はウラシルである。

【０１８７】

投与方法

本開示の融合タンパク質又は医薬組成物の送達は、経口投与、皮下投与、静脈内投与、腹腔内投与又は腫瘍内投与を含む様々な方法で行うことができる。他の投与及び送達経路としては、関節内、動脈内、筋肉内、非経口、皮下、胸膜内、局所、経真皮、皮内、経皮、非経口、例えば経粘膜、頭蓋内、脊髄内、粘膜、呼吸器、鼻腔内、挿管により、肺内、肺内注入、口腔内、舌下、血管内、髄腔内、腔内、イオン注入、眼内、眼、腺内、臓器内、及びリンパ内が挙げられる。

【０１８８】

各送達／投与経路には、本開示に係る融合タンパク質処方物について異なる要求事項があり、当該処方物は、当業者によって常法により調製できる。例えば、経口用途又は腹腔内注入に関して、ｓｄＡｂ－ＣＤ融合タンパク質は、極度の条件（すなわち、プロテアーゼ及び／又は酸性ｐＨ）に対する抵抗性を必要とする。必要に応じて、当該融合タンパク質は、当該技術分野で周知のように、配列の適合により、又はペプシン及びキモトリプシンへの抵抗性を改善するためのさらなるジスルフィド結合の導入により、プロテアーゼに抵抗性であるようにすることができる。静脈内注入については、血清中での安定性が重要である可能性ある。エフェクタードメイン又はナノ粒子と組み合わされたほとんどのｓｄＡｂは、血清中で非常に安定であると記載されている。

【０１８９】

いくつかの実施形態によれば、上記治療用途又は処置（治療）方法は、薬学的に許容できる量のプロドラッグ、例えばシトシンのアナログ、特に５－ＦＣ、が対象又は細胞に投与されるさらなる工程を含む。非限定的な例証として、１日１回又は１日複数回で５０～１０００ｍｇ／ｋｇ／日の用量、又は５００ｍｇ／ｋｇ／日の用量又は２００ｍｇ／ｋｇ／日の用量を使用することが可能である。いくつかの実施形態では、当該方法は、少なくとも、投与の１～２日以内に約１～２００（例えば、１０～１００）μｇ／ｍｌの血清濃度を得るのに十分な５－ＦＣの第１負荷用量を含む。いくつかの実施形態では、このプロドラッグは、標準的な実務に従って（例えば、経口的に、全身的に）投与され、この投与は、本明細書に開示される融合タンパク質の投与に引き続いて行われる。いくつかの実施形態では、上記プロドラッグは経口投与される。いくつかの実施形態では、プロドラッグは単回投与で投与される。いくつかの実施形態では、このプロドラッグは、毒性の代謝産物が宿主生物又は宿主細胞内で産生されることが可能になるのに十分な時間繰り返される用量で、投与される。

【０１９０】

いくつかの実施形態では、上記プロドラッグは、インビボで変換されて、５－ＦＣの生物学的に、医薬的に、又は治療上活性な形態を与えることができる化合物である。このような光で活性化されうる化合物は、例えば、ＵＶ光源（離れて又は時間的に活性化することができる腫瘍部位内に埋め込まれた光源を含む）を用いた照射の際に切断可能である感光性のリンカーを含むことができる。

【０１９１】

いくつかの実施形態では、５－ＦＣの代わりにシトシンアナログが投与される。シトシンデアミナーゼに対する基質であることができるシトシンアナログとしては、ハロゲン化シトシン及びプロドラッグ５－フルオロシトシン（５－ＦＣ）（ＣＤによって５－フルオロウラシル（５－ＦＵ）へと活性化される）が挙げられる。加えて、５－ＦＣの徐放性処方物を使用することができる（例えば、Ｔｏｃａ　ＦＣ）。

【０１９２】

医薬組成物

本開示は、１以上の本明細書に開示される融合タンパク質を含む医薬組成物を提供する。いくつかの実施形態では、当該医薬組成物は、１以上の本明細書に開示される融合タンパク質と、１以上の薬学的に許容できる賦形剤とを含む。本開示の融合タンパク質及びその任意の翻訳後修飾物と、薬学的に許容できる賦形剤とを含む医薬組成物も、本開示の範囲内にあり、当該技術分野で公知の方法を使用して調製されてもよい。好適な賦形剤は当

該技術分野で周知である。賦形剤の選択は、当該組成物が投与されてもよい特定の部位及び当該組成物を投与するために使用される特定の方法によって、一部は決定されることになる。当該組成物は、任意に無菌であってもよい。当該組成物は、保存のために冷凍又は凍結乾燥され、使用に先立って好適な無菌担体の中で再構成されてもよい。当該組成物は、例えば、Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ：Ｔｈｅ　Ｓｃｉｅｎｃｅ　ａｎｄ　Ｐｒａｃｔｉｃｅ　ｏｆ　Ｐｈａｒｍａｃｙ、第２２版、Ｌｉｐｐｉｎｃｏｔｔ　Ｗｉｌｌｉａｍｓ　＆　Ｗｉｌｋｉｎｓ、フィラデルフィア（Ｐｈｉｌａｄｅｌｐｈｉａ）、ペンシルベニア州（２０１３）及び任意の他の版に記載されている従来の技法に従って生成することができる。

【０１９３】

用語「賦形剤」は、広義に、活性治療成分（１又は複数）以外の任意の構成要素を指す。賦形剤は、不活性物質、非有効物質、及び／又は医学的に活性でない物質であってもよい。この賦形剤は、例えば担体、ビヒクル（媒質）、希釈剤、錠剤化助剤として、及び／又は活性物質の投与及び／又は吸収を改善するため、等種々の目的を果たしてもよい。

【０１９４】

いくつかの実施形態では、本開示の医薬組成物は、所定の安定性（物理的及び／又は化学的安定性）を有するように調製される。用語「物理的安定性」は、熱機械的ストレスへの曝露、及び／又は不安定化させる境界面及び表面（疎水性表面等）との相互作用の結果としてポリペプチド又はタンパク質が生物学的に不活性の、及び／又は不溶性の凝集体を形成する傾向を指す。水性タンパク質処方物の物理的安定性は、種々の時間、異なる温度で機械的／物理的ストレス（例えば、撹拌）に曝露したあとに、目視検査によって、及び／又は濁度測定により評価されてもよい。あるいは、物理的安定性は、例えば、チオフラビンＴ又は「疎水性パッチ」プローブ等のタンパク質の配座状態の分光測定用薬剤又はプローブを使用して評価されてもよい。

【０１９５】

用語「化学的安定性」は、無傷のタンパク質と比べて生物学的効力の低下、及び／又は免疫原性効果の増大を潜在的に有する化学的分解生成物の形成につながる、ポリペプチド又はタンパク質の構造における化学的（特に、共有結合の）変化を指す。化学的安定性は、異なる環境条件に曝露された後の種々の時間点で化学的分解生成物の量を、例えばＳＥＣ－ＨＰＬＣ及び／又はＲＰ－ＨＰＬＣにより測定することにより評価することができる。

【０１９６】

本開示の融合タンパク質は、医薬処方物として治療的に使用することができる。用語「医薬処方物」は、活性成分の生物活性が有効であるようにする形態にある調製物を指し、この処方物は、処方物が投与されることになる対象に容認し難いほど毒性であるさらなる成分を含まない。いくつかの実施形態では、医薬処方物は無菌である。

【０１９７】

いくつかの実施形態では、医薬組成物又は医薬処方物は、溶液、エマルション、又は懸濁液（例えば、微小粒子、リポソーム、又は細胞に組み込まれている）であってもよい。通常、組成物又は処方物を等張性にするために、適切な量の薬学的に許容できる塩がその組成物又は処方物において使用される。薬学的に許容できる担体の例としては、生理食塩水、リンゲル液、及びデキストロース溶液が挙げられるが、これらに限定されない。溶液のｐＨは、好ましくは約５～約８、より好ましくは約７～約７．５である。医薬組成物又は処方物は、担体、増粘剤、希釈剤、緩衝液、防腐剤、及び／又は表面活性剤を含んでもよい。好適な担体としては、本開示の融合タンパク質を含有する固体疎水性ポリマーの半透性のマトリクス等の徐放性調製物が挙げられ、このマトリクスは整形された粒子、例えばフィルム、リポソーム、又は微小粒子の形態にある。例えば、投与される組成物の投与経路及び濃度に応じて特定の担体がより好ましい可能性があることは当業者には明らかであろう。医薬組成物又は処方物は、細胞傷害性薬物、細胞分裂抑制剤、化学療法剤、抗菌薬、消炎剤及び麻酔薬等の１以上のさらなる活性成分も含んでよい。

【０１９８】

水性環境への本開示の融合タンパク質の溶解を補助するために、界面活性剤が湿潤剤として添加されてもよい。界面活性剤は、ラウリル硫酸ナトリウム、ジオクチルスルホコハク酸ナトリウム、及びジオクチルスルホン酸ナトリウム等のアニオン性洗浄剤を含んでもよい。カチオン性洗浄剤が使用されてもよく、その例としては、塩化ベンザルコニウム又は塩化ベンゼトニウムを挙げることができよう。当該処方物において界面活性剤として使用することができる非イオン性洗浄剤としては、ラウロマクロゴール（ｌａｕｒｏｍａｃｒｏｇｏｌ）４００；ポリオキシル４０ステアレート；ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油１０、５０、又は６０；モノステアリン酸グリセロール；ポリソルベート２０、４０、６０、６５、又は８０；ショ糖脂肪酸エステル；メチルセルロース；及びカルボキシメチルセルロースが挙げられるが、これらに限定されない。これらの界面活性剤は、当該融合タンパク質の医薬組成物又は処方物の中に、単独で、又は様々な比の混合物として存在することができる。ペプチドの取り込みを増大させる可能性がある添加剤が本開示の医薬組成物又は処方物に含まれてもよい。例えば、いくつかの実施形態では、当該組成物又は処方物は、脂肪酸であるオレイン酸、リノール酸及びリノレン酸のうちの１以上を含む。

【０１９９】

使用方法

本開示の融合タンパク質は、例えば、増殖性疾患（癌／腫瘍、再狭窄、緑内障、瘢痕）の処置（治療）において使用することができる。いくつかの態様では、本開示は、癌又は本明細書に開示される任意の疾患を有する対象に、融合タンパク質又はその医薬組成物若しくは処方物を投与する工程を備え、これによりその疾患がその対象において処置される方法に関する。治療用途に加えて、本明細書に記載される融合タンパク質、医薬組成物、及び／又は医薬処方物は、診断又は研究での応用において使用することができる。

【０２００】

いくつかの実施形態では、本開示の融合タンパク質、又はその医薬組成物若しくは処方物は、当該技術分野で公知の任意の癌、例えば結腸癌、食道癌、胃癌、膵臓癌、乳癌、基底細胞癌、ボーエン病、及び子宮頸癌を処置するために使用することができる。いくつかの実施形態では、本開示の化合物は、眼表面扁平上皮新生物を処置するために使用することができる。いくつかの実施形態では、開示された融合タンパク質、医薬組成物及び／又は医薬処方物は、黒色腫、腎細胞癌、肺癌、膀胱癌、乳癌、子宮頸癌、結腸癌、胆嚢癌、喉頭癌、肝癌、甲状腺癌、胃癌、唾液腺癌、前立腺癌、膵臓癌、胆管細胞癌、食道癌、骨癌、子宮内膜癌、卵巣癌、軟部肉腫、又はメルケル細胞癌を処置するために使用することができる。いくつかの実施形態では、開示された融合タンパク質、医薬組成物及び／又は医薬処方物は、固形腫瘍を処置するために使用することができる。いくつかの実施形態では、この固形腫瘍は結腸癌、結直腸癌、膵臓癌、又は頭頸部癌である。

【０２０１】

いくつかの実施形態では、開示された融合タンパク質、医薬組成物及び／又は医薬処方物は、日光角化症を処置するために使用することができる。いくつかの実施形態では、開示された融合タンパク質、医薬組成物及び／又は医薬処方物は、眼及び／又は眼窩周囲の外科的処置における補助的療法として使用することができる。いくつかの実施形態では、開示された融合タンパク質、医薬組成物及び／又は医薬処方物は、肥厚性瘢痕（ＨＴＳ）及び／又はケロイド瘢痕の処置（治療）において使用することができる。

【０２０２】

用語「処置」、「治療」（または「処置する」、「治療する」）は、疾患を治癒、寛解又は安定化することを意図した患者の医学的管理を指す。この用語は、積極的な処置（治療）、つまり具体的に疾患、病態又は障害の改善に向けた処置（治療）を含み、原因治療、つまり関連する疾患、病態又は疾患の原因の除去に向けた処置（治療）をも含む。加えて、この用語は、対症療法、つまり疾患、病態若しくは障害の治癒よりも症候の緩和のために計画された処置（治療）；予防的処置（治療）、つまり関連する疾患、病態若しくは障害の発症を最小にするか若しくは部分的に若しくは完全に阻害することに向けた処置（治療）；及び／又は抑制的処置（治療）、つまり関連する疾患、病態若しくは障害の改善

に向けた別の特定の治療を補完するために用いられる処置（治療）を含む。
【０２０３】
用語「治療上有効（な）」は、使用されるタンパク質、組成物又は処方物の量が、疾患又は障害の１以上の原因若しくは症候を寛解させるのに十分な量であることを意味する。このような寛解は、低減又は変化のみを必要とし、必ずしも解消を必要とはしない。癌を処置（治療）するための治療上有効量のタンパク質、組成物又は処方物は、好ましくは、腫瘍縮小を引き起こすか又は腫瘍を放射線又は化学療法に対して感作するのに十分な量である。処置において使用するために必要とされる開示された融合タンパク質、医薬組成物及び／又は医薬処方物の量は、選択された特定のｓｄＡｂ（又はその機能的変異体）及び融合タンパク質だけではなく、多くの要因の中でも、投与経路、処置しようとする状態の性質、並びに患者の年齢及び状態に応じて変わることになり、最終的には主治医又は臨床医の判断によることになる。また、開示された融合タンパク質、医薬組成物及び／又は医薬処方物の投薬量は、標的細胞、腫瘍、組織、移植片又は器官に応じて変わってもよい。
【０２０４】
臨床医は、一般に、本明細書中で言及される要因に応じて好適な用量を決定することができるであろう。特定の症例では、臨床医は、例えば上述の要因及び自身の専門的な判断に基づいてこれらの量から外れることを選んでもよいことも明らかであろう。一般に、投与されるべき量に関するいくつかの指針を、実質的に同じ経路により投与された同じ標的に対する同等の従来の抗体又は抗体断片について通常投与された量から、しかしながら親和性／結合活性（アヴィディティ）、有効性、体内分布、半減期、及び当業者にとっては周知である類似の要因における差異を考慮して、得ることができる。例えば、本開示の融合タンパク質は、一般に、連続的に（例えば、注入により）、１回の１日用量として、又はその日の間に複数に分割された用量として、体重１ｋｇあたり１日あたり１ｇ～０．０１μｇ、好ましくは体重１ｋｇあたり１日あたり０．１ｇ～０．１μｇ、例えば体重１ｋｇあたり１日あたり約１μｇ、１０μｇ、１００μｇ、又は１０００μｇの量で投与されてもよい。いくつかの実施形態では、本開示の融合タンパク質は、約１０ｍｇ／ｋｇ～約６０ｍｇ／ｋｇの量で投与される。いくつかの実施形態では、本開示の融合タンパク質は、約１０ｍｇ／ｋｇ／日～約６０ｍｇ／ｋｇ／日の量で投与される。
【０２０５】
本開示の融合タンパク質についての他の好適な用量は、例えば、動物又はヒトの体重について１ｐｇ／ｋｇ～６０ｍｇ／ｋｇの範囲であることができる。しかしながら、この例示的な範囲を下回る範囲又は上回る範囲の用量は本発明の範囲内にある。この１日の非経口用量は、全体重ｋｇについて約０．０００１μｇ／ｋｇ～約２０又は約４０ｍｇ／ｋｇ（例えば、約０．００１μｇ／ｋｇ、約０．１μｇ／ｋｇ、約１μｇ／ｋｇ、約５μｇ／ｋｇ、約１０μｇ／ｋｇ、約１００μｇ／ｋｇ、約５００μｇ／ｋｇ、約１ｍｇ／ｋｇ、約５ｍｇ／ｋｇ、約１０ｍｇ／ｋｇ、又は上記の値のうちのいずれか２つによって定められる範囲）、好ましくは全体重ｋｇについて約０．１μｇ／ｋｇ～約１０ｍｇ／ｋｇ（例えば、約０．５μｇ／ｋｇ、約１μｇ／ｋｇ、約５０μｇ／ｋｇ、約１５０μｇ／ｋｇ、約３００μｇ／ｋｇ、約７５０μｇ／ｋｇ、約１．５ｍｇ／ｋｇ、約５ｍｇ／ｋｇ、又は上記の値のうちのいずれか２つによって定められる範囲）、より好ましくは全体重ｋｇについて約１μｇ／ｋｇ～５ｍｇ／ｋｇ（例えば、約３μｇ／ｋｇ、約１５μｇ／ｋｇ、約７５μｇ／ｋｇ、約３００μｇ／ｋｇ、約９００μｇ／ｋｇ、約２ｍｇ／ｋｇ、約４ｍｇ／ｋｇ、又は上記の値のうちのいずれか２つによって定められる範囲）、さらにより好ましくは体重ｋｇについて１日あたり約０．５～１５ｍｇ／ｋｇ（例えば、約１ｍｇ／ｋｇ、約２．５ｍｇ／ｋｇ、約３ｍｇ／ｋｇ、約６ｍｇ／ｋｇ、約９ｍｇ／ｋｇ、約１１ｍｇ／ｋｇ、約１３ｍｇ／ｋｇ、又は上記の値のうちのいずれか２つによって定められる範囲）であることができる。治療有効性又は予防有効性は、処置される患者の定期的な評価により監視することができる。数日以上にわたる反復投与については、その状態に応じて、処置は、疾患症候の所望の抑制が起こるまで繰り返すことができる。しかしながら、他の投薬レジメンが有用である可能性があり、それは本開示の範囲内にある。例えば、所望

の投薬量は、当該組成物の１回のボーラス投与により、当該組成物の複数回のボーラス投与により、又は本開示の組成物の持続点滴投与により送達することができる。本明細書に開示される融合タンパク質に関して使用することができる他の投与方法は、本明細書の他所に例示される。

【実施例】

【０２０６】

実施例１．哺乳類発現プラスミドの構築

ＣＤ－融合タンパク質の発現プラスミドを、当該技術分野で常法の組換えＤＮＡ技術により構築した。いくつかの代表的な発現プラスミドの構築方法／設計が本明細書に記載される。

【０２０７】

（１）リツキサン－ＣＤ－ＣＤ発現プラスミド

リツキサン－ＣＤ－ＣＤ融合タンパク質の設計を図１Ａに示す。リツキサン重鎖、リツキサン軽鎖及び酵母由来シトシンデアミナーゼの核酸配列は、遺伝子合成により合成できる。ＳＰ－リツキサンＨＣ－ＣＤ－リンカー－ＣＤ（配列番号８９）及びＳＰ－リツキサンＬＣ（配列番号９０）を含有するコード断片を、オーバーラップＰＣＲにより生成した。次いで、断片ＳＰ－リツキサンＨＣ－ＣＤ－リンカー－ＣＤ及びＳＰ－リツキサンＬＣを、それぞれＡｖｒＩＩ／ＢｓｔＺ１７１部位及びＥｃｏＲＶ／ＰａｃＩ部位を介してｐＣＨＯ１．０ベクターにクローニングした。（＊ＳＰ：シグナルペプチド）

【０２０８】

（２）ハーセプチン－ＣＤ発現プラスミド

ハーセプチン－ＣＤ融合タンパク質の設計を図１Ｂに示す。ハーセプチン可変領域及び酵母由来シトシンデアミナーゼの核酸配列は、遺伝子合成により合成できる。ＳＰ－ハーセプチンＨＣ－ＣＤ（配列番号９１）及びＳＰ－ハーセプチンＬＣ（配列番号９２）を含有するコード断片を、オーバーラップＰＣＲにより生成した。次いで、断片ＳＰ－ハーセプチンＨＣ－ＣＤ及びＳＰ－ハーセプチンＬＣを、それぞれＡｖｒＩＩ／ＢｓｔＺ１７１部位及びＥｃｏＲＶ／ＰａｃＩ部位を介してｐＣＨＯ１．０ベクターにクローニングした。

【０２０９】

実施例２．哺乳類細胞におけるリツキサン－ＣＤ－ＣＤ及びハーセプチン－ＣＤの産生

哺乳類発現タンパク質の産生のために、リツキサン－ＣＤ－ＣＤ及びハーセプチン－ＣＤを、ＦｒｅｅＳｔｙｌｅ　Ｍａｘ（商標）のトランスフェクションプロトコルに従ってＦｒｅｅＳｔｙｌｅ　Ｍａｘ（商標）試薬を使用してＣＨＯ－Ｓ（商標）細胞（サーモ（Ｔｈｅｒｍｏ））によって一過性に発現させた。トランスフェクション後７２時間で上清を回収した。次いでこの上清を、（１）タンパク質力価を決定するためにＥＬＩＳＡによって定量し、（２）プロテインＡにより精製し、発現パターンを非還元性ＰＡＧＥによって確認し、（３）ＣＤ活性分析のために濃縮した。

【０２１０】

リツキサン－ＣＤ－ＣＤ及びハーセプチンＣＤの発現力価は、それぞれ０．００２μｇ／ｍＬ及び０．５μｇ／ｍＬであった。両方の融合タンパク質はＣＤ活性を有していた。リツキサン－ＣＤ－ＣＤは、プロテインＡ精製の後でもＰＡＧＥによってほとんど検出不可能であった（データは示さず）。ハーセプチン－ＣＤは、非還元性ＰＡＧＥによって分析したときに、多量体として凝集していたことが観察された（図１Ｂ）。

【０２１１】

実施例３．大腸菌発現プラスミドの構築

各融合タンパク質についてのコード配列は、２つの主要成分を含み、１つは、抗原認識断片（標的化ドメイン）、例えばｓｄＡｂ、抗原結合断片、又はエンドスタチンをコードし、１つは、酵母由来シトシンデアミナーゼ断片をコードする。上記主要成分に連結されるリンカーペプチド配列をコードするコード配列は、発現されたときに、リンカーが標的化ドメインタンパク質成分又はＣＤ成分の機能を妨げないようにされる。発現プラスミド

を、図２Ａに示される概略図に簡単に示す。

【０２１２】

（１）シングルドメイン抗体－ＣＤ発現プラスミド

ｓｄＡｂ及び酵母由来シトシンデアミナーゼの核酸配列は、遺伝子合成により合成できる。ｓｄＡｂ－ＣＤ融合タンパク質のコード断片を、特異的なプライマーを使用してオーバーラップＰＣＲによって得た。ｓｄＡｂとＣＤとの間のリンカーペプチド配列は、（ＧＧＧＧＳ）$_3$（配列番号１８８）であった。上記断片を、ＸｂａＩ及びＸｈｏＩ部位を介してｐＥＴ２８ａベクター（ノバジェン（Ｎｏｖａｇｅｎ））にクローニングした（図２Ａ）。ＣＤ変異（複数可）又はＶＨＨ変異（複数可）を有する融合タンパク質変異体を、オーバーラップＰＣＲにより生成した。

【０２１３】

（２）抗原結合断片－ＣＤ発現プラスミド

酵母由来シトシンデアミナーゼの核酸配列を遺伝子合成により合成した。抗原結合断片－ＣＤ（配列番号８１～配列番号８４）のコード断片を、特異的プライマーを使用してエクステンションＰＣＲにより得た。抗原結合断片とＣＤとの間のリンカーペプチド配列は、（ＧＧＧＧＳ）$_3$（配列番号１８８）であった。上記断片を、ＸｂａＩ及びＸｈｏＩ部位を介してｐＥＴ２８ａベクター（ノバジェン（Ｎｏｖａｇｅｎ））にクローニングした（図２Ａ）。

【０２１４】

（３）エンドスタチン－ＣＤ発現プラスミド

エンドスタチン及び酵母由来シトシンデアミナーゼの核酸配列を遺伝子合成により合成した。エンドスタチン－ＣＤ融合タンパク質（配列番号８５）のコード断片を、特異的プライマーを使用してオーバーラップＰＣＲにより得た。抗原結合断片とＣＤとの間に置かれたリンカーペプチド配列は、（ＧＧＧＧＳ）$_3$（配列番号１８８）であった。次いで、上記断片を、ＸｂａＩ及びＸｈｏＩ部位を介してｐＥＴ２８ａベクター（ノバジェン（Ｎｏｖａｇｅｎ））にクローニングした（図２Ａ）。

【０２１５】

実施例４．大腸菌におけるＣＤ融合タンパク質の産生

産生のために、上記発現プラスミドを、標準的な形質転換手順によってＳＨｕｆｆｌｅ（登録商標）Ｔ７　ｅｘｐｒｅｓｓ又はＴ７　ｅｘｐｒｅｓｓ形質転換受容性大腸菌細胞（ニューイングランドバイオラボ（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ））に形質転換した。

【０２１６】

タンパク質の特徴の試験的な評価のために、上記組換えタンパク質を約３００ｍＬ生産スケールで発現させ精製した。タンパク質発現のために、新しい形質転換体を、３０℃（ＳＨｕｆｆｌｅ（登録商標）Ｔ７　Ｅｘｐｒｅｓｓ細胞）又は３７℃（Ｔ７　Ｅｘｐｒｅｓｓ細胞）の選択培地中、１：１００希釈で、ＯＤ６００が０．４～０．８（Ｉ$_0$）に到達するまで接種した。０．４ｍＭのＩＰＴＧ（ユニ・リージョン（Ｕｎｉ－ｒｅｇｉｏｎ））を、タンパク質発現を誘導するために添加した。Ｔ７　Ｅｘｐｒｅｓｓ細胞については、誘導した培養物を３７℃で５時間インキュベーションした。ＳＨｕｆｆｌｅ（登録商標）Ｔ７　Ｅｘｐｒｅｓｓ細胞については、誘導後、産生のための温度は２５℃又は３０℃であり、産生のための温度は２５°であった。誘導温度は３０℃であった。誘導の５時間後（Ｉ$_5$）、培養物を回収し、超音波処理により細胞溶解用のＰＢＳに再懸濁した。可溶部及び不溶部を細胞可溶化物から別々に集めた。細胞可溶化物の可溶部を、まず、Ｎｉセファロース（ｓｅｐｈａｒｏｓｅ）ビーズ（ジーイーヘルスケア（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ））を用いて、室温で１時間インキュベーションした。インキュベーション後、Ｎｉビーズ（ＧＥ）を、２０ｍＭ、４０ｍＭ及び８０ｍＭイミダゾールグラジエント（それぞれＷ１、Ｗ２及びＷ３）で洗浄した。各融合タンパク質を、１５０ｍＭ及び２５０ｍＭイミダゾール（Ｅ１及びＥ２）を含有する緩衝液で溶出した。各工程からの試料を、発現及び精製プロファイルを評価するために、ＳＤＳ－ＰＡＧＥによって分析した。精製し

た組換えタンパク質を集め、ＳＤＳ－ＰＡＧＥ、ＳＥＣ－ＨＰＬＣ、ＣＤ活性及び抗原結合活性の分析のために５％グリセロールを含むＰＢＳに交換した。すべての組換えタンパク質の発現力価、生理化学的特徴、ＣＤ活性及び抗原結合活性を評価した。これを図２Ｂに要約する。発現プロファイルの例を図２Ｃ及び図２Ｄに示す。精製したｓｄＡｂ－ＣＤのＳＤＳ－ＰＡＧＥ、ＳＥＣ－ＨＰＬＣ、ＣＤ活性及び抗原結合活性の分析の例を図３、図４Ａ、図４Ｂ、図５Ａ、図５Ｂ、図６Ａ及び図６Ｂに示す。

【０２１７】

これらの結果は、ｓｄＡｂ－ＣＤ融合タンパク質が、ほとんど可溶形態で発現され、ＳＤＳ－ＰＡＧＥ及びＳＥＣ－ＨＰＬＣ分析の間許容できる純度プロファイルを呈することを示す。小スケール生産の間のｓｄＡｂ－ＣＤ融合タンパク質の力価は、約１０μｇ／ｍＬであるか、１０μｇ／ｍＬを超え、この力価は、大スケール生産において１６０～４００ｍｇ／Ｌへとさらに上昇することが可能であり、プロセス最適化の後では＞１ｇ／Ｌへと上昇する可能性があり、この値は工業生産に好適である。抗原結合活性及びＣＤ活性は、すべてのｓｄＡｂ－ＣＤ融合タンパク質で維持された。

【０２１８】

対照的に、エンドスタチン－ＣＤは、可溶形態で発現することができなかった。従って、これは工業生産に好適ではない。抗原結合断片－ＣＤ融合タンパク質は、より小さい分子量であるが、可溶形態で発現されるようであった。抗原結合断片－ＣＤ融合タンパク質のほとんどは、二量体又は多量体として凝集し、抗原結合断片は、ＣＤと融合したときに、その抗原結合活性を失った。

【０２１９】

１０種超のｓｄＡｂ－ＣＤ融合タンパク質及び５種の標的化抗原を試験し、データは、ｓｄＡｂがＣＤとの融合のために好適な抗原結合断片であり、ｓｄＡｂ及びＣＤの両方がその生物活性を保持することを示した。

【０２２０】

実施例５．異なる大腸菌株から産生したｓｄＡｂ－ＣＤの安定性研究

３ＶＧＲ１９－ＣＤ－Ｈの発現プラスミドを、それぞれＳＨｕｆｆｌｅ（登録商標）Ｔ７　Ｅｘｐｒｅｓｓ及びＴ７　Ｅｘｐｒｅｓｓ　Ｃｏｍｐｅｔｅｎｔ大腸菌に形質転換した。データは、ＳＨｕｆｆｌｅ（登録商標）Ｔ７　Ｅｘｐｒｅｓｓ及びＴ７　Ｅｘｐｒｅｓｓにおける３ＶＧＲ１９－ＣＤ－Ｈの発現プロファイルは同等であるということを示唆した（図８）。

【０２２１】

ＳＨｕｆｆｌｅ（登録商標）Ｔ７　Ｅｘｐｒｅｓｓ及びＴ７　Ｅｘｐｒｅｓｓ　Ｃｏｍｐｅｔｅｎｔ大腸菌から発現した３ＶＧＲ１９－ＣＤ－Ｈ融合タンパク質を、精製し、３ｍｇ／ｍＬで以下の４種の緩衝液に透析した：（１）ＰＢＳ（２）ＰＢＳ中１％グリセロール（３）ＰＢＳ中５％グリセロール（４）ＰＢＳ中３％マンニトール。各緩衝液中の精製したタンパク質の外観を、３７℃で３時間、３７℃で８時間及び４℃で１週間のインキュベーション後に観察した。これを、表１に要約する。「＋」の数は、濁度レベルを示す。「＋／－」は、非常に僅かな凝集を認めたことを意味する。結果は、Ｔ７　Ｅｘｐｒｅｓｓ細胞から発現した３ＶＧＲ１９－ＣＤ－Ｈにおいて大量の沈殿物が認められたが、ＳＨｕｆｆｌｅ（登録商標）Ｔ７　Ｅｘｐｒｅｓｓ細胞で発現したものでは認められなかったことを示した。

【０２２２】

【表３】
表 1. T7 Express 及び SHuffle（登録商標） T7 Express から産生した sdAb-CD の安定性

濁度	T7 Express				SHuffle（登録商標） T7 Express			
緩衝液	1	2	3	4	1	2	3	4
37℃, 3 時間	+++++	+++++	+++++	+++++	-	-	-	-
37℃, 8 時間	+++++	+++++	+++++	+++++	-	-	-	-
4℃, 1 週間	+++	+++	+	++	+/-	+/-	+/-	+/-

【０２２３】
実施例６．ｓｄＡｂ－ＣＤ融合タンパク質の５Ｌ流加発酵
バイオリアクター条件での本開示のｓｄＡｂ－ＣＤ融合タンパク質の生産を評価するために、５Ｌ流加発酵運転を行った。凍結した細胞を、３０℃で４～６時間、２ｍＬ選択培地に接種し、次いで種培養として１：１０００希釈で２００ｍＬ選択培地に接種した。翌日、種培養を５Ｌ発酵槽に接種した。温度を３０℃に設定し、ｐＨを７．２±０．１に、ＤＯを２５％に、ガス流を１～１．５ｖｖｍに設定した。グルコースが０．３ｇ／Ｌ未満になると供給を開始し、供給速度を、０．５～１ｇ／Ｌのグルコースを維持するように調整した。ＯＤ６００が６０超に到達すると、タンパク質発現を誘導するために０．４ｍＭＩＰＴＧを添加した。細胞が定常期に到達すると、流加回分を回収した。最後に、定常期に到達すると、この発酵プロセスを停止した。精製後のｓｄＡｂ－ＣＤの産生力価は、約１６０～４００ｍｇ／Ｌであった。ＴＣ４の産生力価は、プロセス最適化後に１～１．３ｇ／Ｌへと上昇する可能性がある。
【０２２４】
実施例７．ｓｄＡｂ－ＣＤ融合タンパク質の大スケール精製
ＨＩＳタグを有する融合タンパク質
細胞ペレットを、２０ｍＭ ＴｒｉｓＨＣｌ、０．５Ｍ ＮａＣｌ、２０ｍＭ イミダゾール、及び５％グリセロールから構成されるｐＨ８．０の緩衝液を用いて再懸濁し、ホモジナイザー（ＡＰＶ２０００）により８５０～９５０ｂａｒで１０分間未満、２回ホモジナイズした。得られたホモジネートを２２０００×ｇで６０分間、４℃での遠心分離により清澄にし、濾過した。次いで、この細胞可溶化物を、Ｎｉセファロースカラム、その後、イオン交換Ｑ－セファロースカラムを用いるＦＰＬＣに供した。２０ｍＭ ＴｒｉｓＨＣｌ、０．５Ｍ ＮａＣｌ、２０ｍＭイミダゾール、及び５％グリセロール、ｐＨ８．０を用いて、細胞可溶化物をＮｉセファロースカラムにロードし、次いで２０ｍＭ ＴｒｉｓＨＣｌ、０．５Ｍ ＮａＣｌ、及び５％グリセロール、ｐＨ８．０中の０～５００ｍＭイミダゾールのグラジエントで溶出した。２０ｍＭ ＴｒｉｓＨＣｌ、１７０ｍＭ ＮａＣｌ、５％グリセロール、ｐＨ８．０を用いて、溶離液をイオン交換Ｑ－セファロースカラムにロードし、素通り画分を精製後の産物として集め、次いで２０ｍＭ ＴｒｉｓＨＣｌ、１０００ｍＭ ＮａＣｌ、５％グリセロール、ｐＨ８．０で洗浄し、不純物及び凝集体を除去した。精製した融合タンパク質をＳＤＳ－ＰＡＧＥによって分析した。結果は、すべてのｓｄＡｂ－ＣＤ融合タンパク質が精製後に高純度を示すことを示した（図７Ａ）。
【０２２５】
ＨＩＳタグを有さない融合タンパク質
細胞ペレットを、ｐＨ８．０の５％グリセロール中の２０ｍＭ Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ及び

１５０ｍＭ　ＮａＣｌから構成される緩衝液中で再懸濁し、ホモジナイザー（ＡＰＶ２０００）により８５０～９５０ｂａｒで１０分間未満、２回ホモジナイズした。得られたホモジネートを２２０００×ｇで６０分間、４℃での遠心分離により清澄にし、濾過した。濾液を、ｒＰｒｏｔｅｉｎＡアフィニティーカラム（レプリジェン（Ｒｅｐｌｉｇｅｎ））、その後、イオン交換カラムアニオン交換体Ｑセファロース（ＧＥ）により精製した。ｒＰｒｏｔｅｉｎＡアフィニティーカラム用の緩衝液系は、ｐＨ８．０で、５％グリセロール、２０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣＬ及び１５０ｍＭ　ＮａＣｌを含み（結合及び洗浄用）、次いで５０ｍＭグリシン、５％グリセロール、ｐＨ３．０緩衝液で溶出し、溶出後、生成物を、１：２５の比で１Ｍ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ、ｐＨ９．０を用いて中和した。イオン交換カラムクロマトグラフィー用の緩衝液は、ｐＨ８．０で５％グリセロール、２０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ及び１５０ｍＭ　ＮａＣｌを含んでいた。次いで、精製後の産物を５ｋＤａ（細孔径）ＴＦＦシステムにより濾過し、産物を濃縮し（タンジェンシャルフロー・フィルトレーション）（メルク・ミリポア（Ｍｅｒｃｋ　Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ））、緩衝液を１０ｋＤａ　Ａｍｉｃｏｎフィルター（メルク・ミリポア（Ｍｅｒｃｋ　Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ））に交換した。（図７Ｂ）。

【０２２６】

実施例８．ｓｄＡｂ－ＣＤ融合タンパク質のサイズ排除クロマトグラフィー分析

各融合タンパク質の純度を調べるために、ＢｉｏＳｅｐ　ＳＥＣ－ｓ２０００（フェノメネクス（Ｐｈｅｎｏｍｅｎｅｘ））又はＳｕｐｅｒｄｅｘ２００　Ｉｎｃｒｅａｓｅ（ジーイーヘルスケア（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ））１０／３００カラム樹脂を使用するＳＥＣ－ＨＰＬＣクロマトグラフィーを実施した。上記のように産生したタンパク質の試料を、まず、５％グリセロールを含有するＰＢＳ中で１ｍｇ／ｍＬ又は２ｍｇ／ｍＬに希釈した。この試料を、０．２μｍシリンジフィルター（ピュアテック（ＰｕｒｅＴｅｃｈ））を使用して濾過し、ＳＥＣ－ＨＰＬＣ分析用にＰＰ　Ｉｎｓｅｒｔ（サーモ（Ｔｈｅｒｍｏ））の中に入れた。ＢｉｏＳｅｐ　ＳＥＣ－ｓ２０００用の移動相は、０．３Ｍ塩化ナトリウムを含む０．１Ｍリン酸ナトリウム、ｐＨ７．０であった。Ｓｕｐｅｒｄｅｘ　２００　Ｉｎｃｒｅａｓｅ用の移動相は、ＰＢＳ中の５％グリセロールであった。いずれのカラムについても流量は、０．５ｍＬ／分であった。カラム温度を２５±２℃に設定し、オートサンプラー温度を１０±２℃に設定した。タンパク質をＵＶ２８０の吸光度によって検出した。結果は、抗ＶＥＧＦＲ２　ｓｄＡｂ－ＣＤ融合タンパク質３ＶＧＲ１９－ＣＤ－Ｈ、４ＶＧＲ１７－ＣＤ－Ｈ、及び４ＶＧＲ３８－ＣＤ－Ｈについての純度は、それぞれ約７１％、約７４％、及び約７１％であることを示した（図４Ａ）。抗ＥＧＦＲ　ｓｄＡｂ－ＣＤ融合タンパク質ＶＨＨ１２２－ＣＤ－Ｈ及び７Ｄ１２－ＣＤ－Ｈについての純度は、それぞれ約８３％及び約８７％であった（図４Ａ）。７Ｄ１２－ＣＤｏｅｍ３－Ｈ及び７Ｄ１２－ＣＤｏｅｍ３については、純度は、それぞれ約８８％及び約９３％であった（図４Ａ）。精製プロセスの最適化の後、純度は、約９５％又は９５％超に到達する可能性がある（図４Ｂ）。

【０２２７】

実施例９．ｓｄＡｂ－ＣＤ融合タンパク質のシトシンデアミナーゼ活性

上記ＣＤ融合タンパク質のシトシンデアミナーゼ活性を調べるために、ｓｄＡｂ－ＣＤ融合タンパク質を上記のように調製し、その融合タンパク質試料の系列希釈物を０．２５％　ＢＳＡ及び０．０５％　Ｔｗｅｅｎ２０を含む緩衝液中の２０ｍＭ　５－ＦＣと混合し、この混合物を３７℃で９０分間インキュベーションした。次いで、反応を１０％トリクロロ酢酸で停止し、その混合物を、上清回収のために４℃で遠心分離した。５－ＦＣ及び５－ＦＵの存在を、それぞれ２９０ｎｍ及び２５５ｎｍの吸光度によって検出した。

【０２２８】

この結果は、ＶＥＧＦＲ２を標的とする試験したｓｄＡｂ－ＣＤ融合タンパク質が５－ＦＣを５－ＦＵに変換したことを実証する（図５Ａ）。ＥＧＦＲ、ＨＥＲ２、ＨＥＲ３、又はＣＥＡを標的とするｓｄＡｂ－ＣＤ融合タンパク質についても同様の結果を得た（図５Ａ及び図５Ｂ）。

【０２２９】
実施例１０．ｓｄＡｂ－ＣＤ融合タンパク質の抗原結合親和性
ヒト由来ＶＥＧＦＲ２と本明細書に開示されるｓｄＡｂ－ＣＤ融合タンパク質との結合をＥＬＩＳＡによって試験した。ＶＥＧＦＲ２結合アッセイのために、コーティング抗体Ｈｕｍａｎ　ＶＥＧＦＲ２－Ｆｃ（シノバイオロジカル（Ｓｉｎｏ　Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ））をコーティング緩衝液（１００ｍＭ　$NaHCO_3$＋３２ｍＭ　Na_2HCO_3）中で１μｇ／ｍｌに希釈した。ブロッキング緩衝液（０．２５％ＢＳＡ、０．０５％Ｔｗｅｅｎ－２０、０．０５％NaN_3、１ｍＭ　ＥＤＴＡ）と２時間インキュベーションすることにより、ブロッキングを実施した。試験する融合タンパク質試料をブロッキング緩衝液中で調製し、結合のためにウェルに添加した。検出のために、ウサギ抗Ｈｉｓ－ＨＲＰ（アブカム（ａｂｃａｍ））を０．２５％ＢＳＡ及び０．０５％　Ｔｗｅｅｎ２０を含む緩衝液中で５０００倍に希釈した。
【０２３０】
ＥＧＦＲ結合アッセイのために、ＥＬＩＳＡプレートを、コーティング緩衝液中の濃度１μｇ／ｍＬのｈＥＧＦＲ－Ｆｃ（シノバイオロジカル（Ｓｉｎｏ　Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ））でコーティングした。ブロッキング緩衝液（０．２５％　ＢＳＡ、０．０５％　Ｔｗｅｅｎ－２０、０．０５％　NaN_3、１ｍＭ　ＥＤＴＡ）と２時間インキュベーションすることにより、ブロッキングを実施した。ブロッキング後、試料を、ブロッキング緩衝液中で系列希釈し、結合のためにウェルに１時間添加した。最後に、検出のために、二次抗体（ウサギ抗ＨＩＳ－ＨＲＰ）を０．２５％　ＢＳＡ及び０．０５％　Ｔｗｅｅｎ２０を含む緩衝液中で希釈した。
【０２３１】
ＨＥＲ２、ＨＥＲ３及びＣＥＡ結合アッセイについては、各アッセイについてのコーティング抗体は、それぞれヒト由来ＥｒｂＢ２／Ｈｅｒ２－Ｆｃ（アクロバイオシステム（Ａｃｒｏ　ｂｉｏｓｙｓｔｅｍ））、ヒト由来ＥｒｂＢ３／Ｈｅｒ３－Ｆｃ（アクロバイオシステム（Ａｃｒｏ　ｂｉｏｓｙｓｔｅｍ））、及びヒト由来ＣＥＡＣＡＭ５－Ｆｃ（ノボプロテイン（ｎｏｖｏｐｒｏｔｅｉｎ））であった。
【０２３２】
結果は、３ＶＧＲ１９－ＣＤ－Ｈ、４－ＶＧＲ１７－ＣＤ－Ｈ、及び４ＶＧＲ３８－ＣＤ－ＨがＶＥＧＦＲ２に結合し、ＶＨＨ１２２ＣＤ－Ｈ及び７Ｄ１２－ＣＤ－ＨがＥＧＦＲに結合し、５Ｆ７－ＣＤｏｅｍ３－Ｈ、４７Ｄ５－ＣＤｏｅｍ３－Ｈ及び２Ｄ３－ＣＤｏｅｍ３－ＨがＨＥＲ２に結合し、ＮｂＣＥＡ５－ＣＤｏｅｍ３－Ｈ及び抗ＣＥＡ－ＣＤｏｅｍ３－ＨがＣＥＡＣＡＭ５に結合し、ＢＣＤ０９０－Ｍ２－ＣＤｏｅｍ３－ＨがＨＥＲ３に結合することを示した（図６Ａ及び図６Ｂ）。
【０２３３】
実施例１１．ｓｄＡｂ－ＣＤ融合タンパク質についての細胞ベースの細胞毒性アッセイ
プロトコルＡ：
５－ＦＣと組み合わせたいくつかの抗ＥＧＦＲ　ｓｄＡｂ－ＣＤ融合タンパク質の細胞毒性を、ＭＤＡ－ＭＢ－２３１（ヒト由来乳癌）及びＡ４３１（ヒト由来類表皮癌）ＥＧＦＲ発現癌細胞株に対して試験した。細胞を、最初に３０，０００細胞／ウェルで９６穴プレートに播種し、増殖培地（１０％　ＦＢＳを加えたＤＭＥＭ（ギブコ（Ｇｉｂｃｏ））中で、３７℃で一晩インキュベーションした。１６～１８時間のインキュベーション後、ウェルをＰＢＳで１回洗浄した。１００μｇ／ｍｌの融合タンパク質１００μｌを各ウェルに添加し、３７℃で１時間インキュベーションした。過剰の融合タンパク質を除去するためのＰＢＳでの洗浄の後、示した濃度の５－ＦＣ又は５－ＦＵの１００μｌをそれぞれのウェルに添加し、７２時間インキュベーションした。最後に、１０μｌ／ウェルの細胞増殖試薬ＷＳＴ－１（ロシュ（Ｒｏｃｈｅ））を添加し、細胞を３７℃で４時間インキュベーションした。細胞生存率を、ＥＬＩＳＡリーダーを使用して吸光度ＯＤ４５０（ＷＳＴ－１）及びＯＤ６９０（参照波長）で測定した。結果は、試験した各ｓｄＡｂ－ＣＤ融合タンパク質と５－ＦＣとの組み合わせが、ＭＤＡ－ＭＢ－２３１及びＡ４３１細胞

株の両方において癌細胞生存率を低下させたことを明らかにする（図９Ａ及び図９Ｂ）。
【０２３４】
プロトコルＢ：
代替のアッセイでは、５－ＦＣと組み合わせた本開示の抗ＥＧＦＲ　ｓｄＡｂ－ＣＤ融合タンパク質の細胞毒性をＡ４３１、Ｂｘ－ＰＣ３、Ｃａｌ－２７、及びＦａＤｕの癌細胞株に対して試験した。Ｃ末端Ｈｉｓタグを有するＣＤタンパク質（ＣＤｏｅｍ３－Ｈ）を陰性タンパク質対照（ＮＰ）として使用した。最初に、細胞を２μＭ　ＮＰ又はｓｄＡｂ－ＣＤを含有する４ｍＬ培地中に再懸濁し、３７℃で１時間インキュベーションした。各細胞株は、ＡＴＣＣによって示唆される増殖培地を使用した：Ａ４３１：ＣＲＬ－１５５５（商標）；ＦａＤｕ：ＨＴＢ－４３（商標）；Ｃａｌ２７：ＣＲＬ－２０９５（商標）；ＢｘＰＣ－３：ＣＲＬ－１６８７（商標）。次いで、細胞をＰＢＳで３回洗浄し、９６穴プレートに３０，０００細胞／ウェルで再度播種した。示した濃度の５－ＦＣをウェルに加え、３７℃で７２時間インキュベーションした。インキュベーション後、１０μｌの細胞増殖試薬ＷＳＴ－１を添加し、混合物を３７℃で３時間インキュベーションした。細胞生存率を、ＥＬＩＳＡリーダーを使用してＯＤ４５０及びＯＤ６９０で測定した。結果は、抗ＥＧＦＲ　ｓｄＡｂ－ＣＤ融合タンパク質が、試験したすべての癌細胞株について生存率を低下させたことを示す（図１０Ａ及び図１０Ｂ）。
【０２３５】
実施例１２．Ａ４３１異種移植モデルでのｓｄＡｂ－ＣＤタンパク質の試験
７Ｄ１２－ＣＤｏｅｍ３又は７Ｄ１２－ＣＤｏｅｍ３－Ｈ融合タンパク質の治療効果を、ＮＯＤ－ＳＣＩＤ雄マウス（ＬＡＳＣｏ）においてＡ４３１異種移植モデルを用いて評価した。２．５×10^6のＡ４３１腫瘍細胞を、体重が２０～２７ｇのマウスの右側腹部に皮下注射した。腫瘍のサイズが２００～３００mm^3に到達した後（腫瘍移植からおよそ１０日後）、マウスをランダムに異なる処置群（ｎ＝６）に割り当てた。示した量のビヒクル（媒質）（ＰＢＳ）、５－ＦＵ（腹腔内）、５－ＦＣ（腹腔内）、及びｓｄＡｂ－ＣＤ融合タンパク質（静脈内）を、週２回で４週間投与した。腫瘍の固形分質量を測定し、腫瘍量（腫瘍体積）の差の有意性をスチューデントのｔ検定によって評価した。
【０２３６】
５００ｍｇ／ｋｇの用量の５－ＦＣの腹腔内注射を伴う２０ｍｇ／ｋｇ又は４０ｍｇ／ｋｇの７Ｄ１２－ＣＤｏｅｍ３－Ｈ又は７Ｄ１２－ＣＤｏｅｍ３の静脈内投与は、腫瘍細胞移植後のビヒクル処置群と比べて腫瘍体積及び腫瘍重量の両方の減少によって示されるとおり、Ａ４３１腫瘍の成長の有意な低下をもたらした（ｐ＜０．０１）（図１１Ａ及び図１１Ｂ）。これは、７Ｄ１２－ＣＤｏｅｍ３－Ｈ又は７Ｄ１２－ＣＤｏｅｍ３と５－ＦＣとの同時投与がインビボでＡ４３１癌細胞成長に対する阻害効果を有しうることを確認する。
【０２３７】
実施例１３．Ｔ細胞エピトープマッピング
９１種のペプチドのＥｐｉＳｃｒｅｅｎ（商標）Ｔ細胞エピトープマッピングは、６種のエピトープを含む６種のペプチドに対して陽性のＴ細胞反応を生じた。ｉＴｏｐｅ（商標）を使用して、陽性のＴ細胞増殖反応を誘導したペプチドにおいて９種の有望なＨＬＡ－ＤＲ制限結合配列を特定した。
【０２３８】
要約すれば、７Ｄ１２－ＣＤｏｅｍ３配列内で６種のＴ細胞エピトープを特定し、エピトープ１～３は７Ｄ１２　ｓｄＡｂのフレームワーク領域に位置し、エピトープ４～６はＣＤ領域に位置していた。
【０２３９】

【表４】

エピトープ	HLA-DR 制限エピトープ	配列番号
エピトープ１	SVQTGGSLRL	63
エピトープ２	LKPEDTAIY	64
エピトープ３	IYYCAAAAGS	65
エピトープ４	YTTLSPCDM	66
エピトープ５	MCTGAIIMY	67
エピトープ６	VVVVDDERCKK	68

【０２４０】

実施例１４．ｓｄＡｂ－ＣＤ融合タンパク質の単一エピトープ変異体

７Ｄ１２－ＣＤｏｅｍ３－Ｈの個々の単一エピトープ変異体を、これらの変異体がその構造、溶解性、ＣＤａｓｅ活性、及び抗原結合活性を保持しつつ、免疫原性を取り除くことができるかを評価するために、設計した。

【０２４１】

４３種の単一エピトープ変異体の発現プラスミドを、オーバーラップＰＣＲにより生成した。これらの融合タンパク質変異体を生成し、そのＣＤ活性、ＥＧＦＲ結合活性及び発現プロファイルを評価した。結果を図１２に要約する。

【０２４２】

データは、ＥＧＦＲ結合ドメイン置換（ＴＣ３－００１～ＴＣ３－０２７）のすべてが、ＥＧＦＲ結合能力に対する明白な効果を有さないことを示した。改変したエピトープ４及びエピトープ５を有するすべての８種の変異体（ＴＣ３－０２８～ＴＣ３－０３５）は、そのＣＤａｓｅ活性を喪失した。改変したエピトープ６を有する変異体（ＴＣ３－０３６～ＴＣ３－０４３）は、影響がより小さかった。

【０２４３】

発現力価、生物活性、及びヒト生殖系列（ＥＧＦＲ結合ドメイン）への配列類似性に基づいて、以下の変異体を、多変異設計のために選択した（配列番号１７に対する番号付け）：

ａ．エピトープ１：Ｓ１２Ｖ、Ｖ１３Ａ、Ｔ１５Ｖ、Ｇ１６Ｄ、及びＳ１８Ｄ

ｂ．エピトープ２：Ｋ８８Ｒ、Ｐ８９Ａ、Ｉ９４Ｖ、Ｋ８８Ｄ、Ｋ８８Ｔ

ｃ．エピトープ３：Ｉ９４Ｒ、Ｉ９４Ｑ

ｄ．エピトープ４：Ｙ２２４Ｈ

ｅ．エピトープ６：Ｖ２６８Ａ、Ｖ２６８Ｔ、Ｖ２６９Ｔ

【０２４４】

実施例１５．ｓｄＡｂ－ＣＤ融合タンパク質の単一エピトープ変異体

ＴＣ３の４３種の多変異変異体の発現プラスミドを、オーバーラップＰＣＲにより生成した。これらの融合タンパク質変異体を生成し、そのＣＤａｓｅ活性、ＥＧＦＲ結合活性及び発現プロファイルを評価した。結果を図１３Ａ及び図１３Ｂに要約する。

【０２４５】

発現力価、生物活性、生理化学的特徴、及びＴ細胞エピトープを排除するためのカバレッジに基づいて、５つの候補多変異体を、その免疫原性の潜在能力を評価するためにさらに選択した。

【０２４６】

実施例１６．免疫原性分析

７Ｄ１２－ＣＤｏｅｍ３の５種の変異体を、ＥｐｉＳｃｒｅｅｎ（商標）時間経過Ｔ細胞アッセイを使用してその免疫原性の潜在能力について評価した。ＣＤ８＋欠失ＰＢＭＣを使用してバルク培養物を樹立し、ＣＤ４＋Ｔ細胞増殖を、［３Ｈ］－チミジンの組み込みによる試料の添加の後に種々の時間点で測定した。８日後に、ＥＬＩＳｐｏｔによりＩＬ－２分泌も測定した。ＴＣ４（試料１）及び他の４種の融合タンパク質候補を試験した

。

【０２４７】

【表５】

試料	融合タンパク質名	配列番号
試料 1	TC4-WT (7D12-CDoem3)	19
試料 2	TC4_44 (S12V, T15V, K88R, P89A, I94V, V268A)	182
試料 3	TC4_50 (V13A, K88T, I94R, V268A)	183
試料 4	TC4_51 (G16D, K88T, I94R, V268A)	184
試料 5	TC4_87 (S12V, T15V, K88R, P89A, I94V, V268A, V269T)	185

【０２４８】

ＥｐｉＳｃｒｅｅｎ（商標）時間経過Ｔ細胞増殖アッセイ

欧州／北米及び世界の個体群において発現されたＨＬＡ－ＤＲ及びＨＬＡ－ＤＱアロタイプの数及び頻度を最もよく表すために５２のドナーのコホートを選択した。各ドナー由来のＰＢＭＣをＡＩＭ－Ｖ（登録商標）に、４～６×１０^{6}ＰＢＭＣ／ｍＬに再懸濁した。試験した組換えタンパク質の最終試料濃度は０．３μＭであった。培養液を、合計８日間インキュベーションした。５日目、６日目、７日目及び８日目に、各ウェルの細胞を、１００μＬ　ＡＩＭ－Ｖ（登録商標）培地中で０．７５μＣｉ［３Ｈ］－チミジン（パーキンエルマー（Ｐｅｒｋｉｎ　Ｅｌｍｅｒ）（登録商標）、ビーコンズフィールド（Ｂｅａｃｏｎｓｆｉｅｌｄ）、英国）を用いてパルス処理（瞬間適用）し、さらに１８時間インキュベーションした後でＴｏｍＴｅｃ　Ｍａｃｈ　ＩＩＩ細胞収穫器を使用してフィルターマット（パーキンエルマー（Ｐｅｒｋｉｎ　Ｅｌｍｅｒ）（登録商標）、ビーコンズフィールド（Ｂｅａｃｏｎｓｆｉｅｌｄ）、英国）上に収穫した。各ウェルについてのカウント毎分（ｃｐｍ）を、パラルクス（ｐａｒａｌｕｘ）、低バックグラウンド計数で、１４５０　Ｍｉｃｒｏｂｅｔａ　Ｗａｌｌａｃ　Ｔｒｉｌｕｘ　Ｌｉｑｕｉｄ　Ｓｃｉｎｔｉｌｌａｔｉｏｎ　Ｃｏｕｎｔｅｒ（パーキンエルマー（Ｐｅｒｋｉｎ　Ｅｌｍｅｒ）（登録商標）、ビーコンズフィールド（Ｂｅａｃｏｎｓｆｉｅｌｄ）、英国）でシンチレーション計数により決定した。

【０２４９】

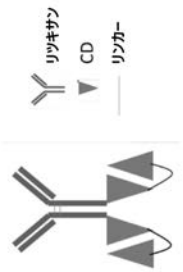
ＥｐｉＳｃｒｅｅｎ（商標）ＩＬ－２　ＥＬＩＳｐｏｔアッセイ

同じドナーのコホート由来のＰＢＭＣを、ＩＬ－２　ＥＬＩＳｐｏｔアッセイのために使用した。ＥＬＩＳｐｏｔプレート（ミリポア（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ）、ワトフォード（Ｗａｔｆｏｒｄ）、英国）を、予め湿らせ、ＩＬ－２捕捉抗体（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ、アビングドン（Ａｂｉｎｇｄｏｎ）、英国）で一晩コーティングした。各ドナーについての細胞密度をＡＩＭ－Ｖ（登録商標）培地中の４～６×１０^{6}ＰＢＭＣ／ｍｌに調整し、１００μＬの細胞を各ウェルに添加した。５０μｌの試料及び対照を適切なウェルに添加した。８日間のインキュベーション期間の後、ＥＬＩＳｐｏｔプレートを製造業者の説明書（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ）に従って現像した。手短に言えば、プレートを、洗浄し、その後でビオチン化検出抗体（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ、アビングドン（Ａｂｉｎｇｄｏｎ）、英国）を添加した。３７℃で１．５時間のインキュベーション後、プレートをＰＢＳ（３回）でさらに洗浄し、濾過し、Ｓｔｒｅｐｔａｖｉｄｉｎ－ＡＰ（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ、アビングドン（Ａｂｉｎｇｄｏｎ）、英国）を１時間添加した（室温でインキュベーション）。Ｓｔｒｅｐｔａｖｉｄｉｎ－ＡＰを捨て、プレートをＰＢＳ（３回）で洗浄した。１００μｌのＢＣＩＰ／ＮＢＴ基質（Ｒ＆Ｄ　Ｓｙｓｔｅｍｓ、アビングドン（Ａｂｉｎｇｄｏｎ）、英国）を各ウェルに添加し、室温で３０分間インキュベーションした。ウェル及びウェルの裏側をｄＨ２Ｏで３回洗浄することにより、スポット現像を停止した。乾燥したプレートをＩｍｍｕｎｏｓｃａｎ（登録商標）Ａｎａｌｙｓｅｒで走査し、ウェルあたりのスポット数（ｓｐｗ）を、Ｉｍｍｕｎｏｓｃａｎ（登録商標）バージョン５ソフトウェアを使用して決定した。

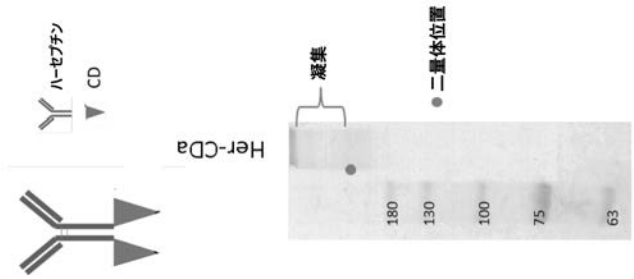
【０２５０】
増殖アッセイ及びＩＬ－２　ＥＬＩＳｐｏｔアッセイについては、１．９以上のＳＩ（ＳＩ≧１．９０）という経験的な閾値が、これまでに確立されており、これにより、この閾値を超える応答を誘導する試料は陽性であるとみなされる。増殖（時間点あたりｎ＝３）及びＥＬＩＳｐｏｔ（ｎ＝６）について、陽性応答を以下のとおりの統計的及び経験的な閾値によって定義した。
１．独立２標本スチューデントｔ検定を使用して試験ウェルのｃｐｍ又はｓｐｗを培地対照ウェルに対して比較することによる、応答の有意性（ｐ＜０．０５）。
【０２５１】
２．ＳＩ≧１．９０、式中、ＳＩ＝試験ウェルの平均（ｃｐｍ又はｓｐｗ）／ベースライン（ｃｐｍ又はｓｐｗ）。
【０２５２】
図１４は、健康なドナーのＴ細胞増殖及びＩＬ－２　ＥＬＩＳｐｏｔ応答の要約を示す。５～８日の時間経過全体の間の増殖（ＳＩ≧１．９０、有意ｐ＜０．０５）（「Ｐ」）、及びＩＬ－２（ＳＩ≧１．９０、有意ｐ＜０．０５）ＥＬＩＳｐｏｔ（「Ｅ」）についての陽性のＴ細胞反応を示す。増殖及びＩＬ－２　ＥＬＩＳｐｏｔアッセイについての陽性応答の頻度を、縦列の底部に百分率として示す。相関は、ＥＬＩＳｐｏｔアッセイでも陽性な増殖応答の百分率として表現されている。
【０２５３】
ＩＬ－２　ＥＬＩＳｐｏｔアッセイにおける陽性応答の低い頻度に起因して、試料のランク付けは、増殖応答のみに基づいている。陽性応答の高い頻度（ＳＩ≧１．９０、ｐ＜０．０５）は、ドナーコホート応答の２５％を有する試料４によって誘導された。試料１、３、及び５は、ドナーコホートの１２％～１５％で陽性応答を誘導し、ドナーの８％が試料２に対して陽性に応答した。試料２は、臨床免疫原性の最小のリスクをもたらした。
【０２５４】
実施例１７．脱免疫化ｓｄＡｂ－ＣＤの機能分析
脱免疫化ＴＣ４変異体のＣＤ活性及びＥＧＦＲ結合活性を分析した。これを図１５に示す。
【０２５５】
ＣＤ活性は、実施例８に記載した方法により評価した。
【０２５６】
ＴＣ４関連タンパク質とＥＧＦＲ－Ｆｃとの結合親和性を、表面プラスモン共鳴（ＳＰＲ）により測定した。ＳＰＲアッセイを、Ｂｉａｃｏｒｅ　Ｔ１００（ジーイーヘルスケア（ＧＥ　Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ））により実施した。２５μｇ／ｍＬの抗ヒトＩｇＧ（Ｆｃ）抗体を固定化緩衝液（１０ｍＭ　ＮａＯＡｃ、ｐＨ５．０）中で希釈した。抗体を、製造プロトコルに従う標準的なアミンカップリング化学により、ＣＭ５チップ（Ｓｅｒｉｅｓ　Ｓ　Ｓｅｎｓｏｒ　Ｃｈｉｐ　ＣＭ５、ＧＥ；カタログ番号：２９１０４９８８）上に固定化した。この手順は、約９０００ＲＵのレベルの固定化を生じる必要がある。移動相はＰＢＳＴであり、フローセル中の温度は、２５℃に維持した。固定化の後、リガンド溶液（ヒトＥＧＦＲ－Ｆｃタンパク質、移動相中の２μｇ／ｍＬ）を、接触時間１２０秒及び流量１０μＬ／分でシステムに注入した。次に、ＰＢＳＴ中で０．７４ｎＭ、２．２２ｎＭ、６．６７ｎＭ、２０ｎＭ及び６０ｎＭに希釈したＴＣ４－ｗｔ又はＴＣ４－変異体を、低濃度から高濃度の順にシステムに注入した。アナライト注入のための条件は、各濃度について接触時間１２０秒であり、最終工程で試料を６００秒間解離させる。分析を、Ｂｉａｃｏｒｅ　Ｔ１００評価ソフトウェアを用いて実施した。各試料についての１回サイクルの反応速度論アナライトの解析結果を２状態反応によってフィッティングし、K_D値を決定した。結果評価基準は、最大応答（R_{max}）が５０～２５０ＲＵの範囲にある必要があることであった。
【０２５７】
データは、ＴＣ４変異体ＴＣ４－４４、ＴＣ４－５０、ＴＣ４－５１及びＴＣ４－８７

のＥＧＦＲ結合能力及びＣＤ活性は野生型ＴＣ４と比べて同等であるということを示唆した（図１５）。

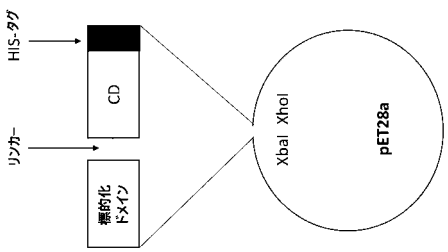
【図１Ａ】



【図１Ｂ】



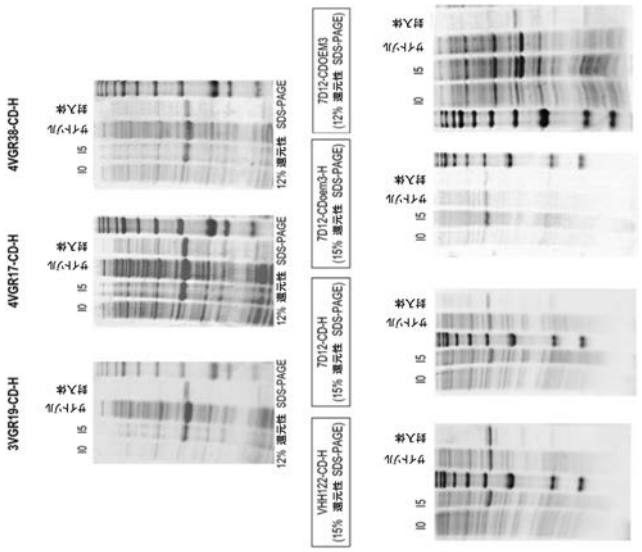
【図２Ａ】



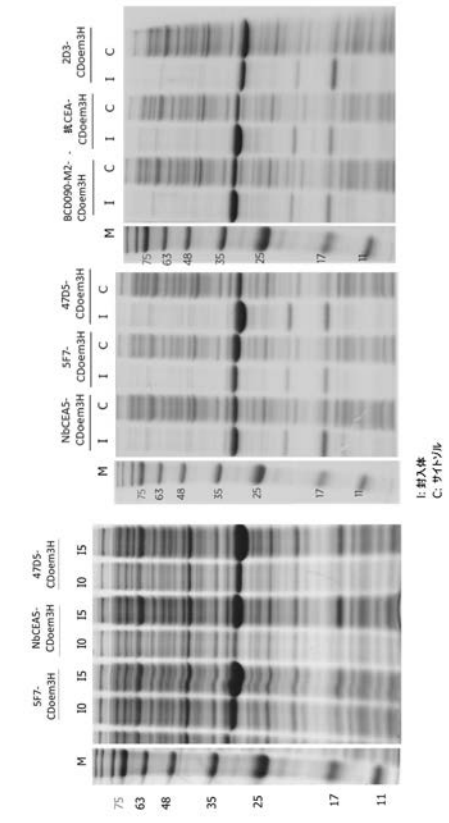
【図２Ｂ】

抗原	標的化ドメイン	標的化ドメインの種類	融合タンパク質名	配列番号	発現系	生物化学的特性解析			5L	CD	抗原結合活性
						溶解性 / ハカール力価 (μg/mL)	純度	発酵槽力価			
VEGFR2	3VGR19	sdAb (VHH)	3VGR19-CD-H	7	SHuffle® T7 express	可溶性 / ~19	v	375 mg/L	v	v	v
	3VGR10		3VGR10-CD-H	86		可溶性 / ~ 6.2	v		v	v	
	3VGR17		3VGR17-CD-H	87		可溶性 / ~ 10	v		v	v	
	4VGR17		4VGR17-CD-H	9		可溶性 / ~19	v	405 mg/L	v	v	
	4VGR38		4VGR38-CD-H	11		可溶性 / ~20	v		v	v	
EGFR	DOM-16-39		DOM-16-39-CD-H	88		可溶性 / N/A	v		v	v	
	V122		VH122-CD-H	13		可溶性 / 9.2	v		v	v	
	7D12		7D12-CD-H	15		可溶性 / 7.5	v	211 mg/L	v	v	
	7D12		7D12-CDoem3-H	17		可溶性 / 8.1	v	259 mg/L	v	v	
	7D12		7D12-CDoem3	19		可溶性 / 7.8	v	163 mg/L	v	v	
Her2	5F7		5F7-CDoem3-H	73		可溶性 / 39	v		v	v	
	47D5		47D5-CDoem3-H	74		可溶性 / 4.5	v		v	v	
	2D3		2D3-CDoem3-H	72		可溶性 / 38	v		v	v	
CEA	NbCEA5		NbCEA5-CDoem3-H	80		可溶性 / 15.2	v		v	v	
	抗CEA		抗CEA-CDoem3-H	78		可溶性 / 11.3	v		v	v	
Her3	BCD0090-M2		BCD0090-M2-CDoem3-H	76		可溶性 / 29	v		v	v	
EGFR	GE10	抗原結合断片	GE10-CD-H	81	T7 express	可溶性	凝集、分解		v	低	
	GE11		GE11-CD-H	82		可溶性	v		v	活性なし	
	Inherbin1		Inherbin1-CD-H	83		可溶性	二量体又は多量体		v	活性なし	
	Inherbin3		Inherbin3-CD-H	84		可溶性	凝集、二量体又は多量体		v	低	
α5-インテグリン	エンドスタチン	成熟タンパク質	Endo-CD	85		可溶性ではない	N/D		v	N/D	

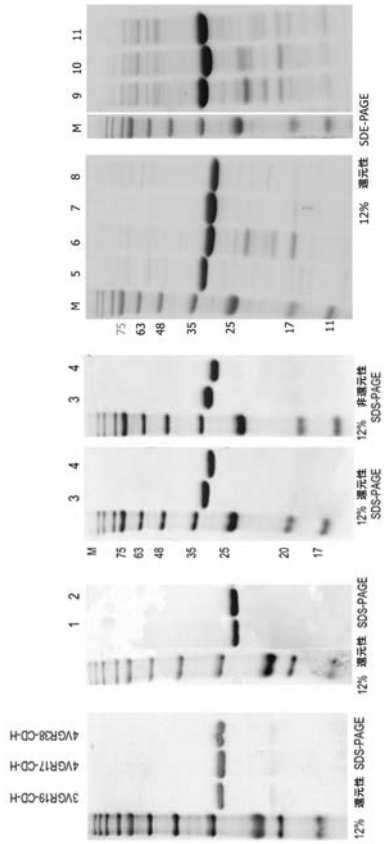
【図２Ｃ】



【図２Ｄ】

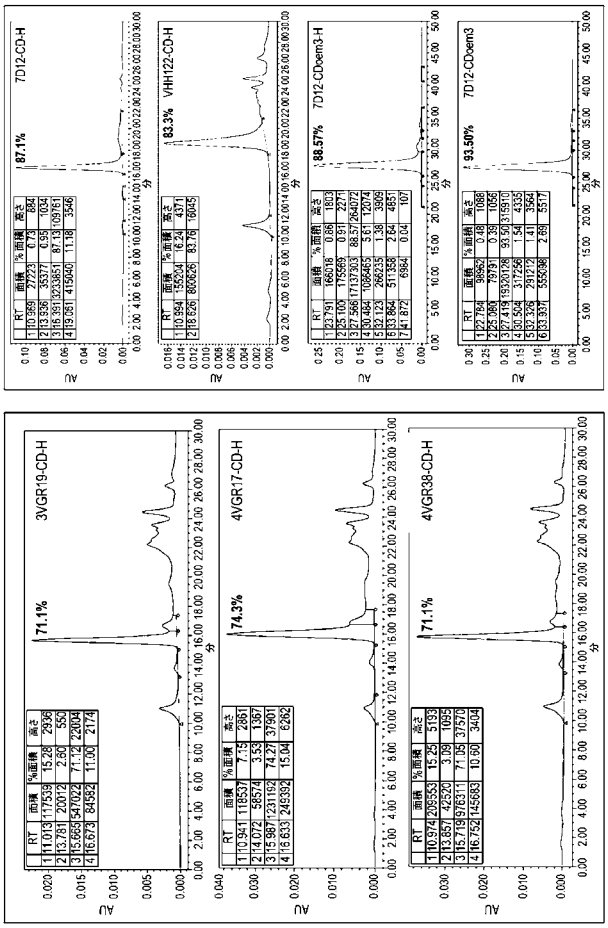


【図３】

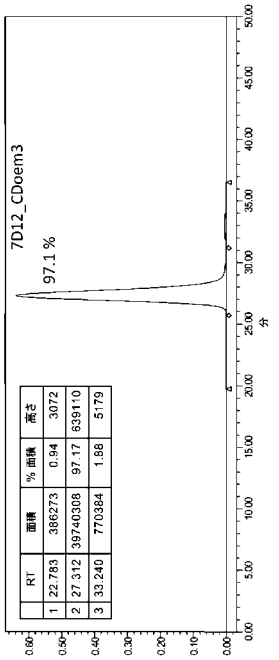


番号	試料
1	VHH12-CD-H
2	7D12-CD-H
3	7D12-CDoem3-H (TC3)
4	7D12-CDoem3 (TC4)
5	TC3
6	NbCEA5-CDoem3H
7	5F7-CDoem3H
8	47D5-CDoem3H
9	BCD090-M2-CDoem3H
10	2D3-CDoem3H
11	抗CEA-CDoem3H

【図４Ａ】

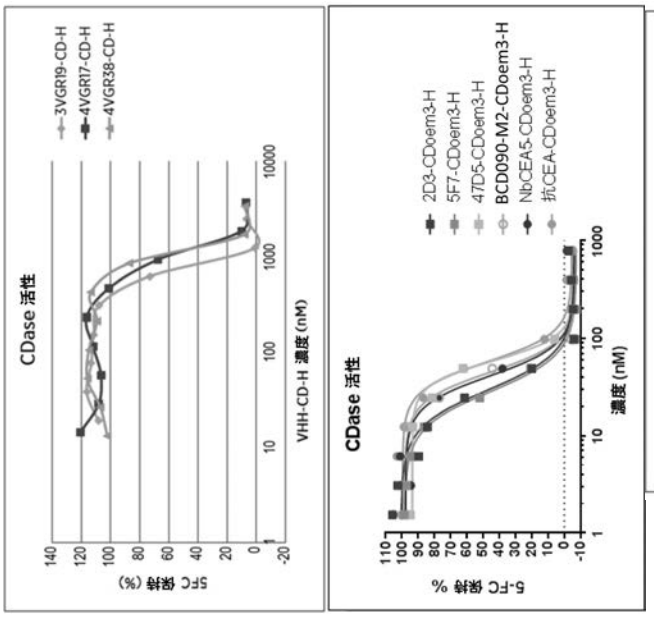


【図４Ｂ】

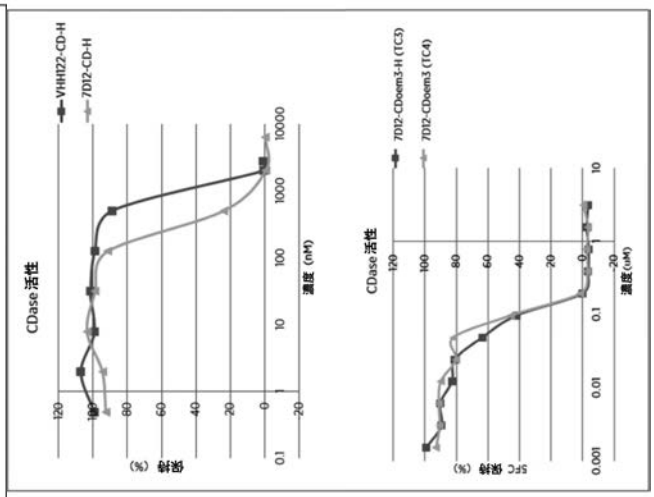


	RT	面積	% 面積	高さ
1	22.783	386273	0.94	3072
2	27.312	39740308	97.17	639110
3	33.240	770384	1.88	5179

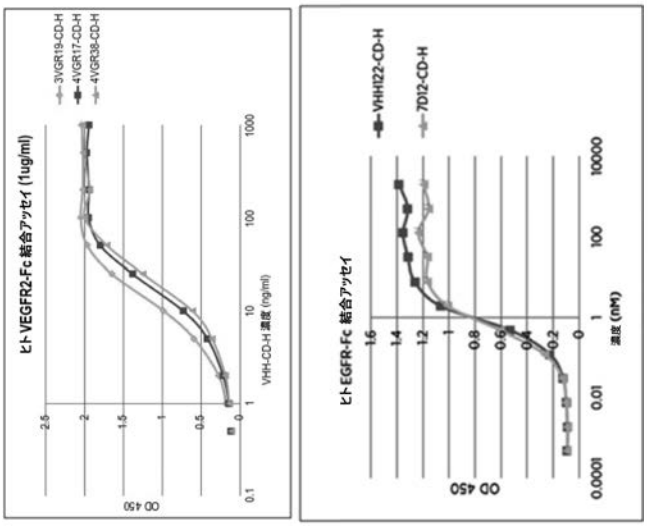
【図５Ａ】



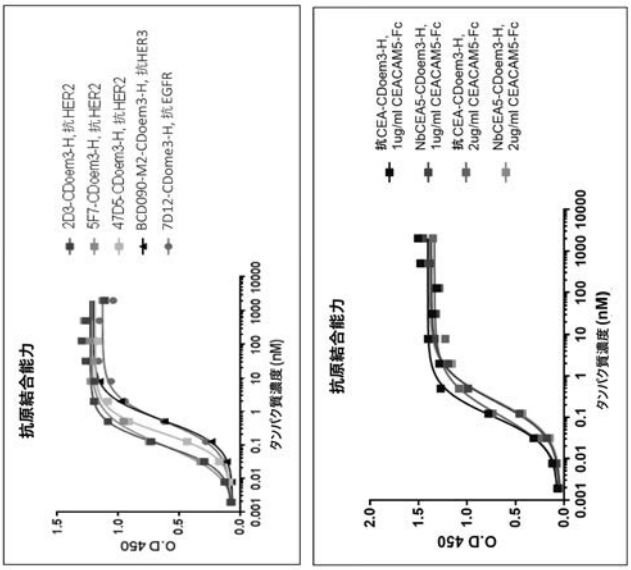
【図５Ｂ】



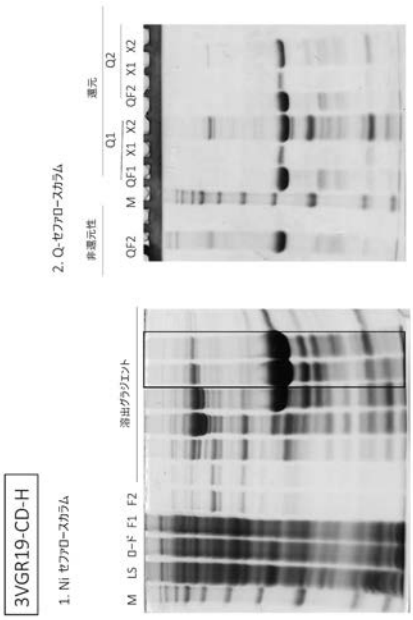
【図６Ａ】



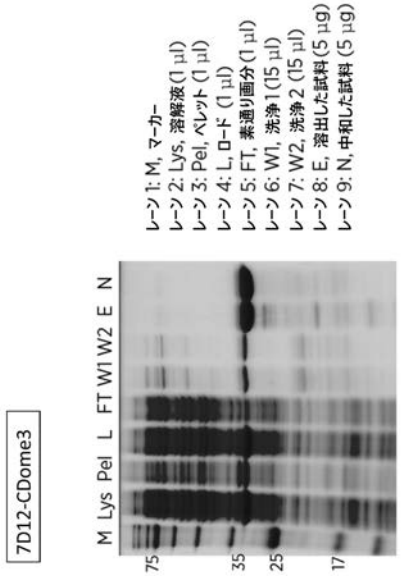
【図６Ｂ】



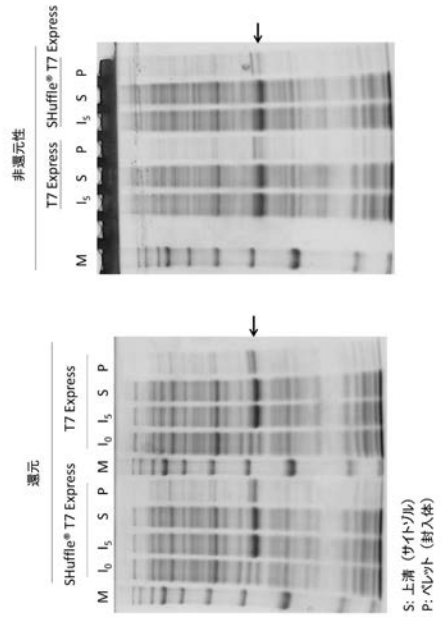
【図７Ａ】



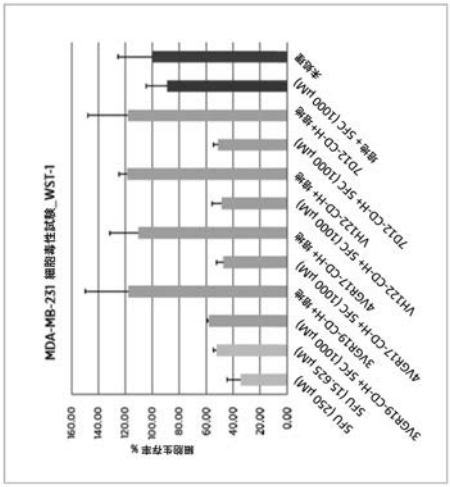
【図７Ｂ】



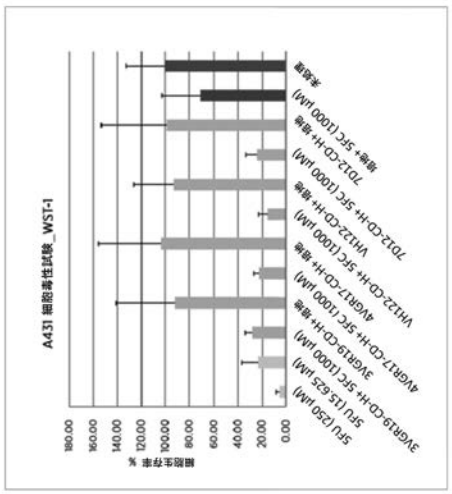
【図８】



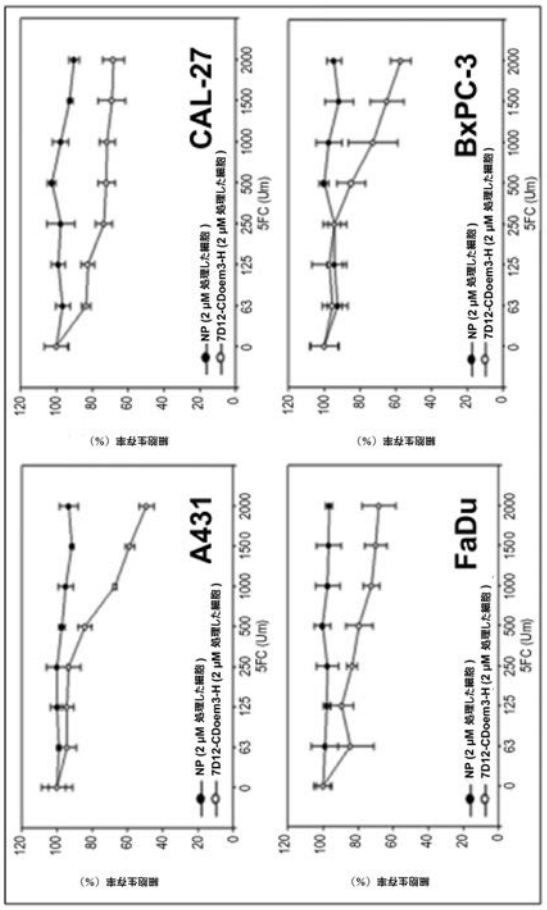
【図９Ａ】



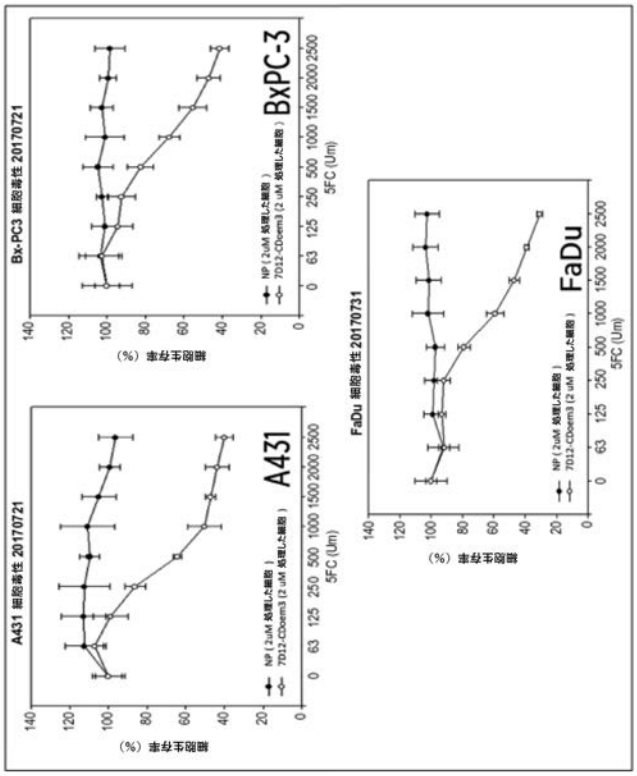
【図９Ｂ】



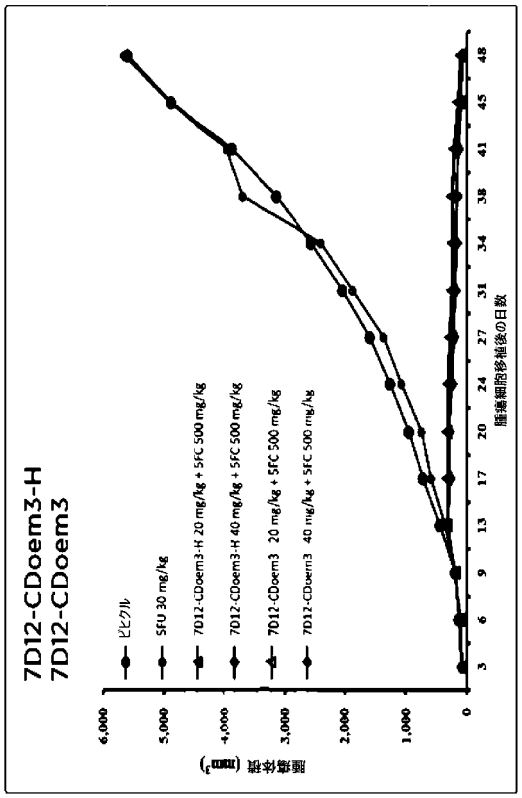
【図１０Ａ】



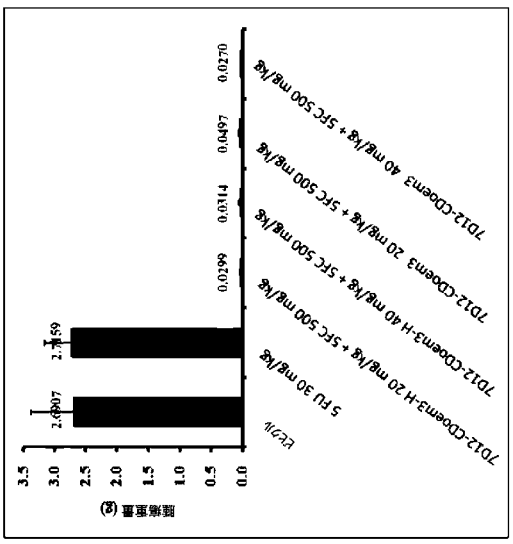
【図１０Ｂ】



【図１１Ａ】



【図１１Ｂ】



【図１２】

コード	精製収率 (mg/mL)	CDase 活性 (EC50, μM)	EGFR 結合能力 (EC50, nM)		
TC3-001, S12V	2.356	NT	0.115	0.118	NT
TC3-002, V13A	1.085	NT	0.122	NT	NT
TC3-003, T15V	2.538	NT	0.129	NT	NT
TC3-004, G16D	0.884	NT	0.146	NT	NT
TC3-005, S18D	0.437	NT	0.154	NT	NT
TC3-006, S18E	0.414	NT	0.14	NT	NT
TC3-007, K88R	0.464	NT	0.152	NT	NT
TC3-008, P89A	0.554	NT	0.12	NT	NT
TC3-009, K88A	0.357	NT	0.084	0.168	NT
TC3-010, K88D	0.692	NT	0.083	0.138	NT
TC3-011, K88S	0.74	NT	0.094	0.172	NT
TC3-012, K88T	1.034	NT	0.08	0.115	NT
TC3-013, P89D	0.082 0.377	NT	0.089	0.388	0.062
TC3-014, P89E	0.322	NT	0.13	NT	NT
TC3-015, T92D	0.379	NT	0.095	0.149	NT
TC3-016, T92E	0.672	NT	0.094	0.144	NT
TC3-017, T92G	0.489	NT	0.105	0.125	NT
TC3-018, T92H	0.293	NT	0.109	0.143	NT
TC3-019, T92Q	0.443	NT	0.116	NT	NT
TC3-020, A93D	0.105 0.1	NT	0.081	0.175	0.205
TC3-021, A93E	NT	NT	NT	NT	NT
TC3-022, I94V	0.801	NT	0.056	0.083	NT
TC3-023, I94A	0.447	NT	0.103	0.096	NT
TC3-024, I94T	0.627	NT	0.129	NT	NT
TC3-025, I94R	0.783	NT	0.12	NT	NT
TC3-026, I94Q	0.636	NT	0.094	0.1	NT
TC3-027, I94N	0.635	NT	0.124	NT	NT
TC3-028, Y224A	0.351	1.49	NT		
TC3-029, Y224H	0.176	0.29	NT		
TC3-030, T225D	0.433	-	NT		
TC3-031, T226E	0.379	-	NT		
TC3-032, M232N	0.431	-	NT		
TC3-033, M232A	0.543	-	NT		
TC3-034, M232K	0.547	-	NT		
TC3-035, M232Q	0.259	-	NT		
TC3-036, V268A	1.21	0.07	NT		
TC3-037, V268T	1.388	0.07	NT		
TC3-038, V269A	1.085	0.11	NT		
TC3-039, V269L	0.984	0.1	NT		
TC3-040, V269I	0.656	0.09	NT		
TC3-041, V269T	0.88	0.08	NT		
TC3-042, V270A	0.574	0.24	NT		
TC3-043, V270T	0.734	0.12	NT		
TC3	0.691 0.763 0.607	0.05 0.07	0.072 0.109	0.104	0.078

【図１３Ａ】

コード	エピトープ 1	エピトープ 2	エピトープ 3	エピトープ 6	精製収率 (mg/mL)	rhEGFR結合 (EC50: nM)	CDase活性 (EC50: nM)
TC3-044	S12V, T15V	K88R, P89A, I94V		V268A	1.081	0.02	0.06
TC3-045	S12V, T15V	K88R, P89A, I94V		V268T	0.125	0.16	0.5
TC3-046	S12V, T15V	K88R, P89A, I94V		V269T	0.549	0.08	0.09
TC3-047	V13A	K88D	I94R	V268A	0.518	0.07	0.11
TC3-048	G16D	K88D	I94R	V268A	0.355	0.05	0.05
TC3-049	S18D	K88D	I94R	V268A	0.019	NT	NT
TC3-050	V13A	K88T	I94R	V268A	0.026	NT	NT
TC3-051	G16D	K88T	I94R	V268A	0.399	0.04	0.05
TC3-052	S18D	K88T	I94R	V268A	0.118	0.08	0.14
TC3-053	V13A	K88D	I94Q	V268A	0.043	NT	NT
TC3-054	G16D	K88D	I94Q	V268A	0.104	0.16	0.28
TC3-055	S18D	K88D	I94Q	V268A	0.032	NT	NT
TC3-056	V13A	K88T	I94Q	V268A	0.033	NT	NT
TC3-057	G16D	K88T	I94Q	V268A	0.274	0.04	0.07
TC3-058	S18D	K88T	I94Q	V268A	0.127	0.08	0.14
TC3-059	V13A	K88D	I94R	V268T	0.017	NT	NT
TC3-060	G16D	K88D	I94R	V268T	0.223	0.1	0.14
TC3-061	S18D	K88D	I94R	V268T	0.052	NT	NT
TC3-062	V13A	K88T	I94R	V268T	0.026	NT	NT
TC3-063	G16D	K88T	I94R	V268T	0.182	0.12	0.15
TC3-064	S18D	K88T	I94R	V268T	0.174	0.1	0.14
TC3-065	V13A	K88D	I94Q	V268T	0.07	NT	NT
TC3-066	G16D	K88D	I94Q	V268T	0.107	0.2	1.42
TC3-067	S18D	K88D	I94Q	V268T	0.013	NT	NT
TC3-068	V13A	K88T	I94Q	V268T	0.021	NT	NT
TC3-069	G16D	K88T	I94Q	V268T	0.341	0.09	0.12
TC3-070	S18D	K88T	I94Q	V268T	0.014	NT	NT
TC3-071	V13A	K88D	I94R	V269T	0.023	NT	NT
TC3-072	G16D	K88D	I94R	V269T	0.168	0.16	0.55
TC3-073	S18D	K88D	I94R	V269T	0.019	NT	NT
TC3-074	V13A	K88T	I94R	V269T	0.017	NT	NT
TC3-075	G16D	K88T	I94R	V269T	0.343	0.14	0.14
TC3-076	S18D	K88T	I94R	V269T	0.114	0.15	1.7
TC3-077	V13A	K88D	I94Q	V269T	0.101	0.34	NA
TC3-078	G16D	K88D	I94Q	V269T	0.019	NT	NT
TC3-079	S18D	K88D	I94Q	V269T	0.044	NT	NT
TC3-080	V13A	K88T	I94Q	V269T	0.043	NT	NT
TC3-081	G16D	K88T	I94Q	V269T	0.21	0.1	0.29
TC3-082	S18D	K88T	I94Q	V269T	0.051	NT	NT
TC_WT					0.018	NT	NT
					0.212	0.09	0.15
					0.301	0.09	0.17

【図１３Ｂ】

コード	エピトープ 1	エピトープ 2	エピトープ 3	エピトープ 4	エピトープ 6	精製後の収率 (mg/200mL バッチ)	rhEGFR 結合 (EC50:nM)	CDase 活性 (EC50:nM)	SEC-HPLC RT (27分) 主ピーク
TC3-044	S12V, T15V	K88R, P89A, I94V			V268A	7.5	0.07	10.35	89.34
TC3-087	S12V, T15V	K88R, P89A, I94V			V268A, V269T	5.6	0.07	10.32	81.37
TC3-088	S12V, T15V	K88R, P89A, I94V		Y224H	V268A	5.9	0.08	11.95	72.9
TC3-047	V13A	K88D	I94R		V268A	0.9	0.1	11.27	83.98
TC3-050	V13A	K88T	I94R		V268A	3.3	0.13	13.42	78.38
TC3-089	V13A	K88T	I94R		V268A, V269T	1.5	0.12	15.62	66.2
TC3-090	V13A	K88T	I94R	Y224H	V268A	2.3	0.11	12.17	72.09
TC3-051	G16D	K88T	I94R		V268A	1.9	0.11	12.13	88.35
TC3-052	S18D	K88T	I94R		V268A	1.9	0.1	10.77	93.97
TC3-056	V13A	K88T	I94Q		V268A	0.9	0.1	11.59	81.39
TC3 WT						2.1	0.14	13.44	86.94

【図１４】

	試料 1	試料 2	試料 3	試料 4	試料 5	エキセナチド	KLH
ドナー 1							PE
ドナー 2				P			PE
ドナー 3							PE
ドナー 4							PE
ドナー 5							PE
ドナー 6							PE
ドナー 7				P		P	PE
ドナー 8							PE
ドナー 9						P	PE
ドナー 10	PE	P	P	P	PE		PE
ドナー 11							PE
ドナー 12							PE
ドナー 13	P					P	PE
ドナー 14				P	P	P	PE
ドナー 15		P	P	P			PE
ドナー 16				P	P	P	PE
ドナー 17							E
ドナー 18							PE
ドナー 19							PE
ドナー 20							PE
ドナー 21							PE
ドナー 22	P			P	P		PE
ドナー 23					P		PE
ドナー 24							PE
ドナー 25				P		P	PE
ドナー 26						P	PE
ドナー 27							PE
ドナー 28						P	P
ドナー 29							PE
ドナー 30	PE			PE		PE	PE
ドナー 31	P					PE	PE
ドナー 32			P		P	P	PE
ドナー 33						P	PE
ドナー 34			E			P	PE
ドナー 35						P	PE
ドナー 36					E	PE	PE
ドナー 37				P			PE
ドナー 38				P		P	PE
ドナー 39						PE	PE
ドナー 40							P
ドナー 41						P	PE
ドナー 42				E			PE
ドナー 43							P
ドナー 44						P	PE
ドナー 45		E			P		
ドナー 46							P
ドナー 47	P	P	P			P	PE
ドナー 48	P	PE	P	PE		P	P
ドナー 49						P	PE
ドナー 50	PE	E	P	PE	PE	P	PE
ドナー 51						P	PE
ドナー 52							PE
増殖 %	15	8	12	25	15	46	96
ELISpot %	6	6	2	8	6	8	88
増殖及び ELISpot %	6	2	0	6	4	8	87
相関 %	38	25	0	23	25	17	90

【図１５】

CD活性	TC4-WT	TC4-44	TC4-50	TC4-51	TC-87
EC50 (nM)	33.3	23.43	19.67	16.35	24.45

試料	ka1(1/Ms)	kd1(1/s)	ka2(1/s)	kd2(1/s)	KD(M)
TC4-WT	2.15E+06	0.04414	0.009098	2.71E-04	**5.93E-10**
TC4-WT	1.22E+06	0.03604	0.007203	2.71E-04	**1.07E-09**
TC4-44	1.05E+06	0.05938	0.01108	1.86E-04	**9.35E-10**
TC4-50	6.90E+05	0.08054	0.01145	2.01E-04	**2.02E-09**
TC4-51	6.96E+05	0.07411	0.01099	2.13E-04	**2.03E-09**
TC4-87	7.63E+05	0.05579	0.008993	1.58E-04	**1.27E-09**

【配列表】
2021511013000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/IB2019/000013

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 14/725(2006.01)i; C07K 16/28(2006.01)i; C07K 16/32(2006.01)i; C12N 9/78(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K; C12N; A61P

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)

CNMED;CPRSABS;CNABS;DWPI;SIPOABS;CNTXT;WOTXT;EPTXT;JPTXT;CNKI;Pubmed;ISI Web of Knowledge; Genbank;EMBL-EBI;China patented sequences searching system: cytosine deaminase, CD, fusion, linker, antibody, sdAb, ScFv, Fab, antigen-binding, vhh, cytosine, 3VGR19, 4VGR17, 4VGR38, VHH122, 7D12, 2D3, 5F7, 47D5, BCD090-M2, ABS29544.1, NbCEA5, sequence search based on SEQ ID NOs:7-42, 72-80, 182-216

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	FANG J. et al. "Construction and expression of fusion gene of single chain Fv against human colorectal carcinomaWorld Chin J Digestol" *World Chin J Digestol,* Vol. 11, No. 3, 31 March 2003 (2003-03-31), pages 289-293 see the abstract	1(partially), 2-46, 49-72(partially)
Y	ZAMBONI S. et al. "Genetic construction, expression, and characterization of a single chain anti-CEA antibody fused to cytosine deaminase from yeast" *INTERNATIONAL JOURNAL OF ONCOLOGY,* Vol. 32, No. 6, 30 June 2008 (2008-06-30), pages 1245-1251 see the abstract	1(partially), 2-46, 49-72(partially)
Y	BEHDANI M. et al. "Generation and characterization of a functional Nanobody against the vascular endothelial growth factor receptor-2; angiogenesis cell receptor" *Molecular Immunology,* Vol. 50, 29 December 2011 (2011-12-29), pages 35-41 see Figure 2	1-11(partially), 12, 14-17, 30-35(partially), 36, 37, 46(partially) and 49-72(partially)

☑ 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	Date of mailing of the international search report
10 October 2019	**27 December 2019**
Name and mailing address of the ISA/CN **National Intellectual Property Administration, PRC** **6, Xitucheng Rd., Jimen Bridge, Haidian District, Beijing** **100088** **China**	Authorized officer **LI,Kangqi**
Facsimile No. **(86-10)62019451**	Telephone No. **62411034**

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2015)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/IB2019/000013

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	GOTTLIN E.B. et al. "Isolation of Novel EGFR-Specific VHH Domains" *Journal of Biomolecular Screening*, Vol. 14, No. 1, 31 January 2009 (2009-01-31), pages 77-85 see Table 1 and Figure 5	1-11(partially), 13(partially), 18(partially), 19, 30-35(partially), 38-39(partially), 46(partially) and 49-72(partially)
Y	GAINKAM L.O.T. et al. "Comparison of the Biodistribution and Tumor Targeting of Two 99mTc-Labeled Anti-EGFR Nanobodies in Mice, Using Pinhole SPECT/Micro-CT" *THE JOURNAL OF NUCLEAR MEDICINE*, Vol. 49, No. 5, 31 May 2008 (2008-05-31), pages 788-795 see Figure 1.	1-11(partially), 13(partially), 18(partially), 20, 30-35(partially), 38-39(partially), 46(partially) and 49-72(partially)
Y	US 2011028695 A1 (REVETS HILDE ADI PIERRETTEet al.) 03 February 2011 (2011-02-03) see Figures 6 and 7	1-11(partially), 21-24, 30-35(partially), 40-43, 46(partially) and 49-72(partially)
PY	ELISEEV I.E. et al. "Crystal structures of a llama VHH antibody BCD090-M2 targeting human ErbB3 receptor." *F1000 Research*, Vol. 7, 16 January 2018 (2018-01-16), Article 57 see Figure 4	1-11(partially), 25, 26, 30-35(partially), 40-41(partially), 46(partially) and 49-72(partially)
Y	DONG B. et al. "A novel bispecific antibody, BiSS, with potent anticancer activities." *Cancer Biology & Therapy*, Vol. 17, No. 4, 01 March 2016 (2016-03-01), Pages 364-370 see page 365, the left column, paragraph 2	1-11(partially), 27(partially), 28, 30-35(partially), 44-46(partially) and 49-72(partially)
Y	VANEYCKEN I. et al. "In Vitro Analysis and In Vivo Tumor Targeting of a Humanized, Grafted Nanobody in Mice Using Pinhole SPECT/Micro-CT." *THE JOURNAL OF NUCLEAR MEDICINE*, Vol. 51, No. 7, 16 June 2010 (2010-06-16), pages 1099-1106 see Figure 1	1-11(partially), 27(partially), 29, 30-35(partially), 44-46(partially) and 49-72(partially)
A	FANG J. et al. "Construction and expression of fusion gene of single chain Fv against human colorectal carcinomaWorld Chin J Digestol" *World Chin J Digestol*, Vol. 11, No. 3, 31 March 2003 (2003-03-31), pages 289-293 see the whole document	47(partially)
A	ZAMBONI S. et al. "Genetic construction, expression, and characterization of a single chain anti-CEA antibody fused to cytosine deaminase from yeast" *INTERNATIONAL JOURNAL OF ONCOLOGY*, Vol. 32, No. 6, 30 June 2008 (2008-06-30), pages 1245-1251 see the whole document	47(partially)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/IB2019/000013

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

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/IB2019/000013

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.: **50-58**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

[1] Although claims 50-58 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the composition.

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] 1. Claims 1-12(partially), 14(partially), 15, 30-37(partially) , 46(partially) and 49-72(partially), relate to a fusion protein comprising 3VGR19 sdAb.

[2] 2. Claims 1-12(partially), 14(partially), 16, 30-37(partially) , 46(partially) and 49-72(partially), relate to a fusion protein comprising 4VGR17 sdAb.

[3] 3. Claims 1-12(partially), 14(partially), 17, 30-37(partially) , 46(partially) and 49-72(partially), relate to a fusion protein comprising 4VGR38 sdAb.

[4] 4. Claims 1-11(partially), 13(partially), 18(partially), 19, 30-35(partially) , 38-39(partially), 46(partially) and 49-72(partially), relate to a fusion protein comprising VHH122 sdAb.

[5] 5. Claims 1-11(partially), 13(partially), 18(partially), 20, 30-35(partially) , 38-39(partially), 46(partially) and 49-72(partially), relate to a fusion protein comprising 7D12 sdAb.

[6] 6. Claims 1-11(partially), 21(partially), 22, 30-35(partially), 40-41(partially), 46(partially) and 49-72(partially), relate to a fusion protein comprising 2D3 sdAb.

[7] 7. Claims 1-11(partially), 21(partially), 23, 30-35(partially), 40-41(partially), 46(partially) and 49-72(partially), relate to a fusion protein comprising 5F7 sdAb.

[8] 8. Claims 1-11(partially), 21(partially), 24, 30-35(partially), 40-41(partially), 46(partially) and 49-72(partially), relate to a fusion protein comprising 47D5 sdAb.

[9] 9. Claims 1-11(partially), 25, 26, 30-35(partially), 42, 43, 46(partially) and 49-72(partially), relate to a fusion protein comprising 47D5 sdAb.

[10] 10. Claims 1-11(partially), 27(partially), 28, 30-35(partially), 44-46(partially) and 49-72(partially), relate to a fusion protein comprising ABS29544.1 sdAb.

[11] 11. Claims 1-11(partially), 27(partially), 29, 30-35(partially), 44-46(partially) and 49-72(partially), relate to a fusion protein comprising NbCEA5 sdAb.

[12] 12. Claims 1(partially), 47(partially) and 49-72(partially), relate to a fusion protein consists essentially of an amino acid sequence of SEQ ID NO: 93.

[13] 13. Claims 1(partially), 47(partially) and 49-72(partially), relate to a fusion protein consists essentially of an amino acid sequence of SEQ ID NO: 94.

[14] 14. Claims 1(partially), 47(partially) and 49-72(partially), relate to a fusion protein consists essentially of an amino acid sequence of SEQ ID NO: 95.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/IB2019/000013

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

[15] ……

[16] 100. Claims 1(partially), 47(partially) and 49-72(partially), relate to a fusion protein consists essentially of an amino acid sequence of SEQ ID NO: 181.

[17] 101. Claims 1(partially) and 48-72(partially), relate to a fusion protein consists essentially of an amino acid sequence of SEQ ID NO: 182.

[18] 102. Claims 1(partially) and 48-72(partially), relate to a fusion protein consists essentially of an amino acid sequence of SEQ ID NO: 183.

[19] 103. Claims 1(partially) and 48-72(partially), relate to a fusion protein consists essentially of an amino acid sequence of SEQ ID NO: 184.

[20] 104. Claims 1(partially) and 48-72(partially), relate to a fusion protein consists essentially of an amino acid sequence of SEQ ID NO: 185.

[21] The common inventive concept unifying the inventions above can be seen in the provision of the fusion protein comprising a sdAb, a linker and a cytosine deaminase. However, the prior art (ZAMBONI S. et al., Genetic construction, expression, and characterization of a single chain anti-CEA antibody fused to cytosine deaminase from yeast, International Journal of Oncology, 1 June 2008(01.06.2008), volume 32, pages 1245-1251) has already disclosed a fusion protein comprising a scFv against CEA antigen, a linker and a cytosine deaminase (see abstract). And it is common practice to substitute sdAb for scFv. Therefore, a fusion protein comprising a sdAb, a linker and a cytosine deaminase is obvious to a person skilled in the art. Therefore, said common inventive concept no more exists, and the inventions are not so linked as to form a single general inventive concept, as required by PCT Rule 13.1.

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 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.: **1(partially), 2-46, 47(partially), 49-72(partially), which relate to sdAb-CD fusion proteins comprising 3VGR19, 4VGR17, 4VGR38, VHH122, 7D12, 2D3, 5F7, 47D5, BCD090-M2, ABS29544.1, NbCEA5 or TC3-001 S12V sdAb.**

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.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/IB2019/000013

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
US 2011028695 A1	03 February 2011	US 9969805 B2	15 May 2018
		WO 2009068630 A1	04 June 2009
		US 2015232562 A1	20 August 2015
		WO 2009068625 A3	06 August 2009
		WO 2009068625 A2	04 June 2009
		AU 2008328785 A1	04 June 2009
		CN 101970490 A	09 February 2011
		EP 2220120 A2	25 August 2010
		EP 2215123 A1	11 August 2010
		AU 2008328784 A1	04 June 2009
		US 8975382 B2	10 March 2015
		ZA 201004057 B	28 April 2011
		EP 2215125 A1	11 August 2010
		US 2011059090 A1	10 March 2011
		CA 2705890 A1	04 June 2009
		JP 2011504740 A	17 February 2011
		EP 2650311 A3	04 June 2014
		EP 2650311 A2	16 October 2013
		AU 2008328779 A1	04 June 2009
		AU 2008328781 A1	04 June 2009
		KR 20100097716 A	03 September 2010
		US 2011053865 A1	03 March 2011
		CA 2706200 A1	04 June 2009
		BR PI0819656 A2	23 June 2015
		AU 2008328784 B2	27 March 2014
		IL 205734 D0	30 November 2010
		MX 2010005783 A	10 August 2010
		CA 2706675 A1	04 June 2009
		US 2011189203 A1	04 August 2011
		AU 2008328779 B2	05 June 2014
		WO 2009068627 A3	01 October 2009
		CA 2706425 A1	04 June 2009
		EP 2225278 A2	08 September 2010
		WO 2009068627 A2	04 June 2009
		WO 2009068628 A1	04 June 2009
		WO 2009068631 A1	04 June 2009

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (January 2015)

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			FI			テーマコード（参考）
C07K	*16/28*	*(2006.01)*	C07K	16/28		4C085
C12N	*15/12*	*(2006.01)*	C12N	15/12		4C086
C12N	*15/13*	*(2006.01)*	C12N	15/13		4H045
C12N	*15/63*	*(2006.01)*	C12N	15/63	Z	
C12N	*1/15*	*(2006.01)*	C12N	1/15		
C12N	*1/19*	*(2006.01)*	C12N	1/19		
C12N	*1/21*	*(2006.01)*	C12N	1/21		
C12N	*5/10*	*(2006.01)*	C12N	5/10		
C12P	*21/02*	*(2006.01)*	C12P	21/02	C	
C12N	*15/55*	*(2006.01)*	C12N	15/55		
A61P	*35/00*	*(2006.01)*	A61P	35/00		
A61P	*43/00*	*(2006.01)*	A61P	43/00	121	
A61K	*41/00*	*(2020.01)*	A61P	43/00	123	
A61K	*45/00*	*(2006.01)*	A61K	41/00		
A61K	*31/513*	*(2006.01)*	A61K	45/00		
A61K	*38/43*	*(2006.01)*	A61K	31/513		
A61K	*39/395*	*(2006.01)*	A61K	38/43		
A61K	*47/68*	*(2017.01)*	A61K	39/395	D	
A61K	*47/65*	*(2017.01)*	A61K	39/395	N	
			A61K	39/395	C	
			A61K	39/395	L	
			A61K	39/395	E	
			A61K	39/395	T	
			A61K	47/68		
			A61K	47/65		

(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

（特許庁注：以下のものは登録商標）
１．ＴＷＥＥＮ

(74)代理人　100120891
弁理士　林　一好
(74)代理人　100165157
弁理士　芝　哲央
(74)代理人　100126000
弁理士　岩池　満
(72)発明者　チェン　ペイージウン
台湾　１１５０３　タイペイ，　ナンガン　ディストリクト，　パーク　ストリート，　ナンバー　３－２，　４エフ
(72)発明者　リー　シューーフア

台湾　１１５０３　タイペイ，　ナンガン　ディストリクト，　パーク　ストリート，　ナンバー３－２，　４エフ

Ｆターム(参考) 4B050 CC03 DD04 LL01
4B064 AG01 AG26 CA19 CC24 DA01
4B065 AA01X AA57X AA72X AA72Y AA87X AA90Y AB01 AC14 AC20 BA02 CA25 CA31 CA44
4C076 AA12 AA95 CC27 CC41 DD23 DD23D DD26 DD26Z EE41 EE59
4C084 AA02 AA03 AA07 AA11 AA19 BA01 BA08 BA22 BA23 BA41 CA04 CA05 CA53 CA56 DC01 MA02 MA55 NA05 NA13 NA15 ZB261 ZB262 ZC192 ZC751
4C085 AA13 AA14 AA22 AA25 BB44 CC22 CC23 EE01 EE03 GG02 GG03 GG04 GG05 GG06 GG08
4C086 AA01 AA02 BC42 MA02 MA03 MA04 MA05 NA05 NA13 NA15 ZB26 ZC75
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 BA50 CA40 DA75 DA89 EA20 FA74 GA26 GA31