

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2025-503512
(P2025-503512A)

(43)公表日 令和7年2月4日(2025.2.4)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
C 0 7 K	16/30 (2006.01)	C 0 7 K	16/30	Z N A	4 B 0 6 3
C 0 7 K	16/28 (2006.01)	C 0 7 K	16/28		4 B 0 6 4
C 1 2 P	21/08 (2006.01)	C 1 2 P	21/08		4 C 0 7 6
C 0 7 K	16/46 (2006.01)	C 0 7 K	16/46		4 C 0 8 4
C 1 2 Q	1/02 (2006.01)	C 1 2 Q	1/02		4 C 0 8 5
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全209頁) 最終頁に続く
(21)出願番号	特願2024-538656(P2024-538656)	(71)出願人	524238213		
(86)(22)出願日	令和4年12月22日(2022.12.22)		エンラザ セラピューティクス, インク.		
(85)翻訳文提出日	令和6年7月31日(2024.7.31)		アメリカ合衆国 9 2 0 3 7 カリフォル		
(86)国際出願番号	PCT/US2022/082277		ニア州 ラ・ホーヤ ノース・トーリー・		
(87)国際公開番号	WO2023/122753		パインズ・ロード 1 1 0 9 9 スイート		
(87)国際公開日	令和5年6月29日(2023.6.29)		2 9 0		
(31)優先権主張番号	63/293,025	(74)代理人	110003797		
(32)優先日	令和3年12月22日(2021.12.22)		弁理士法人清原国際特許事務所		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(72)発明者	デュロン, セルジオ		
(31)優先権主張番号	63/346,799		アメリカ合衆国 9 2 0 3 7 カリフォル		
(32)優先日	令和4年5月27日(2022.5.27)		ニア州 ラ・ホーヤ ノース・トーリー・		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		パインズ・ロード 1 1 0 9 9 スイート		
(31)優先権主張番号	63/388,072	(72)発明者	ローランド, ジェイソン		
			アメリカ合衆国 9 2 0 3 7 カリフォル		
		最終頁に続く		最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 架橋抗体

(57)【要約】

【解決手段】

本明細書では、単ドメイン抗体を標的にコンジュゲートで架橋するための組成物および方法が提供される。さらに本明細書では、標的化ドメインを含むコンジュゲートが提供され、該標的化ドメインは、非天然アミノ酸を含む。さらに、本明細書では、単ドメインおよび多重特異性抗体を架橋することにより疾患を処置する方法が提供される。

【選択図】 2 8 A

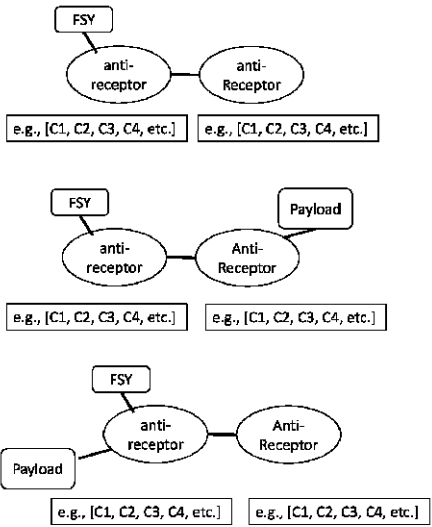


FIG. 28A

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

標的化ドメインとペイロードとを含むコンジュゲートであって、前記標的化ドメインは、少なくとも 1 つの非天然アミノ酸（U A A）残基を含み、前記標的化ドメインは、標的に結合するように構成され、前記 U A A 残基は、前記標的化ドメインが結合している場合に、前記標的と共有結合を形成するのに十分に近接している、コンジュゲート。

【請求項 2】

前記ペイロードが、前記 U A A 残基から $n + x$ 位のアミノ酸に付着しており、 n が前記アミノ酸の位置であり、 x が少なくとも 1 である、請求項 1 に記載のコンジュゲート。

【請求項 3】

前記ペイロードが、前記 U A A 残基から $n - x$ 位のアミノ酸に付着しており、 n が前記アミノ酸の位置であり、 x が少なくとも 1 である、請求項 1 に記載のコンジュゲート。

【請求項 4】

前記標的化ドメインが前記標的に結合している場合に、前記 U A A 残基が前記標的の 5 ～ 20 オングストローム以内にある、請求項 1 ～ 3 のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

【請求項 5】

前記標的化ドメインが、細胞表面分子に結合する、請求項 4 に記載のコンジュゲート。

【請求項 6】

前記細胞表面分子が腫瘍関連抗原である、請求項 5 に記載のコンジュゲート。

【請求項 7】

前記 U A A 残基が、前記標的のヒスチジン、リジン、またはチロシン残基と共有結合を形成するように構成される、請求項 1 ～ 6 のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

【請求項 8】

前記 U A A 残基が、フルオロ硫酸部分を含む、請求項 1 ～ 7 のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

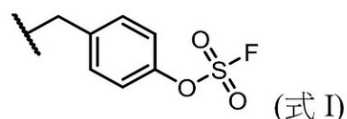
【請求項 9】

前記 U A A 残基が、アリールフルオロ硫酸部分を含む、請求項 1 ～ 7 のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

【請求項 10】

前記 U A A 残基が式 I :

【化 1】

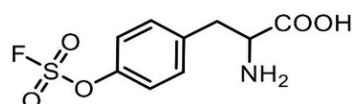


を含む、請求項 9 に記載のコンジュゲート。

【請求項 11】

前記 U A A 残基の U A A が構造 :

【化 2】

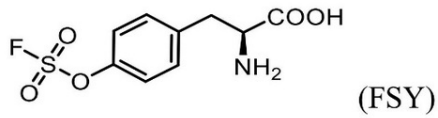


を有する、請求項 9 に記載のコンジュゲート。

【請求項 12】

前記 U A A 残基の U A A が構造：

【化 3】



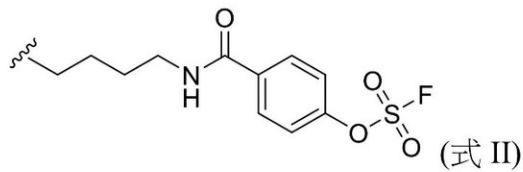
を有する、請求項 9 に記載のコンジュゲート。

【請求項 13】

10

前記 U A A 残基が式 I I：

【化 4】



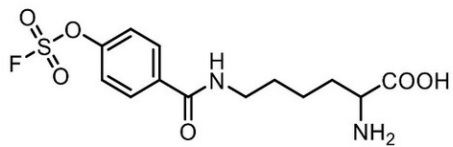
を含む、請求項 9 に記載のコンジュゲート。

20

【請求項 14】

前記 U A A 残基の U A A が構造：

【化 5】



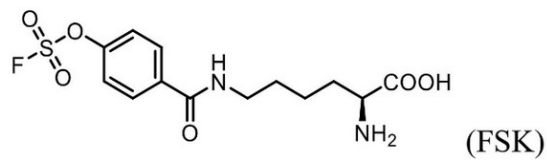
を有する、請求項 9 に記載のコンジュゲート。

30

【請求項 15】

前記 U A A 残基の U A A が構造：

【化 6】



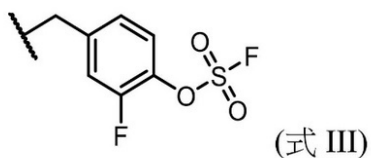
40

を有する、請求項 9 に記載のコンジュゲート。

【請求項 16】

前記 U A A 残基が式 I I I：

【化 7】



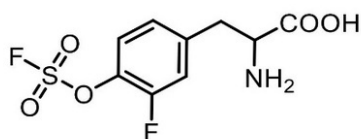
50

を含む、請求項 9 に記載のコンジュゲート。

【請求項 17】

前記 U A A 残基の U A A が構造：

【化 8】



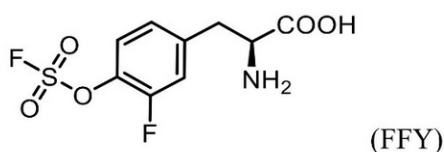
10

を有する、請求項 9 に記載のコンジュゲート。

【請求項 18】

前記 U A A 残基の U A A が構造：

【化 9】



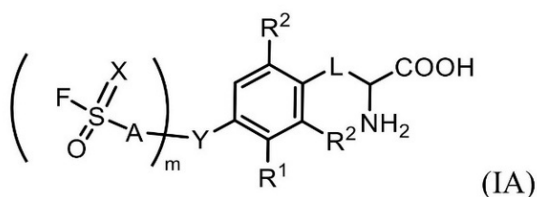
20

を有する、請求項 9 に記載のコンジュゲート。

【請求項 19】

前記 U A A 残基の U A A が、式 (I A) の構造：

【化 10】



30

を有し、式中、

X がそれぞれ独立して、O または N R ' であり、

Y が、結合、-O-、-N R -、または -N = であり、A が、結合または -(C H 2)_n であり、

m が、1 または 2 であり、n が、1 ~ 4 の整数であり、

R および R ' のそれぞれが、存在する場合、独立して、水素、置換もしくは非置換アルキル、置換もしくは非置換ヘテロアルキル、置換もしくは非置換アリール、置換もしくは非置換ヘテロアリール、または置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキルであり、

40

R¹ が、水素、フルオロまたはヨードであり、R² が、水素またはメチルであり、

L が、-(C H 2)_p- または -C (O) N H -(C H 2)_p- であり、p が、1 ~ 6 の整数であり、ならびに、

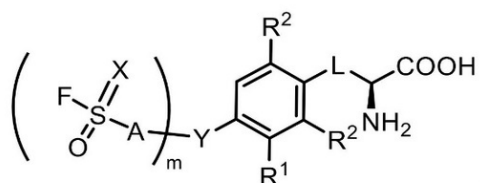
ここで、Y が -O- または -N R - である場合、m が 1 であり、Y が -N = である場合、m が 2 である、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

【請求項 20】

式 (I A) の前記 U A A が、式 (I A - a) の構造：

50

【化 1 1】



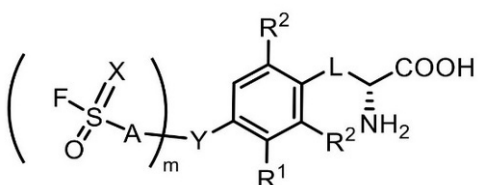
を有する、請求項 19 に記載のコンジュゲート。

【請求項 2 1】

10

式 (I A) の前記 U A A が、式 (I A - b) の構造：

【化 1 2】



を有する、請求項 19 に記載のコンジュゲート。

20

【請求項 2 2】

式 (I A) の前記 U A A が、式 (I B) の構造：

【化 1 3】



30

を有する、請求項 19 に記載のコンジュゲート。

【請求項 2 3】

式 (I A) の前記 U A A が、式 (I C) の構造：

【化 1 4】



40

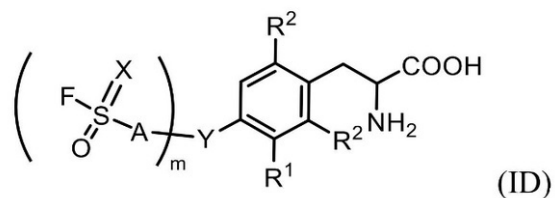
を有する、請求項 19 に記載のコンジュゲート。

【請求項 2 4】

前記式 (I A) の U A A が、式 (I D) の構造：

50

【化 1 5】



を有し、式中、

X がそれぞれ独立して、O または NR であり、

Y が、結合、-O-、-NR-、または -N= であり、

A が、結合または -(CH₂)_n- であり、m が、1 または 2 であり、n が、1 ~ 4 の整数であり、

R および R' のそれぞれが、存在する場合、独立して、水素、置換もしくは非置換アルキル、置換もしくは非置換ヘテロアルキル、置換もしくは非置換アリール、置換もしくは非置換ヘテロアリール、または置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキルであり、

R¹ が、水素、フルオロまたはヨードであり、R² が、水素またはメチルであり、ならびに、

ここで、Y が、結合、-O- または -NR- である場合、m が 1 であり、Y が -N= である場合、m が 2 である、請求項 19 に記載のコンジュゲート。

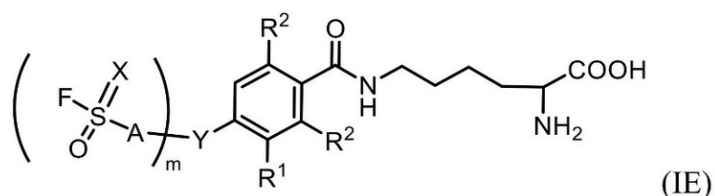
10

20

【請求項 2 5】

式 (IA) の前記 UAA が、式 (IE) の構造：

【化 1 6】



30

を有し、式中、

X がそれぞれ独立して、O または NR' であり、

Y が、結合、-O-、-NR-、または -N= であり、

A が、結合または -(CH₂)_n- であり、m が、1 または 2 であり、n が、1 ~ 4 の整数であり、

R および R' のそれぞれが、存在する場合、独立して、水素、置換もしくは非置換アルキル、置換もしくは非置換ヘテロアルキル、置換もしくは非置換アリール、置換もしくは非置換ヘテロアリール、または置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキルであり、

R¹ が、水素、フルオロまたはヨードであり、R² が、水素またはメチルであり、ならびに、

ここで、Y が、結合、-O- または -NR- である場合、m が 1 であり、Y が -N= である場合、m が 2 である、請求項 19 に記載のコンジュゲート。

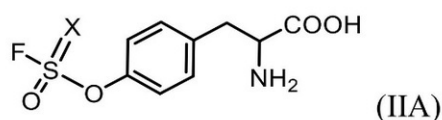
40

【請求項 2 6】

式 (IA) の前記 UAA が、式 (IIA) の構造：

50

【化 17】



を有し、式中、

X が独立して、O または NR' であり、および、

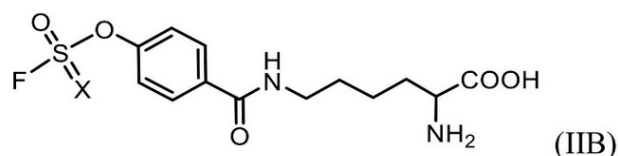
R' が、存在する場合、水素、置換もしくは非置換アルキル、置換もしくは非置換ヘテロアルキル、置換もしくは非置換アリール、置換もしくは非置換ヘテロアリール、または置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキルである、請求項 19 に記載のコンジュゲート。

10

【請求項 27】

式 (IA) の前記 UAA が、式 (IIB) の構造：

【化 18】



20

を有し、式中、

X は独立して、O または NR' であり、および、

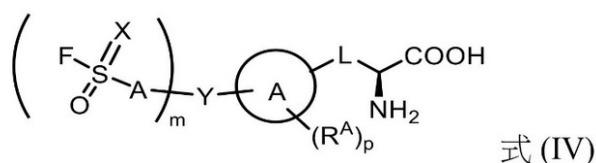
R' は、存在する場合、水素、置換もしくは非置換アルキル、置換もしくは非置換ヘテロアルキル、置換もしくは非置換アリール、置換もしくは非置換ヘテロアリール、または置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキルである、請求項 19 に記載のコンジュゲート。

【請求項 28】

前記 UAA 残基の UAA が、

【化 19】

30



の構造を有し、式中、

X がそれぞれ独立して、O または NR' であり、

Y が、結合、-O-、-NR-、または -N= であり、

40

A が、結合または -(CH2)n- であり、m が、1 または 2 であり、n が、1 ~ 4 の整数であり、

R および R' のそれぞれが、存在する場合、独立して、水素、置換もしくは非置換アルキル、置換もしくは非置換ヘテロアルキル、置換もしくは非置換アリール、置換もしくは非置換ヘテロアリール、または置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキルであり、

環 A が、5 ~ 6 員アリールまたはヘテロアリールであり、

RA がそれぞれ独立して、-OH、-OR^X、ハロゲン、NHR^X、N(R^X)₂、または任意選択で置換されたアルキルであり、R^X がそれぞれ、任意選択で置換されたアルキルであり、

L が、-(CH2)p- または -C(O)NH-(CH2)p- であり、p が、1 ~ 6

50

の整数であり、ならびに、

ここで、Yが、結合、 $-O-$ または $-NR-$ である場合、mが1であり、Yが $-N=$ である場合、mが2である、請求項1～7のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

【請求項29】

少なくとも1つの追加の標的化ドメインをさらに含む、請求項1～28のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

【請求項30】

前記ペイロードが、造影剤、放射性リガンド剤または細胞毒性剤を含む、請求項1～29のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

【請求項31】

細胞傷害性部分が、小分子薬または化学療法薬を含む、請求項30に記載のコンジュゲート。

【請求項32】

前記放射性リガンド剤が、 ^{35}S 、 ^3H 、 ^{111}In 、 ^{112}In 、 ^{14}C 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{32}P 、 ^{153}Sm 、 ^{177}Lu 、 ^{86}Y 、 ^{88}Y 、 ^{90}Y 、 ^{131}I 、 ^{123}I 、 ^{124}I 、 ^{125}I 、 ^{149}Tb 、 ^{211}At 、 ^{212}Pb ／ ^{212}Bi 、 ^{213}Bi 、 ^{223}Ra 、 ^{225}Ac 、 ^{64}Cu 、 ^{67}Cu 、および ^{227}Th からなる群から選択される、請求項30に記載のコンジュゲート。

【請求項33】

前記放射性リガンド剤がキレート剤をさらに含む、請求項31または請求項32に記載のコンジュゲート。

【請求項34】

前記放射性リガンド剤が、 ^{99m}Tc 、 ^{131}I 、 ^{201}Tl 、 ^{111}In 、および ^{67}Ga からなる群から選択される、請求項30または請求項33に記載のコンジュゲート。

【請求項35】

前記ペイロードが、リンカーで前記コンジュゲートに付着される、請求項1～34のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

【請求項36】

前記リンカーがポリマーを含む、請求項35に記載のコンジュゲート。

【請求項37】

前記リンカーが、切断可能または切断不可能なリンカーである、請求項35に記載のコンジュゲート。

【請求項38】

前記リンカーが0.01kDa～50kDaである、請求項35に記載のコンジュゲート。

【請求項39】

前記リンカーが0.01kDa～10kDaである、請求項35に記載のコンジュゲート。

【請求項40】

前記リンカーが、直鎖状、分枝状、多量体、または dendrimer である、請求項35～39のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

【請求項41】

前記リンカーが、二官能性もしくは多官能性リンカーまたは二官能性もしくは多官能性ポリマーである、請求項40に記載のコンジュゲート。

【請求項42】

前記リンカーが水溶性ポリマーを含む、請求項35～41のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

【請求項43】

前記水溶性ポリマーがポリエチレングリコール (PEG) である、請求項42に記載のコンジュゲート。

10

20

30

40

50

【請求項 44】

前記 PEG が、0.1 kDa ～ 2.5 kDa の分子量を有する、請求項 43 に記載のコンジュゲート。

【請求項 45】

前記 PEG が 1 ～ 8 個のモノマーを含む、請求項 43 に記載のコンジュゲート。

【請求項 46】

前記標的化ドメインが、抗体、抗体断片、または抗原結合ドメインを含む、請求項 1 ～ 45 のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

【請求項 47】

前記標的化ドメインが抗原結合ドメインを含み、前記コンジュゲートが CDR 領域を含み、少なくとも 1 つの UAA が、前記 CDR 領域内またはその近傍にある、請求項 46 に記載のコンジュゲート。

10

【請求項 48】

前記 UAA が前記 CDR 領域内に含まれる、請求項 47 に記載のコンジュゲート。

【請求項 49】

前記標的化ドメインが、単ドメイン抗体 (sdAb) を含む、請求項 46 ～ 48 のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

【請求項 50】

細胞表面分子が、PSMA、EGFR、EGFRviii、MSLN、CEA、DLL3、FAP、CD33、HER3、PD-L1、EphA2、EphA4、HER2、SIRPa、DLK1、Muc16、LRP5、LRP6、endol80、LIV-1、SLAMF7、PTK7、GPR20、CDH6、CSP-1、CD71、PRLR、SEZ6、DLL1、NOTCH3 rec、NaPi2b、CD16、GCC、SSTR2、CAIX、CAXII、MC1R、CXCR4、B1R、GRPR、STEAP1、CD70、CD46、CD166、CLL-1、ADAM9、cKIT、CD36、CD73、ITGaVb3、ITGaVb6、GPC-1、CD38、CD51、FGFR3、Ly6E、CD44v6、ENPP3、CXCR3、CXCR5、FcRH5、VEGF、VEGFR2、CD45、CCR4、CD25、5T4、ROR1、TROP-2、NECTIN4、cMET、CD19、CD22、CD30、CD33、CD123、BCMA、CD79b、AXL、RON、B7-H3、B7-H4、KAAG1、Muc1、ADAM-9、GPNMB、EDBフィブロネクチン、組織因子、GPNMB、FolRa、EphA2、ALPP、ALPPL2、MT1-MMP、CLDN18.2、CLDN6、CLDN9、pカドヘリン、CEACAM6、CD47、および EpCAM からなる群から選択される、請求項 5 ～ 49 のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

20

30

【請求項 51】

(i) ペイロードと、(ii) CDR 領域および前記 CDR 領域内またはその近傍の少なくとも 1 つの非天然アミノ酸 (UAA) 残基を有する sdAb を含む操作された単ドメイン抗体 (sdAb) とを含むコンジュゲートであって、前記 sdAb が配列番号 1 ～ 4 または 16 ～ 64 のいずれか 1 つを含む、コンジュゲート。

【請求項 52】

40

前記 UAA 残基がフルオロ硫酸部分を含む、請求項 51 に記載のコンジュゲート。

【請求項 53】

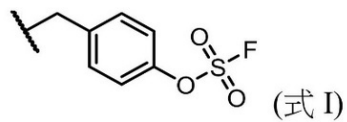
前記 UAA 残基が、アリールフルオロ硫酸部分を含む、請求項 52 に記載のコンジュゲート。

【請求項 54】

前記 UAA 残基が式 I :

50

【化 2 0】



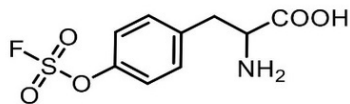
を含む、請求項 5 3 に記載のコンジュゲート。

【請求項 5 5】

前記 U A A 残基の U A A が、構造：

10

【化 2 1】



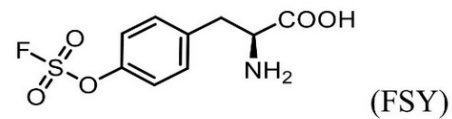
を有する、請求項 5 3 に記載のコンジュゲート。

【請求項 5 6】

前記 U A A 残基の U A A が、構造：

20

【化 2 2】



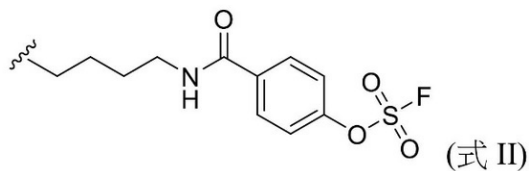
を有する、請求項 5 3 に記載のコンジュゲート。

【請求項 5 7】

前記 U A A 残基が式 I I：

30

【化 2 3】



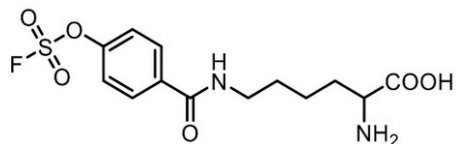
を含む、請求項 5 3 に記載のコンジュゲート。

【請求項 5 8】

前記 U A A 残基の U A A が、構造：

40

【化 2 4】

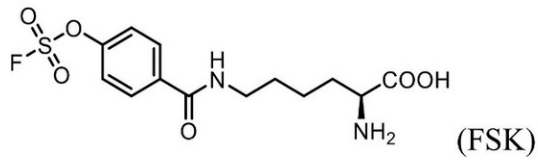


を有する、請求項 5 3 に記載のコンジュゲート。

【請求項 5 9】

50

前記 U A A 残基の U A A が、構造：
【化 2 5】

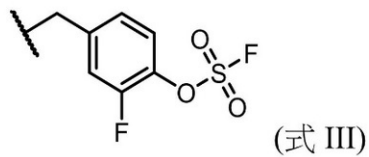


を有する、請求項 5 3 に記載のコンジュゲート。

10

【請求項 6 0】

前記 U A A 残基が式 I I I：
【化 2 6】

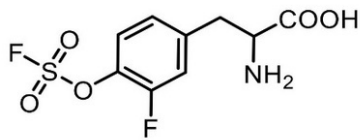


20

を含む、請求項 5 3 に記載のコンジュゲート。

【請求項 6 1】

前記 U A A 残基の U A A が、構造：
【化 2 7】

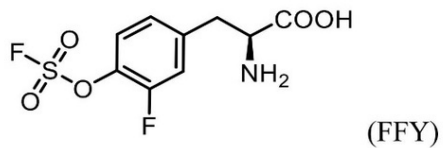


30

を有する、請求項 5 3 に記載のコンジュゲート。

【請求項 6 2】

前記 U A A 残基の U A A が、構造：
【化 2 8】



40

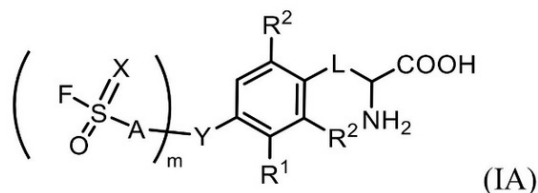
を有する、請求項 5 3 に記載のコンジュゲート。

【請求項 6 3】

前記 U A A 残基の U A A が、式 (I A) の構造：

50

【化 2 9】



を有し、式中、

X がそれぞれ独立して、O または N R ' であり、

Y が、結合、- O -、- N R -、または - N = であり、

A が、結合または - (C H 2) n - であり、m が、1 または 2 であり、n が、1 ~ 4 の整数であり、

R および R ' のそれぞれが、存在する場合、独立して、水素、置換もしくは非置換アルキル、置換もしくは非置換ヘテロアルキル、置換もしくは非置換アリール、置換もしくは非置換ヘテロアリール、または置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキルであり、

R ¹ が、水素、フルオロまたはヨードであり、R ² が、水素またはメチルであり、

L が、- (C H 2) p - または - C (O) N H - (C H 2) p - であり、p が、1 ~ 6 の整数であり、ならびに、

ここで、Y が、- O - または - N R - である場合、m が 1 であり、Y が - N = である場合、m が 2 である、請求項 5 3 に記載のコンジュゲート。

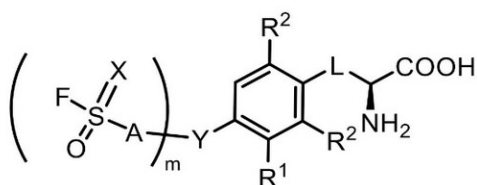
10

20

【請求項 6 4】

式 (I A) の前記 U A A は、式 (I A - a) の構造：

【化 3 0】



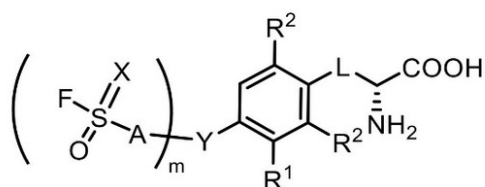
30

を有する、請求項 6 3 に記載のコンジュゲート。

【請求項 6 5】

式 (I A) の前記 U A A が、式 (I A - b) の構造：

【化 3 1】



40

を有する、請求項 6 3 に記載のコンジュゲート。

【請求項 6 6】

式 (I A) の前記 U A A が、式 (I B) の構造：

50

【化 3 2】



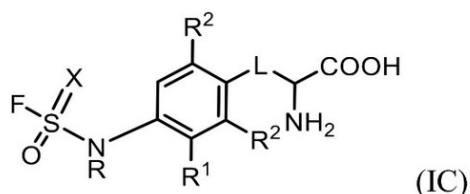
を有する、請求項 6 3 に記載のコンジュゲート。

【請求項 6 7】

10

式 (I A) の前記 U A A が、式 (I C) の構造：

【化 3 3】



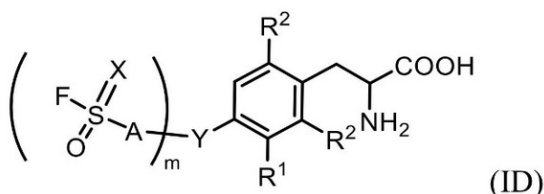
20

を有する、請求項 6 3 に記載のコンジュゲート。

【請求項 6 8】

式 (I A) の前記 U A A が、式 (I D) の構造：

【化 3 4】



30

を有し、式中、

X がそれぞれ独立して、O または N R ' であり、

Y が、結合、-O-、-N R -、または -N = であり、

A が、結合または -(CH2)n- であり、m が、1 または 2 であり、n が、1 ~ 4 の整数であり、

R および R ' のそれぞれが、存在する場合、独立して、水素、置換もしくは非置換アルキル、置換もしくは非置換ヘテロアルキル、置換もしくは非置換アリール、置換もしくは非置換ヘテロアリール、または置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキルであり、

40

R¹ が、水素、フルオロまたはヨードであり、R² が、水素またはメチルであり、ならびに、

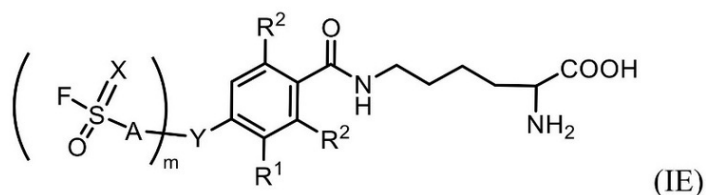
ここで、Y が、結合、-O- または -N R - である場合、m が 1 であり、Y が -N = である場合、m が 2 である、請求項 6 3 に記載のコンジュゲート。

【請求項 6 9】

式 (I A) の前記 U A A が、式 (I E) の構造：

50

【化 3 5】



を有し、式中、

X がそれぞれ独立して、O または N R' であり、

Y が、結合、-O-、-N R-、または -N= であり、

A が、結合または -(CH₂)_n- であり、m が、1 または 2 であり、n が、1 ~ 4 の整数であり、

R および R' のそれぞれが、存在する場合、独立して、水素、置換もしくは非置換アルキル、置換もしくは非置換ヘテロアルキル、置換もしくは非置換アリール、置換もしくは非置換ヘテロアリール、または置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキルであり、

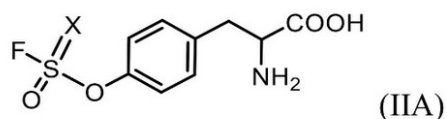
R¹ が、水素、フルオロまたはヨードであり、R² が、水素またはメチルであり、ならびに、

ここで、Y が、結合、-O- または -N R- である場合、m が 1 であり、Y が -N= である場合、m は 2 である、請求項 62 に記載のコンジュゲート。

【請求項 70】

式 (IA) の前記 UAA が、式 (HA) の構造：

【化 3 6】



を有し、式中、

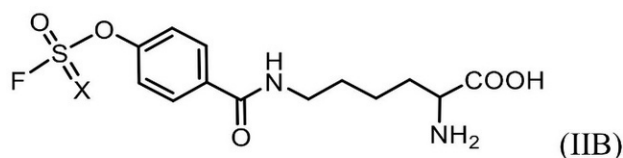
X が独立して、O または N R' であり、および、

R' が、存在する場合、水素、置換もしくは非置換アルキル、置換もしくは非置換ヘテロアルキル、置換もしくは非置換アリール、置換もしくは非置換ヘテロアリール、または置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキルである、請求項 63 に記載のコンジュゲート。

【請求項 71】

式 (IA) の前記 UAA が、式 (IIB) の構造：

【化 3 7】



を有し、式中、

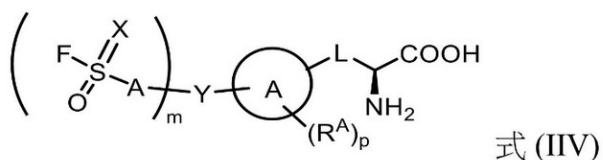
X が独立して、O または N R' であり、および、

R' が、存在する場合、水素、置換もしくは非置換アルキル、置換もしくは非置換ヘテロアルキル、置換もしくは非置換アリール、置換もしくは非置換ヘテロアリール、または置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキルである、請求項 63 に記載のコンジュゲート。

【請求項 72】

前記 UAA 残基の UAA が、

【化 3 8】



の構造を有し、式中、

X がそれぞれ独立して、O または NR' であり、

Y が、結合、 $-\text{O}-$ 、 $-\text{NR}-$ 、または $-\text{N}=\text{}$ であり、

A が、結合または $-(\text{CH}_2)_n-$ であり、m が、1 または 2 であり、n が、1 ~ 4 の整数であり、

R および R' のそれぞれが、存在する場合、独立して、水素、置換もしくは非置換アルキル、置換もしくは非置換ヘテロアルキル、置換もしくは非置換アリール、置換もしくは非置換ヘテロアリール、または置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキルであり、

環 A が、5 ~ 6 員アリールまたはヘテロアリールであり、

R^A がそれぞれ独立して、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{OR}^X$ 、ハロゲン、 NHR^X 、 $\text{N}(\text{R}^X)_2$ 、または任意選択で置換されたアルキルであり、R^X がそれぞれ、任意選択で置換されたアルキルであり、ならびに、

ここで、Y が、結合、 $-\text{O}-$ または $-\text{NR}-$ である場合、m は 1 であり、Y が $-\text{N}=\text{}$ である場合、m が 2 である、請求項 51 に記載のコンジュゲート。

【請求項 73】

前記操作された s d A b が、配列番号 1 を含み、U A A が、配列番号 5、6、および 7 のいずれか 1 つに含まれる、請求項 51 ~ 72 のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

【請求項 74】

前記 U A A が、配列番号 1 に対して 26、28、29、30、99、102、103、105、108、110、111、112、113、114、および 115 からなる群から選択されるアミノ酸位置に存在する、請求項 73 に記載のコンジュゲート。

【請求項 75】

前記操作された s d A b が、配列番号 2 を含み、U A A が、配列番号 8、9、および 10 のいずれか 1 つに含まれる、請求項 51 ~ 72 のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

【請求項 76】

前記 U A A が、配列番号 2 に対して 50、52、53、54、56、58、および 100 からなる群から選択されるアミノ酸位置に存在する、請求項 75 に記載のコンジュゲート。

【請求項 77】

前記操作された s d A b が、配列番号 3 を含み、U A A が、配列番号 11、12、および 13 のいずれか 1 つに含まれる、請求項 51 ~ 72 のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

【請求項 78】

前記 U A A が、配列番号 3 に対して 58、62、101、103、および 107 からなる群から選択されるアミノ酸位置に存在する、請求項 77 に記載のコンジュゲート。

【請求項 79】

前記操作された s d A b が、配列番号 16 を含み、U A A が、配列番号 16 に対して 109 のアミノ酸位置に存在する、請求項 51 ~ 72 のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

【請求項 80】

前記操作された s d A b が、配列番号 25 を含み、U A A が、配列番号 23 に対して 5

10

20

30

40

50

2、53、54、55、56、58、60、62、および64からなる群から選択されるアミノ酸位置に存在する、請求項51～72のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

【請求項81】

前記操作されたs d A bが、配列番号26を含み、U A Aが、配列番号24に対して53、55、56、57、58、60、64、および67からなる群から選択されるアミノ酸位置に存在する、請求項51～72のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

【請求項82】

前記ペイロードが、U A A側鎖を介して連結されない、請求項51～81のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

【請求項83】

前記ペイロードが、造影剤、放射性リガンド剤または細胞傷害性剤を含む、請求項51～82のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

【請求項84】

細胞傷害性部分が、小分子薬または化学療法薬を含む、請求項83に記載のコンジュゲート。

【請求項85】

前記放射性リガンド剤が、 ^{33}S 、 ^3H 、 ^{111}In 、 ^{112}In 、 ^{14}C 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{32}P 、 ^{153}Sm 、 ^{177}Lu 、 ^{86}Y 、 ^{88}Y 、 ^{90}Y 、 ^{131}I 、 ^{123}I 、 ^{124}I 、 ^{125}I 、 ^{149}Tb 、 ^{211}At 、 ^{212}Pb ／ ^{212}Bi 、 ^{213}Bi 、 ^{223}Ra 、 ^{225}Ac 、 ^{64}Cu 、 ^{67}Cu 、および ^{227}Th からなる群から選択される、請求項83に記載のコンジュゲート。

【請求項86】

前記放射性リガンド剤がキレート剤をさらに含む、請求項83または請求項85に記載のコンジュゲート。

【請求項87】

前記造影剤が、フルオロフォア、または $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 ^{131}I 、 ^{201}Tl 、 ^{111}In 、および ^{67}Ga からなる群から選択される放射性リガンド剤を含む、請求項83に記載のコンジュゲート。

【請求項88】

請求項1～87のいずれか一項に記載のコンジュゲートを投与する工程を含む方法であって、前記コンジュゲートが、細胞の表面上の標的に共有結合する、方法。

【請求項89】

前記細胞が腫瘍細胞を含む、請求項88に記載の方法。

【請求項90】

前記コンジュゲートが、前記腫瘍細胞を死滅させるか、または前記腫瘍細胞の増殖を阻害する、請求項89に記載の方法。

【請求項91】

前記標的が腫瘍関連抗原である、請求項88～90のいずれか一項に記載の方法。

【請求項92】

前記標的が、PSMA、EGFR、EGFRviii、MSLN、CEA、DLL3、FAP、CD33、HER3、PD-L1、EphA2、EphA4、HER2、SIRPa、DLK1、Muc16、LRP5、LRP6、endol80、LIV-1、SLAMF7、PTK7、GPR20、CDH6、CSP-1、CD71、PRLR、SEZ6、DLL1、NOTCH3rec、NaPi2b、CD16、GCC、SSTR2、CAIX、CAXII、MC1R、CXCR4、B1R、GRPR、STEAP1、CD70、CD46、CD166、CLL-1、ADAM9、cKIT、CD36、CD73、ITGaVb3、ITGaVb6、GPC-1、CD38、CD51、FGFR3、Ly6E、CD44v6、ENPP3、CXCR3、CXCR5、FcRH5、VEGF、VEGFR2、CD45、CCR4、CD25、5T4、ROR1、TROP-2、NECTIN4、cMET、CD19、CD22、CD30、CD33、CD123、BCM

10

20

30

40

50

A、CD79b、AXL、RON、B7-H3、B7-H4、KAAG1、Muc1、ADAM-9、GPNMB、EDBフィブロネクチン、組織因子、GPNMB、FolRa、EphA2、ALPP、ALPPL2、MT1-MMP、CLDN18.2、CLDN6、CLDN9、pカドヘリン、CEACAM6、CD47、およびEpCAMからなる群から選択される、請求項88～91のいずれか一項に記載の方法。

【請求項93】

疾患または疾病の処置を必要とする対象に、請求項1～92のいずれか一項に記載のコンジュゲートを投与する工程を含む、疾患または疾病を処置する方法。

【請求項94】

前記疾患が、PRAD（前立腺がん）、mCRPC（転移性去勢抵抗性前立腺がん）、固形腫瘍（血管新生）、LUAD（肺腺がん）、LUSC（肺扁平上皮がん）、HNSC（頭頸部扁平上皮がん）、THCA（甲状腺がん）、ESCA（食道がん）、STAD（胃腺がん）、GIST（胃腸間質腫瘍）、COAD（結腸腺がん）、READ（直腸腺がん）、SARC（肉腫）、SCLC（小細胞肺がん）、MESO（中皮腫）、PAAD（膵臓腺がん）、B細胞悪性腫瘍、T細胞悪性腫瘍、ALL（急性リンパ芽球性白血病）、NHL（非ホジキンリンパ腫）、HL（ホジキンリンパ腫）、CLL（慢性リンパ性白血病）、AML（急性骨髄性白血病）、MDS（骨髄異形成症候群）、MSI-high腫瘍、SKCM（皮膚黒色腫）、UVM（網膜黒色腫）、DLBC（びまん性大細胞型B細胞リンパ腫）、子宮内膜がん、CESC（子宮頸がん）、骨がん、BLCA（膀胱上皮がん）、BRCA（乳浸潤性がん）、TNBC（トリプルネガティブ乳がん）、LIHC（肝臓肝細胞がん）、OV（卵巣漿液性嚢胞腺がん）、UCEC（子宮内膜がん）、NEPCa（神経内分泌前立腺がん）、GBM（多形性膠芽腫）、およびKIRC（腎臓腎細胞がん）のうちの1つ以上を含む、請求項93に記載の方法。

【請求項95】

請求項1～87のいずれか一項に記載のコンジュゲートを製造する方法であって、

（a）少なくとも1つの非天然アミノ酸を含む標的化ドメインを生成する工程と、

（b）任意選択でリンカーを介して、前記標的化ドメインをペイロードにコンジュゲートする工程とを含む、方法。

【請求項96】

少なくとも1つの非天然アミノ酸を含む前記標的化ドメインが、*in-vivo*で合成される、請求項95に記載の方法。

【請求項97】

生成する工程が、直交tRNAシンテターゼ／サプレッサーtRNA対の使用を含む、請求項96に記載の方法。

【請求項98】

生成する工程が、ピロリジンtRNAシンテターゼ／tRNA^{Pro}に由来する直交tRNAシンテターゼ／サプレッサーtRNA対を含む、請求項97に記載の方法。

【請求項99】

前記直交tRNAシンテターゼが、配列番号84、87、92、またはその変異体を含む、請求項97に記載の方法。

【請求項100】

細胞傷害性ペイロードを細胞に送達する方法であって、前記方法は、請求項30～33、35～50または83～86のいずれか一項に記載のコンジュゲートを投与する工程を含み、前記コンジュゲートは、前記細胞の表面上の標的に共有結合し、それにより、前記細胞傷害性ペイロードを送達する、方法。

【請求項101】

前記細胞が腫瘍細胞である、請求項100に記載の方法。

【請求項102】

前記細胞が腫瘍微小環境内に含まれる、請求項100に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 103】

前記細胞が哺乳動物対象内に含まれる、請求項 100 に記載の方法。

【請求項 104】

前記細胞がヒト対象内に含まれる、請求項 100 に記載の方法。

【請求項 105】

前記コンジュゲートが、腫瘍細胞を死滅させるか、または前記腫瘍細胞の増殖を阻害する、請求項 100～104 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 106】

前記標的が、PSMA、EGFR、EGFRviii、MSLN、CEA、DLL3、FAP、CD33、HER3、PD-L1、EphA2、EphA4、HER2、SIRPa、DLK1、Muc16、LRP5、LRP6、endol80、LIV-1、SLAMF7、PTK7、GPR20、CDH6、CSP-1、CD71、PRLR、SEZ6、DLL1、NOTCH3 rec、NaPi2b、CD16、GCC、SSTR2、CAIX、CAXII、MC1R、CXCR4、B1R、GRPR、STEAP1、CD70、CD46、CD166、CLL-1、ADAM9、cKIT、CD36、CD73、ITGaVb3、ITGaVb6、GPC-1、CD38、CD51、FGFR3、Ly6E、CD44v6、ENPP3、CXCR3、CXCR5、FcRH5、VEGF、VEGFR2、CD45、CCR4、CD25、5T4、ROR1、TROP-2、NECTIN4、cMET、CD19、CD22、CD30、CD33、CD123、BCMA、CD79b、AXL、RON、B7-H3、B7-H4、KAG1、Muc1、ADAM-9、GPNMB、EDBフィブロネクチン、組織因子、GPNMB、Folra、ALPP、ALPPL2、MT1-MMP、CLDN18.2、CLDN6、CLDN9、pカドヘリン、CEACAM6、CD47、およびEpCAMからなる群から選択される、請求項 100～105 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 107】

ヒト対象が、PCa（前立腺がん）、CRPCa（去勢抵抗性前立腺がん）、固形腫瘍（血管新生）、NSCLC（非小細胞肺癌）、HNSCC（頭頸部扁平上皮がん）、ESCC（食道がん）、GC（胃がん）、CRC（結腸直腸がん）、SCLC（小細胞肺癌）、MPM（中皮腫）、PDAC（膵管腺がん）、ALL（急性リンパ芽球性白血病）、AML（急性骨髄性白血病）、MDS（骨髄異形成症候群）、MSI-high腫瘍、黒色腫、DLBCL（びまん性大細胞型B細胞リンパ腫）、子宮内膜がん、子宮頸がん、膀胱がん、BrCa（乳がん）、TNBC（トリプルネガティブ乳がん）、NE-PCa（神経内分泌前立腺がん）、GBM（膠芽細胞腫）、およびRCC（腎細胞がん）からなる群から選択される疾患または疾病に罹患しているか、またはそれと診断されている、請求項 100～106 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 108】

(i) 第1の標的化ドメインと、(ii) 第2の標的化ドメインと、任意選択で(iii) ペイロードと、を含むコンジュゲートであって、前記第1の標的化ドメインが、少なくとも1つの第1の非天然アミノ酸(UAA)を含み、それにより、前記第1の標的化ドメインが、前記UAAの部位で第1の標的に共有結合することができ、前記第2の標的化ドメインが、第2の標的に結合するように構成される、コンジュゲート。

【請求項 109】

前記第1の標的および前記第2の標的が、同じ細胞上にある、請求項 108 に記載のコンジュゲート。

【請求項 110】

前記第1の標的化ドメインが、抗体、抗体断片、または抗原結合ドメインを含む、請求項 108 または請求項 109 に記載のコンジュゲート。

【請求項 111】

前記第1の標的化ドメインが、単一ドメイン抗体(sdAb)を含む、請求項 110 に記載のコンジュゲート。

【請求項 1 1 2】

前記第 1 の U A A が、前記第 1 の標的と接続する前記第 1 の標的化ドメインの領域内またはその近傍に含まれる、請求項 1 0 8 ～ 1 1 1 のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

【請求項 1 1 3】

前記第 2 の標的化ドメインが、抗体、抗体断片、または抗原結合ドメインを含む、請求項 1 0 8 ～ 1 1 2 のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

【請求項 1 1 4】

前記第 2 の標的化ドメインが、単一ドメイン抗体（s d A b）を含む、請求項 1 1 3 に記載のコンジュゲート。

【請求項 1 1 5】

前記第 1 の標的化ドメインおよび前記第 2 の標的化ドメインが、融合タンパク質を形成するように連結される、請求項 1 0 8 ～ 1 1 4 のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

【請求項 1 1 6】

前記第 1 の標的化ドメインおよび前記第 2 の標的化ドメインが、化学的コンジュゲーションによって連結される、請求項 1 0 8 ～ 1 1 4 のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

【請求項 1 1 7】

前記第 1 の標的化ドメインおよび第 2 の標的化ドメインが、リンカーによって連結される、請求項 1 1 5 または請求項 1 1 6 に記載のコンジュゲート。

【請求項 1 1 8】

前記第 1 の標的化ドメインおよび前記第 2 の標的化ドメインが、同じ標的に結合する、請求項 1 0 8 ～ 1 1 7 のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

【請求項 1 1 9】

前記第 1 の標的化ドメインおよび第 2 の標的化ドメインは、同じ標的の異なるエピトープに結合する、請求項 1 1 8 に記載のコンジュゲート。

【請求項 1 2 0】

前記第 1 の標的化ドメインおよび前記第 2 の標的化ドメインが、前記同じ標的の同じエピトープに結合する、請求項 1 1 8 に記載のコンジュゲート。

【請求項 1 2 1】

前記同じ標的がモノマーである、請求項 1 1 8 ～ 1 2 0 のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

【請求項 1 2 2】

前記同じ標的が多量体分子である、請求項 1 1 8 ～ 1 2 0 のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

【請求項 1 2 3】

前記第 1 の標的化ドメインおよび前記第 2 の標的化ドメインが、異なる標的に結合する、請求項 1 0 8 ～ 1 1 7 のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

【請求項 1 2 4】

前記第 1 の標的が、第 1 の細胞表面分子である、請求項 1 0 8 ～ 1 2 3 のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

【請求項 1 2 5】

前記第 2 の標的が、第 2 の細胞表面分子である、請求項 1 0 8 ～ 1 2 4 のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

【請求項 1 2 6】

前記少なくとも 1 つの第 1 の U A A が、フルオロ硫酸部分を含む、請求項 1 0 8 ～ 1 2 5 のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

【請求項 1 2 7】

前記少なくとも 1 つの U A A が、アリールフルオロ硫酸部分を含む、請求項 1 0 8 ～ 1 2 5 のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

10

20

30

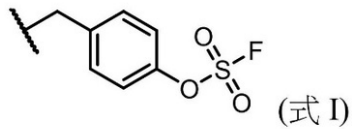
40

50

【請求項 1 2 8】

前記少なくとも 1 つの第 1 の U A A が、式 I :

【化 3 9】



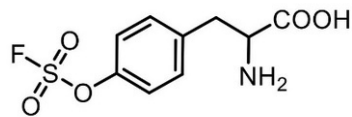
を含む、請求項 1 2 7 に記載のコンジュゲート。

10

【請求項 1 2 9】

前記少なくとも 1 つの第 1 の U A A が、構造 :

【化 4 0】



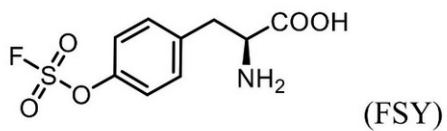
を有する、請求項 1 2 7 に記載のコンジュゲート。

20

【請求項 1 3 0】

前記少なくとも 1 つの第 1 の U A A が、構造 :

【化 4 1】



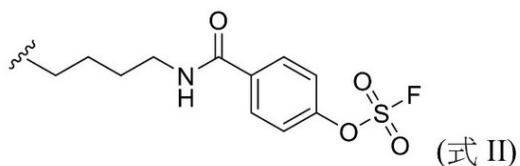
を有する、請求項 1 2 7 に記載のコンジュゲート。

30

【請求項 1 3 1】

前記少なくとも 1 つの第 1 の U A A が、式 II :

【化 4 2】



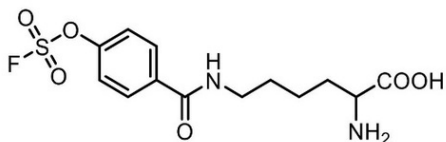
を含む、請求項 1 2 7 に記載のコンジュゲート。

40

【請求項 1 3 2】

前記少なくとも 1 つの第 1 の U A A が、構造 :

【化 4 3】

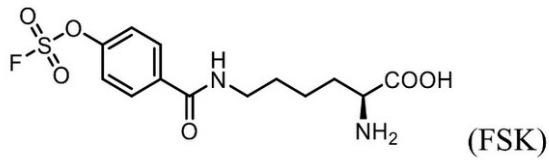


を有する、請求項 1 2 7 に記載のコンジュゲート。

50

【請求項 1 3 3】

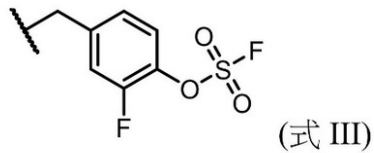
前記少なくとも１つの第１のＵＡＡが、構造：
【化４４】



を有する、請求項１２７に記載のコンジュゲート。
【請求項１３４】

10

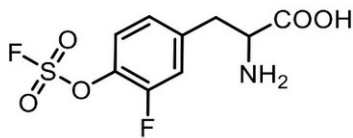
前記少なくとも１つの第１のＵＡＡが、式ⅢⅢⅢ：
【化４５】



を含む、請求項１２７に記載のコンジュゲート。
【請求項１３５】

20

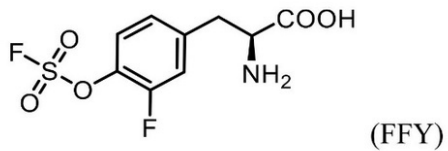
前記少なくとも１つの第１のＵＡＡが、構造：
【化４６】



を有する、請求項１２７に記載のコンジュゲート。
【請求項１３６】

30

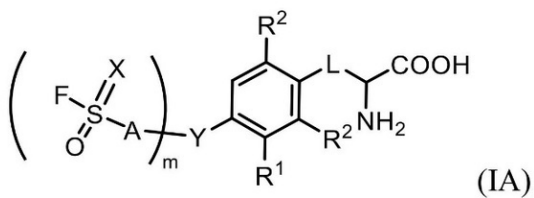
前記少なくとも１つの第１のＵＡＡが、構造：
【化４７】



を有する、請求項１２７に記載のコンジュゲート。
【請求項１３７】

40

前記少なくとも１つの第１のＵＡＡが、式（ⅠＡ）の構造：
【化４８】



を有し、式中、

50

Xがそれぞれ独立して、OまたはNR'であり、

Yが、結合、-O-、-NR-、または-N=であり、

Aが、結合または-(CH₂)_n-であり、mが、1または2であり、nが、1～4の整数であり、

RおよびR'のそれぞれが、存在する場合、独立して、水素、置換もしくは非置換アルキル、置換もしくは非置換ヘテロアルキル、置換もしくは非置換アリール、置換もしくは非置換ヘテロアリール、または置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキルであり、

R¹が、水素、フルオロまたはヨードであり、R²が、水素またはメチルであり、

Lが、-(CH₂)_p-または-C(O)NH-(CH₂)_p-であり、pが、1～6の整数であり、ならびに、

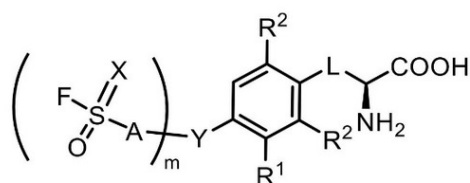
ここで、Yが-O-または-NR-である場合、mが1であり、Yが-N=である場合、mが2である、請求項108～125のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

10

【請求項138】

前記少なくとも1つの第1のUAAが、式(IAa)の構造：

【化49】



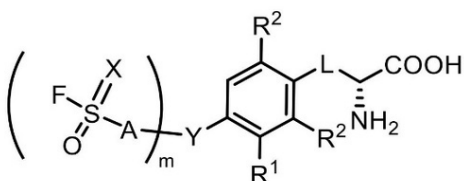
20

を有する、請求項137に記載のコンジュゲート。

【請求項139】

前記少なくとも1つの第1のUAAが、式(IAb)の構造：

【化50】



30

を有する、請求項137に記載のコンジュゲート。

【請求項140】

前記少なくとも1つの第1のUAAが、式(IB)の構造：

【化51】



40

を有する、請求項137に記載のコンジュゲート。

【請求項141】

前記少なくとも1つの第1のUAAが、式(IC)の構造：

50

【化 5 2】



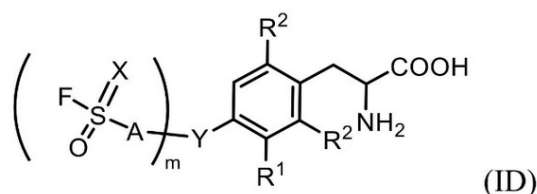
を有する、請求項 1 3 7 に記載のコンジュゲート。

【請求項 1 4 2】

10

前記少なくとも 1 つの第 1 の U A A が、式 (I D) の構造：

【化 5 3】



を有し、式中、

20

X がそれぞれ独立して、O または N R ' であり、

Y が、結合、- O -、- N R -、または - N = であり、

A が、結合または - (C H 2) n - であり、m が、1 または 2 であり、n が、1 ~ 4 の整数であり、

R および R ' のそれぞれが、存在する場合、独立して、水素、置換もしくは非置換アルキル、置換もしくは非置換ヘテロアルキル、置換もしくは非置換アリール、置換もしくは非置換ヘテロアリール、または置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキルであり、

R ¹ が、水素、フルオロまたはヨードであり、R ² が、水素またはメチルであり、なら

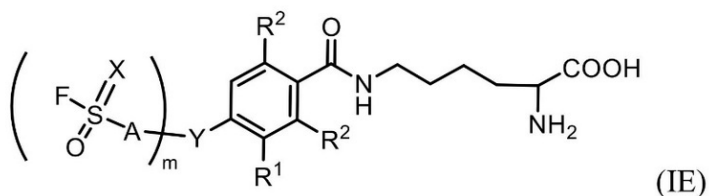
び、
ここで、Y が、結合、- O - または - N R - である場合、m が 1 であり、Y が - N = である場合、m が 2 である、請求項 1 3 7 に記載のコンジュゲート。

30

【請求項 1 4 3】

前記少なくとも 1 つの第 1 の U A A が、式 (I E) の構造：

【化 5 4】



40

を有し、式中、

X がそれぞれ独立して、O または N R ' であり、

Y が、結合、- O -、- N R -、または - N = であり、

A が、結合または - (C H 2) n - であり、m が、1 または 2 であり、n が、1 ~ 4 の整数であり、

R および R ' のそれぞれが、存在する場合、独立して、水素、置換もしくは非置換アルキル、置換もしくは非置換ヘテロアルキル、置換もしくは非置換アリール、置換もしくは非置換ヘテロアリール、または置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキルであり、

R ¹ が、水素、フルオロまたはヨードであり、R ² が、水素またはメチルであり、なら

50

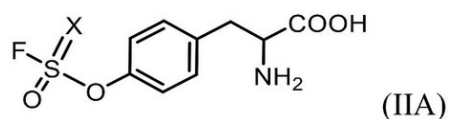
びに、

ここで、Yが、結合、 $-O-$ または $-NR-$ である場合、mが1であり、Yが $-N=$ である場合、mが2である、請求項137に記載のコンジュゲート。

【請求項144】

前記少なくとも1つの第1のUAAが、式(IIA)の構造：

【化55】



10

を有し、式中、

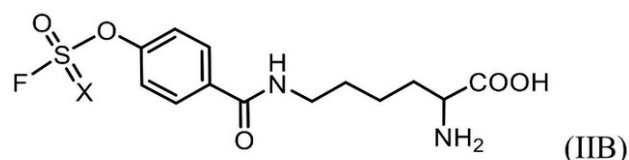
Xが独立して、OまたはNR'であり、および、

R'が、存在する場合、水素、置換もしくは非置換アルキル、置換もしくは非置換ヘテロアルキル、置換もしくは非置換アリール、置換もしくは非置換ヘテロアリール、または置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキルである、請求項137に記載のコンジュゲート。

【請求項145】

前記少なくとも1つの第1のUAAが、式(II B)の構造：

【化56】



20

を有し、式中、

Xが独立して、OまたはNR'であり、および、

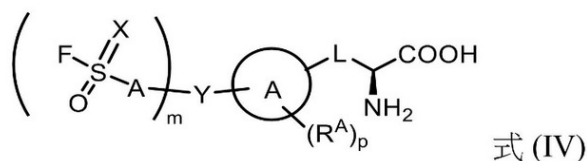
R'が、存在する場合、水素、置換もしくは非置換アルキル、置換もしくは非置換ヘテロアルキル、置換もしくは非置換アリール、置換もしくは非置換ヘテロアリール、または置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキルである、請求項137に記載のコンジュゲート。

30

【請求項146】

前記少なくとも1つの第1のUAAが、

【化57】



40

の構造を有し、式中、

Xがそれぞれ独立して、OまたはNR'であり、

Yが、結合、 $-O-$ 、 $-NR-$ 、または $-N=$ であり、

Aが、結合または $-(CH_2)_n-$ であり、mが、1または2であり、nが、1～4の整数であり、

RおよびR'のそれぞれが、存在する場合、独立して、水素、置換もしくは非置換アルキル、置換もしくは非置換ヘテロアルキル、置換もしくは非置換アリール、置換もしくは

50

非置換ヘテロアリール、または置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキルであり、

環 A が、5～6 員アリールまたはヘテロアリールであり、

R^A がそれぞれ独立して、 $-OH$ 、 $-OR^X$ 、ハロゲン、 NHR^X 、 $N(R^X)_2$ 、または任意選択で置換されたアルキルであり、 p が、0、1、2、3、または 4 であり、 R^X がそれぞれ、任意選択で置換されたアルキルであり、

L が、 $-(CH_2)_p-$ または $-C(O)NH-(CH_2)_p-$ であり、 p が、1～6 の整数であり、ならびに、

ここで、 Y が、結合、 $-O-$ または $-NR-$ である場合、 m が 1 であり、 Y が $-N=$ である場合、 m が 2 である、請求項 108～125 に記載のコンジュゲート。

【請求項 147】

第 1 の細胞表面分子が、PSMA、EGFR、HER2、HER3、PD-L1、EphA4、フィブロネクチン ED-B、EPCAM、CCR4、CD25、VEGF、VEGFR2、endo180、LIV-1、PTK7、CDH6、CSP-1、CD71、PRLR、SEZ6、DLL1、NOTCH3 rec、NaPi2b、DLK1、Muc16、cMET、CEA、LRP5、および LRP6 からなる群から選択される、請求項 124～146 のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

【請求項 148】

第 2 の細胞表面分子が、PSMA、EGFR、HER2、HER3、PD-L1、EphA4、フィブロネクチン ED-B、EPCAM、CCR4、CD25、VEGF、VEGFR2、endo180、LIV-1、PTK7、CDH6、CSP-1、CD71、PRLR、SEZ6、DLL1、NOTCH3 rec、NaPi2b、DLK1、Muc16、cMET、CEA、LRP5、および LRP6 からなる群から選択される、請求項 125～147 のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

【請求項 149】

前記第 2 の標的化ドメインが、第 2 の UAA を含み、それにより、前記第 2 の標的化ドメインが、前記第 2 の UAA の部位で前記第 2 の標的に共有結合することができる、請求項 108～148 のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

【請求項 150】

前記第 2 の UAA が、前記第 1 の標的化ドメインに含まれる少なくとも 1 つの UAA とは異なる、請求項 149 に記載のコンジュゲート。

【請求項 151】

前記第 2 の UAA が、前記第 1 の標的化ドメインに含まれる少なくとも 1 つの UAA と同じである、請求項 149 に記載のコンジュゲート。

【請求項 152】

前記第 2 の UAA が、フルオロ硫酸部分を含む、請求項 149～151 のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

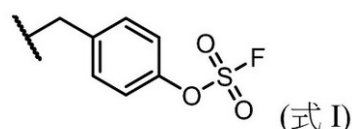
【請求項 153】

前記第 2 の UAA が、アリール-フルオロ硫酸部分を含む、請求項 149～151 のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

【請求項 154】

前記第 2 の UAA が式 I :

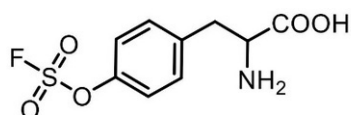
【化 58】



を含む、請求項 153 に記載のコンジュゲート。

【請求項 155】

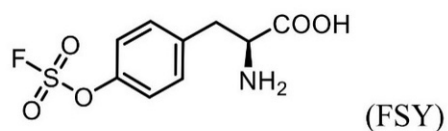
前記第 2 の U A A が、構造：
【化 5 9】



を有する、請求項 1 5 3 に記載のコンジュゲート。

【請求項 1 5 6】

前記第 2 の U A A が、構造：
【化 6 0】

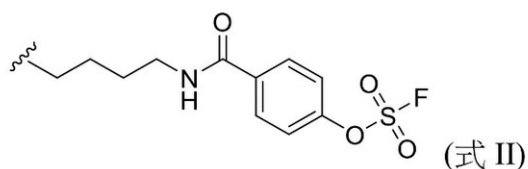


10

を有する、請求項 1 5 3 に記載のコンジュゲート。

【請求項 1 5 7】

前記第 2 の U A A が、式 I I：
【化 6 1】

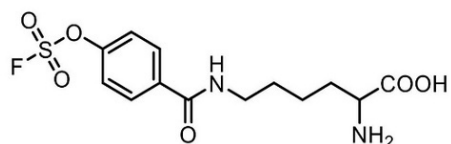


20

を含む、請求項 1 5 3 に記載のコンジュゲート。

【請求項 1 5 8】

前記第 2 の U A A が、構造：
【化 6 2】

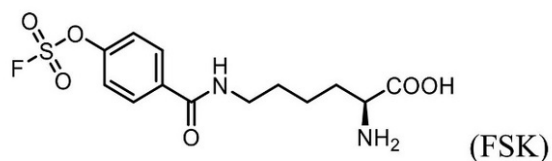


30

を有する、請求項 1 5 3 に記載のコンジュゲート。

【請求項 1 5 9】

前記第 2 の U A A は、構造：
【化 6 3】



40

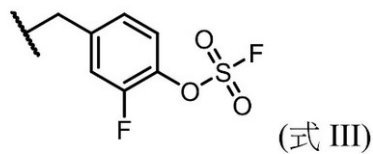
を有する、請求項 1 5 3 に記載のコンジュゲート。

【請求項 1 6 0】

前記第 2 の U A A が、式 I I I：

50

【化 6 4】



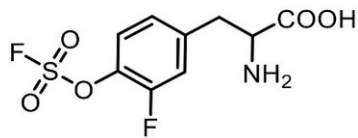
を含む、請求項 1 5 3 に記載のコンジュゲート。

【請求項 1 6 1】

10

前記第 2 の U A A が、構造：

【化 6 5】



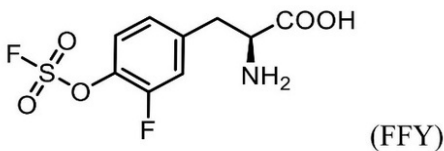
を有する、請求項 1 5 3 に記載のコンジュゲート。

【請求項 1 6 2】

20

前記第 2 の U A A が、構造：

【化 6 6】



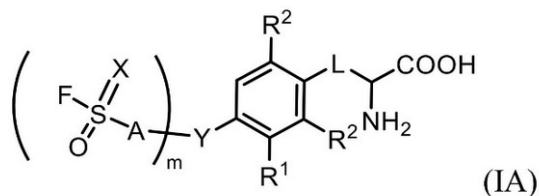
を有する、請求項 1 5 3 に記載のコンジュゲート。

【請求項 1 6 3】

30

前記第 2 の U A A は、式 (I A) の構造：

【化 6 7】



を有し、式中、

40

X がそれぞれ独立して、O または N R ' であり、

Y が、結合、- O -、- N R -、または - N = であり、

A が、結合または - (C H 2) n - であり、m が、1 または 2 であり、n が、1 ~ 4 の整数であり、

R および R ' のそれぞれが、存在する場合、独立して、水素、置換もしくは非置換アルキル、置換もしくは非置換ヘテロアルキル、置換もしくは非置換アリール、置換もしくは非置換ヘテロアリール、または置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキルであり、

R ¹ が、水素、フルオロまたはヨードであり、R ² が、水素またはメチルであり、

L が、- (C H 2) p - または - C (O) N H - (C H 2) p - であり、p が、1 ~ 6 の整数であり、ならびに、

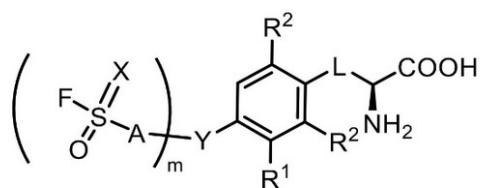
50

ここで、Yが－O－または－NR－である場合、mが1であり、Yが－N＝である場合、mが2である、請求項149～151のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

【請求項164】

前記第2のUAAが、式（IA-a）の構造：

【化68】



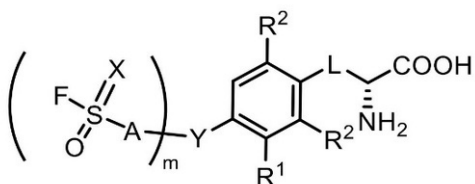
10

を有する、請求項163に記載のコンジュゲート。

【請求項165】

前記第2のUAAが、式（IA-b）の構造：

【化69】



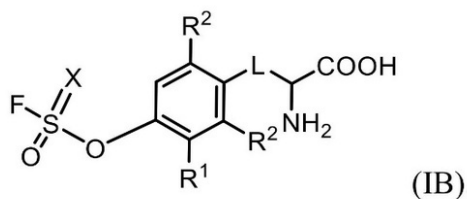
20

を有する、請求項163に記載のコンジュゲート。

【請求項166】

前記第2のUAAが、式（IB）の構造：

【化70】



30

を有する、請求項163に記載のコンジュゲート。

【請求項167】

前記第2のUAAが、式（IC）の構造：

【化71】



40

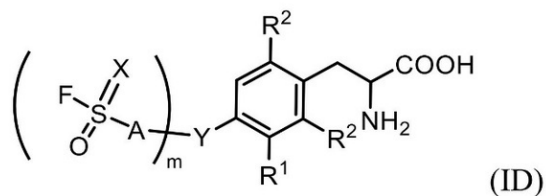
を有する、請求項163に記載のコンジュゲート。

【請求項168】

前記第2のUAAが、式（ID）の構造：

50

【化 7 2】



を有し、式中、

X がそれぞれ独立して、O または N R' であり、

Y が、結合、-O-、-N R-、または -N= であり、

A が、結合または -(CH₂)_n- であり、m が、1 または 2 であり、n が、1 ~ 4 の整数であり、

R および R' のそれぞれが、存在する場合、独立して、水素、置換もしくは非置換アルキル、置換もしくは非置換ヘテロアルキル、置換もしくは非置換アリール、置換もしくは非置換ヘテロアリール、または置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキルであり、

R¹ が、水素、フルオロまたはヨードであり、R² が、水素またはメチルであり、ならびに、

ここで、Y が、結合、-O- または -N R- である場合、m が 1 であり、Y が -N= である場合、m が 2 である、請求項 163 に記載のコンジュゲート。

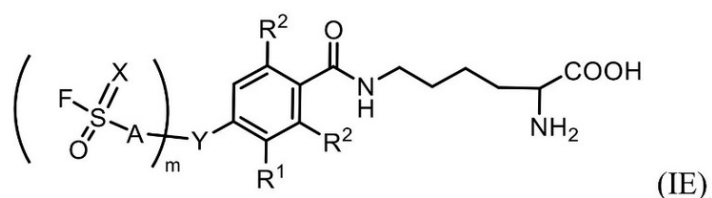
10

20

【請求項 169】

前記第 2 の U A A が、式 (I E) の構造：

【化 7 3】



30

を有し、式中、

X がそれぞれ独立して、O または N R' であり、

Y が、結合、-O-、-N R-、または -N= であり、

A が、結合または -(CH₂)_n- であり、m が、1 または 2 であり、n が、1 ~ 4 の整数であり、

R および R' のそれぞれが、存在する場合、独立して、水素、置換もしくは非置換アルキル、置換もしくは非置換ヘテロアルキル、置換もしくは非置換アリール、置換もしくは非置換ヘテロアリール、または置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキルであり、

R¹ が、水素、フルオロまたはヨードであり、R² が、水素またはメチルであり、ならびに、

ここで、Y が、結合、-O- または -N R- である場合、m が、1 であり、Y が -N= である場合、m が 2 である、請求項 163 に記載のコンジュゲート。

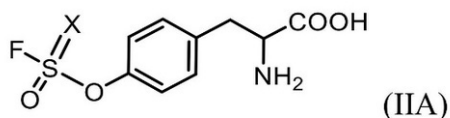
40

【請求項 170】

前記第 2 の U A A が、式 (I I A) の構造：

50

【化 7 4】



を有し、式中、

X が独立して、O または NR' であり、および、

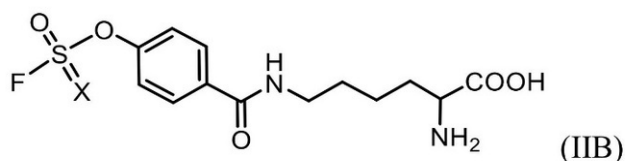
R' が、存在する場合、水素、置換もしくは非置換アルキル、置換もしくは非置換ヘテロアルキル、置換もしくは非置換アリール、置換もしくは非置換ヘテロアリール、または置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキルである、請求項 163 に記載のコンジュゲート。

10

【請求項 171】

前記第 2 の UAA が、式 (IIB) の構造：

【化 7 5】



20

を有し、式中、

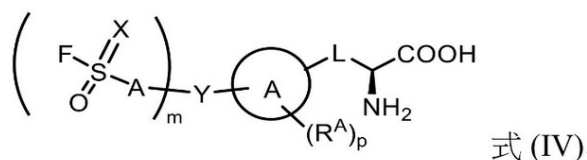
X が独立して、O または NR' であり、および、

R' が、存在する場合、水素、置換もしくは非置換アルキル、置換もしくは非置換ヘテロアルキル、置換もしくは非置換アリール、置換もしくは非置換ヘテロアリール、または置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキルである、請求項 163 に記載のコンジュゲート。

【請求項 172】

前記第 2 の UAA が、

【化 7 6】



30

の構造を有し、式中、

X がそれぞれ独立して、O または NR' であり、

40

Y が、結合、-O-、-NR-、または -N= であり、

A が、結合または -(CH2)n- であり、m が、1 または 2 であり、n は 1 ~ 4 の整数であり、

R および R' のそれぞれが、存在する場合、独立して、水素、置換もしくは非置換アルキル、置換もしくは非置換ヘテロアルキル、置換もしくは非置換アリール、置換もしくは非置換ヘテロアリール、または置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキルであり、

環 A が、5 ~ 6 員アリールまたはヘテロアリールであり、

RA がそれぞれ独立して、-OH、-ORX、ハロゲン、NHRX、N(RX)2、または任意選択で置換されたアルキルであり、p が、0、1、2、3、または 4 であり、RX がそれぞれ、任意選択で置換されたアルキルであり、

50

L が、 $-(CH_2)_p-$ または $-C(O)NH-(CH_2)_p-$ であり、p が、1～6 の整数であり、ならびに、

ここで、Y が、結合、 $-O-$ または $-NR-$ である場合、m が 1 であり、Y が $-N=$ である場合、m が 2 である、請求項 149～151 のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

【請求項 173】

前記第 1 の標的化ドメインが、配列番号 1～4 または 16～64 のいずれか 1 つを含む、請求項 108～172 のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

【請求項 174】

前記第 1 の標的化ドメインが、配列番号 1～4 または 16～64 のいずれか 1 つに対して少なくとも 70% の配列同一性を有する配列を含む、請求項 108～172 のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

10

【請求項 175】

前記第 2 の標的化ドメインが、配列番号 1～4、16～64 のいずれか 1 つを含む、請求項 108～173 のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

【請求項 176】

前記第 2 の標的化ドメインが、配列番号 1～4、16～64 のいずれか 1 つに対して少なくとも 70% の同一性を有する配列を含む、請求項 108～173 のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

【請求項 177】

前記コンジュゲートが配列番号 65～72 を含む、請求項 1～87 または 108～172 のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

20

【請求項 178】

前記コンジュゲートが、配列番号 65～72 に対して少なくとも 70% の配列同一性を有する配列を含む、請求項 1～87 または 108～172 のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

【請求項 179】

前記コンジュゲートが、配列番号 1～4、16～64 のいずれか 1 つを含む、請求項 1～87 または 108～172 のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

【請求項 180】

前記コンジュゲートが、配列番号 1～4、16～64 のいずれか 1 つに対して少なくとも 70% の配列同一性を有する配列を含む、請求項 1～87 または 108～172 のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

30

【請求項 181】

前記コンジュゲートが、配列番号 65～72 に対して少なくとも 80% の配列同一性を有する配列を含む、請求項 1～87 または 108～172 のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

【請求項 182】

前記第 1 の標的化ドメインおよび前記第 2 の標的化ドメインのうちの少なくとも 1 つが、配列番号 1 を含む、請求項 108～172 のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

40

【請求項 183】

前記 UAA が、配列番号 1 に対して 26、28、29、30、99、102、103、105、108、110、111、112、113、114、および 115 からなる群から選択されるアミノ酸位置に存在する、請求項 182 に記載のコンジュゲート。

【請求項 184】

前記第 1 の標的化ドメインおよび前記第 2 の標的化ドメインの少なくとも 1 つが、配列番号 2 を含む、請求項 108～172 のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

【請求項 185】

前記 UAA が、配列番号 2 に対して 50、52、53、54、56、58、および 100 からなる群から選択されるアミノ酸位置に存在する、請求項 184 に記載のコンジュゲ

50

ート。

【請求項 186】

前記第1の標的化ドメインおよび前記第2の標的化ドメインのうちの少なくとも1つが、配列番号3を含む、請求項108～172のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

【請求項 187】

前記UAAが、配列番号3に対して58、62、101、103、および107からなる群から選択されるアミノ酸位置に存在する、請求項186に記載のコンジュゲート。

【請求項 188】

前記第1の標的化ドメインおよび前記第2の標的化ドメインのうちの少なくとも1つが、配列番号16を含む、請求項108～172のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

10

【請求項 189】

配列番号16を含む、前記第1の標的化ドメインおよび前記第2の標的化ドメインのうちの前記少なくとも1つが、配列番号16に対して109位に非天然アミノ酸をさらに含む、請求項188に記載のコンジュゲート。

【請求項 190】

前記第1の標的化ドメインおよび前記第2の標的化ドメインのうちの少なくとも1つが、配列番号18を含む、請求項108～172のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

【請求項 191】

前記ペイロードが、造影剤、放射性リガンド剤または細胞傷害剤を含む、請求項108～190のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

20

【請求項 192】

細胞傷害性部分が、小分子薬または化学療法薬を含む、請求項191に記載のコンジュゲート。

【請求項 193】

前記放射性リガンド剤が、 ^{35}S 、 ^3H 、 ^{111}In 、 ^{112}In 、 ^{14}C 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{32}P 、 ^{153}Sm 、 ^{177}Lu 、 ^{86}Y 、 ^{88}Y 、 ^{90}Y 、 ^{131}I 、 ^{123}I 、 ^{124}I 、 ^{125}I 、 ^{149}Tb 、 ^{211}At 、 ^{212}Pb ／ ^{212}Bi 、 ^{213}Bi 、 ^{223}Ra 、 ^{225}Ac 、 ^{64}Cu 、 ^{67}Cu 、および ^{227}Th からなる群から選択される、請求項191に記載のコンジュゲート。

【請求項 194】

前記放射性リガンド剤がキレート剤をさらに含む、請求項192または請求項193に記載のコンジュゲート。

30

【請求項 195】

前記放射性リガンド剤が、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 ^{131}I 、 ^{201}Tl 、 ^{111}In 、および ^{67}Ga からなる群から選択される、請求項192に記載のコンジュゲート。

【請求項 196】

前記ペイロードが、リンカーでコンジュゲートに付着される、請求項108～195のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

【請求項 197】

請求項108～196のいずれか一項に記載のコンジュゲートを投与する工程を含む方法であって、前記コンジュゲートが、第1の細胞の表面上の第1の標的に共有結合する方法。

40

【請求項 198】

前記コンジュゲートが、前記第1の細胞の表面上の第2の標的に結合する、請求項197に記載の方法。

【請求項 199】

前記第1の標的化ドメインおよび前記第2の標的化ドメインが、前記同じ標的に結合する、請求項197または請求項198に記載の方法。

【請求項 200】

前記第1の標的化ドメインおよび前記第2の標的化ドメインが、前記同じ標的の同じエ

50

ピトープに結合する、請求項 199 に記載の方法。

【請求項 201】

前記第 1 の標的化ドメインおよび前記第 2 の標的化ドメインが、同じ標的の異なるエピトープに結合する、請求項 199 に記載の方法。

【請求項 202】

前記第 1 の標的化ドメインおよび前記第 2 の標的化ドメインが、前記第 1 の細胞の表面上の異なる標的に結合する、請求項 197 または請求項 198 に記載の方法。

【請求項 203】

前記第 2 のドメインが、第 2 の U A A を含み、前記第 2 の U A A が、前記第 2 の標的に共有結合する、請求項 197 ～ 202 のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 204】

前記第 1 の細胞が腫瘍細胞である、請求項 197 ～ 203 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 205】

前記コンジュゲートが、前記第 1 の標的に結合された場合に、前記腫瘍細胞を死滅させるか、または前記腫瘍細胞の増殖を阻害する、請求項 204 に記載の方法。

【請求項 206】

前記コンジュゲートが、前記第 2 の標的に結合された場合に、前記腫瘍細胞を死滅させるか、または前記腫瘍細胞の増殖を阻害する、請求項 204 に記載の方法。

【請求項 207】

前記コンジュゲートが、前記第 1 の標的および前記第 2 の標的に結合された場合に、前記腫瘍細胞を死滅させるか、または前記腫瘍細胞の増殖を阻害する、請求項 204 に記載の方法。

20

【請求項 208】

前記第 1 の標的が、PSMA、EGFR、EGFRviii、MSLN、CEA、DLL3、FAP、CD33、HER3、PD-L1、EphA2、EphA4、HER2、SIRPa、DLK1、Muc16、LRP5、LRP6、endol80、LIV-1、SLAMF7、PTK7、GPR20、CDH6、CSP-1、CD71、PRLR、SEZ6、DLL1、NOTCH3rec、NaPi2b、CD16、GCC、SSTR2、CAIX、CAXII、MC1R、CXCR4、B1R、GRPR、STEAP1、CD70、CD46、CD166、CLL-1、ADAM9、cKIT、CD36、CD73、ITGaVb3、ITGaVb6、GPC-1、CD38、CD51、FGFR3、Ly6E、CD44v6、ENPP3、CXCR3、CXCR5、FcRH5、VEGF、VEGFR2、CD45、CCR4、CD25、5T4、ROR1、TROP-2、NECTIN4、cMET、CD19、CD22、CD30、CD33、CD123、BCMA、CD79b、AXL、RON、B7-H3、B7-H4、KAG1、Muc1、ADAM-9、GPNMB、EDBフィブロネクチン、組織因子、GPNMB、FolRa、EphA2、ALPP、ALPPL2、MT1-MMP、CLDN18.2、CLDN6、CLDN9、pカドヘリン、CEACAM6、CD47、およびEpCAMからなる群から選択される、請求項 197 ～ 207 のいずれか一項に記載の方法。

30

40

【請求項 209】

前記第 2 の標的が、PSMA、EGFR、EGFRviii、MSLN、CEA、DLL3、FAP、CD33、HER3、PD-L1、EphA2、EphA4、HER2、SIRPa、DLK1、Muc16、LRP5、LRP6、endol80、LIV-1、SLAMF7、PTK7、GPR20、CDH6、CSP-1、CD71、PRLR、SEZ6、DLL1、NOTCH3rec、NaPi2b、CD16、GCC、SSTR2、CAIX、CAXII、MC1R、CXCR4、B1R、GRPR、STEAP1、CD70、CD46、CD166、CLL-1、ADAM9、cKIT、CD36、CD73、ITGaVb3、ITGaVb6、GPC-1、CD38、CD51、FGFR3、Ly6E、CD44v6、ENPP3、CXCR3、CXCR5、FcRH5、VE

50

G F、V E G F R 2、C D 4 5、C C R 4、C D 2 5、5 T 4、R O R 1、T R O P - 2、N E C T I N 4、c M E T、C D 1 9、C D 2 2、C D 3 0、C D 3 3、C D 1 2 3、B C M A、C D 7 9 b、A X L、R O N、B 7 - H 3、B 7 - H 4、K A A G 1、M u c l、A D A M - 9、G P N M B、E D B フィブロネクチン、組織因子、G P N M B、F o l R a、E p h A 2、A L P P、A L P P L 2、M T 1 - M M P、C L D N 1 8 . 2、C L D N 6、C L D N 9、p カドヘリン、C E A C A M 6、C D 4 7、および E p C A M からなる群から選択される、請求項 1 9 7 ~ 2 0 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 1 0】

前記ペイロードが、放射標識剤または細胞傷害剤である、請求項 1 9 7 ~ 2 0 9 のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 2 1 1】

前記ペイロードが造影剤である、請求項 1 9 8 ~ 2 0 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 1 2】

前記方法が、前記コンジュゲートが前記第 1 の細胞上の前記第 1 の標的および前記第 2 の標的に結合された場合に、前記第 1 の細胞を造影または同定する、請求項 2 1 1 に記載の方法。

【請求項 2 1 3】

請求項 1 0 8 ~ 1 9 6 のいずれか一項に記載のコンジュゲートを製造する方法であって、

(a) 少なくとも 1 つの非天然アミノ酸を含む前記第 1 の標的化ドメインを *i n v i v o* で合成する工程と、

20

(b) 任意選択でリンカーを介して、前記ペイロードを、前記第 1 の標的化ドメインまたは前記第 2 の標的化ドメインへコンジュゲートする工程とを含む、方法。

【請求項 2 1 4】

前記第 1 の標的化ドメインに対する融合タンパク質として、前記第 2 の標的化ドメインを *i n v i v o* で合成する工程をさらに含む、請求項 2 1 3 に記載の方法。

【請求項 2 1 5】

合成する工程が、直交 t R N A シンターゼ / サプレッサー t R N A 対の使用を含む、請求項 2 1 3 または請求項 2 1 4 に記載の方法。

30

【請求項 2 1 6】

合成する工程が、ピロリジン t R N A シンターゼ / t R N A ^{P y l} に由来する直交 t R N A シンターゼ / サプレッサー t R N A 対を含む、請求項 2 1 5 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

相互参照

本出願は、2 0 2 1 年 1 2 月 2 2 日に出願された米国特許仮出願第 6 3 / 2 9 3 , 0 2 5 号、2 0 2 2 年 5 月 2 7 日に出願された米国特許仮出願第 6 3 / 3 4 6 , 7 9 9 号、および 2 0 2 2 年 7 月 1 1 日に出願された米国特許仮出願第 6 3 / 3 8 8 , 0 7 2 号の利益を主張し、これらの文献のそれぞれは、参照によりその全体が援用される。

40

【背景技術】

【0 0 0 2】

タンパク質のアミノ酸側鎖は通常、可逆的である比較的弱いジスルフィド結合を生成するシステインを除いて、互いに共有結合を形成することができないので、タンパク質は主にタンパク質内またはタンパク質間で非共有結合性相互作用を使用する。したがって、標的タンパク質上の複数の天然アミノ酸残基と特異的に反応することができる潜在的生物反応性非天然アミノ酸 (U A A) は、*i n v i v o* での共有結合を受けやすいタンパク質の多様性に拡張し、これは、既存のタンパク質特性を増強することを可能にし得るか、または新規共有結合を利用することによって新しい機能を進化させ得る。さらに、タンパク

50

質間の共有結合は、*in vivo*でのタンパク質間相互作用の不可逆的捕捉を可能にし、これは、タンパク質同定、創薬、不可逆的アンタゴニストおよびペイロード送達に有用であり得る。

【発明の概要】

【0003】

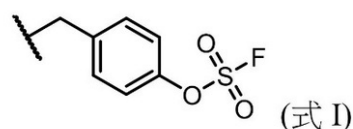
標的化ドメインおよびペイロードを含むコンジュゲートが本明細書で提供され、標的化ドメインは、少なくとも1つの非天然アミノ酸（UAA）残基を含み、標的化ドメインは、標的に結合するように構成され、UAA残基は、標的化ドメインが結合したときに標的と共有結合を形成するのに十分に近接している。さらに本明細書では、ペイロードがUAA残基から $n+x$ 位のアミノ酸に結合しているコンジュゲートが提供され、ここで、 n はアミノ酸の位置であり、 x は少なくとも1である。さらに本明細書では、ペイロードがUAA残基から $n-x$ 位のアミノ酸に結合しているコンジュゲートが提供され、ここで、 n はアミノ酸の位置であり、 x は少なくとも1である。さらに本明細書では、標的化ドメインが標的に結合される場合、UAA残基が標的の5～20オングストローム内にあるコンジュゲートが提供される。さらに本明細書では、標的化ドメインが細胞表面分子に結合するコンジュゲートが提供される。さらに本明細書では、UAA残基が、標的のヒスチジン、リジン、またはチロシン残基と共有結合を形成するように構成されるコンジュゲートが提供される。さらに本明細書では、UAA残基がフルオロ硫酸部分を含むコンジュゲートが提供される。さらに本明細書では、UAA残基がアリールフルオロ硫酸部分を含むコンジュゲートが提供される。さらに本明細書では、UAA残基が式I：

10

20

【0004】

【化1】



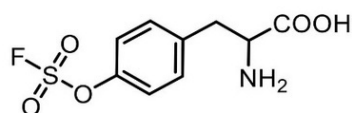
を含むコンジュゲートが提供される。

さらに本明細書では、UAA残基のUAAが構造：

30

【0005】

【化2】



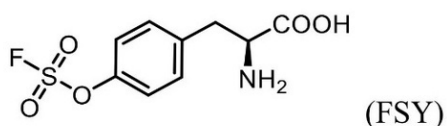
を有するコンジュゲートが提供される。

さらに本明細書では、UAA残基のUAAが構造：

40

【0006】

【化3】



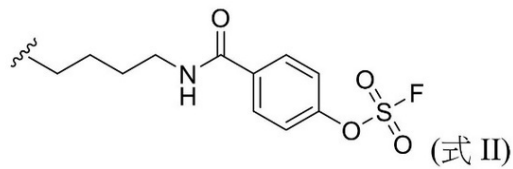
を有するコンジュゲートが提供される。

さらに本明細書では、UAA残基が式II：

50

【 0 0 0 7 】

【 化 4 】



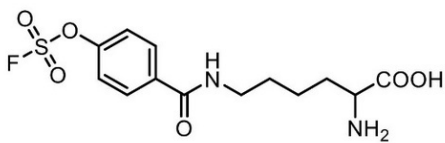
を含むコンジュゲートが提供される。

10

さらに本明細書では、U A A 残基の U A A が構造：

【 0 0 0 8 】

【 化 5 】



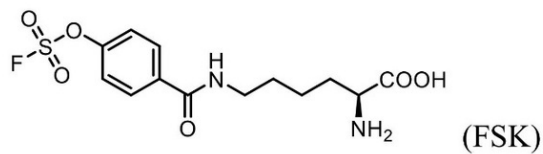
20

を有するコンジュゲートが提供される。

さらに本明細書では、U A A 残基の U A A が以下の構造：

【 0 0 0 9 】

【 化 6 】



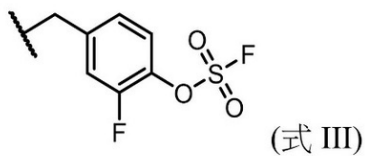
30

を有するコンジュゲートが提供される。

さらに本明細書では、U A A 残基が式 I I I：

【 0 0 1 0 】

【 化 7 】



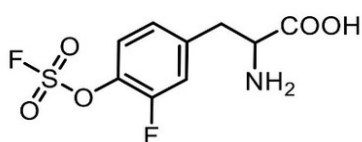
40

を含むコンジュゲートが提供される。

さらに本明細書では、U A A 残基の U A A が構造：

【 0 0 1 1 】

【 化 8 】



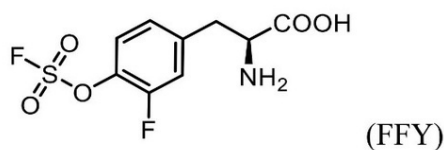
50

を有するコンジュゲートが提供される。

さらに本明細書では、U A A 残基の U A A が構造：

【 0 0 1 2 】

【 化 9 】



10

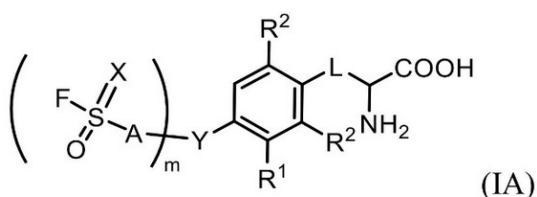
を有するコンジュゲートが提供される。

【 0 0 1 3 】

さらに本明細書では、U A A 残基の U A A が式 (I A) の構造：

【 0 0 1 4 】

【 化 1 0 】



20

を有するコンジュゲートが提供され、
式中、

X はそれぞれ独立して、O または N R ' であり、

Y は、結合、- O -、- N R -、または - N = であり、

A は、結合または - (C H 2) n - であり、m は 1 または 2 であり、n は 1 ~ 4 の整数
であり、

30

R および R ' のそれぞれは、存在する場合、独立して、水素、置換もしくは非置換アル
キル、置換もしくは非置換ヘテロアルキル、置換もしくは非置換アリール、置換もしくは
非置換ヘテロアリール、または置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキルであり、

R ¹ は、水素、フルオロまたはヨードであり、R ² は、水素またはメチルであり、

L は、- (C H 2) p - または - C (O) N H - (C H 2) p - であり、p は 1 ~ 6 の
整数であり、ならびに、

ここで、Y が - O - または - N R - である場合、m は 1 であり、Y が - N = である場合
、m は 2 である。

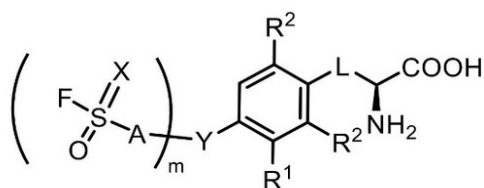
【 0 0 1 5 】

さらに本明細書では、式 (I A) の U A A が式 (I A - a) の構造：

40

【 0 0 1 6 】

【 化 1 1 】



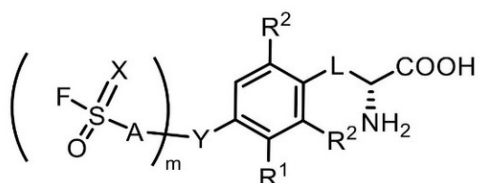
を有するコンジュゲートが提供される。

さらに本明細書では、式 (I A) の U A A が式 (I A - b) の構造：

50

【 0 0 1 7 】

【 化 1 2 】



を有するコンジュゲートが提供される。

10

さらに本明細書では、式 (I A) の U A A が式 (I B) の構造：

【 0 0 1 8 】

【 化 1 3 】



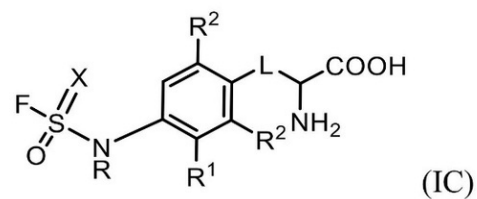
20

を有するコンジュゲートが提供される。

さらに本明細書では、式 (I A) の U A A が式 (I C) の構造：

【 0 0 1 9 】

【 化 1 4 】



30

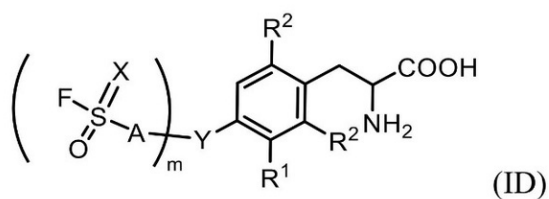
を有するコンジュゲートが提供される。

【 0 0 2 0 】

さらに本明細書では、式 (I A) の U A A が式 (I D) の構造：

【 0 0 2 1 】

【 化 1 5 】



40

を有するコンジュゲートが提供され、
式中、

X はそれぞれ独立して、O または NR であり、

Y は、結合、-O-、-NR-、または -N= であり、

50

A は、結合または $-(CH_2)_n-$ であり、m は 1 または 2 であり、n は 1 ~ 4 の整数であり、

R および R' のそれぞれは、存在する場合、独立して、水素、置換もしくは非置換アルキル、置換もしくは非置換ヘテロアルキル、置換もしくは非置換アリール、置換もしくは非置換ヘテロアリール、または置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキルであり、

R¹ は、水素、フルオロまたはヨードであり、R² は、水素またはメチルであり、ならびに、

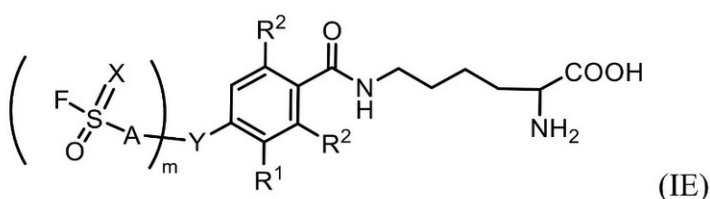
ここで、Y が、結合、 $-O-$ または $-NR-$ である場合、m は 1 であり、Y が $-N=$ である場合、m は 2 である。

【0022】

さらに本明細書では、式 (IA) の UAA が式 (IE) の構造：

【0023】

【化16】



を有するコンジュゲートが提供され、
式中、

X はそれぞれ独立して、O または NR' であり、

Y は、結合、 $-O-$ 、 $-NR-$ 、または $-N=$ であり、

A は、結合または $-(CH_2)_n-$ であり、m は 1 または 2 であり、n は 1 ~ 4 の整数であり、

R および R' のそれぞれは、存在する場合、独立して、水素、置換もしくは非置換アルキル、置換もしくは非置換ヘテロアルキル、置換もしくは非置換アリール、置換もしくは非置換ヘテロアリール、または置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキルであり、

R¹ は、水素、フルオロまたはヨードであり、R² は、水素またはメチルであり、ならびに、

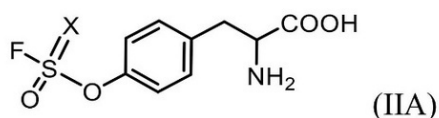
ここで、Y が、結合、 $-O-$ または $-NR-$ である場合、m は 1 であり、Y が $-N=$ である場合、m は 2 である。

【0024】

さらに本明細書では、式 (IA) の UAA が式 (IIA) の構造：

【0025】

【化17】



を有するコンジュゲートが提供され、
式中、

X は独立して、O または NR であり、および、

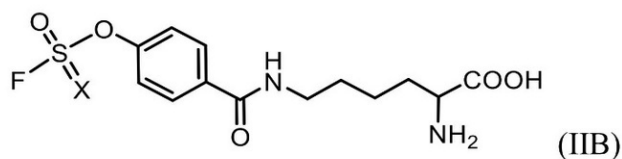
R' は、存在する場合、水素、置換もしくは非置換アルキル、置換もしくは非置換ヘテロアルキル、置換もしくは非置換アリール、置換もしくは非置換ヘテロアリール、または置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキルである。

【0026】

さらに本明細書では、式（IA）のUAAが式（IIB）の構造：

【0027】

【化18】



10

を有するコンジュゲートが提供され、
式中、

Xは独立して、OまたはNR'であり、および、

R'は、存在する場合、水素、置換もしくは非置換アルキル、置換もしくは非置換ヘテロアルキル、置換もしくは非置換アリール、置換もしくは非置換ヘテロアリール、または置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキルである。

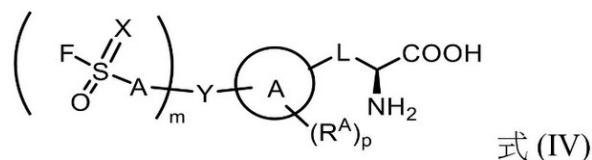
【0028】

さらに本明細書では、UAA残基のUAAが式（IV）の構造：

【0029】

【化19】

20



を有するコンジュゲートが提供され、
式中、

Xはそれぞれ独立して、OまたはNR'であり、

Yは、結合、-O-、-NR-、または-N=であり、

Aは、結合または-(CH2)n-であり、mは1または2であり、nは1～4の整数であり、

RおよびR'のそれぞれは、存在する場合、独立して、水素、置換もしくは非置換アルキル、置換もしくは非置換ヘテロアルキル、置換もしくは非置換アリール、置換もしくは非置換ヘテロアリール、または置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキルであり、

環Aは、5～6員アリールまたはヘテロアリールであり、

RAはそれぞれ独立して、-OH、-ORX、ハロゲン、NHRX、N(RX)2、または任意選択で置換されたアルキルであり、RXはそれぞれ、任意選択で置換されたアルキルであり、

Lは、-(CH2)p-または-C(O)NH-(CH2)p-であり、pは1～6の整数であり、ならびに、

ここで、Yが、結合、-O-または-NR-である場合、mは1であり、Yが-N=である場合、mは2である。

【0030】

さらに本明細書では、ペイロードが造影剤（imaging agent）、放射性リガンド剤（radioligand agent）または細胞傷害剤（cytotoxic agent）を含むコンジュゲートが提供される。さらに本明細書では、細胞傷害性部分が小分子薬または化学療法薬を含むコンジュゲートが提供される。さらに本明細書では、放射性リガンド剤が、¹⁵³Sm、¹⁷⁷Lu、⁹⁰Y、¹³¹I、¹⁴⁹Tb、²¹¹At、²¹²Pb/²¹²Bi、²¹³Bi、²²³Ra、²²⁵Ac、および²²⁷Thが

50

らなる群から選択されるコンジュゲートが提供される。さらに本明細書では、放射性リガンド剤がキレート剤をさらに含むコンジュゲートが提供される。さらに本明細書では、放射性リガンド剤が ^{99m}Tc 、 ^{131}I 、 ^{201}Tl 、 ^{111}In 、および ^{67}Ga からなる群から選択されるコンジュゲートが提供される。さらに本明細書では、ペイロードがリンカーでコンジュゲートに結合しているコンジュゲートが提供される。さらに本明細書では、リンカーがポリマー含むコンジュゲートが提供される。さらに本明細書では、リンカーが切断可能または非切断可能リンカーであるコンジュゲートが提供される。さらに本明細書では、リンカーが $0.01\text{ kDa} \sim 2.5\text{ kDa}$ であるコンジュゲートが提供される。さらに本明細書では、リンカーが $0.01\text{ kDa} \sim 2.5\text{ kDa}$ であるコンジュゲートが提供される。さらに本明細書では、リンカーが直鎖状、分枝状、多量体、またはデンドリマーであるコンジュゲートが提供される。さらに本明細書では、リンカーが二官能性もしくは多官能性リンカーまたは二官能性もしくは多官能性ポリマーであるコンジュゲートが提供される。さらに本明細書では、リンカーが水溶性ポリマーを含むコンジュゲートが提供される。さらに本明細書では、水溶性ポリマーがポリエチレングリコール (PEG) であるコンジュゲートが提供される。さらに本明細書では、PEGが $0.1\text{ kDa} \sim 2.5\text{ kDa}$ の分子量を有するコンジュゲートが提供される。さらに本明細書では、PEGが1～8モノマーを含むコンジュゲートが提供される。さらに本明細書では、標的化ドメインが抗体、抗体断片、または抗原結合ドメインを含むコンジュゲートが提供される。さらに本明細書では、標的化ドメインが抗原結合ドメインを含み、コンジュゲートがCDR領域を含み、少なくとも1つのUAA残基がCDR領域内またはその近傍にあるコンジュゲートが提供される。さらに本明細書では、UAA残基がCDR領域内に含まれるコンジュゲートが提供される。さらに本明細書では、標的化ドメインが単ドメイン抗体 (sdAb) を含むコンジュゲートが提供される。さらに本明細書では、細胞表面分子が、PSMA、EGFR、EGFRviii、MSLN、CEA、DLL3、FAP、CD33、HER3、PD-L1、EphA2、EphA4、HER2、SIRPa、DLK1、Muc16、LRP5、LRP6、endo180、LIV-1、SLAMF7、PTK7、GPR20、CDH6、CSP-1、CD71、PRLR、SEZ6、DLL1、NOTCH3 rec、NaPi2b、CD16、GCC、SSTR2、CAIX、CAXII、MC1R、CXCR4、B1R、GRPR、STEAP1、CD70、CD46、CD166、CLL-1、ADAM9、cKIT、CD36、CD73、ITGaVb3、ITGaVb6、GPC-1、CD38、CD51、FGFR3、Ly6E、CD44v6、ENPP3、CXCR3、CXCR5、FcRH5、VEGF、VEGFR2、CD45、CCR4、CD25、5T4、ROR1、TROP-2、NECTIN4、cMET、CD19、CD22、CD30、CD33、CD123、BCMA、CD79b、AXL、RON、B7-H3、B7-H4、KAAG1、Muc1、ADAM-9、GPNMB、EDBフィブロネクチン、組織因子、GPNMB、FolRa、ALPP、ALPPL2、MT1-MMP、CLDN18.2、CLDN6、CLDN9、pCadherin、CEACAM6、CD47、およびEpCAMからなる群から選択されるコンジュゲートが提供される。

10

20

30

40

【0031】

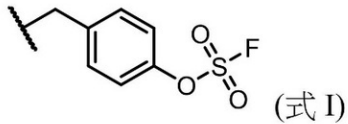
さらに本明細書では、(i) ペイロードと、(ii) CDR領域およびCDR領域内もしくはその近傍の少なくとも1つの非天然アミノ酸 (UAA) 残基を有するsdAbを含む操作された単ドメイン抗体 (sdAb) とを含むコンジュゲートが提供され、sdAbが配列番号1～4または16～64のいずれか1つを含むコンジュゲートも提供される。さらに本明細書では、UAA残基がフルオロ硫酸部分を含むコンジュゲートが提供される。さらに本明細書では、UAA残基がアリールフルオロ硫酸部分を含むコンジュゲートが提供される。

さらに本明細書では、UAA残基が式I：

【0032】

50

【化 2 0】



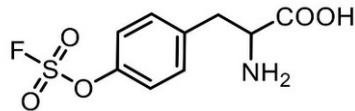
を含むコンジュゲートが提供される。

さらに本明細書では、U A A 残基の U A A が以下の構造：

【0 0 3 3】

【化 2 1】

10



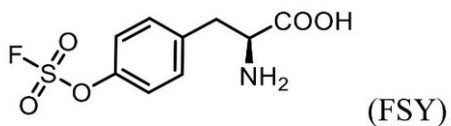
を有するコンジュゲートが提供される。

さらに本明細書では、U A A 残基の U A A が構造：

【0 0 3 4】

【化 2 2】

20



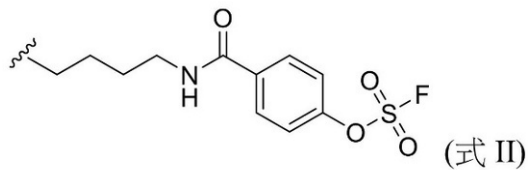
を有するコンジュゲートが提供される。

さらに本明細書では、U A A 残基が式 I I：

【0 0 3 5】

【化 2 3】

30



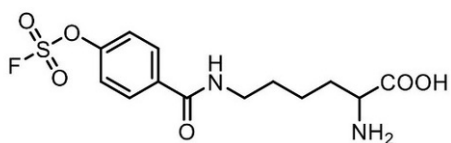
を含むコンジュゲートが提供される。

さらに本明細書では、U A A 残基の U A A が構造：

【0 0 3 6】

【化 2 4】

40



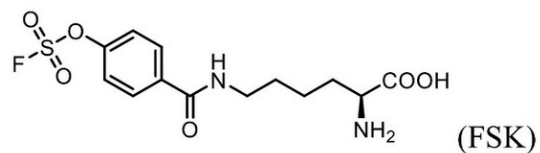
を有するコンジュゲートが提供される。

さらに本明細書では、U A A が構造：

【0 0 3 7】

50

【化 2 5】



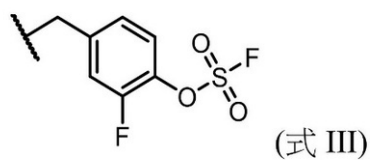
を有するコンジュゲートが提供される。

さらに本明細書では、U A A 残基が式 I I I :

【 0 0 3 8 】

10

【化 2 6】



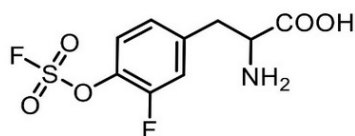
を含むコンジュゲートが提供される。

さらに本明細書では、U A A 残基の U A A が構造 :

20

【 0 0 3 9 】

【化 2 7】



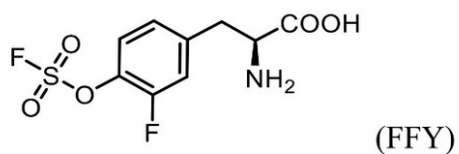
を有するコンジュゲートが提供される。

さらに本明細書では、U A A 残基の U A A が構造 :

30

【 0 0 4 0 】

【化 2 8】



を有するコンジュゲートが提供される。

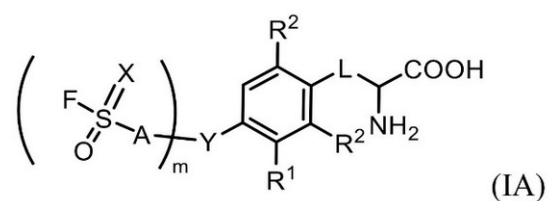
【 0 0 4 1 】

40

さらに本明細書では、U A A 残基の U A A が式 (I A) の構造 :

【 0 0 4 2 】

【化 2 9】



50

を有するコンジュゲートが提供され、
式中、

Xはそれぞれ独立して、OまたはNR'であり、

Yは、結合、-O-、-NR-、または-N=であり、

Aは、結合または-(CH₂)_n-であり、mは1または2であり、nは1～4の整数であり、

RおよびR'のそれぞれは、存在する場合、独立して、水素、置換もしくは非置換アルキル、置換もしくは非置換ヘテロアルキル、置換もしくは非置換アリール、置換もしくは非置換ヘテロアリール、または置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキルであり、

R¹は、水素、フルオロまたはヨードであり、R²は、水素またはメチルであり、

Lは、-(CH₂)_p-または-C(O)NH-(CH₂)_p-であり、pは1～6の整数であり、ならびに、

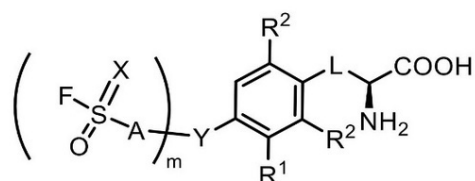
ここで、Yが-O-または-NR-である場合、mは1であり、Yが-N=である場合、mは2である。

【0043】

さらに本明細書では、式(IA)のUAAが式(IA-a)の構造：

【0044】

【化30】

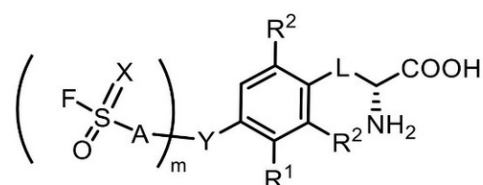


を有するコンジュゲートが提供される。

さらに本明細書では、式(IA)のUAAが式(IA-b)の構造：

【0045】

【化31】



を有するコンジュゲートが提供される。

さらに本明細書では、式(IA)のUAAが式(IB)の構造：

【0046】

【化32】



を有するコンジュゲートが提供される。

さらに本明細書では、式(IA)のUAAが式(IC)の構造：

10

20

30

40

50

【 0 0 4 7 】

【 化 3 3 】



を有するコンジュゲートが提供される。

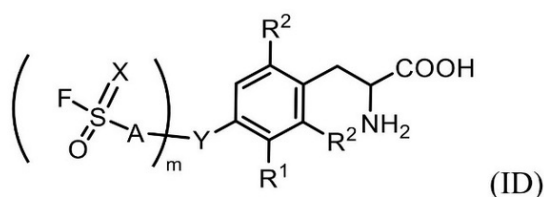
10

【 0 0 4 8 】

さらに本明細書では、式 (I A) の U A A が式 (I D) の構造：

【 0 0 4 9 】

【 化 3 4 】



20

を有するコンジュゲートが提供され、

式中、

X はそれぞれ独立して、O または N R ' であり、

Y は、結合、- O -、- N R -、または - N = であり、

A は、結合または - (C H 2) n - であり、m は 1 または 2 であり、n は 1 ~ 4 の整数であり、

R および R ' のそれぞれは、存在する場合、独立して、水素、置換もしくは非置換アルキル、置換もしくは非置換ヘテロアルキル、置換もしくは非置換アリール、置換もしくは非置換ヘテロアリール、または置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキルであり、

30

R¹ は、水素、フルオロまたはヨードであり、R² は、水素またはメチルであり、ならびに、

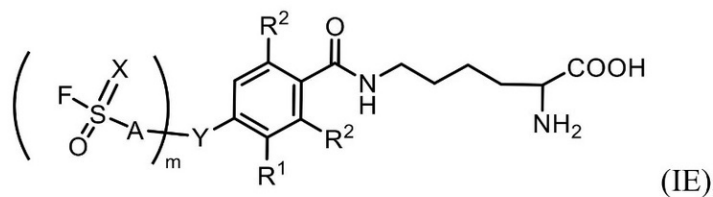
ここで、Y が、結合、- O - または - N R - である場合、m は 1 であり、Y が - N = である場合、m は 2 である。

【 0 0 5 0 】

さらに本明細書では、式 (I A) の U A A が式 (I E) の構造：

【 0 0 5 1 】

【 化 3 5 】



40

を有するコンジュゲートが提供され、

式中、

X はそれぞれ独立して、O または N R ' であり、

50

Y は、結合、 $-O-$ 、 $-NR-$ 、または $-N=$ であり、

A は、結合または $-(CH_2)_n-$ であり、m は 1 または 2 であり、n は 1 ~ 4 の整数であり、

R および R' のそれぞれは、存在する場合、独立して、水素、置換もしくは非置換アルキル、置換もしくは非置換ヘテロアルキル、置換もしくは非置換アリール、置換もしくは非置換ヘテロアリール、または置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキルであり、

R¹ は、水素、フルオロまたはヨードであり、R² は、水素またはメチルであり、ならびに、

ここで、Y が、結合、 $-O-$ または $-NR-$ である場合、m は 1 であり、Y が $-N=$ である場合、m は 2 である。

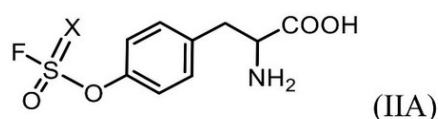
10

【0052】

さらに本明細書では、式 (IA) の UAA が式 (IIA) の構造：

【0053】

【化36】



20

を有する操作された s d A b s が提供され、
式中、

X は独立して、O または NR' であり、および、

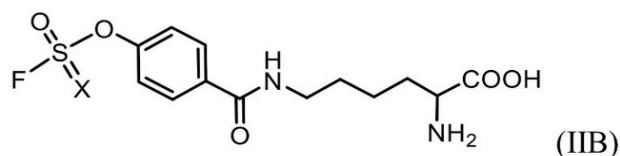
R' は、存在する場合、水素、置換もしくは非置換アルキル、置換もしくは非置換ヘテロアルキル、置換もしくは非置換アリール、置換もしくは非置換ヘテロアリール、または置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキルである。

【0054】

さらに本明細書では、式 (IA) の UAA が式 (IIB) の構造：

【0055】

【化37】



30

を有する操作された s d A b s が提供され、
式中、

X は独立して、O または NR であり、および、

40

R' は、存在する場合、水素、置換もしくは非置換アルキル、置換もしくは非置換ヘテロアルキル、置換もしくは非置換アリール、置換もしくは非置換ヘテロアリール、または置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキルである。

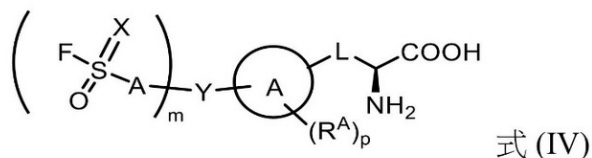
【0056】

さらに本明細書では、UAA 残基の UAA が式 (IV) の構造：

【0057】

50

【化 3 8】



を有するコンジュゲートが提供され、

式中、

X はそれぞれ独立して、 O または NR' であり、 Y は、結合、 $-\text{O}-$ 、 $-\text{NR}-$ 、または $-\text{N}=\text{}$ であり、

A は、結合または $-(\text{CH}_2)_n-$ であり、 m は 1 または 2 であり、 n は 1 ~ 4 の整数であり、

R および R' のそれぞれは、存在する場合、独立して、水素、置換もしくは非置換アルキル、置換もしくは非置換ヘテロアルキル、置換もしくは非置換アリール、置換もしくは非置換ヘテロアリール、または置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキルであり、

環 A は、5 ~ 6 員アリールまたはヘテロアリールであり、

R^{A} はそれぞれ独立して、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{OR}^{\text{X}}$ 、ハロゲン、 NHR^{X} 、 $\text{N}(\text{R}^{\text{X}})_2$ 、または任意選択で置換アルキルであり、 R^{X} はそれぞれ、任意選択で置換されたアルキルであり、

L は、 $-(\text{CH}_2)_p-$ または $-\text{C}(\text{O})\text{NH}-(\text{CH}_2)_p-$ であり、 p は 1 ~ 6 の整数であり、ならびに、

ここで、 Y が、結合、 $-\text{O}-$ または $-\text{NR}-$ である場合、 m は 1 であり、 Y が $-\text{N}=\text{}$ である場合、 m は 2 である。

【0058】

さらに本明細書では、操作された s d A b が配列番号 1 を含み、 U A A 残基が配列番号 5、6、および 7 のいずれか 1 つに含まれるコンジュゲートが提供される。さらに本明細書では、 U A A 残基が配列番号 1 に対して 26、28、29、30、99、102、103、105、108、110、111、112、113、114、および 115 からなる群から選択されるアミノ酸位置に存在するコンジュゲートが提供される。さらに本明細書では、操作された s d A b が配列番号 2 を含み、 U A A 残基が配列番号 8、9、および 10 のいずれか 1 つに含まれるコンジュゲートが提供される。さらに本明細書では、 U A A 残基が配列番号 2 に対して 50、52、53、54、56、58、および 100 からなる群から選択されるアミノ酸位置に存在するコンジュゲートが提供される。さらに本明細書では、操作された s d A b が配列番号 3 を含み、 U A A 残基が配列番号 11、12、および 13 のいずれか 1 つに含まれるコンジュゲートが提供される。さらに本明細書では、 U A A 残基が配列番号 3 に対して 58、62、101、103、および 107 からなる群から選択されるアミノ酸位置に存在するコンジュゲートが提供される。さらに本明細書では、操作された s d A b が配列番号 16 を含み、 U A A が配列番号 16 に対して 109 のアミノ酸位置に存在するコンジュゲートが提供される。さらに本明細書では、操作された s d A b が配列番号 23 を含み、 U A A が配列番号 23 に対して 52、53、54、55、56、58、60、62、および 64 からなる群から選択されるアミノ酸位置に存在するコンジュゲートが提供される。さらに本明細書では、操作された s d A b が配列番号 24 を含み、 U A A が配列番号 24 に対して 53、55、56、57、58、60、64、および 67 からなる群から選択されるアミノ酸位置に存在するコンジュゲートが提供される。

【0059】

さらに本明細書では、ペイロードが U A A 残基側鎖を介して連結されていないコンジュゲートが提供される。さらに本明細書では、ペイロードが造影剤、放射性リガンド剤また

は細胞傷害剤を含むコンジュゲートが提供される。さらに本明細書では、細胞傷害性部分が小分子薬または化学療法薬を含むコンジュゲートが提供される。さらに本明細書では、放射性リガンド剤が、 ^{153}Sm 、 ^{177}Lu 、 ^{90}Y 、 ^{131}I 、 ^{149}Tb 、 ^{211}At 、 $^{212}\text{Pb}/^{212}\text{Bi}$ 、 ^{213}Bi 、 ^{223}Ra 、 ^{225}Ac 、および ^{227}Th からなる群から選択されるコンジュゲートが提供される。さらに本明細書では、放射性リガンド剤がキレート剤をさらに含むコンジュゲートが提供される。さらに本明細書では、造影剤が、フルオロフォア、または $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 ^{131}I 、 ^{201}Tl 、 ^{111}In 、および ^{67}Ga からなる群から選択される放射性リガンド剤を含むコンジュゲートが提供される。

【0060】

本明細書では、本明細書に記載されるコンジュゲートを投与する工程を含む方法が提供され、コンジュゲートは、細胞の表面上の標的を共有結合させる。さらに本明細書では、細胞が腫瘍細胞を含む方法が提供される。さらに本明細書では、コンジュゲートが腫瘍細胞を死滅させるかまたはその増殖を阻害する方法が提供される。さらに本明細書では、標的が、PSMA、EGFR、EGFRviii、MSLN、CEA、DLL3、FAP、CD33、HER3、PD-L1、EphA2、EphA4、HER2、SIRPa、DLK1、Muc16、LRP5、LRP6、endol80、LIV-1、SLAMF7、PTK7、GPR20、CDH6、CSP-1、CD71、PRLR、SEZ6、DLL1、NOTCH3 rec、NaPi2b、CD16、GCC、SSTR2、CAIX、CAXII、MC1R、CXCR4、B1R、GRPR、STEAP1、CD70、CD46、CD166、CLL-1、ADAM9、cKIT、CD36、CD73、ITGaVb3、ITGaVb6、GPC-1、CD38、CD51、FGFR3、Ly6E、CD44v6、ENPP3、CXCR3、CXCR5、FcRH5、VEGF、VEGFR2、CD45、CCR4、CD25、5T4、ROR1、TROP-2、NECTIN4、cMET、CD19、CD22、CD30、CD33、CD123、BCMA、CD79b、AXL、RON、B7-H3、B7-H4、KAAG1、Muc1、ADAM-9、GPNMB、EDBフィブロネクチン、組織因子、GPNMB、FolRa、ALPP、ALPPL2、MT1-MMP、CLDN18.2、CLDN6、CLDN9、pカドヘリン、CEACAM6、CD47、およびEpCAMからなる群から選択される方法が提供される。さらに本明細書では、本明細書に記載されるコンジュゲートを投与する工程を含む、疾患または疾病を処置する方法が提供される。さらに本明細書では、疾患が、PCa（前立腺がん（prostate cancer））、CRPCa（去勢抵抗性前立腺がん（castration resistant prostate cancer））、固形腫瘍（血管新生（neovasculature））、NSCLC（非小細胞肺癌（non-small cell lung cancer））、HNSC（頭頸部扁平上皮がん（head and neck squamous cell carcinoma））、ESCC（食道がん（esophageal cancer））、GC（胃がん（gastric cancer））、CRC（結腸直腸がん（colorectal cancer））、SCLC（小細胞肺癌（small cell lung cancer））、MPM（中皮腫（mesothelioma））、PDAC（膵管腺がん（Pancreatic ductal adenocarcinoma））、ALL（急性リンパ芽球性白血病（Acute Lymphoblastic Leukemia））、AML（急性骨髄白血病（Acute Myeloid Leukemia））、MDS（骨髄異形成症候群（Myelodysplastic syndromes））、MSI-high tumor、黒色腫（melanoma）、DLBCL（びまん性大細胞型B細胞リンパ腫（diffuse large B cell lymphoma））、子宮内膜がん（endometrial cancer）、子宮頸がん（cervical cancer）、膀胱がん（bladder cancer）、BrCa（乳がん（breast cancer））、TNBC（トリプルネガティブ乳がん（triple negative breast cancer））、NE-PCa（神経内分泌前立腺がん（Neuroendocrine prostate c

10

20

30

40

50

ancer))、GBM (膠芽腫 (glioblastoma))、および RCC (腎細胞がん (Renal cell carcinoma)) の1つ以上を含む、方法が提供される。

【0061】

本明細書では、本明細書に記載されるコンジュゲートを製造する方法が提供され、該方法は、少なくとも1つの非天然アミノ酸を含む標的化ドメインを生成する工程と、任意選択でリンカーを介して、標的化ドメインをペイロードにコンジュゲートする工程とを含む。さらに本明細書では、少なくとも1つの非天然アミノ酸を含む標的化ドメインが *in vivo* で合成される方法が提供される。さらに本明細書では、生成する工程が、直交 tRNA シンターゼ / サプレッサー tRNA 対 (an orthogonal tRNA synthetase / suppressor tRNA pair) の使用を含む方法が提供される。さらに本明細書では、生成する工程が、ピロリジン tRNA シンターゼ / tRNA^{Pyl} (pyrrolysine tRNA synthetase / tRNA^{Pyl}) に由来する直交 tRNA シンターゼ / サプレッサー tRNA 対を含む、方法が提供される。さらに本明細書では、直交 tRNA シンターゼが配列番号 84、87、92、またはその変異体を含む方法が提供される。

【0062】

本明細書では、細胞傷害性ペイロードを細胞に送達する方法が提供され、該方法は、本明細書に記載のコンジュゲートを投与する工程を含み、コンジュゲートが細胞の表面上の標的を共有結合させ、それによって細胞傷害性ペイロードを送達する。さらに本明細書では、細胞が腫瘍細胞である、方法が提供される。さらに本明細書では、細胞が腫瘍微小環境内に含まれる、方法が提供される。さらに本明細書では、細胞が哺乳動物対象内に含まれる、方法が提供される。さらに本明細書では、細胞がヒト対象内に含まれる、方法が提供される。さらに本明細書では、コンジュゲートが腫瘍細胞を死滅させるかまたはその増殖を阻害する、方法が提供される。さらに本明細書では、標的が、PSMA、EGFR、EGFRviii、MSLN、CEA、DLL3、FAP、CD33、HER3、PD-L1、EphA2、EphA4、HER2、SIRPa、DLK1、Muc16、LRP5、LRP6、endol80、LIV-1、SLAMF7、PTK7、GPR20、CDH6、CSP-1、CD71、PRLR、SEZ6、DLL1、NOTCH3 rec、NaPi2b、CD16、GCC、SSTR2、CAIX、CAXII、MC1R、CXCR4、B1R、GRPR、STEAP1、CD70、CD46、CD166、CLL-1、ADAM9、cKIT、CD36、CD73、ITGaVb3、ITGaVb6、GPC-1、CD38、CD51、FGFR3、Ly6E、CD44v6、ENPP3、CXCR3、CXCR5、FcRH5、VEGF、VEGFR2、CD45、CCR4、CD25、5T4、ROR1、TROP-2、NECTIN4、cMET、CD19、CD22、CD30、CD33、CD123、BCMA、CD79b、AXL、RON、B7-H3、B7-H4、KAAG1、Muc1、ADAM-9、GPNMB、EDBフィブロネクチン、組織因子、GPNMB、FolRa、ALPP、ALPPL2、MT1-MMP、CLDN18.2、CLDN6、CLDN9、pカドヘリン、CEACAM6、CD47、および EpCAM からなる群から選択される方法が提供される。さらに本明細書では、ヒト対象が、PCa (前立腺がん)、CRPCa (去勢抵抗性前立腺がん)、固形腫瘍 (血管新生)、NSCLC (非小細胞肺がん)、HNSCC (頭頸部扁平上皮がん)、ESCC (食道がん)、GC (胃がん)、CRC (結腸直腸がん)、SCLC (小細胞肺がん)、MPM (中皮腫)、PDAC (膵管腺がん)、ALL (急性リンパ芽球性白血病)、AML (急性骨髄白血病)、MDS (骨髄異形成症候群)、MSI-high tumor、黒色腫、DLBCL (びまん性大細胞型B細胞リンパ腫)、子宮内膜がん、子宮頸がん、膀胱がん、BrCa (乳がん)、TNBC (トリプルネガティブ乳がん)、NE-PCa (神経内分泌前立腺がん)、GBM (膠芽腫)、および RCC (腎細胞がん) からなる群から選択される疾患または疾病に罹患しているか、またはそれらと診断される、方法が提供される。

10

20

30

40

50

【0063】

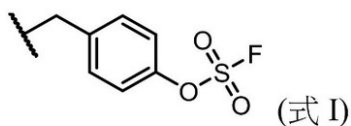
本明細書では、(i) 第1の標的化ドメイン、(ii) 第2の標的化ドメイン、および (iii) ペイロードを含むコンジュゲートが提供され、第1の標的化ドメインは、少なくとも1つの第1の非天然アミノ酸(UAA)を含み、それにより、第1の標的化ドメインは、UAAの部位で第1の標的に共有結合することができ、第2の標的化ドメインは、第2の標的に結合するように構成される。いくつかの実施形態では、第1の標的および第2の標的は、同じ細胞上にある。いくつかの実施形態では、第1の標的化ドメインは、抗体、抗体断片、または抗原結合ドメインを含む。いくつかの実施形態では、第1の標的化ドメインは単ドメイン抗体(sdAb)を含む。いくつかの実施形態では、第1のUAAは、第1の標的と接する(interface)第1の標的化ドメインの領域内またはその近接内に含まれる。いくつかの実施形態では、第2の標的化ドメインは、抗体、抗体断片、または抗原結合ドメインを含む。いくつかの実施形態では、第2の標的化ドメインは単ドメイン抗体(sdAb)を含む。いくつかの実施形態では、第1の標的化ドメインおよび第2の標的化ドメインは、融合タンパク質を形成するために連結される。いくつかの実施形態では、第1の標的化ドメインおよび第2の標的化ドメインは、化学的コンジュゲーションによって連結される。いくつかの実施形態では、第1の標的化ドメインおよび第2のドメインは、リンカーによって連結される。いくつかの実施形態では、第1の標的化ドメインおよび第2の標的化ドメインは、同じ標的を結合させる。いくつかの実施形態では、第1の標的化ドメインおよび第2の標的化ドメインは、同じ標的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、第1の標的化ドメインおよび第2の標的化ドメインは、同じ標的の同じエピトープに結合する。いくつかの実施形態では、同じ標的はモノマーである。いくつかの実施形態では、同じ標的は多量体分子(multimeric molecule)である。いくつかの実施形態では、第1の標的化ドメインおよび第2の標的化ドメインは、異なる標的を結合させる。いくつかの実施形態では、第1の標的は、第1の細胞表面分子である。いくつかの実施形態では、第2の標的は、第2の細胞表面分子である。いくつかの実施形態では、少なくとも1つの第1のUAAは、フルオロ硫酸塩部分を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも1つのUAAは、アリールフルオロ硫酸塩部分を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも1つの第1のUAAは式I:

10

20

【0064】

【化39】



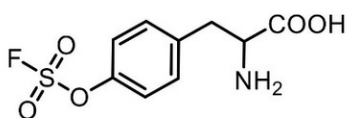
30

を含む。

いくつかの実施形態では、少なくとも1つの第1のUAAは、構造:

【0065】

【化40】



40

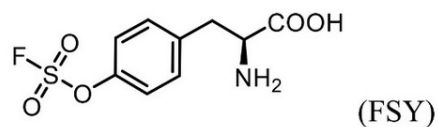
を有する。

いくつかの実施形態では、少なくとも1つの第1のUAAは、構造:

【0066】

50

【化 4 1】



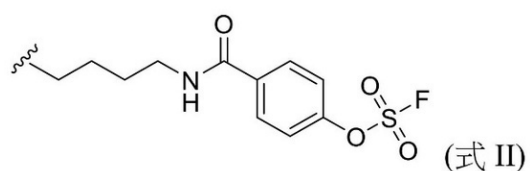
を有する。

いくつかの実施形態では、少なくとも 1 つの第 1 の U A A は、式 I I :

【 0 0 6 7】

10

【化 4 2】



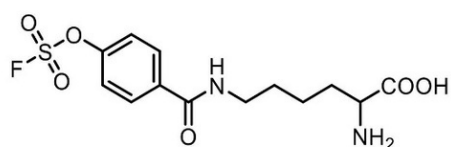
を含む。

20

いくつかの実施形態では、少なくとも 1 つの第 1 の U A A は、構造 :

【 0 0 6 8】

【化 4 3】



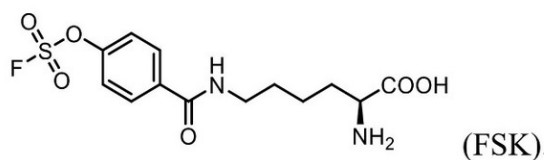
30

を有する。

いくつかの実施形態では、少なくとも 1 つの第 1 の U A A は、構造 :

【 0 0 6 9】

【化 4 4】



40

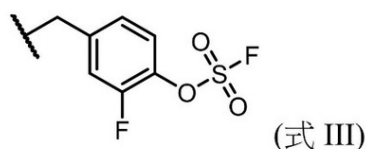
を有する。

いくつかの実施形態では、少なくとも 1 つの第 1 の U A A は、式 I I I :

【 0 0 7 0】

50

【化 4 5】



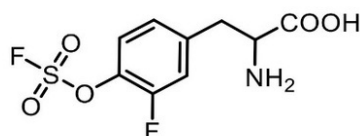
を含む。

いくつかの実施形態では、少なくとも 1 つの第 1 の U A A は、構造：

10

【 0 0 7 1】

【化 4 6】



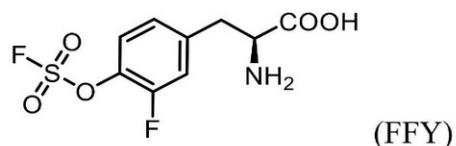
を有する。

いくつかの実施形態では、少なくとも 1 つの第 1 の U A A は、構造：

20

【 0 0 7 2】

【化 4 7】



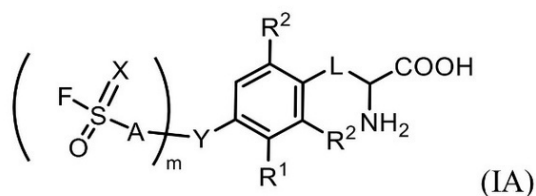
を有する。

いくつかの実施形態では、少なくとも 1 つの第 1 の U A A は、式 (I A) の構造：

30

【 0 0 7 3】

【化 4 8】



40

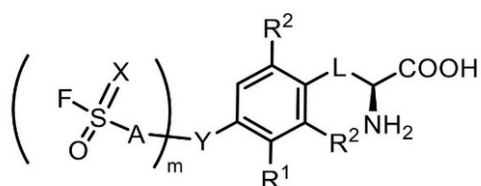
を有し、式中、Xはそれぞれ独立して、OまたはNR'であり、Yは、結合、-O-、-NR-、または-N=であり、Aは、結合または-(CH₂)_n-であり、mは1または2であり、nは1～4の整数であり、RおよびR'のそれぞれは、存在する場合、独立して、水素、置換もしくは非置換アルキル、置換もしくは非置換ヘテロアルキル、置換もしくは非置換アリール、置換もしくは非置換ヘテロアリール、または置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキルであり、R¹は、水素、フルオロまたはヨードであり、R²は、水素またはメチルであり、Lは、-(CH₂)_p-または-C(O)NH-(CH₂)_p-で

50

あり、 p は 1 ～ 6 の整数であり、ならびに、ここで、 Y が $-O-$ または $-NR-$ である場合、 m は 1 であり、 Y が $-N=$ である場合、 m は 2 である。いくつかの実施形態では、少なくとも 1 つの第 1 の U A A は、式 (I A - a) の構造：

【 0 0 7 4 】

【 化 4 9 】

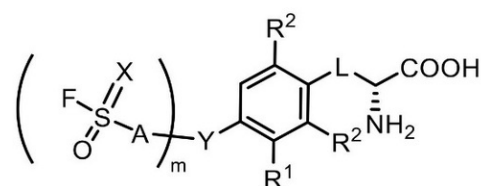


10

を有する。いくつかの実施形態では、少なくとも 1 つの第 1 の U A A は、式 (I A - b) の構造：

【 0 0 7 5 】

【 化 5 0 】

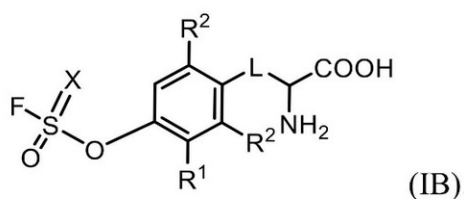


20

の構造を有する。いくつかの実施形態では、少なくとも 1 つの第 1 の U A A は、式 (I B) の構造：

【 0 0 7 6 】

【 化 5 1 】



30

を有する。いくつかの実施形態では、少なくとも 1 つの第 1 の U A A は、式 (I C) の構造：

【 0 0 7 7 】

【 化 5 2 】



40

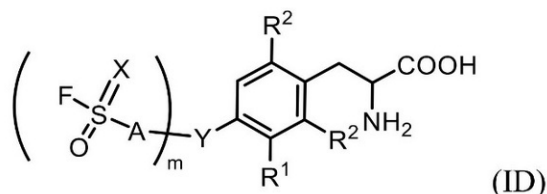
を有する。いくつかの実施形態では、少なくとも 1 つの第 1 の U A A は、式 (I D) の構

50

造：

【0078】

【化53】



(ID)

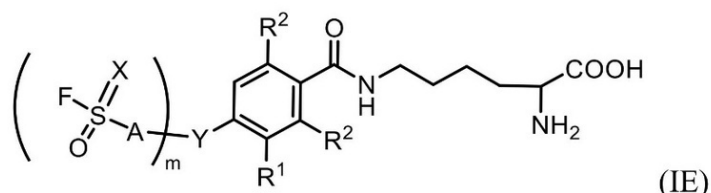
10

を有し、式中、Xはそれぞれ独立して、OまたはNR'であり、Yは、結合、-O-、-NR-、または-N=であり、Aは、結合または-(CH₂)_n-であり、mは1または2であり、nは1~4の整数であり、RおよびR'のそれぞれは、存在する場合、独立して、水素、置換もしくは非置換アルキル、置換もしくは非置換ヘテロアルキル、置換もしくは非置換アリール、置換もしくは非置換ヘテロアリール、または置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキルであり、R¹は、水素、フルオロまたはヨードであり、R²は、水素またはメチルであり、ならびに、ここで、Yが、結合、-O-または-NR-である場合、mは1であり、Yが-N=である場合、mは2である。いくつかの実施形態では、少なくとも1つの第1のUAAは、式(IE)の構造：

20

【0079】

【化54】



(IE)

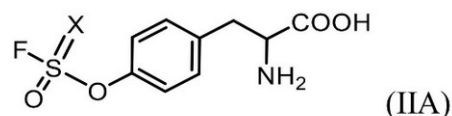
30

を有し、式中、Xはそれぞれ独立して、OまたはNR'であり、Yは、結合、-O-、-NR-、または-N=であり、Aは、結合または-(CH₂)_n-であり、mは1または2であり、nは1~4の整数であり、RおよびR'のそれぞれは、存在する場合、独立して、水素、置換もしくは非置換アルキル、置換もしくは非置換ヘテロアルキル、置換もしくは非置換アリール、置換もしくは非置換ヘテロアリール、または置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキルであり、R¹は、水素、フルオロまたはヨードであり、R²は、水素またはメチルであり、ならびに、ここで、Yが、結合、-O-または-NR-である場合、mは1であり、Yが-N=である場合、mは2である。いくつかの実施形態では、少なくとも1つの第1のUAAは、式(IIA)の構造：

40

【0080】

【化55】



(IIA)

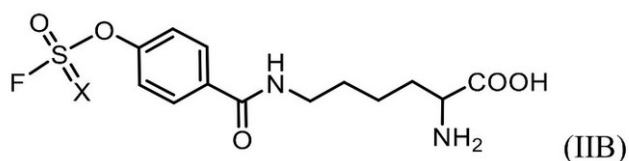
を有し、式中、Xは独立して、OまたはNR'であり、および、R'は、存在する場合、水素、置換もしくは非置換アルキル、置換もしくは非置換ヘテロアルキル、置換もしくは非置換アリール、置換もしくは非置換ヘテロアリール、または置換もしくは非置換ヘテロシ

50

クロアルキルである。いくつかの実施形態では、少なくとも1つの第1のUAAは、式(IIB)の構造：

【0081】

【化56】

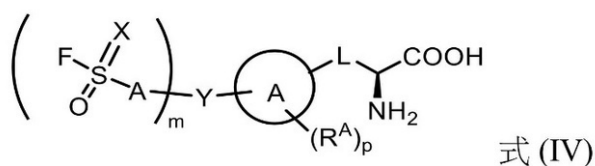


10

を有し、式中、Xは独立して、OまたはNR'であり、および、R'は、存在する場合、水素、置換もしくは非置換アルキル、置換もしくは非置換ヘテロアルキル、置換もしくは非置換アリール、置換もしくは非置換ヘテロアリール、または置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキルである。いくつかの実施形態では、少なくとも1つの第1のUAAは、式(IV)の構造：

【0082】

【化57】



20

を有し、式中、Xはそれぞれ独立して、OまたはNR'であり、Yは、結合、-O-、-NR-、または-N=であり、Aは、結合または-(CH2)n-であり、mは1または2であり、nは1~4の整数であり、RおよびR'のそれぞれは、存在する場合、独立して、水素、置換もしくは非置換アルキル、置換もしくは非置換ヘテロアルキル、置換もしくは非置換アリール、置換もしくは非置換ヘテロアリール、または置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキルであり、環Aは、5~6員アリールまたはヘテロアリールであり、RAはそれぞれ独立して、-OH、-ORX、ハロゲン、NHRX、N(RX)2、または任意選択で置換アルキルであり、pは0、1、2、3、または4であり、RXはそれぞれ、任意選択で置換されたアルキルであり、Lは、-(CH2)p-または-C(O)NH-(CH2)p-であり、pは1~6の整数であり、ならびに、ここで、Yが、結合、-O-または-NR-である場合、mは1であり、Yが-N=である場合、mは2である。いくつかの実施形態では、第1の細胞表面分子は、PSMA、EGFR、EGFRviii、MSLN、CEA、DLL3、FAP、CD33、HER3、PD-L1、EphA2、EphA4、HER2、SIRPa、DLK1、Muc16、LRP5、LRP6、endo180、LIV-1、SLAMF7、PTK7、GPR20、CDH6、CSP-1、CD71、PRLR、SEZ6、DLL1、NOTCH3rec、NaPi2b、CD16、GCC、SSTR2、CAIX、CAXII、MC1R、CXCR4、B1R、GRPR、STEAP1、CD70、CD46、CD166、CLL-1、ADAM9、cKIT、CD36、CD73、ITGaVb3、ITGaVb6、GPC-1、CD38、CD51、FGFR3、Ly6E、CD44v6、ENPP3、CXCR3、CXCR5、FcRH5、VEGF、VEGFR2、CD45、CCR4、CD25、5T4、ROR1、TROP-2、NECTIN4、cMET、CD19、CD22、CD30、CD33、CD123、BCMA、CD79b、AXL、RON、B7-H3、B7-H4、KAAG1、Muc1、ADAM-9、GPNMB、EDBフィブロネクチン、組織因子、GPNMB、FolRa、ALPP、ALPPL2、MT1-MMP、CL

30

40

50

DN18.2、CLDN6、CLDN9、pカドヘリン、CEACAM6、CD47、およびEpCAMからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、第2の細胞表面分子は、PSMA、EGFR、EGFRviii、MSLN、CEA、DLL3、FAP、CD33、HER3、PD-L1、EphA2、EphA4、HER2、SIRPa、DLK1、Muc16、LRP5、LRP6、endol80、LIV-1、SLAMF7、PTK7、GPR20、CDH6、CSP-1、CD71、PRLR、SEZ6、DLL1、NOTCH3 rec、NaPi2b、CD16、GCC、SSTR2、CAIX、CAXII、MC1R、CXCR4、B1R、GRPR、STEAP1、CD70、CD46、CD166、CLL-1、ADAM9、cKIT、CD36、CD73、ITGaVb3、ITGaVb6、GPC-1、CD38、CD51、FGFR3、Ly6E、CD44v6、ENPP3、CXCR3、CXCR5、FcRH5、VEGF、VEGFR2、CD45、CCR4、CD25、5T4、ROR1、TROP-2、NECTIN4、cMET、CD19、CD22、CD30、CD33、CD123、BCMA、CD79b、AXL、RON、B7-H3、B7-H4、KAG1、Muc1、ADAM-9、GPNMB、EDBフィブロネクチン、組織因子、GPNMB、FolRa、ALPP、ALPPL2、MT1-MMP、CLDN18.2、CLDN6、CLDN9、pカドヘリン、CEACAM6、CD47、およびEpCAMからなる群から選択される。

いくつかの実施形態では、第2のドメインは第2のUAAを含み、それによって、第2のドメインは、第2のUAAの部位で第2の標的に共有結合することができる。

いくつかの実施形態では、第2のUAAは、第1の標的化ドメインに含まれた少なくとも1つのUAAとは異なる。

いくつかの実施形態では、第2のUAAは、第1の標的化ドメインに含まれた少なくとも1つのUAAと同じである。

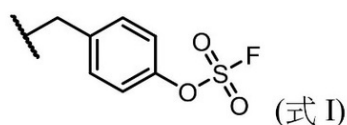
いくつかの実施形態では、第2のUAAは、フルオロ硫酸塩部分を含む。

いくつかの実施形態では、第2のUAAは、アリールフルオロ硫酸塩部分を含む。

いくつかの実施形態では、第2のUAAは式I：

【0083】

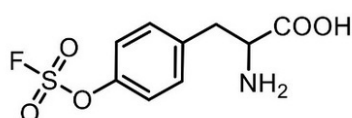
【化58】



を含む。いくつかの実施形態では、第2のUAAは、構造：

【0084】

【化59】



を有する。いくつかの実施形態では、第2のUAAは、構造：

【0085】

10

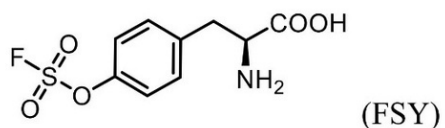
20

30

40

50

【化 6 0】

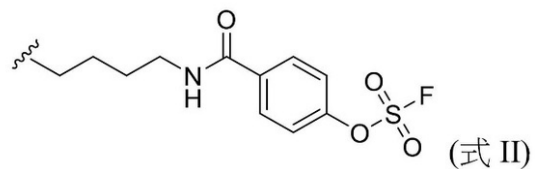


を有する。いくつかの実施形態では、第 2 の U A A は、式 I I :

【 0 0 8 6】

【化 6 1】

10

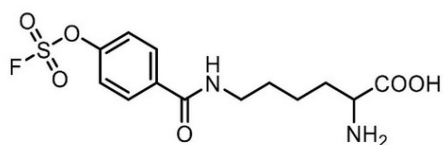


を含む。いくつかの実施形態では、第 2 の U A A は、構造 :

【 0 0 8 7】

【化 6 2】

20

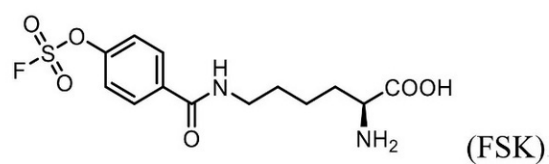


を有する。いくつかの実施形態では、第 2 の U A A は、構造 :

【 0 0 8 8】

【化 6 3】

30

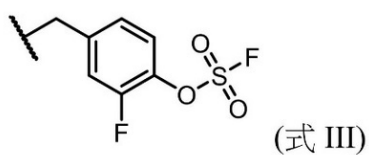


を有する。いくつかの実施形態では、第 2 の U A A は、式 I I I :

【 0 0 8 9】

【化 6 4】

40

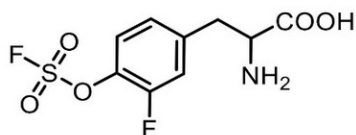


を含む。いくつかの実施形態では、第 2 の U A A は、構造 :

【 0 0 9 0】

50

【化 6 5】

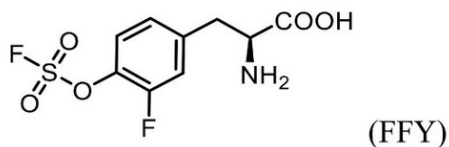


を有する。いくつかの実施形態では、第 2 の U A A は、構造：

【0091】

【化 6 6】

10

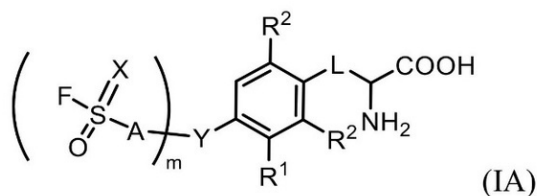


を有する。いくつかの実施形態では、第 2 の U A A は、式 (I A) の構造：

【0092】

【化 6 7】

20



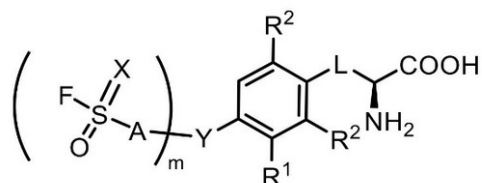
を有し、式中、X はそれぞれ独立して、O または N R ' であり、Y は、結合、- O -、- N R -、または - N = であり、A は、結合または - (C H 2) n - であり、m は 1 または 2 であり、n は 1 ~ 4 の整数であり、R および R ' のそれぞれは、存在する場合、独立して、水素、置換もしくは非置換アルキル、置換もしくは非置換ヘテロアルキル、置換もしくは非置換アリール、置換もしくは非置換ヘテロアリール、または置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキルであり、R¹ は、水素、フルオロまたはヨードであり、R² は、水素またはメチルであり、L は、- (C H 2) p - または - C (O) N H - (C H 2) p - であり、p は 1 ~ 6 の整数であり、ならびに、ここで、Y が - O - または - N R - である場合、m は 1 であり、Y が - N = である場合、m は 2 である。いくつかの実施形態では、第 2 の U A A は、式 (I A - a) の構造：

30

【0093】

【化 6 8】

40

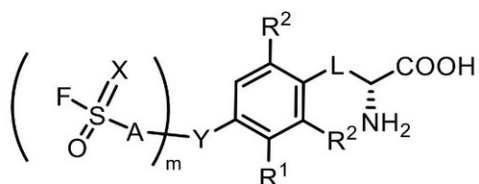


を有する。いくつかの実施形態では、第 2 の U A A は、式 (I A - b) の構造：

【0094】

50

【化 6 9】



を有する。いくつかの実施形態では、第 2 の U A A は、式 (I B) の構造：

10

【 0 0 9 5】

【化 7 0】



を有する。いくつかの実施形態では、第 2 の U A A は、式 (I C) の構造：

20

【 0 0 9 6】

【化 7 1】

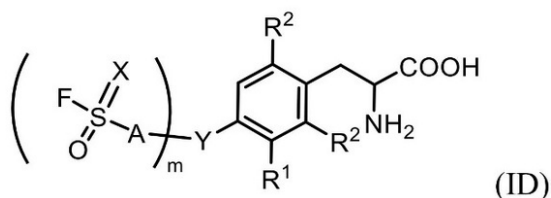


30

を有する。いくつかの実施形態では、第 2 の U A A は、式 (I D) の構造：

【 0 0 9 7】

【化 7 2】



40

を有し、式中、

X はそれぞれ独立して、O または N R ' であり、

Y は、結合、- O -、- N R -、または - N = であり、

A は、結合または - (C H 2) n - であり、

m は 1 または 2 であり、

n は 1 ~ 4 の整数であり、

R および R ' のそれぞれは、存在する場合、独立して、水素、置換もしくは非置換アルキル、置換もしくは非置換ヘテロアルキル、置換もしくは非置換アリール、置換もしくは非置換ヘテロアリール、または置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキルであり、

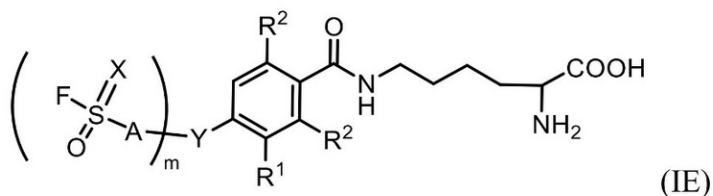
50

R^1 は、水素、フルオロまたはヨードであり、
 R^2 は、水素またはメチルであり、
 ならびに、ここで、 Y が、結合、 $-O-$ または $-NR-$ である場合、 m は 1 であり、
 Y が $-N=$ である場合、 m は 2 である。

いくつかの実施形態では、第 2 の UAA は、式 (IE) の構造：

【0098】

【化73】



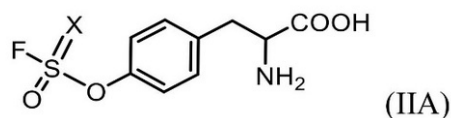
10

を有し、式中、 X はそれぞれ独立して、 O または NR' であり、 Y は、結合、 $-O-$ 、 $-NR-$ 、または $-N=$ であり、 A は、結合または $-(CH_2)_n-$ であり、 m は 1 または 2 であり、 n は 1 ~ 4 の整数であり、 R および R' のそれぞれは、存在する場合、独立して、水素、置換もしくは非置換アルキル、置換もしくは非置換ヘテロアルキル、置換もしくは非置換アリール、置換もしくは非置換ヘテロアリール、または置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキルであり、 R^1 は、水素、フルオロまたはヨードであり、 R^2 は、水素またはメチルであり、ならびに、ここで、 Y が、結合、 $-O-$ または $-NR-$ である場合、 m は 1 であり、 Y が $-N=$ である場合、 m は 2 である。いくつかの実施形態では、第 2 の UAA は、式 (IIA) の構造：

20

【0099】

【化74】

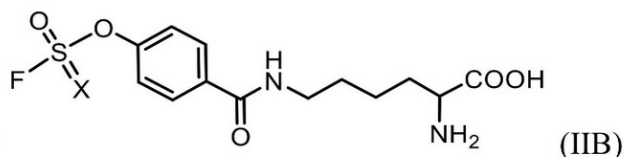


30

を有し、式中、 X は独立して、 O または NR' であり、および、 R' は、存在する場合、水素、置換もしくは非置換アルキル、置換もしくは非置換ヘテロアルキル、置換もしくは非置換アリール、置換もしくは非置換ヘテロアリール、または置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキルである。いくつかの実施形態では、第 2 の UAA は、式 (IIB) の構造：

【0100】

【化75】



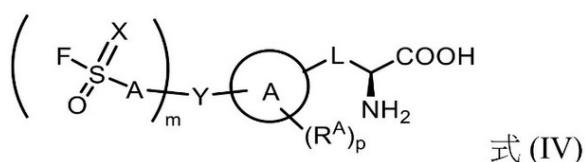
40

を有し、式中、 X は独立して、 O または NR' であり、および、 R' は、存在する場合、水素、置換もしくは非置換アルキル、置換もしくは非置換ヘテロアルキル、置換もしくは非置換アリール、置換もしくは非置換ヘテロアリール、または置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキルである。いくつかの実施形態では、第 2 の UAA は、式 (IV) の構造：

【0101】

50

【化 7 6】



を有し、式中、Xはそれぞれ独立して、OまたはNR'であり、Yは、結合、-O-、-NR-、または-N=であり、Aは、結合または-(CH₂)_n-であり、mは1または2であり、nは1～4の整数であり、RおよびR'のそれぞれは、存在する場合、独立して、水素、置換もしくは非置換アルキル、置換もしくは非置換ヘテロアルキル、置換もしくは非置換アリール、置換もしくは非置換ヘテロアリール、または置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキルであり、環Aは、5～6員アリールまたはヘテロアリールであり、R^Aはそれぞれ独立して、-OH、-OR^X、ハロゲン、NHR^X、N(R^X)₂、または任意選択で置換アルキルであり、pは0、1、2、3、または4であり、R^Xはそれぞれ、任意選択で置換されたアルキルであり、Lは、-(CH₂)_p-または-C(O)NH-(CH₂)_p-であり、pは1～6の整数であり、ならびに、ここで、Yが、結合、-O-または-NR-である場合、mは1であり、Yが-N=である場合、mは2である。

いくつかの実施形態では、第1の標的化ドメインは、配列番号1～4または16～64のいずれか1つを含む。いくつかの実施形態では、第1の標的化ドメインは、配列番号1～4または16～64のいずれか1つに対して、少なくとも70%の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、第2の標的化ドメインは、配列番号1～4または16～64のいずれか1つを含む。いくつかの実施形態では、第2の標的化ドメインは、配列番号1～4または16～64のいずれか1つに対して、少なくとも70%の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、コンジュゲートは、配列番号66～72を含む。いくつかの実施形態では、コンジュゲートは、配列番号66～72に対して、少なくとも70%の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、コンジュゲートは、配列番号1～4または16～64のいずれか1つを含む。いくつかの実施形態では、コンジュゲートは、配列番号1～4または16～64のいずれか1つに対して、少なくとも70%の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、コンジュゲートは、配列番号66～72に対して、少なくとも70%の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、第1の標的化ドメインの少なくとも1つおよび第2の標的化ドメインは、配列番号1を含む。いくつかの実施形態では、UAAは、配列番号1に対して、26、28、29、30、99、102、103、105、108、110、111、112、113、114、および115からなる群から選択されるアミノ酸位置に存在する。いくつかの実施形態では、第1の標的化ドメインおよび第2の標的化ドメインのうちの少なくとも1つは、配列番号2を含む。いくつかの実施形態では、UAAは、配列番号2に対して、50、52、53、54、56、58、および100からなる群から選択されるアミノ酸位置に存在する。いくつかの実施形態では、第1の標的化ドメインおよび第2の標的化ドメインのうちの少なくとも1つは、配列番号3を含む。いくつかの実施形態では、UAAは、配列番号3に対して、58、62、101、103、および107からなる群から選択されるアミノ酸位置に存在する。いくつかの実施形態では、第1の標的化ドメインおよび第2の標的化ドメインのうちの少なくとも1つは、配列番号16を含む。いくつかの実施形態では、配列番号16を含む、第1の標的化ドメインおよび第2の標的化ドメインのうちの少なくとも1つは、配列番号16に対して、109位で非天然アミノ酸をさらに含む。いくつかの実施形態では、第1の標的化ドメインおよび第2の標的化ドメインのうちの少なくとも1つは、配列番号18を含む。いくつかの実施形態では、ペイロードは、造影剤、放射性リガンド剤または細胞傷害剤を含む。いくつかの実施形態では、細胞傷害性部分は、小分子薬または化学療法薬を含む。いくつかの実施形態では、放射性

10

20

30

40

50

リガンド剤が、 ^{153}Sm 、 ^{177}Lu 、 ^{90}Y 、 ^{131}I 、 ^{149}Tb 、 ^{211}At 、 ^{212}Pb ／ ^{212}Bi 、 ^{213}Bi 、 ^{223}Ra 、 ^{225}Ac 、および ^{227}Th からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、放射性リガンド剤は、さらにキレート剤を含む。いくつかの実施形態では、放射性リガンド剤は、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 ^{131}I 、 ^{201}Tl 、 ^{111}In 、および ^{67}Ga からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、ペイロードは、リンカーによりコンジュゲートに結合している。別の実施形態では、コンジュゲートを投与する工程を含む方法が本明細書で提供され、コンジュゲートは、第1の細胞の表面上の第1の標的を共有結合させる。いくつかの実施形態では、コンジュゲートは、第1の細胞の表面上の第2の標的を結合させる。いくつかの実施形態では、第1の標的化ドメインおよび第2の標的化ドメインは、同じ標的に結合する。いくつかの実施形態では、第1の標的化ドメインおよび第2の標的化ドメインは、同じ標的の同じエピトープに結合する。いくつかの実施形態では、第1の標的化ドメインおよび第2の標的化ドメインは、同じ標的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、第1の標的化ドメインおよび第2の標的化ドメインは、第1の細胞の表面上の異なる標的に結合する。いくつかの実施形態では、第2のドメインは、第2のUAAを含み、第2のUAAは、第2の標的に共有結合する。いくつかの実施形態では、第1の細胞は、腫瘍細胞である。いくつかの実施形態では、コンジュゲートは、第1の標的に結合した場合に、腫瘍細胞を死滅させるかまたはその増殖を阻害する。いくつかの実施形態では、コンジュゲートは、第2の標的に結合した場合に、腫瘍細胞を死滅させるかまたはその増殖を阻害する。いくつかの実施形態では、コンジュゲートは、第1の標的および第2の標的に結合した場合に、腫瘍細胞を死滅させるかまたはその増殖を阻害する。いくつかの実施形態では、第1の標的が、PSMA、EGFR、EGFRviii、MSLN、CEA、DLL3、FAP、CD33、HER3、PD-L1、EphA2、EphA4、HER2、SIRPa、DLK1、Muc16、LRP5、LRP6、endo180、LIV-1、SLAMF7、PTK7、GPR20、CDH6、CSP-1、CD71、PRLR、SEZ6、DLL1、NOTCH3 rec、NaPi2b、CD16、GCC、SSTR2、CAIX、CAXII、MC1R、CXCR4、B1R、GRPR、STEAP1、CD70、CD46、CD166、CLL-1、ADAM9、cKIT、CD36、CD73、ITGaVb3、ITGaVb6、GPC-1、CD38、CD51、FGFR3、Ly6E、CD44v6、ENPP3、CXCR3、CXCR5、FcRH5、VEGF、VEGFR2、CD45、CCR4、CD25、5T4、ROR1、TROP-2、NECTIN4、cMET、CD19、CD22、CD30、CD33、CD123、BCMA、CD79b、AXL、RON、B7-H3、B7-H4、KAAG1、Muc1、ADAM-9、GPNMB、EDBフィブロネクチン、組織因子、GPNMB、FolRa、ALPP、ALPPL2、MT1-MMP、CLDN18.2、CLDN6、CLDN9、pカドヘリン、CEACAM6、CD47、およびEpCAMからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、第2の標的が、PSMA、EGFR、EGFRviii、MSLN、CEA、DLL3、FAP、CD33、HER3、PD-L1、EphA2、EphA4、HER2、SIRPa、DLK1、Muc16、LRP5、LRP6、endo180、LIV-1、SLAMF7、PTK7、GPR20、CDH6、CSP-1、CD71、PRLR、SEZ6、DLL1、NOTCH3 rec、NaPi2b、CD16、GCC、SSTR2、CAIX、CAXII、MC1R、CXCR4、B1R、GRPR、STEAP1、CD70、CD46、CD166、CLL-1、ADAM9、cKIT、CD36、CD73、ITGaVb3、ITGaVb6、GPC-1、CD38、CD51、FGFR3、Ly6E、CD44v6、ENPP3、CXCR3、CXCR5、FcRH5、VEGF、VEGFR2、CD45、CCR4、CD25、5T4、ROR1、TROP-2、NECTIN4、cMET、CD19、CD22、CD30、CD33、CD123、BCMA、CD79b、AXL、RON、B7-H3、B7-H4、KAAG1、Muc1、ADAM-9、GPNMB、EDBフィブロネクチン、組織因子、GPNMB、FolRa、ALPP、ALPPL2、MT1-MMP、CLDN18.

10

20

30

40

50

2、CLDN6、CLDN9、pカドヘリン、CEACAM6、CD47、およびEpCAMからなる群から選択される。いくつかの実施形態では、ペイロードは、放射標識剤あるいは細胞傷害性薬である。いくつかの実施形態では、ペイロードは造影剤である。いくつかの実施形態では、方法は、コンジュゲートが、第1の細胞上の第1の標的および第2の標的に結合される場合、第1の細胞を造影または同定する。さらに別の態様では、本明細書で提供されるコンジュゲートを製造する方法が本明細書に提供され、該方法は、(a)少なくとも1つの非天然アミノ酸を含む第1の標的化ドメインを*in vivo*で合成する工程と、(b)ペイロードを、第1の標的化ドメインまたは第2の標的化ドメインへ、任意選択でリンカーを介してコンジュゲートする工程とを含む。いくつかの実施形態では、方法は、第1の標的化ドメインへの融合タンパク質として、第2の標的化ドメインを*in vivo*で合成する工程をさらに含む。いくつかの実施形態では、合成する工程は、直交tRNAシンセターゼ／サプレッサーtRNA対の使用を含む。いくつかの実施形態では、合成する工程は、ピロリジンtRNAシンセターゼ／tRNA^{pyl}に由来する直交tRNAシンセターゼ／サプレッサーtRNA対を含む。

10

【0102】

参照による援用

本明細書に言及される全ての刊行物、特許、および特許出願は、あたかも個々の刊行物、特許、または特許出願が参照によって援用される具体的かつ個別に示されるのと同じ程度に、参照により本明細書に援用される。

20

【図面の簡単な説明】

【0103】

本発明の新規な特徴は、添付の特許請求の範囲内に特に明記されている。本発明の特徴と利点についてのよりよい理解は、本発明の原則が用いられている例証的な実施形態を記載する以下の詳細な記載と、添付の図面を参照することによって得られるであろう。

【図1A】異なる位置でFSYを有するFSY修飾sdAbと、PSMAとの間の架橋の、約7:1のsdAb対PSMA (PSMA最終濃度は0.125mg/mL、1.25μMであった)のモル比で、37°Cでの様々なSDS-PAGE分析を示す。図1Aは、標的PSMAの存在下または非存在下でFSYを含むC1構築物を示すゲルを表す。PSMA-C1-FSY架橋、PSMA、およびC1-FSYは、標識されている。

【図1B】異なる位置でFSYを有するFSY修飾sdAbと、PSMAとの間の架橋の、約7:1のsdAb対PSMA (PSMA最終濃度は0.125mg/mL、1.25μMであった)のモル比で、37°Cでの様々なSDS-PAGE分析を示す。図1Bは、標的PSMAの存在下または非存在下でFSYを含むC1構築物を示すゲルを表す。PSMA-C1-FSY架橋、PSMA、およびC1-FSYは、標識されている。

30

【図1C】異なる位置でFSYを有するFSY修飾sdAbと、PSMAとの間の架橋の、約7:1のsdAb対PSMA (PSMA最終濃度は0.125mg/mL、1.25μMであった)のモル比で、37°Cでの様々なSDS-PAGE分析を示す。図1Cは、標的PSMAの存在下または非存在下でFSYを含むC1構築物を示すゲルを表す。PSMA-C1-FSY架橋、PSMA、およびC1-FSYは、標識されている。

【図1D】異なる位置でFSYを有するFSY修飾sdAbと、PSMAとの間の架橋の、約7:1のsdAb対PSMA (PSMA最終濃度は0.125mg/mL、1.25μMであった)のモル比で、37°Cでの様々なSDS-PAGE分析を示す。図1Dは、標的PSMAの存在下または非存在下でFSYを含むC1構築物を示すゲルを表す。PSMA-C1-FSY架橋、PSMA、およびC1-FSYは、標識されている。

40

【図1E】異なる位置でFSYを有するFSY修飾sdAbと、PSMAとの間の架橋の、約7:1のsdAb対PSMA (PSMA最終濃度は0.125mg/mL、1.25μMであった)のモル比で、37°Cでの様々なSDS-PAGE分析を示す。図1Eは、標的PSMAの存在下または非存在下でFSYを含むC1構築物を示すゲルを表す。PSMA-C1-FSY架橋、PSMA、およびC1-FSYは、標識されている。

【図2A】sdAb:PSMAのモル比8:1で、C2 (PSMA特異的sdAb)とP

50

SMAとの間の架橋の、37℃での様々なSDS-PAGE分析を示す。図2Aは、標的PSMA、ならびにPSMAおよび野生型C2-CDR2プール対照の存在下で、50～61位にFSYを含むC2構築物を示すゲルを表す。厚い矢は、架橋産物の存在を指し示す。PSMAおよびC2は、薄い矢で標識されている。

【図2B】sdAb：PSMAのモル比8：1で、C2（PSMA特異的sdAb）とPSMAとの間の架橋の、37℃での様々なSDS-PAGE分析を示す。図2Bは、標的PSMAの存在下でFSYを含むC2構築物を示すゲルを表す。

【図2C】sdAb：PSMAのモル比8：1で、C2（PSMA特異的sdAb）とPSMAとの間の架橋の、37℃での様々なSDS-PAGE分析を示す。図2Cは、標的PSMA、ならびに野生型C2-CDR3プール対照の存在下で、FSYを含むC2構築物を示すゲルを表す。厚い矢は、架橋産物の存在を指し示す。PSMAおよびC2-FSYは、薄い矢で標識されている。

10

【図3A】sdAb対PSMAのモル比5：1（PSMA最終濃度は0.125mg/mL、1.25μMであった）で、37℃で180分間にわたるFSY修飾sdAb（C1の28または102位におけるFSY）とPSMAとの間の架橋の、反応速度論（kinetics）のSDS-PAGE分析を示す。

【図3B】FSY修飾sdAbとPSMAとの間の架橋実験について、PSMA架橋パーセンテージ対時間の反応速度論プロットを示す。y軸は架橋PSMAの%（10単位間隔で0～60）を表し、x軸は時間（分、30分間隔で0～180）を表す。試験した構築物は、C1-28FSY（円）、C1-102FSY（正方形）、C1-112FSY（三角形）、C1-113FSY（逆三角形）であった。

20

【図4】モノマーC1関連sdAb構築物の図を示す。C1（2つのシステインジスルフィド結合を含む野生型配列）、C39（1つのシステインジスルフィド結合であるC1-C101A/C104Aを2つのアラニンで置換し、ジスルフィド結合を除去する）、C1-102FSY（ヒスチジン102が非天然アミノ酸FSYで置換された構築物C1）、およびC39-102FSY（C1-C101A/C104A/H102（FSY）、C101およびC104システインの両方のアラニンでの置換、ならびにヒスチジン102のFSYでの置換）。

【図5A】バイパラトピック構築物（biparatopic construct）C40-102FSY（C39-102FSY配列を、FSYを含まないC39のコピーと連結することによって作製される）、またはC39-102FSYのモノパラトピック構築物（monoparatopic construct）のいずれかと、PSMAとの架橋の速度論の37℃で180分間にわたるSDS-PAGE分析を示す。C39-102FSY、C40-102FSY、受容体、および架橋種（crosslink species）に対応するバンドが標識される。カップリング速度は、モノパラトピック構築物と比較して、バイパラトピック構築物の方が高い。

30

【図5B】バイパラトピック構築物C40-102FSY、またはモノパラトピック構築物C39-102FSYのいずれかと、PSMAとの架橋について、PSMA架橋対時間の反応速度論プロットを示す。

【図6A】様々なFSY修飾C3構築物間の架橋のSDS-PAGE分析を示す。26～35位および50～60位にFSYを有するC3構築物の結果を示し、構築物C3-58FSYの架橋産物をアスタリスクで示す。

40

【図6B】様々なFSY修飾C3構築物間の架橋のSDS-PAGE分析を示す。61～66位および99～113位にFSYを有するC3構築物の結果を示し、架橋産物は、少なくとも構築物C3-62FSY、C3-101FSY、C3-103FSY、C3-107FSYについて観察された。

【図7A】様々なプールされたFSK修飾C8構築物とFAP受容体との間の架橋のSDS-PAGE分析を示す。

【図7B】様々な個々のFSK修飾C8構築物とFAP受容体との間の架橋のSDS-PAGE分析を示す。

50

【図 7 C】様々な F S K 修飾 C 8 構築物と F A P 受容体との間の架橋の速度論の S D S - P A G E 分析を示す。

【図 8 A】様々な F S Y 修飾 C 9 構築物と H e r 3 受容体との間の架橋の S D S - P A G E 分析を示す。様々な位置に F S Y を有する C 9 構築物と、H e r 3 受容体とのプールの結果を示す。

【図 8 B】様々な F S Y 修飾 C 9 構築物と H e r 3 受容体との間の架橋の S D S - P A G E 分析を示す。52～68 位に F S Y を有する C 9 構築物と、H e r 3 受容体との結果を示す。

【図 8 C】様々な F S Y 修飾 C 9 構築物と H e r 3 受容体との間の架橋の S D S - P A G E 分析を示す。53、55、56、57、58、60、64 または 67 位に F S Y を有する C 9 構築物と、H e r 3 受容体との結果を示す。

【図 8 D】様々な F S Y 修飾 C 9 構築物と H e r 3 受容体との間の架橋の S D S - P A G E 分析を示す。F S Y 修飾 C 9 構築物 (C 9 - 55 F S Y) と H e r 3 受容体との間の架橋の速度論の S D S - P A G E 分析を示す。

【図 9】フローサイトメトリーを用いた、ヒト前立腺腫瘍細胞株 L N C a P (P S M A +) および P C 3 (P S M A -) への C 2 - 54 F S Y および C 2 - 54 T Y R s d A b の結合アッセイの結果を示す。

【図 10 A】細胞に架橋した F S Y 修飾 s d A b の S D S - P A G E 分析を示す。異なる濃度および時点でインキュベートした L N C a P 細胞および C 2 - 54 F S Y を用いたウェスタンブロットを示す。抗 P S M A 抗体 (上部パネル)、抗 s d A b 抗体 (中央パネル)、および抗 G A P D H (下部パネル) をローディングコントロールとして使用して、ブロットを分析する。

【図 10 B】細胞に架橋した F S Y 修飾 s d A b の S D S - P A G E 分析を示す。L N C a P 細胞および C 2 - 54 T Y R を用いたウェスタンブロットを示し、P S M A との架橋を示さなかった。最も右側のレーンは、L N C a P 細胞を用いて、1 u M で 9 時間インキュベートした C 2 - 54 F S Y の試料を示す対照である。

【図 10 C】様々な時点での様々な濃度の C 2 - 54 F S Y での架橋の速度論のグラフを示す。

【図 11 A】異なる時間の L N C a P 細胞における、1 u M および 24 n M での C 2 - 54 F S Y および C 3 - 101 F S Y の P S M A との架橋の速度論のウェスタンブロット分析を示す。上部パネルは抗 P S M A 抗体でのブロットを示し、下部パネルは抗 G A P D H 対照を示す。

【図 11 B】L N C a P 細胞における、C 2 - 54 F S Y および C 3 - 101 F S Y の P S M A への架橋の速度論のグラフを示す。

【図 12 A】試験デザインおよび i n v i v o 架橋アッセイの結果を示す。図 12 A は、試験デザインならびに C 2 - 54 T Y R および C 2 - 54 F S Y を投与したマウスからの L N C a P および P C 3 腫瘍組織試料のウェスタンブロットを示す。上部パネルは、抗 V H H 抗体でブロッティングされたゲルの P S M A 領域を示し、中央パネルは、抗 V H H 抗体でブロッティングされたゲルの遊離 V H H 領域を示し、下部パネルは、抗 G A P D H ブロットを示す。左パネルは、L N C a P 腫瘍を有する動物からの試料を示し、右パネルは P C 3 試料を示す。架橋は、L N C a P (P S M A +) 腫瘍において、および C 2 - 54 F S Y の存在下でのみ観察される。

【図 12 B】試験デザインおよび i n v i v o 架橋アッセイの結果を示す。投与後の C 2 - 54 T Y R および C 2 - 54 F S Y の血漿濃度のグラフを示す。

【図 13】C 8 - 54 F S Y、C 8 - 55 F S Y、および C 8 - 56 F S Y (左から右) についての架橋の速度論の S D S - P A G E 分析を示す。架橋および C 8 - F S Y を表すバンド位置を標識する。各構築物について、レーンは、(左から右へ) 0、15、30、60、120、180 分、およびラダーを表す。

【図 14】様々な C 15 - F S Y 含有構築物についての架橋の S D S - P A G E 分析を示す。左ゲル：レーン (左から右) は、2、4、5、6、7、8、9、10、11、12、

10

20

30

40

50

33、34、35位においてFSY置換を有する構築物、ラダー、およびHer2を表す。右ゲル：レーン（左から右）は、36、37、66、67、68、69位においてFSY置換を有する構築物、wtラダー、およびHer2を有する。架橋およびFSYを含む構築物を表すバンド位置を標識する。

【図15】バイパルトピック構築物C38-FSYのHer2-Fcとの架橋のSDS-PAGE分析を示す。レーン（左から右）は、0、0.5、1.5、2.5、3.5、4.5、5.5、Her2、およびラダーにおける時間である。架橋、Her2-Fc、およびC38-FSYを表すバンド位置を標識する。

【図16】A431およびColo320DM細胞、A431-C23-TYR（塗りつぶした正方形）、A431-C23-FSY（塗りつぶした三角形）、Colo320DM-C23-TYR、「x」記号、Colo320DM-C23-FSY（白丸）における構築物について、フローサイトメトリーによる結合試験に由来する蛍光対濃度のプロットを示す。y軸は、40,000単位間隔で、0~200,000のAF680-GeoMeanを表す。x軸は、底が10の対数のスケールで、 10^{-11} ~ 10^{-5} までの濃度（M）を表す。

【図17】A431（EGFR+）腫瘍およびCOLO320DM（EGFR-）腫瘍における、時間依存的様式での腫瘍内遊離およびEGFR架橋AF680標識化合物C23-TYRおよびC23-FSYを示す。遊離AF-680標識C23-TYRおよびC23-FSYは、~15kDの領域（下部パネル）で検出され、EGFR架橋sdAbバンドは、~175kDの領域（上部パネル）で検出されたEGFR+A431腫瘍において、C23-FSYではEGFRの時間依存性架橋（time-dependent crosslinking）が観察されたが、C23-TYRでは観察されなかった。EGFR-COLO320DM腫瘍では、遊離sdAbの保持も架橋も観察されなかった。

【図18A】C23-TYRまたはC23-FSY被験物質を投与した動物に由来するA431腫瘍からの、3連生物学的複製（triplicate biological replicates）における光子/秒/g組織のプロットを示す。個々の動物からの値を示し、中央のバーは平均強度を示し、エラーバーはSEM（対応のあるt検定により、*は $p=0.024$ を示し、**は $p=0.002$ を示す）を示す。C23-FSYは、非FSY含有C23-TYRタンパク質と比較して、8および24時間の両方の時点で、A431腫瘍において有意に高いレベルで存在した。y軸は、 0.5×10^{10} 間隔で0~ 1.5×10^{10} の光子/s/g組織を表す。x軸は、投与の8および24時間後の時間（hr）を表す。星は、対応のあるt検定（両側）により、統計的有意性を示した（* $=p \leq 0.05$ 、** $=p \leq 0.005$ ）。

【図18B】投与の8および24時間後にC23-FSYを投与した動物からのA431およびCOLO320DM腫瘍の定量的ex vivo蛍光強度のプロットを示す。プロットは、3連生物学的複製における光子/秒/g組織を示す。個々の動物からの値を示し、中央のバーは平均強度を示し、エラーバーはSEMを示す。C23-FSYは、EGFR-COLO320DM腫瘍に存在する量と比較して、8時間および24時間の両方の時点で、A431腫瘍において有意に高いレベルで存在し、C23-FSYタンパク質の腫瘍ロッキングの特異性を実証した。y軸は、 0.5×10^{10} 間隔で0~ 1×10^{10} までの光子/秒/g組織を表す。x軸は、棒グラフの各セットについて、8時間および24時間の投与後の時間（hr）を表す。左のセットはA431モデル腫瘍であり、右のセットはColo320DMモデル腫瘍である。

【図19】SDS-PAGEゲルの蛍光画像を示し、これは、時間依存的様式で、腫瘍関連遊離sdAbおよびPSMA架橋sdAbを示す。LNCaP腫瘍を有するマウスに、C30-TYRまたはC30-FSYを三連で投与した。処置後の指定された時点で、腫瘍を回収し、ゲル電気泳動のために処理して、フルオロフォアコンジュゲートsdAb被験物質を検出した。遊離（非架橋）sdAb-AF680は、約20kDの領域で検出され（下部パネル）、C30-FSYのPSMA架橋sdAb-AF680種は100kDの領域で移動した（上部パネル）。*で示されるレーンはビヒクル試料を示す。

【図20】腫瘍関連遊離およびPSMA架橋被験物質C30-TYRおよびC30-FSYの定量分析を示す。上記のゲルからの遊離およびPSMA架橋種バンドの蛍光バンド強度を、デンストメトリーおよび標準曲線との比較によって定量した。総腫瘍内被験物質濃度（遊離およびPSMA架橋、pg/mg腫瘍組織）を時間（h）に対してプロットする。*で表されるデータ点は、検出および定量の限界未満であった試料を示す。C30-FSYの腫瘍曝露は、非共有結合C30-TYRに対しておよそ3倍増加した。

【図21A】PC3PIP（PSMA陽性）およびPC3flu（PSMA陰性）細胞株におけるC26-54TYRおよびC26-54FSY被験物質の細胞傷害性の比較のプロットを示し、これは、MMAEにコンジュゲートされたsdAbの濃度対細胞生存率曲線を示す。y軸は、20単位間隔で0～120の生存率%を表す。x軸は、底が10の対数の間隔で 10^{-11} ～ 10^{-6} の被験物質濃度（M）を表す。

10

【図21B】PC3PIP（PSMA陽性）およびPC3flu（PSMA陰性）細胞株におけるC28-101TYRおよびC28-101FSY被験物質の細胞傷害性の比較のプロットを示し、これは、MMAEにコンジュゲートされたsdAbの濃度対細胞生存率曲線を示す。y軸は、20単位間隔で0～120の生存率%を表す。x軸は、底が10の対数の間隔で 10^{-11} ～ 10^{-6} の被験物質濃度（M）を表す。

【図22】FSY架橋反応速度論のSDS-PAGE分析を示し、C17の52FSYおよび54FSY変異体をHer2受容体によってインキュベートし、架橋効率について調べた。レーン1～5は、0、30、60、120、および180分でのC17-52FSYを表し、レーン6～10は、0、30、60、120、および180分でのC17-54FSYを表し、レーン11および12は、それぞれFcHer2およびラダーである。C17-FSY、受容体、および架橋産物に対応するバンド位置を標識する。

20

【図23A】C33-52TYR、C33-52FSY、C33-54TYRおよびC33-54FSY被験物質の5時間のウォッシュアウトを使用した、細胞傷害性の比較のプロットを示し、これは、BT474細胞におけるMMAEにコンジュゲートされたsdAbの濃度対細胞生存率曲線を示す。y軸は、20単位間隔で-20～120の生存率%を表す。x軸は、底が10の対数の間隔で 10^{-3} ～ 10^3 の被験物質濃度（nM）を表す。

【図23B】C33被験物質の連続6日間の曝露を用いた細胞傷害性の比較のプロットを示し、これは、BT474細胞におけるMMAEにコンジュゲートされたsdAbの濃度対細胞生存率曲線を示す。y軸は、20単位間隔で-20～120の生存率%を表す。x軸は、底が10の対数の間隔で 10^{-2} ～ 10^2 の被験物質濃度（nM）を表す。

30

【図24A】モノパラトピック構築物およびバイパラトピック構築物についてのPSMA架橋のプロット（C3-101FSY、正方形；C34-FSY、三角形；C36-FSY、円）を示す。y軸は、20単位間隔で0～100の架橋PSMA（合計%）を表す。x軸は、ベース10の間隔で0.01～1000の被験物質濃度（nM）を表す。このプロットは、1時間での架橋に対応する。

【図24B】モノパラトピック構築物およびバイパラトピック構築物についてのPSMA架橋のプロット（C3-101FSY、正方形；C34-FSY、三角形；C36-FSY、円）を示す。y軸は、20単位間隔で0～100の架橋PSMA（合計%）を表す。x軸は、ベース10の間隔で0.01～1000の被験物質濃度（nM）を表す。このプロットは、6時間での架橋に対応する。

40

【図25A】1時間および6時間の時点での、様々な濃度のC3-101FSYおよびC34-FSY構築物における、FSY架橋速度論のウェスタンブロット分析を示す。レーン1～6は、1時間でのC3-101FSYを表し、レーン7～12は、1時間でのC34-FSYを表し、レーン13～18は、6時間でのC3-101FSYを表し、レーン19～24は、6時間でのC34-FSYを表す。6つのレーンの各グループ分けは、構築物濃度の増加（左から右に）：UTC、0.1、1、10、100、1000 nMを示す。上部のプロットセットはα-PSMAを示し、下部のプロットセットはα-GAPDHを示す。GAPDH、PSMA、架橋モノマー、および架橋ダイマーのバンド位置を標

50

識する。

【図25B】1時間および6時間の時点での、様々な濃度のC3-101FSYおよびC36-FSY構築物における、FSY架橋速度論のウェスタンブロット分析を示す。レーン1~6は、1時間でのC3-101FSYを表し、レーン7~12は、1時間でのC36-FSYを表し、レーン13~18は、6時間でのC3-101FSYを表し、レーン19~24は、6時間でのC36-FSYを表す。6つのレーンの各グループ分けは、構築物濃度の増加（左から右に）：UTC、0.1、1、10、100、1000nMを示す。上部のプロットセットはa-PSMAを示し、下部のプロットセットはa-GAPDHを示す。GAPDH、PSMA、架橋モノマー、および架橋ダイマーのバンド位置を標識する。

10

【図26A】EGFRとモノパラトピック構築物C4-109FSYとの間の架橋速度論のSDS-PAGE分析を示す。t半値幅（t_{half-max}）は約120分であった。架橋産物、EGFR、およびsdAbモノマーに対応するバンドを標識する。モノマーFSY含有sdAbと結び付けられた（engaged with）受容体の漫画を右に示す。

【図26B】EGFRとバイパラトピック構築物C37-FSYとの間の架橋の速度論のSDS-PAGE分析を示す。架橋産物、EGFR、およびsdAb2量体に対応するバンドを標識する。バイパラトピックFSY含有sdAb構築物と結び付けられた受容体の漫画を右に示す。

【図27】モノパラトピック構築物C4-109FSY（正方形）またはバイパラトピック構築物C37-FSY（円）について、EGFR架橋速度論のプロットを示す。y軸は、0~100%のEGFR架橋%を表す。x軸は、100分間隔で0~400の時間（分）を表す。

20

【図28A】第1の標的化ドメイン（例えば、構築物C1-C4）および第2の標的化ドメイン（例えば、構築物C1-C4）を含む、本明細書に記載の例示的なコンジュゲートを表現し、ここで、コンジュゲートは、非天然アミノ酸（例えば、FSY）を含む。1つの例示的なコンジュゲートはまた、ペイロードを含む。例示的なコンジュゲートは、第1の標的化ドメイン、第2の標的化ドメイン、または両方の標的化ドメイン上に非天然アミノ酸を含むことができる。

【図28B】第1の標的化ドメイン（例えば、構築物C1-C4）および第2の標的化ドメイン（例えば、構築物C1-C4）を含む、本明細書に記載の例示的なコンジュゲートを表現し、ここで、コンジュゲートは、非天然アミノ酸（例えば、FSY）を含む。1つの例示的なコンジュゲートはまた、ペイロードを含む。例示的なコンジュゲートは、第1の標的化ドメイン、第2の標的化ドメイン、または両方の標的化ドメイン上に非天然アミノ酸を含むことができる。

30

【図28C】第1の標的化ドメイン（例えば、構築物C1-C4）および第2の標的化ドメイン（例えば、構築物C1-C4）を含む、本明細書に記載の例示的なコンジュゲートを表現し、ここで、コンジュゲートは、非天然アミノ酸（例えば、FSY）を含む。1つの例示的なコンジュゲートはまた、ペイロードを含む。例示的なコンジュゲートは、第1の標的化ドメイン、第2の標的化ドメイン、または両方の標的化ドメイン上に非天然アミノ酸を含むことができる。

40

【発明を実施するための形態】

【0104】

抗体、抗体断片および抗体-薬物コンジュゲート（ADC）などの抗体関連構築物は、研究および臨床適用のための有用なツールであり得る。しかしながら、いくつかの例では、これらの分子の使用は、標的に対するオン/オフレート（on/off rates）ならびに安定性によって制限される。本明細書では、標的へのコンジュゲートの特異的かつ共有結合的結合のための組成物および方法が提供される。いくつかの例では、コンジュゲートは、標的と標的化ドメインとの間の界面の近傍に、少なくとも1つの非天然アミノ酸（UAA）残基を有する少なくとも1つの標的化ドメインを含み、その結果、標的化ド

50

メインと標的とが結合すると、標的とUAA残基との間に共有結合が形成される。いくつかの例では、コンジュゲートは、少なくとも1つの標的化ドメインおよび少なくとも1つのペイロードを含む。いくつかの例では、標的化ドメインは、標的と標的化ドメインとの間の界面の近傍に、少なくとも1つの非天然アミノ酸（UAA）残基を含み、その結果、標的化ドメインと標的とが結合すると、標的とUAA残基との間に共有結合が形成される。いくつかの例では、コンジュゲートがその標的細胞／腫瘍に到達すると、ペイロードはここで標的化ドメインを介して標的に共有結合される。いくつかの例では、共有結合的相互作用は、標的に結合するコンジュゲートのオフレートを排除または低減し、接続したペイロードとの接触を増加させる。

【0105】

10

いくつかの例では、コンジュゲートは、（i）第1の標的化ドメイン、および（ii）第2の標的化ドメインを含み、ここで、第1または第2の標的化ドメインは、少なくとも1つの非天然アミノ酸（UAA）を含む。いくつかの例では、第1または第2の標的化ドメインは、標的と第1または第2の標的化ドメインとの間の界面の近傍に存在する少なくとも1つのUAAを含み、第1または第2の標的化ドメインと標的とが結合すると、標的と少なくとも1つのUAAとの間に共有結合が形成される。いくつかの例では、コンジュゲートは、ペイロードをさらに含む。いくつかの例では、コンジュゲートが腫瘍または腫瘍微小環境内の細胞などの標的細胞に到達すると、ペイロードは、標的化ドメイン（例えば、第1または第2の標的化ドメイン）の1つを介して標的に共有結合的に結合される。

【0106】

20

いくつかの例では、共有結合相互作用は、標的に結合するコンジュゲートのオフレートを排除または低減するか、あるいは標的への接触を安定化する。さらなる例では、本明細書に提供されるコンジュゲートにおける第1および第2の標的化ドメインは、同じ標的または異なる標的を標的化する。いくつかの場合では、第1の標的化ドメインではなく第2の標的化ドメインだけがUAAを含む。いくつかの場合では、第2の標的化ドメインではなく第1の標的化ドメインだけがUAAを含む。いくつかの場合では、第1の標的化ドメインおよび第2の標的化ドメインの両方がUAAを含む。いくつかの例では、ペイロードは、第1の標的化ドメインまたは第2の標的化ドメインに付着し得る。いくつかの場合では、ペイロードが第1の標的化ドメインに付着する。いくつかの場合では、ペイロードが第2の標的化ドメインに付着する。

30

コンジュゲート

【0107】

コンジュゲートは、標的化ドメインおよびペイロードを含み得る。いくつかの実施形態では、ペイロードは、リンカーでコンジュゲートに接続される。いくつかの例では、コンジュゲートは、少なくとも1つの非天然アミノ酸を含む。いくつかの例では、標的化ドメインは、標的に結合するように構成され、標的化ドメイン内の非天然アミノ酸のうちの1つは、標的との共有結合的結合を形成する。

【0108】

本明細書に提供されるコンジュゲートは、（i）第1の標的化ドメインおよび（ii）第2の標的化ドメインを含み得る。本明細書に提供されるコンジュゲートは、（i）第1の標的化ドメイン、（ii）第2の標的化ドメイン、および（iii）ペイロードを含み得る。本明細書に記載のコンジュゲートは、第1の標的化ドメインおよび第2の標的化ドメインを含み得、ここで、第1の標的化ドメインおよび第2の標的化ドメインは同じ細胞へ結合するように構成される。いくつかの例では、コンジュゲートは、第1の標的化ドメイン、第2の標的化ドメイン、に含まれた少なくとも1つの非天然アミノ酸（UAA）を含むか、または、第1の標的化ドメインおよび第2の標的化ドメインのそれぞれは、少なくとも1つのUAAを含む。いくつかの例では、標的化ドメインは標的に結合するように構成され、標的化ドメイン（例えば、第1および／または第2の標的化ドメイン）内のUAAのうちの1つは、標的との共有結合的結合を形成する。いくつかの例では、第1の標的化ドメインはUAAを含み、第1の標的との共有結合を形成するように構成され、その

40

50

結果、少なくとも1つのUAAが、第1の標的と第1の標的化ドメインとの間の界面の近傍における、第1の標的化ドメインに存在する。いくつかの例では、第1の標的および第1の標的化ドメインは結合し、共有結合は、第1の標的と、コンジュゲートの第1の標的化ドメインにおけるUAAとの間で形成される。いくつかの例では、第2の標的化ドメインはUAAを含み、第2の標的との共有結合を形成するように構成され、その結果、少なくとも1つのUAAが、第2の標的と第2の標的化ドメインとの間の界面の近傍における、第2の標的化ドメインに存在する。いくつかの例では、第2の標的および第2の標的化ドメインは結合し、共有結合は、第2の標的と、コンジュゲートの第2の標的化ドメインにおけるUAAとの間で形成される。いくつかの例では、第1の標的は第2の標的と同じである。いくつかの例では、第1の標的および第2の標的は、同じ細胞の表面上にある。

10

【0109】

いくつかの実施形態では、第1の標的化ドメインおよび第2の標的化ドメインは、細胞の表面上など、同じ標的を結合し、標的化ドメインのうちの1つのエンゲージメントは、もう一方の標的化ドメインの、対応する標的への近接をもたらす。いくつかの場合では、第1の標的化ドメインは、第1の標的に結合し、第2の標的化ドメインは、第2の標的に結合し、第1および第2の標的化ドメインの少なくとも1つはUAAを含み、UAAは、対応する標的との共有結合を形成する。いくつかの例では、1つの標的化ドメインは、その対応する標的との共有結合を形成し、もう一方の標的化ドメインは、その対応する標的に非共有結合的に結合する。いくつかの例では、第1の標的化ドメインおよび第2の標的化ドメインの両方はそれぞれ、それらの対応する標的に共有結合的に結合する。

20

【0110】

本明細書に提供されるコンジュゲートは、1を超える標的に結合するように構成され得る。いくつかの例では、第2の標的化ドメインは、第1の標的化ドメイン以外の標的を結合し得る。いくつかの例では、コンジュゲートは、少なくとも2、3、4、5、6、または7を超える標的化ドメインを含む。いくつかの例では、標的化ドメイン（例えば、第1の標的化ドメインおよび第2の標的化ドメイン）は、リンカー（例えば、化学のリンカー、融合タンパク質、または本明細書に提供される他のリンカー）によって互いに結合する。いくつかの例では、本明細書に提供されるコンジュゲート中の多数の標的化ドメイン（例えば、第1の標的化ドメインおよび第2の標的化ドメイン）は、モノパラトピックまたはバイパラトピック構築物を提供し得る。いくつかの実施形態では、第1の標的化ドメインおよび第2の標的化ドメインは、同じ標的に結合する。いくつかの例では、第1の標的化ドメインおよび第2の標的化ドメインは、同じ標的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、第1の標的化ドメインおよび第2の標的化ドメインは、異なる標的に結合する。いくつかの実施形態では、第1の標的化ドメインおよび第2のドメインは結合して、融合タンパク質を形成する。

30

【0111】

標的化ドメイン（例えば、第1の標的化ドメインまたは第2の標的化ドメイン）は、標的へのコンジュゲートに結合されたペイロードをガイドし得る。いくつかの例では、標的化ドメインは、抗体またはその断片を含む。いくつかの例では、標的化ドメインは、単特異性Fab2、二重特異性Fab2、三重特異性Fab3、一価IgG、scFv、二重特異性ダイアボディ、三重特異性トリアボディ、scFv-Fc、ナノボディ（すなわち、単ドメイン抗体、sdAb）、ミニボディ、IgNAR、V-NAR、hcIgG、VhH、またはペプチボディ、Darpin、モノボディ/FN3、VNAR、Repbody、Darpinを含む。いくつかの例では、標的化ドメインは、ナノボディを含む。いくつかの実施形態では、標的化ドメインは単ドメイン抗体（sdAb）を含む。いくつかの例では、標的化ドメインは、1つ以上のCDR領域を含む。いくつかの実施形態では、標的化ドメインは、細胞表面分子と結合する。いくつかの例では、コンジュゲートは、バイパラトピックである。いくつかの実施形態では、第1の標的化ドメインおよび第2の標的化ドメインはそれぞれ、抗体またはフラグメント結合性断片を含み、そのような抗体または抗原結合性断片の構造は、同じか、または異なり得る。いくつかの例では、

40

50

第1の標的化ドメインは、単鎖（例えば、Fv）抗体断片であり得、第2の標的化ドメインは、sdAbであり得るか、または他の例では、第1の標的化ドメインは、sdAbであり得、第2の標的化ドメインは、sdAbであり得る。

【0112】

いくつかの例では、標的化ドメイン（例えば、第1の標的化ドメインおよび／または第2の標的化ドメイン）は、アフィボディ、DARPinまたはミニバインダーなどの抗体ミミックである。

【0113】

いくつかの例では、標的は細胞表面タンパク質を含む。いくつかの例では、標的はPSMAを含む。いくつかの例では、標的化ドメイン（例えば、第1の標的化ドメインおよび／または第2の標的化ドメイン）は、配列番号1～4または16～64のうちのいずれか1つを含む。いくつかの例では、標的化ドメインは、配列番号1～4または16～64のうちのいずれか1つに対して、少なくとも99%、98%、97%、95%、90%、85%、80%、70%、または少なくとも65%の同一性を有する配列を含む。いくつかの例では、標的化ドメインは、配列番号1～4または16～64のうちのいずれか1つに対して、少なくとも99%、98%、97%、95%、90%、85%、80%、70%、または少なくとも65%の同一性を有する配列、および少なくとも1つの非天然アミノ酸を含む。

【0114】

非天然アミノ酸は、コンジュゲートにおける任意の位置に位置し得る。いくつかの例では、第1または第2の標的化ドメイン（例えば、第1の標的化ドメインまたは第2の標的化ドメイン）の一方または両方は、非天然アミノ酸を含む。いくつかの例では、標的化ドメインは、1つ以上の相補性決定領域（CDR）を含む、抗体または抗原結合性断片である。いくつかの例では、1つ以上の非天然アミノ酸は、標的化ドメインの一方または両方のみのCDR内またはその近傍に含まれる。いくつかの例では、標的化ドメインは、非天然アミノ酸を含む。いくつかの例では、標的化ドメインは、C1、C2、またはC3を含む。いくつかの例では、コンジュゲートは、CDR1、CDR2、またはCDR3において、非天然アミノ酸を有するC1を含む。いくつかの例では、コンジュゲートは、26、28、29、30、99、102、103、105、108、110、111、112、113、114、および115位のうちのいずれか1つにおいて、非天然アミノ酸を有するC1を含む。いくつかの例では、コンジュゲートは、28、102、112、および113位のうちのいずれか1つにおいて、非天然アミノ酸を有するC1を含む。いくつかの例では、コンジュゲートは、CDR1、CDR2、またはCDR3において、非天然アミノ酸を有するC2を含む。いくつかの例では、コンジュゲートは、50、52、53、54、56、58、または100位のうちのいずれか1つにおいて、非天然アミノ酸を有するC2を含む。いくつかの例では、コンジュゲートは、CDR1、CDR2、またはCDR3において、非天然アミノ酸を有するC4を含む。いくつかの例では、コンジュゲートは、109位において、非天然アミノ酸を有するC4を含む。いくつかの例では、コンジュゲートは、CDR1、CDR2、またはCDR3において、非天然アミノ酸を有するC3を含む。いくつかの例では、コンジュゲートは、58、62、101、103、または107位のうちのいずれか1つにおいて、非天然アミノ酸を有するC3を含む。いくつかの例では、コンジュゲートは、52、53、54、55、56、58、60、62、64位のうちのいずれか1つにおいて、非天然アミノ酸を有するC8を含む。いくつかの例では、コンジュゲートは、53、55、56、57、58、60、64、67位のうちのいずれか1つにおいて、非天然アミノ酸を有するC9を含む。いくつかの例では、コンジュゲートは、CDR領域を有するsdAbと、CDR領域内またはその近傍の少なくとも1つの非天然アミノ酸（UAA）残基と、を含む単一ドメイン抗体（sdAb）を含み、ここで、sdAbは、配列番号1～4または14～64のうちのいずれか1つを含む。いくつかの例では、コンジュゲートは、CDR領域を有するsdAbと、CDR領域内またはその近傍の少なくとも1つの非天然アミノ酸（UAA）残基と、を含む単一ドメイン抗体

10

20

30

40

50

(s d A b) を含み、ここで、s d A b は、配列番号 1 ~ 4 または 1 6 ~ 6 4 のうちのいずれか 1 つに対して、9 9 %、9 8 %、9 7 %、9 5 %、9 0 %、8 5 %、8 0 %、7 0 %、少なくとも 6 5 % の同一性を有する配列を含む。いくつかの実施形態では、C D R 領域は、配列番号 5 ~ 1 3 のうちの 1 つ以上を含む。いくつかの実施形態では、C D R 領域は、配列番号 5 ~ 1 3 のうちの 1 つ以上に対して、少なくとも 9 9 %、9 8 %、9 7 %、9 5 %、9 0 %、8 5 %、8 0 %、7 0 %、または少なくとも 6 5 % の同一性を有する配列を含む。

【0 1 1 5】

いくつかの例では、コンジュゲートは、精製などのためのタグ（例えば、H i s 6 タグ）を含む。いくつかの例では、コンジュゲートはタグを含まないか、または、タグは投与前に取り除かれる。いくつかの例では、コンジュゲートは、発現または分泌などのためのリーダー配列を含む。いくつかの例では、コンジュゲートはリーダー配列を含まないか、あるいは、リーダー配列は、コンジュゲートの形成前、ペイロードの付着前、またはコンジュゲートの投与前に、第 1 の標的化ドメインまたは第 2 の標的化ドメインから取り除かれる。

【0 1 1 6】

いくつかの例では、コンジュゲートはシグナル配列を含む。シグナル配列は、細菌細胞中のコンジュゲートの発現、フォールディング、または酸化を可能にし得る。いくつかの例では、シグナル配列は、細菌細胞において発現されたコンジュゲートを別の位置または環境に輸送して、コンジュゲートのフォールディングまたは機能を促進することを可能にし得る。いくつかの例では、シグナル配列は P e l B 配列であり得る。いくつかの例では、シグナル配列は、細菌細胞のペリプラスムへのコンジュゲートの輸送を可能にし得る。いくつかの例では、環境は、ジスルフィドの形成またはジスルフィドの還元を可能にするように、酸化または還元であってもよい。

【0 1 1 7】

標的

本明細書に提供されるコンジュゲートは、1 つ以上の標的に結合するように構成され得る。いくつかの例では、コンジュゲートは、U A A を含む単一の標的化ドメインで構成され、コンジュゲートは標的に結合する。いくつかの例では、コンジュゲートは 2 つ（あるいは少なくとも 2 つ）の標的化ドメインで構成され、第 1 および第 2 の標的化ドメインは、1 つ以上の標的に結合する。いくつかの例では、第 1 の標的化ドメインは、第 1 の標的に結合し、第 2 の標的化ドメインは、第 2 の標的に結合する。いくつかの例では、標的化ドメイン（例えば、単一の標的化ドメイン、または第 1 の標的化ドメイン、または第 2 の標的化ドメイン）に含まれる U A A は、標的化ドメイン（例えば、単一の標的化ドメイン、または第 1 の標的化ドメイン、または第 2 の標的化ドメイン）と標的（標的化ドメイン、例えば、第 1 または第 2 の標的に対応する）との間の共有結合を形成する。いくつかの例では、コンジュゲートは、第 1 の U A A を含む第 1 の標的化ドメインと、第 2 の U A A を含む第 2 の標的化ドメインとを含む。このような U A A は、いくつかの事例では、同じであるか、または他の事例では、異なる。いくつかの例では、標的は、細胞表面分子（すなわち、細胞の外表面上に全体的または部分的に存在する）である。いくつかの例では、第 1 の標的化ドメインおよび第 2 の標的化ドメインは、同じ細胞表面分子などの同じ標的に結合する。いくつかの例では、第 1 の標的化ドメインおよび第 2 の標的化ドメインはそれぞれ、異なる細胞表面分子に結合するなど、異なる標的に結合する。異なる細胞表面分子は、同じ細胞上にあり得る。

【0 1 1 8】

いくつかの例では、標的は、腫瘍細胞上に存在する細胞表面分子である。いくつかの例における標的は、モノマーである。いくつかの例では、標的は、同種（h o m o g e n e o u s）または異種（h e t e r o g e n e o u s）の単位の多量体構造に含まれる。いくつかの例では、標的が、P S M A、E G F R、E G F R v i i i、M S L N、C E A、D L L 3、F A P、C D 3 3、H E R 3、P D - L 1、E p h A 2、E p h A 4、H E R

2、SIRPa、DLK1、Muc16、LRP5、LRP6、endo180、LIV-1、SLAMF7、PTK7、GPR20、CDH6、CSP-1、CD71、PRLR、SEZ6、DLL1、NOTCH3 rec、NaPi2b、CD16、GCC、SSTR2、CAIX、CAXII、MC1R、CXCR4、B1R、GRPR、STEAP1、CD70、CD46、CD166、CLL-1、ADAM9、cKIT、CD36、CD73、ITGaVb3、ITGaVb6、GPC-1、CD38、CD51、FGFR3、Ly6E、CD44v6、ENPP3、CXCR3、CXCR5、FcRH5、VEGF、VEGFR2、CD45、CCR4、CD25、5T4、ROR1、TROP-2、NECTIN4、cMET、CD19、CD22、CD30、CD33、CD123、BCMA、CD79b、AXL、RON、B7-H3、B7-H4、KAG1、Muc1、ADAM-9、GPNMB、EDBフィブロネクチン、組織因子、GPNMB、FolRa、ALPP、ALPPL2、MT1-MMP、CLDN18.2、CLDN6、CLDN9、pカドヘリン、CEACAM6、CD47、およびEpCAMからなる群から選択されるが提供される

10

【0119】

いくつかの例では、コンジュゲートは、第1の標的化ドメインおよび第2の標的化ドメインを含み、これらの標的化ドメインの両方は、同じ標的に結合し、ここで標的は、腫瘍細胞上の細胞表面分子である。例えば、両方の標的化ドメインは、PSMA、EGFR、EGFRviii、MSLN、CEA、DLL3、FAP、CD33、HER3、PD-L1、EphA2、EphA4、HER2、SIRPa、DLK1、Muc16、LRP5、LRP6、endo180、LIV-1、SLAMF7、PTK7、GPR20、CDH6、CSP-1、CD71、PRLR、SEZ6、DLL1、NOTCH3 rec、NaPi2b、CD16、GCC、SSTR2、CAIX、CAXII、MC1R、CXCR4、B1R、GRPR、STEAP1、CD70、CD46、CD166、CLL-1、ADAM9、cKIT、CD36、CD73、ITGaVb3、ITGaVb6、GPC-1、CD38、CD51、FGFR3、Ly6E、CD44v6、ENPP3、CXCR3、CXCR5、FcRH5、VEGF、VEGFR2、CD45、CCR4、CD25、5T4、ROR1、TROP-2、NECTIN4、cMET、CD19、CD22、CD30、CD33、CD123、BCMA、CD79b、AXL、RON、B7-H3、B7-H4、KAG1、Muc1、ADAM-9、GPNMB、EDBフィ
 ブロネクチン、組織因子、GPNMB、FolRa、ALPP、ALPPL2、MT1-MMP、CLDN18.2、CLDN6、CLDN9、pカドヘリン、CEACAM6、CD47、およびEpCAMからなる群から選択される標的に結合する。いくつかの例では、コンジュゲートは、第1の標的化ドメインおよび第2の標的化ドメインを含むが、これらは、異なる標的に結合し、ここで異なる標的の1つ以上は、腫瘍細胞上の細胞表面分子である。例えば、第1および第2の標的化ドメインは、PSMA、EGFR、EGFRviii、MSLN、CEA、DLL3、FAP、CD33、HER3、PD-L1、EphA2、EphA4、HER2、SIRPa、DLK1、Muc16、LRP5、LRP6、endo180、LIV-1、SLAMF7、PTK7、GPR20、CDH6、CSP-1、CD71、PRLR、SEZ6、DLL1、NOTCH3 rec、NaPi2b、CD16、GCC、SSTR2、CAIX、CAXII、MC1R、CXCR4、B1R、GRPR、STEAP1、CD70、CD46、CD166、CLL-1、ADAM9、cKIT、CD36、CD73、ITGaVb3、ITGaVb6、GPC-1、CD38、CD51、FGFR3、Ly6E、CD44v6、ENPP3、CXCR3、CXCR5、FcRH5、VEGF、VEGFR2、CD45、CCR4、CD25、5T4、ROR1、TROP-2、NECTIN4、cMET、CD19、CD22、CD30、CD33、CD123、BCMA、CD79b、AXL、RON、B7-H3、B7-H4、KAG1、Muc1、ADAM-9、GPNMB、EDBフィ
 ブロネクチン、組織因子、GPNMB、FolRa、ALPP、ALPPL2、MT1-MMP、CLDN18.2、CLDN6、CLDN9、pカドヘリン、CEACAM6、CD47

20

30

40

50

、およびE p C A Mからなる群からそれぞれ選択される異なる標的に結合する。いくつかの例では、コンジュゲートは、第1または第2の標的（またはその両方）が結合した場合に、細胞表面にペイロードを運ぶ。いくつかの例では、コンジュゲートはペイロードを有さず、コンジュゲートは、第1の標的、第2の標的、または第1の標的および第2の標的の両方に共有結合する場合、ブロッカーまたはアンタゴニストとして作用する。

【0120】

いくつかの例では、コンジュゲートは、単一の標的化ドメインを含み、標的化ドメインは、標的に結合し、ここで標的は、腫瘍細胞上の細胞表面分子である。例えば、標的化ドメインが、P S M A、E G F R、E G F R v i i i、M S L N、C E A、D L L 3、F A P、C D 3 3、H E R 3、P D - L 1、E p h A 2、E p h A 4、H E R 2、S I R P a、D L K 1、M u c l 6、L R P 5、L R P 6、e n d o l 8 0、L I V - 1、S L A M F 7、P T K 7、G P R 2 0、C D H 6、C S P - 1、C D 7 1、P R L R、S E Z 6、D L L 1、N O T C H 3 r e c、N a P i 2 b、C D 1 6、G C C、S S T R 2、C A I X、C A X I I、M C 1 R、C X C R 4、B 1 R、G R P R、S T E A P 1、C D 7 0、C D 4 6、C D 1 6 6、C L L - 1、A D A M 9、c K I T、C D 3 6、C D 7 3、I T G a V b 3、I T G a V b 6、G P C - 1、C D 3 8、C D 5 1、F G F R 3、L y 6 E、C D 4 4 v 6、E N P P 3、C X C R 3、C X C R 5、F c R H 5、V E G F、V E G F R 2、C D 4 5、C C R 4、C D 2 5、5 T 4、R O R 1、T R O P - 2、N E C T I N 4、c M E T、C D 1 9、C D 2 2、C D 3 0、C D 3 3、C D 1 2 3、B C M A、C D 7 9 b、A X L、R O N、B 7 - H 3、B 7 - H 4、K A A G 1、M u c l、A D A M - 9、G P N M B、E D Bフィブロネクチン、組織因子、G P N M B、F o l R a、A L P P、A L P P L 2、M T 1 - M M P、C L D N 1 8 . 2、C L D N 6、C L D N 9、pカドヘリン、C E A C A M 6、C D 4 7、およびE p C A Mからなる群から選択される標的に結合する。いくつかの例では、単一の標的化ドメインは標的にペイロードを運ぶ。いくつかの例では、単一の標的化ドメインはペイロードを有さず、コンジュゲートは、標的に共有結合する場合、ブロッカーまたはアンタゴニストとして作用する。

【0121】

標的化ドメインが結びつく標的は、様々な構造を含み得る。いくつかの例では、標的は、標的化ドメインが結びつき得る1つ以上のエピトープを含む。いくつかの例では、標的は、複数のエピトープを含み、例えば、第1のエピトープに結合する第1の標的化ドメインおよび第2のエピトープに結合する第2の標的化ドメインなどによって、複数の標的化ドメインによって結びつき得る。いくつかの例では、標的はモノマーを含む。いくつかの例では、標的は単鎖ペプチドを含む。いくつかの例では、標的は多量体分子を含む。いくつかの例では、多量体分子は、2つ以上のサブユニットを含む。いくつかの例では、サブユニットは、同じ構造を有する。いくつかの例では、サブユニットは、異なる構造、または同じ構造と異なる構造との組み合わせである。いくつかの例では、多量体分子は、複合体中に2つ以上の分子を含む。いくつかの例では、多量体分子は、互いに複合体化または相互作用する2つのタンパク質を含む。

【0122】

例示的な標的化ドメインおよび例示的なコンジュゲート

本明細書で提供されるコンジュゲートは、標的に結びつく分子から組み立てることができる標的化ドメインを含む。いくつかの例では、標的化ドメイン（単一の標的化ドメインまたは第1の標的化ドメインおよび／もしくは第2の標的化ドメイン）は、抗原結合領域を含み、抗原結合領域は特異的標的に結びつく。このような抗原結合領域は、抗体の重鎖または軽鎖に一般に見出される3つのC D RなどのC D Rを含むことができる。いくつかの例では、標的化ドメインは、V H H（ナノボディまたは単一ドメイン抗体とも呼ばれる）などのC D Rを含む抗原結合断片を含む。いくつかの例では、単一ドメイン抗体は、1つ以上のU A Aを含む。

いくつかの例では、単一の標的化ドメイン、または複数の標的化ドメインを有するコンジュゲートについて、標的化ドメイン（例えば、第1の標的化ドメインまたは第2の標的化

ドメイン) の1つは、C 1、C 2、C 3、C 4、またはC 5など、表1の単ドメイン抗体から選択される。いくつかの例では、複数の標的化ドメインを有するコンジュゲートの場合、標的化ドメイン(例えば、第1の標的化ドメインおよび第2の標的化ドメイン)のそれぞれは、例えば、C 1、C 2、C 3、C 4、またはC 5のいずれかなど、表1の単ドメイン抗体から独立して選択され、1つ以上のU A Aは、単ドメイン抗体のC D R中またはC D Rの近傍に存在している。いくつかの例では、第1の標的化ドメインは、C 1、C 2、C 3、C 4、またはC 5のうちのいずれかなど、表1の単ドメイン抗体から選択される。いくつかの例では、第2の標的化ドメインは、C 1、C 2、C 3、C 4、またはC 5のうちのいずれかなど、表1の単ドメイン抗体から選択される。

【0123】

いくつかの例では、コンジュゲートは、構築物C 1を含む、単一の標的化ドメイン、第1の標的化ドメイン、第2の標的化ドメイン、または両方の標的化ドメインを含む。いくつかの例では、コンジュゲートは、C D R 1、C D R 2、またはC D R 3において、非天然アミノ酸を有する構築物C 1を含む。いくつかの例では、コンジュゲートは、配列番号1、4、19、または73の26、28、29、30、99、102、103、105、108、110、111、112、113、114、および115位のいずれか1つで、非天然アミノ酸を有する構築物C 1を含む。いくつかの例では、コンジュゲートは、配列番号1、4、19、または73の28、102、112、および113位のいずれか1つに、非天然アミノ酸を有する構築物C 1を含む。いくつかの例では、コンジュゲートは、単ドメイン抗体(s d A b)、およびs d A b内のC D R領域内、またはその近傍内に少なくとも1つの非天然アミノ酸(U A A)を含む。いくつかの例では、このようなs d A bは、配列番号1を含む。いくつかの例では、コンジュゲートは、単ドメイン抗体(s d A b)、およびs d A b内のC D R領域内、またはその近傍の少なくとも1つに非天然アミノ酸(U A A)を含み、s d A bは、配列番号1に対して、少なくとも99%、98%、97%、95%、90%、85%、80%、70%、少なくとも65%の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの例では、コンジュゲートは、配列番号1に対して少なくとも99%、98%、97%、95%、90%、85%、80%、70%、または少なくとも65%の同一性を有する、単一の標的化ドメイン、第1の標的化ドメイン、または第2の標的化ドメイン、またはその両方を含む。

【0124】

いくつかの例では、コンジュゲートは、構築物C 2を含む、単一の標的化ドメイン、第1の標的化ドメイン、第2の標的化ドメイン、または両方の標的化ドメインを含む。いくつかの例では、コンジュゲートは、C D R 1、C D R 2、またはC D R 3において、非天然アミノ酸を有する構築物C 2を含む。いくつかの例では、コンジュゲートは、配列番号2または22の50、52、53、54、56、58、または100位のうちのいずれか1つで、非天然アミノ酸を有する構築物C 2を含む。いくつかの例では、コンジュゲートは、s d A bおよびs d A b内のC D R領域内、またはその近傍内に少なくとも1つの非天然アミノ酸(U A A)を含む、単ドメイン抗体(s d A b)を含み、ここで、s d A bは配列番号2を含む。いくつかの例では、コンジュゲートは、単ドメイン抗体(s d A b)、およびs d A b内のC D R領域内、またはその近傍の少なくとも2つに非天然アミノ酸(U A A)を含み、s d A bは、配列番号2に対して、少なくとも99%、98%、97%、95%、90%、85%、80%、70%、少なくとも65%の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの例では、コンジュゲートは、配列番号2に対して少なくとも99%、98%、97%、95%、90%、85%、80%、70%、または少なくとも65%の配列同一性を有する、単一の標的化ドメイン、第2の標的化ドメイン、または第2の標的化ドメイン、またはその両方を含む。

【0125】

いくつかの例では、コンジュゲートは、構築物C 3を含む、単一の標的化ドメイン、第1の標的化ドメイン、第2の標的化ドメイン、または両方の標的化ドメインを含む。いくつかの例では、コンジュゲートは、C D R 1、C D R 2、またはC D R 3において、非天

10

20

30

40

50

然アミノ酸を有する構築物 C 3 を含む。いくつかの例では、コンジュゲートは、配列番号 3 の 58、62、101、103、あるいは 107 位のいずれか 1 つで、非天然アミノ酸を有する構築物 C 3 を含む。いくつかの例では、コンジュゲートは、C 3 の CDR 1、CDR 2、または CDR 3 において、非天然アミノ酸を含む。いくつかの例では、コンジュゲートは、109 位において、非天然アミノ酸を含む。いくつかの例では、コンジュゲートは、s d A b および内の CDR 領域内、またはその近傍内に少なくとも 1 つの非天然アミノ酸 (U A A) を、単一ドメイン抗体 (s d A b) を含み、ここで、s d A b は配列番号 3 を含む。いくつかの例では、コンジュゲートは、単一ドメイン抗体 (s d A b)、および s d A b 内の CDR 領域内、またはその近傍の少なくとも 3 つに非天然アミノ酸 (U A A) を含み、s d A b は、配列番号 1 に対して、少なくとも 99%、98%、97%、95%、90%、85%、80%、70%、少なくとも 65% の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの例では、コンジュゲートは、配列番号 2 に対して少なくとも 99%、98%、97%、95%、90%、85%、80%、70%、または少なくとも 65% の配列同一性を有する、単一の標的化ドメイン、第 2 の標的化ドメイン、または第 3 の標的化ドメイン、またはその両方を含む。

10

20

30

40

50

【0126】

いくつかの例では、コンジュゲートは、構築物 C 4 を含む、単一の標的化ドメイン、第 1 の標的化ドメイン、第 2 の標的化ドメイン、または両方の標的化ドメインを含む。いくつかの例では、コンジュゲートは、CDR 1、CDR 2、または CDR 3 において、非天然アミノ酸を有する構築物 C 4 を含む。いくつかの例では、コンジュゲートは、単一ドメイン抗体 (s d A b)、および内の CDR 領域内、またはその近傍内に少なくとも 1 つの非天然アミノ酸 (U A A) を含み、ここで、s d A b は配列番号 16 を含む。いくつかの例では、コンジュゲートは、単一ドメイン抗体 (s d A b)、および s d A b 内の CDR 領域内、またはその近傍の少なくとも 1 つに非天然アミノ酸 (U A A) を含み、s d A b は、配列番号 16 に対して、少なくとも 99%、98%、97%、95%、90%、85%、80%、70%、少なくとも 65% の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの例では、コンジュゲートは、配列番号 16 に対して少なくとも 99%、98%、97%、95%、90%、85%、80%、70%、または少なくとも 65% の配列同一性を有する、単一の標的化ドメイン、第 2 の標的化ドメイン、または第 16 の標的化ドメイン、またはその両方を含む。

【0127】

いくつかの例では、コンジュゲートは、構築物 C 5 を含む、単一の標的化ドメイン、第 1 の標的化ドメイン、第 2 の標的化ドメイン、または両方の標的化ドメインを含む。いくつかの例では、コンジュゲートは、CDR 1、CDR 2、または CDR 3 において、非天然アミノ酸を有する構築物 C 5 を含む。いくつかの例では、コンジュゲートは、単一ドメイン抗体 (s d A b)、および内の CDR 領域内、またはその近傍内に少なくとも 1 つの非天然アミノ酸 (U A A) を含み、ここで、s d A b は配列番号 18 を含む。いくつかの例では、コンジュゲートは、単一ドメイン抗体 (s d A b)、および s d A b 内の CDR 領域内、またはその近傍の少なくとも 1 つに非天然アミノ酸 (U A A) を含み、s d A b は、配列番号 18 に対して少なくとも 99%、98%、97%、95%、90%、85%、80%、70%、少なくとも 65% の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの例では、コンジュゲートは、配列番号 18 に対して少なくとも 99%、98%、97%、95%、90%、85%、80%、70%、または少なくとも 65% の配列同一性を有する、単一の標的化ドメイン、第 2 の標的化ドメイン、または第 18 の標的化ドメイン、またはその両方を含む。

【0128】

本明細書に記載されるコンジュゲートは、2 つ以上の標的化ドメインを含み得る。いくつかの例では、2 つ以上の標的化ドメイン (例えば、第 1 の標的化ドメインまたは第 2 の標的化ドメイン) は、リンカーを介して互いに接続している。いくつかの例では、コンジュゲートは融合タンパク質である。いくつかの例では、リンカーはリンカー L 1 (配列番

号 14) を含む。いくつかの例では、コンジュゲートは、配列番号 65～72 のいずれか 1 つを含む。いくつかの実施形態では、コンジュゲートは、配列 65～72 のうちの 1 つに対して少なくとも 99 %、98 %、97 %、95 %、90 %、85 %、80 %、70 %、または少なくとも 65 % の配列同一性を有する。

【0129】

いくつかの例では、第 1 の標的化ドメインは、配列番号 1～4 または 16～64 のいずれか 1 つを含む。いくつかの例では、第 1 の標的化ドメインは、配列番号 1～4 または 16～64 のいずれか 1 つに対して、少なくとも 70 % の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの例では、第 2 の標的化ドメインは、配列番号 1～4 または 16～64 のいずれか 1 つを含む。いくつかの例では、第 2 の標的化ドメインは、配列番号 1～4 または 16～64 のいずれか 1 つに対して、少なくとも 70 % の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの例では、コンジュゲートは、単一の標的化ドメインで構成され、単一の標的化ドメインは、配列番号 1～4 または 16～64 のいずれか 1 つを含む。いくつかの例では、単一の標的化ドメインは、配列番号 1～4 または 16～64 のいずれか 1 つに対して、少なくとも 70 % の配列同一性を有する配列を含む。

10

【0130】

いくつかの例では、コンジュゲートは、配列番号 65～72 を含む。いくつかの例では、コンジュゲートは、配列番号 65～72 のいずれか 1 つに対して、少なくとも 70 % の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの例では、コンジュゲートは、配列番号 1～4 または 16～64 のいずれか 1 つを含む。いくつかの例では、コンジュゲートは、配列番号 1～4 または 16～64 のいずれか 1 つに対して、少なくとも 70 % の配列同一性を有する配列を含む。いくつかの例では、コンジュゲートは、配列番号 65～72 に対して、少なくとも 70 % の配列同一性を有する配列を含む。

20

【0131】

いくつかの例では、本明細書に記述されたコンジュゲートに関連したアミノ酸配列は、表 1A にある。

【0132】

30

40

50

【表 1 - 1】

表 1A: アミノ酸配列

構築物名	配列 番号	配列
C1	1	<u>QVQLQESGGGSVQAGGSLRLSCTAPGYTDSN</u> <u>YYMSWFRQAPGKEREWVAGVNTGRGSTSY</u> <u>ADSVKGRFTISQDNAKNTMFLQMNSLKPEDT</u> <u>AIYYCAVAACHFCDSLPKTQDEYILWGQGTQ</u> <u>VTVSSAAAYPYDVPDYGS</u>
C2	2	<u>EVQLVESGGGLVQPGGSLTLSCAASRFMISEY</u> <u>SMHWVRQAPGKGLEWVSTINPAGTTDYAES</u> <u>VKGRFTISRDNANTLYLQMNSLKPEDTAVY</u> <u>YCDGYGYRGQGTQVTVSS</u>
C3	3	<u>QVQLQESGGGSVEAGGSLRLSCARSGWPYST</u> <u>YSMNWFRQAPGKEREA VAGISSTMSGIIFAES</u> <u>KAGQFTISQDNAKNTVYLQMNNLKPEDTAIY</u> <u>YCAARRDYSLSSSSDDFDYWGQGTQVTVSSA</u> <u>AAYPYDVPDYGS</u>
C1- C101A/C1 04A/H102 (FSY)	4	<u>QVQLQESGGGSVQAGGSLRLSCTAPGYTDSN</u> <u>YYMSWFRQAPGKEREWVAGVNTGRGSTSY</u> <u>ADSVKGRFTISQDNAKNTMFLQMNSLKPEDT</u> <u>AIYYCAVAAAXFADSLPKTQDEYILWGQGTQ</u> <u>VTVSSAAAYPYDVPDYGSC</u>
C1- CDR1_26 -35	5	GYTDSNYYMS
C1- CDR2_50 -66	6	VNTGRGSTSYADSVKG
C1- CDR3_99 -116	7	AACHFCDSLPKTQDEYIL
C2- CDR1_26 -35	8	RFMISEYSMH
C2- CDR2_50 -65	9	TINPAGTTDYAESVKG
C2- CDR3_96 -100	10	DGYGY
C3_CDR1 26-35	11	GWPYSTYSMN
C3_CDR2 50-65	12	GISSTMSGIIFAESKAG
C3_CDR3 99-113	13	RRDYSLSSSSDDFDY
L1	14	GGGGSGGGGS
PeIB	15	MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMAMG

10

20

30

40

【0 1 3 3】

50

【表 1 - 2】

C4	16	QVKLEESGGGSVQTGGSLRLTCAASGRTSRS YGMGWFRQAPGKEREFVSGISWRGDSTGYA DSVKGRFTISRDNNAKNTVDLQMNSLKPEDTA IYYCAAAAGSAWYGTLYEYDYWGQGTQVT VSS
C4- 109FSY	17	QVKLEESGGGSVQTGGSLRLTCAASGRTSRS YGMGWFRQAPGKEREFVSGISWRGDSTGYA DSVKGRFTISRDNNAKNTVDLQMNSLKPEDTA IYYCAAAAGSAWYGTLYEYDYWGQGTQVT VSS
C5	18	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSAAASGRTFSS YAMGWFRQAPGKQREFVAAIRWSGGYTYT DSVKGRFTISRDNNAKNTVYLQMNSLKPEDTA VYYCAATYLSSDYSRYALPQRPLDYDYWGQ GTQVTVSSLE
C1- C101A/C1 04A	19	QVQLQESGGGSVQAGGSLRLSCTAPGYTDSN YYMSWFRQAPGKEREWVAGVNTGRGSTSY ADSVKGRFTISQDNAKNTMFLQMNSLKPEDT AIYYCAVAAAHFADSLPKTQDEYILWGQGTQ VTVSSAAAYPYDVPDYGSC
C2- A54(FSY)	20	EVQLVESGGGLVQPGGSLTLSCAASRFMISEY SMHWVRQAPGKGLEWVSTINPXGTTDYAES VKGRFTISRDNNAKNTLYLQMNSLKPEDTAVY YCDGYGYRGQGTQVTVSS
C6	21	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNK YAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYAT YYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTE DTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGTLV TVSS
C7	22	EVQLVESGGGLVQPGESLTLSCVAVGSIFSFA MSWYRQAPGKERELVARIGSDDRVTYADSV KGRFTISRDNNAKNTAGLQMNSLKPEDTAVYY CNAQTDLRDWTVREYWGQGTQVTVSSSPST PPTPSPSTPP
C8	23	QVQLQESGGGLVQTGGSLRLSAAASGSIFVG NAMGWYRQALGNQRELVAGITSDGITYYPD SVKGRFTISRDNNAKNTIYLQMNSLKPEDTAV YYCNLWPPRIGFASWGQGTQVTVSSAAAYP YDVPDYGS
C9	24	QVQLVQSGGGLVQAGGSLRLSCAFSGRTFSM YTMGWFRQAPGKEREFVAANRGRGLSPDIA DSVNGRFTISRDNNAKNTLYLQMDSLKPEDTA VYYCAADLQYGSSWPQRSSAEYDYWGQGT VTVSS
C10	25	QVQLVQSGGGLVQAGGSLRLSCAPSGSIFGIR TMDWYRQAPGKERELVARITMDGRVFHADS VKGRFSGSRDGASNAVYLMNSLKPDDTAV YYCRYSGLTREDYWGPGTQVTVSS
C11	26	QVQLVQSGGGLVHPGGSLRLSAAASGIDLSL YRMRWYRQAPGKERDLVALITDDGTSYYED

10

20

30

40

【 0 1 3 4】

50

【表 1 - 3】

		SVKGRFTITRDNP SNKVFLQMNSLKPEDTAV YYCNAETPLSPVNYWGQGTQVTVS
C12	27	EVQLLES GGG EVQPGGSLRLSCAASETFGVV FTLGWYRQAPGK GREFVARVTGTD TVDYAE SVKGRFTISSDFARNTVYLQMNSLRAEDTAV YYCNTGAYWGQGT LTVKPSPTPTPSPSTP P
C14	28	QVQLVES GGG SVQAGGSLRLSCAASGDTYGS YWMGWFRQAPGKEREGVAAINRGGGYTVY ADSVKGRFTISRDTAKNTVYLQMNSLRPDDT ADYYCAASGVLGGLHEDWFNYWGQGTQVT VSS
C15	29	MDLGKKLLEAARAGQDDEV RILMANGADV NAHDFYGITPLHLAANFGHLEIVEVLLKHGA DVNAFDYDNTPLHLAADAGHLEIVEVLLKYG ADVNASDRDGHTPLHLAAREGHLEIVEVLLK NGADVNAQDKFGKTAFDISIDNGNEDLAEIL QKLAAALE
C16	30	RSDLGKKLLEAARAGQDDEV RILMANGADV NAKDEYGLTPLYLATAHGHLEIVEVLLKNGA DVNAVDAIGFTPLHLA AFIGHLEIAEVLLKHG ADVNAQDKFGKTAFDISIGNGNEDLAEILQKL NGS
C17	31	QVQLQES GGG SVQAGGSLKLTCAASGYIFNS CGMGWYRQSPGRERELVSRI SGDGD TWHKE SVKGRFTISQDNVKKTLYLQMNSLKPEDTAV YFCAVCYNLETYWGQGTQVT VSSSPSTPPTPS PSTPP
C17- 52FSY	32	QVQLQES GGG SVQAGGSLKLTCAASGYIFNS CGMGWYRQSPGRERELVSRI XGDGD TWHKE SVKGRFTISQDNVKKTLYLQMNSLKPEDTAV YFCAVCYNLETYWGQGTQVT VSSSPSTPPTPS PSTPP
C17_54(F SY)	33	QVQLQES GGG SVQAGGSLKLTCAASGYIFNS CGMGWYRQSPGRERELVSRI SGXGD TWHKE SVKGRFTISQDNVKKTLYLQMNSLKPEDTAV YFCAVCYNLETYWGQGTQVT VSSSPSTPPTPS PSTPP
C18	34	EVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTSSK YAMGWFRQAPGKGTEFVATISWSDGSTYYA DSVEGRFTISRDN AKNTVYLQMNSLKPEDTA VYYCAA AVDVL AGTFEYDYWGQGT LVT VSSSPSTPPTPSPSTPP
C19	35	QVKLEES GGG SVQTGGSLRLTCAASGRTSRS YGMGWFRQAPGKSREFVSGISWRGDSTGYA DSVKGRFTISRDN AKNTVDLQMNSLKPEDTA IYYCAA AAGSAWYGTRYEYDYWGQGTQVT VSS
C19_109(FSY)	36	QVKLEES GGG SVQTGGSLRLTCAASGRTSRS YGMGWFRQAPGKSREFVSGISWRGDSTGYA

10

20

30

40

【 0 1 3 5】

50

【表 1 - 4】

		DSVKGRFTISRDNKNTVDLQMNSLKPEDTA IYYCAAAAGSAWYGTRXEYDYWGQGTQVT VSS
C20	37	QVTLRESGGGLVQAGGSLRLSCKGSGRAINT YAMGWFRQAPGKEREVAAISWNGGHTRYA DSVQGRFAISRDNADNTMYLQMNSLKPEDT AVYHCAAYSYHRIATMEADADSWGQGTQ VTV
C21	38	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASDFTFRN YEMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGGSTYYA HSLKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAI YYCARLRDGFNNGFDYWGQGTQVTVSSLPE TGGSPSTPPTPSPSTPP
C22-TYR	39	MGQVKLEESGGGSVQTGGSLRLTCAASGRTS RSYGMGWFRQAPGKSREFVSGISWRGDSTG YADSVKGRFTISRDNKNTVDLQMNSLKPED TAIYYCAAAAGSAWYGTRYEYDYWGQGTQ VTVSSLPETGGSPSTPPTPSPSTPP
C22-FSY	40	MGQVKLEESGGGSVQTGGSLRLTCAASGRTS RSYGMGWFRQAPGKSREFVSGISWRGDSTG YADSVKGRFTISRDNKNTVDLQMNSLKPED TAIYYCAAAAGSAWYGTRXEYDYWGQGTQ VTVSSLPETGGSPSTPPTPSPSTPP
C23-TYR	41	MGQVKLEESGGGSVQTGGSLRLTCAASGRTS RSYGMGWFRQAPGKSREFVSGISWRGDSTG YADSVKGRFTISRDNKNTVDLQMNSLKPED TAIYYCAAAAGSAWYGTRYEYDYWGQGTQ VTVSSLPETGGG-(AF680)
C23-FSY	42	MGQVKLEESGGGSVQTGGSLRLTCAASGRTS RSYGMGWFRQAPGKSREFVSGISWRGDSTG YADSVKGRFTISRDNKNTVDLQMNSLKPED TAIYYCAAAAGSAWYGTRXEYDYWGQGTQ VTVSSLPETGGG-(AF680)
C24	43	QVQLQESGGGSVEAGGSLRLSCARSGWPYST YSMNWFRQAPGKEREAVAGISSTMSGIIFAES KAGQFTISQDNAKNTVYLQMNNLKPEDTAIY YCAARRYFSLSSSSDDFDYWGQGTQVTVSSA AAYPYDVPDYGS
C24-FSY	44	QVQLQESGGGSVEAGGSLRLSCARSGWPYST YSMNWFRQAPGKEREAVAGISSTMSGIIFAES KAGQFTISQDNAKNTVYLQMNNLKPEDTAIY YCAARRXFSLSSSSSDDFDYWGQGTQVTVSSA AAYPYDVPDYGS
C25- 54TYR	45	EVQLVESGGGLVQPGGSLTLSCAASRFMISEY SMHWVRQAPGKGLEWVSTINPYGTTDYAES VKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLKPEDTAVY YCDGYGYRGQGTQVTVSSSPSTPPTPSPSTPP C
C25- 54FSY	46	EVQLVESGGGLVQPGGSLTLSCAASRFMISEY SMHWVRQAPGKGLEWVSTINPXGTTDYAES VKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLKPEDTAVY

10

20

30

40

【 0 1 3 6 】

50

【表 1 - 5】

		YCDGYGYRGQGTQVTVSSSPSTPPTSPSTPP C
C26	47	EVQLVESGGGLVQPGGSLTSCAASRFMISEY SMHWVRQAPGKGLEWVSTINPYGTTDYAES VKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLKPEDTAVY YCDGYGYRGQGTQVTVSSSPSTPPTSPSTPP CHHHHHH-(PEG8-VC-PABC-MMAE)
C26-54 FSY	48	EVQLVESGGGLVQPGGSLTSCAASRFMISEY SMHWVRQAPGKGLEWVSTINPXGTTDYAES VKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLKPEDTAVY YCDGYGYRGQGTQVTVSSSPSTPPTSPSTPP CHHHHHH-(PEG8-VC-PABC-MMAE)
C27- 101TYR	49	QVQLQESGGGSVEAGGSLRLSCARSGWPYST YSMNWFRQAPGKEREAVAGISSTMSGIIFAES KAGQFTISQDNAKNTVYLQMNNLKPEDTAIY YCAARRYFSLSSSSDDFDYWGQGTQVTVSSA AAYPYDVPDYGSSPSTPPTSPSTPPC
C27- 101FSY	50	QVQLQESGGGSVEAGGSLRLSCARSGWPYST YSMNWFRQAPGKEREAVAGISSTMSGIIFAES KAGQFTISQDNAKNTVYLQMNNLKPEDTAIY YCAARRXFSLSSSSDDFDYWGQGTQVTVSSA AAYPYDVPDYGSSPSTPPTSPSTPPC
C28	51	QVQLQESGGGSVEAGGSLRLSCARSGWPYST YSMNWFRQAPGKEREAVAGISSTMSGIIFAES KAGQFTISQDNAKNTVYLQMNNLKPEDTAIY YCAARRYFSLSSSDDFDYWGQGTQVTVSSA AAYPYDVPDYGSSPSTPPTSPSTPPCHHHHH H-(PEG8-VC-PABC-MMAE)
C28-101 FSY/TYR	52	QVQLQESGGGSVEAGGSLRLSCARSGWPYST YSMNWFRQAPGKEREAVAGISSTMSGIIFAES KAGQFTISQDNAKNTVYLQMNNLKPEDTAIY YCAARRXFSLSSSSDDFDYWGQGTQVTVSSA AAYPYDVPDYGSSPSTPPTSPSTPPCHHHHH H-(PEG8-VC-PABC-MMAE)
C29-TYR	53	QVQLQESGGGSVEAGGSLRLSCARSGWPYST YSMNWFRQAPGKEREAVAGISSTMSGIIFAES KAGQFTISQDNAKNTVYLQMNNLKPEDTAIY YCAARRYFSLSSSDDFDYWGQGTQVTVSSA AAYPYDVPDYGSLPETGGSPSTPPTSPSTPP
C29-FSY	54	QVQLQESGGGSVEAGGSLRLSCARSGWPYST YSMNWFRQAPGKEREAVAGISSTMSGIIFAES KAGQFTISQDNAKNTVYLQMNNLKPEDTAIY YCAARRXFSLSSSSDDFDYWGQGTQVTVSSA AAYPYDVPDYGSLPETGGSPSTPPTSPSTPP
C30-TYR	55	QVQLQESGGGSVEAGGSLRLSCARSGWPYST YSMNWFRQAPGKEREAVAGISSTMSGIIFAES KAGQFTISQDNAKNTVYLQMNNLKPEDTAIY YCAARRYFSLSSSDDFDYWGQGTQVTVSSA AAYPYDVPDYGSLPETGGG-(AF680)
C30-FSY	56	QVQLQESGGGSVEAGGSLRLSCARSGWPYST YSMNWFRQAPGKEREAVAGISSTMSGIIFAES

10

20

30

40

【 0 1 3 7 】

50

【表 1 - 6】

		KAGQFTISQDNAKNTVYLQMNNLKPEDTAIY YCAARRXFSLSSSDDFDYWGQGTQVTVSSA AAYPYDVPDYGSLPETGGG-(AF680)
C32- 52TYR	57	QVQLQESGGGSVQAGGSLKLTCAASGYIFNS CGMGWYRQSPGRERELVSRIYGDGDTWHKE SVKGRFTISQDNVKKTLYLQMNSLKPEDTAV YFCAVCYNLETYWGQGTQVTVSSAAAYPYD VPDYGSLPETGGSPSTPPTPSPSTPP
C32- 52FSY	58	QVQLQESGGGSVQAGGSLKLTCAASGYIFNS CGMGWYRQSPGRERELVSRIYGDGDTWHKE SVKGRFTISQDNVKKTLYLQMNSLKPEDTAV YFCAVCYNLETYWGQGTQVTVSSAAAYPYD VPDYGSLPETGGSPSTPPTPSPSTPP
C32- 54TYR	59	QVQLQESGGGSVQAGGSLKLTCAASGYIFNS CGMGWYRQSPGRERELVSRIYGDGDTWHKE SVKGRFTISQDNVKKTLYLQMNSLKPEDTAV YFCAVCYNLETYWGQGTQVTVSSAAAYPYD VPDYGSLPETGGSPSTPPTPSPSTPP
C32- 54FSY	60	QVQLQESGGGSVQAGGSLKLTCAASGYIFNS CGMGWYRQSPGRERELVSRIYGDGDTWHKE SVKGRFTISQDNVKKTLYLQMNSLKPEDTAV YFCAVCYNLETYWGQGTQVTVSSAAAYPYD VPDYGSLPETGGSPSTPPTPSPSTPP
C33- 52TYR	61	QVQLQESGGGSVQAGGSLKLTCAASGYIFNS CGMGWYRQSPGRERELVSRIYGDGDTWHKE SVKGRFTISQDNVKKTLYLQMNSLKPEDTAV YFCAVCYNLETYWGQGTQVTVSSAAAYPYD VPDYGSLPETGGG-(PEG8-vc-PABC-MMAE)
C33- 52FSY	62	QVQLQESGGGSVQAGGSLKLTCAASGYIFNS CGMGWYRQSPGRERELVSRIYGDGDTWHKE SVKGRFTISQDNVKKTLYLQMNSLKPEDTAV YFCAVCYNLETYWGQGTQVTVSSAAAYPYD VPDYGSLPETGGG-(PEG8-vc-PABC-MMAE)
C33- 54TYR	63	QVQLQESGGGSVQAGGSLKLTCAASGYIFNS CGMGWYRQSPGRERELVSRIYGDGDTWHKE SVKGRFTISQDNVKKTLYLQMNSLKPEDTAV YFCAVCYNLETYWGQGTQVTVSSAAAYPYD VPDYGSLPETGGG-(PEG8-vc-PABC-MMAE)
C33- 54FSY	64	QVQLQESGGGSVQAGGSLKLTCAASGYIFNS CGMGWYRQSPGRERELVSRIYGDGDTWHKE SVKGRFTISQDNVKKTLYLQMNSLKPEDTAV YFCAVCYNLETYWGQGTQVTVSSAAAYPYD VPDYGSLPETGGG-(PEG8-vc-PABC-MMAE)
C34	65	EVQLVESGGGLVQPGGSLTLSCAASRFMISEY SMHWVRQAPGKGLEWVSTINPYGTTDYAES VKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLKPEDTAVY YCDGYGYRGQGTQVTVSSGGGGSGGGSGG GGSQVQLQESGGGSVEAGGSLRLSCARSGWP YSTYSMNWFRQAPGKEREAVAGISSTMSGIIF AESKAGQFTISQDNAKNTVYLQMNNLKPEDT AIYYCAARRYFSLSSSSDDFDYWGQGTQVTV

10

20

30

40

【 0 1 3 8 】

50

【表 1 - 7】

		SSAAAYPYDVPDYGSLPETGGSPSTPPTPSPST PP
C34-FSY	66	EVQLVESGGGLVQPGGSLTLSCAASRFMISEY SMHWVRQAPGKGLEWVSTINPYGTTDYAES VKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLKPEDTAVY YCDGYGYRGQGTQVTVSSGGGGSGGGGSGG GGSQVQLQESGGGSVEAGGSLRLSCARSGWP YSTYSMNWFRQAPGKEREAVAGISSTMSGIIF AESKAGQFTISQDNAKNTVYLYQMNNLKPEDT AIYYCAARRXFSLSSSSDDFDYWGQGTQVTV SSAAAYPYDVPDYGSLPETGGSPSTPPTPSPST PP
C35	67	QVQLQESGGGSVEAGGSLRLSCARSGWPYST YSMNWFRQAPGKEREAVAGISSTMSGIIFAES KAGQFTISQDNAKNTVYLYQMNNLKPEDTAIY YCAARRYFSLSSSSDDFDYWGQGTQVTVSSG GGSGGGGSGGGGSQVQLQESGGGSVEAGG SLRLSCARSGWPYSTYSMNWFRQAPGKERE AVAGISSTMSGIIFAESKAGQFTISQDNAKNT VYLYQMNNLKPEDTAIYYCAARRYFSLSSSSD DFDYWGQGTQVTVSSAAAYPYDVPDYGSLP ETGGSPSTPPTPSPSTPP
C36-FSY	68	QVQLQESGGGSVEAGGSLRLSCARSGWPYST YSMNWFRQAPGKEREAVAGISSTMSGIIFAES KAGQFTISQDNAKNTVYLYQMNNLKPEDTAIY YCAARRXFSLSSSSDDFDYWGQGTQVTVSSG GGSGGGGSGGGGSQVQLQESGGGSVEAGG SLRLSCARSGWPYSTYSMNWFRQAPGKERE AVAGISSTMSGIIFAESKAGQFTISQDNAKNT VYLYQMNNLKPEDTAIYYCAARRXFSLSSSSD DFDYWGQGTQVTVSSAAAYPYDVPDYGSLP ETGGSPSTPPTPSPSTPP
C37 TYR または FSY	69	QVKLEESGGGSVQTGGSLRLTCAASGRTSRS YGMGWFRQAPGKEREFVSGISWRGDSTGYA DSVKGRFTISRDNAKNTVDLQMNSLKPEDTA IYYCAAAAGSAWYGTLYXEYDYWGQGTQVT VSSGGGSGGGGSQVQLQESGGGLVQPGGSL RLSCAASGRTFSSYAMGWFRQAPGKQREFV AAIRWSGGYTYTDSVKGRFTISRDNAKTTV YLQMNSLKPEDTAVYYCAATYLSSDYSRYA LPQRPLDYDYWGQGTQVTVSSLE
C38 C15- C16_66 wt または FSY)	70	MDLGKKLLEAARAGQDDEVRLMANGADV NAHDFYGITPLHLAANFGHLEIVEVLLKHGA DVNAFYDNTPLHLAADAGHLEIVEVLLKYG ADVNASDRDGHTPLHLAAREGHLEIVEVLLK NGADVNAQDKFGKTAFDISIDNGNEDLAEIL QKLGGGGSRSDLGKKLLEAARAGQDDEVRL MANGADVNAKDEYGLTPLYLATAHGHLEIV EVLLKNGADVNAVDAIGFTPLHLAAFIGHLEI AEVLLKHGADVNAQDKFGKTAFDISIGNGNE DLAEILQKLNGS

10

20

30

40

【 0 1 3 9 】

50

【表 1－8】

C39	71	QVQLQESGGGSVQAGGSLRLSCTAPGYTDSN YYMSWFRQAPGKEREWVAGVNTGRGSTSY ADSVKGRFTISQDNAKNTMFLQMNSLKPEDT AIYYCAVAAAHFADSLPKTQDEYILWGQGTQ VTVSSAAAYPYDVPDYGS
C40	72	QVQLQESGGGSVQAGGSLRLSCTAPGYTDSN YYMSWFRQAPGKEREWVAGVNTGRGSTSY ADSVKGRFTISQDNAKNTMFLQMNSLKPEDT AIYYCAVAAAHFADSLPKTQDEYILWGQGTQ VTVSSAAAYPYDVPDYGSGGGGSGGGGSQV QLQESGGGSVQAGGSLRLSCTAPGYTDSNYY MSWFRQAPGKEREWVAGVNTGRGSTSYADS VKGRFTISQDNAKNTMFLQMNSLKPEDTAIY YCAVAAAHFADSLPKTQDEYILWGQGTQVT VSSAAAYPYDVPDYGS

10

XはF S Y 取り込み部位の位置を示す。H i s 6 精製タグおよび／またはP e l B リーダー配列を有する表中の配列もまた、本明細書において具体化される。

【0 1 4 0】

20

いくつかの例では、本明細書に記述されたコンジュゲートに関連したD N A 配列は、表2にある。

【0 1 4 1】

30

40

50

【表 2 - 1】

表 2: DNA 配列

名称	配列 番号	配列
C1	73	CTTTAAGAAGGAGATATACATATGAAGTAT TTGTTGCCTACAGCGGCTGCCGGATTACTTC TGCTTGCCGCACAGCCAGCGATGGCCCAAG TCCAAGTCAAGAGTCGGGTGGCGGCTCTG TTCAAGCGGGAGGCTCCTTGCGCTTGAGCT GTACCGCTCCTGGGTACACAGACAGTAATT ATTATATGAGCTGGTTCGCGCAAGCGCCCG GTAAAGAACGTGAATGGGTAGCTGGTGTGA ACACAGGACGCGGGTCGACATCCTACGCGG ACAGTGTTAAAGGTCGCTTCACAATCTCGC AAGATAACGCTAAGAACACAATGTTCTTGC AAATGAACTCGCTTAAGCCAGAAGATACTG CTATTTACTACTGCGCTGTAGCCGCTGCCA CTTCTGTGATAGTCTTCCAAAGACTCAAGAC GAGTACATTTTATGGGGCCAGGGCACTCAA GTCACAGTTTCGAGCGCCGCCGCATACCCA TACGACGTCCCAGACTATGGCTCTCATCATC ACCATCACCAT _{Taa} AAGCTTGGCTGTTTGGC GGATGAGAGAAG
C2	74	CTTTAAGAAGGAGATATACATATGAAGTAT TTATTACCTACAGCGGCAGCAGGGTTATTGT TATTGGCCGCGCAGCCCGCAATGGCTGAAG TTCAACTTGTTGAGAGCGGGGGCGGATTGG TACAGCCGGGGGGGTCACTTACCTTATCAT GTGCAGCATCGCGCTTCATGATCTCAGAAT ACAGTATGCATTGGGTTCGTCAAGCGCCGG GGAAAGGTCTTGAGTGGGTAGTACCATCA ACCCAGCCGGAACCACTGATTACGCGGAAA GCGTGAAGGGCCGTTTTACCATCTCCCGCG ACAATGCTAAAAATACTTTATACTTACAGA TGAACAGTTTGAAACCCGAAGATACGGCGG TGTACTACTGTGACGGGTACGGCTATCGTG GCCAAGGAACACAAGTTACTGTATCCTCTC ATCATCATCACCATCAC _{Taa} AAGCTTGGCTGT TTTGGCGGATGAGAG
C3	75	CTTTAAGAAGGAGATATACATATGAAGTAC CTTCTGCCGACTGCCGCTGCAGGTTTGTGTG TATTGGCCGCTCAACCAGCGATGGCCCAGG TACAGCTGCAAGAAAGTGGTGGTGGTAGCG TAGAGGCGGGTGGGTCTTTACGTCTGTCGT GCGCTCGTTCGGGTGGCCCTACTCAACGTA TAGTATGAATTGGTTCGTCAGGCCCCCGGT AAAGAACGTGAGGCAGTCGCGGGGATTTTCG TCAACGATGTCTGGGATTATCTTTGCCGAGT CCAAAGCTGGACAGTTCACTATTAGCCAAG

【 0 1 4 2 】

10

20

30

40

【表 2 - 2】

		ATAACGCCAAGAACACAGTGTATCTTCAGA TGAATAACCTGAAACCGGAAGACACCGCAA TTTACTACTGCGCAGCGCGCCGTGACTACTC CTTGTCTTCGAGCTCGGACGATTTTCGATTAT TGGGGTCAGGGGACCCAAGTCACTGTGAGT TCCGCCGCAGCATATCCGTATGATGTACCC GATTACGGCTCGCACCACCATCATCACCATt aaAAGCTTGGCTGTTTTGGCGG
C4	76	CTTTAAGAAGGAGATATACATATGAAATAC CTGCTGCCGACCGCTGCTGCTGGTCTGCTGC TCCTCGCTGCCAGCCGGCGATGGCCATGG GCCAAGTAAAACTAGAGGAATCAGGTGGA GGGTCCGTGCAAACCGGTGGCAGTCTCCGT TTGACCTGTGCTGCGAGCGGCCGTACCAGC CGCAGCTACGGCATGGGTTGGTTTCGTGTCAG GCACCGGGTAAGGAGCGCGAGTTCGTGTCC GGCATCAGCTGGCGTGGTGACAGCACGGGC TATGCGGATAGCGTTAAAGGTCGCTTCACC ATTTCTCGTGATAATGCAAAGAACACCGTT GATCTGCAAATGAACAGCCTGAAACCGGAA GACACCGCTATCTACTACTGCGCCGCGGCG GCGGGTTCTGCCTGGTATGGCACTCTGTATG AATACGACTACTGGGGTCAGGGTACGCAGG TTACCGTCTCGTCCCATCATCACCACCACCA CTAAAAGCTTGGCTGTTTTGGCGGATGAGA G
C4_109	77	CTTTAAGAAGGAGATATACATATGAAATAC CTGCTGCCGACCGCTGCTGCTGGTCTGCTGC TCCTCGCTGCCAGCCGGCGATGGCCATGG GCCAAGTAAAACTAGAGGAATCAGGTGGA GGGTCCGTGCAAACCGGTGGCAGTCTCCGT TTGACCTGTGCTGCGAGCGGCCGTACCAGC CGCAGCTACGGCATGGGTTGGTTTCGTGTCAG GCACCGGGTAAGGAGCGCGAGTTCGTGTCC GGCATCAGCTGGCGTGGTGACAGCACGGGC TATGCGGATAGCGTTAAAGGTCGCTTCACC ATTTCTCGTGATAATGCAAAGAACACCGTT GATCTGCAAATGAACAGCCTGAAACCGGAA GACACCGCTATCTACTACTGCGCCGCGGCG GCGGGTTCTGCCTGGTATGGCACTCTGTAG GAATACGACTACTGGGGTCAGGGTACGCAG GTTACCGTCTCGTCCCATCATCACCACCACC ACTAAAAGCTTGGCTGTTTTGGCGGATGAG AG
C8	78	CTTTAAGAAGGAGATATACATATGAAATAC TTACTTCCAACAGCAGCCGCAGGATTATTA CTGTTGGCCGCTCAGCCTGCAATGGCTCAA GTGCAGTTACAAGAAAGCGGGGGCGGACTT GTGCAAAACAGGAGGGAGTCTGCGTCTTTCC TGTGCGGCGAGTGGGTCGATCTTCGTTGGA AATGCGATGGGCTGGTATCGCCAAGCCTTG

10

20

30

40

【 0 1 4 3 】

【表 2 - 3】

		GGTAATCAACGTGAATTAGTCGCAGGGATC ACGTCCGATGGGATCACATACTACCCGGAT TCAGTTAAGGGCCGCTTTACAATCTCTCGTG ATAACGATAAAAAACAGATTTACTTACAAA TGAATAGTTTAAAACCAGAGGATACCGCTG TTTACTACTGCAACCTGTGGCCCCCTCGTAT CGGGTTCGCCTCCTGGGGACAAGGAACTCA AGTGACGGTCTCGAGTGCTGCCGCTTACCCT TACGACGTACCGGATTACGGGTTCGCATCAT CATCATCACCCTAAAAGCTTGGCTGTTTTG GCGGATGAGAG
C9	79	CTTTAAGAAGGAGATATACATATGAAATAC TTATTACCTACCGCTGCAGCGGGGCTGTTGT TGTTGGCCGCCAGCCAGCAATGGCTATGG CGCAAGTCCAATTAGTTCAATCAGGCGGGG GGTTGGTCCAGGCGGGGGGATCCTTACGTC TGTCATGTGCTTTCAGTGGCCGCACGTTCTC AATGTACACGATGGGGTGGTTTCGTCAAGC TCCGGGGAAGAAGCGCGAGTTTGTGGCCGC AAATCGCGGACGTGGGTAAAGTCCCGACAT TGCTGACAGTGTTAATGGACGCTTACCATT TCACGCGACAATGCTAAGAATACTCTTTAC CTTCAGATGGACTCTCTGAAACCAGAGGAC ACCGCCGTATATTATTGCGCCGCAGACTTAC AGTACGGGTCATCATGGCCTCAACGTTTCGT CTGCTGAATATGATTACTGGGGGCAAGGAA CGACAGTCACTGTATCCTCGCATCACCACC ATCACCAT _{taa} AAGCTTGGCTGTTTTGGCGGA TGAGAG
pBAD_f wd	80	CTTGGCTGTTTTGGCGGATGAGAGAAGATT TTCAGCCTGATACAG
pBAD_re v	81	GTATATCTCCTTCTTAAAGTTAAACAAAATT ATTTCTAGCCCCAAAAAACGGGTATGGAG
pBAD- C8	82	AAGAAACCAATTGTCCATATTGCATCAGAC ATTGCCGTCACTGCGTCTTTTACTGGCTCTT CTCGCTAACCAAACCGGTAACCCCGCTTATT AAAAGCATTCTGTAACAAAGCGGGACCAAA GCCATGACAAAAACGCGTAACAAAAGTGTC TATAATCACGGCAGAAAAGTCCACATTGAT TATTTGCACGGCGTCACACTTTGCTATGCCA TAGCATTTTTATCCATAAGATTAGCGGATCC TACCTGACGCTTTTTATCGCAACTCTCTACT GTTTCTCCATACCCGTTTTTTTGGGCTAGAA ATAATTTTGTTAACTTTAAGAAGGAGATAT ACATATGAAATACTTACTTCCAACAGCAGC CGCAGGATTATTACTGTTGGCCGCTCAGCCT GCAATGGCTCAAGTGCAGTTACAAGAAAGC GGGGGCGGACTTGTGCAAACAGGAGGGAG TCTGCGTCTTTCCTGTGCGGCGAGTGGGTCTG ATCTTCGTTGGAAATGCGATGGGCTGGTAT CGCCAAGCCTTGGGTAATCAACGTGAATTA

10

20

30

40

【 0 1 4 4 】

50

【表 2 - 4】

	GTCGCAGGGATCACGTCCGATGGGATCACA TACTACCCGGATTTCAGTTAAGGGCCGCTTTA CAATCTCTCGTGATAACGATAAAAAACACGA TTTACTTACAAATGAATAGTTTAAAACCAG AGGATACCGCTGTTTACTACTGCAACCTGTG GCCCCCTCGTATCGGGTTCGCCTCCTGGGGA CAAGGAACTCAAGTGACGGTCTCGAGTGCT GCCGCTTACCCTTACGACGTACCGGATTAC GGGTGCGATCATCATCATCACCCTAAAAG CTTGGCTGTTTTGCGCGATGAGAGAAGATT TTCAGCCTGATACAGATTAAATCAGAACGC AGAAGCGGTCTGATAAAACAGAATTTGCCT GGCGGCAGTAGCGCGGTGGTCCACCTGAC CCCATGCCGAACCTCAGAAGTGAAACGCCGT AGCGCCGATGGTAGTGTGGGGTCTCCCAT GCGAGAGTAGGGAAGTCCAGGCATCAAAT AAAACGAAAGGCTCAGTCGAAAGACTGGG CCTTTCGTTTTATCTGTTGTTTGTGCGGTGAA CGCTCTCCTGAGTAGGACAAATCCGCCGGG AGCGGATTTGAACGTTGCGAAGCAACGGCC CGGAGGGTGGCGGGCAGGACGCCCCGCCATA AACTGCCAGGCATCAAATTAAGCAGAAGGC CATCCTGACGGATGGCCTTTTTGCGTTTCTA CAAATCTTTTTGTTTATTTTTCTAAATACAT TCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAA CCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAA AGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGT GTCGCCCTTATCCCTTTTTTGCGGCATTTTG CCTTCCTGTTTTTGCTCAGGAGAAACGCTG GTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTG GGTGACGAGTGGGTACATCGAACTGGAT CTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTT CGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGC ACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTAT TATCCCGTGTTGACGCCGGCAAGAGCAAC TCGGTCGCCGCATACACTATTCTCAGAATG ACTTGTTGAGTACTCACCAGTCACAGAAA AGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAG AATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTG ATAACACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAA CGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTT TTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAACCTC GCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATG AAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCA CGATGCCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGC GCAAACATTAACCTGGCGAACTACTTACTCT AGCTTCCCGCAACAATTAATAGACTGGAT GGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCT GCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATT GCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGG TCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCA
--	---

10

20

30

40

【 0 1 4 5 】

50

【表 2 - 5】

	GATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCT ACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATG AACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTG CCTCACTGATTAAGCATTGGTAACTGTCAG ACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGA TTTAAACTTCATTTTAAATTTAAAAGGATC TAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGA CCAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTCGTTCCA CTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAA AGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTCTGCGC GTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAACCA CCGCTACCAGCGGTGGTTTGTGCGCGATC AAGAGCTACCAACTCTTTTCCGAAGGTAA CTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATA CTGTCCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCA CCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTAC ATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCACTG GCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTT ACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCG GATAAGGCGCAGCGGTCGGGCTGAACGGG GGGTTCGTGCACACAGCCCAGCTTGGAGCG AACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACA GCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCC CGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGG TAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGC ACGAGGGAGCTTCCAGGGGAAACGCCTGG TATCTTTATAGTCCTGTCGGGTTTCGCCACC TCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTC GTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACG CCAGCAACGCGGCCTTTTACGGTTCCTGGC CTTTTGCTGGCCTTTGCTCACATGTTCTTTC CTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAACCG TATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCT CGCCGCAGCCGAACGACCGAGCGCAGCGA GTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCC TGATGCGGTATTTTCTCCTTACGCATCTGTG CGGTATTTACACCGCATATCGTGCACTCTC AGTACAATCTGCTCTGATGCCGCATAGTTA AGCCAGTATACACTCCGCTATCGCTACGTG ACTGGGTCATGGCTGCGCCCCGACACCCGC CAACACCCGCTGACGCGCCCTGACGGGCTT GTCTGCTCCCGGCATCCGCTTACAGACAAG CTGTGACCGTCTCCGGGAGCTGCATGTGTC AGAGGTTTTACCGTTCATCACCGAAACGCG CGAGGCAGCAGATCAATTCGCGCGCGAAGG CGAAGCGGCATGCATAATGTGCCTGTCAAA TGGACGAAGCAGGGATTCTGCAAACCTAT GCTACTCCGTCAAGCCGTCAATTGTCTGATT CGTTACCAATTATGACAACTTGACGGCTAC ATCATTCACTTTTCTTCAACCGGCACGG AACTCGCTCGGGCTGGCCCCGGTGCATTTTT
--	--

10

20

30

40

【 0 1 4 6 】

50

【表 2 - 6】

		TAAATACCCGCGAGAAATAGAGTTGATCGT CAAAACCAACATTGCGACCGACGGTGGCGA TAGGCATCCGGGTGGTGCTCAAAAGCAGCT TCGCCTGGCTGATACGTTGGTCCTCGCGCCA GCTTAAGACGCTAATCCCTAACTGCTGGCG GAAAAGATGTGACAGACGCGACGGCGACA AGCAAACATGCTGTGCGACGCTGGCGATAT CAAAATTGCTGTCTGCCAGGTGATCGCTGA TGTA CTGACAAGCCTCGCGTACCCGATTATC CATCGGTGGATGGAGCGACTCGTTAATCGC TTCCATGCGCCGCAGTAACAATTGCTCAAG CAGATTTATCGCCAGCAGCTCCGAATAGCG CCCTTCCCCTTGCCCGGCGTTAATGATTTGC CCAAACAGGTCGCTGAAATGCGGCTGGTGC GCTTCATCCGGGCGAAAGAACCCCGTATTG GCAAATATTGACGGCCAGTTAAGCCATTCA TGCCAGTAGGCGCGCGGACGAAAGTAAACC CACTGGTGATAACCATTCGCGAGCCTCCGGA TGACGACCGTAGTGATGAATCTCTCCTGGC GGGAACAGCAAAATATCACCCGGTCGGCAA ACAAATTCTCGTCCCTGATTTTTTACCACCC CCTGACCGCGAATGGTGAGATTGAGAATAT AACCTTTCATTCCCAGCGGTCCGGTCGATAA AAAAATCGAGATAACCGTTGGCCTCAATCG GCGTTAAACCCGCCACCAGATGGGCATTAA ACGAGTATCCCGGCAGCAGGGGATCATTTT GCGCTTCAGCCATACTTTTCATACTCCCGCC ATTCAGAG	10
pBAD-C9	83	AAGAAACCAATTGTCCATATTGCATCAGAC ATTGCCGTCACTGCGTCTTTTACTGGCTCTT CTCGCTAACCAAACCGGTAACCCCGCTTATT AAAAGCATTCTGTAACAAAGCGGGACCAAA GCCATGACAAAAACGCGTAACAAAAGTGTC TATAATCACGGCAGAAAAGTCCACATTGAT TATTTGCACGGCGTCACACTTTGCTATGCCA TAGCATTTTTATCCATAAGATTAGCGGATCC TACCTGACGCTTTTTATCGCAACTCTCTACT GTTCTCCATAACCGTTTTTTTTGGGCTAGAA ATAATTTTGTTTAACTTTAAGAAGGAGATAT ACATATGAAATACTTATTACCTACCGCTGCA GCGGGGCTGTTGTTGTTGGCCGCCAGCCA GCAATGGCTATGGCGCAAGTCCAATTAGTT CAATCAGGCGGGGGGTTGGTCCAGGCGGGG GGATCCTTACGTCTGTCATGTGCTTTCAGTG GCCGCACGTTCTCAATGTACACGATGGGGT GGTTTCGTCAAGCTCCGGGGAAAGAACGCG AGTTTGTGGCCGCAATCGCGGACGTGGGT TAAGTCCCGACATTGCTGACAGTGTTAATG GACGCTTACCATTTCACGCGACAATGCTA AGAATACTCTTTACCTTCAGATGGACTCTCT GAAACCAGAGGACACCGCCGTATATTATG	20 30 40

【 0 1 4 7 】

【表 2 - 7】

	CGCCGCAGACTTACAGTACGGGTCATCATG GCCTCAACGTTTCGTCTGCTGAATATGATTAC TGGGGGCAAGGAACGACAGTCACTGTATCC TCGCATCACCACCATCACCATTAAAAGCTT GGCTGTTTTGGCGGATGAGAGAAGATTTTC AGCCTGATACAGATTAAATCAGAACGCAGA AGCGGTCTGATAAAACAGAATTTGCCTGGC GGCAGTAGCGCGGTGGTCCCACCTGACCCC ATGCCGAACCTCAGAAGTGAAACGCCGTAGC GCCGATGGTAGTGTGGGGTCTCCCCATGCG AGAGTAGGGAACTGCCAGGCATCAAATAAA ACGAAAGGCTCAGTCGAAAGACTGGGCCTT TCGTTTTATCTGTTGTTGTCTCGGTGAACGCT CTCCTGAGTAGGACAAATCCGCCGGGAGCG GATTTGAACGTTGCGAAGCAACGGCCCCGA GGGTGGCGGGCAGGACGCCCCGCCATAAACT GCCAGGCATCAAATTAAGCAGAAGGCCATC CTGACGGATGGCCTTTTTGCGTTTCTACAAA CTCTTTTGTTTATTTTTCTAAATACATTCAA TATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCTG ATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAA GAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTCGCC CTTATTCCCTTTTTTGCGGCATTTTGCCTTCC TGTTTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAA AGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGC ACGAGTGGGTACATCGAACTGGATCTCAA CAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTTCGCCC CGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTT AAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCC GTGTTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTC GCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGT TGAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATCT TACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATG CAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAACAC TGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGG AGGACCGAAGGAGCTAACCCTTTTTTGCA CAACATGGGGGATCATGTAACCTCGCCTTGA TCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCAT ACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCC TGTAAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAAC ATTAACCTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCC CGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCG GATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCG GCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATA AATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCG GTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTA AGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGAC GGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAA ATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCAC TGATTAAGCATTGGTAACTGTCAGACCAAG TTTACTCATATATACTTTAGATTGATTAA
--	--

10

20

30

40

【 0 1 4 8 】

50

【表 2 - 8】

	ACTTCATTTTTAATTTAAAAGGATCTAGGTG AAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAA TCCCTTAACGTGAGTTTTTCGTTCCACTGAGC GTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATC TTCTTGAGATCCTTTTTTCTGCGCGTAATCT GCTGCTTGCAAACAAAAAACACCGCTAC CAGCGGTGGTTTGGTTGCCGGATCAAGAGC TACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAAGTGGCTT CAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGTCTT TCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTC AAGAACTCTGTAGCACCGCTACATACCTC GCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTG CCAGTGGCGATAAGTTCGTGTCTTACCGGGT TGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGG CGCAGCGGTCGGGCTGAACGGGGGGTTCGT GCACACAGCCCAGCTTGGAGCGAACGACCT ACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGC TATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGA GAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGC AGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGA GCTTCCAGGGGGAAACGCCTGGTATCTTTA TAGTCCTGTCGGGTTTCGCCACCTCTGACTT GAGCGTCGATTTTGTGATGCTCGTCAGGG GGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAA CGCGGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGC TGGCCTTTTGCTCACATGTTCTTTCCTGCGTT ATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACC GCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGC AGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTG AGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCTGATGCG GTATTTTCTCCTTACGCATCTGTGCGGTATT TCACACCGCATATGGTGCCTCTCAGTACA ATCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAAGCCAGT ATACACTCCGCTATCGCTACGTGACTGGGTC ATGGCTGCGCCCCGACACCCGCCAACACCC GCTGACGCGCCCTGACGGGCTTGTCTGCTCC CGGCATCCGCTTACAGACAAGCTGTGACCG TCTCCGGGAGCTGCATGTGTGACAGGTTTTT ACCGTCATCACCGAAACGCGCGAGGCAGCA GATCAATTGCGCGCGGAAGGCGAAGCGGCA TGCATAATGTGCCTGTCAAATGGACGAAGC AGGGATTCTGCAAACCCTATGCTACTCCGTC AAGCCGTCAATTGTCTGATTTCGTTACCAATT ATGACAACCTTGACGGCTACATCATTCACTTT TTCTTCACAACCGGCACGGAACCTCGCTCGG GCTGGCCCCGGTGCATTTTTTAAATACCCGC GAGAAATAGAGTTGATCGTCAAACCAACA TTGCGACCGACGGTGGCGATAGGCATCCGG GTGGTGCTCAAAGCAGCTTCGCCTGGCTG ATACGTTGGTCCTCGCGCCAGCTTAAGACG CTAATCCCTAACTGCTGGCGAAAAGATGT	10 20 30 40
--	---	---

【 0 1 4 9 】

【表 2 - 9】

	GACAGACGCGACGGCGACAAGCAAACATG CTGTGCGACGCTGGCGATATCAAAATTGCT GTCTGCCAGGTGATCGCTGATGTACTGACA AGCCTCGCGTACCCGATTATCCATCGGTGG ATGGAGCGACTCGTTAATCGCTTCCATGCG CCGCAGTAACAATTGCTCAAGCAGATTTAT CGCCAGCAGCTCCGAATAGCGCCCTTCCCC TTGCCCCGGCGTTAATGATTTGCCCAAACAG GTCGCTGAAATGCGGCTGGTGCGCTTCATC CGGGCGAAAGAACCCCGTATTGGCAAATAT TGACGGCCAGTTAAGCCATTCATGCCAGTA GGCGCGCGGACGAAAGTAAACCCACTGGTG ATACCATTTCGCGAGCCTCCGGATGACGACC GTAGTGATGAATCTCTCCTGGCGGGAACAG CAAAATATCACCCGGTCGGCAAACAAATTC TCGTCCCTGATTTTTTCACCACCCCTGACCG CGAATGGTGAGATTGAGAATATAACCTTTC ATTCCCAGCGGTTCGGTCGATAAAAAAATCG AGATAACCGTTGGCCTCAATCGGCGTTAAA CCCGCCACCAGATGGGCATTAAACGAGTAT CCCGGCAGCAGGGGATCATTTTGCGCTTCA GCCATACTTTTCATACTCCCGCCATTCAGAG
--	--

10

20

【0150】

ペイロード

コンジュゲートはペイロードを含み得る。いくつかの例では、コンジュゲートに含まれた標的化ドメイン（例えば、単一の標的化ドメイン、第1の標的化ドメイン、第2の標的化ドメイン）は、ペイロードを標的に誘導し得る。いくつかの例では、標的化ドメイン（例えば、単一の標的化ドメイン、第1の標的化ドメイン、第2の標的化ドメイン）は、腫瘍細胞などの細胞にペイロードを誘導する抗体またはその断片を含む。いくつかの実施形態では、ペイロードは、造影剤、放射性リガンド剤または細胞傷害剤を含む。いくつかの実施形態では、細胞傷害性部分は、小分子薬、ペプチド、タンパク質、または化学療法薬を含む。いくつかの実施形態では、ペイロードは、放射性リガンド剤を含む。いくつかの実施形態では、放射リガンド剤は、 ^{35}S 、 ^3H 、 ^{111}In 、 ^{112}In 、 ^{14}C 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{32}P 、 ^{153}Sm 、 ^{177}Lu 、 ^{86}Y 、 ^{88}Y 、 ^{90}Y 、 ^{131}I 、 ^{123}I 、 ^{124}I 、 ^{125}I 、 ^{149}Tb 、 ^{211}At 、 ^{212}Pb ／ ^{212}Bi 、 ^{213}Bi 、 ^{223}Ra 、 ^{225}Ac 、 ^{64}Cu 、 ^{67}Cu 、および ^{227}Th からなる群から選ばれる。いくつかの実施形態では、放射性リガンド剤は、さらにキレート剤を含む。キレート剤の例には、DOTA、DOTAGA、NOTA、MACROPA、THP、およびTRAPが含まれる。いくつかの実施形態では、放射性リガンド剤は、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 ^{131}I 、 ^{201}Tl 、 ^{111}In 、および ^{67}Ga からなる群から選択される。いくつかの例では、造影剤は、染料を含む。いくつかの例では、コンジュゲートは、2つ以上のペイロードを含む。例えば、コンジュゲートは、組織浸透を視覚化するためのペイロード染料と、腫瘍を殺傷するためのペイロード化学療法剤とを含む。

30

40

【0151】

ペイロードは、コンジュゲートに付着され得る。ペイロードは、コンジュゲートに共有結合で付着され得る。いくつかの例では、ペイロードは、非天然アミノ酸（UAA）残基を介してコンジュゲートに付着しない。いくつかの実施形態では、ペイロードは、UAA残基からアミノ酸 $n+x$ （C末端に向かって）に付着している。いくつかの実施形態では

50

、付着部位は、非天然アミノ酸位置 n から x アミノ酸離れた位置として定義される。いくつかの実施形態では、ペイロードは、UAA 残基からアミノ酸 $n-x$ (N 末端に向かって) に付着している。いくつかの実施形態では、UAA 残基は、標的と接触する標的化ドメイン (例えば、単一標的化ドメインまたは第 1 もしくは第 2 の標的化ドメイン) の領域内またはその近傍に含まれる。いくつかの例では、ペイロードは、コンジュゲート中の非天然アミノ酸から少なくとも 2、5、10、20、25、30、40、50、60、70、80、90、100、または少なくとも 125 アミノ酸離れて付着する。

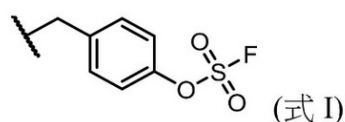
【0152】

非天然アミノ酸 (UAA)

非天然アミノ酸 (UAA) は、本明細書に記述されたコンジュゲートに組み込まれ得る。いくつかの例では、UAA 残基は、コンジュゲートの標的化ドメイン内にある。いくつかの例では、UAA は、共有結合で標的に結合するように構成される。いくつかの例では、UAA は、共有結合で標的内に存在するアミノ酸に結合するように構成される。いくつかの例では、コンジュゲートは 1、2、3、または 4 つ以上の UAA を含む。いくつかの例では、コンジュゲートは、第 1 の UAA を含む第 1 の標的化ドメインと、第 2 の UAA を含む第 2 の標的化ドメインとを含む。いくつかの例では、UAA は、標的化ドメイン (例えば、第 1 の標的化ドメインまたは第 2 の標的化ドメイン) 内に、標的化ドメインが標的に結びつく場合に、標的中に存在するアミノ酸を共有結合させるように構成される。いくつかの例では、このようなアミノ酸は、求核性アミノ酸 (nucleophilic amino acids) を含む。いくつかの例では、UAA 残基は、リジン、ヒスチジン、またはチロシンとの共有結合を形成する。いくつかの例では、UAA 残基は、標的結合ドメインに位置する。いくつかの例では、UAA は、いったんコンジュゲートに組み込まれると、抗体または抗原結合断片、例えば、単一ドメイン抗体を含む標的化ドメインなどの標的化ドメインの CDR に位置する。いくつかの実施形態では、UAA 残基は、アリールフルオロ硫酸塩部分を含む。いくつかの例では、UAA 残基は、本明細書に記載されたコンジュゲートへ遺伝学的にコードされる。いくつかの例では、UAA 残基は、チロシンまたはリジンの変異体を含む。いくつかの実施形態では、非天然アミノ酸残基は、式 I の構造：

【0153】

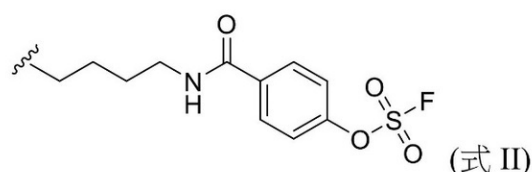
【化 77】



を含む。いくつかの実施形態では、非天然アミノ酸残基は、式 II の構造：

【0154】

【化 78】



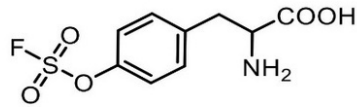
を含む。いくつかの実施形態では、UAA 残基は、本明細書に記載された UAA の組み込みからのものである。

いくつかの実施形態では、非天然アミノ酸は、2-アミノ-3-(4-(フルオロスル

ホニル) オキシ) フェニル) プロパン 酸 :

【 0 1 5 5 】

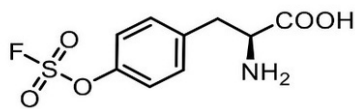
【 化 7 9 】



である。いくつかの実施形態では、非天然アミノ酸は、フルオロスルホニルチロシン (F S Y) : 10

【 0 1 5 6 】

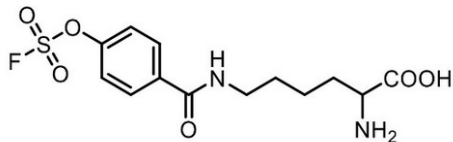
【 化 8 0 】



である。いくつかの実施形態では、非天然アミノ酸は、N 6 - (4 - ((フルオロスルホニル) オキシ) ベンゾイル) リシン : 20

【 0 1 5 7 】

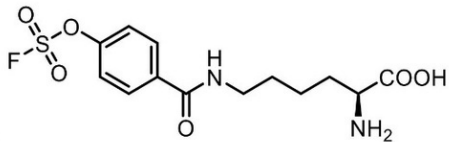
【 化 8 1 】



である。いくつかの実施形態では、非天然アミノ酸は、フルオロスルホニルオキシベンゾイル-L-リジン (F S K) : 30

【 0 1 5 8 】

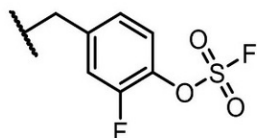
【 化 8 2 】



である。いくつかの実施形態では、非天然アミノ酸残基は、式 I I I の構造 :

【 0 1 5 9 】

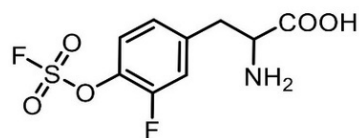
【 化 8 3 】



を含む。いくつかの実施形態では、非天然アミノ酸残基は、

【0160】

【化84】

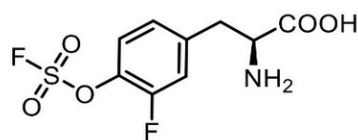


である。いくつかの実施形態では、非天然アミノ酸残基は、

10

【0161】

【化85】



(FFY)

である。

20

【0162】

いくつかの実施形態では、UAA残基の非天然アミノ酸(UAA)は式(IA)の構造：

(IA)

を有し、

式中、

Xはそれぞれ独立して、OまたはNR'であり、

Yは、結合、-O-、-NR-、または-N=であり、

Aは、結合または-(CH2)n-であり、mは1または2であり、nは1~4の整数

30

であり、
RおよびR'のそれぞれは、存在する場合、独立して、水素、置換もしくは非置換アルキル、置換もしくは非置換ヘテロアルキル、置換もしくは非置換アリール、置換もしくは非置換ヘテロアリール、または置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキルであり、

R¹は、水素、フルオロまたはヨードであり、R²は、水素またはメチルであり、

Lは、-(CH2)p-または-C(O)NH-(CH2)p-であり、pは1~6の整数であり、ならびに、

ここで、Yが-O-または-NR-である場合、mは1であり、Yが-N=である場合、mは2である。

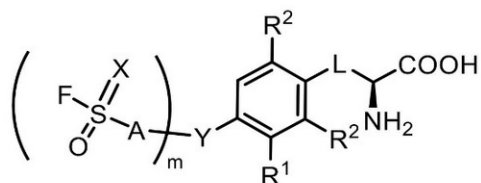
【0163】

いくつかの実施形態では、式(IA)のUAAは、式(IA-a)の構造：

40

【0164】

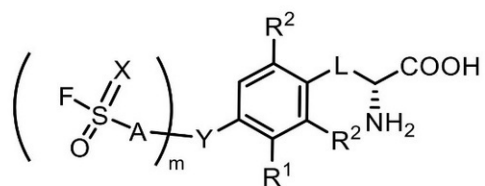
【化86】



を有する。いくつかの実施形態では、式 (I A) の U A A は、式 (I A - b) の構造：

【0165】

【化87】



10

を有する。

【0166】

いくつかの実施形態では、式 (I A) の U A A は、式 (I B) の構造：

【0167】

【化88】



20

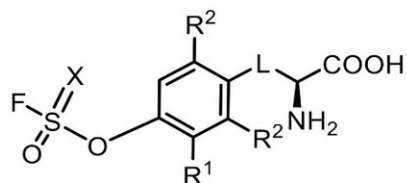
を有する。

【0168】

いくつかの実施形態では、式 (I B) の U A A は、式 (I B - a) の構造：

【0169】

【化89】

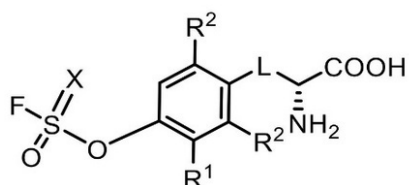


30

を有する。いくつかの実施形態では、式 (I B) の U A A は、式 (I B - b) の構造：

【0170】

【化90】



40

を有する。

【0171】

いくつかの実施形態では、式 (I A) の U A A は、式 (I C) の構造：

【0172】

50

【化 9 1】



を有する。

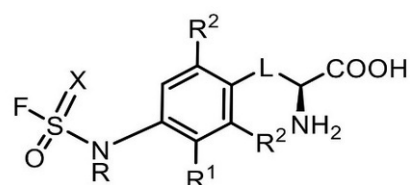
10

【0 1 7 3】

いくつかの実施形態では、式 (IC) の UAA は、式 (IC-a) の構造：

【0 1 7 4】

【化 9 2】

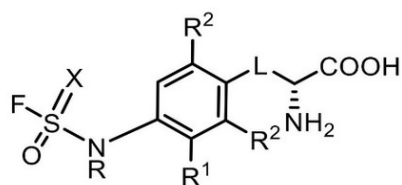


20

を有する。いくつかの実施形態では、式 (IB) の UAA は、式 (IB-b) の構造：

【0 1 7 5】

【化 9 3】



30

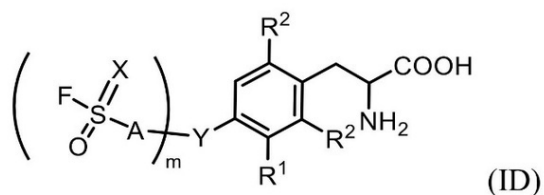
を有する。いくつかの好ましい実施形態では、R は水素である。

【0 1 7 6】

いくつかの実施形態では、式 (IA) の UAA は、式 (ID) の構造：

【0 1 7 7】

【化 9 4】



40

を有し、式中、

X はそれぞれ独立して、O または NR' であり、

Y は、結合、-O-、-NR-、または -N= であり、

A は、結合または -(CH2)n- であり、m は 1 または 2 であり、n は 1 ~ 4 の整数であり、

R および R' のそれぞれは、存在する場合、独立して、水素、置換もしくは非置換アル

50

キル、置換もしくは非置換ヘテロアルキル、置換もしくは非置換アリール、置換もしくは非置換ヘテロアリール、または置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキルであり、

R^1 は、水素、フルオロまたはヨードであり、

R^2 は、水素またはメチルであり、ならびに、

ここで、 Y が、結合、 $-O-$ または $-NR-$ である場合、 m は1であり、 Y が $-N=$ である場合、 m は2である。

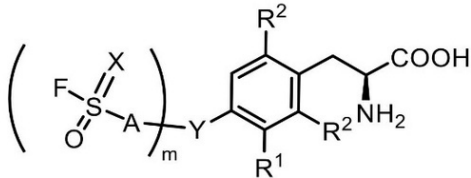
【0178】

いくつかの実施形態では、式 (ID) のUAAは、式 (ID-a) の構造：

【0179】

【化95】

10

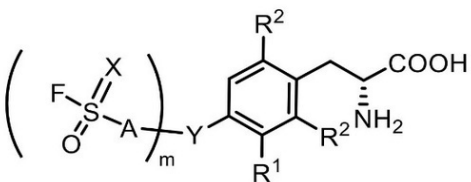


を有する。いくつかの実施形態では、式 (ID) のUAAは、式 (ID-b) の構造：

【0180】

【化96】

20



を有する。

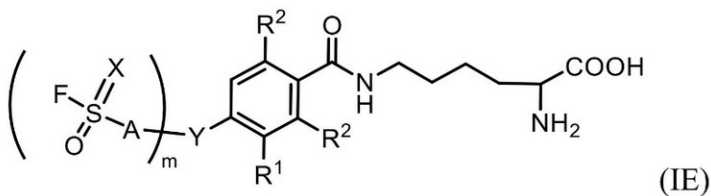
【0181】

いくつかの実施形態では、式 (IA) のUAAは、式 (IE) の構造：

【0182】

【化97】

30



(IE)

40

を有し、式中、

X はそれぞれ独立して、 O または NR' であり、

Y は、結合、 $-O-$ 、 $-NR-$ 、または $-N=$ であり、

A は、結合または $-(CH_2)_n-$ であり、 m は1または2であり、 n は1~4の整数であり、

R および R' のそれぞれは、存在する場合、独立して、水素、置換もしくは非置換アルキル、置換もしくは非置換ヘテロアルキル、置換もしくは非置換アリール、置換もしくは非置換ヘテロアリール、または置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキルであり、

R^1 は、水素、フルオロまたはヨードであり、 R^2 は、水素またはメチルであり、ならび

50

に、

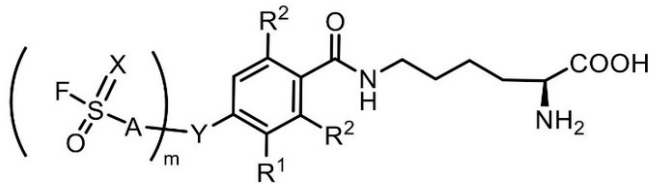
ここで、Yが、結合、 $-O-$ または $-NR-$ である場合、mは1であり、Yが $-N=$ である場合、mは2である。

【0183】

いくつかの実施形態では、式(IE)のUAAは、式(IE-a)の構造：

【0184】

【化98】

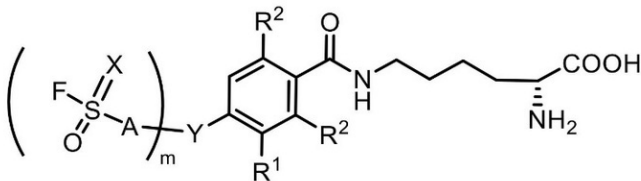


10

を有する。いくつかの実施形態では、式(IE)のUAAは、式(IE-b)の構造：

【0185】

【化99】



20

を有する。

【0186】

特定の実施形態では、Yは、結合、 $-O-$ または $-NR-$ であり、mは1である。他の実施形態では、Yは $-N=$ であり、mは2である。特定の好ましい実施形態では、Yは、 $-O-$ であり、mは1である。他の実施形態では、Yは $-NR=$ であり、mは1である。他の実施形態では、Yは結合であり、mは1である。他の実施形態では、Yは、 $O-$ または $-NR-$ であり、mは1である。

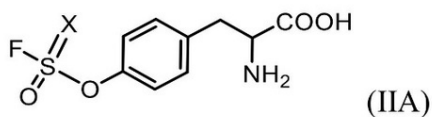
30

【0187】

いくつかの実施形態では、式(IA)のUAAは、式(IIA)の構造：

【0188】

【化100】



(IIA)

40

を有し、式中、

Xは独立して、Oまたは NR' であり、および、

R' は、存在する場合、水素、置換もしくは非置換アルキル、置換もしくは非置換ヘテロアルキル、置換もしくは非置換アリール、置換もしくは非置換ヘテロアリール、または置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキルである。

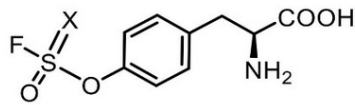
【0189】

いくつかの実施形態では、式(IIA)のUAAは、式(IIA-a)の構造：

【0190】

50

【化 1 0 1】

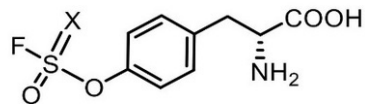


を有する。いくつかの実施形態では、式 (I I A) の U A A は、式 (I I A - b) の構造：

【0 1 9 1】

10

【化 1 0 2】



を有する。

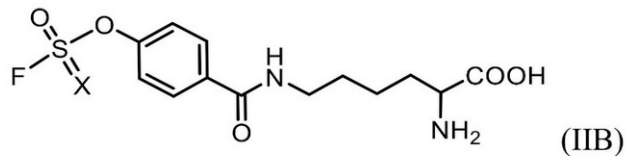
【0 1 9 2】

いくつかの実施形態では、式 (I A) の U A A は、式 (I I B) の構造：

【0 1 9 3】

20

【化 1 0 3】



を有し、式中、

30

X は独立して、O または N R ' であり、および、

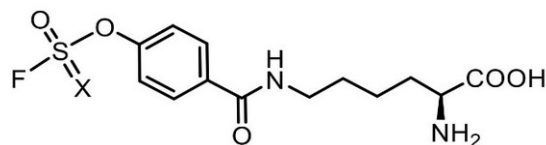
R ' は、存在する場合、水素、置換もしくは非置換アルキル、置換もしくは非置換ヘテロアルキル、置換もしくは非置換アリール、置換もしくは非置換ヘテロアリール、または置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキルである。

【0 1 9 4】

いくつかの実施形態では、式 (I I B) の U A A は、式 (I I B - a) の構造：

【0 1 9 5】

【化 1 0 4】



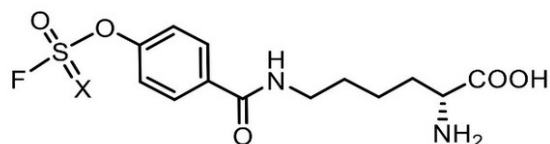
40

を有する。いくつかの実施形態では、式 (I I B) の U A A は、式 (I I B - b) の構造：

【0 1 9 6】

50

【化 1 0 5】



を有する。

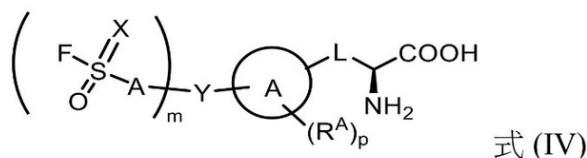
【0 1 9 7】

いくつかの実施形態では、非天然アミノ酸（UAA）に、式（IV）の構造：

10

【0 1 9 8】

【化 1 0 6】



を有し、

20

式中、

Xはそれぞれ独立して、OまたはNR'であり、

Yは、結合、-O-、-NR-、または-N=であり、

Aは、結合または-(CH₂)_n-であり、mは1または2であり、nは1～4の整数であり、

RおよびR'のそれぞれは、存在する場合、独立して、水素、置換もしくは非置換アルキル、置換もしくは非置換ヘテロアルキル、置換もしくは非置換アリール、置換もしくは非置換ヘテロアリール、または置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキルであり、

環Aは、5～6員アリールまたはヘテロアリールであり、

R^Aはそれぞれ独立して、-OH、-OR^X、ハロゲン、NHR^X、N(R^X)₂、または任意選択で置換アルキルであり、

30

R^Xはそれぞれ、任意選択で置換されたアルキルであり、Lは、-(CH₂)_p-または-C(O)NH-(CH₂)_p-であり、pは1～6の整数であり、ならびに、

ここで、Yが、結合、-O-または-NR-である場合、mは1であり、Yが-N=である場合、mは2である。

【0 1 9 9】

いくつかの実施形態では、Aは結合である。他の実施形態では、Aは-(CH₂)_n-である。いくつかの実施形態では、nは、1、2、3または4である。一実施形態では、nは1である。別の実施形態では、nは2である。さらなる別の実施形態では、nは3である。さらなる別の実施形態では、nは4である。

40

【0 2 0 0】

いくつかの実施形態では、環Aは、6員環である。いくつかの実施形態では、環Aは、6員環である。いくつかの実施形態では、環Aは、アリールである。いくつかの実施形態では、環Aは、ヘテロアリールである。いくつかの実施形態では、環Aは、6員アリールである。いくつかの実施形態では、環Aは、6員ヘテロアリールである。一つの好ましい実施形態では、環Aは、フェニルである。

【0 2 0 1】

いくつかの実施形態では、pは0である。いくつかの実施形態では、pは1～4の整数である。いくつかの実施形態では、pは1～3の整数である。一実施形態では、pは1で

50

ある。別の実施形態では、 p は 2 である。さらなる別の実施形態では、 p は 3 である。さらなる別の実施形態では、 p は 4 である。

【0202】

いくつかの実施形態では、 R^A はそれぞれ独立して、 $-OH$ 、 $-OR^X$ 、ハロゲン、 NHR^X 、 $N(R^X)_2$ 、または任意選択で置換アルキルであり、 R^X はそれぞれ、任意選択で置換されたアルキルである。いくつかの実施形態では、 R^A はそれぞれ独立して、 $-OH$ 、ハロゲン、または任意選択で置換されたアルキルである。いくつかの実施形態では、 R^A はそれぞれ独立して、ハロゲンまたは任意選択で置換されたアルキルである。いくつかの実施形態では、 R^A はそれぞれ独立して、 $-OH$ 、または任意選択で置換されたアルキルである。いくつかの実施形態では、 R^A はそれぞれ独立して、任意選択で置換されたアルキルである。いくつかの実施形態では、 R^A はそれぞれ独立して、選択で置換されたアルキルである。いくつかの実施形態では、 R^A はそれぞれ独立して、非置換のアルキルである。一実施形態では、 R^A はそれぞれヨードである。別の実施形態では、 R^A はそれぞれメチルである。 p が 1 である、1 つの具体的な実施形態では、 R^A はヨードである。 p が 2 である、別の具体的な実施形態では、 R^A はそれぞれメチルである。

10

【0203】

いくつかの実施形態では、 Y は、結合、 $-O-$ 、 $-NR-$ 、または $-N=$ である。いくつかの実施形態では、 Y は、 $-O-$ 、 $-NR-$ 、または $-N=$ である。いくつかの実施形態では、 Y は、結合、 $-O-$ 、または $-NR-$ である。いくつかの実施形態では、 Y は、結合、 $-O-$ 、または $-N=$ である。いくつかの実施形態では、 Y は、結合、 $NR-$ 、または $-N=$ である。いくつかの実施形態では、 Y は、 $-O-$ 、または $-NR-$ である。いくつかの実施形態では、 Y は、 $-O-$ 、または $-N=$ である。いくつかの実施形態では、 Y は、 $-NR-$ 、または $-N=$ である。1 つの実施形態では、 Y は結合である。別の実施形態では、 Y は $-O-$ である。さらなる別の実施形態では、 Y は $-NR-$ である。さらなる別の実施形態では、 Y は $-N=$ である。

20

【0204】

いくつかの実施形態では、 L は $-(CH_2)_p-$ である。他の実施形態では、 L は $-C(O)NH-(CH_2)_p-$ である。いくつかの実施形態では、 p は、1 ~ 6、1 ~ 5、1 ~ 4、1 ~ 3 または 1 ~ 2 の整数である。一実施形態では、 p は、1 ~ 4 である。別の実施形態では、 p は 1 または 2 である。さらなる別の実施形態では、 p は 1 または 4 である。1 つの好ましい実施形態では、 L は $-CH_2-$ である。別の好ましい実施形態では、 L は $-C(O)NH-(CH_2)_4-$ である。

30

【0205】

いくつかの実施形態では、 R は、水素、置換もしくは非置換アルキル、置換もしくは非置換ヘテロアルキル、置換もしくは非置換アリール、置換もしくは非置換ヘテロアリール、または置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキルである。いくつかの実施形態では、 R は、水素または置換もしくは非置換のアルキルである。一つの好ましい実施形態では、 R は水素である。別の実施形態では、 R は置換または非置換の C_{1-6} アルキルである。さらなる別の実施形態では、 R は非置換の C_{1-6} アルキルである。一実施形態では、 R はメチルである。別の好ましい実施形態では、 R は水素またはメチルである。

40

【0206】

いくつかの実施形態では、 R' は、水素、置換もしくは非置換アルキル、置換もしくは非置換ヘテロアルキル、置換もしくは非置換アリール、置換もしくは非置換ヘテロアリール、または置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキルである。いくつかの実施形態では、 R' は、水素、置換もしくは非置換アルキル、置換もしくは非置換ヘテロアルキル、置換もしくは非置換アリール、または置換もしくは非置換ヘテロアリールである。いくつかの実施形態では、 R' は、水素、置換もしくは非置換アルキル、置換もしくは非置換アリール、置換もしくは非置換ヘテロアリール、または置換もしくは非置換ヘテロシクロアルキルである。いくつかの実施形態では、 R' は、水素、置換もしくは非置換アルキル、または置換もしくは非置換アリールである。いくつかの実施形態において、 R' は水素である

50

。別の実施形態では、 R' は、置換もしくは非置換である。さらなる別の実施形態では、 R' は、置換もしくは非置換アリールである。

【0207】

いくつかの実施形態では、 R^1 は水素である。いくつかの実施形態では、 R^1 はフルオロである。いくつかの実施形態では、 R^1 はヨードである。いくつかの実施形態では、 R^2 は水素である。他の実施形態では、 R^2 はメチルである。いくつかの実施形態では、 R^1 は水素であり、 R^2 は水素である。いくつかの実施形態では、 R^1 はフルオロであり、 R^2 は水素である。いくつかの実施形態では、 R^1 は水素であり、 R^2 はメチルである。いくつかの実施形態では、 R^1 はヨードであり、 R^2 は水素である。

【0208】

10

リンカー

いくつかの実施形態では、本明細書に提供されるコンジュゲートは、1を超えるリンカーを含む。いくつかの実施形態では、標的化ドメイン（例えば、第1および第2の標的化ドメイン）は、第1のリンカーによって接続される。第1のリンカーおよび第2のリンカーは本明細書に記載の任意のリンカーになり得る。いくつかの実施形態では、ペイロードは、第2のリンカーによって標的化ドメイン（第1および第2の標的化ドメイン）のうちの1つに接続される。1つの好ましい実施形態では、第1のリンカーはペプチドリンカーである。別の好ましい実施形態では、第2のリンカーは、化学的コンジュゲーションによって形成される。いくつかの実施形態では、第2のリンカーは、化学的コンジュゲーションのための二官能性リンカーである。別の好ましい実施形態では、第2のリンカーは非ペプチドリンカーである。

20

【0209】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のペイロードへの標的化ドメインをコンジュゲートさせるか、または結合させるための有用な官能性反応基（functional reactive groups）は、例えば、ゼロまたは高次リンカーを含む。いくつかの例では、コンジュゲート部分は、本明細書に記載のリンカー（任意選択で、ペイロード、標的化ドメイン、またはコンジュゲートの他の部分に予め付着させる）と反応する官能性反応基を含む。いくつかの実施形態では、リンカーは、本明細書に記載のペイロードか標的化ドメイン中の天然アミノ酸と反応する反応性基を含む。標的化ドメイン（例えば、第1の標的化ドメインおよび第2の標的化ドメイン）、または標的化ドメイン（例えば、第1の標的化ドメインまたは第2の標的化ドメイン）の1つ、およびペイロードは、第1の標的化ドメイン上の求核反応性部分（nucleophilic reactive moiety）を第2の標的化ドメイン上の求電子反応性部分（electrophilic reactive moiety）と反応させることによって、または標的化ドメイン上の求核反応性部分をペイロード上の求電子反応性部分と反応させることによって共にコンジュゲートされ得る。代替の実施形態では、第1の標的化ドメインおよび第2の標的化ドメイン、または標的化ドメイン（例えば、第1の標的化ドメインまたは第2の標的化ドメイン）、およびペイロードは、第1の標的化ドメイン上の求電子性反応性部分を第2の標的化ドメイン上の求核性部分と反応させることによって、または標的化ドメイン上の求電子性反応性部分をペイロード上の求核性部分と反応させることによって共にコンジュゲートされる。いくつかの実施形態では、アミド結合は、標的化ドメイン（例えば、リジン残基の ϵ -アミン）上のアミンと別の標的化ドメイン上のカルボキシル基との反応、または標的化ドメイン上のアミンとペイロード上のカルボキシル基との反応時に形成し得る。代替の実施形態では、標的化ドメインおよび／またはペイロードは、コンジュゲーションの前に誘導体化剤で誘導体化される。

30

40

【0210】

いくつかの場合では、高次リンカーは、ホモ二官能性リンカーまたはヘテロ二官能性リンカーなどの二官能性リンカーを含む。例示的なホモ二官能性リンカーとしては、Lomantの試薬ジチオビス（スクシンイミジルプロピオネート）DSP、3'3'-ジチオビス（スルホスクシンイミジルプロピオネート（DTSSP）、ジスクシンイミジルスベレ

50

ート (DSS)、ビス (スルホスクシンイミジル) スベレート (BS)、ジスクシンイミ
 ジルタルレート (DST)、ジスルホスクシンイミジルタルレート (スルホDST)、エ
 チレングリコビス (スクシンイミジルスクシネート) (EGS)、ジスクシンイミジルグ
 ルタレート (DSG)、N, N'-ジスクシンイミジルカルボネート (DSC)、ジメチ
 ルアジピミデート (DMA)、ジメチルピメリミデート (DMP)、ジメチルスベリミデ
 ート (DMS)、ジメチル-3, 3'-ジチオビスプロピオンイミデート (DTBP)、
 し, 4-ジ-3'- (2'-ピリジルジチオ) プロピオンアミド) ブタン (DPDPB)、
 ビスマレイミドヘキサ (BMH)、ハロゲン化アリール含有化合物 (DFDNB)、例
 えばし, 5-ジフルオロ-2, 4-ジニトロベンゼンまたはし, 3-ジフルオロ-4, 6
 -ジニトロベンゼン、4, 4'-ジフルオロ-3, 3'-ジニトロフェニルスルホン (DF 10
 DNPS)、ビス- [β-3- (4-アジドサリチルアミド) エチル] ジスルフィド (B
 ASED)、ホルムアルデヒド、グルタルアルデヒド、1, 4-ブタンジオールジグリシ
 ジルエーテル、アジピン酸ジヒドラジド、カルボヒドラジド、o-トルイジン、3, 3'
 -ジメチルベンジジン、ベンジジン、α, α'-p-ジアミノジフェニル、ジヨード-p
 -キシレンスルホン酸、N, N'-エチレン-ビス (ヨードアセトアミド)、またはN,
 N'-ヘキサメチレン-ビス (ヨードアセトアミド) が挙げられるが、これらに限定され
 ない。

【0211】

いくつかの実施形態では、二官能性リンカーは、ヘテロ二官能性リンカーを含む。例示
 的なヘテロ二官能性リンカーとしては、アミン反応性およびスルフヒドリル架橋剤、例え
 ばN-スクシンイミジル 3- (2-ピリジルジチオ) プロピオネート (sPDP)、長
 鎖N-スクシンイミジル 3- (2-ピリジルジチオ) プロピオネート (LC-sPDP)
)、水溶性長鎖N-スクシンイミジル 3- (2-ピリジルジチオ) プロピオネート (スル
 ホ-LC-sPDP)、スクシンイミジルオキシカルボニル-α-メチル-α- (2-ピ
 リジルジチオ) トルエン (sMPT)、スルホスクシンイミジル-6- [α-メチル-α
 - (2-ピリジルジチオ) トルアミド] ヘキサノエート (スルホ-LC-sMPT)、ス
 クシンイミジル-4- (N-マレイミドメチル) シクロヘキサン-1-カルボキシレート
 (sMCC)、スルホスクシンイミジル-4- (N-マレイミドメチル) シクロヘキサ
 ン-1-カルボキシレート (スルホ-sMCC)、m-マレイミドベンゾイル-N-ヒド
 ロキシスクシンイミドエステル (MB)、N-スクシンイミジル (4-ヨードアクテイル 30
) アミノベンゾエート (sIAB)、スルホスクシンイミジル (4-ヨードアクテイル)
 アミノベンゾエート (スルホ-sIAB)、スクシンイミジル-4- (p-マレイミドフ
 ェニル) ブチレート (sMPB)、スルホスクシンイミジル-4- (p-マレイミドフ
 ェニル) ブチレート (スルホ-sMPB)、N- (γ-マレイミドブチリルオキシ) スクシ
 ンイミドエステル (GMB)、N- (γ-マレイミドブチリルオキシ) スルホスクシンイ
 ミドエステル (スルホ-GMB)、スクシンイミジル 6- ((ヨードアセチル) アミノ)
 ヘキサノエート (sIAX)、スクシンイミジル 6- [6- ((ヨードアセチル) アミ
 ノ) ヘキサノイル) アミノ] ヘキサノエート (sIAXX)、スクシンイミジル 4- ((40
 (ヨードアセチル) アミノ) メチル) シクロヘキサン-1-カルボキシレート (sIAC
)、スクシンイミジル 6- (((4-ヨードアセチル) アミノ) メチル) シクロヘキサ
 ン-1-カルボニル) アミノ) ヘキサノエート (sIACX)、p-ニトロフェニルヨード
 アセテート (NPIA)、カルボニル反応性およびスルフヒドリル反応性架橋剤、例えば
 、4- (4-N-マレイミドフェニル) 酪酸ヒドラジド (MPBH)、4- (N-マレイ
 ミドメチル) シクロヘキサン-1-カルボキシル-ヒドラジド-8 (M₂C₂H)、3-
 (2-ピリジルジチオ) プロピオニルヒドラジド (PDPH)、アミン反応性および光反
 応性架橋剤、例えば、N-ヒドロキシスクシンイミジル-4-アジドサリチル酸 (NHs
 -ASA)、N-ヒドロキシスルホスクシンイミジル-4-アジドサリチル酸 (スルホ-
 NHs-ASA)、スルホスクシンイミジル- (4-アジドサリチルアミド) ヘキサノエ
 ート (スルホ-NHs-LC-ASA)、スルホスクシンイミジル-2- (p-アジドサ
 リチルアミド) エチル-1, 3'-ジチオプロピオネート (sASD)、N-ヒドロキシ 50

スクシンイミジル-4-アジドベンゾエート (HsAB)、N-ヒドロキシスルホスクシンイミジル-4-アジドベンゾエート (スルホ-HsAB)、N-スクシンイミジル-6-(4'-アジド-2'-ニトロフェニルアミノ)ヘキサノエート (sANPAH)、スルホスクシンイミジル-6-(4'-アジド-2'-ニトロフェニルアミノ)ヘキサノエート (スルホ-sANPAH)、N-5-アジド-2-ニトロベンゾイルオキシスクシンイミド (ANB-NOs)、スルホスクシンイミジル-2-(m-アジド-ニトロベンズアミド)-エチル-1,3'-ジチオプロピオネート (sAND)、N-スクシンイミジル-4(4-アジドフェニル)1,3'-ジチオプロピオネート (sADP)、N-スルホスクシンイミジル(4-アジドフェニル)-1,3'-ジチオプロピオネート (スルホ-sADP)、スルホスクシンイミジル 4-(p-アジドフェニル)ブチレート (スルホ-sAPB)、スルホスクシンイミジル 2-(7-アジド-4-メチルクマリン-3-アセトアミド)エチル-1,3'-ジチオプロピオネート (sAED)、スルホスクシンイミジル 7-アジド-4-メチルクマリン-3-アセテート (スルホ-sAMCA)、p-ニトロフェニルジアゾピルベート (pNPDP)、スルフヒドリル反応性および光反応性架橋剤、例えば、p-ニトロフェニル-2-ジアゾ-3,3,3-トリフルオロプロピオネート (PNP-DTP)、1-(p-アジドサリチルアミド)-4-(ヨードアセトアミド)ブタン (AsIB)、N-[4-(p-アジドサリチルアミド)ブチル]-3'-(2'-ピリジルジチオ)プロピオンアミド (APDP)、ベンゾフェノン-4-ヨードアセトアミド、ベンゾフェノン-4-マレイミド カルボニル反応性架橋剤および光反応性架橋剤、例えば、p-アジドベンゾイルヒドラジド (ABH)、カルボキシレート反応性および光反応性架橋剤、例えば、4-(p-アジドサリチルアミド)ブチルアミン (AsBA)、アルギニン反応性および光反応性架橋剤、例えば p-アジドフェニルグリオキザール (APG) が挙げられるが、これらに限定されない

10

20

30

40

50

【0212】

いくつかの例では、反応性官能基は、結合部分 (例えば、ペイロード部分または標的化ドメイン) に存在する求電子基に対して反応性である求核基を含む。例示的な求電子基としては、アルデヒド、ケトン、カルボン酸、エステル、アミド、エノン、ハロゲン化アシル、または酸無水物などのカルボニル基が挙げられる。いくつかの実施形態では、反応性官能基 (reactive functional group) はアルデヒドである。例示的な求核基としては、ヒドラジド、オキシム、アミノ、ヒドラジン、チオセミカルバゾン、ヒドラジンカルボキシレート、およびアリールヒドラジドが挙げられる。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のコンジュゲートに組み込まれる非天然アミノ酸は、求電子基を含む。

【0213】

いくつかの実施形態では、リンカーは、切断可能なリンカーである。いくつかの実施形態では、切断可能なリンカーは、ジペプチドリンカーである。いくつかの実施形態では、ジペプチドリンカーは、バリニン-シトルリン (Val-Cit)、フェニルアラニン-リジン (Phe-Lys)、バリニン-アラニン (Val-Ala) およびバリニン-リジン (Val-Lys) である。いくつかの実施形態では、ジペプチドリンカーは、バリニン-シトルリンである。リンカーは、切断可能な配列またはプロテアーゼによって認識される配列を含み得る。

【0214】

様々な実施形態では、標的化ドメイン (例えば、第1の標的化ドメインおよび第2の標的化ドメイン) は、ポリペプチドリンカー配列を含む。リンカーは、標的化ドメインに対してC末端であり得る。リンカーは、組換え技術を介して発現され得、標的化ドメインの発現と併せて、核酸配列を使用してコードされてもよい。リンカーは、融合タンパク質を形成するために標的化ドメインを連結し得る。コンジュゲート中のリンカーの存在は、標的化ドメインが他の標的化ドメインからの立体的干渉 (steric interference) なしに適切に機能することを可能にし得る。リンカーは、標的化ドメインを発現タグか精製タグなどのタグに連結し得る。リンカーは、可撓性リンカーであり得る。リ

ンカーの可撓性は、標的化ドメインが、他の標的化ドメインからの最小限の干渉で独立した立体配座を採用することを可能にし得る。いくつかの実施形態では、リンカーは、例えば、少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、15、20、25、30、35、40、45、50個、またはそれ以上のアミノ酸を含むペプチドリンカーである。いくつかの例では、ペプチドリンカーは、最大で、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、15、20、25、30、35、40、45、50個、またはそれ以下のアミノ酸を含む。追加の場合では、ペプチドリンカーは、約2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、15、20、25、30、35、40、45、または50個のアミノ酸を含む。追加の場合では、ポリペプチドリンカーは、約2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、15、20、25、30、35、40、45、または50個のアミノ酸を含む。いくつかの例では、ポリペプチドリンカーは、(GGGGSGGGGS) x (配列番号14)を含み、ここで、xは1~10である。いくつかの実施形態では、リンカーは、長さが1、1~2、1~3、1~4、1~5、1~6、1~7、1~8、1~9、1~10、1~11、1~12アミノ酸、および長さがこれらより長いポリペプチドリンカーである。リンカーはSPSTPTPTSPSTPTPを含み得、ポリペプチドリンカーは、(GGGGGS) x、(GGGGS) xを繰り返し得る。リンカーは、グリシン、セリン、トレオニン、またはプロリンを含み得る。いくつかの実施形態では、1つの標的化ドメインのN末端は、リンカーポリペプチドのC末端に融合し、リンカーポリペプチドのN末端は、別の標的化ドメインのN末端に融合する。

10

20

【0215】

様々な実施形態では、標的化ドメイン（例えば、第1の標的化ドメインおよび第2の標的化ドメイン）は、リンカーによって接続または分離される。リンカーは、ポリペプチドリンカーであり得る。リンカーは、組換え技術を介して発現され得、標的化ドメインの発現と併せて、核酸配列を使用してコードされてもよい。リンカーは、融合タンパク質を形成するために標的化ドメインを連結し得る。コンジュゲート中のリンカーの存在は、標的化ドメインが他の標的化ドメインからの立体的干渉なしに適切に機能することを可能にし得る。リンカーは、可撓性リンカーであり得る。リンカーの可撓性は、標的化ドメインが、他の標的化ドメインからの最小限の干渉で独立した立体配座を採用することを可能にし得る。いくつかの実施形態では、リンカーは、例えば、少なくとも2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、15、20、25、30、35、40、45、50個、またはそれ以上のアミノ酸を含むペプチドリンカーである。いくつかの例では、ペプチドリンカーは、最大で、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、15、20、25、30、35、40、45、50個、またはそれ以下のアミノ酸を含む。追加の場合では、ペプチドリンカーは、約2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、15、20、25、30、35、40、45、または50個のアミノ酸を含む。追加の場合では、ポリペプチドリンカーは、約2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、15、20、25、30、35、40、45、または50個のアミノ酸を含む。いくつかの例では、ポリペプチドリンカーは、(GGGGSGGGGS) x (配列番号14)を含み、ここで、xは1~10である。いくつかの実施形態では、リンカーは、長さが1、1~2、1~3、1~4、1~5、1~6、1~7、1~8、1~9、1~10、1~11、1~12アミノ酸、および長さがこれらより長いポリペプチドリンカーである。リンカーはSPSTPTPTPTSPSTPTPを含み得、ポリペプチドリンカーは、(GGGGGS) x、(GGGGS) xを繰り返し得る。リンカーは、グリシン、セリン、トレオニン、またはプロリンを含み得る。いくつかの実施形態では、1つの標的化ドメインのN末端は、リンカーポリペプチドのC末端に融合し、リンカーポリペプチドのN末端は、別の標的化ドメインのN末端に融合する。

30

40

【0216】

いくつかの実施形態では、リンカーは、自己犠牲リンカー部分 (self-immolative linker moiety) を含む。いくつかの実施形態では、自己犠牲リンカー部分は、p-アミノベンジルアルコール (PAB)、p-アミノベンジルオキシ

50

カルボニル（PABC）、またはその誘導体もしくは類似体を含む。いくつかの実施形態では、リンカーは、ジペプチドリンカー部分および自己犠牲リンカー部分を含む。いくつかの実施形態において、自己犠牲リンカー部分は、米国特許第9089614号およびIPO Application No. WO2015038426に記載されている通りである。

【0217】

いくつかの実施形態では、切断可能なリンカーはグルクロニドである。いくつかの実施形態では、切断可能なリンカーは、酸-切断可能なリンカーである。いくつかの実施形態では、酸-切断可能なリンカーは、ヒドラジンである。いくつかの実施形態では、切断可能なリンカーは、還元可能なリンカーである。

【0218】

いくつかの実施形態では、リンカーは、マレイミド基を含む。いくつかの例では、マレイミド基はまた、マレイミドスペーサーと呼ばれる。いくつかの例では、マレイミド基はカプロン酸をさらに含み、マレイミドカプロイル（me）を形成する。いくつかの場合において、リンカーは、マレイミドカプロイル（me）を含む。いくつかの場合において、リンカーは、マレイミドカプロイル（me）である。他の例では、マレイミド基は、上記のスクシンイミジル-4-（N-マレイミドメチル）シクロヘキサン-1-カルボキシレート（sMCC）またはスルホスクシンイミジル-4-（N-マレイミドメチル）シクロヘキサン-1-カルボキシレート（スルホ-sMCC）などのマレイミドメチル基を含む。

【0219】

いくつかの実施形態では、マレイミド基は自己安定化マレイミドである。いくつかの例では、自己安定化マレイミドは、ジアミノプロピオン酸（DPR）を利用して、マレイミドに隣接する塩基性アミノ基を組み込み、チオスクシンイミド環加水分解の分子内触媒作用を提供し、それによって、マレイミドがレトロマイケル反応を通して脱離反応を受けることを排除する。いくつかの例では、自己安定化マレイミドは、Lyonらの「Self-hydrolyzing maleimides improves the stability and pharmacological properties of antibody-drug conjugates」Nat. Biotechnol. 32(10):1059-1062(2014)に記載されているマレイミド基である。いくつかの例では、リンカーは自己安定化マレイミドを含む。いくつかの例では、リンカーは自己安定化マレイミドである。

【0220】

いくつかの例では、リンカーは、カルボニルまたはジカルボニル基、オキシム基、ヒドロキシルアミン基、またはそれらの保護形態の少なくとも1つ、少なくとも2つ、少なくとも3つ、少なくとも4つ、少なくとも5つ、少なくとも6つ、少なくとも7つ、少なくとも8つ、少なくとも9つ、または10個以上を含む。TLRアゴニストリンカー誘導体または標的化ドメインは、同じであるか、または異なり得、例えば、誘導体中に、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、またはそれ以上の異なる反応性基を含む、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、またはそれ以上の異なる異なる部位が存在し得る。

【0221】

本明細書に記載される場合、本開示は、式「標的化ドメイン-L-ペイロード」を有する別の分子に結合した標的化ドメインを提供し、式中、Lは連結基または化学結合である。いくつかの実施形態では、Lは、in vivoで安定である。いくつかの実施形態では、Lは、in vivoで加水分解性である。いくつかの実施形態では、Lは、in vivoで準安定（metastable）である。

【0222】

標的化ドメインおよびペイロードは、当業者に公知の標準的な連結剤および手順を使用

10

20

30

40

50

して、Lを介してともに連結され得る。いくつかの態様では、標的化ドメインおよびペイロードは、直接融合され、Lは結合である。他の態様では、標的化ドメインおよびペイロードは、連結基Lによって融合する。例えば、いくつかの具体化では、標的化ドメインおよびペイロードは、ペプチド結合を介して、任意選択でペプチドまたはアミノ酸スペーサーによって、ともに連結される。いくつかの実施形態では、標的化ドメインおよびペイロードは、任意選択で連結基(L)によって、化学的コンジュゲーションによって、ともに連結される。いくつかの実施形態では、Lは、標的化ドメインおよびペイロードのそれぞれに直接コンジュゲートされる。

【0223】

化学的コンジュゲーションは、ある化合物の求核反応性基を、別の化合物の求電子反応性基と反応させることによって生じ得る。いくつかの実施形態では、Lが結合である場合、標的化ドメインは、標的化ドメイン上の求核反応性部分をリンカー上の求電子反応性部分と反応させることによって、または標的化ドメイン上の求電子反応性部分をペイロード上の求核反応性部分と反応させることによって、ペイロードにコンジュゲートされる。Lが標的化ドメインおよびペイロードをともに連結する基である実施形態では、標的化ドメインおよび／またはペイロードは、標的化ドメインおよび／またはペイロード上の求核反応性部分をL上の求電子反応性部分と反応させることによって、または標的化ドメインおよび／またはペイロード上の求電子反応性部分をL上の求核反応性部分と反応させることによって、Lにコンジュゲートされ得る。求核反応性基の非限定的な例としては、アミノ、チオール、およびヒドロキシルが挙げられる。求電子反応基の非限定的な例としては、カルボキシル、アシルクロリド、無水物、エステル、スクシンイミドエステル、アルキルハライド、スルホネートエステル、マレイミド、ハロアセチル、およびイソシアネートが挙げられる。標的化ドメインおよびペイロードが、カルボン酸をアミンと反応させることによってともにコンジュゲートされる実施形態では、活性化剤を使用して、カルボン酸の活性化エステルを形成することができる。

【0224】

カルボン酸の活性化エステルは、例えば、N-ヒドロキシスクシンイミド(NHS)、トシレート(Tos)、メシレート、トリフレート、カルボジイミド、またはヘキサフルオロホスフェートであり得る。いくつかの実施形態において、カルボジイミドは、1,3-ジシクロヘキシルカルボジイミド(DCC)、1,1'-カルボニルジイミダゾール(CDI)、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩(EDC)、または1,3-ジイソプロピルカルボジイミド(DICD)である。いくつかの実施形態では、ヘキサフルオロリン酸塩は、ヘキサフルオロホスフェートベンゾトリアゾール-1-イル-オキシトリス(ジメチルアミノ)ホスホニウムヘキサフルオロホスフェート(BOP)、ベンゾトリアゾール-1-イル-オキシトリピロロジノホスホニウムヘキサフルオロホスフェート(PyBOP)、2-(1H-7-アザベンゾトリアゾール-1-イル)-1,1,3,3-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスフェート(HATU)、およびo-ベンゾトリアゾール-N,N,N',N'-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスフェート(HBTU)からなる群から選択される。

【0225】

いくつかの実施形態では、標的化ドメイン(例えば、第1の標的化ドメインおよび第2の標的化ドメイン)は、ペイロードまたはL上の求電子性反応基にコンジュゲートすることができる求核性反応基(例えば、リジン、システインまたはセリンの側鎖のアミノ基、チオール基またはヒドロキシル基)を含む。いくつかの実施形態では、標的化ドメインは、ペイロードまたはL上の求核性反応基にコンジュゲートすることができる求電子性反応基(例えば、AspまたはGluの側鎖のカルボキシレート基)を含む。いくつかの実施形態では、標的化ドメインは、ペイロードまたはLに直接コンジュゲートすることができる反応基を含むように化学的に修飾される。いくつかの実施形態では、標的化ドメインは、求核性側鎖を有する天然アミノ酸を含むようにN末端またはC末端で修飾される。例示的な実施形態では、標的化ドメインのN末端またはC末端アミノ酸は、リジン、オルニチ

ン、セリン、システインおよびホモシステインからなる群から選択される。例えば、標的化ドメインのN末端またはC末端アミノ酸は、リジン残基を含むように修飾され得る。いくつかの実施形態では、ターゲティングドメインは、例えば、AspおよびGluなどの求電子性側鎖を有する天然アミノ酸を含むように、N末端またはC末端アミノ酸において修飾される。いくつかの実施形態では、標的化ドメインの内部アミノ酸は、本明細書に以前に記載されるように、求核性側鎖を有する天然アミノ酸で置換される。例示的な実施形態では、置換される標的化ドメインの内部アミノ酸は、リジン、オルニチン、セリン、システインおよびホモシステインからなる群から選択される。例えば、標的化ドメインの内部アミノ酸は、リジン残基で置換され得る。いくつかの実施形態では、標的化ドメインの内部アミノ酸は、例えば、AspおよびGluなどの求電子性側鎖を有する天然アミノ酸で置換される。

10

【0226】

いくつかの実施形態では、ペイロードは、標的化ドメインまたはLに直接コンジュゲートすることができる反応基を含む。いくつかの実施形態では、ペイロードは、標的化ドメインまたはL上の求電子性反応基にコンジュゲートすることができる求核性反応基（例えば、アミン、チオール、ヒドロキシル）を含む。いくつかの実施形態では、ペイロードは、標的化ドメインまたはL上の求核反応基にコンジュゲートすることができる求電子性反応基（例えば、カルボキシル基、カルボキシル基の活性化形態、脱離基を有する化合物）を含む。いくつかの実施形態では、ペイロードは、標的化ドメイン上の求電子性反応基にコンジュゲートすることができる求核性反応基またはLのいずれかを含むように化学的に修飾される。いくつかの実施形態では、ペイロードは、標的化ドメインまたはL上の求核性反応基にコンジュゲートすることができる求電子性反応基を含むように化学的に修飾される。

20

【0227】

いくつかの実施形態では、コンジュゲーションは、オルガノシラン、例えば、グルタルアルデヒドで処置されたアミノシラン、シラノール基のカルボニルジイミダゾール（CDI）活性、またはデンドリマーの利用を通して行われ得る。様々なデンドリマーが当技術分野において公知であり、アンモニアまたはエチレンジアミン開始剤コア試薬から開始する発散法によって合成されるポリ（アミドアミン）（PAMAM）デンドリマーと、トリスーアミノエチレンーイミンコアに基づくPAMAMデンドリマーのサブクラスと、親水性求核性ポリアミドアミン（PAMAM）の内部および疎水性有機ケイ素（OS）の外部からなる反転単分子ミセルである放射状層状ポリ（アミドアミンー有機ケイ素）デンドリマー（PAMAMOS）と、一般に末端基として第一級アミンを有するポリアルキルアミンである一方、デンドリマーの内部は、多数の三級トリスープロピレンアミンからなる、ポリ（プロピレンイミン）（PPI）デンドリマーと、ポリ（プロピレンアミン）（POPAM）デンドリマーと、ジアミノブタン（DAB）デンドリマーと、両親媒性デンドリマーと、水溶性超分岐ポリフェニレンの単分子ミセルであるミセルデンドリマーと、ポリリジンデンドリマーと、ポリーベンジルエーテル超分岐骨格に基づくデンドリマーとを含む。

30

【0228】

いくつかの実施形態では、コンジュゲーションは、オレフィンメタセシスによって行うことができる。いくつかの実施形態では、ペイロードおよび標的化ドメイン、ペイロードおよびL、または標的化ドメインおよびLは両方とも、メタセシスを受けることができるアルケンまたはアルキン部分を含む。いくつかの実施形態では、適切な触媒（例えば、銅、ルテニウム）が、メタセシス反応を加速するために使用される。オレフィンメタセシス反応を行う適切な方法は、当技術分野において記載されている。例えば、Schafmeister et al., J. Am. Chem. Soc. 122: 5891-5892 (2000), Walensky et al., Science 305: 1466-1470 (2004)、およびBlackwell et al., Angew. Chem., Int. Ed. 37: 3281-3284 (1998)を参照されたい。

40

50

【0229】

いくつかの実施形態では、コンジュゲーションは、クリックケミストリーを行うことができる。「クリック反応 (click reaction)」は、範囲が広く、実施が容易であり、容易に入手可能な試薬のみを使用し、酸素および水に対して非感受性である。いくつかの実施形態では、クリック反応は、トリアゾリル基を形成するための、アルキニル基とアジド基との間の環化付加反応である。いくつかの実施形態において、クリック反応は、銅またはルテニウム触媒を使用する。クリック反応を行う適切な方法は、当技術分野において記載されている。例えば、Kolbらによる、Drug Discovery Today 8:1128 (2003)、Kolbらによる、Angew. Chem. Int. Ed. 40:2004 (2001)、Rostovtsevらによる、Angew. Chem. Int. Ed. 41:2596 (2002)、Tomoeらによる、J. Org. Chem. 67:3057 (2002)、Manetschらによる、J. Am. Chem. Soc. 126:12809 (2004)、Lewisらによる、Angew. Chem. Int. Ed. 41:1053 (2002)、Speersらによる、J. Am. Chem. Soc. 125:4686 (2003)、Chanらによる、Org. Lett. 6:2853 (2004)、Zhangらによる、J. Am. Chem. Soc. 127:15998 (2005)、Waserらによる、J. Am. Chem. Soc. 127:8294 (2005)を参照されたい。

10

【0230】

高親和性特異的結合パートナー、例えばストレプトアビジン／ビオチン、またはアビジン／ビオチン、またはレクチン／炭水化物を介した間接的コンジュゲーションも企図される。

20

【0231】

コンジュゲーションのための反応性残基

いくつかの実施形態では、標的化ドメインおよび／またはペイロードは、有機誘導体化剤 (organic derivatizing agent) を用いて、求核性反応基または求電子性反応基を含むように官能基化される。この誘導体化剤は、標的化ドメイン上の標的化アミノ酸の選択された側鎖またはN末端もしくはC末端残基およびペイロード上の官能基と反応することができる。標的化ドメインおよび／またはペイロード上の反応基としては、例えば、アルデヒド、アミノ、エステル、チオール、 α -ハロアセチル、マレイミドまたはヒドラジノ基が挙げられる。誘導体化剤としては、例えば、マレイミドベンゾイルスルホスクシンイミドエステル (システイン残基を介するコンジュゲーション)、N-ヒドロキシスクシンイミド (リジン残基を介する)、グルタルアルデヒド、無水コハク酸または当技術分野で公知の他の薬剤が挙げられる。あるいは、標的化ドメインおよび／またはペイロードは、多糖またはポリペプチド担体などの中間担体を通して、互いに間接的に連結することができる。多糖担体の例としては、アミノデキストランが挙げられる。適切なポリペプチド担体の例としては、ポリリシン、ポリグルタミン酸、ポリアスパラギン酸、そのコポリマー、およびこれらのアミノ酸と他のもの、例えばセリンとの混合ポリマーが挙げられ、結果として得られる充填担体に望ましい溶解性を付与する。

30

【0232】

システイニル残基は、最も一般的には、クロロ酢酸又はクロロアセトアミドなどの α -ハロアセテート (および対応するアミン) と反応させて、カルボキシメチルまたはカルボキシアミドメチル誘導体を得る。システイニル残基はまた、プロモトリフルオロアセトン、 α -ブromo- β -(5-イミドゾイル)プロピオン酸、クロロアセチルホスフェート、N-アルキルマレイミド、3-ニトロ-2-ピリジルジスルフィド、メチル 2-ピリジルジスルフィド、p-クロロ水銀ベンゾエート、2-クロロ水銀-4-ニトロフェノール、またはクロロ-7-ニトロベンゾ-2-オキサール, 3-ジアゾールとの反応によって誘導体化される。

40

【0233】

ヒスチジル残基は、この薬剤がヒスチジル側鎖に比較的特異的であるため、pH 5.5

50

～7.0でジエチルピロカーボネートと反応させることによって誘導体化される。パラ－プロモフェナシルブロミドも有用であり、この反応は、好ましくは、pH 6.0、0.1 Mカコジル酸ナトリウム中で行われる。

【0234】

リシニルおよびアミノ末端残基は、コハク酸または他のカルボン酸無水物と反応させられる。これらの薬剤による誘導体化は、リシニル残基の電荷を逆転させる効果を有する。 α -アミノ含有残基を誘導体化するための他の適切な試薬には、メチルピコリンイミデート、ピリドキサルホスフェート、ピリドキサル、クロロボロヒドリド、トリニトロベンゼンスルホン酸、O-メチルイソ尿素、2,4-ペンタンジオンなどのイミドエステル、およびグリオキシレートとのトランスアミナーゼ触媒反応が含まれる。

10

【0235】

アルギニル残基は、1つまたはいくつかの従来の試薬、とりわけ、フェニルグリオキサル、2,3-ブタンジオン、1,2-シクロヘキサジオン、およびニンヒドリンとの反応によって修飾される。アルギニン残基の誘導体化は、グアニジン官能基の高いpKaのために、反応がアルカリ性条件下で行われることを必要とする。さらに、これらの試薬は、リジンの基ならびにアルギニン ϵ -アミノ基と反応し得る。

【0236】

チロシル残基の特異的修飾は、芳香族ジアゾニウム化合物またはテトラニトロメタンとの反応によるチロシル残基へのスペクトル標識の導入に特に興味深く行うことができる。最も一般的には、N-アセチルイミダゾールおよびテトラニトロメタンを使用して、それぞれO-アセチルチロシル種および3-ニトロ誘導体を形成する。

20

【0237】

カルボキシル側鎖基（アスパルチル又はグルタミル）は、カルボジイミド（ $R-N=C=N-R'$ ）との反応によって選択的に修飾され、ここでRおよびR'は、1-シクロヘキシル-3-（2-モルホリニル-4-エチル）カルボジイミド又は1-エチル-3-（4-アゾニア-4,4-ジメチルペンチル）カルボジイミドなどの異なるアルキル基である。さらに、アスパルチル及びグルタミル残基は、アンモニウムイオンとの反応によってアスパラギニルおよびグルタミニル残基に変換される。

【0238】

他の変形例としては、プロリンやリジンの水酸化、セリル残基やスレオニル残基の水酸基のリン酸化、リジン、アルギニン、ヒスチジン側鎖の α -アミノ基のメチル化（T. E. Creighton, *Proteins: Structure and Molecular Properties*, W. H. Freeman & Co., San Francisco, pp. 79-86 (1983)）、アスパラギンまたはグルタミンの脱アミド化、N末端アミンのアセチル化、および／またはC末端カルボン酸基のアミド化またはエステル化がある。

30

【0239】

別の種類の共有結合修飾は、ペプチドにグリコシドを化学的または酵素的にカップリングすることを含む。糖（複数可）は、（a）アルギニンおよびヒスチジン、（b）遊離カルボキシル基、（c）システインのものなどの遊離スルフヒドリル基、（d）セリン、スレオニンまたはヒドロキシプロリンのものなどの遊離ヒドロキシル基、（e）チロシンまたはトリプトファンのもなどの芳香族残基、または（f）グルタミンのアミド基に付着し得る。これらの方法は、WO 1987/05330、およびApplin and Wriston, *CRC Crit. Rev. Biochem.*, pp. 259-306 (1981)に記載されている。

40

【0240】

いくつかの実施形態では、Lは結合である。これらの実施形態では、標的化ドメインおよびペイロードは、標的化ドメイン上の求核反応性部分を求電子性反応部分またはペイロードと反応させることによって共にコンジュゲートされる。代替の実施形態では、標的化ドメインおよびペイロードは、標的化ドメイン上の求電子性反応部分をペイロード上の求

50

核性部分と反応させることによって共にコンジュゲートされる。例示的な実施形態では、Lは、標的化ドメイン（例えば、リジン残基のε-アミン）上のアミンとM上のカルボキシル基との反応時に形成するアミド結合である。代替の実施形態では、標的化ドメインおよび／またはペイロードは、コンジュゲーションの前に誘導体化剤で誘導体化される。

【0241】

いくつかの実施形態では、Lは連結基である。いくつかの実施形態では、Lは二官能性リンカーであり、標的化ドメインおよびペイロードへのコンジュゲーションの前に、2つの反応基のみを含む。標的化ドメインおよびペイロードの両方が求電子性反応基を有する実施形態では、Lは、標的化ドメインおよびペイロードへのコンジュゲーションの前に、2つの同じまたは2つの異なる求核基（例えば、アミン、ヒドロキシル、チオール）を含む。標的化ドメインおよびペイロードの両方が求核反応基を有する実施形態では、Lは、ペイロードの標的化ドメインへのコンジュゲーションの前に、2つの同じまたは2つの異なる求電子基（例えば、カルボキシル基、カルボキシル基の活性化形態、脱離基を有する化合物）を含む。標的化ドメインまたはペイロードの一方が求核性反応基を有し、標的化ドメインまたはペイロードの他方が求電子性反応基を有する実施形態では、Lは、標的化ドメインおよびペイロードへのコンジュゲーションの前に、1つの求核性反応基および1つの求電子性基を含む。

10

【0242】

Lは、標的化ドメインおよびペイロードのそれぞれと反応することができる少なくとも2つの反応基（標的化ドメインおよびペイロードへのコンジュゲーションの前）を有する任意の分子であり得る。いくつかの実施形態では、Lは、2つのみの反応基を有し、二官能性である。L（ペプチドへのコンジュゲーションの前）は、式VI：A-L-Bによって表すことができ、式中、AおよびBは独立して、求核性または求電子性反応基である。いくつかの実施形態では、AおよびBは両方とも求核基であるか、または両方とも求電子基であるかのいずれかである。いくつかの実施形態では、AまたはBの一方は求核基であり、AまたはBの他方は求電子基である。

20

【0243】

いくつかの実施形態では、AおよびBは、オレフィンメタセシス反応に適したアルケンおよび／またはアルキン官能基を含み得る。いくつかの実施形態では、AおよびBは、クリックケミストリー（例えば、アルケン、アルキン、ニトリル、アジド）に適した部分を含む。反応基（AおよびB）の他の非限定的な例としては、ピリジルジチオール、アリーラジド、ジアジリン、カルボジイミド、およびヒドラジドが挙げられる。

30

【0244】

いくつかの実施形態では、Lは疎水性である。疎水性リンカーは、当技術分野において公知である。例えば、その全体が参照により組み込まれるBioconjugate Techniques, G. T. Hermanson (Academic Press, San Diego, CA, 1996)を参照されたい。当技術分野で公知の好適な疎水性連結基としては、例えば、8-ヒドロキシオクタン酸および8-メルカプトオクタン酸が挙げられる。組成物のペプチドへのコンジュゲーションの前に、疎水性連結基は、本明細書に記載され、かつ以下：A-（疎水性連結基）-Bに示されるように、少なくとも2つの反応基（AおよびB）を含む。

40

【0245】

いくつかの実施形態では、疎水性連結基は、マレイミド基またはヨードアセチル基のいずれか、および反応基としてのカルボン酸または活性化カルボン酸（例えば、NHSEステル）のいずれかを含む。これらの実施形態では、マレイミドまたはヨードアセチル基は、標的化ドメインまたはペイロード上のチオール部分にカップリングさせることができ、カルボン酸または活性化カルボン酸は、カップリング試薬の使用の有無にかかわらず、標的化ドメインまたはペイロード上のアミンにカップリングさせることができる。当業者に公知の任意のカップリング剤を使用して、カルボン酸を遊離アミンとカップリングさせることができ、例えば、DCC、DIC、HATU、HBTU、TBTU、および本明細書

50

に記載の他の活性化剤が挙げられる。特定の実施形態では、親水性連結基は、2～100個のメチレン基の脂肪族鎖を含み、AおよびBは、カルボキシル基またはその誘導体（例えば、コハク酸）である。他の特定の実施形態では、Lはヨード酢酸である。

【0246】

いくつかの例では、組成物のペプチドへのコンジュゲーションの前に、疎水性連結基は、本明細書に記載され、かつ以下：A－（疎水性連結基）－Bに示されるように、少なくとも2つの反応基（AおよびB）を含む。特定の実施形態では、連結基はポリエチレングリコール（PEG）である。特定の実施形態では、PEGは、約100ダルトン～約10,000ダルトン、例えば約500ダルトン～約5000ダルトンの分子量を有する。PEGは、いくつかの実施形態では、約10,000ダルトン～約40,000ダルトンの分子量を有する。

10

【0247】

いくつかの実施形態では、疎水性連結基は、マレイミド基またはヨードアセチル基のいずれかと、反応基としてのカルボン酸または活性化カルボン酸（例えば、NHSEステル）のいずれかとを含む。これらの実施形態では、マレイミドまたはヨードアセチル基は、標的化ドメインまたはペイロード上のチオール部分にカップリングさせることができ、カルボン酸または活性化カルボン酸は、カップリング試薬の使用の有無にかかわらず、標的化ドメインまたはペイロード上のアミンにカップリングさせることができる。当業者に公知の任意の適切なカップリング剤を使用して、カルボン酸を遊離アミンとカップリングさせることができ、例えば、DCC、DIC、HATU、HBTU、TBTU、および本明細書に記載の他の活性化剤が挙げられる。いくつかの実施形態では、連結基は、マレイミド－ポリマー（0.1～2.5 kDa）－COOH、ヨードアセチル－ポリマー（0.1～2.5 kDa）－COOH、マレイミド－ポリマー（0.1～2.5 kDa）－NHS、またはヨードアセチル－ポリマー（0.1～2.5 kDa）－NHSである。

20

【0248】

いくつかの実施形態では、連結基は、アミノ酸、ジペプチド、トリペプチド、またはポリペプチドから構成され、アミノ酸、ジペプチド、トリペプチド、またはポリペプチドは、本明細書に記載されるように、少なくとも2つの活性化基を含む。いくつかの実施形態では、連結基（L）は、アミノ、エーテル、チオエーテル、マレイミド、ジスルフィド、アミド、エステル、チオエステル、アルケン、シクロアルケン、アルキン、トリアゾール、カルバマート、カルボネート、カテプシンB－切断可能、およびヒドラゾンからなる群から選択される部分を含む。

30

【0249】

いくつかの実施形態では、Lは、1～約60、または1～30原子以上、2～5原子、2～10原子、5～10原子、または10～20原子長の原子の鎖を含む。いくつかの実施形態では、鎖原子は全て炭素原子。いくつかの実施形態では、リンカーの骨格中の鎖原子は、C、O、N、およびSからなる群から選択され、鎖原子およびリンカーは、いくつかの例では、より可溶性のコンジュゲートを提供するように、それらの予想される溶解度（親水性）にしたがって選択される。いくつかの実施形態では、Lは、酵素もしくは他の触媒による切断、または標的組織もしくは器官もしくは細胞において見出される加水分解条件に供される官能基を提供する。いくつかの実施形態では、Lの長さは、立体障害の可能性を低減するのに十分長い。

40

【0250】

いくつかの実施形態では、Lは、血液または血液画分などの生体液中で安定である。いくつかの実施形態では、Lは、血清中で少なくとも5分間安定であり、例えば、血清中で5分間インキュベートした場合、コンジュゲートの25%、20%、15%、10%または5%未満が切断される。他の実施形態では、Lは、少なくとも10、または20、または25、または30、または60、または90、または120分間、または3、4、5、6、7、8、9、10、12、15、18または24時間、血清中で安定である。これらの実施形態では、Lは、in vivoで加水分解を受けることができる官能基を含み

50

ない。いくつかの例示的な実施形態では、Lは、血清中で少なくとも約72時間安定である。in vivoで有意な加水分解を受けることができない官能基の非限定的な例としては、アミド、エーテル、およびチオエーテルが挙げられる。

【0251】

いくつかの実施形態では、Lは、in vivoで加水分解性である。これらの実施形態では、Lは、in vivoで加水分解を受けることができる官能基を含む。in vivoで加水分解を受けることができない官能基の非限定的な例としては、エステル、無水物、およびチオエステルが挙げられる。

【0252】

いくつかの例示的な実施形態では、Lは不安定であり、37℃の血漿中で3時間以内に実質的な加水分解を受け、6時間以内に完全な加水分解を受ける。いくつかの例示的な実施形態では、Lは不安定ではない。

【0253】

いくつかの実施形態では、Lは、in vivoで準安定である。これらの実施形態では、Lは、任意選択である期間にわたってin vivoで化学的または酵素的に切断することができる官能基を含む（例えば、酸に不安定な、還元不安定な、または酵素に不安定な官能基）。これらの実施形態では、Lは、例えば、ヒドラゾン部分、ジスルフィド部分、またはカテプシン切断可能部分を含むことができる。Lが準安定である場合、いかなる特定の理論にも束縛されることを意図しないが、標的化ドメイン-L-Mコンジュゲートは、細胞外環境において安定であり、例えば、上記の期間にわたって血清中で安定であるが、細胞内環境または細胞内環境を模倣する状態において不安定であり、その結果、細胞に入ると切断する。いくつかの実施形態では、Lが準安定である場合、Lは、少なくとも約24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、42、もしくは48時間、例えば、少なくとも約48、54、60、66、もしくは72時間、または約24~48、48~72、24~60、36~48、36~72、または48~72時間、血清中で安定である。

【0254】

いくつかの例において、適切なポリマー骨格は、式X-ポリマー-LYを有し、ポリマーはポリ（エチレングリコール）であり、Xはアジド基と反応しない官能基であり、Yは適切な脱離基である。適切な官能基の例としては、ヒドロキシル、保護ヒドロキシル、アセタール、アルケニル、アミン、アミノオキシ、保護アミン、保護ヒドラジド、保護チオール、カルボン酸、保護カルボン酸、マレイミド、ジチオピリジン、およびビニルピリジン、およびケトンが挙げられるが、これらに限定されない。適切な脱離基の例としては、クロリド、臭化物、ヨージド、メシレート、トレシレート、およびトシレートが挙げられるが、これらに限定されない。

【0255】

リンカーは、広範囲の分子量または分子長を有し得る。より大きな、またはより小さな分子量のリンカーは、標的化ドメインと連結された実体との間、または連結された実体とその結合パートナーとの間に、もしあれば、所望の空間的關係または立体配座を提供するために使用され得る。より長い、またはより短い分子長を有するリンカーもまた、標的化ドメインと連結された実体との間、または連結された実体とその結合パートナーとの間に所望の空間または柔軟性を提供するために使用され得る。

【0256】

いくつかの実施形態では、リンカーは、a) ポリマー骨格の少なくとも第1の末端上のアジド、アルキン、ヒドラジン、ヒドラジド、ヒドロキシルアミン、またはカルボニル含有部分と、b) ポリマー骨格の第2の末端上の少なくとも第2の官能基とを含むダンベル構造を有する水溶性二官能性リンカーを含む。第2の官能基は、第1の官能基と同じであっても異なり得る。第2の官能基は、いくつかの実施形態では、第1の官能基と反応しない。いくつかの実施形態では、水溶性化合物は、分岐分子構造の少なくとも1つのアームを含む。例えば、分岐分子構造は樹枝状であり得る。

【0257】

例示的な実施形態では、ポリマーは、リンカーを介して標的化ドメインまたは修飾された標的化ドメインに連結される。例えば、リンカーは、一端がアルブミン結合部分などのポリマーに結合し、かつ他端がポリペプチド骨格上の任意の利用可能な位置に結合する、1つまたは2つのアミノ酸を含むことができる。さらなる例示的なリンカーには、少なくとも5個の非水素原子を含む化学的部分などの親水性リンカーが含まれ、これらの30～50%はNまたはOのいずれかである。

【0258】

任意選択で、複数の標的化ドメインまたは修飾された標的化ドメイン分子は、リンカーポリペプチドによって繋がりが得、上記リンカーポリペプチドは、任意選択で、長さが1、1～2、1～3、1～4、1～5、1～6、1～7、1～8、1～9、1～10、1～11、1～12アミノ酸、および長さがそれらより長く、任意選択で、1つの標的化ドメインのN末端はリンカーポリペプチドのC末端に融合され、リンカーポリペプチドのN末端は別の標的化ドメインのN末端に融合される。

【0259】

本明細書で使用する用語「求電子基 (electrophilic group)」、「求電子剤 (electrophile)」などは、共有結合を形成するために電子対を受け入れることができる原子または原子団を指す。本明細書で使用される「求電子基 (electrophilic group)」としては、ハロゲン化物、カルボニルおよびエポキシド含有化合物が挙げられるが、これらに限定されない。一般的な求電子剤としては、チオホスゲン、グリセリンジクロロヒドリン、フタロイルクロリド、スクシニルクロリド、クロロアセチルクロリド、クロロスクシニルクロリドなどのハロゲン化物、クロロアセトン、プロモアセトンなどのケトン、グリオキサールなどのアルデヒド、ヘキサメチレンジイソシアナート、トリレンジイソシアネート、メターキシリレンジイソシアネート、シクロヘキシルメタン-4, 4-ジイソシアネートなどのイソシアネート、およびこれらの化合物の誘導体が挙げられる。

【0260】

本明細書で使用する用語「求核基 (nucleophilic group)」、「求核剤 (nucleophile)」などは、共有結合を形成することができる電子対を有する原子または原子団を指す。この種類の基は、アニオン性基として反応するイオン化可能な基であり得る。本明細書で使用される「求核基」には、ヒドロキシル、第一級アミン、第二級アミン、第三級アミン、およびチオールが含まれるが、これらに限定されない。

【0261】

一般に、炭素求電子剤は、炭素求核剤を含む相補的求核剤による攻撃を受けやすく、攻撃する求核剤は、求核剤と炭素求電子剤との間に新しい結合を形成するために、炭素求電子剤に電子対をもたらす。

【0262】

炭素求核試薬の非限定的な例としては、限定されないが、アルキル、アルケニル、アリールおよびアルキニルグリニャール (alkynyl Grignard)、有機リチウム、有機亜鉛、アルキル-、アルケニル-、アリール-およびアルキニル-スズ試薬 (オルガノスタンナン)、アルキル-、アルケニル-、アリール-およびアルキニル-ボラン試薬 (オルガノボラン (organoborane) および有機ホウ酸塩 (organoboronate)) が挙げられ、これらの炭素求核試薬は、水または極性有機溶媒中で動力学的に安定であるという利点を有する。炭素求核試薬の他の非限定的な例としては、リンイリド、エノールおよびエノレート試薬が挙げられ、これらの炭素求核試薬は、合成有機化学の当業者に周知の前駆体から生成することが比較的容易であるという利点を有する。炭素求核試薬は、炭素求電子試薬と併せて使用される場合、炭素求核試薬と炭素求電子試薬との間に新しい炭素-炭素結合を生じさせる。

【0263】

炭素求電子剤へのカップリングに適した非炭素求核剤の非限定的な例としては、第一級

10

20

30

40

50

および第二級アミン、チオール、チオレート、およびチオエーテル、アルコール、アルコキシド、アジド、セミカルバジドなどが挙げられるが、これらに限定されない。これらの非炭素求核試薬は、炭素求電子試薬と併せて使用される場合、典型的には、ヘテロ原子連結 ($C-X-C$) を生成し、ここで、 X はヘテロ原子であり、酸素、硫黄、または窒素を含むが、これらに限定されない。

【0264】

いくつかの場合において、本明細書で使用されるポリマーは、一端がヒドロキシまたはメトキシで終端し、すなわち、 X は H または CH_3 (「メトキシPEG (methoxy PEG)」) である。あるいは、ポリマーは、反応基で終端し、それによって二官能性ポリマーを形成することができる。典型的な反応基は、20個の共通アミノ酸 (マレイミド基、活性化カーボネート (p-ニトロフェニルエステルを含むが、これらに限定されない)、活性化エステル (N-ヒドロキシスクシンイミド、p-ニトロフェニルエステルを含むが、これらに限定されない) およびアルデヒドを含むが、これらに限定されない) に見られる官能基と反応させるために通常使用される反応基、ならびに20個の共通アミノ酸に対して不活性であるが、相補的官能基 (アジド基、アルキン基を含むが、これらに限定されない) と特異的に反応する官能基を含むことができる。上記式において Y で示されるポリマーの他方の末端は、アミノ酸を介して標的化ドメインに直接的または間接的に結合することに留意されたい。例えば、 Y は、ポリペプチドのアミン基 (リジンのイプシロンアミンまたはN末端を含むが、これらに限定されない) へのアミド、カルバメートまたは尿素結合である。あるいは、 Y は、チオール基 (システインのチオール基を含むが、これに限定されない) へのマレイミド結合である。あるいは、ポリマー上のアルキン基は、標的化ドメインに存在するアジド基と反応し、同様の生成物を形成することができる。いくつかの実施形態では、強力な求核試薬 (ヒドラジン、ヒドラジド、ヒドロキシルアミン、セミカルバジドを含むが、これらに限定されない) を標的化ドメインに存在するアルデヒドまたはケトン基と反応させて、適用可能な場合、ヒドラゾン、オキシムまたはセミカルバゾンを形成することができ、これは、いくつかの場合では、適切な還元剤で処置することによってさらに還元することができる。あるいは、強力な求核試薬を、アミノ酸を介して標的化ドメインに組み込み、水溶性ポリマー中に存在するケトン基またはアルデヒド基と優先的に反応させるために使用することができる。

【0265】

約0.1ダルトン (Da) ~ 2,500 Da 以上を含むがこれらに限定されない、ポリマーの任意の分子量は、実用的に所望されるように使用することができる。ポリマーの分子量は、約100 Da ~ 約5,000 Da またはそれ以上を含むがこれらに限定されない、広範囲であり得る。いくつかの例では、ポリマーは、50 ~ 5000 Da、50 ~ 3000 Da、50 ~ 2500 Da、100 ~ 2500 Da、250 ~ 2500 Da、250 ~ 5000 Da、または500 ~ 5000 Da である。分岐鎖ポリマーとしては、各鎖が0.1 ~ 5 kDa、0.1 ~ 4 kDa、0.1 ~ 3 kDa、0.1 ~ 2.5 kDa、0.1 ~ 1.5 kDa の範囲の分子量を有するポリマー分子が挙げられるが、これらに限定されない。

【0266】

ポリマーは、約800 Da ~ 約100,000 Da の平均分子量を有する水溶性ポリマー骨格を含む、アザイドおよびアセチレン含有ポリマー誘導体を含み得る。水溶性ポリマーのポリマー骨格はポリ (エチレングリコール) であり得る。しかしながら、限定されないが、ポリ (エチレン) グリコールならびにポリ (デキストラン) およびポリ (プロピレングリコール) を含む他の関連ポリマーを含む多種多様な水溶性ポリマーもまた、PEG またはポリ (エチレングリコール) という用語の使用は、全てのそのような分子すべてを包含し含めることを意図していることを理解すべきである。PEG という用語には、二官能性PEG、マルチアームPEG、誘導体化PEG、フォークPEG、分岐型PEG、ペンダントPEG (すなわち、PEG、またはポリマー骨格にペンダントする1つ以上の官能基を有する関連ポリマー)、またはその中に分解性連結を有するPEGを含む、その形

態のいずれかのポリ（エチレングリコール）が含まれるが、これらに限定されない。

【0267】

ポリマーのこれらの形態に加えて、ポリマーはまた、骨格中に弱いまたは分解性連結を用いて調製され得る。例えば、ポリマーは、加水分解を受けるポリマー骨格中のエステル結合を用いて調製することができる。以下に示すように、この加水分解は、ポリマーのより低い分子量の断片への切断をもたらす： $\text{ポリマー}-\text{CO}_2-\text{ポリマー}+\text{H}_2\text{O}\rightarrow\text{polymer}-\text{CO}_2\text{H}+\text{HO}-\text{ポリマー}$ 。

【0268】

リンカーは、水溶性骨格を含むものなどのポリマーを含み得る。いくつかの実施形態では、水溶性であるポリマー骨格は、2～約300個の末端を含む。適切な高分子の例としては、ポリ（プロピレングリコール）（「PPG」）、そのコポリマー（エチレングリコールおよびプロピレングリコールのコポリマーを含むがこれらに限定されない）、そのターポリマー（terpolymer）、その混合物等など、他のポリ（アルキレングリコール）が挙げられるが、これらに限定されない。ポリマー骨格の各鎖の分子量は変化し得るが、典型的には約800Da～約100,000Da、しばしば約6,000Da～約80,000Daの範囲である。ポリマー骨格の各鎖の分子量は、約100Da～約100,000Daであり得、100,000Da、95,000Da、90,000Da、85,000Da、80,000Da、75,000Da、70,000Da、65,000Da、60,000Da、55,000Da、50,000Da、45,000Da、40,000Da、35,000Da、30,000Da、25,000Da、20,000Da、15,000Da、10,000Da、9,000Da、8,000Da、7,000Da、6,000Da、5,000Da、4,000Da、3,000Da、2,000Da、1,000Da、900Da、800Da、700Da、600Da、500Da、400Da、300Da、200Da、および100Daを含むが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、ポリマー骨格の各鎖の分子量は、約100Da～約50,000Daである。いくつかの実施形態では、ポリマー骨格の各鎖の分子量は、約100Da～約40,000Daである。いくつかの実施形態では、ポリマー骨格の各鎖の分子量は、約1000Da～約40,000Daである。いくつかの実施形態では、ポリマー骨格の各鎖の分子量は、約50,000Da～約40,000Daである。いくつかの実施形態では、ポリマー骨格の各鎖の分子量は、約10,000Da～約40,000Daである。

【0269】

適切な生理学的に切断可能な結合としては、エステル、カルボネートエステル、カルバマート、スルファート、リン酸塩、アシルオキシアルキルエーテル、アセタールおよびケタールが挙げられるが、これらに限定されない。このようなコンジュゲートは、保存時および投与時に安定である、生理学的に切断可能な結合を有する必要がある。例えば、ポリマーに連結された標的化ドメインまたは修飾された標的化ドメインは、最終医薬組成物の製造時、適切な送達ビヒクル（使用される場合）への溶解時、および経路に関係なく投与時に、その完全性を維持する必要がある。

【0270】

本発明はまた、参照により本明細書に組み込まれるUS2017/0182181に開示される薬物コンジュゲートの細胞内送達のための調整可能な安定性を有するリン酸系ベースリンカーを含む。リン酸ベースリンカーは、遠位から近位方向にチューニング要素、任意選択でスペーサー要素、および反応性官能基を含むリンカーアームの遠位端に共有結合的に連結されたモノホスフェート、ジホスフェート、トリホスフェートまたはテトラリン酸基（リン酸基）を含む。リン酸ベースリンカーのリン酸基はペイロードにコンジュゲートすることができ、反応性官能基は抗体などの細胞特異的標的化リガンドにコンジュゲートすることができる。リン酸ベースリンカーの一般的な構造は以下：

Phosphate group-Tuning element-Optional spacer element-Functional reactive group

であり、ペイロードにコンジュゲートしたリン酸ベースリンカーは、以下の一般構造：
Payload-Phosphate group-Tuning element-Optional spacer element-Functional reactive groupを有し、かつ、標的化リガンドにコンジュゲートされる場合、一般構造
Payload-Phosphate group-Tuning element-Optional spacer element-Targeting ligandを
有する。これらのリン酸塩ベースのリンカーは、血液中と細胞内環境（例えば、リソソームコンパートメント）とで、差別化された調整可能な安定性を有する。リン酸基が細胞内環境で切断されてペイロードをその天然または活性形態で放出する速度は、調整要素の構造によって影響され得、さらなる効果は、リン酸基の置換によって媒介され、ならびにリン酸基がモノホスフェート、ジホスフェート、トリホスフェートであるか、またはテトラリン酸であるかによって媒介される。さらに、これらのリン酸ベースリンカーは、本明細書に開示されるリン酸ベースリンカーではないリンカーを使用して、同じペイロードが抗体または標的リガンドにコンジュゲートされるコンジュゲートと比較して、コンジュゲートが凝集体を形成する傾向が低減される、抗体-薬物コンジュゲートなどのコンジュゲートを構築する能力を提供する。

10

【0271】

いくつかの例では、標的化ドメインは、本明細書に記載される方法を介して水溶性ポリマーを介してペイロードに連結される。いくつかの実施形態では、方法は、反応性アミノ酸側鎖を含む単離された標的化ドメインをリンカーと接触させる工程を含む。いくつかの例では、コンジュゲートは、標的化ドメイン上に存在する官能基をリンカー上に存在する反応性基と反応させることによって合成される。いくつかの例では、コンジュゲートは、リンカー上に存在する官能基をペイロード上に存在する反応基と反応させることによって合成される。いくつかの例では、ペイロード-リンカー部分は、標的化ドメインにコンジュゲートされる。いくつかの例では、標的化ドメイン-リンカー部分は、ペイロードにコンジュゲートされる。いくつかの実施形態では、標的化ドメインは、水溶性ポリマーを含むリンカーに連結される。

20

【0272】

他の実施形態では、標的化ドメインは、リンカーによってペイロードにコンジュゲートされる。いくつかの例では、リンカーは、ポリマーを含む。いくつかの実施形態では、標的化ドメインは、直接あるいは間接的にリンカー、ポリマー、または生物活性分子にコンジュゲートされる。いくつかの実施形態では、リンカーは、切断可能または切断不可能なリンカーである。

30

【0273】

いくつかの実施形態では、リンカーは、0.1 kDa~5 kDaである。他の実施形態では、リンカーは、0.1 kDa~2.5 kDaである。他の実施形態において、リンカーまたはポリマーは、直鎖、分枝鎖、多量体、またはデンドリマーである。別の実施形態では、リンカーまたはポリマーは、二官能性もしくは多官能性リンカーまたは二官能性もしくは多官能性ポリマーである。

【0274】

他の実施形態において、ポリマーは、水溶性ポリマーである。他の実施形態では、水溶性ポリマーはポリエチレングリコール（PEG）である。いくつかの実施形態では、PEGは、0.1 kDa~10 kDaの分子量を有する。他の実施形態では、PEGは、0.1 kDa~5 kDaの分子量を有する。他の実施形態では、PEGは、0.1 kDa~4 kDaの分子量を有する。他の実施形態では、PEGは、0.1 kDa~3 kDaの分子量を有する。他の実施形態では、PEGは、0.1 kDa~2 kDaの分子量を有する。他の実施形態では、PEGは、0.1 kDa~2.5 kDaの分子量を有する。いくつかの実施形態では、ポリ（エチレングリコール）は、約0.1 kDa~10 kDaの分子量を有する。いくつかの実施形態では、ポリ（エチレングリコール）は、0.1 kDa~50 kDaの分子量を有する。いくつかの実施形態では、ポリ（エチレングリコール）は、

40

50

0.1 kDa～2.5 kDa、または0.2～2.2 kDa、または0.5 kDa～2 kDaの分子量を有する。例えば、ポリ（エチレングリコール）ポリマーの分子量は、いくつかの例において、約0.5 kDa、または約1 kDa、または約2 kDa、または約2.5 kDaである。例えば、ポリ（エチレングリコール）ポリマーの分子量は、いくつかの例において、0.1 kDa、または0.5 kDa、または1 kDa、2.5 kDaである。いくつかの実施形態では、ポリ（エチレングリコール）分子は分岐型PEGである。いくつかの実施形態では、ポリ（エチレングリコール）分子は分岐型1KPEGである。いくつかの実施形態では、ポリ（エチレングリコール）分子は分岐型2.5KPEGである。いくつかの実施形態では、ポリ（エチレングリコール）分子は分岐型5KPEGである。いくつかの実施形態では、ポリ（エチレングリコール）分子は直鎖型PEGである。いくつかの実施形態では、ポリ（エチレングリコール）分子は直鎖型2.5KPEGである。いくつかの実施形態では、ポリ（エチレングリコール）分子は直鎖型10KPEGである。いくつかの実施形態では、ポリ（エチレングリコール）分子は直鎖型2KPEGである。いくつかの実施形態では、ポリ（エチレングリコール）分子は直鎖型0.5KPEGである。いくつかの実施形態では、ポリ（エチレングリコール）ポリマーの分子量は、平均分子量である。特定の実施形態では、平均分子量は、数平均分子量（Mn）である。平均分子量は、GPCまたはSEC、SDS/PAGE分析、RP-HPLC、質量分析、またはキャピラリー電気泳動を用いて決定または測定することができる。

10

【0275】

処置方法

20

本明細書に記載されるコンジュゲートは、疾病および／または疾患を処置するために使用され得る。いくつかの例では、疾患は増殖性疾患を含む。いくつかの例では、増殖性疾患はがんを含む。いくつかの例では、がんは1つ以上の腫瘍を含む。いくつかの例では、がんは固形または液性腫瘍を含む。いくつかの例では、コンジュゲートは、腫瘍細胞などの急速に分裂する細胞を死滅させるかまたはその増殖を阻害するために投与される。いくつかの例では、増殖性疾患または疾病を処置する必要のある対象において増殖性疾患または疾病を処置する方法は、対象に、本明細書に記載のコンジュゲートを治療有効量で投与する工程を含む。いくつかの実施形態では、増殖性疾患または疾病は、がんである。いくつかの実施形態では、がんは、固形腫瘍がんである。いくつかの実施形態では、固形腫瘍がんは、膀胱がん、骨がん、脳腫瘍、乳がん、結腸直腸がん、食道がん、眼がん、頭頸部がん、腎臓がん、肺がん、黒色腫、卵巣がん、膵臓がん、または前立腺がんである。いくつかの例では、疾患は、PCa（前立腺がん）、CRPCa（去勢抵抗性前立腺がん）、固形腫瘍（新生血管）、NSCLC（非小細胞肺癌）、HNSCC（頭頸部扁平上皮がん）、ESCC（食道がん）、GC（胃がん）、CRC（結腸直腸がん）、SCLC（小細胞肺癌）、MPM（中皮腫）、PDAC（膵管腺がん）、ALL（急性リンパ芽球性白血病）、AML（急性骨髄性白血病）、MDS（骨髄異形成症候群）、MSI-high tumor、黒色腫、DLBCL（びまん性大細胞型B細胞リンパ腫）、子宮内膜がん、子宮頸がん、膀胱がん、BrCa（乳がん）、TNBC（トリプルネガティブ乳がん）、NE-PCa（神経内分泌前立腺がん）、GBM（膠芽腫）、およびRCC（腎細胞がん）を含む。

30

40

【0276】

いくつかの例では、本明細書において標的とされる腫瘍細胞は、1つ以上の標的を過剰発現する。いくつかの例では、標的は表面マーカーまたは受容体を含む。

いくつかの例では、標的は、PSMA、EGFR、EGFRviii、MSLN、CEA、DLL3、FAP、CD33、HER3、PD-L1、EphA2、EphA4、HER2、SIRPa、DLK1、Muc16、LRP5、LRP6、endol80、LIV-1、SLAMF7、PTK7、GPR20、CDH6、CSP-1、CD71、PRLR、SEZ6、DLL1、NOTCH3 rec、NaPi2b、CD16、GCC、SSTR2、CAIX、CAXII、MC1R、CXCR4、B1R、GRPR、STEAP1、CD70、CD46、CD166、CLL-1、ADAM9、cKIT、CD3

50

6、CD73、ITGaVb3、ITGaVb6、GPC-1、CD38、CD51、FGFR3、Ly6E、CD44v6、ENPP3、CXCR3、CXCR5、FcRH5、VEGF、VEGFR2、CD45、CCR4、CD25、5T4、ROR1、TROP-2、NECTIN4、cMET、CD19、CD22、CD30、CD33、CD123、BCMA、CD79b、AXL、RON、B7-H3、B7-H4、KAG1、Muc1、ADAM-9、GPNMB、EDBフィブロネクチン、組織因子、GPNMB、FolRa、ALPP、ALPPL2、MT1-MMP、CLDN18.2、CLDN6、CLDN9、pカドヘリン、CEACAM6、CD47、およびEpCAMのうちの1つ以上から選択される。いくつかの例では、標的は、PSMA、EGFR、EGFRviii、MSLN、CEA、DLL3、FAP、CD33、HER3、PD-L1、EphA2、EphA4、HER2、SIRPa、DLK1、Muc16、LRP5、LRP6、endol80、LIV-1、SLAMF7、PTK7、GPR20、CDH6、CSP-1、CD71、PRLR、SEZ6、DLL1、NOTCH3 rec、Napi2b、CD16、GCC、SSTR2、CAIX、CAXII、MC1R、CXCR4、B1R、GRPR、STEAP1、CD70、CD46、CD166、CLL-1、ADAM9、cKIT、CD36、CD73、ITGaVb3、ITGaVb6、GPC-1、CD38、CD51、FGFR3、Ly6E、CD44v6、ENPP3、CXCR3、CXCR5、FcRH5、VEGF、VEGFR2、CD45、CCR4、CD25、5T4、ROR1、TROP-2、NECTIN4、cMET、CD19、CD22、CD30、CD33、CD123、BCMA、CD79b、AXL、RON、B7-H3、B7-H4、KAG1、Muc1、ADAM-9、GPNMB、EDBフィブロネクチン、組織因子、GPNMB、FolRa、ALPP、ALPPL2、MT1-MMP、CLDN18.2、CLDN6、CLDN9、pカドヘリン、CEACAM6、CD47、およびEpCAMのうちの2つ以上から選択される。いくつかの例では、コンジュゲートが腫瘍細胞上の1つ以上の標的に結合し、ペイロードが腫瘍細胞を死滅させる、腫瘍細胞の増殖を阻害する、または遅らせる場合、コンジュゲートは腫瘍細胞にペイロードをもたらす。

10

20

30

40

【0277】

いくつかの例では、本明細書のコンジュゲートは、特定の細胞または細胞群を造影するために投与される。いくつかの場合では、細胞または細胞群は、腫瘍細胞であるか、または腫瘍微小環境に存在する。いくつかの例では、コンジュゲートが腫瘍細胞上の1つ以上の標的に結合し、ペイロードが造影剤（視覚色素または放射性標識など）である場合、コンジュゲートは腫瘍細胞にペイロードをもたらし、腫瘍細胞は、コンジュゲートと腫瘍細胞との付着の結果として造影される。

【0278】

医薬組成物は、処置（または予防）される疾患に適切な様式で投与される。適切な用量ならびに適切な投与の持続時間および頻度は、患者の疾病、患者の疾患の種類および重症度、活性成分の特定の形態、ならびに投与方法などの因子によって決定される。一般に、適切な用量および処置レジメンは、治療的および／もしくは予防的利益（例えば、改善された臨床転帰）、または症状の重症度の軽減を提供するのに十分な量で組成物を提供する。最適用量は、概して、実験モデルおよび／または臨床試験を使用して決定される。最適用量は、患者の体重、体重、または血液量に依存する。

【0279】

一実施形態では、本明細書に記載される注射可能な医薬組成物は、開示されるコンジュゲートの注射可能な医薬組成物のいずれか1つの投与から利益を得るであろう哺乳動物における疾患または疾病の処置のための医薬の調製に使用される。そのような処置を必要としている哺乳動物において本明細書に記載される疾患または疾病のいずれかを処置するための方法は、本明細書に記載される少なくとも1つの化合物、あるいはその薬学的に許容可能な塩、活性代謝物、プロドラッグ、または薬学的に許容可能な溶媒和物を、治療有効量で前記哺乳動物に投与する工程を含む。

50

【0280】

特定の実施形態では、本明細書に記載される化合物を含有する組成物は、予防的および／または治療的な処置のために投与される。特定の治療用途では、組成物は、疾患または疾病の症状の少なくとも1つを治療するか、または少なくとも部分的に阻止するのに十分な量で、疾患または疾病に既に苦しんでいる患者に投与される。この使用に有効な量は、疾患または疾病の重症度および経過、以前の治療、患者の健康状態、体重、および薬物に対する反応、ならびに処置担当医の判断に依存する。治療有効量は、限定されないが、用量漸増および／または用量決定臨床試験を含む方法によって任意選択で決定される。

【0281】

予防的な用途では、本明細書に記載される化合物を含有する組成物は、特定の疾患、障害、または疾病になりやすい、あるいはそのリスクのある患者に投与される。このような量は、「予防的に有効な量または用量」とであると定義される。この使用において、正確な量は患者の健康状態、体重などにも依存する。患者に使用される際、この用途のための有効量は、疾患、障害、または疾病の重症度および経過、以前の治療、患者の健康状態および薬物に対する反応、ならびに処置担当医の判断に依存する。1つの態様では、予防処置は、疾患または疾病の症状の再発を防ぐために、処置されている疾患の少なくとも1つの症状を以前に経験し、現在寛解期にある哺乳動物に、本明細書に記載される化合物またはその薬学的に許容可能な塩を含む医薬組成物を投与する工程を含む。

10

【0282】

ある特定の実施形態では、化合物の投与は、患者の疾患または疾病の症状を改善するか、またはそうでなければ制御もしくは制限するために、慢性的に、すなわち、患者の生涯にわたるものを含む長期間にわたって投与される。

20

【0283】

製造の方法

本明細書に記載されるコンジュゲートは、*in-vivo*法もしくは*in-vitro*法、または方法の組み合わせを使用して合成され得る。いくつかの場合では、方法は*in-vivo*法である。いくつかの場合では、方法は*in-vitro*法である。いくつかの例では、非天然アミノ酸を含む標的化ドメインは、*in-vivo*で合成され、ペイロードは、*in-vitro*での化学的方法を用いて付着される。

【0284】

いくつかの場合では、方法は*ex vivo*法である。いくつかの場合では、天然アミノ酸変異または非天然アミノ酸変異を含む本明細書に記載されるコンジュゲートは、組換えによって産生されるか、または化学的に合成される。いくつかの場合では、本明細書に記載される標的化ドメインは、組換えによって、例えば、宿主細胞系によって、または無細胞系において産生される。

30

【0285】

一般に、非標準アミノ酸を含む標的ポリペプチドを作製する方法は公知である。いくつかの場合では、非天然アミノ酸に同族のアミノアシルtRNA合成酵素／tRNA対は、それが使用される細胞の細胞成分に対して直交する。外因性アミノアシルtRNAシンターゼ／tRNA対の直交性（したがって適合性）は、宿主生物の種類に依存する。4つの主要な直交アミノアシルtRNAシンターゼ：Methanococcus janaschiiチロシル-tRNAシンターゼ（MjTyrRS）／tRNA_{CUA}対、Escherichia coliチロシル-tRNAシンターゼ（EcTyrRS）／tRNA_{CUA}対、大腸菌ロイシルtRNAシンターゼ（EcLeuRS）／tRNA_{CUA}対、および特定のMethanosarcinaからのピロリシルtRNAシンターゼ（PyLRS）／tRNA_{CUA}（tRNA^{PyL}）対が遺伝コード拡張のために開発された。PyLRS／tRNA_{CUA}対は、細菌、真核細胞、および動物において直交性である（例えば、Chin, Jason W. 「Expanding and reprogramming the genetic code of cells and animals」, Annual review of biochemist

40

50

ry 83 (2014) : 379-408を参照されたい)。

【0286】

いくつかの場合において、本明細書において提供される非天然アミノ酸(UAA)は、ピロリシル-tRNA合成酵素(tRNA^{pyl})を使用して組み込まれる。非天然アミノ酸(UAA)は、翻訳に使用され得るように、転移RNA分子(tRNA)上に導入される。しかしながら、tRNAへの非天然アミノ酸の結合は、必ずしも天然アミノアシルtRNAシンテターゼによって達成されない場合もあり得る。したがって、作製されたtRNA^{pyl}突然変異体ライブラリーから調製および選択された操作されたtRNA^{pyl}などの操作されたアミノアシルtRNAシンテターゼは、所望のUAAをtRNAに付着させて、所望のUAAを突然変異誘発に組み込むことができるようにするために有用であり得る。

10

【0287】

いくつかの場合では、本明細書で提供される非天然アミノ酸(UAA)は、ピロリシル-tRNAシンテターゼ(tRNA^{pyl})を使用して組み込まれる。非天然アミノ酸(UAA)は、翻訳に使用され得るように、転移RNA分子(tRNA)上に導入される。しかし、tRNAへの非天然アミノ酸の付着は、必ずしも天然に存在するアミノアシルtRNAシンテターゼによって達成され得るとは限らない。したがって、生成されたtRNA^{pyl}突然変異体ライブラリーから調製および選択された、操作されたtRNA^{pyl}などの操作されたアミノアシル-tRNAシンテターゼは、所望のUAAが突然変異誘発に組み込まれ得るように、所望のUAAをtRNAに付着させるために有用であり得る。

20

【0288】

いくつかの実施形態では、本明細書に提供されるUAA(例えば、式(IA)のUAA)は、そのようなUAAを付着させることができる操作された変異体tRNA^{pyl}変異体を用いてtRNAに結合することができる。いくつかの実施形態では、突然変異体tRNA^{pyl}変異体は、1つのアミノ酸突然変異を導入する(例えば、UAAを組み込む)。他の実施形態では、変異tRNA^{pyl}変異体は、複数のアミノ酸変異を導入する。いくつかの実施形態では、tRNA^{pyl}変異体のライブラリーを調製し、当業者がスクリーニングして、所望のUAAの付着に適切なtRNA^{pyl}変異体を選択する。いくつかの実施形態では、本明細書に提供される、コンジュゲートにUAAを導入するために使用されるtRNA^{pyl}変異体は、US8,735,093、US9,133,449、WO2020206341に記載されるtRNA^{pyl}変異体であり、これらの文献のそれぞれは参照により本明細書に組み込まれる。

30

【0289】

様々な実施形態では、変異体ピロリシルtRNAシンテターゼが使用され得る。変異体ピロリシル-tRNA合成酵素は、*Methanosarcina barkeri*、*Methanosarcina mazei*、*Methanosarcina alvus*、もしくは*Methanosarcina jannaschii*由来のピロリシル-tRNA合成酵素、またはそのキメラに由来するか、またはそれらの変異体であり得る。

【0290】

いくつかの実施形態では、本明細書において提供される変異体ピロリシルtRNA合成酵素は、変異体ピロリシルtRNA合成酵素の基質結合部位内に少なくとも5個のアミノ酸残基置換を含む。いくつかの実施形態では、変異体ピロリシルtRNAシンテターゼは、配列番号90のアミノ酸配列中に少なくとも5個のアミノ酸残基置換を含む。いくつかの実施形態では、基質結合部位は、配列番号90のアミノ酸配列に示される302位のアラニン、305位のロイシン、306位のチロシン、309位のロイシン、322位のイソロイシン、346位のアスパラギン、348位のシステイン、384位のチロシン、401位のバリン、および417位のトリプトファンの残基を含む。いくつかの実施形態では、少なくとも5個のアミノ酸残基置換は、配列番号90のアミノ酸配列に示される、302位のアラニンの置換、346位のアスパラギンの置換、348位のシステインの置換、384位のチロシンの置換、および417位のトリプトファンの置換から選択される。

40

50

いくつかの実施形態では、少なくとも5つのアミノ酸残基置換は、配列番号90のアミノ酸配列に示される、302位のアラニンのイソロイシン、346位のアスパラギンのトレオニン、348位のシステインのイソロイシン、384位のチロシンのロイシン、および417位のトリプトファンのリジンである。

【0291】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される変異体ピロリシル tRNA 合成酵素は、配列番号84のアミノ酸配列を有する。いくつかの実施形態では、変異体ピロリシル tRNA 合成酵素は、配列番号84のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、変異体ピロリシル tRNA 合成酵素は、配列番号84に対して少なくとも80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性を有するアミノ酸配列を有する。いくつかの実施形態では、変異体ピロリシル tRNA 合成酵素は、配列番号84に対して少なくとも80%の同一性を有するアミノ酸配列を有する。いくつかの実施形態では、変異体ピロリシル tRNA 合成酵素は、配列番号84に対して少なくとも85%の同一性を有するアミノ酸配列を有する。いくつかの実施形態では、変異体ピロリシル tRNA 合成酵素は、配列番号84に対して少なくとも90%の同一性を有するアミノ酸配列を有する。いくつかの実施形態では、変異体ピロリシル tRNA 合成酵素は、配列番号84に対して少なくとも91%の同一性を有するアミノ酸配列を有する。いくつかの実施形態では、変異体ピロリシル tRNA 合成酵素は、配列番号84に対して少なくとも92%の同一性を有するアミノ酸配列を有する。いくつかの実施形態では、変異体ピロリシル tRNA 合成酵素は、配列番号84に対して少なくとも93%の同一性を有するアミノ酸配列を有する。いくつかの実施形態では、変異体ピロリシル tRNA 合成酵素は、配列番号84に対して少なくとも94%の同一性を有するアミノ酸配列を有する。いくつかの実施形態では、変異体ピロリシル tRNA 合成酵素は、配列番号84に対して少なくとも95%の同一性を有するアミノ酸配列を有する。いくつかの実施形態では、変異体ピロリシル tRNA 合成酵素は、配列番号84に対して少なくとも96%の同一性を有するアミノ酸配列を有する。いくつかの実施形態では、変異体ピロリシル tRNA 合成酵素は、配列番号84に対して少なくとも97%の同一性を有するアミノ酸配列を有する。いくつかの実施形態では、変異体ピロリシル tRNA 合成酵素は、配列番号84に対して少なくとも98%の同一性を有するアミノ酸配列を有する。いくつかの実施形態では、変異体ピロリシル tRNA 合成酵素は、配列番号84に対して少なくとも99%の同一性を有するアミノ酸配列を有する。

【0292】

いくつかの実施形態では、本明細書で提供される変異体ピロリシル tRNA 合成酵素は、配列番号87のアミノ酸配列を有する。いくつかの実施形態では、変異体ピロリシル tRNA 合成酵素は、配列番号87のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、変異体ピロリシル tRNA 合成酵素は、配列番号87に対して少なくとも80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性を有するアミノ酸配列を有する。いくつかの実施形態では、変異体ピロリシル tRNA 合成酵素は、配列番号87に対して少なくとも80%の同一性を有するアミノ酸配列を有する。いくつかの実施形態では、変異体ピロリシル tRNA 合成酵素は、配列番号87に対して少なくとも85%の同一性を有するアミノ酸配列を有する。いくつかの実施形態では、変異体ピロリシル tRNA 合成酵素は、配列番号87に対して少なくとも90%の同一性を有するアミノ酸配列を有する。いくつかの実施形態では、変異体ピロリシル tRNA 合成酵素は、配列番号87に対して少なくとも91%の同一性を有するアミノ酸配列を有する。いくつかの実施形態では、変異体ピロリシル tRNA 合成酵素は、配列番号87に対して少なくとも92%の同一性を有するアミノ酸配列を有する。いくつかの実施形態では、変異体ピロリシル tRNA 合成酵素は、配列番号87に対して少なくとも93%の同一性を有するアミノ酸配列を有する。いくつかの実施形態では、変異体ピロリシル tRNA 合成酵素は、配列番号87に対して少なくとも9

10

20

30

40

50

10

20

30

40

50

ドされる。いくつかの実施形態では、変異体ピロリシル tRNA 合成酵素は、配列番号 91 に対して少なくとも 80 %、85 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、または 100 % 同一である核酸配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、変異体ピロリシル tRNA シンターゼは、配列番号 91 に対して少なくとも 80 % 同一である核酸配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、変異体ピロリシル tRNA シンターゼは、配列番号 91 に対して少なくとも 85 % 同一である核酸配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、変異体ピロリシル tRNA シンターゼは、配列番号 91 に対して少なくとも 90 % 同一である核酸配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、変異体ピロリシル tRNA シンターゼは、配列番号 91 に対して少なくとも 91 % 同一である核酸配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、変異体ピロリシル tRNA シンターゼは、配列番号 91 に対して少なくとも 92 % 同一である核酸配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、変異体ピロリシル tRNA シンターゼは、配列番号 91 に対して少なくとも 93 % 同一である核酸配列によってコードされる。

10

いくつかの実施形態では、変異体ピロリシル tRNA シンターゼは、配列番号 91 に対して少なくとも 94 % 同一である核酸配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、変異体ピロリシル tRNA シンターゼは、配列番号 91 に対して少なくとも 95 % 同一である核酸配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、変異体ピロリシル tRNA シンターゼは、配列番号 91 に対して少なくとも 96 % 同一である核酸配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、変異体ピロリシル tRNA シンターゼは、配列番号 91 に対して少なくとも 97 % 同一である核酸配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、変異体ピロリシル tRNA シンターゼは、配列番号 91 に対して少なくとも 98 % 同一である核酸配列によってコードされる。いくつかの実施形態では、変異体ピロリシル tRNA シンターゼは、配列番号 91 に対して少なくとも 99 % 同一である核酸配列によってコードされる。

20

【0297】

いくつかの例では、本明細書の変異体ピロリシル tRNA シンターゼに関連する配列は表 1 B にある。

【0298】

30

40

50

【表 3 - 1】

表 1B

配列 番号.	記述	配列
84	FSYRS のアミノ酸配列	MDKKPLNTLISATGLWMSRTGTIHKIKHHEVSRSKIYIEMA CGDHLVVNNSRSSRTARALRHHKYRKTCKRCRVSDLEDLN KFLTKANEDQTSVKVKVVSAPTRTKKAMPKSVARAPKPL ENTEAAQAQPSGSKFSPAIPVSTQESVSPASVSTSISSISTG ATASALVKGNTNPITSMASAPVQASAPALTKSQTDRLEVLL NPKDEISLNSGKPFRELESELLSRRKKDLQIYAEERENYL GKLEREITRFFVDRGFLEIKSPILIPLEYIERMGIDNDTELSK QIFRVDKNFCLRPMLIPNLNYLRKLDRALPDPIKIFEIGPC YRKESDGKEHLEEFMTLTFIQMGSCTRENLESIITDFLNH LGIDFKIVGDSCMVLGDTLDVMHGDLELSSAVVGPIPLDR EWGIDKPKIGA GFGLERLLKVKHDFKNIKRAARSESYYNGISTNL*
85	FSYRS の核酸 (DNA) 配列	ATGGATAAAAAGCCTTTGAACACTCTGATTTCTGCGACC GGTCTGTGGATGTCCCGCACCGGCACCATCCACAAAAT CAAACACCATGAAGTTAGCCGTTCCAAAATCTACATTG AAATGGCTTGC GGCGATCACCTGGTTGTCAACAACTCCC GTTCTTCTCGTACCGCTCGCGCACTGCGCCACCACAAAT ATCGCAAAACCTGCAAACGTTGCCGTGTTAGCGATGAG GACCTGAACAAATTCCTGACCAAAGCTAACGAGGATCA GACCTCCGTAAAAGTGAAGGTAGTAAGCGCTCCGACCC GTACTAAAAAGGCTATGCCAAAAAGCGTGGCCCGTGCC CCGAAACCTCTGGAACACCGAGGCGGCTCAGGCTCA ACCATCCGTTCTAAATTTTCTCCGGCGATCCCAGTGTC CACCCAAGAATCTGTTTCCGTACCAGCAAGCGTGTCTAC CAGCATTAGCAGCATTTCTACCGGTGCTACCGCTTCTGC GCTGGTAAAAGG TAACACTAACCCGATTACTAGCATGTCTGCACCGGTACA GGCAAGCGCCCCAGCTCTGACTAAATCCCAGACGGACC GTCTGGAGGTGCTGCTGAACCCAAAGGATGAAATCTCT CTGAACAGCGGCAAGCCTTTCCGTGAGCTGGAAAGCGA GCTGCTGTCTCGTCGTAAAAAGGATCTGCAACAGATCTA CGCTGAGGAACGCGAGAACTATCTGGGTAAGCTGGAGC GCGAAATTACTCGCTTCTTCGTGGATCGCGGTTTCTCGG AGATCAAATCTCCGATTCTGATTCCGCTGGAATACATTG AACGTATGGGCATCGATAATGATACCGAACTGTCTAAA CAGATCTTCCGTGTGGATAAAAACTTCTGTCTGCGTCCG ATGCTGATTCCGAACTTGTACAACTATTTACGTAAACTG GACCGTGCCCTGCCGACCCGATCAAAATATTCGAGAT CGGTCTTGCTACCGTAAAGAGTCCGACGGTAAAGAGC ACCTGGAAGAAT TCACCATGCTGACATTCATTGAGATGGGTAGCGGTTGCA CGCGTGAAAACCTGGAATCCATTATCACCGACTTCCTGA ATCACCTGGGTATCGATTTCAAATTTGTTGGTGACAGCT GTATGGTGTAGGCGATACGCTGGATGTTATGCACGGC

10

20

30

40

【 0 2 9 9 】

【表 3 - 2】

		GATCTGGAGCTGTCTTCCGCAGTTGTGGGCCCCAATCCCG CTGGATCGTGAGTGGGGTATCGACAAACCTAAAATCGG TGCGGGTTTTGGTCTGGAGCGTCTGCTGAAAGTAAAAC ACGACTTCAAGAACATCAAACGTGCTGCACGTTCCGAG TCCTATTACAATGGTATTTCTACTAACCTGTAA
86	pEVOL-FSYRS DNA 配列	ACTAGTATGGATAAAAAGCCTTTGAACACTCTGATTTCT GCGACCGGTCTGTGGATGTCCCGCACCGGCACCATCCA CAAAATCAAACACCATGAAGTTAGCCGTTCCAAAATCT ACATTGAAATGGCTTGCGGCGATCACCTGGTTGTCAACA ACTCCCGTTCTTCTCGTACCGCTCGCGCACTGCGCCACC ACAAATATCGCAAAACCTGCAAACGTTGCCGTGTTAGC GATGAGGACCTGAACAAATTCCTGACCAAAGCTAACGA GGATCAGACCTCCGTAAAAGTGAAGGTAGTAAGCGCTC CGACCCGTACTAAAAAGGCTATGCCAAAAAGCGTGGCC CGTGCCCCGAAACCTCTGGAAAACACCGAGGCGGCTCA GGCTCAACCATCCGTTCTAAATTTTCTCCGCGCATCCC AGTGTCCACCCAAGAATCTGTTTCCGTACCAGCAAGCGT GTCTACCAGCATTAGCAGCATTTCTACCGGTGCTACCGC TTCTGCGCTGGTAAAAGGTAACACTAACCCGATTACTAG CATGTCTGCACCGGTACAGGCAAGCGCCCCAGCTCTGA CTAAATCCCAGACGGACCGTCTGGAGGTGCTGCTGAAC CCAAAGGATGAAATCTCTCTGAACAGCGGCAAGCCTTT CCGTGAGCTGGAAAGCGAGCTGCTGTCTCGTCTGAAAA AGGATCTGCAACAGATCTACGCTGAGGAACGCGAGAAC TATCTGGGTAAGCTGGAGCGCGAAATTACTCGCTTCTTC GTGGATCGCGGTTTCCTGGAGATCAAATCTCCGATTCTG ATTCCGCTGGAATACATTGAACGTATGGGCATCGATAAT GATACCGAAGTGTCTAAACAGATCTTCCGTGTGGATAA AACTTCTGTCTGCGTCCGATGCTGATTCCGAACCTGTA CAACTATTTACGTAAACTGGACCGTGCCCTGCCGGACCC GATCAAAATATTCGAGATCGGTCCTTGCTACCGTAAAG AGTCCGACGGTAAAGAGCACCTGGAAGAATTCACCATG CTGACATTCATTAGATGGGTAGCGGTTGCACGCGTGA AAACCTGGAATCCATTATCACCGACTTCCTGAATCACCT GGGTATCGATTTCAAATTTGTTGGTGACAGCTGTATGGT GTTAGGCGATACGCTGGATGTTATGCACGGCGATCTGG AGCTGTCTTCCGCAGTTGTGGGCCCCAATCCCGCTGGATC GTGAGTGGGGTATCGACAAACCTAAAATCGGTGCGGGT TTTGGTCTGGAGCGTCTGCTGAAAGTAAAACACGACTTC AAGAACATCAAACGTGCTGCACGTTCCGAGTCCTATTAC AATGGTATTTCTACTAACCTGTAAGTCGACCATCATCAT CATCATCATTGAGTTTAAACGGTCTCCAGCTTGGCTGTT TTGGCGGATGAGAGAAGATTTTCAGCCTGATACAGATT AAATCAGAACGCAGAAGCGGTCTGATAAAACAGAATTT GCCTGGCGGCAGTAGCGCGGTGGTCCCACCTGACCCCA TGCCGAACCTCAGAAAGTGAACGCCGTAGCGCCGATGGT AGTGTGGGGTCTCCCATGCGAGAGTAGGGAAGTGC GGCATCAAATAAAACGAAAGGCTCAGTCGAAAGACTGG GCCTTGTTTGTGAGCTCCCGGTCATCAATCATCCCCATA ATCCTTGTTAGATTATCAATTTTAAAAAACTAACAGTTG TCAGCCTGTCCCGCTTAATATCATACGCCGTTATACGT

10

20

30

40

【0300】

【表 3 - 3】

	TGTTTACGCTTTGAGGAATCCCATATGATACGCGGCCGC TTTCAAACGCTAAATTGCCTGATGCGCTACGCTTATCAG GCCTACATGATCTCTGCAATATATTGAGTTTGCGTGCTT TTGTAGGCCCGGATAAGGCGTTCACGCCGCATCCGGCAA GAAACAGCAAACAATCCAAAACGCCGCGTTCAGCGGCG TTTTTCTGCTTTTCTTCGCGAATTAATTCCGCTTCGCAA CATGTGAGCACCGGTTTATTGACTACCGGAAGCAGTGT GACCGTGTGCTTCTCAAATGCCTGAGGCCAGTTTGCTCA GGCTCTCCCCGTGGAGGTAATAATTGACGATATGATCA GTGCACGGCTAACTAAGCGGCCTGCTGACTTTCTCGCCG ATCAAAAGGCATTTTGCTATTAAGGGATTGACGAGGGC GTATCTGCGCAGTAAGATGCGCCCCGCATTGGAAACCT GATCATGTAGATCGAATGGACTCTAAATCCGTTTCAGCCG GGTTAGATTCCCGGGGTTTCCGCCAAATTCGAAAAGCCT GCTCAACGAGCAGGCTTTTTTGCTGCTCGAGCAGCTCA GGGTGCAATTTGCTTTCGAATTTCTGCCATTCATCCGCTT ATTATCACTTATTCAGGCGTAGCAACCAGGCGTTTAAGG GCACCAATAACTGCCTTAAAAAAATTACGCCCCGCCCT GCCACTCATCGCAGTACTGTTGTAATTCATTAAGCATT TGCCGACATGGAAGCCATCACAAACGGCATGATGAACC TGAATCGCCAGCGGCATCAGCACCTTGTCGCCTTGCGTA TAATATTTGCCCATGGTGAAAACGGGGGCGAAGAAGTT GTCCATATTGGCCACGTTTAAATCAAACTGGTGAACT CAGGAGGATTGGCTGAGACGAAAAACATATTCTCAA TAAACCTTTAGGGAAATAGGCCAGGTTTTCACCGTAAC ACGCCACATCTTGCGAATATATGTGTAGAACTGCCGG AAATCGTCGTGGTATTCCTCCAGAGCGATGAAAACGT TTCAGTTTGCTCATGAAAACGGTGTAACAAGGGTGAA CACTATCCCATATCACCAGCTCACCGTCTTTCATTGCCA TACGGAATTCCGGATGAGCATTATCAGGCGGGCAAGA ATGTGAATAAAGGCCGGATAAACTTGTCCTTATTTTTC TTTACGGTCTTTAAAAAGGCCGTAAATCCAGCTGAACG GTCTGGTTATAGGTACATTGAGCAACTGACTGAAATGCC TCAAAATGTTCTTTACGATGCCATTGGGATATATCAACG GTGGTATATCCAGTGATTTTTTCTCCATTTTAGCTTCCT TAGCTCCTGAAAATCTCGATAACTCAAAAAATACGCC GGTAGTGATCTTATTTTATTATGGTGAAAGTTGGAACCT CTTACGTGCCGATCAACGTCTCATTTTCGCCAAAAGTTG GCCCAGGGCTTCCCGGTATCAACAGGGACACCAGGATT TATTTATTCTGCGAAGTGATCTTCCGTCACAGGTATTTA TTCGGCGCAAAGTGCGTCGGGTGATGCTGCCAACTTACT GATTTAGTGATGATGGTGTTTTTGAGGTGCTCCAGTGG CTTCTGTTTCTATCAGCTGTCCCTCCTGTTTCAGCTACTGA CGGGGTGGTGCGTAACGGCAAAAGCACCGCCGGACATC AGCGCTAGCGGAGTGTATACTGGCTTACTATGTTGGCAC TGATGAGGGTGTCAGTGAAGTGCTTCATGTGGCAGGAG AAAAAAGGCTGCACCGGTGCGTCAGCAGAATATGTGAT ACAGGATATATTCCGCTTCTCGCTCACTGACTCGCTAC GCTCGGTGCTTCGACTGCGGCGAGCGGAAATGGCTTAC GAACGGGGCGGAGATTTCTGGAAGATGCCAGGAAGAT ACTTAACAGGGAAGTGAGAGGGCCGCGGCAAGCCGTT	10
		20
		30
		40

【0301】

	TTTCCCATAGGCTCCGCCCCCTGACAAGCATACAGAAAT CTGACGCTCAAATCAGTGGTGGCGAAACCCGACAGGAC TATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGCGGCTCCCTCG TGCGCTCTCCTGTTCTCCTGCCTTTCGGTTTACCGGTGTCAT TCCGCTGTTATGGCCGCGTTTGTCTCATTCCACGCCTGA CACTCAGTTCGCGGTAGGCAGTTCGCTCCAAGCTGGACT GTATGCACGAACCCCCCGTTCAGTCCGACCGCTGCGCCT TATCCGGTAACATATCGTCTTGAGTCCAACCCGGAAAGAC ATGCAAAAGCACCACCTGGCAGCAGCCACTGGTAATTGA TTTAGAGGAGTTAGTCTTGAAGTCATGCGCCGGTTAAGG CTAAACTGAAAGGACAAGTTTTGGTGACTGCGCTCTCTCC AAGCCAGTTACCTCGGTTCAAAGAGTTGGTAGCTCAGA GAACCTTCGAAAAAACGCCCTGCAAGGCGGTTTTTTTCGT TTTCAGAGCAAGAGATTACGCGCAGACCAAAACGATCT CAAGAAGATCATCTTATTAATCAGATAAAATATTTCTAG ATTTCAGTGCAATTTATCTCTTCAAATGTAGCACCTGAA GTCAGCCCCATACGATATAAGTTGTAATTCTCATGTTTG ACAGCTTATCATCGATAAGCTTGGTACCCAATTATGACA ACTTGACGGCTACATCATTCACTTTTTCTTCACAACCGG CACGGAACCTCGCTCGGGCTGGCCCCGGTGCATTTTTTAA ATACCCGCGAGAAATAGAGTTGATCGTCAAAACCAACA TTGCGACCGACGGTGGCGATAGGCATCCGGGTGGTGCT CAAAAGCAGCTTCGCCTGGCTGATACGTTGGTCTCTCGCG CCAGCTTAAGACGCTAATCCCTAACTGCTGGCGGAAAA GATGTGACAGACGCGACGGCGACAAGCAAAACATGCTGT GCGACGCTGGCGATATCAAAATTGCTGTCTGCCAGGTG ATCGCTGATGTACTGACAAGCCTCGCGTACCCGATTATC CATCGGTGGATGGAGCGACTCGTTAATCGCTTCCATGCG CCGCAGTAACAATTGCTCAAGCAGATTTATCGCCAGCA GCTCCGAATAGCGCCCTTCCCCCTGCCCGGCGTTAATGA TTTGCCCAAACAGGTCGCTGAAATGCGGCTGGTGCGCTT CATCCGGGCGAAAGAACCCCGTATTGGCAAATATTGAC GGCCAGTTAAGCCATTCATGCCAGTAGGCGCGCGGACG AAAGTAAACCCACTGGTGATAACCATTGCGGAGCCTCCG GATGACGACCGTAGTGATGAATCTCTCTGCGGGGAAC AGCAAAATATCACTCGGTGGGCAAAACAATTCTCGTCC CTGATTTTTTACCACCCCCTGACCGCGAATGGTGAGATT GAGAATATAACCTTTTCAATCCCAGCGGTGCGTGCATAAA AAAATCGAGATAACCGTTGGCCTCAATCGGCGTTAAAC CCGCCACCAGATGGGCATTAAACGAGTATCCCGGCAGC AGGGGATCATTTTTCGCTTCAGCCATACTTTTCATACTC CCGCCATTGAGAGAAGAAACCAATTGTCCATATTGCATC AGACATTGCCGTCACTGCGTCTTTTACTGGCTCTTCTCG CTAACCAAACCGGTAACCCCGCTTATTAAGCAATTCTG TAACAAAGCGGGACCAAGCCATGACAAAAACGCGTA ACAAAAGTGCTATAATCACGGCAGAAAAGTCCACATT GATTATTTGCACGGCGTCACACTTTGCTATGCCATAGCA TTTTTATCCATAAGATTAGCGGATCCTACCTGACGCTTT TTATCGCAACTCTCTACTGTTTCTCCATACCCGTTTTTTT GGGCTAACAGGAGGAATT
--	--

40

【表 3 - 5】

87	FSKRS の アミノ酸配列	MTVKYTDAQIQRLREYNGNGTYEQKFEDLASRDAAFSKE MSVASTDNEKKIKGMIANPSRHGLTQLMNDIADALVAEGF IEVRTPIFISKDALARMTITEDKPLFKQVFWIDEKRALRPML APNLGSVARDLRDHTDGPVKIFEMGSCFRKESHSGMHLEE FTMLNLFDMGPRGDATEVLKNYISVVMKAAGLPDYDLVQ EESDVYKETIDVEINGQEVCSAAVGPTPIDAAHDVHEPWS GAGFGLERLLTIREKYSTVKKGGASISYLNKAKIN
88	FSKRS の核酸 (DNA) 配列	ATGACCGTGAAGTACACCGACGCCAGATCCAACGCCT GCGCGAGTATGGTAATGGCACCTATGAACAGAAAGTTT TTGAGGACCTGGCCAGCCGTGACGCCGCGTTCAGCAAG GAAATGAGCGTGGCCAGCACCGACAACGAGAAGAAAA TCAAGGGTATGATTGCCAATCCGAGCCGCCACGGCCTG ACCCAGCTGATGAACGACATCGCTGATGCCCTGGTGGC GGAGGGTTTCATTGAAGTGCGTACCCCGATCTTTATTAG CAAGGATGCGCTGGCTCGCATGACCATCACCGAAGACA AGCCGCTGTTCAAACAGGTGTTTTGGATTGATGAGAAA CGTGCCCTGCGCCCGATGCTGGCGCCAAACCTGGGTAG CGTGGCTCGTGACCTGCGCGATCACACCGACGGTCCGG TGAAAATCTTCGAAAATGGGCAGCTGCTTTCGTAAAGAG AGCCACAGCGGTATGCACCTGGAGGAGTTCACCATGCT GAATCTGTTTGATATGGGTCCGCGCGGCGACGCTACCG AAGTGCTGAAGAACTACATTAGCGTGGTGATGAAAGCT GCCGGCCTGCCGGACTACGATCTGGTGCAAGGAAGAGAG CGACGTGTACAAGGAAACCATCGACGTGGAAATTAACG GTCAGGAAGTGTGCAGCGCGGCTGTGGGTCCAACCTCT ATTGATGCGGCCCCATGACGTGCATGAGCCGTGGAGCGG TGCTGGTTTTGGCCTGGAACGTCTGCTGACCATCCGCGA GAAATACTCCACCGTGAAAAAGGGCGGCGCAAGCATCT CCTACCTGAATGGTGCCAAAATCAATTAA
89	pEVOL-FSKRS	ACTAGTATGACCGTGAAGTACACCGACGCCAGATCCA ACGCCTGCGCGAGTATGGTAATGGCACCTATGAACAGA AAGTTTTTGAGGACCTGGCCAGCCGTGACGCCGCGTTCA GCAAGGAAATGAGCGTGGCCAGCACCGACAACGAGAA GAAAATCAAGGGTATGATTGCCAATCCGAGCCGCCACG GCCTGACCCAGCTGATGAACGACATCGCTGATGCCCTG GTGGCGGAGGGTTTCATTGAAGTGCGTACCCCGATCTTT ATTAGCAAGGATGCGCTGGCTCGCATGACCATCACCGA AGACAAGCCGCTGTTCAAACAGGTGTTTTGGATTGATG AGAAACGTGCCCTGCGCCCGATGCTGGCGCCAAACCTG GGTAGCGTGGCTCGTGACCTGCGCGATCACACCGACGG TCCGGTGAAAATCTTCGAAATGGGCAGCTGCTTTCGTAA AGAGAGCCACAGCGGTATGCACCTGGAGGAGTTCACCA TGCTGAATCTGTTTGATATGGGTCCGCGCGGCGACGCTA CCGAAGTGCTGAAGAACTACATTAGCGTGGTGATGAAA GCTGCCGGCCTGCCGGACTACGATCTGGTGCAAGGAAGA GAGCGACGTGTACAAGGAAACCATCGACGTGGAAATTA ACGGTCAGGAAGTGTGCAGCGCGGCTGTGGGTCCAAC CCTATTGATGCGGCCCCATGACGTGCATGAGCCGTGGAG CGGTGCTGGTTTTGGCCTGGAACGTCTGCTGACCATCCG CGAGAAATACTCCACCGTGAAAAAGGGCGGCGCAAGCA TCTCCTACCTGAATGGTGCCAAAATCAATTAAGTCGACC

【 0 3 0 3 】

10

20

30

40

50

【表 3 - 6】

	ATCATCATCATCATCATTGAGTTTAAACGGTCTCCAGCT TGGCTGTTTTGGCGGATGAGAGAAGATTTTCAGCCTGAT ACAGATTAAATCAGAACGCAGAAAGCGGTCTGATAAAAC AGAATTTGCCTGGCGGCAGTAGCGCGGTGGTCCCACCT GACCCCATGCCGAACCTCAGAAAGTCAAACGCCGTAGCGC CGATGGTAGTGTGGGGTCTCCCATGCGAGAGTAGGGA ACTGCCAGGCATCAAATAAAACGAAAGGCTCAGTCGAA AGACTGGGCCCTGTTTGTGAGCTCCCGGTCATCAATCAT CCCCATAATCCTTGTTAGATTATCAATTTTAAAAAACTA ACAGTTGTCAGCCTGTCCCGCTTTAATATCATACGCCGT TATACGTTGTTTACGCTTTGAGGAATCCCATATGATACG CGGCCGCTTTCAAACGCTAAATTGCCTGATGCGCTACGC TTATCAGGCCTACATGATCTCTGCAATATATTGAGTTTG CGTGCTTTTGTAGGCCGGATAAGGCGTTCACGCCGCATC CGGCAAGAAACAGCAAACAATCCAAAACGCCCGCTTCA GCGGCGTTTTTTCTGCTTTTCTCGCGAATTAATCCGCT TCGCAACATGTGAGCACCGGTTTATTGACTACCGGAAG CAGTGTGACCGTGTGCTTCTCAAATGCCTGAGGCCAGTT TGCTCAGGCTCTCCCGTGGAGGTAATAATTGACGATAT GATCAGTGCACGGCTAACTAAGCGGCCTGCTGACTTTCT CGCCGATCAAAAGGCATTTTGCTATTAAGGGATTGACG AGGGCGTATCTGCGCAGTAAGATGCGCCCCGCATTGGG GGACGGTCCGGCGACCAGCGGGTCTCTAAAACCTAGCC AGCGGGGTTCGACGCCCGGTCTCTCGCCAAATTCGAA AAGCCTGCTCAACGAGCAGGCTTTTTTGCATGCTCGAGC AGCTCAGGGTCGAATTTGCTTTCGAATTTCTGCCATTCA TCCGCTTATTATCACTTATTAGGCGTAGCAACCAGGCG TTTAAGGGCACCAATAACTGCCTTAAAAAAATTACGCC CCGCCCTGCCACTCATCGCAGTACTGTTGTAATTCATTA AGCATTCTGCCGACATGGAAGCCATCACAAACGGCATG ATGAACCTGAATCGCCAGCGGCATCAGCACCTTGTCGC CTTGCGTATAATATTTGCCCATGGTGAAAACGGGGGCG AAGAAGTTGTCCATATTGGCCACGTTTAAATCAAAACTG GTGAAACTCACCCAGGGATTGGCTGAGACGAAAAACAT ATTCTCAATAAAACCCTTTAGGGAAATAGGCCAGGTTTTCT ACCGTAACACGCCACATCTTGCGAATATATGTGTAGAA ACTGCCGGAATCGTCGTGGTATTACTCCAGAGCGAT GAAAACGTTTTCAGTTTGCTCATGGAACGCGTGAACA AGGGTGAACACTATCCCATATCACCAGCTCACCGTCTTT CATTGCCATACGGAATTCCGGATGAGCATTATCAGGC GGGCAAGAATGTGAATAAAGGCCGGATAAACTTGTCG TTATTTTCTTTACGGTCTTTAAAAAGGCCGTAATATCC AGCTGAACGGTCTGGTTATAGGTACATTGAGCAACTGA CTGAAATGCCTCAAAATGTTCTTTACGATGCCATTGGGA TATATCAACGGTGGTATATCCAGTGATTTTTTCTCCATT TTAGCTTCCTTAGCTCCTGAAAATCTCGATAACTCAAAA AATACGCCCGGTAGTGATCTTATTTTATTATGGTGAAAG TTGGAACCTCTTACGTGCCGATCAACGTCTCATTTTCGC CAAAAGTTGGCCCAGGGCTTCCCGGTATCAACAGGGAC ACCAGGATTTATTTATTCTGCGAAGTGATCTTCCGTCAC AGGTATTTATTTCGGCGCAAAGTGCGTCGGGTGATGCTGC	10
		20
		30
		40

【 0 3 0 4】

	CAACTTACTGATTATTAGTTAGTATGATGGTGGTTTTTGTAGAGTG CTCCAGTGGCTTCTGTTTTCTATCAGCTGTCCCTCCTGTTC AGCTACTGACGGGGTGGTGC GTAACGGCAAAAGCACCG CCGACATCAGCGCTAGCGGAGTGTATACTGGCTTACT ATGTTGGCACTGATGAGGGTGTCAGTGAAGTGCTTCATG TGGCAGGAGAAAAAAGGCTGCACCGGTGCGTCAGCAGA ATATGTGATACAGGATATATTCCGCTTCCTCGCTCACTG ACTCGCTACGCTCGGTCGTTTCGACTGCGGCGAGCGGAA ATGGCTTACGAACGGGGCGGAGATTTCTTGGGAAGATGC CAGGAAGATACTTAACAGGGAAGTGAGAGAGGGCCGCG CAAAGCCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACAAGC ATCACGAAATCTGACGCTCAAATCAGTGGTGGCGAAAC CCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTTCCCCCTGG CGGCTCCCTCGTGCCTCTCCTGTTCTGCTTTTCGGTTT ACCGGTGTCATTCCGCTGTTATGGCCGCGTTTGTCTCAT TCCACGCCTGACACTCAGTTCGGGTAGGCAGTTCGCTC CAAGCTGGACTGTATGCACGAACCCCCCGTTCAGTCCG ACCGCTGCGCTTATCCGGTAACCTATCGTCTTGAGTCCA ACCCGGAAGACATGCAAAAGCACCCTGGCAGCAGCC ACTGGTAATTGATTTAGAGGAGTTAGTCTTGAAGTCATG CGCCGGTTAAGGCTAAACTGAAAGGACAAGTTTTGGTG ACTGCGCTCCTCCAAGCCAGTTACCTCGGTTCAAAGAGT TGGTAGCTCAGAGAACCTTCGAAAAACCGCCCTGCAAG GCGGTTTTTTTCGTTTTTCAGAGCAAGAGATTACGCGCAGA CCAAAACGATCTCAAGAAGATCATCTTATTAATCAGAT AAAATATTTCTAGATTTTCAGTGCAATTTATCTCTTCAA TGTAGCACCTGAAGTCAGCCCCATACGATATAAGTTGTA ATTCTCATGTTTGACAGCTTATCATCGATAAGCTTGGTA CCCAATTATGACAACCTTGACGGCTACATCATTCATTTTT TCTTCACAACCGGCACGGAACCTCGCTCGGCTGGCCCC GGTGCATTTTTTTAAATACCCGCGAGAAATAGAGTTGATC GTCAAAACCAACATTGCGACCGACGGTGGCGATAGGCA TCCGGGTGGTGCTCAAAAGCAGCTTCGCTGGCTGATAC GTTGGTCTCGCGCCAGCTTAAGACGCTAATCCCTAACT GCTGGCGGAAAAGATGTGACAGACGCGACGGCGACAA GCAAACATGCTGTGCGACGCTGGCGATATCAAAATTGC TGTCTGCCAGGTGATCGCTGATGTACTGACAAGCCTCGC GTACCCGATTATCCATCGGTGGATGGAGCGACTCGTTAA TCGTTCCATGCGCCGAGTAACAATTGCTCAAGCAGGAT TTATCGCCAGCAGCTCCGAATAGCGCCCTTCCCCCTGGC CGGCGTTAATGATTTGCCCAAACAGGTCGCTGAAATGC GGCTGGTGCGCTTCATCCGGGCGAAAGAACCCCGTATT GGCAAATATTGACGGCCAGTTAAGCCATTTCATGCCAGT AGGCGCGCGGACGAAAGTAAACCCACTGGTGATACCAT TCGCGAGCCTCCGGATGACGACCGTAGTGATGAATCTCT CCTGGCGGGAACAGCAAAATATCACTCGGTCGGCAAAC AAATTCTCGTCCCTGATTTTTTACCACCCCTGACCGCG AATGGTGAGATTGAGAATATAACCTTTTCATTTCCGACGG TCGGTCGATAAAAAAATCGAGATAACCGTTGGCCTCAA TCGGCGTTAAACCCGCCACCAGATGGGCATTAAACGAG TATCCCGGCAGCAGGGGATCATTTTTGCGCTTCAGCCATA
--	--

【 0 3 0 5 】

【表 3 - 8】

		CTTTTCATACTCCCGCCATTTCAGAGAAGAAACCAATTGT CCATATTGCATCAGACATTGCCGTCCTGCGTCTTTTAC TGGCTCTTCTCGCTAACCAAACCGGTAACCCCGCTTATT AAAAGCATTCTGTAAACAAAGCGGGACCAAAGCCATGAC AAAAACGCGTAACAAAAGTGTCTATAATCACGGCAGAA AAGTCCACATTGATTATTTGCACGGCGTCACACTTTGCT ATGCCATAGCATTTTTATCCATAAGATTAGCGGATCCTA CCTGACGCTTTTTATCGCAACTCTCTACTGTTTCTCCATA CCCGTTTTTTTGGGCTAACAGGAGGAATT	
90	Methanosarcina mazei ピロリシ ル tRNA シンテ ターゼの野生 型アミノ酸配 列	MDKKPLNLTISATGLWMSRTGTIHKIKHHEVSRSKIYIEMA CGDHLVVNNSRSSRTARALRHHKYRKTCKRRCRVSDDLN KFLTKANEDQTSVKVKVVSAPTRTKKAMPKSVARAPKPL ENTEAAQAQPSGSKFSPAIPVSTQESVSVPASVSTSISSISTG ATASALVKGNTNPITSMSAPVQASAPALTKSQTDRLLEVLL NPKDEISLNSGKPFRELESELLSRRKKDLQIYAEERENYL GKLEREITRFFVDRGFLEIKSPILIPLEYIERMGIDNDTELSK QIFRVDKNFCLRPMLAPNLYNLRKLDRALPDIKIFEIGPC YRKESDGDKEHLEEFMTLNFQCMGSGCTRENLESITDFLNH LGIDFKIVGDSCMVYGDTLDMHGDLELSSAVVGPIPLDR EWGIDKPWIGAGFGLERLLKVKHDFKNIKRAARSESYYNG ISTNL*	10
91	FSKRS-OPT ヌクレオチド 配列	ATGACCGTGAAGTACACCGACGCCAGATCCAACGCCT GCGCGAGTATGGTAATGGCACCTATGAACAGAAAAGTTT TTGAGGACCTGGCCAGCCGTGACGCCGCTTCAGCAAG GAAATGAGCATTGCCAGCACCGACAACGAGAAGAAAAT CAAGGGTATGATTGCCAATCCGAGCCGCCACGGCCTGA CCCAGCTGATGAACGACATCGCTGATGCCCTGGTGGCG GAGGGTTTCATTGAAGTGCCTACCCCGATCTTTATTAGC AAGGATGCGCTGGCTCGCATGACCATCACCGAAGACAA GCCGCTGTTCAAACAGGTGTTTTGGATTGATGAGAAAC GTGCCCTGCGCCCGATGCTGGCGCCAAACCTGGGTAGC GTGGCTCGTGACCTGCGCGATCACACCGACGGTCCGGT GAAAATCTTCGAAATGGGCAGCTGCTTTTCGTAAAGAGA GCCACAGCGGTATGCACCTGGAGGAGTTCACCATGCTG AATCTGTTTGATATGGGTCCGCGCGGCGACGCTACCGA AGTGCTGGAAAACACTACATTAGCGTGGTGATGAAAGTGG CCGGCCTGCCGGACTACGATCTGGTGACGGAAGAGAGC GACGTGTACAAGGAAACCATCGACGTGGAAATTAACGG TCAGGAAGTGTGCAGCGCGGCTGTGGGTCCAACCTCCTA TTGATGCGGCCCATGACGTGCATGAGCCGTGGAGCGGT GCTGGTTTTGGCTGGAACGTCTGCTGACCATCCGCGAG AAATACTCCACCGTGAAAAAGGGCGGCGCAAGCATCTC CTACCTGAATGGTGCCAAAATCAATTAA	20 30 40
92	FSKRS-OPT アミノ酸配列	MTVKYTDAQIQRLREYNGNGTYEQKFEDLASRDAAFSKE MSIASTDNEKKIKGMIANPSRHGLTQLMNDIADALVAEGFI EVRTPIFISKDALARMITITDKPLFKQVFWIDEKRALRPML APNLGVSARDLRDHTDGPVKIFEMGSCFRKESHSGMHLEE FTMLNLFDMGPRGDATEVLENYISVVMKVAGLPDYDLVQ EESDVYKETIDVEINGQEVCSAAVGPTPIDAAHDVHEPWS GAGFGLERLLTIREKYSTVKKGGASISYLNKAKIN	40

【 0 3 0 6 】

【表 3 - 9】

93	PEVOL-FSKRS- OPT	ACTAGTATGACCGTGAAGTACACCGACGCCAGATCCA ACGCCTGCGCGAGTATGGTAATGGCACCTATGAACAGA AAGTTTTTGAGGACCTGGCCAGCCGTGACGCCGCGTTCA GCAAGGAAATGAGCATTGCCAGCACCGACAACGAGAA GAAAATCAAGGGTATGATTGCCAATCCGAGCCGCCACG GCCTGACCCAGCTGATGAACGACATCGCTGATGCCCTG GTGGCGGAGGGTTTCATTGAAGTGCGTACCCCGATCTTT ATTAGCAAGGATGCGCTGGCTCGCATGACCATCACCGA AGACAAGCCGCTGTTCAAACAGGTGTTTTGGATTGATG AGAAACGTGCCCTGCGCCCGATGCTGGCGCCAAACCTG GGTAGCGTGGCTCGTGACCTGCGCGATCACACCGACGG TCCGGTGAAAATCTTCGAAATGGGCAGCTGCTTTCGTAA AGAGAGCCACAGCGGTATGCACCTGGAGGAGTTCACCA TGCTGAATCTGTTTGATATGGGTCCGCGCGGCGACGCTA CCGAAGTGCTGGAAAACACTACATTAGCGTGGTGATGAAA GTGGCCGGCCTGCCGGACTACGATCTGGTGCAGGAAGA GAGCGACGTGTACAAGGAAACCATCGACGTGGAAATTA ACGGTCAGGAAGTGTGTCAGCGCGGCTGTGGGTCCAAT CCTATTGATGCGGCCCATGACGTGCATGAGCCGTGGAG CGGTGCTGGTTTTGGCCTGGAACGTCTGCTGACCATCCG CGAGAAATACTCCACCGTGAAAAAGGGCGGCGCAAGCA TCTCCTACCTGAATGGTGCCAAAATCAATTAAGTCGACC ATCATCATCATCATCATTGAGTTTAAACGGTCTCCAGCT TGGCTGTTTTGGCGGATGAGAGAAGATTTTCAGCCTGAT ACAGATTAAATCAGAACGCAGAAGCGGTCTGATAAAAC AGAATTTGCCTGGCGGCAGTAGCGCGGTGGTCCCACCT GACCCCATGCCGAACCTCAGAAGTGAAACGCCGTAGCGC CGATGGTAGTGTGGGGTCTCCCCATGCGAGAGTAGGGA ACTGCCAGGCATCAAATAAAAACGAAAGGCTCAGTCGAA AGACTGGGCCTTGTTTGTGAGCTCCCGGTCATCAATCAT CCCATAATCCTTGTTAGATTATCAATTTTAAAAAACTA ACAGTTGTGAGCCTGTCCCGCTTAATATCATACGCCGT TATACGTTGTTTACGCTTTGAGGAATCCCATATGATACG CGGCCGCTTTCAAACGCTAAATTGCCTGATGCGCTACGC TTATCAGGCCTACATGATCTCTGCAATATATTGAGTTTG CGTGCTTTTGTAGGCCGATAAAGGCGTTCACGCCGCATC CGGCAAGAAACAGCAAACAATCCAAAACGCCGCGTTCA GCGGCGTTTTTTCTGCTTTTCTTCGCGAATTAATTCCGCT TCGCAACATGTGAGCACCGGTTTATTGACTACCGGAAG CAGTGTGACCGTGTGCTTCTCAAATGCCTGAGGCCAGTT TGCTCAGGCTCTCCCGTGGAGGTAATAATTGACGATAT GATCAGTGCACGGCTAACTAAGCGGCCTGCTGACTTTCT CGCCGATCAAAAAGGCATTTTGCTATTAAGGGATTGACG AGGGCGTATCTGCGCAGTAAGATGCGCCCCGCATTGGG GGACGGTCCGGCGACCAAGCGGGTCTCTAAAACCTAGCC AGCGGGGTTTCAGCGCCCCGGTCTCTCGCCAAATTCGAA AAGCCTGCTCAACGAGCAGGCTTTTTTGCATGCTCGAGC AGCTCAGGGTCGAATTTGCTTTTGAATTTCTGCCATTCA TCCGCTTATTATCACTTATTCAGGCGTAGCAACCAGGCG TTTAAGGGCACCAATAACTGCCTTAAAAAAATTACGCC CCGCCCTGCCACTCATCGCAGTACTGTTGTAATTCATTA
----	---------------------	--

10

20

30

40

【 0 3 0 7 】

	AGCATTTCTGCCGACATGGGAAGCCATCACAAACGGGCATG ATGAACCTGAATCGCCAGCGGCATCAGCACCTTGTCGC CTTGCGTATAATATTTGCCCATGGTGAAAACGGGGGCG AAGAAGTTGTCCATATTGGCCACGTTTAAATCAAAACTG GTGAAACTCACCCAGGGATTGGCTGAGACGAAAAACAT ATTCTCAATAAACCCCTTTAGGGAAATAGGCCAGGTTTTT ACCGTAACACGCCACATCTTGCGAATATATGTGTAGAA ACTGCCGGAATCGTCGTGGTATTTCACTCCAGAGCGAT GAAAACGTTTTCAGTTTGCTCATGGAAAACGGGTGTAACA AGGGTGAACACTATCCCATATCACCAGCTCACCCTCTTT CATTGCCATACGGAATTCCGGATGAGCATTTCATCAGGC GGGCAAGAATGTGAATAAAGGCCGGATAAAACTTGTGC TTATTTTTCTTTACGGTCTTTAAAAAGGCCGTAATATCC AGCTGAACGGTCTGGTTATAGGTACATTGAGCAACTGA CTGAAATGCCTCAAAATGTTCTTTACGATGCCATTGGGA TATATCAACGGTGGTATATCCAGTGATTTTTTTCTCCATT TTAGCTTCCTTAGCTCCTGAAAATCTCGATAACTCAAAA AATACGCCCGGTAGTGATCTTATTTCAATTATGGTGAAAG TTGGAACCTTACGTGCCGATCAACGTCTCATTTTTCGC CAAAAGTTGGCCAGGGCTTCCCGGTATCAACAGGGAC ACCAGGATTTATTTATTCTGCGAAGTGATCTTCCGTCAC AGGTATTTATTCGGCGCAAAGTGCGTCGGGTGATGCTGC CAACTTACTGATTTAGTGTATGATGGTGTTTTTGAGGTG CTCCAGTGGCTTCTGTTTCTATCAGCTGTCCCTCCTGTT AGCTACTGACGGGGTGGTGCGTAACGGCAAAAGCACCG CCGGACATCAGCGCTAGCGGAGTGATACTGGCTTACT ATGTTGGCACTGATGAGGGTGTCAGTGAAGTGCTTCATG TGGCAGGAGAAAAAAGGCTGCACCGGTGCGTCAGCAGA ATATGTGATACAGGATATATTCGGCTTCCTCGCTCACTG ACTCGCTACGCTCGGTGCTTCGACTGCGGCGAGCGGAA ATGGCTTACGAACGGGGCGGAGATTTCTGGAAGATGC CAGGAAGATACTTAACAGGGAAGTGAGAGGGCCGCGG CAAAGCCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACAAGC ATCACGAAATCTGACGCTCAAATCAGTGGTGCGGAAAC CCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGG CGGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCTGCTTTCGGTTT ACCGGTGTCAATTCGCTGTTATGGCCGCGTTTGTCTCAT TCCACGCCTGACACTCAGTTCCGGGTAGGCAGTTTCGCTC CAAGCTGGACTGTATGCACGAACCCCCCGTTCAGTCCG ACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCA ACCCGGAAGACATGCAAAAGCACCCTGGCAGCAGCC ACTGGTAATTGATTTAGAGGAGTTAGTCTTGAAGTCATG CGCCGTTAAGGCTAAACTGAAAGGACAAGTTTTGGTG ACTGCGCTCCTCCAAGCCAGTTACCTCGGTTCAAAGAGT TGGTAGCTCAGAGAACCTTCGAAAAACCGCCCTGCAAG GCGGTTTTTTCGTTTTCAGAGCAAGAGATTACGCGCAGA CCAAAACGATCTCAAGAAGATCATCTTATTAATCAGAT AAAATATTTCTAGATTTTCAGTGCAATTTATCTCTTCAAA TGAGCACCTGAAGTCAGCCCCATACGATATAAGTTGTA ATTCTCATGTTTGACAGCTTATCATCGATAAGCTTGGTA CCCAATTATGACAACCTTGACGGCTACATCATTCACTTTT	10 20 30 40
--	---	---

【 0 3 0 8 】

【表 3 - 1 1】

	TCTTCACAACCGGCACGGAACCTCGCTCGGGCTGGCCCC GGTGCATTTTTTAAATACCCGCGAGAAATAGAGTTGATC GTCAAAACCAACATTGCGACCGACGGTGGCGATAGGCA TCCGGGTGGTGCTCAAAAGCAGCTTCGCCTGGCTGATAC GTTGGTCCTCGCGCCAGCTTAAGACGCTAATCCCTAACT GCTGGCGGAAAAGATGTGACAGACGCGACGGCGACAA GCAAACATGCTGTGCGACGCTGGCGATATCAAAATTGC TGTCTGCCAGGTGATCGCTGATGTACTGACAAGCCTCGC GTACCCGATTATCCATCGGTGGATGGAGCGACTCGTTAA TCGCTTCCATGCGCCGAGTAACAATTGCTCAAGCAGAT TTATCGCCAGCAGCTCCGAATAGCGCCCTTCCCCTTGCC CGGCGTTAATGATTTGCCCAAACAGGTCGCTGAAATGC GGCTGGTGCGCTTCATCCGGGCGAAAGAACCCCGTATT GGCAAATATTGACGGCCAGTTAAGCCATTCATGCCAGT AGGCGCGCGGACGAAAGTAAACCCACTGGTGATACCAT TCGCGAGCCTCCGGATGACGACCGTAGTGATGAATCTCT CCTGGCGGGAACAGCAAAATATCACTCGGTGCGCAAAC AAATTCTCGTCCCTGATTTTTTACCACCCCTGACCGCG AATGGTGAGATTGAGAATATAACCTTTCATTCCCAGCGG TCGGTCGATAAAAAAATCGAGATAACCGTTGGCCTCAA TCGGCGTTAAACCCGCCACCAGATGGGCATTAAACGAG TATCCCGGCAGCAGGGGATCATTTTTCGCTTCAGCCATA CTTTTCATACTCCCGCCATTTCAGAGAAGAAACCAATTGT CCATATTGCATCAGACATTGCCGTCCTGCGTCTTTTAC TGGCTCTTCTCGCTAACCAAACCGGTAACCCCGCTTATT AAAAGCATTCTGTAACAAAGCGGGACCAAAGCCATGAC AAAAACGCGTAACAAAAGTGTCTATAATCACGGCAGAA AAGTCCACATTGATTATTTGCACGGCGTCACACTTTGCT ATGCCATAGCATTTTTATCCATAAGATTAGCGGATCCTA CCTGACGCTTTTTATCGCAACTCTCTACTGTTTCTCCATA CCCGTTTTTTTGGGCTAACAGGAGGAATT	10
		20
		30

【0309】

いくつかの場合では、標的化ドメインは、宿主細胞系によって組換え的に産生される。いくつかの場合では、宿主細胞は、真核細胞（例えば、哺乳動物細胞、昆虫細胞、酵母細胞、または植物細胞）または原核細胞（例えば、グラム陽性菌またはグラム陰性菌）である。いくつかの場合では、真核生物宿主細胞は哺乳動物宿主細胞である。いくつかの場合では、哺乳動物宿主細胞は、安定な細胞株、または目的の遺伝物質をそれ自体のゲノムに組み込み、複数世代にわたる細胞分裂後にその遺伝物質の産物を発現する能力を有する細胞株である。他の場合では、哺乳動物宿主細胞は、一過性細胞株、または目的の遺伝物質をそれ自体のゲノムに組み込み、複数世代にわたる細胞分裂後に遺伝物質の産物を発現する能力を有さない細胞株である。

【0310】

例示的な哺乳動物宿主細胞としては、293T細胞株、293A細胞株、293FT細胞株、293F細胞、293H細胞、A549細胞、MDCK細胞、CHO DG44細胞、CHO-S細胞、CHO-K1細胞、Expi293F細胞（商標）細胞、Flp-In（商標）T-RExTM293細胞株、Flp-In（商標）-293細胞株、Flp-In（商標）-3T3細胞株、Flp-In（商標）BHK細胞株、Flp-In（商標）-CHO細胞株、Flp-In（商標）-CV-1細胞株、Flp-In（商標）The Jurkat細胞株、FreeStyle（商標）293-F細胞、FreeS

10

20

30

40

50

ty le (商標) CHO-S細胞、GripTite (商標) 293MSR細胞株、GS-CHO細胞株、Heparg (商標)細胞、T-Rex (商標) Jurkat細胞株、Per.C6細胞、T-Rex (商標)-293細胞株、T-Rex (商標)-CHO細胞株およびT-Rex (商標) HeLa細胞株が挙げられる。

【0311】

いくつかの実施形態では、真核生物宿主細胞は昆虫宿主細胞である。例示的な昆虫宿主細胞としては、Drosophila S2細胞、Sf9細胞、Sf21細胞、およびCellular High Five (商標)細胞が挙げられる。

【0312】

いくつかの実施形態では、真核生物宿主細胞は酵母宿主細胞である。例示的な酵母宿主細胞としては、GS115、KM71H、SMD1168H、X-33などのPichia pastoris酵母株、およびINVSC1などのSaccharomyces cerevisiae酵母株が挙げられる。

【0313】

いくつかの実施形態では、真核生物宿主細胞は植物宿主細胞である。いくつかの場合では、植物細胞は、藻類由来の細胞を含む。例示的な植物細胞株としては、Chlamydomonas reinhardtii 137cまたはSynechococcus elongatus PPC 7942からの株が挙げられる。

【0314】

いくつかの実施形態では、宿主細胞は原核生物宿主細胞である。例示的な原核生物宿主細胞としては、BL21、BL21 (DE3)、Mach1TM、DH10BTM、TOP10、DH5α、DH10Bac (商標)、OmniMaxTM、MegaXTM、DH12S (商標)、INV110、TOP10F'、INVαF、TOP10/P3、ccdB Survival、PIR1、PIR2、Stbl2 (商標)、Stbl3 (商標)、またはStbl4 (商標)が含まれる。

【0315】

いくつかの場合では、本明細書に記載される標的化ドメインを産生するための適切な核酸分子またはベクターは、真核生物または原核生物の供給源に由来する任意の適切なベクターを含む。例示的な核酸分子またはベクターとしては、細菌 (例えば、大腸菌)、昆虫、酵母 (例えば、Pichia pastoris)、藻類または哺乳動物源からのベクターが挙げられる。細菌ベクターとしては、例えば、pACYC177、pASK75、pBADシリーズのベクター、pBADMシリーズのベクター、pETシリーズのベクター、pETMシリーズのベクター、pGEXシリーズのベクター、pHAT2、pMal-C2、pMal-p2、pQEシリーズのベクター、pRSET A、pRSET B、pRSET C、pTrcHis2シリーズ、pZA31-Luc、pZE21-MCS-1、pFLAG ATS、pFLAG CTS、pFLAG MAC、pFLAG Shift-12C、pTAC-MAT-1、pFLAG CTCまたはpTAC-MAT-2が挙げられる。

【0316】

昆虫ベクターとしては、例えば、pFastBac1、pFastBac DUAL、pFastBac ET、pFastBac HTa、pFastBac HTb、pFastBac HTc、pFastBac M30a、pFastBac M30b、pFastBac M30c、pVL1392、pVL1393M 10、pVL1393M 11、pVL1393M 12、FLAGベクター、例えば、pPolh-FLAG 1もしくはpPolh-MAT2、またはMATベクター、例えば、pPolh-MAT 1もしくはpPolh-MAT2が挙げられる。

【0317】

酵母ベクターとしては、例えば、pDEST (商標) 14 担体、pDEST (商標) 15 担体、pDEST (商標) 17 担体、pDEST (商標) 24 担体、pYES-DEST52ベクター、pBAD-DEST49Targetベクター、pAO815

10

20

30

40

50

P i c h i a 酵母ベクター、*p F L D 1 P i c h i a* パストリスベクター、*p G A P Z A*、*ピキア*パストリスCベクター、*ピキア*パストリス*p P I C 3 . 5 K*ベクター、*p P I C 6 A*、*B*および*ピキア*パストリスCベクター、*p P I C 9 K*ベクター、*p T E F 1 / Z e o*、*p Y E S 2* 酵母ベクター、*p Y E S 2 / C T* 酵母ベクター、*p Y E S 2 / N T A*、*B*および*C* 酵母親、または*p Y E S 3 / C T* 酵母ベクターが挙げられる。

【0318】

藻類ベクターとしては、例えば、*p C h l a m y - 4* ベクターまたは*M C S* ベクターが挙げられる。

【0319】

哺乳動物ベクターには、例えば、一過性発現ベクターまたは安定発現ベクターが含まれる。例示的な哺乳動物の一過性発現ベクターには、*p 3 x F L A G - C M V 8*、*p F L A G - M y c - C M V 1 9*、*p F L A G - M y c - C M V 2 3*、*p F L A G - C M V 2*、*p F L A G - C M V 6 a*、*b*、*c*、*p F L A G - C M V 5 . 1*、*p F L A G - C M V 5 a*、*b*、*c*、*p 3 x F L A G - C M V 7 . 1*、*p F - C M V 2 0*、*p 3 x F L A G - M y c - C M V 2 4*、*p C M V - F L A G - M A T 1*、*p C M V - F L A G - M A T 2*、*p B I C E P - C M V 3*、または*p B I C C M V - 4*が挙げられる。例示的な哺乳動物安定発現ベクターとしては、*p F L A G - C M V 3*、*p 3 x F L A G - C M V 9*、*p 3 x F L A G - C M V 1 3*、*p F L A G - M y c - C M V 2 1*、*p 3 x F L A G - M y c - C M V 2 5*、*p F L A G - C M V 4*、*p 3 x F L A G - C M V 1 0*、*p 3 x F L A G - C M V 1 4*、*p F L A G - M y c - C M V 2 2*、*p 3 x F L A G - M y c - C M V 2 6*、*p B I C E P - C M V 1*、または*p B I C E P - C M V 2*が挙げられる。いくつかの場合では、無細胞系が、本明細書に記載される標的化ドメインを産生するために使用される。いくつかの場合では、無細胞系は、細胞からの細胞質および／または核成分の混合物を含み、*i n v i t r o*での核酸合成に適している。いくつかの場合では、無細胞系は、原核細胞成分を利用する。他の場合では、無細胞系は真核細胞成分を利用する。核酸合成は、例えば、*D r o s o p h i l a*細胞、*X e n o p u s e g g s*、古細菌または*H e L a*細胞に基づく無細胞系において達成される。例示的な無細胞系としては、大腸菌*S 3 0* 抽出系、大腸菌*T 7 S 3 0*系または*X p r e s s C F*および*X p r e s s C F +*が挙げられる。

【0320】

無細胞翻訳系は、プラスミド、*m R N A*、*D N A*、*t R N A*、シンテターゼ、放出因子、リボソーム、シャペロン、翻訳開始および伸長因子、天然および／もしくは非天然アミノ酸、ならびに／またはタンパク質発現のための他の成分などの成分を様々に含む。そのような成分は、任意選択で、収率を改善するため、合成速度を増加させるため、タンパク質産物の忠実度を増加させるため、または非天然アミノ酸を組み込むために修飾される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の非天然アミノ酸含有標的化ドメインは、*U S 8*，*7 7 8*，*6 3 1*、*U S 2 0 1 7 / 0 2 8 3 4 6 9*、*U S 2 0 1 8 / 0 0 5 1 0 6 5*、*U S 2 0 1 4 / 0 3 1 5 2 4 5*、または*U S 8*，*7 7 8*，*6 3 1*に記載の無細胞翻訳系を用いて合成される。いくつかの実施形態では、無細胞翻訳系は、修飾された放出因子を含むか、またはさらに1つ以上の放出因子が系から除去される。いくつかの実施形態では、無細胞翻訳系は、減少したプロテアーゼ濃度を含む。いくつかの実施形態では、無細胞翻訳系は、非天然アミノ酸をコードする再割り当てコドン (*r e a s s i g n e d c o d o n*) を有する修飾*t R N A*を含む。いくつかの実施形態では、非天然アミノ酸を組み込むための本明細書に記載のシンテターゼは、無細胞翻訳系において使用される。いくつかの実施形態では、*t R N A*は、*t R N A*を無細胞翻訳系に添加する前に、酵素的または化学的プロセスを用いて非天然アミノ酸を予めローディングされる。いくつかの実施形態では、無細胞翻訳系のための成分は、改変細菌、酵母、または他の生物などの改変生物から得られる。

【0321】

いくつかの実施形態では、標的化ドメインは、発現宿主系を介して、または無細胞系によって環状配置で産生される。

10

20

30

40

50

【0322】

直交または拡張遺伝子コードを使用して、本明細書に記載される標的化ドメインを生成する、標的化ドメインの核酸配列に存在する1つ以上の特異的コドンは、非天然アミノ酸をコードするように割り当てられ、その結果、直交tRNAシンテターゼ／tRNA対の使用を通して、非天然アミノ酸は、コンジュゲートに遺伝的に組み込まれ得る（例えば、ドメインを標的化する）。直交tRNA合成酵素／tRNA対は、tRNAを非天然アミノ酸で荷電させることができ、コドンに応答して非天然アミノ酸をポリペプチド鎖に組み込むことができる。

【0323】

いくつかの場合では、コドンは、アンバーコドン、オーカーコドン、オパールコドン、または4重コドンである。いくつかの場合では、コドンは、非天然アミノ酸を保有するために使用される直交tRNAに対応する。いくつかの場合では、コドンはアンバーコドンである。他の場合では、コドンは直交コドンである。

【0324】

いくつかの場合では、コドンは四重コドンであり、直交リボソームリボ-Q1によってデコードすることができる。いくつかの場合では、四重鎖コドンは、Neumannらによる、「Encoding multiple unnatural amino acid analysis of a quadruplet-decoding ribosome」, Nature, 464 (7287) : 441-444 (2010)に記載されている通り。

【0325】

いくつかの場合では、本開示において使用されるコドンは、再コードされたコドン、例えば、同義コドンまたは置換コドンで置き換えられた稀少コドンである。いくつかの場合では、再コードされたコドンは、Napolitanoらによる、「Emergent rules for codon selection isolated by editing of a ray array code in Escherichia coli」, PNAS, 113 (38) : E5588-E5597 (2016)に記載されている通りである。いくつかの場合では、再コードされたコドンは、Ostrovらによる、「Design, synthesis, and testing translated a 57-code gene」, Science 353 (6301) : 819 . sub. 822 (2016) . に記載される通りである。

【0326】

定義

「アミノ酸 (amino acid)」という用語は、天然に存在するアミノ酸および合成アミノ酸、ならびに天然に存在するアミノ酸と同様に機能するアミノ酸類似体およびアミノ酸模倣体を指す。天然に存在するアミノ酸は、遺伝暗号によってコードされるアミノ酸、ならびに後に修飾されるアミノ酸、例えば、ヒドロキシプロリン、γ-カルボキシグルタミン酸塩、およびO-ホスホセリンである。アミノ酸類似体は、天然に存在するアミノ酸と同じ基本化学構造、つまり、水素に結合する炭素、カルボキシル基、アミノ基、R基を有する化合物、例えば、ホモセリン、ノルロイシン、メチオニンスルホキシド、メチオニンメチルスルホニウムを指す。このような類似体は、修飾されたR基（例えば、ノルロイシン）または修飾されたペプチド骨格を有するが、天然に存在するアミノ酸と同じ基本化学構造を保持している。アミノ酸模倣体は、アミノ酸の一般的な化学構造とは異なる構造を有するが、天然に存在するアミノ酸と同様に機能する化合物を指す。

【0327】

「天然に存在しないアミノ酸 (non-naturally occurring amino acid)」および「非天然アミノ酸 (unnatural amino acid)」という用語は、天然には見出されないアミノ酸類似体、合成アミノ酸、およびアミノ酸模倣体、例えば、アリールアミド、ビニルスルホンアミド、スルホニルフルオリド、アリールスルホニルフルオリドおよび4-スルホテトラフルオロフェニル (STP)

エステルを含有するアミノ酸残基を指す。

【0328】

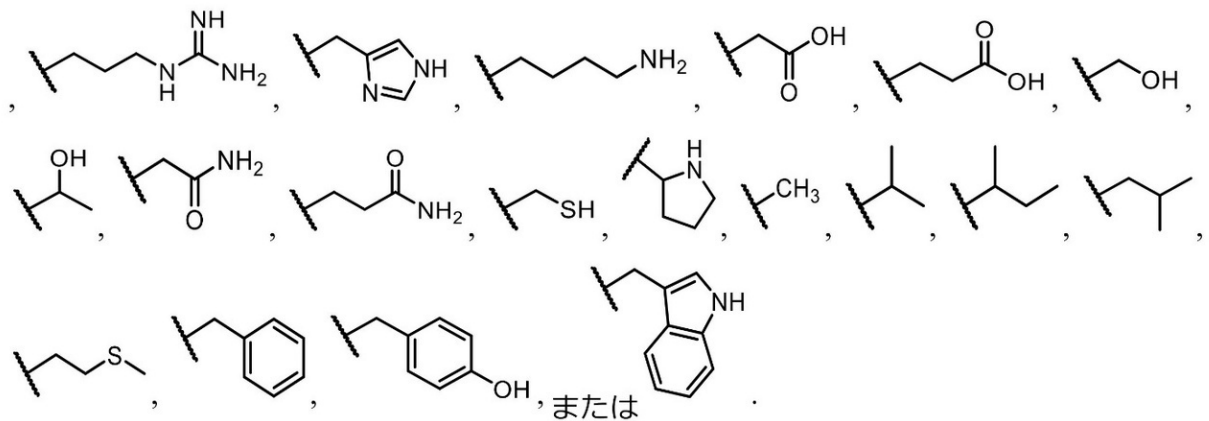
アミノ酸は、本明細書において、IUPAC-IUB Biochemical Nomenclature Commissionによって推奨される、それらの一般に知られている3文字記号または1文字記号のいずれかによって言及され得る。同様に、ヌクレオチドは、一般に受け入れられている一文字コードによって言及され得る。

【0329】

「アミノ酸側鎖 (amino acid side chain)」という用語は、アミノ酸上に含まれる官能性置換基を指す。例えば、アミノ酸側鎖は、天然に存在するアミノ酸の側鎖であり得る。天然に存在するアミノ酸は、遺伝暗号によってコードされるアミノ酸 (例えば、アラニン、アルギニン、アスパラギン、アスパラギン酸、システイン、グルタミン、グルタミン酸、グリシン、ヒスチジン、イソロイシン、ロイシン、リジン、メチオニン、フェニルアラニン、プロリン、セリン、トレオニン、トリプトファン、チロシン、またはバリン)、ならびに後に修飾されるアミノ酸、例えば、ヒドロキシプロリン、γ-カルボキシグルタミン酸塩、およびオ-ホスホセリンである。態様では、アミノ酸側鎖は、非天然アミノ酸側鎖であり得る。態様では、アミノ酸の側鎖が、H、

【0330】

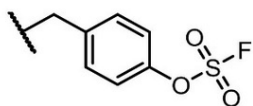
【化107】



である。いくつかの実施形態では、非天然アミノ酸側鎖は、

【0331】

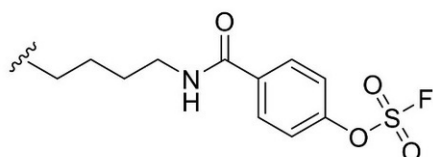
【化108】



である。いくつかの実施形態では、非天然アミノ酸側鎖は、

【0332】

【化109】



である。

【0333】

「非天然アミノ酸側鎖 (non-natural amino acid side chain)」または「非天然アミノ酸側鎖 (unnatural amino acid side chain)」または「Uaa」は、天然に存在するアミノ酸と同じ基本化学構造、つまり、水素に結合する炭素、カルボキシル基、アミノ基、R基を有する化合物、例えば、ホモセリン、ノルロイシン、メチオニンスルホキシド、メチオニンメチルスルホニウム、アリルアラニン、2-アミノイソ酪酸の機能的置換基を指す。非天然アミノ酸は、天然に存在するか、または化学的に合成されるタンパク質を構成しないアミノ酸 (non-proteinogenic amino acids) である。このような類似体は、修飾されたR基 (例えば、ノルロイシン) または修飾されたペプチド骨格を有するが、天然に存在するアミノ酸と同じ基本的化学構造を保持している。非限定的な例としては、エキソ-シス-3-アミノピシクロ [2.2.1] ヘプター-5-エン-2-カルボン酸塩酸塩、シス-2-アミノシクロヘプタンカルボン酸塩酸塩、シス-6-アミノ-3-シクロヘキセン-1-カルボン酸塩酸塩、シス-2-アミノ-2-メチルシクロヘキサニルカルボン酸塩酸塩、シス-2-アミノ-2-メチルシクロペンタンカルボン酸塩酸塩、2-(Bocアミノメチル)、安息香酸、2-(Boc-アミノ)オクタン二酸、Boc-4, 5-デヒドロ-Leu-OH (ジシクロヘキシルアンモニウム)、Boc-4-(Fmoc-アミノ)-L-フェニルアラニン、Boc-P-ホモビル-OH、Boc-(2-インダニル)-Gly-OH、4-Boc-3-モルホリン酢酸、4-Boc-3-モルホリン酢酸、Bocペンタフルオロ-D-フェニルアラニン、Boc-ペンタフルオロ-L-フェニルアラニン、Boc-Phe (2-Br)-OH、Boc-Phe (4-Br)-OH、Boc-D-Phe (4-Br)-OH、Boc-D-Phe (3-Cl)-OH、Boc-Phe (4-NH₂)-OH、Boc-Phe (3-NH₂)-OH、Boc-Phe (3, 5-F₂)-OH、2-(4-Boc-ピペラジノ)-2-(3, 4-ジメトキシフェニル)酢酸 purum、2-(4-Boc-ピペラジノ)-2-(2-フルオロフェニル)酢酸 purum、2-(4-Boc-ピペラジノ)-2-(3-フルオロフェニル)酢酸 purum、2-(4-Boc-ピペラジノ)-2-(4-フルオロフェニル)酢酸 purum、2-(4-Boc-ピペラジノ)-2-(4-メトキシフェニル)酢酸 purum、2-(4-Boc-ピペラジノ)-2-フェニル酢酸 purum、2-(4-Boc-ピペラジノ)-2-(3-ピリジル)酢酸 purum、2-(4-Boc-ピペラジノ)-2-[4-(トリフルオロメチル)フェニル]酢酸 purum、Boc-P-(2-キノリル)-Ala-OH、NBoc-1, 2, 3, 6-テトラヒドロ-2-ピリジンカルボン酸、Boc-P-(4-チアゾリル)-Ala-OH、Boob-(2-チエニル)-D-Ala-OH、Fmoc-N-(4-Boc-アミノブチル)-Gly-OH、Fmoc-N-(2-Boc-アミノエチル)-Gly-OH、Fmoc-N-(2, 4-ジメトキシベンジル)-Gly-OH、Fmoc-(2-インダニル)-Gly-OH、Fmoc-ペンタフルオロ-L-フェニルアラニン、Fmoc-Pen(Trt)-OH、Fmoc-Phe (2-Br)-OH、Fmoc-Phe (4-Br)-OH、Fmoc-Phe (3, 5-F₂)-OH、Fmoc-P-(4-チアゾリル)-Ala-OH、Fmoc-P-(2-チエニル)-Ala-OH、4-(ヒドロキシメチル)-D-フェニルアラニンが挙げられる。

いくつかの実施形態では、非天然アミノ酸は、式Iの構造：

【0334】

10

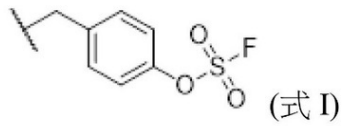
20

30

40

50

【化 1 1 0】



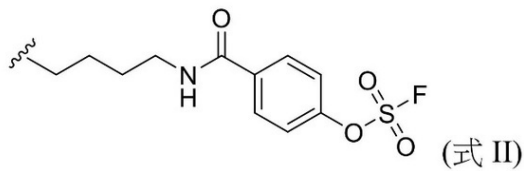
を含む。

いくつかの実施形態では、非天然アミノ酸は、式 I I の構造：

10

【0 3 3 5】

【化 1 1 1】

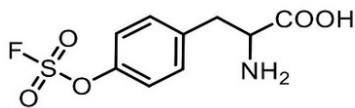


を含む。いくつかの実施形態では、非天然アミノ酸は、2-アミノ-3-(4-(フル
オロスルホニル)オキシ)フェニル)プロパン酸：

20

【0 3 3 6】

【化 1 1 2】

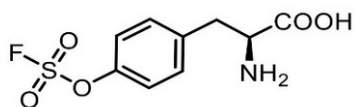


であるいくつかの実施形態では、非天然アミノ酸はフルオロスルホニルチロシン (F S Y
)：

30

【0 3 3 7】

【化 1 1 3】

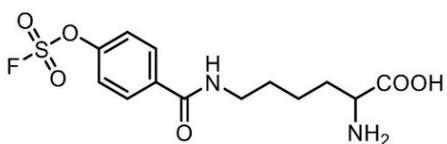


である。いくつかの実施形態では、非天然アミノ酸は N 6-(4-(フルオロスルホニ
ル)オキシ)ベンゾイル)リシン：

40

【0 3 3 8】

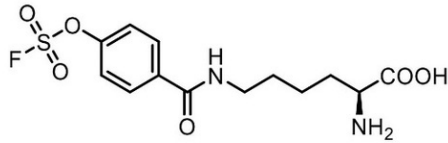
【化 1 1 4】



であるいくつかの実施形態では、非天然アミノ酸はフルオロスルホニルオキシベンゾイル-L-リシン (FSK) :

【0339】

【化115】



である。

【0340】

「保存的に修飾された変異体 (conservatively modified variants)」は、アミノ酸配列および核酸配列の両方に適用される。特定の核酸配列に関して、「保存的に修飾された変異体」は、同一または本質的に同一のアミノ酸配列をコードする核酸を指す。遺伝暗号の縮重のために、いくつかの核酸配列が任意の所与のタンパク質をコードする。例えば、コドン G C A、G C C、G C G および G C U は全て、アミノ酸アラニンをコードする。したがって、コドンによってアラニンが指定されるすべての位置において、コドンは、コードされるポリペプチドを変更することなく、記載される対応するコドンのいずれかに変更され得る。このような核酸変異は、「サイレント変異 (silent variations)」であり、保存的に修飾された変異の1つの種。ポリペプチドをコードする本明細書におけるあらゆる核酸配列はまた、核酸のあらゆる可能なサイレント変異を記載する。当業者は、核酸中の各コドン（通常はメチオニンの唯一のコドンである A U G と、通常はトリプトファンの唯一のコドンである T G G とを除く）を修飾して、機能的に同一の分子を得ることができることを認識するであろう。したがって、ポリペプチドをコードする核酸の各サイレント変異は、記載される各配列に暗示される。

【0341】

アミノ酸配列に関して、当業者は、コードされた配列中の単一のアミノ酸または少数のアミノ酸を変化、付加または欠失させる核酸、ペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質配列への個々の置換、欠失または付加が、「保存的に修飾された変異体」であり、ここで変化は、化学的に類似したアミノ酸によるアミノ酸の置換をもたらすことを認識するであろう。機能的に類似したアミノ酸を提供する保存的置換表は、当技術分野において周知である。このような保存的に修飾された変異体は、本開示の多型変異体、種間相同体、および対立遺伝子に追加され、これらを排除しない。

【0342】

以下の8つの群はそれぞれ、互いに保存的置換であるアミノ酸を含有する：(1) アラニン (A)、グリシン (G)、(2) アスパラギン酸 (D)、グルタミン酸 (E)、(3) アスパラギン (N)、グルタミン (Q)、(4) アルギニン (R)、リジン (K)、(5) イソロイシン (I)、ロイシン (L)、メチオニン (M)、バリン (V)、(6) フェニルアラニン (F)、チロシン (Y)、トリプトファン (W)、(7) セリン (S)、トレオニン (T)、(8) システイン (C)、メチオニン (M)。(例えば、Creighton, Proteins (1984) を参照されたい)。

【0343】

いくつかの実施形態では、本明細書で言及されるピロリシル tRNA シンテターゼ (tRNA^{Pyl}) は、α-アミノ酸ピロリジンまたは類似の非天然アミノ酸を同族 tRNA に付着させるために必要な反応を触媒し、それによって、アンバー終止コドン (つまり、U A G) でのタンパク質生成中にピロリジンまたは類似の非天然アミノ酸の組み込みを可能にするアミノアシル-tRNA シンテターゼである。ピロリジンを自然に取り込む Methanosarcina 種の野生型 tRNA^{Pyl} は、大腸菌や真核細胞の内因性 tR

10

20

30

40

50

NAやアミノアシルtRNA合成酵素と直交している。この対、およびその合成的に進化させられた誘導体または変異体を使用して、本発明者らなどは、翻訳後修飾アミノ酸、化学ハンドル(chemical handles)、および光ケージドアミノ酸(photo caged amino acids)を含む非天然アミノ酸を、大腸菌、酵母、および哺乳動物細胞における所望のタンパク質中の特定の部位において、効率的に組み込むことを指向した。

【0344】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるtRNA^{Pyl}は、tRNA^{Pyl}活性を維持するピロリシル-tRNAシンテターゼまたはその変異体、相同体、もしくはアイソフォームの任意の組換え形態または天然に存在する形態を含む(例えば、野生型tRNA^{Pyl}と比較して少なくとも30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、または100%以内の活性)。いくつかの実施形態では、変異体、相同体、またはアイソフォームは、天然に存在するピロリジルtRNA合成酵素と比較して、配列全体または配列の一部(例えば、50、100、150、または200の連続アミノ酸部分)にわたって、少なくとも90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%のアミノ酸配列同一性を有する。いくつかの実施形態では、突然変異体tRNA^{Pyl}は、非天然アミノ酸(UAA)が組み込まれるように、非天然アミノ酸(UAA)(例えば、フルオロスルフェートレーチロシン(FSY)などの式(IA)のUAA)のtRNAピルへの付着を触媒する。

【0345】

いくつかの実施形態では、本明細書において提供されるtRNA^{Pyl}は、当業者によって操作され得るtRNA^{Pyl}誘導体または変異体。いくつかの実施形態では、本明細書で提供されるtRNA^{Pyl}は、約70~90ヌクレオチドを含有する一本鎖RNA分子であり、これは、鎖内塩基対形成を介して折り畳まれ、特定のアミノ酸(例えば、FSYなどの式(IA)のUAA)を担持し、タンパク質合成中にmRNA上の対応するコドンにマッチさせる特徴的なクローバーリーフ構造を形成する。

【0346】

「イメージングリガンド(imaging ligand)」または「検出可能な薬剤(detectable agent)」は、分光学的、光化学的、生化学的、免疫化学的、化学的、磁気共鳴イメージング、または他の物理的手段などの適切な手段によって検出可能な組成物である。例えば、有用な検出可能な薬剤としては、³H、¹⁴C、¹⁸F、³³P、³⁵S、⁴⁵Ti、⁴⁷Sc、⁵²Fe、⁵⁹Fe、⁶²Cu、⁶⁴Cu、⁶⁷Cu、⁶⁷Ga、⁶⁸Ga、⁷⁷As、⁸⁶Y、⁹⁰Y、⁸⁹Sr、⁸⁹Zr、⁹⁴Tc、⁹⁴Tc、^{99m}Tc、⁹⁹Mo、¹⁰⁵Pd、¹⁰⁵Rh、¹¹¹Ag、¹¹¹In、¹¹²In、¹²³I、¹²⁴I、¹²⁵I、¹³¹I、¹⁴²Pr、¹⁴³Pr、¹⁴⁹Pm、¹⁵³Sm、¹⁵⁴~¹⁵⁸Gd、¹⁶¹Tb、¹⁶⁶Dy、¹⁶⁶Ho、¹⁶⁹Er、¹⁷⁵Lu、¹⁷⁷Lu、¹⁸⁶Re、¹⁸⁸Re、¹⁸⁹Re、¹⁹⁴Ir、¹⁹⁸Au、¹⁹⁹Au、²¹¹At、²¹¹Pb、²¹²Bi、²¹²Pb、²¹³Bi、²²³Ra、²²⁵Ac、¹⁵³Sm、¹⁷⁷Lu、⁸⁶Y、⁸⁸Y、⁹⁰Y、¹²³I、¹²⁴I、¹²⁵I、¹³¹I、¹⁴⁹Tb、²¹²Pb/²¹²Bi、および²²⁷Th、Cr、V、Mn、Fe、Co、Ni、Cu、La、Ce、Pr、Nd、Pm、Sm、Eu、Gd、Tb、Dy、Ho、Er、Tm、Yb、Lu、³²P、フルオロフォア(例えば、蛍光色素)、電子密度の高い試薬、酵素(例えば、ELISAで一般的に使用されるように)、ビオチン、ジゴキシンゲン、常磁性分子、常磁性ナノ粒子、超小型超常磁性酸化鉄(「USPIO」)ナノ粒子、USPIOナノ粒子凝集体、超常磁性酸化鉄(「SPIO」)ナノ粒子、SPIOナノ粒子凝集体、単結晶酸化鉄ナノ粒子、単結晶酸化鉄、ナノ粒子造影剤、リポソーム、またはガドリニウムキレート(「Gd-キレート」)分子、ガドリニウム、放射性同位元素、放射性核種(例えば、炭素-11、窒素-13、酸素-15、フッ素-18、ルビジウム-82)、フルオロデオキシグルコース(例えば、フッ素-18標識)、任意のガンマ線放出放射性核種、陽電子放出放射性核種、放射性標識グルコース、放射性標識水、放

放射性標識アンモニア、バイオコロイド、マイクロバブル（例えば、アルブミン、ガラクトース、脂質、および／またはポリマーを含み、空気、重ガス（e s）、パーフルオロカーボン、窒素、オクタフルオロプロパン、パーフレキサン脂質ミクロスフェア、ペルフルトレンなどを含むマイクロバブルガスコア）、ヨード化造影剤（例えば、イオヘキソール、イオジキサノール、イオバーソール、イオパミドール、イオキシラン、イオプロミド、ジアトリゾエート、メトリゾエート、イオキサグレート）、硫酸バリウム、二酸化トリウム、金、金ナノ粒子、金ナノ粒子凝集体、フルオロフォア、2光子フルオロフォア、またはハプテンおよびタンパク質、または検出可能にすることができる他の実体、例えば、標的ペプチドと特異的に反応するペプチドや抗体に放射性標識を組み込むことによって検出可能にすることができる他の実体が挙げられる。検出可能な部分は、一価の検出可能な薬剤、または別の組成物との結合を形成することができる検出可能な薬剤である。

10

【0347】

本開示の実施形態にしたがって造影剤および／または標識剤として使用され得る放射性物質（例えば、放射性同位体）としては、 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{18}F 、 ^{33}P 、 ^{35}S 、 ^{45}Ti 、 ^{47}Sc 、 ^{52}Fe 、 ^{59}Fe 、 ^{62}Cu 、 ^{64}Cu 、 ^{67}Cu 、 ^{67}Ga 、 ^{68}Ga 、 ^{77}As 、 ^{86}Y 、 ^{90}Y 、 ^{89}Sr 、 ^{89}Zr 、 ^{94}Tc 、 ^{94}Tc 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 ^{99}Mo 、 ^{105}Pd 、 ^{105}Rh 、 ^{111}Ag 、 ^{111}In 、 ^{112}In 、 ^{123}I 、 ^{124}I 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{142}Pr 、 ^{143}Pr 、 ^{149}Pm 、 ^{153}Sm 、 $^{154}\sim^{158}\text{Gd}$ 、 ^{161}Tb 、 ^{166}Dy 、 ^{166}Ho 、 ^{169}Er 、 ^{175}Lu 、 ^{177}Lu 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{189}Re 、 ^{194}Ir 、 ^{198}Au 、 ^{199}Au 、 ^{211}At 、 ^{211}Pb 、 ^{212}Bi 、 ^{212}Pb 、 ^{213}Bi 、 ^{223}Ra 、 ^{225}Ac 、 ^{153}Sm 、 ^{177}Lu 、 ^{86}Y 、 ^{88}Y 、 ^{90}Y 、 ^{123}I 、 ^{124}I 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{149}Tb 、 ^{212}Pb ／ ^{212}Bi 、および ^{227}Th が挙げられるが、これらに限定されない。本開示の実施形態にしたがって追加の造影剤として使用され得る常磁性イオンとしては、遷移金属およびランタニド金属（例えば、原子番号が21～29、42、43、44、または57～71の金属）のイオンが挙げられるが、これらに限定されない。これらの金属としては、Cr、V、Mn、Fe、Co、Ni、Cu、La、Ce、Pr、Nd、Pm、Sm、Eu、Gd、Tb、Dy、Ho、Er、Tm、Yb、およびLuのイオンが挙げられる。

20

【0348】

「リンケージ（linkage）」または「リンカー（linker）」は、本明細書で使用される場合、リンカーの官能基と別の分子との間の化学反応から形成される結合または化学部分を指す。このような結合は、共有結合による連結および非共有結合を含み得るが、これらに限定されない一方、このような化学的部分は、エステル、カーボネート、イミン、リン酸エステル、ヒドラゾン、アセタール、オルトエステル、ペプチド結合、およびオリゴヌクレオチド結合を含み得るが、これらに限定されない。加水分解的に安定な連結は、連結が水中で実質的に安定であり、限定されないが、生理学的条件下で、長期間にわたって、おそらく無期限でさえも、有用なpH値で水と反応しないことを意味する。加水分解的に不安定または分解可能な連結は、連結が、水中または例えば血液を含む水溶液中で分解可能であることを意味する。酵素的に不安定または分解可能な連結は、結合が1つ以上の酵素によって分解され得ることを意味する。単なる例として、PEGおよび関

連ポリマーは、ポリマー骨格中、またはポリマー骨格とポリマー分子の末端官能基の1つ以上との間のリンカー基中に分解性連結を含み得る。このような分解性連結としては、PEGカルボン酸または活性化PEGカルボン酸と生物活性剤上のアルコール基との反応によって形成されるエステル結合が挙げられるが、これらに限定されず、このようなエステル基は、通常、生理学的条件下で加水分解して生物活性剤を放出する。他の加水分解性結合としては、限定されないが、炭酸結合、アミンとアルデヒドとの反応から生じたイミン結合、アルコールをリン酸基と反応させることによって形成されるリン酸エステル結合、ヒドラジドとアルデヒドとの反応生成物であるヒドラゾン結合、アルデヒドとアルコールとの反応生成物であるアセタール結合、ギ酸塩とアルコールとの反応生成物であるオルトエステル結合、PEGなどのポリマーの末端を含むがこれらに限定されないアミン基、お

30

40

50

よびペプチドのカルボキシル基によって形成されるペプチド結合、およびポリマーの末端を含むがこれに限定されないホスホラミダイト基、およびオリゴヌクレオチドの5'ヒドロキシル基によって形成されるオリゴヌクレオチド結合が挙げられる。リンカーとしては、短い直鎖状、分枝状、マルチアーム状、またはポリマーなどのデンドリマー分子が挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、リンカーは分岐され得る。他の実施形態では、リンカーは、二官能性リンカーであり得る。いくつかの実施形態では、リンカーは、三官能性リンカーであり得る。これらのリンカー基からの薬剤の放出のメカニズムとしては、例えば、光不安定結合 (photo labile bond) の照射および酸触媒加水分解が挙げられる。リンカーの長さは、ポリペプチドとそれに連結された分子との間の所望の空間的關係に応じて、予め決定または選択され得る。

10

【0349】

「ポリペプチド (polypeptide)」、「ペプチド (peptide)」、および「タンパク質 (protein)」という用語は、本明細書において互換的に使用され、アミノ酸残基のポリマーを指し、ポリマーは、実施形態において、アミノ酸からなっていない部分にコンジュゲートされ得る。この用語は、1つ以上のアミノ酸残基が対応する天然に存在するアミノ酸の人工化学模倣体であるアミノ酸ポリマー、ならびに天然に存在するアミノ酸ポリマーおよび非天然に存在するアミノ酸ポリマーに適用される。「融合タンパク質 (fusion protein)」は、単一の部分として組換え発現される2つ以上の別個のタンパク質配列をコードするキメラタンパク質を指す。

【0350】

20

アミノ酸またはヌクレオチド塩基「位置 (position)」は、参照配列中の各アミノ酸 (またはヌクレオチド塩基) を、N末端 (または5'末端) に対するその位置に基づいて順次同定する数字によって示される。最適なアラインメントを決定する際に考慮しなければならない欠失、挿入、切断、融合などに起因して、一般に、N末端から単にカウントすることによって決定される試験配列中のアミノ酸残基数は、参照配列中のその対応する位置の数と必ずしも同じではない。例えば、変異体が整列した参照配列に対して欠失を有する場合、欠失部位における参照配列中の位置に対応するアミノ酸は変異体中に存在しない。整列した参照配列中に挿入がある場合、その挿入は参照配列中の番号付けされたアミノ酸位置に対応しない。切断または融合の場合、参照配列または整列配列のいずれかにおいて、対応する配列中のいずれのアミノ酸にも対応しないアミノ酸のストレッチが存在し得る。

30

【0351】

所与のアミノ酸またはポリヌクレオチド配列の番号付けの文脈で使用される場合、用語「を参照して番号付けされる (numbered with reference to)」または「に対応する (corresponding to)」は、所与のアミノ酸またはポリヌクレオチド配列が参照配列と比較される場合の、特定の参照配列の残基の番号付けを指す。

【0352】

タンパク質中のアミノ酸残基は、所与の残基と同じタンパク質内の必須構造位置を占める場合、所与の残基に「対応する」。例えば、選択された残基がP y l R Sタンパク質中のA l a 3 0 2と同じ本質的な空間的關係または他の構造的関係を占める場合、選択されたタンパク質中の選択された残基はP y l R Sタンパク質のA l a 3 0 2に対応する。実施形態では、選択されたタンパク質は、P y l R Sタンパク質との最大相同性のために整列され、A l a 3 0 2と整列する整列された選択されたタンパク質における位置は、A l a 3 0 2に対応すると言われる。一次配列アラインメントの代わりに、三次元構造アラインメントを使用することもでき、ここで、選択されたタンパク質の構造は、P y l R Sタンパク質との最大の対応のために整列され、全体的な構造が比較される。この場合、構造モデルにおいてA l a 3 0 2と同じ必須位置を占めるアミノ酸は、A l a 3 0 2残基に対応すると言われる。

40

【0353】

50

「配列同一性のパーセンテージ (percentage of sequence identity)」は、比較ウィンドウにわたって2つの最適に整列された配列を比較することによって決定され、比較ウィンドウ中のポリヌクレオチドまたはポリペプチド配列の部分は、2つの配列の最適なアラインメントのための参照配列（付加または欠失を含まない）と比較して、付加または欠失（すなわち、ギャップ）を含むことができる。パーセンテージは、同一の核酸塩基またはアミノ酸残基が両方の配列において生じた位置の数を決定して、マッチした位置の数を得、マッチした位置の数を比較のウィンドウにおける位置の総数で割り、その結果に100を掛けて配列同一性のパーセンテージを得ることによって計算される。

【0354】

2つ以上の核酸またはポリペプチド配列の文脈における「同一 (identical)」または「同一性 (identity)」パーセントという用語は、同一であるか、または同一であるアミノ酸残基またはヌクレオチドの特定の割合を有する2つ以上の配列または部分配列を指し（すなわち、比較ウィンドウまたは指定された領域にわたって最大限に対応させるために比較され整列された場合、指定された領域にわたって約60%の同一性、好ましくは65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはそれ以上の同一性）、後述のデフォルトパラメーターを有する、BLASTまたはBLAST 2.0 配列比較アルゴリズムを用いて測定されるか、または、手動アライメントと目視検査（例えば、NCBI web site ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/などを参照されたい）で測定される。このような配列は、「実質的に同一である (substantially identical)」と言われる。この定義はまた、試験配列の相補体を指すか、または試験配列の相補体に適用され得る。この定義はまた、欠失および／または付加を有する配列、ならびに置換を有する配列を含む。下記の通りであって、好ましいアルゴリズムは、ギャップなどを考慮に入れることができる。好ましくは、同一性は、少なくとも約25アミノ酸またはヌクレオチド長の領域にわたって、またはより好ましくは50～100アミノ酸またはヌクレオチド長の領域にわたって存在する。

【0355】

「抗体 (antibodies)」は、複雑な内部構造を有する大きく複雑なタンパク質。天然抗体分子は、2つの同一対のポリペプチド鎖を含有し、対はそれぞれ、1つの軽鎖および1つの重鎖を有する。軽鎖および重鎖はそれぞれ、順に2つの領域、標的抗原の結合に関与する可変（「V」）領域、および免疫系の他の成分と相互作用する定常（「C」）領域からなる。軽鎖および重鎖可変領域は、3次元空間において一緒になって、抗原（例えば、細胞の表面上の受容体）に結合する可変領域を形成する。各軽鎖または重鎖可変領域内には、相補性決定領域（「CDR」）と呼ばれる3つの短いセグメント（10アミノ酸長の平均）がある。抗体可変ドメイン中の6つのCDR（軽鎖から3つおよび重鎖から3つ）は、3次元空間において一緒に折り畳まれて、標的抗原上にドッキングする実際の抗体結合部位を形成する。CDRの位置および長さは、Kabatt, E.らによる Sequences of Proteins of Immunological Interest, U. S. Department of Health and Human Services, 1983, 1987に正確に定義されている。CDRに含まれない可変領域の部分はフレームワーク（「FR」）と呼ばれ、CDRの環境を形成する。

【0356】

「抗体 (antibody)」という用語は、当技術分野において一般に知られているその意味に従って使用される。抗体は、例えば無傷の免疫グロブリンとして、あるいは様々なペプチダーゼで消化することによって生成される、よく特徴づけられた多くの断片として存在する。したがって、例えば、ペプシンは、ヒンジ領域中のジスルフィド結合の下で抗体を消化して、それ自体がジスルフィド結合によってVH-CH1に連結した軽鎖であるFabのダイマーであるF(ab)'₂を生成する。F(ab)'₂を穏やかな条件下で還元してヒンジ領域におけるジスルフィド結合を破壊し、それによってF(ab)'₂

10

20

30

40

50

ダイマーをFab'モノマーに変換することができる。Fab'モノマーは、本質的にヒンジ領域の一部を有するFabである(Fundamental Immunology (Paul ed., 3d ed. 1993)を参照されたい)。様々な抗体断片がインタクトな抗体の消化に関して定義されているが、当業者は、そのような断片が化学的にまたは組換えDNA法を使用することによってデノボ合成され得ることを理解するであろう。したがって、本明細書で使用される抗体という用語には、抗体全体の改変によって産生された抗体断片、または組換えDNAの方法論を使用してde novoで合成された抗体断片(例えば、単鎖Fv)、またはファージディスプレイライブラリーを使用して同定された抗体断片(例えば、McCaffertyらによる、Nature 348:552-554 (1990))も含まれる。

10

【0357】

例示的な免疫グロブリン(抗体)構造単位は、テトラマーを含む。テトラマーはそれぞれ、ポリペプチド鎖の2つの同一の対から構成され、対はそれぞれ、1つの「軽(light)」鎖(約25kD)および1つの「重(heavy)」鎖(約50~70kD)を有する。各鎖のN末端は、主に抗原認識に関与する約100~110個以上のアミノ酸の可変領域を画定する。可変軽鎖(VL)および可変重鎖(VH)という用語は、それぞれこれらの軽鎖および重鎖を指す。Fc(すなわち、断片結晶化可能領域)は、免疫グロブリンの「塩基(base)」または「尾部(tail)」であり、典型的には、抗体のクラスに応じて2つまたは3つの定常ドメインに寄与する2つの重鎖から構成される。特異的タンパク質に結合することによって、Fc領域は、各抗体が所与の抗原に対して適切な免疫応答を生じることを確実にする。Fc領域はまた、Fc受容体などの様々な細胞受容体、および補体タンパク質などの他の免疫分子に結合する。

20

【0358】

本明細書で提供される抗体「変異体」は、抗原に結合することができ、抗体またはその断片の1つまたは複数の構造ドメインを含むポリペプチドを指す。抗体変異体の非限定的な例としては、単ドメイン抗体(ナノボディ)、アフィボディ(モノクローナル抗体よりも小さい(例えば、6kDA)ポリペプチド)が挙げられ、高い親和性で抗原を結合することが可能であり、モノクローナル抗体、単特異性Fab2、二重特異性Fab2、三特異性Fab3、一価IgG、scFv、二重特異性ダイアボディ、三特異性トリアボディ、scFv-Fc、ミニボディ、IgNAR、V-NAR、hcIgG、VhH、またはペプチボディを模倣することができる。本明細書で提供される「ペプチボディ(peptibody)」は、抗体のFcドメインに(共有結合または非共有結合リンカーを介して)付着したペプチド部分を指す。当技術分野で公知の抗体変異体のさらなる非限定的な例としては、軟骨魚類またはラクダ科動物によって産生される抗体が挙げられる。ラクダ科動物からの抗体およびその可変領域、ならびにそれらの産生、単離、および使用のための方法は、参考文献WO97/49805およびWO97/49805に見出すことができ、参照によりその全体が全ての目的のために本明細書に援用される。同様に、軟骨魚類からの抗体およびその可変領域、ならびにそれらの産生、単離、および使用のための方法は、WO2005/118629に見出すことができ、これは、参照によりその全体がすべての目的のために本明細書に援用される。

30

40

【0359】

「単ドメイン抗体(single-domain antibody)」または「ナノボディ(nanobody)」は、単一のモノマー可変抗体ドメインを有する抗体断片を指す。全抗体と同様に、特異的抗原に選択的に結合することができる。いくつかの実施形態では、単ドメイン抗体は、ヒトまたはヒト化単ドメイン抗体である。いくつかの実施形態では、シングルドメイン抗体はラクダ科単ドメイン抗体である。単ドメイン抗体は、操作された単ドメイン抗体であり得、非天然アミノ酸を含み得る

【0360】

本明細書で提供される「抗原(antigen)」という用語は、本明細書で提供される抗体結合ドメインに結合することができる分子を指す。本明細書で提供される「抗原結

50

合ドメイン (antigen binding domain)」は、抗原 (エピトープ) に結合する抗体の領域である。上記のように、抗原結合ドメインは、重鎖および軽鎖 (それぞれ VL、VH、CL、および CH1) のそれぞれの 1 つの定常ドメインおよび 1 つの変換ドメインを含み得る。実施形態では、抗原結合ドメインは、軽鎖可変ドメインおよび重鎖可変ドメインを含む。実施形態では、抗原結合ドメインは、軽鎖可変ドメインを含み、重鎖可変ドメインおよび／または重鎖定常ドメインを含まない。パルトープまたは抗原結合部位は、抗原結合ドメインの N 末端に形成される。抗原結合ドメインの 2 つの変換ドメインは、抗原のエピトープに結合し得る。抗体は、例えば、インタクトな免疫グロブリンとして、または様々なペプチダーゼによる消化によって産生される多数のよく特徴付けられた断片として存在する。したがって、例えば、ペプシンは、ヒンジ領域中のジスルフィド結合の下で抗体を消化して、それ自体がジスルフィド結合によって VH-CH1 に連結した軽鎖である Fab のダイマーである F(ab)'₂ を生成する。F(ab)'₂ を穏やかな条件下で還元してヒンジ領域におけるジスルフィド結合を破壊し、それによって F(ab)'₂ ダイマーを Fab' モノマーに変換することができる。Fab' モノマーは、本質的にヒンジ領域の一部を有する抗原結合部分である (Fundamental Immunology (Paul ed., 3d ed., 1993) を参照)。様々な抗体断片がインタクトな抗体の消化に関して定義されているが、当業者は、そのような断片が化学的にまたは組換え DNA 法を使用することによってデノボ合成され得ることを理解するであろう。したがって、本明細書で使用される抗体という用語には、抗体全体の改変によって産生された抗体断片、または組換え DNA の方法論を使用して de novo で合成された抗体断片 (例えば、単鎖 Fv)、またはファージディスプレイライブラリーを使用して同定された抗体断片も含まれる (例えば、McCafferty らによる、Nature 348: 552-554 (1990) を参照のこと)。

10

20

30

40

50

【実施例】

【0361】

実施例 1-P SMA sdAb の結合部位の同定

単ドメイン抗体 (sdAb) C1 (配列番号 1) を使用して、FSY 含有標的化分子と結合するための標的としての P SMA の適合性を評価するために、CDR1、CDR2、および CDR3 領域内の選択されたコドンのそれぞれを TAG 終止コドンで置き換え、コードされたタンパク質を産生して、FSY を適切な位置に組み込むことによって、FSY 部位をスクリーニングした。およそ 19 のポテンシャル部位 (potential sites) が同定され、大部分が CDR1 および CDR3 領域にクラスター化された。これらの TAG 部位は、CDR1 (部位 26~35: GYTDSNY YMS、配列番号 5)、CDR2 (50~66: VNTGRGSTSYADSVKG、配列番号 6)、CDR3 (99~116、Cys101 を除く、Cys104 AACHFCDSL PKTQDEYIL、配列番号 7) に位置する。第 2 の sdAb C2 (配列番号 2) を、FSY 修飾部位について同様に評価した。およそ 8 個の部位が、C2 CDR における FSY のポテンシャル配置 (potential placements) として見出され、CDR2 および CDR3 における大部分のクラスター化を伴った。これらの TAG 部位は、CDR1 (部位 26~35 RFMISEY SMH、配列番号 8)、CDR2 (50~65: TINPAGTTDYAESVKG、配列番号 9)、CDR3 (96~100 DGYGY

【0362】

実施例 2-FSY 修飾 sdAb の発現

ORF インサートを欠くベクター pBAD 配列 (Invitrogen #43001) を、それぞれフォワードおよびリバースプライマー (配列番号 80) および (配列番号 81) を用いて PCR 増幅した。

【0363】

得られた PCR 増幅ベクターをゲル抽出し、Zymo PCR 精製キット (Zymo Clean Gel DNA Recovery キット Cat # D4002) を用いて

精製した。C2 WT HisおよびC1 WT HisのdsDNA配列をPCR増幅pBAD骨格と連結し、大腸菌DH10b化学的コンピテント細胞（Fisher Thermo Scientific（商標）DH10B Competent Cells、High Efficiency、FEREC0113）に形質転換した。クローンをミニプレップし、pBADフォワードプライマーを用いて配列を確認した。発現カセットはまた、PelBリーダー配列およびHis6タグを組み込んだ。C1およびC2wtのDNA配列は、それぞれ配列番号73および配列番号74である。FSY残基を組み込む構築物について、TAGコドン、sdAbまたはバイパトリック構築物のオープンリーディングフレーム内のアミノ酸置換のための所望の位置でDNA配列中に操作した。

【0364】

10

C1 TAGライブラリーの構築。C1のCDR領域において同定された部位（実施例1を参照されたい）内の各コドンの代わりに、TAGコドンを含むポリヌクレオチド（dsDNA配列）をIDTによって合成した。これらのTAG部位は、CDR1（部位26～35）、CDR2（50～66）、CDR3（99～116、Cys101、Cys104を除く）に位置する。これらの部位は、以下の配列

QVQLQESGGGSVQAGGSLRLSCTAPGYTDSNYYSMSWFRQA
PGKEREWVAGVNTGRGSTSYADSVKGRFTISQDNAKNTMF
LQMNSLKPEDTAIYYCAVAACHFCDSLPKTQDEYILWGQG
TQVTVSSAAAYPYDVPDYG（配列番号1）において下線が引かれている。

【0365】

20

これらのTAG変異体のそれぞれを含むポリヌクレオチドを、上記のようにpBAD骨格にクローニングし、配列を検証した。

【0366】

C2 TAGライブラリーの構築。

実施例1において同定されたC2のCDR領域中の各残基を置換する単一のTAGコドンを含むポリヌクレオチド配列をIDTによって合成した。C2 WT Hisタンパク質配列のアミノ酸配列におけるこれらの領域は、以下の配列

EVQLVESGGGLVQPGGSLTSLSCAASRFMISEYSMHWVRQA
PGKGLEWVSTINPAGTTDYAESVKGRFTISRDNDAKNTLYL
QMNSLKPEDTAVYYCDGYGYRGQGQTQVTVSS（配列番号2）において下線が引かれている。

30

【0367】

これらのTAG変異体のそれぞれを含むポリヌクレオチドを、上記のようにpBAD骨格にクローニングし、配列を検証した。

【0368】

ライブラリー株の生成（library strain generation）。操作されたMb FSYRSアミノアシルtRNAシンテターゼを発現するpEVOL-FSYRSプラスミドを、（Order No. U168NGE200；Cat#SC1010）（Ref：J. Am. Chem. Soc. 2018, 140, 15, 4995-4999）によって合成し、標準的な方法を用いて化学的にコンピテントなDH10bコンピテント細胞に形質転換し、親株FSYRS-DH10bを生成した。C1 CDR TAGまたはC2 CDR TAG変異体のそれぞれをコードする個々のプラスミドを、標準的な方法を用いて化学的にコンピテントなFSYRS-DH10bに形質転換した。単一コロニーを、100 μg/mlアンピシリンおよび34 μg/mlクロラムフェニコールを含む2xYT培地（Teknova#Y0166）に接種し、37℃、およそ220 rpmで一晩振盪して増殖させた。一晩、培養物を滅菌50%グリセロールと1：1で混合し、-80℃で保存した。

40

【0369】

発現および精製。FSYRS-DH10b親バックグラウンドにおいて、個々のCDR残基がTAGに変異したsdAbをコードするプラスミドを有する株を、100 μg/ml

50

lアンピシリンおよび34 μg/mLクロラムフェニコールの存在下で2 x YT培地 (Teknova #Y0166) 中で培養した。誘導前に、細胞を37℃の温度で増殖させた。OD₆₀₀ 0.6で、培養液に1 mM FSYを添加し、0.2%アラビノースを加えて誘導した。誘導時に、培養を25℃に移し、220 RPMで一晩、合計16時間振盪した。

【0370】

2200 x g、30分間、4℃で細胞をペレット化することにより、発現を採取した。上清を除去し、細胞ペレットを秤量し、-80℃で保存した。細胞ペレットを溶解のために、4 mL/g ペレットのB-PERタンパク質抽出試薬 (ThermoFisher #78243) を添加することによって再懸濁した。室温、15分間、中速度でオービタルシェーカー上に試料を置くことによって、再懸濁したペレットを溶解させた。次いで、溶解した細胞を2200 x gで30分間スピンドウンした。上清中の可溶性画分をさらなる精製のために除去した。

10

【0371】

可溶性画分を精製するために、HisPur Ni-NTA樹脂 (ThermoFisher #88222) を使用して、可溶性物質を溶解物から捕捉した。樹脂保存緩衝液を除去し、洗浄緩衝液 (40 mMリン酸ナトリウム、pH 7.2、300 mM NaCl、20 mMイミダゾール) 中でのバッチ洗浄によって平衡化した。バッチ洗浄を、合計50 x 樹脂容量で繰り返した。上記の清澄化した溶解物を洗浄したNi-NTA樹脂に添加し、室温で1時間、絶えず回転させながら結合させた。結合後、タンパク質結合樹脂を洗浄緩衝液中、50 x 樹脂容量でバッチ洗浄して、非結合汚染物質を除去した。次いで、タンパク質結合樹脂をスピンカラムに移し、700 x gで短時間遠心して、残留する洗浄緩衝液を除去した。次いで、標的タンパク質を、溶出緩衝液 (40 mMリン酸ナトリウム、7.2、300 mM NaCl、500 mMイミダゾール) を含む緩衝液を用いて溶出した。溶出緩衝液を2 x 樹脂容量で添加し、室温で5分間インキュベートした。試料を短時間遠心分離し、溶出したタンパク質を新しいチューブに回収した。同じ条件を用いて溶出手順を2回繰り返した。溶出画分をプールし、Nanodrop 2000上でA280により定量し、溶出緩衝液でブランキングした。次いで、Ni-NTA精製タンパク質を0.5 mL、3 kDa MWCO PESスピンフィルター (ThermoFisher #88512) を用いて濃縮し、サンプルと濃度の8~10倍容量で希釈を繰り返し、1 x PBSにバッファー交換した。

20

30

【0372】

実施例3-FSY修飾sdAbとPSMAとの共有結合相互作用

実施例2からの半精製sdAb生成物を、およそ7:1のモル比で市販のPSMA (Sino Bio, cat#15877-H07H) を含む1 x PBS中で一晩インキュベートした (sdAb:PSMA、PSMA最終濃度は0.125 mg/mL、1.25 μM)。架橋をSDS-PAGEを還元することによって分析した (図1A~1E)。

【0373】

C1 sdAbのCDR1およびCDR3において評価された部位は、以下の表3に示されるように、PSMAに対する架橋能力のスペクトルを示した。

40

【0374】

【表 4】

表 3 – C1 sdAb 部位の架橋効率			
CDR 領域	弱い架橋(<50%)	架橋部位(>50%)	架橋部位 (80-90%)
CDR1	26	28, 29, 30	28
CDR3	99, 103, 105, 108, 111, 110, 114, 115	102, 112, 113	102, 112, 113

部位位置を配列番号 1 に対して列挙する。

10

第 2 の P S M A 特異的 s d A b C 2 を、s d A b : P S M A モル比がおおよそ 8 : 1 であるという変更を加え、実施例 1 の方法と同様の方法を用いて架橋の効率について評価した。架橋の結果を図 2 A ~ 2 C に示す。C 2 s d A b の C D R 2 および C D R 3 において評価された部位は、以下の表 4 に示される P S M A に対する架橋能力のスペクトルを示した。

【 0 3 7 5 】

【表 5】

20

表 4 – C2 sdAb 部位の架橋効率			
CDR 領域	弱い架橋(<50%)	架橋部位(>50%)	架橋部位 (80-90%)
CDR2	56	50, 53, 58	52, 54
CDR3	100	0	0

部位位置を配列番号 2 に対して列挙する。

30

【 0 3 7 6 】

実施例 4 – 架橋の反応速度論

P S M A 架橋の反応速度論を評価するために、F S Y 修飾 s d A b のサブセットを選択した。s d A b を P S M A と 5 : 1 のモル比でインキュベートした (P S M A 最終濃度は 0 . 1 2 5 m g / m L 、 1 . 2 5 u M) 。 0 ~ 1 8 0 分 の 時 点 で 試 料 を 採 取 し 、 P S M A 架橋の割合を S D S – P A G E によって評価した。図 3 A および図 3 B に示すように、修飾 s d A b は、様々な結合反応速度論 (c o u p l i n g k i n e t i c s) を表した。架橋バンドパーセンテージを、s d A b – P S M A 架橋バンドを定量することによって計算し、P S M A バンド強度を、I m a g e J を使用して定量した。

40

【 0 3 7 7 】

実施例 5 – 修飾 C D R 3 を有する P S M A 標的化構築物

C 1 (配 列 番 号 1) の C D R 3 (配 列 番 号 7) 中 の 2 つ の シ ス テ イン 残 基 を 除 去 し 、 こ れ ら の 残 基 を ア ラ ニ ン (C 1 0 1 A お よ び C 1 0 4 A) に 修 飾 して C 3 9 を 作 製 す る こ と に よ り 、 P S M A 標 的 化 s d A b C 1 構 築 物 を 作 製 し た 。 次 い で 、 こ の 構 築 物 を さ ら に 改 変 し て 、 残 基 1 0 2 に F S Y を 導 入 し た (C 1 – C 1 0 1 A / C 1 0 4 A / H 1 0 2 (F S Y) 、 配 列 番 号 4 、 以 下 、 C 3 9 – 1 0 2 F S Y と 称 す る) 。 こ れ ら の s d A b 構 築 物 の 図 を 図 4 に 示 す 。 成 熟 タ ン パ ク 質 か ら 切 断 さ れ た p e l B リ ー ダ ー 配 列 (配 列 番 号 1 5) を 用 い て 構 築 物 を 合 成 し 、 6 つ の C 末 端 ヒ ス チ ジ ン を H i s – T a g 精 製 に 使 用 し た 。 こ れ ら の 構 築 物 の 架 橋 能 力 を 、 実 施 例 3 の 方 法 を 使 用 し て 評 価 し た 。 S D S – P A G E

50

分析は、全ての構築物がこれらの条件下で同等のレベルで架橋したことを示した。

【0378】

P S M A 標的化 s d A b C 3 9 - F S Y C 1 を含有する F S Y をクローニングし、実施例 2 に記載のように発現させた。バイパラトピック構築物 (C 1 - C 1 0 1 A / C 1 0 4 A / H 1 0 2 (F S Y) - L 1 - C 1 - C 3 9、配列番号 2 1、以下 C 4 0 - F S Y と呼ぶ) は、C 3 9 - F S Y C 1 を C 1 - C 1 0 1 A / C 1 0 4 A / H 1 0 2 H (配列番号 7 1、F S Y なし) の追加のコピーと連結することによって作製した。構築物は、2 つの s d A b アミノ酸配列間に G G G G S G G G G S リンカーを添加することによって設計した。次いで、実施例 2 に記載されるように、バイパラトピック構築物を p B A D ベクターにクローニングし、発現させた。成熟タンパク質から切断された p e l B リーダー配列 (配列番号 1 5) を用いて構築物を合成し、6 つの C 末端ヒスチジンを H i s - T a g 精製に使用した。

10

【0379】

モノパラトピック s d A b およびバイパラトピック構築物を、S D S - P A G E によって経時的に P S M A への架橋について評価した。S D S - P A G E 分析は、ダイマー形態 C 4 0 - 1 0 2 F S Y がモノマー C 3 9 - 1 0 2 F S Y より 2 倍速く架橋することを示した (ダイマーに対する t 1 / 2 最大架橋 ~ 3 0 分対モノマーに対する t 1 / 2 最大架橋 ~ 6 0 分)。(図 5 A - 5 B)

【0380】

C 3 9 - 1 0 2 F S Y アミノ酸配列 (* は 1 0 2 F S Y 位置であり、配列番号 4、アラニン修飾には下線が引かれている) :

20

Q V Q L Q E S G G G S V Q A G G S L R L S C T A P G Y T D S N Y Y M S W F R Q A
P G K E R E W V A G V N T G R G S T S Y A D S V K G R F T I S Q D N A K N T M F
L Q M N S L K P E D T A I Y Y C A V A A A * F A D S L P K T Q D E Y I L W G Q G
T Q V T V S S A A A Y P Y D V P D Y G S C H H H H H H

【0381】

実施例 6 - 構築物の合成

C 末端システイン残基を介した部位特異的コンジュゲーション。s d A b 化合物への部位特異的バイオコンジュゲーションを可能にするために、構築物の C 末端付近に追加の C y s 残基を操作した。s d A b - C y s 化合物を調製し、1 x P B S、p H 7. 4、5 m M E D T A 中、1 m g / m l に製剤化した。T C E P を穏やかな還元のために 1 0 m M に添加し、室温で 1 5 分間インキュベートした。次いで、Z e b a S p i n カラムを用いて試料を緩衝液交換して、T C E P を除去し、1 x P B S、p H 7. 4、1 m M E D T A に交換した。次いで、マレイミド反応性ペイロード化合物 (A Z D y e 6 4 7 M a l e i m i d e c a t # : 1 1 2 2 - 5 など) を 1 0 x モル過剰で添加し、3 7 ° C で 2 時間、または 4 ° C で 1 6 時間インキュベートした。サイズ排除クロマトグラフィー、脱塩カラム、透析または T F F を使用して、未反応マレイミド化合物を試料から除去した。試料を還元および非還元条件下で S D S - P A G E に供して、標識効率を観察し、L C - M S を用いて分析して、標識種および非標識種の無傷の質量および相対的割合を定量した。

30

40

【0382】

実施例 7 - 架橋活性のアッセイ

分子を、標的腫瘍抗原への特異的結合および架橋についてアッセイする。P S M A 標的化構築物の細胞結合効力を評価するために、特異的 F S Y または T y r 含有 s d A b を使用して、目的の特異的抗原への共有結合架橋の効果を試験する。これらの被験物質を連続的に希釈し、i n v i t r o で培養した前立腺癌細胞株 L n C A P (P S M A +) および P C 3 (P S M A -) と会合させる。3 7 ° C で異なる時間インキュベートした後、細胞を洗浄し、培地を交換して未結合物質を除去する。試料を、抗 H i s タグ抗体または抗 V H H を使用するフローサイトメトリーによって分析して、投入濃度の関数として結合集団を測定する。架橋効率および特異性を測定するために、細胞を収集し、溶解し、抗 h i s

50

または抗VHH抗体を使用してウェスタンブロットして、ゲルシフトを介して共有結合した集団を測定し、抗PSMA抗体を使用してゲルシフトウェスタンブロットと比較して、sdAb被験物質に架橋される総標的抗原 (total target antigen) を測定する。

【0383】

コンジュゲート分子は、機能的活性、この場合、標的抗原を発現する腫瘍細胞に特異的に *in vitro* で毒性ペイロードを送達する能力についてさらにアッセイされる。操作されたC末端または近位Cys残基を含む構築物は、実施例8に記載される一般的な方法を使用して、MMAEまたは他のクラスの高度に細胞傷害性の化合物などの細胞傷害性のペイロードにカップリングされる。用量反応曲線を作成し、試料をLnCAPおよびPC3細胞と *in vitro* でインキュベートする。様々な期間のインキュベーション後、細胞を洗浄して遊離化合物を除去し、Promega Cytotox Greenなどのアッセイ、またはレポーター化合物検出を介して細胞生存率を測定する他のアッセイ、Presto Blue、CKK-8もしくは類似の試薬による生存細胞の検出、および／またはアネキシンV-FITC、ヨウ化プロピジウム染色もしくは類似の試薬を介してアポトーシスを測定するアッセイを使用して細胞生存率を測定する。

【0384】

実施例8 - *In-Vivo* 送達

in vivo で腫瘍組織にペイロードを特異的に送達する構築物の能力を測定し、構築物と非共有結合sdAbコンジュゲートとの腫瘍曝露を比較するために、フルオロフォア標識をプロキシペイロードとして使用して、経時的な追跡／生体分布測定を可能にする。TyrまたはFSYのいずれかに置換された単一の残基を有するsdAb構築物（例えば、C1、C2、またはC3）を、操作されたシステイン残基を介して、マレイミド化学を介して化学的フルオロフォア (Alexa647または類似のもの) にコンジュゲートし、実施例6に記載されているように精製する。フルオロフォア標識sdADCコンジュゲート分子を、PSMA+または-腫瘍を有する雄NSGマウスに尾静脈IV注射によって投与し、被験物質の生体内分布を、AmiX imagerまたは類似のものを使用する全動物イメージングによって経時的に観察する。腫瘍特異的および末梢曝露 (the tumor-specific and peripheral exposures) をイメージ濃度測定によって定量し、sdAbのFSYおよびTyrバージョン間で比較する。

【0385】

実施例9：追加のFSY修飾sdAbの設計

C3wt抗PSMA sdAbは、NdeIおよびHindIII制限酵素により、C3wt配列 (IDTから合成、配列番号3) を消化ベクター (Genscriptにより合成) にクローニングすることにより構築した。発現カセットはまた、PelBリーダー配列およびHis6タグを組み込んだ。C3wt DNA配列を配列番号75として示す。

【0386】

CDR領域中のアミノ酸配列を、FSY修飾のために選択された部位でプラスミド中のTAGコドンに変更した。これらのORF中のTAG突然変異体は、部位特異的突然変異誘発 (site-directed mutagenesis) を介してGenscriptによって調製した。

【0387】

C3 CDR1 (26~35: GWPYSTYSMN, 配列番号11)、CDR2 (50~65: GISSTMSGIIFAESKAG, 配列番号12)、CDR3 (99~113: RRDYSLSSSSDDDFDY, 配列番号13)。

【0388】

実施例10 - FSY改変sdAbのスクリーニング

実施例9からのC3構築物を、実施例2に記載されるように、DH10bコンピテント

細胞に pEVOL-FSYRS と同時形質転換した。形質転換からの単一コロニーを取り出し、 $100\mu\text{g}/\text{mL}$ の Amp + $34\mu\text{g}/\text{mL}$ の Cm を補充した 24 ディープウェルプレート中の 1mL の $2\times\text{YT}$ に、 220rpm 、 37°C で振盪しながら接種した。OD が 0.5 に達したとき、温度を 25°C に低下させた。各ウェルの発現は、 0.2% アラビノース 1mM + FSY を添加して誘導した。生成物を 25°C で一晩発現させた。一晩後、細胞を 1.5mL の Eppendorf tube に移し、ベンチトップ遠心分離機 (benchtop centrifuge) で回転させた。上清を除去した。細胞溶解のために、ペレットを $50\mu\text{L}$ の B-per (ThermoFisher #78243) で 15 分間処理した。その後、細胞溶解物を、 4°C のベンチトップ遠心分離機によって最大速度で遠心沈降させた (spun down)。

10

【0389】

$3\mu\text{L}$ の上清を $3\mu\text{L}$ の PBS または $3\mu\text{L}$ $0.25\text{mg}/\text{mL}$ PSMAO によってインキュベートすることによって架橋反応を開始した。反応物を 37°C 、より短い時間窓 3 時間 (shorter time window 3 hr) インキュベートした。その後、インキュベーション混合物を 2X SDS ローディング色素で処理した。Coomassie blue による SDS-PAGE 染色を実行することによって架橋を調べた。結果を図 6A および 6B に示し、以下の表 5 に要約する。

【0390】

【表 6】

20

表 5 – C3 sdAb の PSMA との 3 時間以内の架橋効率			
CDR 領域	弱い架橋 (<50%)	架橋部位 (>50%)	架橋部位 (80-90%)
CDR1	0	0	0
CDR3	0	58, 62	0
CDR3	101, 103, 107	0	0

部位位置を配列番号 3 に対して列挙する。

30

【0391】

実施例 11 – FSK 修飾 FAP sdAb の同定および反応速度論

配列分析 (abYsis) を使用して、Fap 抗体配列中の相補性決定領域 (CDR) ループ位置を定義した。各 CDR 残基を TAG コドンで個々に置き換えるようにライブラリーを構築し、得られたタンパク質を、各位置に非天然アミノ酸 FSK を組み込む条件下で発現させた。

【0392】

C8 FAP ライブラリー生成。sdAb における異なる FSK 取り込み部位を評価するために、ベクター pBAD-C8 WT (配列番号 82) を以下のように構築し、C8 WT 配列 (配列番号 23) を大腸菌発現についてコドン最適化し、IDT company により合成した。C8 WT gblock 配列 (配列番号 78) を、NdeI および HindIII 制限酵素により消化した pBAD ベクター (Genscript) にクローニングすることにより、pBAD-C8 WT ベクターを構築した。

40

【0393】

ライブラリー株生成。対応するシンテターゼの発現について、操作された Ma FSK RS アミノアシル tRNA シンテターゼ (配列番号 87) をコードする pEVOL-FSK RS プラスミド (Genscript) を合成し、pEVOL-FSK RS (配列番号 89) を化学的コンピテントな DH10b コンピテント細胞に形質転換し、親株 FSK RS-DH10b を生成した。各 C8 CDR TAG 変異体をコードする個々のプラスミ

50

ドを、化学的コンピテントな F S K R S - D H 1 0 b 細胞に形質転換した。単一コロニーを、100 μg / ml アンピシリンおよび 34 μg / ml クロラムフェニコールを含有する Super broth 培地 (Teknova # S 1 5 3 0) に接種し、37 °C で約 220 rpm で一晩振盪培養した。

【0394】

発現および精製。F S K R S - D H 1 0 b 親バックグラウンドにおいて T A G に変異した個々の C D R 残基を有する s d A b をコードするプラスミドを有する株を、100 μg / ml アンピシリンおよび 34 μg / ml クロラムフェニコールの存在下で Super broth 培地中で培養した。各プールからの単一コロニーを、関連する抗生物質を含む 5 mL の Super broth 培地に接種し、37 °C で一晩増殖させた。翌日、細胞を、100 μg / ml アンピシリンおよび 34 μg / ml クロラムフェニコール、1 mM F S K、0.2 % アラビノースを含む 30 mL (3 mL ~ 30 mL 希釈) Super broth 培地中に 1 : 10 の比で希釈した。細胞を F S K 取り込みについて 30 °C、220 rpm で 6 時間誘導した。発現後、F S K 修飾 s d A b (C 8 - F S K) を回収し、実施例 2 に記載の方法にしたがって精製した。

【0395】

架橋反応速度論。F A P 受容体 (A c r o b i o s y s t e m # A P - H 5 2 6 3 - 1 0 0 u g) を、37 °C、1 X P B S、p H 7.4、1 時間、2 時間、または一晩で約 8 : 1 (抗体 : 受容体) のモル比でプールした抗体混合物 (表 6) を用いてインキュベートした。インキュベーション後、100 mM D T T を含有する 1 X L a e m m l i L a e m m l i S a m p l e B u f f e r を添加することによって架橋反応を停止させた。試料を 95 °C で 5 分間加熱し、続いて T r i s - g l c y i n e S D S - P A G E (4 ~ 20 % M i n i - P R O T E A N (登録商標) T G X (商標)) を実施した。続いて、Image J ソフトウェアを用いて相対バンド強度を定量した。F S K プールシフトの結果は、プール 2 および 3 内の架橋活性を介した F A P 受容体シフトを実証した (図 7 A)。

【0396】

【表 7】

表 6. 発現 C8 FSK 混合物のために設計された CDR プール

プール名	CDR 領域
1	CDR1 (26-35)
2	CDR2 (50-57)
3	CDR2 (58-65)
4	CDR3 (98-106)

【0397】

F A P との架橋に関与する単一の F S K 部位の同定。架橋に関与する個々の F S K 部位を同定するために、各 T A G 変異体を p E V O L - F S K R S と共に D H 1 0 b 細胞に同時形質転換し、上記のように発現させ、精製した。候補プール由来の各個々の F S K 変異体を、ゲルシフトの調査のために F A P 受容体を用いてインキュベートした (図 7 B)。C D R 2 中の 9 つの F S K 変異体は、F A P と架橋を有することが見出された (52、53、54、55、56、58、60、62、64)。1 つの部位 (56) は、1 時間以内に全ての架橋部位の中で最も高い架橋収率を有することが見出された。

【0398】

F A P 受容体に対する C 8 - F S K 架橋反応速度論の測定。F S K 架橋反応速度論を評価するために、C 8 - 54 F S K および C 8 - 56 F S K を F A P 受容体を用いて 15、

30、60、および120分間インキュベートし、架橋収率について調べた。56FSK部位は、他の部位と比較して最も高い架橋速度論を有することが見出され、これは、C8-56FSKが最も速い架橋速度論（2時間以内に>50%架橋）を有することを示す（図7C）。

【0399】

実施例12-FSY修飾Her3SdAbの同定および反応速度論

C9ライブラリー生成。配列分析を用いて（abYsis）、Her-3抗体配列における相補性決定領域（CDR）ループ位置を定義した。各CDR残基をTAGコドンで個々に置換するようにライブラリーを構築し、各位置に非天然アミノ酸FSYを組み込む条件下で発現させた。

【0400】

ベクターpBAD-C9 WTを構築した。C9 WT配列（配列番号24）を大腸菌発現についてコドン最適化した。pBAD-C9 WTベクター（配列番号83）は、C9 gblock配列（配列番号79）を消化pBADベクター（Genescript cat# SC1010）にNdeIおよびHindIII制限酵素によりクローニングすることにより構築した。pEVOL-FSYRSプラスミドおよび個々の突然変異体pBAD-C9突然変異体を形質転換し、DH10b細胞ではなくBL21細胞で発現させたことを除いて、C9-FSY変異体のライブラリーを実施例2に記載したように作製した。FSY改変sdAb（C9-FSY）の発現は、FSY改変C9 sdAbが親株FSYRS-BL21において発現され、それから精製されたことを除いて、実施例2に記載の方法に従った。

【0401】

架橋に関与するプールの同定。架橋適合性FSY部位を含有するCDRの領域を最初に同定するために、複数のCDR領域にTAG部位を有するプラスミドを含有する株を最初にプールした（表7）。プールした株を発現させ、Ni-NTA親和性を介して精製し、濃度について正規化し、実施例2に記載されるようにSDS-PAGEゲルシフトを介して架橋について評価した。C9-FSYプール混合物をHer3（Acrobiosystem # ER3-H5223-100ug）と3：1の比（3μgのC9 FSY対1μgのHer3受容体）で37℃、1xPBS、pH7.4、一晚インキュベートした。4 終夜。反応を4～20% Mini-PROTEAN（登録商標）TGX（商標）で実行し、次いでCoomassie blueで染色した。プールされたシフトの結果は、プール2、3、および4内のHer3受容体架橋活性を示した（図8A）。

【0402】

【表8】

表7. 発現C9FSY混合物のために設計されたCDRプール

プール名	CDR 領域
1	CDR1 (28-37)
2	CDR2 (52-58)
3	CDR2 (59-63)
4	CDR2 (64-68)
5	CDR3 (101-106)
6	CDR3 (107-112)
7	CDR3 (113-118)

【0403】

Her 3との架橋に關与する単一のFSY部位の同定。

架橋に關与する各個々のFSY部位を同定するために、各TAG変異体をpEVOL-FSYRSと共にBL21細胞に同時形質転換し、上記のように発現させ、精製した。候補プール由来の個々のFSY変異体のそれぞれをHer 3受容体と共に37℃で一晩インキュベートした。架橋は、Coomassie blue染色で4~20% Mini-PROTEAN (登録商標) TGX (商標) 上で反応を実行することによって評価した。(図8B)。CDR2における8つのC9-FSY変異体は、Her 3との架橋を支持することが見出された(53、55、56、57、58、60、64、67)。2つの部位(55、57)は、全ての架橋部位の中で最も高い架橋収率を有することが見出された。

【0404】

10

最も速い速度でのC9-FSY架橋部位の同定。最も速い速度でFSY架橋部位を同定するために、上で同定したFSY部位を有するC9をHer 3受容体(Acrobiosystem)を用いてインキュベートし、架橋収率を決定した。C9-FSY変異体を、1xPBS、pH7.4中で、8:1のモル比でHer 3受容体と共にインキュベートした。インキュベーションを、1時間後に、100mM DTTを含有する最終1xSDSローディング色素に添加することによって停止し、反応物をCoomassie blue染色で4~20% Mini-PROTEAN (登録商標) TGX (商標) によって分析した。

【0405】

20

固有の55 FSY部位は、他の部位と比較して最も高い架橋収率(1時間以内に>50%)を有することが見出され、55 FSYが最も速い架橋速度を有することが示された(図8C)。C9-55FSYをHer 3受容体と共にインキュベートし、0、15、30、60、120、および180分の時間経過にわたって反応を停止させることによってさらに分析した。図8Dに示すように、架橋は急速に進行し、15分以内に検出され、1時間以内に50%を超える架橋であった。

【0406】

実施例13-FSY修飾および非修飾C2 sdAbの結合親和性

54位にFSYを有するC2 sdAb (C2-54FSY)を選択して、同じ位置のチロシンを有するC2 sdAb (C2-54TYR)との結合親和性を比較した。実施例2におけるようにタンパク質を調製し、次いで、FPLCサイズ排除クロマトグラフィー(HiLoad 16/600 Superdex 200pgsize exclusion column Cytiva #28989335)によってさらに精製した。1xDPBSをランニング緩衝液(running buffer)として使用し、タンパク質をイソクラティック溶離(isocratic elution)によって回収した。各C2 sdAbについて、還元SDS-PAGEによってモノマーピーク画分を分析し、プールし、陰イオン交換ランニング緩衝液(20mM Tris、7.5および20mM NaCl)に4℃で一晩、透析した。エンドトキシンを除去するため、透析した試料プールを、HiTrap Q XL、1mlカラム(Cytiva #17515801)に流し、カラムにエンドトキシンを結合させた。貫流を回収し、エンドトキシンレベルについてチェックした。最後に、完全に精製した試料を最終製剤緩衝液として1xDPBSに透析した。試料を等分し、-80℃で保存した。

30

40

【0407】

AHCセンサー(Sartorius Item #18-5060)を用いたバイオレイヤー干渉法を用いて結合反応速度論を測定した。C2-54FSYまたはC2-54TYR sdAb (タンパク質濃度400nM、200nM、100nM、50nM)のいずれかを有するFcタグ(Acrobiosystem PSA-H5264-100ug)を有するPSMA(50nM)。測定したOCTETの工程を、ベースライン:60秒、受容体のローディング:300秒、非結合受容体のウォッシュアウト:300秒、接続についてsdAbのローディング:100秒、解離:600秒。C2-54TYRのは、9.1nMのKD、C2-54FSYは、10.9nMのKDであり、54位のチロ

50

シンの代わりにFSYを組み込んでも結合親和性は変わらないことが示された。

【0408】

実施例14－細胞結合アッセイ

C2-54FSYおよびC2-54TYR sdAbを、フローサイトメトリーを用いて、ヒト前立腺腫瘍細胞株LNCaP (PSMA+) およびPC3 (PSMA-) への結合について評価した。実施例13からのタンパク質を、FACS緩衝液(1×PBS+2%HI-FBS)を用いて、3μM(1000μL)まで製剤化し、次いで5x(200μL sdAb~800μL FACS緩衝液)で連続希釈して、アッセイのための8つの濃度点を生成し、最低濃度は0.0000384μMであった。対照sdAb(ヒトPSMA Alexa Fluor Alexa Fluor(登録商標)647-コンジュゲート抗体)を、FACS緩衝液(1×PBS+2%HI-FBS)を用いて、1μM(450μL)まで製剤化し、次いで3x(150μL被験物質対300μL FACS緩衝液)で連続希釈し、最低濃度は0.00045μMであった。

10

【0409】

結合アッセイ。LNCaPおよびPC3細胞株(ATCC)を、10%熱不活性化ウシ胎仔血清(Thermo Fisher)を補充したRPMI-1640およびF12K培地中で、5%CO2を含む加湿環境において37℃で維持した。細胞を指数増殖期(exponential growth phase)に回収し、計数し、100μL細胞/ウェルでv底96ウェルプレートに等分した。細胞を遠心分離によってペレット化した。C2 sdAbおよび対照sdAb試料を細胞に添加し、氷上で1時間インキュベートした。C2 sdAbで処理した細胞については、インキュベーション後、細胞をFACS緩衝液で2回洗浄し、5μg/mLの二次抗体(Alexa Fluor 647 AffiniPure Goat Anti-Alpaca IgG、VHHDメイン)を含有する氷冷FACS緩衝液100μLと氷上で30分間インキュベートした。次いで、細胞をFACS緩衝液で2回洗浄し、4℃の固定緩衝液(ThermoFisher, Cat. No. 0082249)で固定した。対照sdAbで処理した細胞については、インキュベーション後、細胞をFACS緩衝液で2回洗浄し、4℃の固定緩衝液(ThermoFisher, Cat. No. 0082249)で固定した。固定後、細胞を2回洗浄し、Attuneフローサイトメトリー(ThermoFisher)で分析した。

20

【0410】

生データ(FCSファイル)を分析した(Flowjo 10.7.2)。FSC-AおよびSSC-Aを使用して全細胞を分離し、無傷細胞をFSC-AおよびSSC-Aでゲーティングした。次いで、FSC-Hに対してFSC-Aを用いてシングレットをゲーティングした。シングレットをAlexa Fluor-647で分離した。試料のAlexa Fluor-647シグナル強度の幾何平均強度をさらなる分析およびプロットに使用した。試料のAlexa Fluor-647の幾何平均強度の平均値およびSTDEV値を計算した(Microsoft 365 MSO Version 2202 Build 16.0.14931.20128 64-bitのためのMicrosoft(登録商標)Excel(登録商標))。曲線フィットとプロットは、「log(アゴニスト)vs反応-可変勾配(4つのパラメータ)」(GraphPad Prism 9.2.0)を用いて行った。

30

40

【0411】

C2-54TYRおよびC2-54FSYは、LNCaP細胞に用量依存的に結合したが、PSMA陰性PC3細胞への結合を示さなかった(図9)。C2-54TYRおよびC2-54FSYに対する結合親和性を、LNCaP細胞のフロー染色後のEC50値から測定した(表8)。

【0412】

50

【表 9】

表 8. LNCaP 細胞における C2 sdAb の結合親和性

	C2-54TYR	C2-54FSY
EC50	14.88nM	12.25nM
EC50 範囲	8.83nM ~ 27.05nM	8.98nM ~ 16.88nM
R 平方	0.978	0.99

10

【0413】

実施例 15 - 標的細胞への FSY 修飾 sdAb の架橋

C2-54TYR、C2-54FSY および C3-101FSY の架橋を細胞結合について比較した。LNCaP および PC3 細胞を実施例 14 に記載のように培養した。細胞を、それらの増殖培地中で、500,000 細胞／ウェルの密度で 6 ウェルプレートに播種した。播種の 48 時間後であって、培養培地を除去し、sdAb を含む 0.8 mL の培養培地を、示された濃度および時点で添加した（表 9 および 10 を参照されたい）。細胞を 2 回（1 mL／ウェルの 1 × PBS）ですすぎ、0.2 mL／ウェル 0.25 % EDTA トリプシン（Gibco, Cat. No. 25200-056）を添加した。インキュベーター中で 5 分間インキュベートした後、1 mL の完全培地を添加してトリプシンを中和した。細胞をすすぎ、ペレット化した。

20

【0414】

プロテアーゼ阻害剤カクテルを添加した RIPA 緩衝液で細胞を溶解した（Santa Cruz Biotechnology, Cat. No. SC-24948A）。変性したサンプルを 4-20 % Criterion TGX Gel（Bio-Rad, Cat. No. 5671095）で電気泳動により分析し、続いてウェスタンブロットキット（Bio-Rad, Cat. No. 1704271）および Pierce Fast Western Blot Kits（Thermo Scientific, Cat. No. 35060、35061）により分析し、一次抗体抗ヒト PSMA（Invitrogen、Cat. No. 37-3900）または抗アルパカ VHH（Jackson ImmunoResearch、Cat. No. 128-035-232）、内部標準抗 GAPDH（Cell Signaling Technology、Cat. No. CST-2118）を用いて分析した。

30

【0415】

Azure Biosystem C600 によって画像を取得した。GIMP 2.10.28 を使用して画像を処理した。ウェスタンブロットのバンド密度は、ImageJ 1.51j8 を用い、指示に従って測定した（imagej.nih.gov/ij/docs/guide/146-30.html#infobox:Densitometry, Section 30.13）。全 PSMA に対する架橋 PSMA の割合を以下の式：架橋 PSMA の密度／（架橋 PSMA の密度 + 非架橋 PSMA の密度）× 100 % で計算した。

40

【0416】

LNCaP 細胞からのウェスタンブロットでは、抗 PSMA 抗体で検出された優勢なバンド（～100 kD）が観察されたが（図 10A）、PC3 細胞では、同様の分子量を有するバンドは検出されず（図 10B）、これは、抗 PSMA 抗体の特異性を実証し、LNCaP 細胞における PSMA 発現の特異性を確認した。C2-54FSY で処理した LNCaP 細胞では、PSMA より上のさらなるバンドが検出された。バンドの強度は時間および濃度依存的に増加し、特異的架橋を示した。しかし、様々な濃度の C2-54TYR で様々な時間処理した LNCaP 細胞において、架橋バンドではなく同様の強度の非架橋

50

PSMAバンドが観察され、FSYを含まないsdAbがLNCaP細胞においてPSMAに架橋しなかったことが示された（図10B）。架橋の定量化は、C2-54TYRがLNCaP細胞において時間および用量依存的にPSMAに架橋したことを示した。

（表9および図10C）

【0417】

【表10】

表9. LNCaP細胞におけるC2-54FSYとPSMAとの架橋速度論

	濃度		
	1μM	24 nM	4.8 nM
処置後の時間(時)	架橋 PSMA(合計 PSMA%)		
0	0.0	0.0	0.0
1	5.1	1.4	0.5
3	17.1	9.2	0.5
6	41.7	18.5	1.2
9	50.9	29.7	2.2
24	71.8	50.8	3.1

10

20

【0418】

C3-101FSYで処理したLNCaP細胞では、同様のパターンが観察され、架橋バンド（PSMA-sdAb）の強度は時間および濃度依存的に増加した。C3-101FSYの分子量はC2-54FSYよりも高いので、架橋バンドは、C2-54FSYの架橋バンドよりも高い見かけの分子量で移動した（図11A）。C2-54FSYおよびC3-101FSYの架橋反応速度論の比較を、表10および図11Bに示す。

【0419】

30

40

50

【表 1 1】

表 10. LNCaP 細胞における C2-54FSY および C3-101FSY と PSMA との架橋速度論

	処置			
	1μM C2-54FSY	24nM C2-54FSY	1μM C3-101FSY	24nM C3-101FSY
処置後の時間 (時)	架橋 PSMA (合計 PSMA%)			
0	0.0	0.0	0.0	0.0
1	3.5	1.4	38.2	4.4
3	8.6	3.8	60.2	12.8
6	22.6	7.7	87.2	13.5
9	37.2	12.4	88.6	14.0
24	58.5	26.6	80.8	6.0

10

20

【0 4 2 0】

実施例 16 – *In vivo* 架橋アッセイ

この研究は、2つのマウス異種移植腫瘍モデル、LNCaP および PC3 における PSMA による C2-54TYR および C2-54FSY の *in vivo* 架橋、全身性、および腫瘍内曝露を評価した。LNCaP および PC3 細胞株 (ATCC) を、10% 熱不活性化ウシ胎仔血清 (Thermo Fisher) を補充した RPMI-1640 および F12K 培地中で、5% CO₂ を含む加湿環境において 37℃ でそれぞれ維持した。細胞を指数増殖期に回収し、冷蔵遠心機において 335xg で遠心分離し、培地を吸引した。細胞接種のために、細胞ペレットを、PC3 については 100 μL の無血清 F-12K 培地中に、または LNCaP については RPMI+100 μL の Matrigel 中に再懸濁した。500 万の PC3 細胞または 300 万の LNCaP 細胞を含有する 200 μL を、雄 NSG マウス (Jackson Labs) の側腹部に移植した。腫瘍サイズが約 200 mm³ に達したとき、C2-54TYR および C2-54FSY を尾静脈から注射した。末梢血試料を頬出血によって採取した。6 時間後、マウスを殺し、末梢血試料および腫瘍の両方を採取し、秤量し、-80℃ で凍結した。

30

【0 4 2 1】

腫瘍試料 (~30~40 mg) を、プロテアーゼ阻害剤カクテル (Santa Cruz Biotechnology, Cat. No. SC-24948A) を含む 1 mL の RIPA 緩衝液に添加し、次いで Qiagen TissueLyser II Sample Disruptor でホモジナイズした。均質化後、試料を 12,000 rpm で 10 分間 4℃ で遠心分離した。上清を保持し、ペレットを廃棄した。遠心分離プロセスを 1 回繰り返した (合計 2 回)。

40

【0 4 2 2】

腫瘍溶解物のタンパク質濃度を、BCA タンパク質アッセイキット (Thermo Scientific, Cat. No. 23225) 用いて定量した。試料を RIPA 緩衝液で同じ濃度に製剤化し、次いで、6x 低減ローディング緩衝液 (Alfa Aesar, Cat. No. J61337) を添加した後、100℃ で 10 分間加熱した。変性したサンプルは、4-20% Criterion TGX ゲル (Bio-Rad, Cat. No. 5671095) で電気泳動して分析して、続いて、架橋を検出するための抗 PSM

50

A抗体と抗VHH抗体、およびローディングコントロールとしての抗GAPDH抗体を用いたウェスタンブロット（Bio-Rad, Cat. No. 1704271およびThermo Scientific, Cat. No. 35060, 35061）により分析した。Azure Biosystem C600によって画像を取得した。GIMP 2.10.28を使用して画像を処理した。血漿をELISAに供し、データを処理し、プロットした（GraphPad Prism 9.2.0）。平均値およびSTDEVを計算し、血漿濃度の有意性を、対応のない両側スチューデントt検定を使用して評価した。

【0423】

C2-FSYまたはC2-TYRを投与された動物に由来するLNCaPおよびPC3腫瘍からの試料を上記のように調製し、抗VHH抗体でウェスタンブロットして、非架橋C2化合物（ブロットの15kD領域）および架橋C2化合物（上記PSMAの約100kD領域）を検出した。C2-54FSYを投与された動物からのLNCaP腫瘍試料において、抗VHHウェスタンブロットは、全ての試料においてPSMA領域（～100kD）より上のバンドを検出したが、C2-54TYRまたはビヒクル試料において架橋バンドは観察されず（図12A）、これは、C2-54FSYによる特異的かつ再現可能な架橋を示す。PC3腫瘍試料では抗VHHシグナルは観察されなかったが、C2-54TYRおよびC2-54FSYで処理したLNCaP試料ではバンドの異なるパターンが観察された。非架橋／遊離sdAbを示すブロットの～15kD領域では、C2-54TYRおよびC2-54FSY処理LNCaP試料の両方が、同様の強度のバンドを示し、同様のレベルの非架橋sdAbの存在を実証した。C2-54FSYで処置したLNCaP腫瘍組織において特異的に約100kDで移動したさらなるバンドが観察されたが、C2-54TYRで処置した動物からのPC3試料またはLNCaP試料においてこの領域ではバンドは観察されず、C2-54FSYのPSMAへの架橋が示された。

【0424】

sdAbの全身曝露を推定および比較するために、C2-54TYRおよびC2-54FSYの血漿濃度を、ELISAを使用して投与の30分後および6時間後に測定した（表11および図12B）。

【0425】

【表12】

表 11. C2-54TYR および C2-54FSY の血漿中濃度(ng/ml)

		投与の 30 分後				投与の 6 時間後			
		群			平均±STDEV	群			平均±STDEV
PC3 腫瘍を有するマウス	C2-54TYR	7746.7	23430.0	17463.3	16213.3±7916.0	33.2	31.2	10.3	24.9±12.7
	C2-54FSY	18713.3	16696.7	22113.3	19174.4±2737.6	43.9	39.9	45.7	43.2±3.0
LNCaP 腫瘍を有するマウス	C2-54TYR	8530.0	8146.7	8163.3	8280±216.7	9.3	11.5	45.7	22.2±20.4
	C2-54FSY	12246.7	14313.3	9463.3	12007.8±2433.8	34.5	82.9	36.8	51.4±27.3

【0426】

結果は、単回IV投与後、C2-54TYRおよびC2-54FSYが腫瘍にアクセスし、PSMA依存的に蓄積することを示す。しかし、C2-54FSYのみが腫瘍においてPSMAに特異的に架橋する。

【 0 4 2 7 】

実施例 1 7 標的特異的架橋のための F S K 修飾および F S Y 修飾 s d A b の構築

概して実施例 2 および 1 1 の方法にしたがって、ライブラリーおよびライブラリー株を構築し、発現させ、精製した。F S Y または F S K の挿入に適合する部位を含有する C D R の領域を最初に同定するために、C D R 領域のコード領域内に T A G コドンを含むプラスミドを含有する株を構築した。表 1 2 は、スクリーニングに使用した s d A b および C D R 配列を示す。

【 0 4 2 8 】

【表 1 3】

表 12: FSY および FSK 挿入を有する SdAb

sdAb	標的	CDR	CDR アミノ酸配列	FSY 挿入	FSK 挿入
C14 (配列 番号: 28)	CEA5	CDR1 (26-35)	GDTYGSYWVG	x	x
		CDR2 (50-66)	AINRGGGYTVYADSVKG	x	x
		CDR3 (99-112)	SGVLGGLHEDWFNY	x	x
C8 (配列 番号: 23)	FAP	CDR1 (26-35)	GSIFVGNAMG	x	
		CDR2 (50-65)	GITSDGITYYPDSVKG	x	
		CDR3 (98-106)	WPPRIGFAS	x	
C12 (配列 番号: 27)	葉酸 受容体 α	CDR1 (26-35)	ETFGVVFTLG	x	
		CDR2 (50-65)	RVTGTDTVDYAESVKG	x	
		CDR3 (98-100)	GAY	x	
C11 (配列 番号: 26)	MSLN	CDR1 (26-35)	GIDLSLYRMR	x	x
		CDR2 (50-65)	LITDDGTSYYEDSVKG	x	x
		CDR3 (98-106)	ETPLSPVNY	x	x
C10 (配列 番号: 25)	MSLN	CDR1 (26-35)	GSIFGIRTMD	x	
		CDR2 (50-65)	RITMDGRVVFHADSVKG	x	
		CDR3 (98-106)	SGLTSREDY	x	
C18 (配列 番号: 34)	HER3	CDR1 (26-35)	GRTSSKYAMG	x	x
		CDR2 (50-66)	TISWSDGSTYYADSVEG	x	
		CDR3 (99-113)	AVDVLAGTFEYDYDY	x	
C20 (配列 番号: 37)	CD123	CDR1 (26-35)	GRAINTYAMG	x	
		CDR2 (50-66)	AISWNGGHTRYADSVQ G	x	
		CDR3 (99-114)	YSDYHRIATMEADADS	x	
C21 (配列 番号: 38)	5T4	CDR1 (26-35)	DFTFRNYEMS or DFTFRSYEMS	x	x
		CDR2 (50-66)	SISGSGGSTYYAHSLKG	x	x
		CDR3 (99-109)	LRDGFNNGFDY	x	x

【 0 4 2 9 】

スクリーニング。CDR領域のコード領域内にTAGコドンを含むプラスミドを含む株をプール中でスクリーニングし、実施例11および12の方法に概してしたがって架橋をアッセイした。標的に対する架橋活性を示すプールを、架橋について個々のFSYまたはFSK変異体を評価することによってさらに分析した。架橋を示す個々の変異体を表13に示す。

【0430】

【表14】

表13: 架橋sdAbのためのFSYおよびFSK挿入の同定

sdAb	架橋アッセイのための 標的(ヒト)	FSY 位置	FSK 位置
C14	CEACAM5	55	52
C8	FAP	54, 55, 56	52, 53, 54, 55, 56, 58, 60, 62, 64 (上記実施例11)
C12	葉酸受容体 α (FOLRa)	58	未試験
C11	MSLN	53, 54, 101, 102, 103, 104, 105	53
C10	MSLN	29, 30, 31, 32, 33, 52, 53, 54, 100, 101	未試験
C18	HER3	33, 101, 103	30, 31, 32, 35
C20	CD123	56, 57, 58	未試験
C21	5T4	59	27

10

20

【0431】

架橋アッセイの標的のために使用される試薬。CEACAM5は、Acrobiosystem (#CE5-HF255-25 μ g) およびSinobiological (#11077-H02H-100 μ g) から購入した。FAP受容体は、Acrobiosystem (#AP-H5263-100ug) から購入した。ヒトFOLRa (葉酸受容体 α) 受容体は、Acrobiosystem (#FO1-H5253-100ug) から購入した。MSLN (メソテリン) は、Sinobiological (Cat: 13128-HNCH、Cat: 13128-H01H-B) およびAcrobiosystem (#MSN-H526x-100ug) から購入した。ヒトMSLN細胞外ドメインは、Acrobiosystemから購入した (#MSN-H5253-100ug、#MSN-HF223-25ug)。Her3細胞外ドメインは、Acrobiosystem (#ER3-H5223-100ug) から購入した。ヒトCD123タンパク質細胞外ドメインは、Sinobiological (#10518-H02H-50ug) から購入した。ヒト5T4細胞外ドメインは、Acrobiosystem (#TPG-H5253-100ug) から購入した。

30

40

【0432】

C8 FSY sdAbについて、架橋の反応速度論を実施例11の方法にしたがって分析した。図13は、0~180分での架橋を示す。C8-54 FSY部位は、他の部位と比較して最も高い架橋速度を有することが見出された (2時間以内に約50%架橋)。同様に、C18-FSYおよびC18-FSK sdAbのHER3受容体への架橋速度を比較した。33、101、および103位の間と同様に、101位のFSYは、最も高い架橋効率および架橋速度を達成することが観察された。30、32、35位のC18 sdAb FSK変異体について、35位のFSKは、Her3に対して最も高い架橋効

50

率および架橋速度を達成することが観察された。C 2 0 F S Y s d A bにおける3つの部位の評価は、5 7 位がC D 1 2 3に対して最も高い架橋効率および架橋速度を達成したことを示した。

【0 4 3 3】

実施例 1 8 . F S Y 修飾 D A R P i n の同定および反応速度論

H e r 2 結合 D A R P i n (C 1 5) を、F S Y アミノ酸の挿入を介して架橋する能力についてスクリーニングした。実施例 2 の一般的な方法にしたがって、ライブラリーおよびライブラリー株を構築し、発現させ、精製した。C 1 5 W T 配列 (配列番号 2 9) を表 1 4 に示し、F S Y 挿入によってスクリーニングされた領域を太字で示し、F S Y 置換のアミノ酸位置を表の第 2 行に示す。

【0 4 3 4】

【表 1 5】

表 14. HER2 DARPIn への FSY の置換のためのアミノ酸位置

DARPIn C15 wt ア ミノ酸配 列	MDLGKKLLEAARAGQDDEVRLMANGADVNAH DFY GITPLHLAA NFGHLEIVEVLLKHGADVNA FDYD NTPLHLAADAGHLEIVEVLLKY GADVNASDRDGHTPLHLAAREGHLEIVEVLLKNGADVNAQDKFGK TAFDISIDNGNEDLAEILQKLAAALEHHHHHHH
ライブラ リー中の FSY部位	2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 33, 34, 35, 36, 37, 66, 67, 68, 69

【0 4 3 5】

個々の C 1 5 - F S Y 突然変異体をそれぞれ、実施例 1 1 の方法に一般にしたがって、架橋効率のために H e r 2 受容体と共にインキュベートした。C 1 5 における部位 9、1 2、3 7、6 6、6 8 は、図 1 4 に示されるように、H e r 2 受容体との架橋を示した。最も速い速度で F S Y 架橋部位を同定するために、上記で同定した F S Y 部位を有する D A R P i n を F c タグ付き H E R 2 (A c r o b i o s y s t e m : A c r o b i o s y s t e m : # H E R 2 - H 5 2 5 3 - 1 0 0 u g) と共にインキュベートし、1 5 分および 3 0 分で架橋について調べた。C 1 5 - 6 6 F S Y 部位は、他の部位と比較してより高い架橋収率を有することが見出された。

【0 4 3 6】

バイパルトピック D A R P i n (C 1 5 - 6 6 F S Y - C 1 6、以下 C 3 8 - F S Y と称する) は、F S Y 置換 C 1 6 (配列番号 3 0) を有さない D A R P i n の 1 コピーを C 1 5 - 6 6 F S Y の C 末端に 5 アミノ酸 G G G G S リンカーで融合して融合タンパク質を作製することによって構築した。C 3 8 - F S Y タンパク質を F c タグ化 H e r 2 と共にインキュベートし、実施例 1 1 の方法に一般にしたがって架橋について調べた。図 1 5 に示すように、バイパルトピック C 3 8 - F S Y は時間依存的に H e r 2 を架橋し、2 . 5 時間以内に 5 0 % が架橋した。

【0 4 3 7】

実施例 1 9 . 標的化イメージングペイロード (t a r g e t e d i m a g i n g p a y l o a d) との細胞結合

C 2 2 - T Y R および C 2 2 - F S Y (それぞれ、配列番号 3 9 および 4 0) は、N i - N T A 樹脂からの溶出後、精製タンパク質を次いで、1 : 1 0 0 の希釈係数を使用して 4 ° C で一晚、陰イオン交換ランニング緩衝液 (2 0 m M T r i s、7 . 5 および 2 0 m M N a C l) に緩衝液交換したことを除いて、実施例 2 の方法に一般にしたがって発現および精製した。透析した試料プールを H i T r a p Q X L、5 m l カラム (C y t

i v a # 1 7 5 1 5 8 0 1) にフロースルーで通し、エンドトキシンをカラムに結合させた。s d A b モノマーフロースルー画分を還元 SDS-PAGE によって分析し、プールした。次いで、精製された C 2 2-TYR および C 2 2-FSY を、A Z Dye 680 (Click Chemistry Tools, Catalog # 1578-25) にコンジュゲートした。

【0438】

ソルターゼ媒介ライゲーションを使用して、A Z Dye 680 (Click Chemistry Tools, Catalog # 1578-25) を C 2 2-FSY および C 2 2-TYR にコンジュゲートし、C 2 3-TYR および C 2 3-FSY を作製した。ソルターゼ g ブロック配列をコドン最適化し、IDT によって順序付け、pBAD ベクターにクローニングし、記載のように調製した (PubMed: 21697512)。s d A b 構築物を A Z Dye 680 にコンジュゲートするために、PBS pH 7.4 中で上記で精製した 20 mg のタンパク質を、1 mM CaCl₂、0.5 mM A Z Dye 680、2 mg ソルターゼと共にシェーカー中 30°C でインキュベートした (s d A b の最終濃度は約 0.7 mg/mL であった)。2 時間後、2 mM MTSET を添加して反応をクエンチした。クエンチした反応を、2 mL の Ni 樹脂 (PBS 平衡化) にバッチ結合させて、ソルターゼおよび非コンジュゲート物質を除去し、室温で 30 分間攪拌した (nutating)。ビーズをスピンして、未結合画分からの樹脂の分離を容易にし (700 g × 10 分、20°C)、ガラスカラムに充填し、ビーズを PBS で洗浄して残りのタンパク質を収集することによって、フロースルーを収集した。フロースルーと洗浄液を組み合わせで濃縮し (5 K MWCO、4 k rcf、10°C、1.5 時間)、Hi Load 26/600 Superdex 75 pg (Cytiva, #28-9893-34) にロードして非コンジュゲート色素 (unconjugated dye) を除去した。画分を回収し、SDS-PAGE によって分析し、プールし、-80°C で保存した。

【0439】

得られたコンジュゲート C 2 3-TYR および C 2 3-FSY を、ヒト表皮扁平上皮癌株 A 431 (EGFR+) およびヒト結腸直腸癌細胞株 COLO320DM (EGFR-) への結合について、フローサイトメトリーによって評価した。タンパク質を、FACS 緩衝液 (1 × PBS + 2% HI-FBS + 5 mM EDTA) を用いて 30 μM (10 × 最終) まで製剤化し、次いで 5 × (20 μL s d A b 対 80 μL FACS 緩衝液) で連続希釈して、アッセイのための 8 つの濃度点を生成し、最低濃度は 0.000384 μM (10 × 最終) であった。A 431 および COLO320DM 細胞株 (ATCC) の両方を、5% CO₂ の加湿環境中、37°C で、10% 熱不活化ウシ胎仔血清 (Thermo Fisher) を補充した RPMI-1640 中で維持した。細胞を指数増殖期に回収し、計数し、氷冷 FACS 緩衝液に 1.1 × 10⁶ /mL で再懸濁し、v 底 96 ウェルプレート (Corning 3897) に 90 μL /ウェルで分注した。C 2 3-TYR および C 2 3-FSY タンパク質を A 431 細胞に 10 μL /ウェルで添加し、最終濃度を 1 倍にした。EGFR+ 細胞への結合の特異性を制御するために、同じ希釈範囲の被験物質を COLO320DM 細胞に添加した。氷上で 2 時間インキュベートした後、細胞を 2000 rpm で 2 分間ベレット化し、次いで 200 μL の FACS 緩衝液で 2 回洗浄し、次いで 100 μL の氷冷 FACS 緩衝液に再懸濁し、NovoCyte フローサイトメーター (ACEA / Agilent) で分析した。

【0440】

生データ (FCS ファイル) を FlowJo 10.7.2 で分析した。FSC-A および SSC-A を用いて全無傷細胞を同定し、次いで、FSC-H に対する FSC-A を用いてシングレットをゲートアウトした。試料の AZ680 の幾何平均蛍光強度をさらなる分析およびプロットに使用した。AZ680 チャネルの幾何平均蛍光強度 (GeoMean または GeoMFI) を用いて、GraphPad Prism (V9.3.1) で「log (アゴニスト) vs log (アゴニスト) vs 反応-可変勾配 (4 つのパラメー

タ)」を用いてEC50を算出した。

【0441】

図16に示されるように、C23-FSYおよびC23-TYRは、用量依存的にA431細胞に結合したが、EGFR陰性COLO320DM細胞への結合を示さなかった。表15に示されるように、C23-FSYおよびC23-TYRに対する結合親和性を、A431細胞の染色およびフローサイトメトリー後のEC50値から測定した。

【0442】

【表16】

表 15. A431細胞上のC23-FSYおよびC23-TYR AF680 コンジュゲートの結合親和性

10

	C23-TYR	C23-FSY
EC50 (nM)	495	518
EC50 範囲	415.2-613.1	444.7-618.2
R平方	0.99	1.00

【0443】

実施例20. 標的化イメージングペイロードを用いたin vivoでの腫瘍ロッキング
この研究では、蛍光標識sdAbのin vivoでの架橋を評価した。C22-FS
YおよびC22-TYRを改変して、実施例19の方法にしたがってAZ680コンジュ
ゲートC23-FSYおよびC23-TYR（それぞれ配列番号42、41）を作製した
。EGFRへのC23-FSYおよびC23-TYRのin vivoでの架橋を、A4
31表皮扁平上皮癌異種移植腫瘍モデル（A431 epidermoid squam
ous carcinoma xenograft tumor model）において
評価した。ヒト結腸直腸癌異種移植モデルCOLO320DMをEGFR-対照として用
いた。両方の細胞株を、供給業者のプロトコル（ATCC）に従って培養した。注射の日
に、細胞を回収し、無血清培地で洗浄し、計数し、冷無血清培地に再懸濁した。A431
細胞ペレットを100mLの無血清DMEMおよび100μLのRPMI1640に再懸
濁し、次いで細胞を100mLのMatrigelと混合し、 5×10^6 個の生存細胞／
100μLの最終濃度を得た。6～8週齢の雌性Balb／cヌードマウス（Charl
es River）の右脇腹上部に、A431またはCOLO 320DM細胞を100
0万個含む200mLを移植した。腫瘍サイズが約200mm³に達したとき、5mg／
kgのC23-FSY、C23-TYRまたはビヒクル対照（PBS）を10mL／kg
の容量で尾静脈から注射した。投与精度を確認するため、投与0.5時間後に頬出血によ
り末梢血試料を採取した。

20

30

【0444】

被験物質の生体内分布を、表16に示すように2つの異なる時点で研究した。動物を安
楽死させ、腫瘍を採取し、秤量し、氷上に置いてex vivoでIVISイメージング
し、その後ウェスタンブロット分析のために瞬間凍結した。

40

【0445】

【表 17】

表 16. 体内分布分析の時点

群	時点あたりのマウスの数	時点(時)	PKの非終末血清試料抽出
ビヒクル	1	8, 24	すべてのマウスについて0.5時間
C23-TYR	3	8, 24	すべてのマウスについて0.5時間
C23-FSY	3	8, 24	すべてのマウスについて0.5時間

10

【0446】

組織処理。腫瘍片（約30～50mg）を秤量し、かみそり刃で小片に刻んだ。刻んだ腫瘍組織をCK28-Rチューブ（Bertin Instruments, Cat. P000916LYSK0-A）に入れ、0.5mLのT-PER緩衝液（Thermo Scientific Cat. 78510）にHalt Protease & Phosphatase Inhibitor Cocktail（Thermo Scientific Cat. 78446）を添加した。次いで、組織をPrecellys 24組織ホモジナイザーでホモジナイズした。均質化後、試料を12,000×rpmで10分間4℃で遠心分離した。次いで、上清を保持し、ペレットを廃棄した。遠心分離プロセスをもう1回繰り返した（合計2回）。

20

【0447】

ゲルイメージング。腫瘍溶解液のタンパク質濃度は、Pierce Rapid Gold BCA Protein Assay Kit（Thermo Scientific Cat. A53225）を用いて、製造業者の指示に従って定量した。キットからの1mg/mL BSAで開始するBSAの7点2倍希釈を標準として使用した。試料をT-PERバッファーで同濃度（3.6mg/mL）に調製し、次いで1x還元ローディングバッファー中で95℃、10分間加熱し、最終濃度3mg/mLを得た。次に、各試料の全タンパク質30μgを電気泳動のために4～20% Criterion TGX Gel（Bio-Rad, Cat. 5671085）。画像は、NIR-700チャンネルを用いてAzure Biosystem C600によって取得した。GIMP 2.10.28を使用して画像を処理した。

30

【0448】

図17は、A431（EGFR+）およびCOLO320DM（EGFR-）腫瘍における腫瘍内遊離およびEGFR架橋sdAbを時間依存的に示す。遊離sdAbは～15kDの領域で検出され（下部パネル、遊離VHHと標識）、EGFR架橋sdAbバンドは～175kDの領域で検出された（上部パネル、VHH-EGFR架橋と標識）。EGFR+A431腫瘍において、C23-FSYではEGFRの時間依存性架橋が観察されたが、C23-TYRでは観察されなかった。遊離sdAb保持も架橋もEGFR-COLO320DM腫瘍では観察されなかった。

40

【0449】

腫瘍を剥離し、AMI HTXでイメージングし、イメージングデータをAuraソフトウェアで解析した（Spectral Instruments Imaging, Version 4.0.7）。放射効率の平均値（average radiant efficiency values）は、個々の腫瘍の周囲にROIを作成して得た（AuraのEllipse ROIツール）。全発光（光子/秒）を測定し、記録した。全発光値を組織重量（光子/秒/g）に対して正規化した。統計学的有意性は、Prism（v9.1.0（221））で対応のあるt検定を用いて決定した（* = $p \leq 0.05$ 、** = $p \leq 0.005$ ）。図18は、C23-FSYおよびC23-TYRの投与の8時間後および24時間後のA431およびCOLO320DM腫瘍組織のex vivo

50

でのイメージングを示す。

【0450】

図18Aは、3回の生物学的複製にわたる光子／秒／g腫瘍組織を示す。個々の動物からの値を示し、中央のバーは平均強度を、エラーバーはSEMを示す（*は $p=0.024$ 、**は $p=0.002$ 、対応のあるt検定による）。C23-FSYは、8および24時間の時点の両方において、C23-TYRタンパク質と比較して、A431腫瘍において有意に高いレベルで存在した。24時間後、C23-TYRはA431腫瘍組織において非常に低いレベルで観察されたが、C23-FSY、特にEGFR-VHH架橋種は顕著であった（図17、18A）。被験物質は同様の親和性を有するので（図16）、これらの結果は合わせて、FSY含有sdAbの腫瘍AUCが共有結合性によって増加し得ることを示す。

10

【0451】

図18Bは、投与の8および24時間後にC23-FSYを投与した動物からのA431およびCLO320DM腫瘍の定量的ex vivo蛍光強度を示す。プロットは、3回の生物学的複製（triplicate biological replicate）にわたる光子／秒／g腫瘍組織を示す。個々の動物からの値を示し、中央のバーは平均強度を示し、エラーバーはSEMを示す。C23-FSYは、8時間および24時間の両方の時点でEGFR-CLO320DM腫瘍に存在する量と比較して、A431腫瘍において有意に高いレベルで存在し、C23-FSYタンパク質の腫瘍ロッキングの特異性を実証した。

20

【0452】

これらの結果は、架橋適合性非天然アミノ酸を有するsdAbなどの標的化ドメインが、標的特異性を有する腫瘍にペイロード（ここではイメージング色素）を運ぶことができ、また、架橋適合性非天然アミノ酸を有さない標的化ドメインと比較して標的部位におけるペイロードの保持を改善することができる。

【0453】

実施例21．標的化イメージングペイロードを用いたin vivoでのPSMA腫瘍ロッキング

この研究では、LNCaPマウス前立腺癌異種移植腫瘍モデルにおける蛍光標識sdAbのin vivoでのPSMA架橋、全身性、および腫瘍内曝露を評価した。

30

【0454】

AZ Dye 680にコンジュゲートしたPSMA標的sdAbを、C29-101TYRおよびC29-101FSY（配列番号53または54）を使用し、実施例19の方法にしたがって、101位にTYRまたはFSYのいずれかを用いて調製して、C30-TYRおよびC30-FSY（それぞれ配列番号55、56）を作製した。LNCaP細胞を、5%CO₂の加湿環境中、37℃で、10%熱不活化ウシ胎仔血清を補充したRPMI-1640培地中で維持した。移植の日に、細胞を回収し、無血清培地で洗浄し、計数し、冷無血清培地に再懸濁した。細胞ペレットを50μLの無血清RPMIに再懸濁し、50μLのマトリゲルと混合し、 5×10^6 個の生存細胞／100μLの最終濃度を得た。500万のLNCaP細胞を含む100μLの容量を、雄NU/Jマウス（Jackson Labs）の右上腹部に移植した。腫瘍サイズが約200mm³に達したとき、5mg/kgのC30-TYRまたはC30-FSYのいずれかを10mL/kgの容量で尾静脈から注射した。投与精度を確認するため、投与0.5時間後に頬出血により末梢血試料を採取した。被験物質の生体内分布を、表17に示すように、8つの異なる時点（投与前、投与後15分、1時間、6時間、24時間、48時間、72時間および96時間）で研究した。安楽死後、腫瘍組織を採取し、秤量し、ex vivoでのIVISイメージングし、その後ウェスタンブロット分析のために急速凍結した。

40

【0455】

50

【表 18】

表 17 PK 試料抽出の時点

群	時点あたりのマウスの数	犠牲の時間（時）	PK の非終末血清試料抽出
ビヒクル	1	0.25, 1, 6, 24, 48, 72, 96	0.25 時間終末を除くすべてのマウスについて 0.5 時間
C30-TYR	3	0.25, 1, 6, 24, 48	0.25 時間終末を除くすべてのマウスについて 0.5 時間
C30-FSY	3	0.25, 1, 6, 24, 48, 72, 96	0.25 時間終末を除く全てのマウスについて 0.5 時間

10

【0456】

組織プロセッシング、タンパク質定量化および標準化を、実施例 20 の方法を使用して行った。遊離および P S M A 架橋 s d A b 被験物質の定量化のために、C 3 0 - F S Y の 2 倍 1 6 点標準曲線を、5 0 0 n g / m L で開始して T - P E R 緩衝液中で調製した。標準を、1 × 低減ローディング緩衝液中で 9 5 ° C で 1 0 分間加熱した。試料中の被験物質濃度の推定に基づいて、異なるゲルに対して異なる範囲の標準を使用した。標準曲線は、E x c e l の線形フィット関数を用いて、標準物質の濃度に対する標準物質のバンド面積を用いて作成した。画像中のバンドの密度は、I m a g e J 1 . 5 1 j 8 を用いて説明書にしたがって決定した (<https://imagej.nih.gov/ij/docs/guide/146-30.html#info:box:Densitometry,Section30.13>)。I m a g e J を用いて試料のバンドの面積を得た後、レーン中の T A の量を、標準曲線の線形フィットから差し引いた式を用いて計算した。3 0 μ g の全タンパク質をロードしたことであって、レーン中の T A の量は、総タンパク質 3 0 μ g 中の T A の量でもある。腫瘍 s d A b 濃度 (p g s d A b / m g 腫瘍組織) = レーン中の s d A b 量 (p g) * (タンパク質濃度 (m g / m l) * (0 . 5 m l * 1 0 0 0 / 3 0 μ g) / 腫瘍組織重量 (m g))。得られた標準曲線は、少なくとも 5 点を含み、R 2 > 0 . 9 9 であった。曲線下面積 (A U C) を、台形規則を使用して G r a p h P a d P r i s m で計算し、2 つの隣接する点間の面積を $\Delta X * ([(Y 1 + Y 2) / 2] - \text{ベースライン})$ (https://www.graphpad.com/guides/prism/latest/statistics/stat_area_under_the_curve.htm) として計算した。C 3 0 - T Y R の A U C は 1 6 7 6 であり、C 3 0 - F S Y の A U C は 4 9 0 2 であった。

20

30

【0457】

図 19 は、C 3 0 - T Y R および C 3 0 - F S Y の投与後に時間依存的に腫瘍関連遊離 s d A b および P S M A 架橋 s d A b を示す S D S P A G E ゲルの蛍光画像を示す。処置後の指定された時点で、腫瘍を回収し、ゲル電気泳動のために処理して、フルオロフォアコンジュゲート s d A b 被験物質を検出した。遊離 (非架橋) s d A b - A F 6 8 0 は約 2 0 k D の領域で検出され (下のパネル)、C 3 0 - F S Y の P S M A 架橋 s d A b - A F 6 8 0 種は 1 0 0 k D の領域で移動した (上のパネル)。* で示されるレーンはビヒクル試料を示す。

40

【0458】

図 20 は、腫瘍関連遊離および P S M A 架橋被験物質の定量分析を示す。上記のゲルからの遊離および P S M A 架橋種バンドの蛍光バンド強度を、デンストメトリーおよび標準曲線との比較によって定量した。総腫瘍内被験物質濃度 (遊離および P S M A 架橋、p g

50

／mg 腫瘍組織）を時間（h）に対してプロットする。*で表されるデータ点は、検出および定量の限界未満であった試料を示す。C30-FSYの腫瘍曝露は、非共有結合C30-TYRに対して約3倍増加した。

【0459】

実施例22．細胞傷害性ペイロードの送達

C25およびC27 sdAbを、FSY置換ありおよびFSY置換なしで調製して、C25-54TYR、C25-54FSY、C27-101TYRおよびC27-101FSY（それぞれ配列番号45、46、49、50）を生成した。Ni-NTA樹脂からの溶出後、精製タンパク質を次いで、1：100の希釈係数を使用して4℃で一晩、陰イオン交換ランニング緩衝液（20mM Tris、7.5および20mM NaCl）に緩衝液交換したことを除いて、タンパク質を発現させ、実施例2の方法にしたがって精製した。透析した試料プールをHiTrap Q XL、5mLカラム（Cytiva #17515801）に通し、カラムにエンドトキシンが結合したフロースルーモードとした。sdAbモノマーフロースルー画分を還元SDS-PAGEによって分析し、プールした。

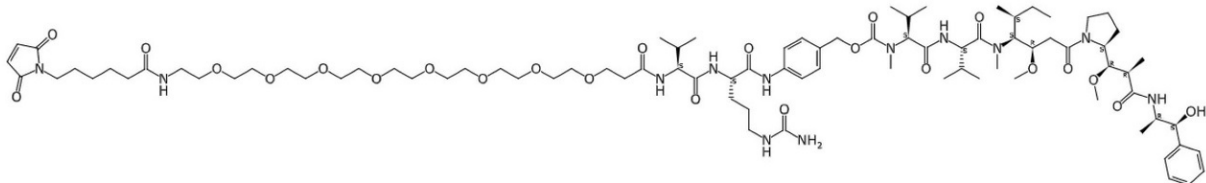
【0460】

sdAb構築物をMC-PEG8-VC-PABC-MMAE（以下に示す構造）にコンジュゲートして、C26-54TYR、C26-54FSY、C28-101TYRおよびC28-101FSYを作製した。試料を最初に1mM EDTAおよび1.5当量のTCEP（脱酸素水中10mM）で還元し、室温で1時間インキュベートした。還元後、Zeba Spin脱塩カラム（Thermo P/N 89891、7K MWCO）を用いて、1×PBS中の1mM EDTAを平衡化緩衝液として用いて、任意の残留TCEPを除去した。リンカーペイロードの溶解性を向上させるため、プロピレングリコール（PG）およびジメチルアセトアミド（DMA）を反応混合物（Cf=10% v/v）に添加し、1.5当量のリンカーペイロードを添加した。反応物を穏やかにボルテックスし、4℃で一晩インキュベートした。コンジュゲート混合物を予め水和した透析カセット（約1mL Sample：3500mL 緩衝液容量）に添加し、最低2時間透析した。透析緩衝液を交換し、試料を4℃で一晩透析した後、A280および分析SECによる分析のために試料を除去した。標準PD-10スピンプロトコール（平衡化緩衝液：1X PBS、pH 7.4）にしたがって、Cytiva PD-10カラム（カートリッジあたり4.3mLのSephadex G-25吸着剤）を用いて非コンジュゲートリンカーペイロードを除去した。溶出液の収集後であって、カラムを追加の1mLの1X PBS、pH 7.4ですすいだ。PD-10での精製後、試料は、Thermo Scientific Slide-A-Lyzer mini透析装置（3.5k MWCO）を用いて、50mLの1X PBSで最終透析を行った。すべての試料は、0.2μmの滅菌PESフィルターに通され、-20℃で保存された。

【0461】

【化116】

MC-PEG8-VC-PABC-MMAE:



【0462】

FSYを含むsdAbコンジュゲートが、非共有結合のsdAbコンジュゲートと比較

して、*in vitro*で不死化PSMA発現腫瘍細胞株へ細胞毒性ペイロードを特異的に送達する能力を測定するために、細胞透過性ペイロードであるモノメチルアウリスチンを、薬剤抗体比（*drug to antibody ratio*）（DAR）が1のsdAbsにコンジュゲートした。PSMAを発現するように操作されたPC3pip細胞株、およびPC3flu PSMA陰性細胞株（Xinning Wang教授およびWarren D. Heston教授、Case Western Reserve University、Cleveland、OHより提供）は、37℃、5%CO₂の加湿環境下、10%熱不活化ウシ胎児血清（Thermo Fisher、FB-12）を添加したRPMI-1640（Thermo Scientific、11875-903）からなる増殖培地で維持した。TrypLE Express（Thermo Scientific、14175-095）を用いて指数増殖期に細胞を回収し、黒色96ウェルフラットクリアボトムプレート（Costar、3603）中の100μL増殖培地中に800細胞／ウェルで播種した。次いで、細胞を5%CO₂の加湿環境において37℃で一晩インキュベートして、細胞をプレートに接着させた。以下の表に列挙されるsdAb-MMAEコンジュゲートを、増殖培地中で50x最終濃度まで希釈し、3倍増分で希釈して、10点希釈系列を作製した。50x被験物質希釈系列をそれぞれ容量2μLずつ、3連でウェルに添加して、1xの最終濃度を達成した（表18に示す各系列の最高濃度）。

10

【0463】

【表19】

20

表18. 被験物質コンジュゲート

名称	用量応答における最高濃度 (1x)
C26-54TYR	158 nM
C26-54FSY	137 nM
C28-101TYR	208 nM
C28-101FSY	127nM

30

【0464】

プレートを4日間インキュベーターに戻し、その後細胞生存率を評価した。CellTiter-Glo（Promega、G5737）を全てのプレートに50μL／ウェルで添加し、次いでプレートを室温で1000rpmで1分間振盪した。次いで、発光をVictor X5プレートリーダー（PerkinElmer）で読み取り、相対発光単位（RLU）として報告した。生存率は、Excel（Microsoft（登録商標）Excel（登録商標） for Microsoft 365 MSO, Version 2202 Build 16.0.14931.20128, 64-bit）を用いて、%生存率 = 100 * (処置RLU / 未処置RLU) として算出した。データは、GraphPad Prism（V9.3.1）で、生存率%対非験物質濃度としてプロットし、IC50は、log [阻害剤] 対反応-可変勾配（4パラメータ）を用いて算出した。

40

【0465】

極めて低いレベルの細胞傷害活性が、PC3flu細胞株に対するsdAb-PEG8-VC-PABC-MMAEコンジュゲートについて観察され、この細胞株におけるPSMA標的発現の欠如と一致した。C26-54TYRは、PSMAに対して14.9nMの推定親和性を有し、（LNCaP細胞における非コンジュゲート化合物について実施例14に示したように）PC3pip細胞において用量依存的な細胞毒性の増加を示し、P

50

SMA 結合および内在化を介したペイロードの標的送達と一致した。表 19 に示すように、C26-54FSY は C26-54TYR より 3.57 倍強力にペイロードを送達し、共有結合性がシングルメイン抗体薬物コンジュゲートの細胞効力を増強することを実証した。第 2 の例では、PSMA に対して $>500 \text{ nM}$ の親和性を有する C28-101TYR は、PC3pip 細胞に対して低レベルの細胞傷害活性を有したが、C28-101FSY の架橋活性は、400 倍を超えて効力をシフトさせ、細胞効力に対する共有結合性の影響を確認した。MMAE にコンジュゲートした sdAb の濃度対細胞生存率曲線を示す被験物質の細胞毒性の比較を図 21A (C26 構築物) および図 21B (C28 構築物) に示す。sdAb-PEG8-VC-PABC-MMAE コンジュゲートとの 4 日間のインキュベーション後に、PSMA+PC3pip および PSMA-PC3flu 細胞の生存率を Cell Titer-Glo アッセイによって評価した。用量反応分析を 3 回繰り返して行い、記号は平均を表し、エラーバーは STDEV を表す。

10

【0466】

【表 20】

表 19. sdAb-PEG8-VC-PABC-MMAE コンジュゲートの細胞傷害性についての IC50 値

	IC50 PC3pip (M)	IC50 PC3flu (M)
C26-54TYR	3.36e-9	$>1\text{e-}7$
C26-54FSY	9.39e-10	$>1\text{e-}7$
C28-101TYR	8.47e-8	$>1\text{e-}7$
C28-101FSY	1.8e-10	$>1\text{e-}7$

20

【0467】

実施例 23. 細胞傷害性ペイロードの HER2 標的への送達

30

HER2 標的化 sdAb (C17; 配列番号 31) を評価して、HER2 標的への架橋をもたらした FSY 挿入の個々の位置を同定した。sdAb は、プールされたスクリーニングの使用ではなく、修飾および試験のために特定の単一部位を選択したことを除いて、実施例 2 の方法に概してしたがってクローニング発現および精製した。FSY 挿入のために選択された部位を表 20 に示す。

【0468】

【表 21】

表 20. FSY 挿入 sdAb ライブラリーを標的 HER2 に焦点を合わせた

	アミノ酸配列	FSY 挿入のために選択された部位
CDR1	GYIFNSCGMG	30, 31, 33
CDR2	RISGDGDTWHKESVKG	50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60
CDR3	CYNLETY	99, 100, 101, 102, 103, 104
非 CDR		37, 44, 45, 47

40

【0469】

52 位および 54 位は、HER2 標的への架橋として同定された。FSY 架橋反応速度

50

論を評価するために、C17の52FSYおよび54FSY変異体をHer2受容体と共にインキュベートし、架橋効率について調べた。図22に示すように、54FSY部位は、1時間以内に>90%の架橋を有する最も高い架橋速度を有することが発見されたが、52FSYは、2時間以内に90%の架橋に達した。これらの2つの構築物を、細胞傷害性ペイロードへのコンジュゲーションのためのそれらの非FSY(TYR)対応物とともに選択した。

【0470】

【表22】

表21. C17変異体に基づくコンジュゲート

名称
C33-54FSY
C33-52FSY
C33-52TYR
C33-54TYR

10

【0471】

sdAb構築物をGGG-PEG8-vc-PABC-MMAEにコンジュゲートするために、C32-54TYR、C32-54FSY、C32-52TYRおよびC32-52FSY化合物を上記のように精製した。化合物をPBS pH7.4でインキュベートし、1mM CaCl₂、10当量のリンカーペイロード(10%DMA中10mMストック溶液)、ソルターゼ(2mgソルターゼ/10mg sdAb)を添加し、4℃で一晩インキュベートした。反応物を、2mLのNi樹脂(PBS平衡化)にバッチ結合させて、ソルターゼおよび非コンジュゲート物質を除去し、室温で30分間攪拌した。ビーズをスピンして、未結合画分(700g×10分、20℃)からの樹脂の分離を容易にし、ガラスカラムにローディングし、ビーズをPBSで洗浄して残りのタンパク質を収集することによって、フロースルーを収集した。フロースルーと洗浄液を合わせて濃縮し(5K MWCO、4k rcf、10℃、1.5時間)、HiLoad 26/600 Superdex 75 pg(Cytiva, #28-9893-34)にロードして非コンジュゲート色素を除去した。画分を収集し、SDS-PAGEによって分析し、プールし、-80℃で保存した。

20

30

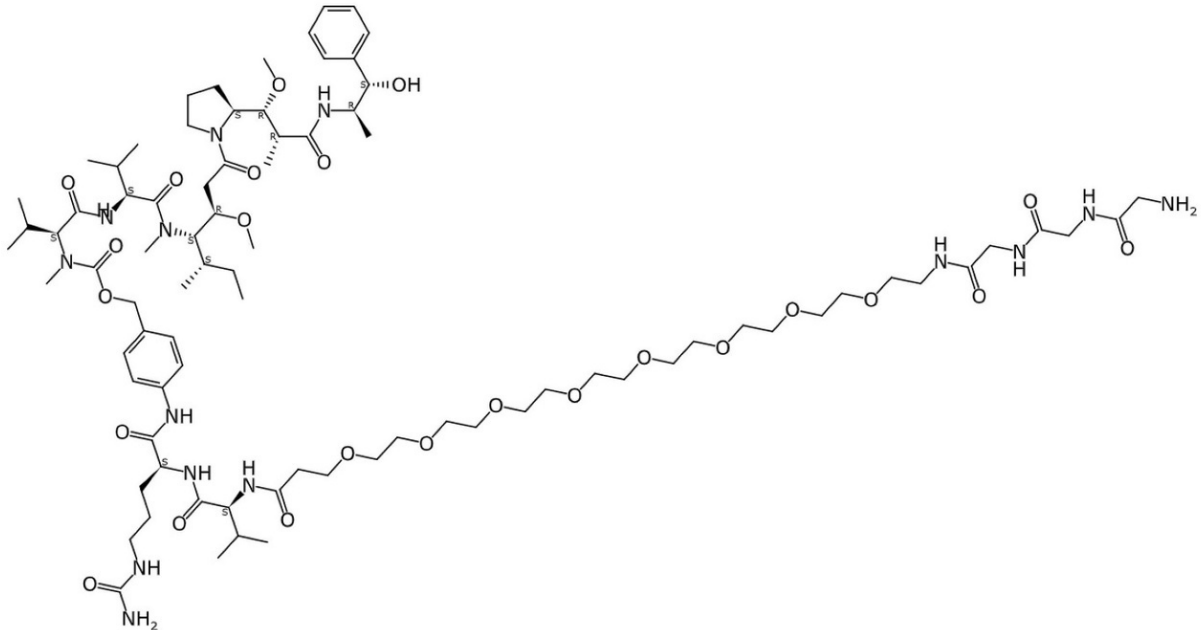
【0472】

40

50

【化 1 1 7】

GGG-PEG8-VC- PABC- MMAE:



10

20

【0 4 7 3】

52位および54位のTYRまたはFSY（表21）を含有するC33コンジュゲートを、ヒト乳癌株BT-474（HER2+）への結合について評価した。タンパク質はFACS緩衝液（1xPBS+2% HI-FBS+5mM EDTA）で3μM（最終1x）に希釈し、その後3倍に連続希釈してアッセイ用の8つの濃度ポイントを作り、最低濃度は0.00384μM（最終1x）とした。

【0 4 7 4】

BT-474細胞株（ATCC HTB-20）を、10%熱不活化ウシ胎仔血清（Thermo Fisher, FB-12）を補充したRPMI-1640（Thermo Scientific, 11875-903）からなる増殖培地中で、5%CO2を含む加湿環境において37℃で維持した。細胞は指数増殖期で回収し、氷冷したpH6.0のFACS緩衝液（PBS pH6.0/2% FBS/5mM EDTA）に1.0x10⁶/mLで再懸濁し、v底96ウェルプレート（Corning 3897）に100μL/ウェルで分注した。細胞を2000rpmで2分間ペレット化し、次いでpH6.0のFACS緩衝液中の試験物質の滴定液に100μL/ウェルで2回に分けて再懸濁した。氷上で2時間インキュベートした後、細胞を2000rpmで2分間ペレット化し、次いで200μLのFACS緩衝液で2回洗浄した。次に細胞を、AF488ヤギ抗アルパカVHH抗体（Jackson ImmunoResearch 128-547-232）の1:100希釈液を含む100μLの氷冷FACS緩衝液pH7.4に再懸濁した。氷上で30分間インキュベートした後、細胞を2000rpmで2分間ペレット化し、200μLのFACS緩衝液で2回洗浄した後、100μLのpH7.4のFACS緩衝液に再懸濁し、NovoCyteフローサイトメーター（ACEA/Aglilent）で分析した。

30

40

【0 4 7 5】

氷上で30分間インキュベートした後、細胞を2000rpmで2分間ペレット化し、200μLのFACS緩衝液で2回洗浄した後、100μLのpH7.4のFACS緩衝液に再懸濁し、NovoCyteフローサイトメーター（ACEA/Aglilent）で分析した。試料のAF488の幾何平均蛍光強度をさらなる分析およびプロットに使用し

50

た。A F 4 8 8 チャンネルの幾何平均蛍光強度（G e o M e a n または G e o M F I）を使用して、「l o g（アゴニスト）v s 反応－可変勾配（4つのパラメータ）」を使用して G r a p h P a d P r i s m（V 9．3．1）における E C 5 0 を計算した。被験物質は B T－4 7 4 細胞に用量依存的に結合した。表 2 2 に示すように、B T－4 7 4 細胞の染色およびフローサイトメトリー後の E C 5 0 値から、試験物質に対する結合親和性を測定した。

【 0 4 7 6 】

【表 2 3】

表 22. BT-474 細胞に対する結合親和性

被験物質（コンジュゲート）	EC50 (nM) pH 6.0
C33-54FSY	4.6
C33-54TYR	2.5
C33-52FSY	49
C33-52TYR	160

10

【 0 4 7 7 】

次いで、コンジュゲートを細胞ベースのアッセイにおいて使用して、非共有結合 s d A b コンジュゲートに対して、細胞傷害性ペイロードを i n v i t r o で不死化 H E R 2 発現腫瘍細胞株に特異的に送達する共有結合 s d A b コンジュゲートの能力を測定した。B T－4 7 4 細胞株を上記のように維持した。細胞を、T r y p L E E x p r e s s（T h e r m o S c i e n t i f i c，1 4 1 7 5－0 9 5）を使用して指数増殖期に回収し、黒色 9 6 ウェル平底プレート（C o s t a r，3 6 0 3）中の 1 0 0 μ L 増殖培地中に 5 0 0 0 細胞／ウェルで播種した。次いで、細胞を 5 % C O 2 の加湿環境において 3 7 °C で一晚インキュベートして、細胞をプレートに接着させた。翌日、1 つのプレートを C T G によって分析してバックグラウンドを決定した。残りのプレートを以下のように C 3 3－T Y R および C 3 3－F S Y コンジュゲートで処理した：表 2 3 に示したコンジュゲートを最終濃度 1 1 倍（1．1 μ M）まで成長培地で希釈し、さらに 5 倍ずつ希釈して 1 0 点希釈系列を作成した。1 0 μ L の容量の 1 1 × 被験物質希釈系列の各々を 3 連でウェルに添加して、1 × の最終濃度を達成した。1 組のプレートをインキュベーターに 5 時間戻し、その後、各ウェルを 1 0 0 μ L の増殖培地で 1 回穏やかにすすぎ、次いで増殖培地（1 0 0 μ L／ウェル）を交換し、5 % C O 2 を含む加湿環境において 3 7 °C で 6 日間細胞を培養することによって被験物質を洗浄した。別の組のプレートを、5 % C O 2 の加湿環境中、3 7 °C で全 6 日間被験物質と共にインキュベートした。6 日目に、細胞生存率を評価するために、すべての培養プレートの増殖培地を除去し、C e l l T i t e r－G l o（P r o m e g a，G 5 7 3 7）を等容量の P B S と混合し、1 0 0 μ L／ウェルですべてのプレートに添加し、次いでプレートを室温で 1 0 0 0 r p m で 1 分間振盪した。次いで、発光を V i c t o r X 5 プレートリーダー（P e r k i n E l m e r）で読み取り、相対発光単位（R L U）として報告した。生存率は、E x c e l（M i c r o s o f t（登録商標）E x c e l（登録商標）f o r M i c r o s o f t 3 6 5 M S O，V e r s i o n 2 2 0 2 B u i l d 1 6．0．1 4 9 3 1．2 0 1 2 8，6 4－b i t）を用いて、% 生存率 = 1 0 0 *（処置 R L U－バックグラウンド R L U／未処置 R L U－バックグラウンド R L U）として算出した。データは、G r a p h P a d P r i s m（V 9．3．1）で、生存率 % 対被験物質濃度としてプロットし、I C 5 0 は l o g [阻害剤] 対反応－可変勾配（4つのパラメータ）を用いて算出した。

20

30

40

【 0 4 7 8 】

結果を図 2 3 および表 2 3 に示す。図 2 3 A は、5 時間のウォッシュアウトを示し、図

50

23Bは、連続的な6日間の曝露を示す。全ての用量反応分析を3回繰り返して行い、記号は平均を表し、エラーバーはS T D E Vを表す。FSY変異体は、5時間のウォッシュアウト試験および6日間の連続曝露実験において、それらのTYR対応物と比較して増加した細胞傷害性を示し、共有結合形態の優れた細胞効力を示した。

【0479】

【表24】

表23. 5時間のウォッシュアウトおよび6日間の曝露についての細胞傷害性のIC50値

名称	IC50 (nM) – 5 時間	IC50 (nM) – 6 日間
C33-52TYR	>100	8.417
C33-52FSY	>100	1.599
C33-54TYR	21.56	0.3279
C33-54 FSY	1.00	0.106

10

【0480】

実施例24. バイパロットピック構築物の評価 – 結合

FSYを含むおよびFSYを含まない一連のモノパロットピックsdAbおよびバイパロットピックsdAbを表24に示すように調製し、PSMA標的を架橋するそれらの能力について比較した。タンパク質を、実施例19に記載される改変を伴って、概して実施例2の方法に従って発現させた。

【0481】

【表25】

表24 モノパロットピック構築物およびバイパロットピック構築物

化合物 ID	構築物
C34-TYR	C2-54TYR-C24-101TYR
C34-FSY	C2-54TYR-C24-101FSY
C35-TYR	C24-101TYR-C24-101TYR
C36-FSY	C24-101FSY-C24-101FSY
C2-54TYR	C2-54TYR
C24-101TYR	C24-101TYR
C24-101FSY	C24-101FSY

30

40

【0482】

被験物質のPSMA+LNCaPヒト前立腺腫瘍細胞への結合について、以下の修正を加えて、実施例14の方法に概ね従うフローサイトメトリーを用いて評価した。

【0483】

C34-TYR、C35-TYRおよびC2-54TYRを、FACS緩衝液を用いて3uM（最終1倍）に製剤化し、次いで5倍に連続希釈して、アッセイのための12の濃

50

度点を生成し、最低濃度は0.06 pM (1×最終)であった。別の実験では、C24-101TYRをFACS緩衝液で製剤化し、次いで5倍に連続希釈して、アッセイのための8つの濃度点を生成し、最低濃度は38.4 pM (1×最終)であった。アッセイにおけるLNCaP細胞は、160,000/ウェルであるC24-101TYRを除く全てについて120,000細胞/ウェルであった。氷上での2時間の被験物質とのインキュベーション後、細胞を、200 µL/ウェルFACS緩衝液/洗浄(500×g、3分)で2回洗浄し、次いで、暗所で、Alexa Fluor 488 AffiniPureヤギ抗アルパカIgGを含有する100 µLの氷冷FACS緩衝液とともにインキュベートした、VHHドメイン(Jackson ImmunoResearch, Code: 128-545-230) 5 µg/mlの二次抗体を氷上に30分間置く。次いで、細胞をFACS緩衝液で2回(200 µL/洗浄)洗浄し、NovoExpressソフトウェアバージョン1.5.0を使用して、Novocyte 2060(s/n45-1-1511-2036-9)フローサイトメーターで取得するために100 µLのFACS緩衝液に再懸濁し、Rawデータ(FCS 3.1ファイル)を分析して、Alexa Fluor-488(FITCチャンネル中)の幾何平均強度を決定した(FlowJo v.10.8.1, Windows)。試料のAlexa Fluor-488の幾何平均強度の平均およびSTDEVを、GraphPad Prism(v9.3.1)で被験物質の対数濃度に対してプロットした。EC50は、式「log(アゴニスト) vs 反応-可変勾配(4つのパラメーター)」を用いて計算した。データを可視化するために、結合曲線を各被験物質についてPrismで正規化し、各被験物質の最低値の平均を0%に設定し、各被験物質の平均最高値を100%に設定した。被験物質に対する結合親和性を、LNCaP細胞のフロー染色後のEC50値から測定し、表25に示す。バイパトリックタンパク質は、LNCaP細胞に用量依存的に結合した。親モノマー化合物と比較して親和性が増加することが観察されたので、データは、バイパトリック化合物の結合におけるアビディティ効果を示唆する。

【0484】

【表26】

表 25. LNCaP 細胞における結合親和性

	C34-TYR	C35-TYR	C2-54TYR	C24-101TYR
EC50	2.30 nM	12.26nM	6.75nM	> 500nM
EC50 範囲	2.16～2.46 nM	11.48～13.09 nM	5.06～9.19 nM	N/A
R 平方	0.99	0.99	0.99	0.99

【0485】

実施例 25. 標的細胞へのFSY修飾バイパトリック構築物の架橋

PSMAを発現する細胞への、C34-FSYおよびC36-FSYの架橋を一価C24-101FSYと比較した。増殖培地中のLNCaP細胞を、250,000細胞/ウェルの密度でポリ-L-リシンでコーティングした12ウェルプレートに播種した。播種の48時間後、培養培地を除去し、表26に示される濃度の試験化合物を含有する0.4 mLの培養培地を1時間または6時間添加した。細胞を0.5 mL/ウェルの氷冷1×PBSで2回すすぎ、1×プロテアーゼ阻害剤カクテルを含む0.15 mL/ウェルのRIPA緩衝液を添加した。氷上で10分間インキュベートした後、トリミングした200 µLピペットチップでプレートをこすることによって細胞溶解物を収集した。溶解物を1.

5 mL の E p p e n d o r f T u b e s に移し、12,000 rpm で10分間4℃で遠心分離した。遠心分離後、上清を新しい1.5 mL の E p p e n d o r f T u b e s に移し、0.2 mL / ウェルの0.25% EDTA-トリプシン (G i b c o、C a t . N o . 25200-056) を添加した。

【0486】

変性試料を電気泳動により分析した後、一次抗体抗ヒトPSMA (I n v i t r o g e n、C a t . N o . 37-3900) または内部標準抗GAPDH (C e l l S i g n a l i n g T e c h n o l o g y、C a t . N o . C S T - 2118) を用いたウェスタンブロットにより分析した。Azure Biosystem C600によって画像を取得した。GIMP 2.10.28を使用して画像を処理した。ウェスタンブロットにおけるバンドの密度を、指示に従ってImageJ 1.51j8を用いて決定した (<https://imagej.nih.gov/ij/docs/guide/146-30.html#info:box:Densitometry,Section30.13>)。全PSMAに対する架橋PSMAの割合を以下の式：架橋PSMAの密度 / (架橋PSMAの密度 + 非架橋PSMAの密度) × 100% で計算した。各被験物質 (構築物) の密度対濃度のプロットを図24Aおよび24Bに示す。

【0487】

ウェスタンブロットの結果を図25Aおよび25Bに示す。試験した3つの構築物はすべて、PSMAに架橋することができた。バイパラトピック構築物C34-FSYは、モノマーよりも高い見かけの分子量で移動し、複合体の質量の増加を反映する架橋バンドを示したが、C36-FSY構築物は、2つのPSMA分子の架橋を表す、さらに高い見かけの分子量を有する架橋バンドを示した。全てのFSY化合物のバンドの強度は、時間および濃度依存的に増加し、特異的架橋を示した。架橋の定量化は、両バイパラトピック構築物がモノパラトピック構築物よりもPSMAに対してより効率的かつより強力な架橋を示したことを表した。(表26ならびに図25Aおよび25B)。

【0488】

【表27】

表26. LNCaP細胞における架橋速度論

	処置					
	C24-101FSY		C34-FSY		C36-FSY	
	1時間	6時間	1時間	6時間	1時間	6時間
濃度 (nM)	架橋 PSMA (合計 PSMA%)					
0	0	0	0	0	0	0
0.1	0	0	0	3.2	3.8	2.8
1.0	0	2.4	14.8	21.5	13.8	23.7
10.0	4.6	28.45	56.9	78.7	58.7	74.2
100.0	28.5	71.0	63.3	87.1	82.7	87.9
1000.0	41.4	75.85	70.4	89.9	90.3	92

【0489】

実施例26. 細胞傷害性ペイロードを有するバイパラトピックコンジュゲート

バイパラトピックsdAb化合物にコンジュゲートした細胞傷害性ペイロードを含有する被験物質を、以下の改変を伴って、実施例24および25に概して記載される方法に従

って作製する。PEG8-VC-PABC-MMAEリンカーペイロードのバイパルトピック化合物へのシステイン-マレイミドコンジュゲーションを可能にするため、化合物C34-FSYまたはC34-TYRをコードするプラスミド配列は、C末端またはその付近にcys残基を含有するように修飾され、化合物は、101位にFSYまたはTYRを組み込むように発現され、コンジュゲートおよび精製される。

【0490】

PEG8-VC-PABC-MMAEリンカーペイロードのバイパルトピック化合物へのソルタッグ媒介コンジュゲーションを可能にするため、化合物C34-FSYまたはC34-TYRをコードする配列は、C末端ソルターゼ認識およびHisタグ配列を含有するように修飾され、化合物は、101位にFSYまたはTYRを組み込むように発現され、コンジュゲートおよび精製される。

10

【0491】

PSMAおよびPC3flu PSMA陰性細胞株を発現するように操作されたPC3pip細胞株を維持し、播種し、実施例22に記載される試験のために調製する。バイパルトピックスdAb-MMAEコンジュゲートを増殖培地中で最終濃度50倍に希釈し、3倍増分で希釈して10点希釈系列を作製する。被験物質希釈系列の各々を3回に分けてウェルに添加して、各系列について1×（最高濃度）の最終濃度を達成する。

【0492】

1組のプレートをインキュベーターに5時間戻し、その後、各ウェルを100μLの増殖培地で1回穏やかにすすぎ、次いで増殖培地（100μL／ウェル）を交換し、5%CO₂を含む加湿環境において37℃で6日間細胞を培養することによって被験物質を洗い流す。別の組のプレートを、5%CO₂の加湿環境中、37℃で全6日間、被験物質と共にインキュベートする。6日目に、細胞生存率を評価するために、全ての培養プレートの増殖培地を除去し、CellTiter-Glo（Promega, G5737）を等容量のPBSと混合し、100μL／ウェルで全てのプレートに添加し、次いでプレートを室温で1000rpmで1分間振盪する。次いで、発光をVictor X5プレートリーダー（PerkinElmer）または同様のものを読み取り、相対発光単位（RLU）として報告する。生存率をExcelまたは類似のプログラムで%生存率=100*（処理RLU-バックグラウンドRLU／未処理RLU-バックグラウンドRLU）として計算する。データは、GraphPad Prism（V9.3.1）または同様のプログラムにおいて被験物質の濃度に対する生存率（%）としてプロットされ、IC50は、log〔阻害剤〕対反応-可変勾配（4つのパラメーター）を使用して計算される。

20

30

【0493】

実施例27. PSMA+腫瘍の処置のためのマウス異種移植モデル

マウス異種移植腫瘍モデルにおける腫瘍増殖の制御におけるチロシンならびにFSY含有モノパルトピックおよびバイパルトピックコンジュゲートの効果を評価するために、細胞株LNCaP（PSMA+）およびPC3（PSMA-）を用いる。実施例20および21に記載されるように、細胞株を維持し、増殖させ、Balb／Cヌードマウスに移植する。腫瘍サイズが約200mm³に達したとき、バイパルトピックC34-TYRまたはC34-FSYコンジュゲート（実施例25）、モノパルトピックC26-54TYRまたはC26-54FSYコンジュゲート（実施例22）またはビヒクルを、7日間毎日5mg／kgなどの異なる用量およびスケジュールで尾静脈を通して注射する。腫瘍サイズは、腫瘍成長を経時的に追跡するために、ノギス測定を介して毎日測定される。1000mm³に達する腫瘍を有する動物を殺し、生存時間を記録する。

40

【0494】

実施例28. -EGFR標的化バイパルトピック構築物

FSYを有するEGFR標的化sdAb（C4-109FSY、配列番号17）およびリンカーによって連結された2つのEGFR標的化sdAb（C4-109TYRまたはFSY）-L1-C5、以下、C37-TYRまたはC37-FSYと称される、配列番号69）を有するバイパルトピック構築物を構築し、クローニングし、実施例2に記載さ

50

れるように発現させた。成熟タンパク質から切断された p e l B リーダー配列（配列番号 15）を用いて構築物を合成し、6つのC末端ヒスチジンを H i s - T a g 精製に使用した。バイパルトピック構築物 C 3 7 は、第 1 の s d A b C 4 と第 2 の s d A b C 5 との間に G G G G S G G G G S（配列番号 14）リンカーを含有する。

【0495】

F S Y 修飾 s d A b を E G F R 架橋の反応速度論について評価した。タンパク質を 8 : 1 のモル比で E G F R と共にインキュベートした（E G F R 最終濃度は 0 . 1 2 5 m g / m L、1 . 2 5 μ M であった）。0 ~ 1 8 0 分の時点で試料を採取し、E G F R 架橋の割合を S D S - P A G E によって評価した。架橋バンドパーセンテージは、s d A b - E G F R 架橋バンドを定量することによって計算し、E G F R バンド強度は、I m a g e J を使用して定量した。

10

【0496】

時間ゼロから 3 6 0 分まで試料を採取した。カップリングの反応速度論を図 2 6 - 2 7 に示す。バイパルトピック構築物を、F S Y 修飾を有する s d A b C 4（C 4 - 1 0 9 F S Y）のみを含むモノパルトピック構築物と比較した。バイパルトピック構築物 C 3 7 - F S Y は、モノパルトピック構築物と比較して、半最大架橋までの時間の短縮によって測定されるように、モノパルトピック C 4 - 1 0 9 F S Y 配列よりも迅速に E G F R に結合した。

【0497】

実施例 29：ヘテロ多重特異性結合コンジュゲートの構築

20

【0498】

複数の異なる抗原を標的とするヘテロ二重特異性 F S Y 含有化合物は、リンカーによって、同じ細胞上で発現される異なる腫瘍細胞抗原に標的化された s d A b（「標的 s d A b 2」）に連結された、腫瘍細胞抗原などの標的に対する s d A b（「標的 s d A b 1」）を有するように構築される。各場合では、標的 s d A b 1、標的 s d A b 2、またはその両方は、F S Y を含有し得る。次いで、二重特異性構築物を p B A D ベクターにクローニングし、実施例 2 に記載のように発現させる。

【0499】

E G F R および H e r 3 の細胞外ドメインを標的とするヘテロ二重特異性 F S Y 含有化合物は、実施例 2 からの C 4 - 1 0 9 F S Y（またはその変異体）を、H e r 3 を標的化する s d A b（F S Y を含まない）と連結することによって作製される。C 4（F S Y を含まない）に連結された H e r 3（F S Y を含む）を標的化する s d A b を含む代替構築物を生成する。構築物は、2つの s d A b アミノ酸配列間に配列 G G G G S または類似の反復を含有するリンカーを添加することによって設計される。次いで、二重特異性構築物を p B A D ベクターにクローニングし、実施例 2 に記載のように発現させる。二重特異性構築物について予想されるアミノ酸配列の例を以下に示す。

30

M K Y L L P T A A A G L L L L A A Q P A M A M G Q V Q L V Q S G G G L V Q A G G
S L R L S C A F S G R T F S M Y T M G W F R Q A P G K E R E F V A A N R G R G L
S P D I A D S V N G R F T I S R D N A K N T L Y L Q M D S L K P E D T A V Y Y C
A A D L Q Y G S S W P Q R S S A E Y D Y W G Q G T T V T V S S G G G G S G G G G
S G G G G S Q V K L E E S G G G S V Q T G G S L R L T C A A S G R T S R S Y G M
G W F R Q A P G K E R E F V S G I S W R G D S T G Y A D S V K G R F T I S R D N
A K N T V D L Q M N S L K P E D T A I Y Y C A A A A G S A W Y G T L X E Y D Y W
G Q G T Q V T V S S H H H H H H

40

X は F S Y 取り込み部位の位置を示し、太字の N 末端残基は、成熟タンパク質から切断される p e l B リーダー配列である。C 末端 6 ヒスチジンは、親和性精製に使用される H i s - T a g を含む。生成のための他の二重特異性構築物は、H e r 3 - E G F R、E G F R - H e r 2、H e r 2 - H e r 3、H e r 3 - H e r 3（同じまたは異なるエピトープ）、E G F R - c M E T、および E G F R - C E A を含み得る。

【0500】

50

二重特異性 F S Y 修飾 s d A b を使用するコンジュゲートは、リンカー／ペイロードの化学的カップリングのためのユニークなコンジュゲーション部位を操作することによって調製される。上記の二重特異性 F S Y 修飾構築物は、構築物の C 末端に遊離の C y s 残基を含むように修飾されているか、あるいは、修飾されてもそれぞれの標的への結合を妨害しない構築物内の代替許容部位に遊離の C y s 残基を含むように修飾されている。代替方法は、リンカー／ペイロードのソルターゼ媒介性またはトランスグルタミナーゼ媒介性ライゲーション、リジン残基への N H S－エステルコンジュゲーション、または当該分野で共通の他の方法を含み得る。リンカーペイロードへのコンジュゲートは、標的化ドメイン（s d A b または他の結合タンパク質）、リンカー、およびペイロードを接続するために生成され、これは、毒性ペイロード、キレート化放射性金属、ペプチドもしくはタンパク質毒素または他の機能的細胞傷害性化合物を含み得る。

10

【0501】

二重特異性 F S Y 修飾 s d A b またはそのコンジュゲートを、それぞれ E G F R および H e r 3 との i n v i t r o で生化学的架橋について評価する。タンパク質を、5：1 または 8：1 などの過剰の化学量論比で E G F R または H e r 3 受容体ドメインと共にインキュベートする。試料をインキュベートし、s d A b－F S Y 化合物に架橋される E G F R または H e r 3 のパーセンテージを、S D S－P A G E を使用してゲルシフトによって評価し、デンストメトリーによって定量する。

【0502】

二重特異性 F S Y 修飾 s d A b またはそのコンジュゲートを、E L I S A を用いて E G F R および H e r 3 への同時結合について評価する。H e r 3 または E G F R の細胞外ドメインをマイクロタイタープレートの表面に吸着させ、広範囲に洗浄する。プレートを非特異的相互作用についてブロックし、二重特異性 F S Y 修飾 s d A b を添加し、インキュベートして結合を可能にする。次いで、ウェルを洗浄して非結合物質を除去し、次いで、第 2 の受容体サブユニットを添加し、インキュベートして結合させる。プレートを再度洗浄して非結合化合物を除去し、抗受容体抗体を用いて第 2 の受容体を検出する。あるいは、第 2 の受容体サブユニットは、受容体ドメインと H R P または蛍光色素などの検出系との間の融合物またはコンジュゲートとして添加され、標準的な比色または蛍光検出によって検出される。特異性の対照として、第 1 の受容体、二重特異性化合物、または第 2 の受容体の添加は、手順から省略される。抗受容体抗体の結合は、抗種 H R P 二次抗体、スト

20

30

【0503】

二重特異性 F S Y 修飾 s d A b またはそのコンジュゲートを、表面プラズモン共鳴（S P R）を使用して E G F R および H e r 3 への同時結合について評価する。H e r 3 または E G F R 受容体の細胞外ドメインは、N H S－エステル化学または他の標準的な方法によって S P R チップの表面に固定化される。次いで、二重特異性 F S Y 修飾 s d A b 化合物を受容体 1 表面と会合させた後、洗浄して未結合物質を除去する。三元複合体を組み立て、検出するため、次いで、第 2 の受容体サブユニットを注入し、シグナルを測定する。特異性の対照として、第 1 の受容体、二重特異性化合物、または第 2 の受容体の添加は、

40

【0504】

二重特異性 F S Y 修飾 s d A b またはそのコンジュゲートを、E G F R および H e r 3 陽性細胞への特異的結合について評価する。一連の異なる濃度の被験物質を細胞に投与し、フローサイトメトリーによって、または細胞ベースの E L I S A もしくは類似の方法によって、被験物質の用量－依存的結合を検出することができる。観察された結合シグナルに対する各受容体特異性の寄与を決定するために、競合抗体（冷たい競合物質（c o l d c o m p e t i t o r s））を大きな化学量論的過剰量で添加して、E G F R、H e r 3、または両方の受容体の被験物質の関与をアンタゴナイズする。インキュベーションおよび洗浄後、非結合のアンタゴニスト抗体を除去するために、濃度系列の二重特異性試験物

50

質を細胞に添加し、結合させる。インキュベーションおよび洗浄後、結合していない試験化合物を除去するために、被験物質は、抗エピトープタグまたは抗 s d A b 抗体などの化合物に特異的な抗体または他の方法によって検出される。抗試験試料抗体の結合は、フローサイトメトリーを介して、または抗種 H R P 二次抗体を介した E L I S A、ストレプトアビジン H R P で検出されるビオチン化抗受容体抗体、蛍光色素コンジュゲート二次抗体、または E L I S A 検出に標準的な他の類似の方法によって検出され得る。

【0505】

二重特異性 F S Y 修飾 s d A b またはそのコンジュゲートを、標的抗原を発現する腫瘍細胞への *in vitro* での特異的毒性ペイロードの *in vitro* での送達について評価する。操作された C 末端 C y s 残基を含む構築物は、上記の一般的な方法を使用して、M M A E または他のクラスの高度に細胞傷害性 (*highly-cytotoxic*) の化合物などの細胞傷害性のペイロードに結合される。用量反応曲線を作成し、試料を S K B R 3 および C o l o 3 2 0 D M 細胞と共に *in vitro* でインキュベートする。特異性の対照として、第 1 の受容体、第 2 の受容体、またはその両方に対する交差反応性抗体を特定の試料に加える。様々な期間のインキュベート後、細胞を洗浄して遊離化合物を除去し、P r o m e g a C y t o x G r e e n などのアッセイ、あるいはレポーター化合物の検出、P r e s t o B l u e、C C K - 8、または同様の試薬による生存細胞の検出、および／または A n n e x i n V - F I T C、ヨウ化プロピジウム染色、または同様の試薬によるアポトーシスの測定を通じて細胞生存率を測定する他のアッセイを用いて、細胞生存率を測定する。

【0506】

二重特異性 F S Y 修飾 s d A b またはそのコンジュゲートを、腫瘍組織へのペイロードの *in vivo* 送達について評価する。構築物と非共有結合 s d A b コンジュゲートとの腫瘍曝露を比較するために、フルオロフォア標識をプロキシペイロードとして使用して、経時的な追跡／生体分布測定を可能にする。T y r または F S Y のいずれかに置換された単一の残基を有する s d A b 構築物は、マレイミド化学または上記の他の方法による操作されたシステイン残基を介して、化学的フルオロフォア (A l e x a 6 8 0 または同様のもの) にコンジュゲートされ、上記のように精製される。フルオロフォア標識 s d A D C コンジュゲート分子を、腫瘍抗原+または一異種移植腫瘍を有する雄ヌードマウスに尾静脈 I V 注射によって投与し、被験物質の生体内分布を、A m i X、I V I S スペクトルイメージャーまたは同様のものを使用する全動物イメージングによって経時的に観察する。腫瘍特異的および末梢曝露を画像濃度測定によって定量し、s d A b の F S Y および T y r バージョン間で比較する。イメージングに加えて、腫瘍試料を収集し、ゲルベースの検出方法、例えば、ウェスタンブロットまたは蛍光画像化のために処理して、投与後の経時的な腫瘍組織中の架橋 s d A b - 受容体複合体および遊離 s d A b を検出する。

【0507】

本開示の好ましい実施形態が本明細書に示され、説明されてきたが、そのような実施形態は例としてのみ提供されることが当業者には明らかであろう。当業者であれば、本開示から逸脱することなく、多数の変形形態、変更形態、および置換形態を思いつくであろう。本明細書に記載される本開示の実施形態に対する様々な代替形態が、本開示を実施する際に採用され得ることを理解されたい。以下の特許請求の範囲が本開示の範囲を定義し、これらの特許請求の範囲内の方法および構造ならびにそれらの同等物がそれによって包含されることが意図される。

10

20

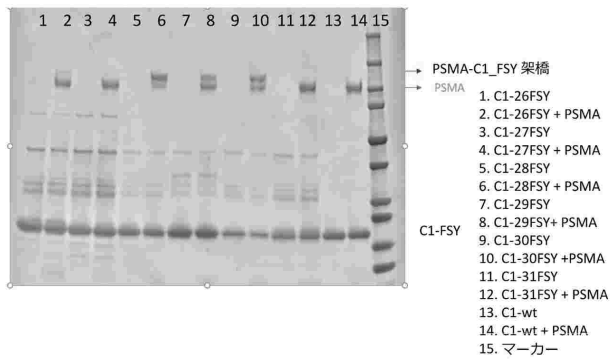
30

40

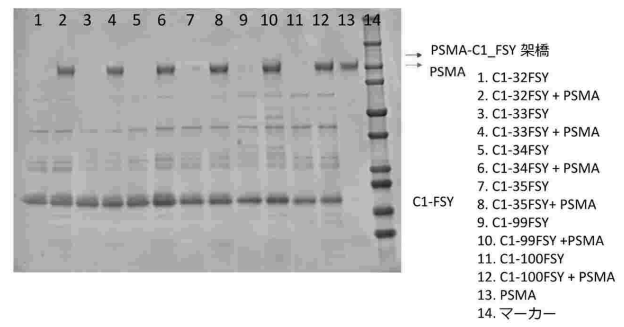
50

【図面】

【図 1 A】

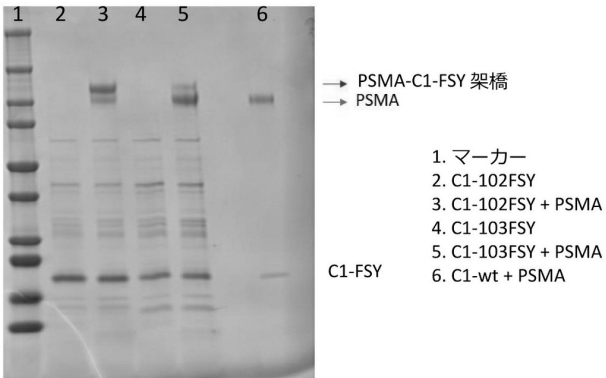


【図 1 B】

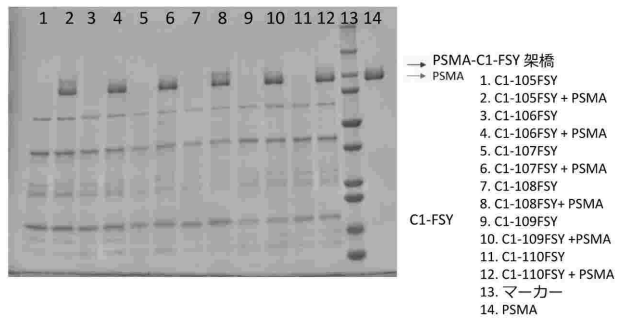


10

【図 1 C】

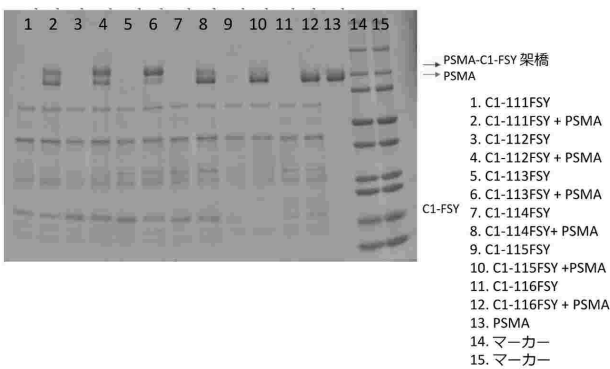


【図 1 D】

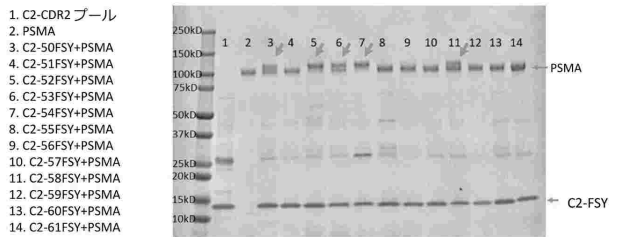


20

【図 1 E】



【図 2 A】

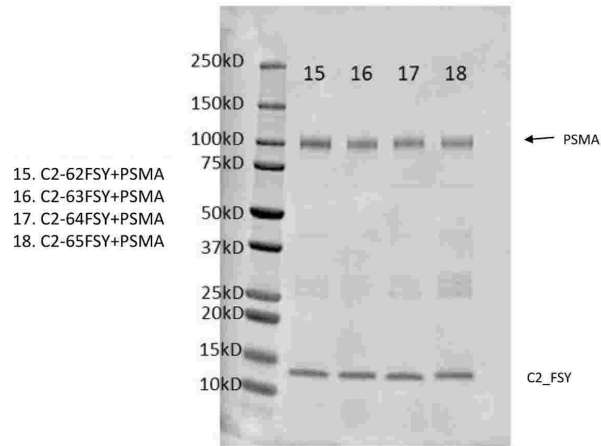


30

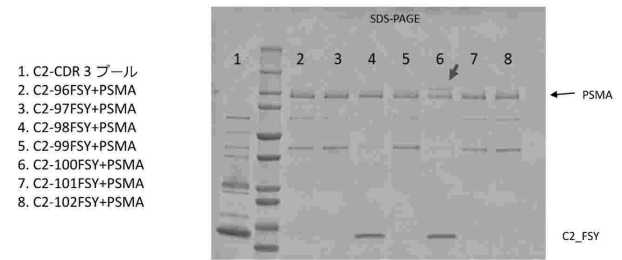
40

50

【図 2 B】

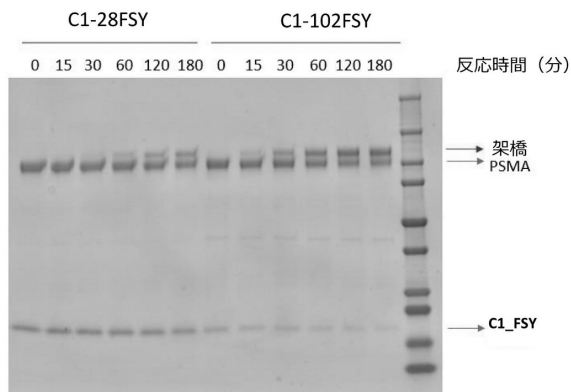


【図 2 C】

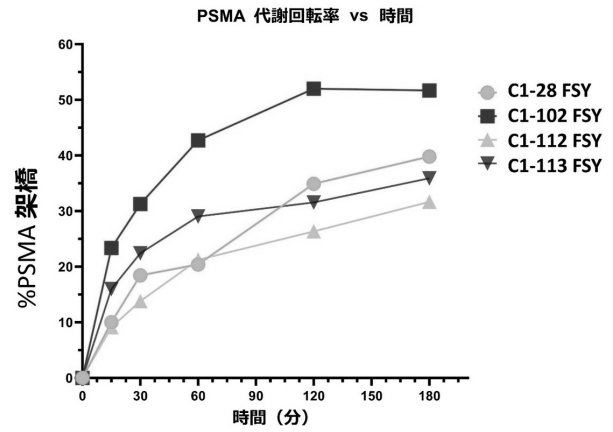


10

【図 3 A】



【図 3 B】



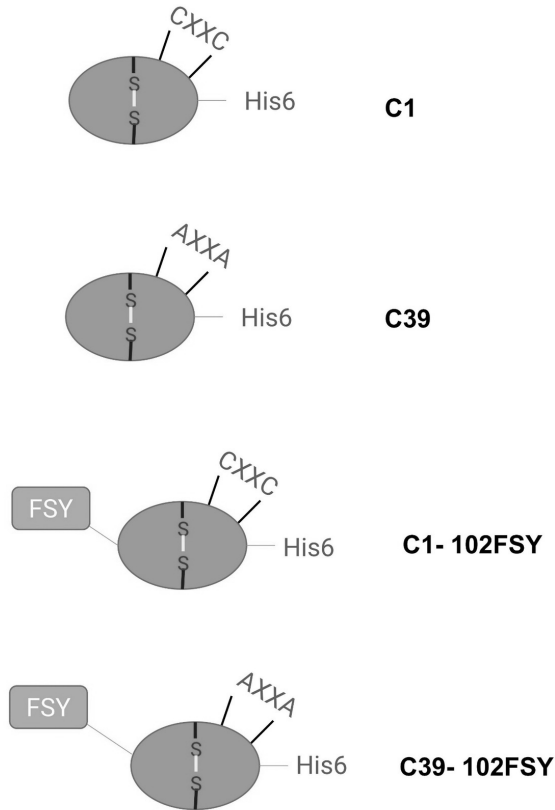
20

30

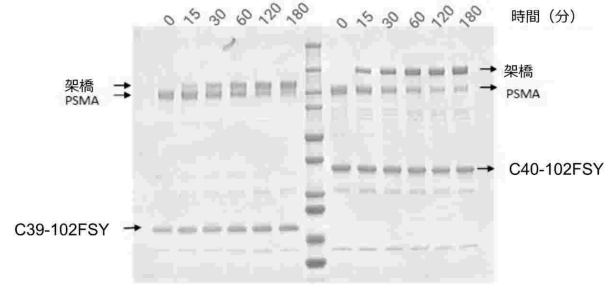
40

50

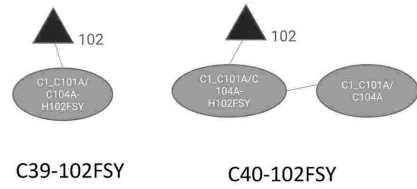
【図 4】



【図 5 A】

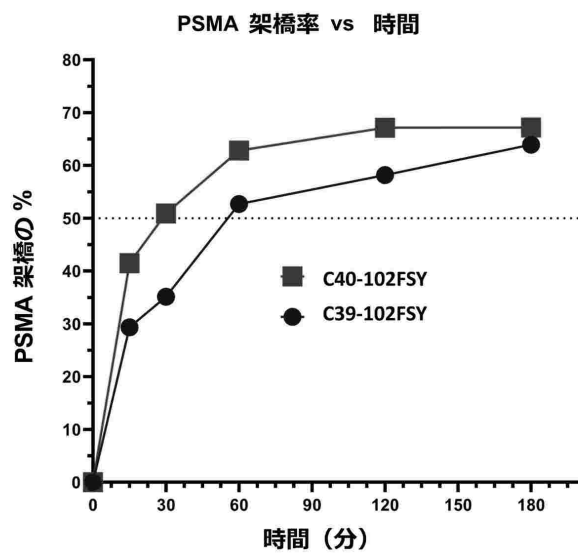


10

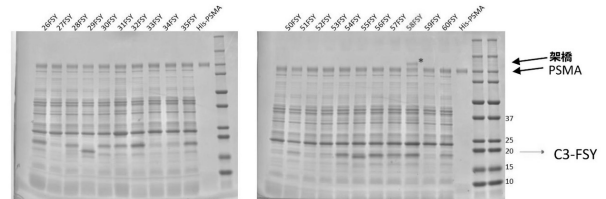


20

【図 5 B】



【図 6 A】

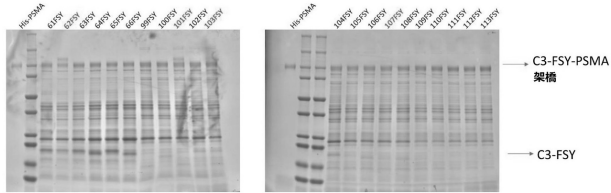


30

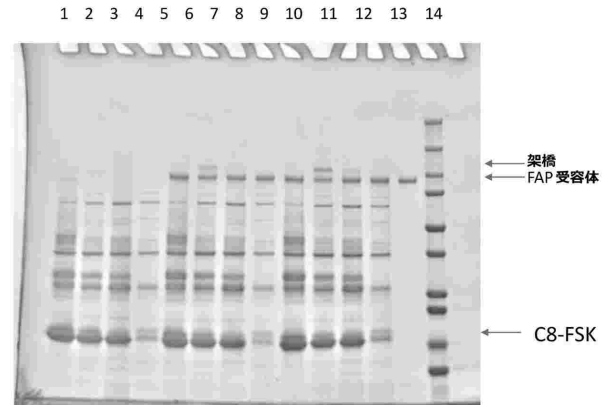
40

50

【図 6 B】

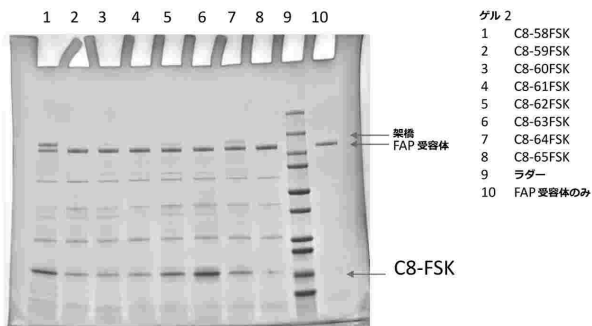


【図 7 A】



- 1: ブール1 5: ブール1+ (1 時間) 9: ブール1+ (2 時間)
 2: ブール2 6: ブール2+ (1 時間) 10: ブール2+ (2 時間)
 3: ブール3 7: ブール3+ (1 時間) 11: ブール3+ (2 時間)
 4: ブール4 8: ブール4+ (1 時間) 12: ブール4+ (2 時間)
 12: FAP 受容体のみ
 14: ラダー

【図 7 B】



【図】

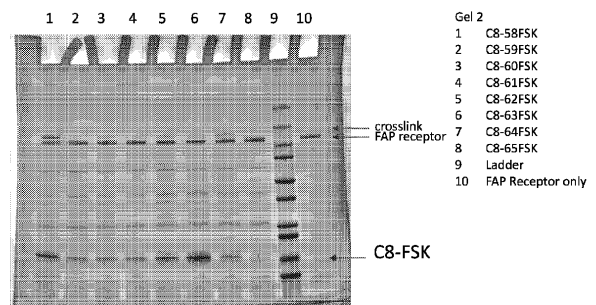
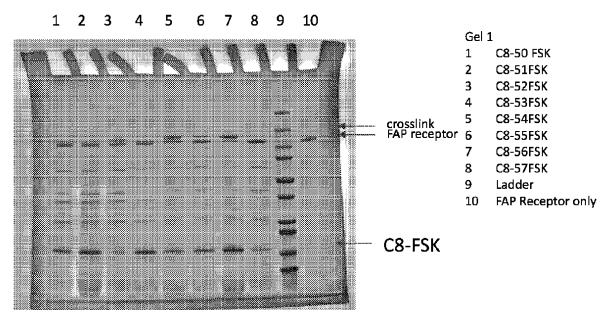


FIG. 7B

10

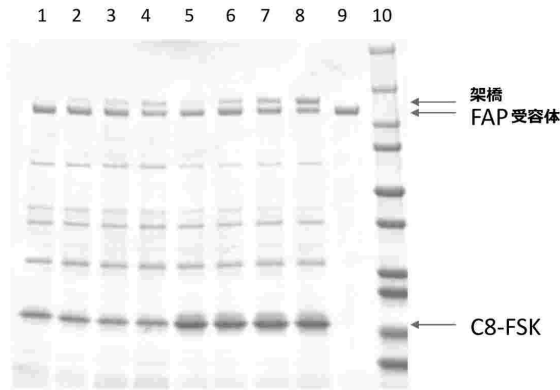
20

30

40

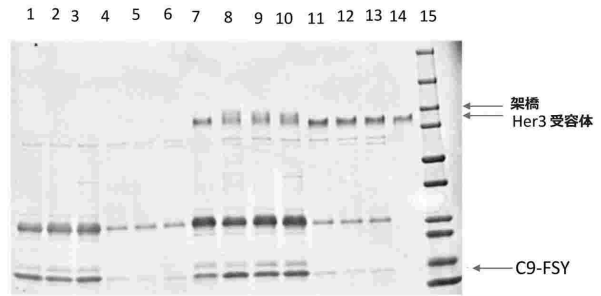
50

【図 7 C】



- 1 C8-54FSK 15 分
- 2 C8-54FSK 30 分
- 3 C8-54FSK 60 分
- 4 C8-54FSK 120 分
- 5 C8-56FSK 15 分
- 6 C8-56FSK 30 分
- 7 C8-56FSK 60 分
- 8 C8-56FSK 120 分
- 9 ラダー
- 10 FAP 受容体のみ

【図 8 A】

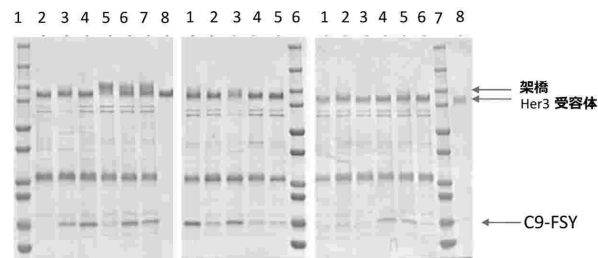


- 1 C9-FSY プール 2
- 2 C9-FSY プール 3
- 3 C9-FSY プール 4
- 4 C9-FSY プール 5
- 5 C9-FSY プール 6
- 6 C9-FSY プール 7
- 7 C9-FSY プール 1 + Her3
- 8 C9-FSY プール 2 + Her3
- 9 C9-FSY プール 3 + Her3
- 10 C9-FSY プール 4 + Her3
- 11 C9-FSY プール 5 + Her3
- 12 C9-FSY プール 6 + Her3
- 13 C9-FSY プール 7 + Her3
- 14 Her3 受容体のみ
- 15 ラダー

10

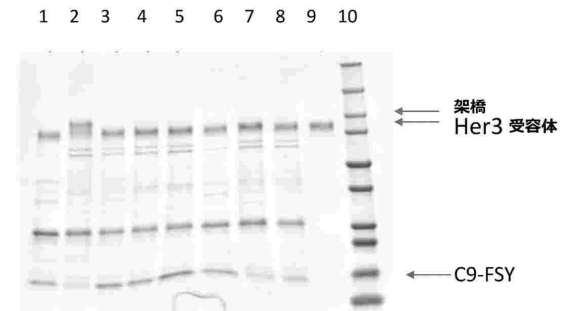
20

【図 8 B】



- | | | |
|-------------------|-------------------|-------------------|
| パネル 1 | パネル 2 | パネル 3 |
| 1 ラダー | 1 C9-58FSY + Her3 | 1 C9-63FSY + Her3 |
| 2 C9-52FSY + Her3 | 2 C9-59FSY + Her3 | 2 C9-64FSY + Her3 |
| 3 C9-53FSY + Her3 | 3 C9-60FSY + Her3 | 3 C9-65FSY + Her3 |
| 4 C9-54FSY + Her3 | 4 C9-61FSY + Her3 | 4 C9-66FSY + Her3 |
| 5 C9-55FSY + Her3 | 5 C9-62FSY + Her3 | 5 C9-67FSY + Her3 |
| 6 C9-56FSY + Her3 | 6 ラダー | 6 C9-68FSY + Her3 |
| 7 C9-57FSY + Her3 | | 7 ラダー |
| 8 Her3 のみ | | 8 Her3 のみ |

【図 8 C】



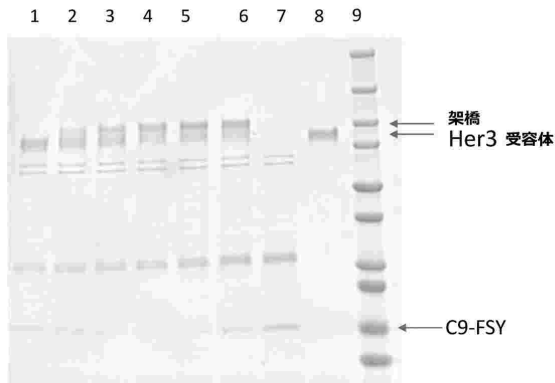
- 1 C9-53FSY + Her3
- 2 C9-55FSY + Her3
- 3 C9-56FSY + Her3
- 4 C9-57FSY + Her3
- 5 C9-58FSY + Her3
- 6 C9-60FSY + Her3
- 7 C9-64FSY + Her3
- 8 C9-67FSY + Her3
- 9 Her3 のみ
- 10 ラダー

30

40

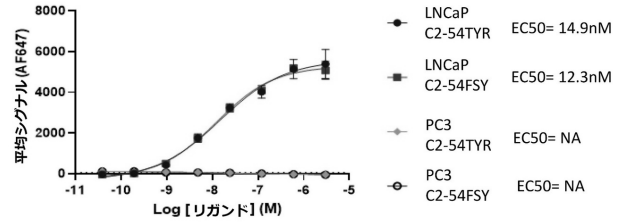
50

【図 8 D】



- 1 C9-55FSY + Her3 0 分
- 2 C9-55FSY + Her3 15 分
- 3 C9-55FSY + Her3 30 分
- 4 C9-55FSY + Her3 60 分
- 5 C9-55FSY + Her3 120 分
- 6 C9-55FSY + Her3 180 分
- 7 C9-55FSY のみ
- 8 Her3 受容体のみ
- 9 ラダー

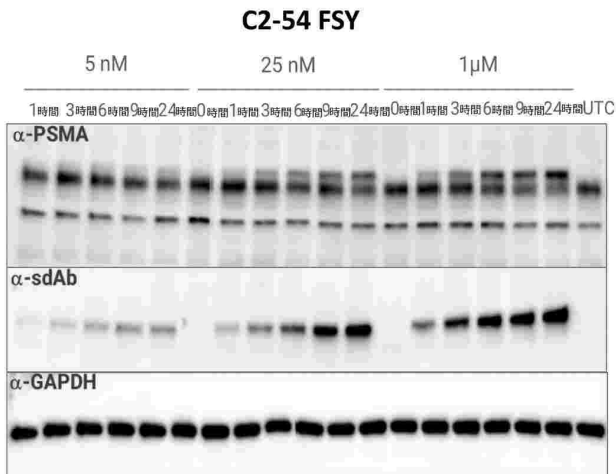
【図 9】



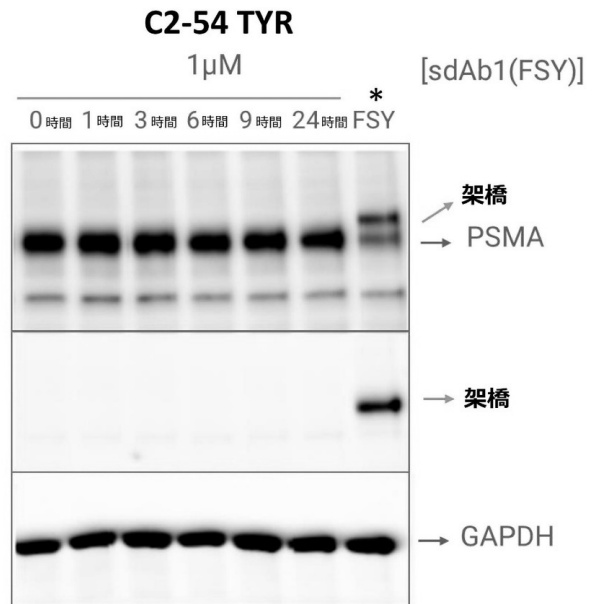
10

20

【図 10 A】



【図 10 B】



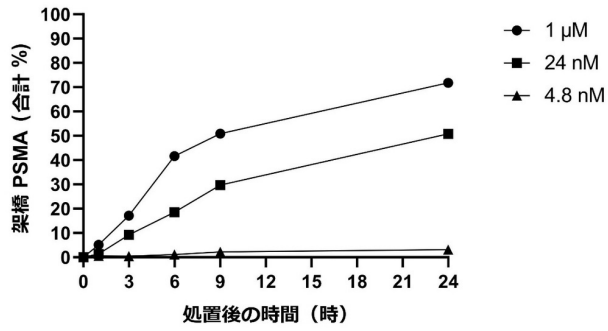
* LNCaP細胞を1uM C2 54 FSYで9時間処置した。

30

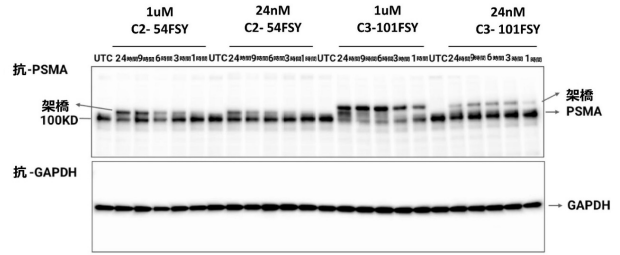
40

50

【図 1 0 C】

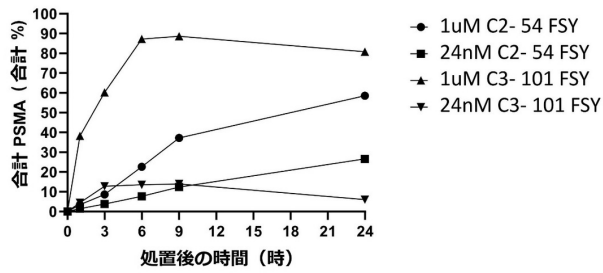


【図 1 1 A】

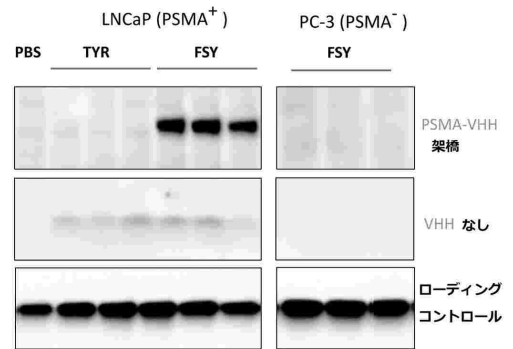
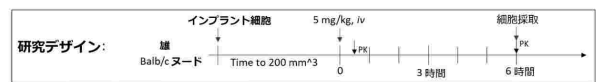


10

【図 1 1 B】



【図 1 2 A】



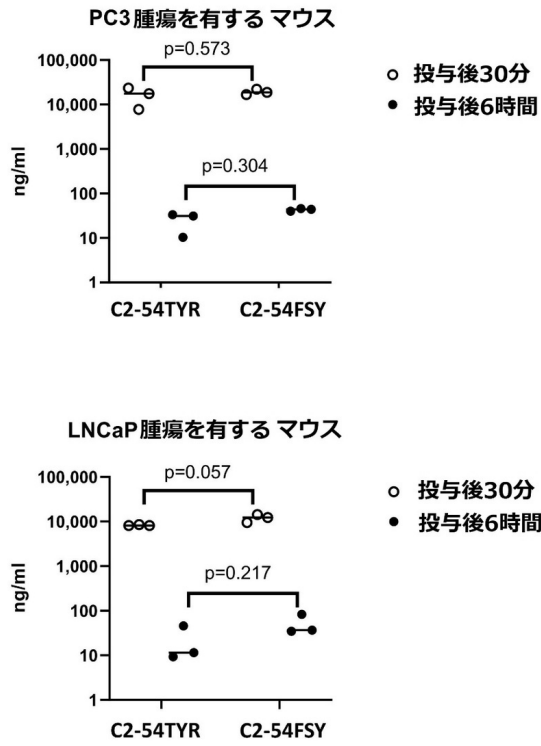
20

30

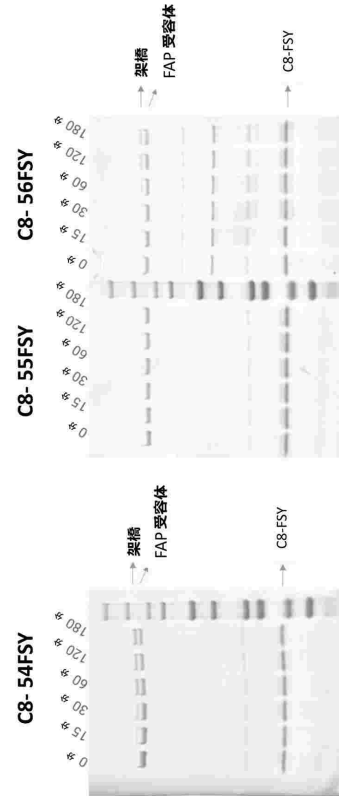
40

50

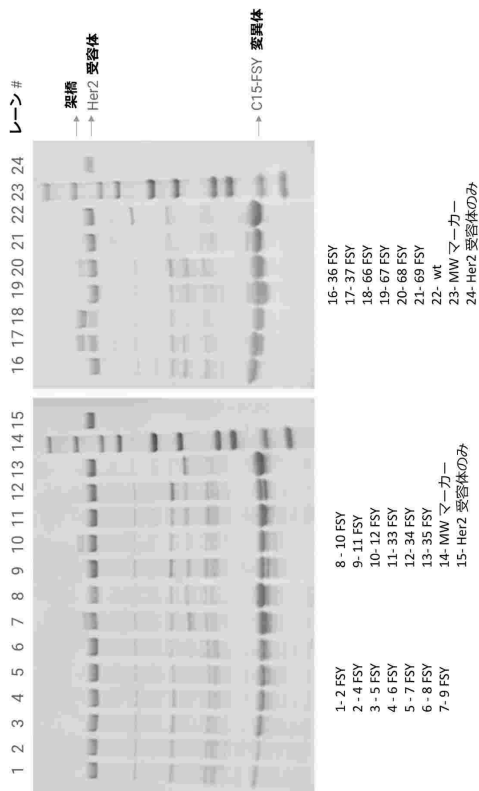
【図 1 2 B】



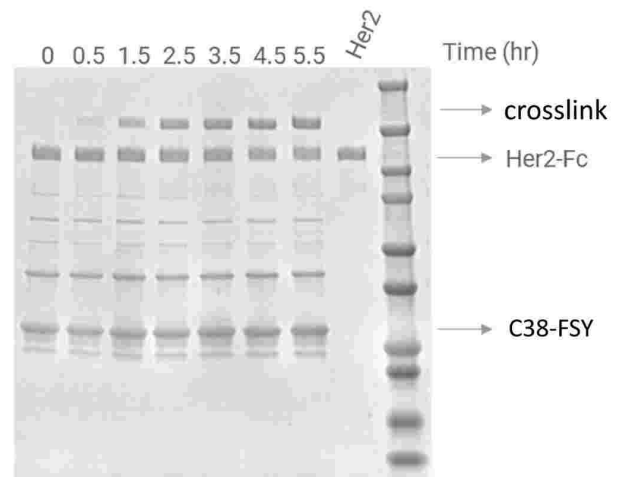
【図 1 3】



【図 1 4】



【図 1 5】



10

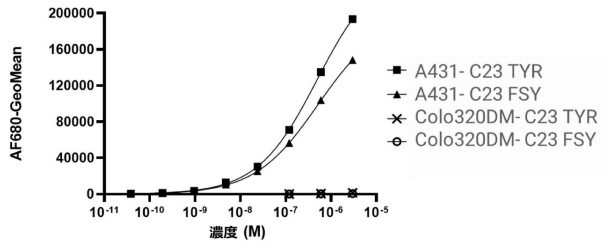
20

30

40

50

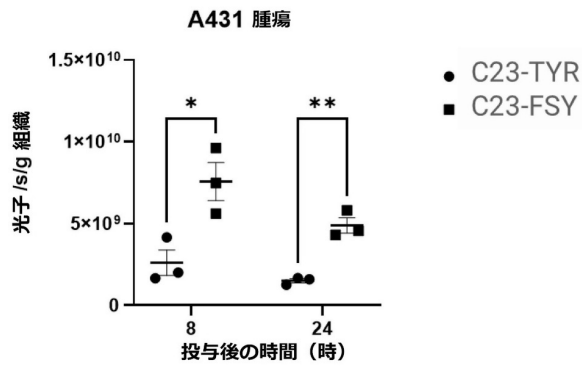
【図 1 6】



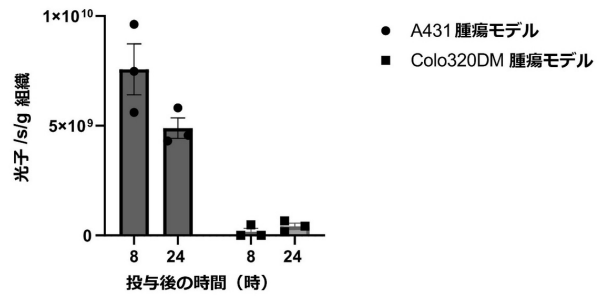
【図 1 7】



【図 1 8 A】



【図 1 8 B】



10

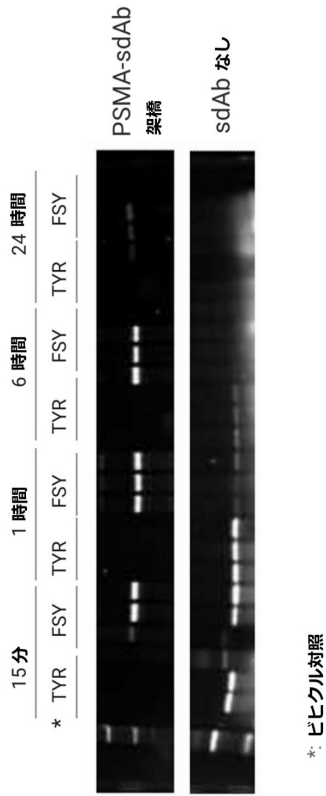
20

30

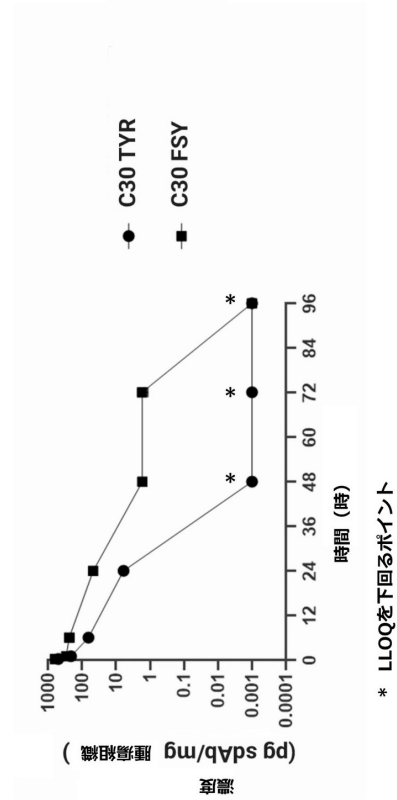
40

50

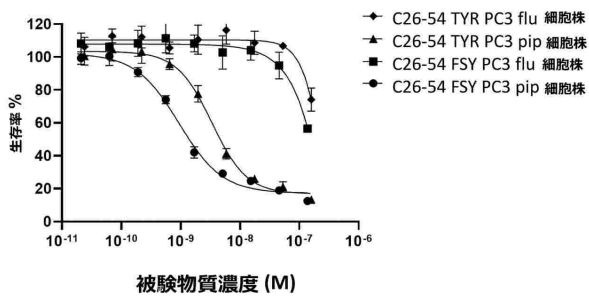
【図 1 9】



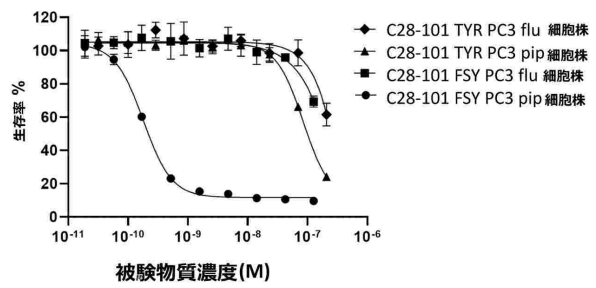
【図 2 0】



【図 2 1 A】



【図 2 1 B】



10

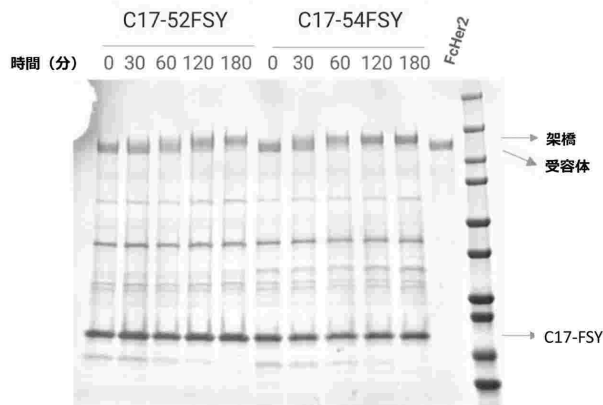
20

30

40

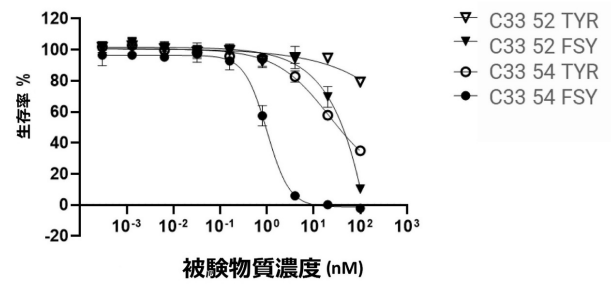
50

【図 2 2】



【図 2 3 A】

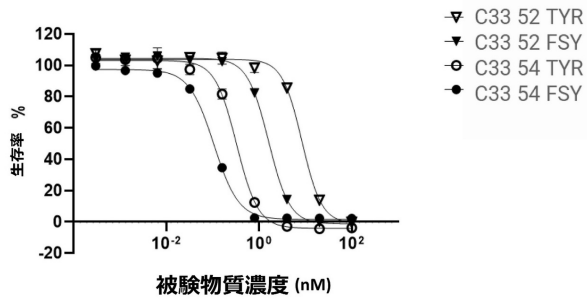
5時間 ウォッシュアウト



10

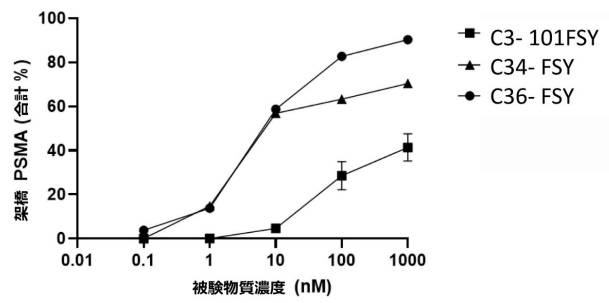
【図 2 3 B】

6日間 アッセイ



【図 2 4 A】

1時間



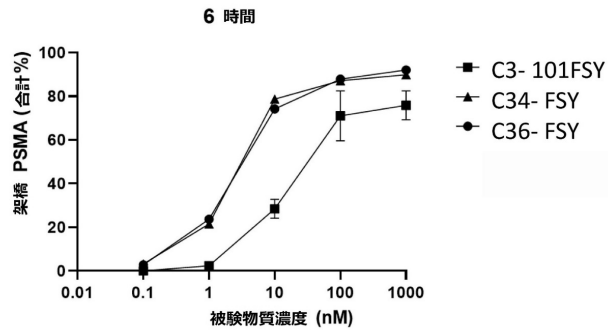
20

30

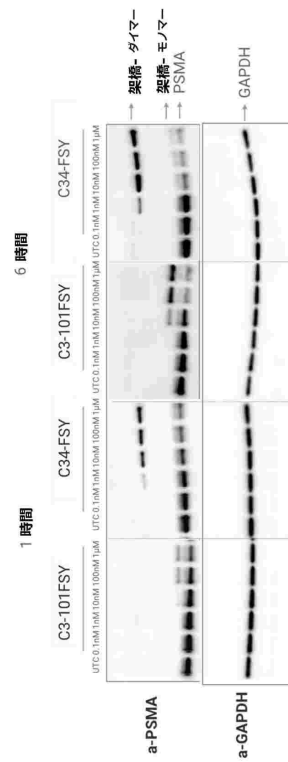
40

50

【図 2 4 B】



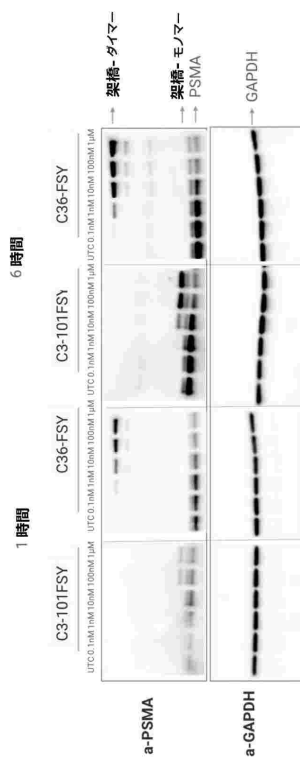
【図 2 5 A】



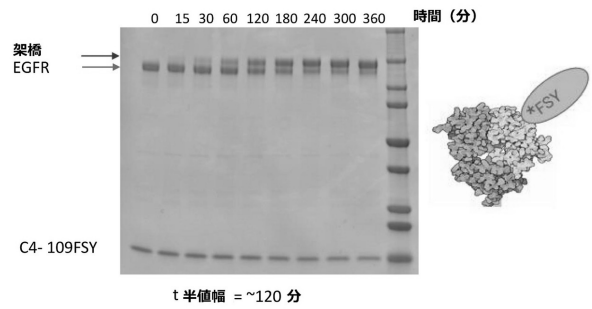
10

20

【図 2 5 B】



【図 2 6 A】

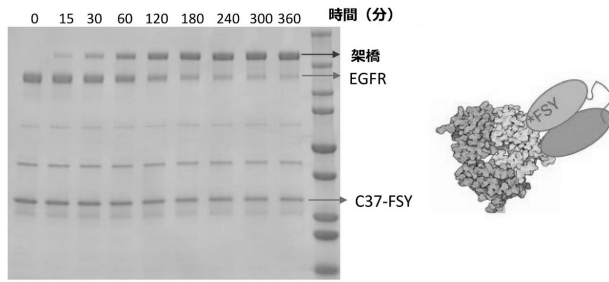


30

40

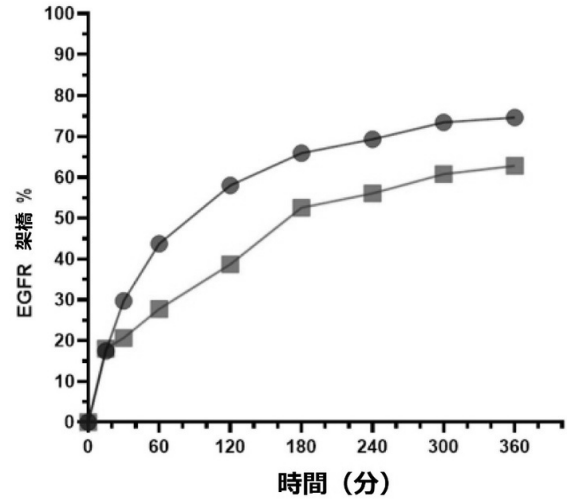
50

【図 26 B】

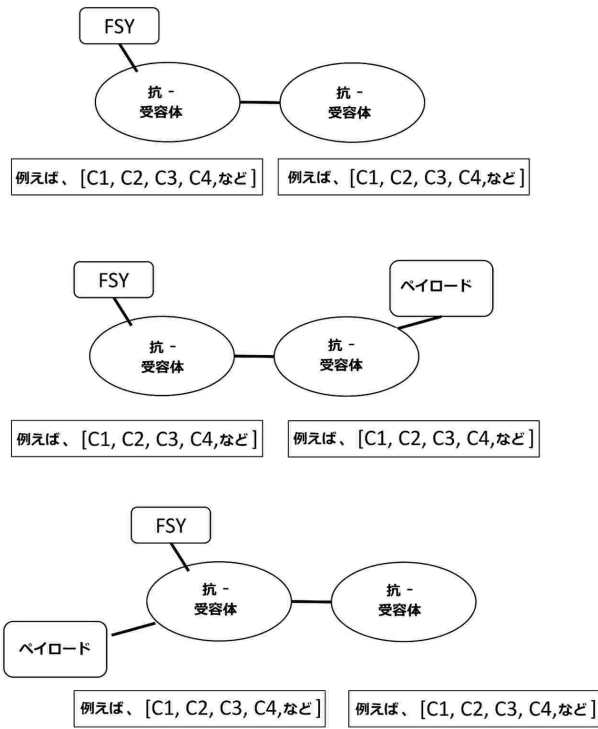


【図 27】

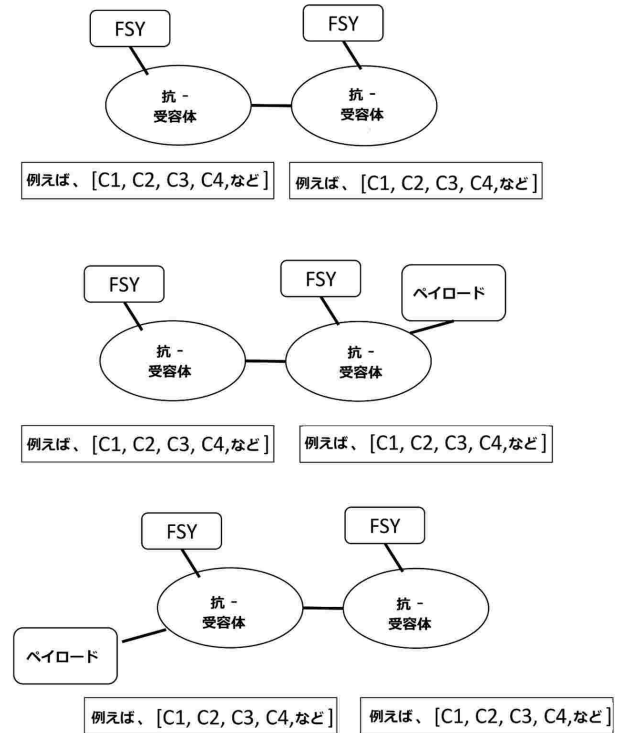
■ C4- 109 FSY
● C37-FSY



【図 28 A】



【図 28 B】



10

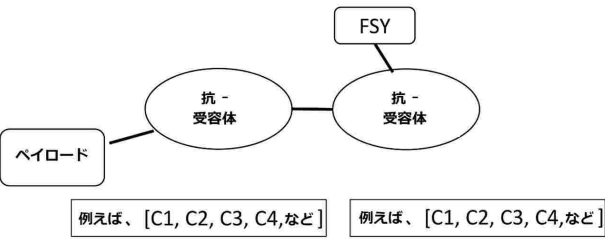
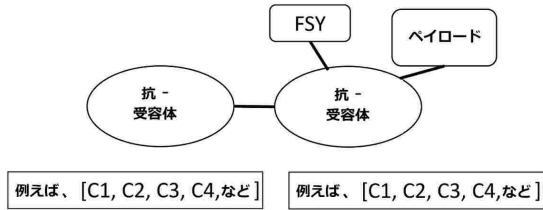
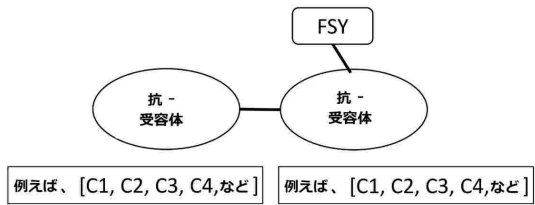
20

30

40

50

【図 28 C】



10

20

【配列表】

2025503512000001.xml

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US2022/082277
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER A61K 47/68 (2017.01) A61K 51/10 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01) C07K 16/18 (2006.01) C07K 16/30 (2006.01) C12N 9/00 (2006.01) C12P 21/02 (2006.01)		
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)		
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)		
Database: CAPLUS, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE, REGISTRY, PATENW (WPIAP, EPODOC, AND ALL FULL TEXT ENGLISH LANGUAGE DATABASES), GENOMEQUEST, GOOGLE, DOCDB, DWPI, PUBMED, ESPACENET and internal databases of IP Australia.		
Terms: fluorosulfate, amino acid, PSY, FSK, crosslink, covalent, bond, proximity-enabled, protein, Sufex, antibody, enlaza, duron sergio, roland jason, ptacin jerod, heidt analcah, liu jun and other similar terms.		
SEQ ID NOs 1-4, 16-64, 65-72, 84, 87, 92 are search in GENOMEQUEST.		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	Documents are listed in the continuation of Box C	
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C ☒ See patent family annex		
* "A" "D" "E" "L" "O" "P"	Special categories of cited documents: document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance document cited by the applicant in the international application earlier application or patent but published on or after the international filing date 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) document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means 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 27 March 2023		Date of mailing of the international search report 27 March 2023
Name and mailing address of the ISA/AU AUSTRALIAN PATENT OFFICE PO BOX 200, WODEN ACT 2606, AUSTRALIA Email address: pct@ipaustralia.gov.au		Authorised officer Peng Zhang AUSTRALIAN PATENT OFFICE (ISO 9001 Quality Certified Service) Telephone No. +61 2 6225 6189

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2022/082277

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.
- b. ☒ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13~~ter~~.1(a)).
☒ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3. Additional comments:
SEQ ID NOs: 1-4 and 16-64, 65-72, 84, 87, 92 are searched in GenomeQuest.

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No.
C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		PCT/US2022/082277
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2019/173760 A1 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA) 12 September 2019 Example 1 and Example 2, [0083-0084]	1-15, 29-59, 73, 75, 77, 79, 82-133, 147-159, 173-176, 178-182, 184, 186, 188-216
X	WO 2020/206341 A1 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA) 08 October 2020 Example 1, [0061-0062]	1-15, 29-59, 73, 75, 77, 79, 82-133, 147-159, 173-176, 178-182, 184, 186, 188-216
X	Wang, N., <i>et al.</i> , 2018. Genetically encoding fluorosulfate-L-tyrosine to react with lysine, histidine, and tyrosine via SuFEx in proteins in vivo. <i>Journal of the American Chemical Society</i> , 140(15), pp.4995-4999. Abstract, page 4997 left column paragraph 2, page 4998 left column paragraph 1	1-15, 29-59, 73, 75, 77, 79, 82-133, 147-159, 173-176, 178-182, 184, 186, 188-216
X	WO 2021/102624 A1 (HANGZHOU BRANCH OF TECHNICAL INSTITUTE OF PHYSICS AND CHEMISTRY, CHINESE ACADEMY OF SCIENCES) 03 June 2021 Abstract, Examples 1-5	1-15, 29-59, 73, 75, 77, 79, 82-133, 147-159, 173-176, 178-182, 184, 186, 188-216
X	WO 2021/244504 A1 (GUANGDONG SHENGSAI BIOTECHNOLOGY INC., LIMITED) 09 December 2021 Examples 1-5 and its English translation from Google Patents	1-15, 29-59, 73, 75, 77, 79, 82-133, 147-159, 173-176, 178-182, 184, 186, 188-216
X	Li, Q., <i>et al.</i> , 2020. Developing covalent protein drugs via proximity-enabled reactive therapeutics. <i>Cell</i> , 182(1), pp.85-97. summary, results	1-15, 29-59, 73, 75, 77, 79, 82-133, 147-159, 173-176, 178-182, 184, 186, 188-216
X	Liu, J., <i>et al.</i> 2021 July. A genetically encoded fluorosulfonyloxybenzoyl-L-lysine for expansive covalent bonding of proteins via sufex chemistry. <i>Journal of the American Chemical Society</i> , 143(27), pp.10341-10351. Abstract, Results and Discussion	1-15, 29-59, 73, 75, 77, 79, 82-133, 147-159, 173-176, 178-182, 184, 186, 188-216
X	Cheng, Y. <i>et al.</i> , 2021 May. A CDR-based approach to generate covalent inhibitory antibody for human rhinovirus protease. <i>Bioorganic & Medicinal Chemistry</i> , 42, p.116219. the entire document	1-15, 29-59, 73, 75, 77, 79, 82-133, 147-159, 173-176, 178-182, 184, 186, 188-216
P,X	WO 2022/187273 A1 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA) 09 September 2022 [0088], [0369], [0373-0375], [0405-0406], [0421-0426], [0445]	1-15, 30, 32-34, 46-59, 79, 83, 85-87, 95-99
	WO 2022/194078 A1 (PEKING UNIVERSITY) 22 September 2022	
Form PCT/ISA/210 (fifth sheet) (July 2019)		

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No.
C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		PCT/US2022/082277
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	Example 1, Example 2, SEQ ID NO: 18, page 46 paragraph 8, page 47 paragraph 4 and Google translation of the document	1-12, 29-31, 35-37, 46-56, 82-84, 88-98, 100-112, 115-117, 123-130, 147, 173-174, 179-180, 188, 191-192, 196-198, 202, 204-208, 210-216
P,X	WO 2022/232377 A2 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA) 03 November 2022 Examples 1-4, [0151-0153], [0354-0464], [0791-0818], [0766-0790], [0201], [0504], [0428-0432], Figures	1-12, 29-57, 79-98, 100-118, 120-130, 147-156, 173-176, 178-181, 188-189, 191-200, 202-216

Form PCT/ISA/210 (fifth sheet) (July 2019)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2022/082277

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.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
the subject matter listed in Rule 39 on which, under Article 17(2)(a)(i), an international search is not required to be carried out, including
2. ☒ Claims Nos.: 16-28, 60-72, 134-146, 160-172
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:
See Supplemental Box
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:

See Supplemental Box for Details

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.:
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	International application No. PCT/US2022/082277
Supplemental Box	
Continuation of Box II See Box VIII for details. Continuation of: Box III This International Application does not comply with the requirements of unity of invention because it does not relate to one invention or to a group of inventions so linked as to form a single general inventive concept. This Authority has found that there are different inventions based on the following features that separate the claims into distinct groups: • Claims 1-50 are directed to a conjugate comprising a targeting domain and a payload, wherein the targeting domain comprises at least one unnatural amino acid (UAA) residue, wherein the targeting domain is configured to bind to a target, and wherein the UAA residue is in sufficient proximity to form a covalent bond with the target when the targeting domain is bound. The feature of a conjugate comprising a targeting domain comprising at least one UAA and a payload, wherein the UAA enables covalent bond with the target when the targeting domain is bound is specific to this group of claims. • Claims 51-107 are directed to a conjugate comprising a payload and an engineered sdAb, wherein the sdAb having a CDR region and at least one UAA residue within or in the proximity of the CDR region, wherein the sdAb comprises any one of SEQ ID NOs: 1-4, or 16-64. The feature of a conjugate comprising a payload and a sdAb, wherein the sdAb has at least one UAA within or in the proximity of the CDR region, wherein the sdAb can be selected from any one of SEQ ID NOs: 1-4, or 16-64 is specific to this group of claims. • Claims 108-216 are directed to a conjugate comprising a first targeting domain and a second targeting domain, wherein the first targeting domain comprises at least one UAA that enabled covalent bonding to the target when bound to the first target, and wherein the second targeting domain is configured to bind a second target. The feature of a conjugate comprising a first and a second targeting domain, wherein the first targeting domain comprises at least one UAA that enabled covalent bonding to the target when bound to the first target and the second targeting domain binds to a second target is specific to this group of claims. PCT Rule 13.2, first sentence, states that unity of invention is only fulfilled when there is a technical relationship among the claimed inventions involving one or more of the same or corresponding special technical features. PCT Rule 13.2, second sentence, defines a special technical feature as a feature which makes a contribution over the prior art. When there is no special technical feature common to all the claimed inventions there is no unity of invention. In the above groups of claims, the identified features may have the potential to make a contribution over the prior art but are not common to all the claimed inventions and therefore cannot provide the required technical relationship. The only feature common to all of the claimed inventions and which provides a technical relationship among them is a targeting domain comprising at least one UAA, wherein the UAA enables covalent bond with the target when the targeting domain is bound to the target. However this feature does not make a contribution over the prior art because it is disclosed in: D1: WO 2019/173760 A1. Therefore in the light of this document this common feature cannot be a special technical feature. Therefore there is no special technical feature common to all the claimed inventions and the requirements for unity of invention are consequently not satisfied <i>a posteriori</i>. I have searched and reported on all three inventions as it takes negligible additional efforts.	
Form PCT/ISA/210 (Supplemental Box) (July 2019)	

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US2022/082277	
Information on patent family members			
This Annex lists known patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The Australian Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.			
Patent Document/s Cited in Search Report		Patent Family Member/s	
Publication Number	Publication Date	Publication Number	Publication Date
WO 2019/173760 A1	12 September 2019	WO 2019173760 A1	12 Sep 2019
		AU 2019231893 A1	29 Oct 2020
		CA 3093377 A1	12 Sep 2019
		CN 112566632 A	26 Mar 2021
		EP 3761972 A1	13 Jan 2021
		JP 2021515561 A	24 Jun 2021
		US 2021002325 A1	07 Jan 2021
WO 2020/206341 A1	08 October 2020	WO 2020206341 A1	08 Oct 2020
		EP 3947424 A1	09 Feb 2022
		US 2022371986 A1	24 Nov 2022
WO 2021/102624 A1	03 June 2021	WO 2021102624 A1	03 Jun 2021
		CN 113179631 A	27 Jul 2021
WO 2021/244504 A1	09 December 2021	WO 2021244504 A1	09 Dec 2021
		CN 112028987 A	04 Dec 2020
		CN 112028987 B	30 Jul 2021
WO 2022/187273 A1	09 September 2022	WO 2022187273 A1	09 Sep 2022
WO 2022/194078 A1	22 September 2022	WO 2022194078 A1	22 Sep 2022
		CN 114573714 A	03 Jun 2022
WO 2022/232377 A2	03 November 2022	WO 2022232377 A2	03 Nov 2022
End of Annex			
Due to data integration issues this family listing may not include 10 digit Australian applications filed since May 2001. Form PCT/ISA/210 (Family Annex)(July 2019)			

フロントページの続き

(51)国際特許分類		F I	テーマコード (参考)	
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00	4 H 0 4 5
A 6 1 K	45/00 (2006.01)	A 6 1 K	45/00	
A 6 1 K	50/00 (2006.01)	A 6 1 K	50/00	1 0 0
A 6 1 K	49/00 (2006.01)	A 6 1 K	49/00	
A 6 1 K	51/00 (2006.01)	A 6 1 K	51/00	2 0 0
A 6 1 K	47/68 (2017.01)	A 6 1 K	47/68	
A 6 1 K	39/395 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	T
C 1 2 N	15/13 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	L
		A 6 1 K	39/395	E
		A 6 1 K	39/395	C
		C 1 2 N	15/13	

(32)優先日 令和4年7月11日(2022.7.11)

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(81)指定国・地域 AP(BW,CV,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,ME,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,CV,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IQ,IR,IS,IT,JM,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,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,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. WINDOWS

ニア州 ラ・ホーヤ ノース・トーリー・パインズ・ロード 1 1 0 9 9 スイート 2 9 0

(72)発明者 ブタシン, ジェロッド

アメリカ合衆国 9 2 0 3 7 カリフォルニア州 ラ・ホーヤ ノース・トーリー・パインズ・ロード
1 1 0 9 9 スイート 2 9 0

(72)発明者 ヘイト, アナレア

アメリカ合衆国 9 2 0 3 7 カリフォルニア州 ラ・ホーヤ ノース・トーリー・パインズ・ロード
1 1 0 9 9 スイート 2 9 0

(72)発明者 リュー, ジュン

アメリカ合衆国 9 2 0 3 7 カリフォルニア州 ラ・ホーヤ ノース・トーリー・パインズ・ロード
1 1 0 9 9 スイート 2 9 0

F ターム (参考) 4B063 QA20 QQ08 QR48 QR90 QS40

4B064 AG27 CA19 CC24 DA01

4C076 AA95 CC27 EE59

4C084 AA12 AA17 MA66 NA13 ZB26

4C085 AA13 AA14 AA21 AA26 BB31 CC22 CC23 EE01 GG01 HH01

KA29 LL18

4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 BA71 BA72 DA76 EA20 FA10 FA74