

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7681681号
(P7681681)

(45)発行日 令和7年5月22日(2025.5.22)

(24)登録日 令和7年5月14日(2025.5.14)

(51)国際特許分類		F I	
C 0 7 K	19/00 (2006.01)	C 0 7 K	19/00
C 0 7 K	16/18 (2006.01)	C 0 7 K	16/18
C 0 7 K	14/52 (2006.01)	C 0 7 K	14/52
C 0 7 K	14/715 (2006.01)	C 0 7 K	14/715
C 1 2 N	15/19 (2006.01)	C 1 2 N	15/19
請求項の数 23 (全64頁) 最終頁に続く			
(21)出願番号	特願2023-510318(P2023-510318)	(73)特許権者	523168825
(86)(22)出願日	令和3年8月10日(2021.8.10)		ジャナックス セラピューティクス、イ
(65)公表番号	特表2023-547978(P2023-547978		ンク。
	A)		アメリカ合衆国 9 2 1 3 0 カリフォル
(43)公表日	令和5年11月15日(2023.11.15)		ニア州 サンディエゴ ビスタ・ソレント
(86)国際出願番号	PCT/US2021/045395		・パークウェイ 1 0 9 5 5 スイート
(87)国際公開番号	WO2022/035866		2 0 0
(87)国際公開日	令和4年2月17日(2022.2.17)	(74)代理人	110003797
審査請求日	令和6年7月30日(2024.7.30)		弁理士法人清原国際特許事務所
(31)優先権主張番号	63/064,268	(72)発明者	キャンベル，デイビッド
(32)優先日	令和2年8月11日(2020.8.11)		アメリカ合衆国 9 2 1 3 0 カリフォル
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		ニア州 サンディエゴ ビスタ・ソレント
早期審査対象出願			・パークウェイ 1 0 9 5 5 スイート
			2 0 0
		(72)発明者	ディライモンド，トーマス アール。
			最終頁に続く

(54)【発明の名称】 切断可能リンカー組成物および方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

配列番号6のアミノ酸配列（L S G R S D A G S P L G L A G）による切断可能リンカーを含む単離ポリペプチドであって、前記単離ポリペプチドが標的抗原に結合する抗原結合性ドメインをさらに含み、前記切断可能リンカーが、式Ⅰ：A₁－L₁－P₁による配置で、前記標的抗原に結合する前記抗原結合性ドメインにペプチドを接続し、式中、A₁は、前記標的抗原に結合する前記抗原結合性ドメインを含み、L₁は前記切断可能リンカーを含み、P₁は、前記標的抗原への前記抗原結合性ドメインの結合を損なわせるペプチドを含む、単離ポリペプチド。

【請求項2】

前記切断可能リンカーがプロテアーゼにより切断可能である、請求項1に記載の単離ポリペプチド。

【請求項3】

前記プロテアーゼが腫瘍特異的プロテアーゼを含む、請求項2に記載の単離ポリペプチド。

【請求項4】

前記プロテアーゼが、マトリックスメタロプロテアーゼ（MMP）またはセリンプロテアーゼを含む、請求項2に記載の単離ポリペプチド。

【請求項5】

前記マトリックスメタロプロテアーゼが、MMP2、MMP7、MMP9、MMP13

、またはMMP 1 4を含む、請求項 4 に記載の単離ポリペプチド。

【請求項 6】

前記セリンプロテアーゼが、マトリプターゼ、ウロキナーゼ、またはヘプシンを含む、請求項 4 に記載の単離ポリペプチド。

【請求項 7】

前記抗原結合性ドメインが、前記切断可能リンカーに対する C 末端である、請求項 1 に記載の単離ポリペプチド。

【請求項 8】

P₁ が N 末端で前記切断可能リンカーに接続され、A₁ が C 末端で前記切断可能リンカーに接続される、請求項 1 に記載の単離ポリペプチド。

【請求項 9】

P₁ が、前記標的抗原に対し 70%未満の配列同一性を有する、請求項 1 に記載の単離ポリペプチド。

【請求項 10】

P₁ が、長さが少なくとも 10 のアミノ酸および長さが 20 以下のアミノ酸のペプチド配列を含む、請求項 1 に記載の単離ポリペプチド。

【請求項 11】

P₁ が半減期延長部分にさらに連結される、請求項 1 に記載の単離ポリペプチド。

【請求項 12】

前記半減期延長部分が単一ドメイン抗体である、請求項 1 に記載の単離ポリペプチド。

【請求項 13】

A₁ が、抗体、一本鎖可変フラグメント (s c F v)、重鎖可変ドメイン (V H ドメイン)、軽鎖可変ドメイン (V L ドメイン)、ラクダ科由来単一ドメイン抗体の可変ドメイン (V H H)、F a b、F a b'、F a b 軽鎖ポリペプチド、または F a b 重鎖ポリペプチドを含む、請求項 1 に記載の単離ポリペプチド。

【請求項 14】

A₁ が前記 s c F v を含む、請求項 1 に記載の単離ポリペプチド。

【請求項 15】

前記 s c F v が抗 C D 3 e 一本鎖可変フラグメントを含む、請求項 1 に記載の単離ポリペプチド。

【請求項 16】

請求項 1 に記載の単離ポリペプチドと、第 2 の抗原結合性ドメインを含む第 2 の単離ポリペプチドとを含む、複合体。

【請求項 17】

前記第 2 の単離ポリペプチドが、式 I I : A₂ - L₂ - P₂ による配置にあり、式中、A₂ は前記第 2 の抗原結合性ドメインを含み、L₂ は第 2 の切断可能リンカーを含み、P₂ は、第 2 の標的抗原への前記第 2 の抗原結合性ドメインの結合を損なわせる第 2 のペプチドを含み、前記第 2 の抗原結合性ドメインが F a b 軽鎖ポリペプチドまたは F a b 重鎖ポリペプチドを含み、前記第 2 の標的抗原が腫瘍抗原を含む、請求項 1 に記載の複合体。

【請求項 18】

前記第 2 の切断可能リンカーが、配列番号 1 のアミノ酸配列 (L S G R S D A G) を含む、請求項 1 に記載の複合体。

【請求項 19】

前記第 2 の切断可能リンカーが、配列番号 3 のアミノ酸配列 (I S S G L L S G R S D A G) を含む、請求項 1 に記載の複合体。

【請求項 20】

前記第 2 の切断可能リンカーが、配列番号 26 のアミノ酸配列 (A G L L A P P G G L S G R S D A G) を含む、請求項 1 に記載の複合体。

【請求項 21】

前記第 2 の切断可能リンカーが、配列番号 4 のアミノ酸配列 (A A G L L A P P G G L

10

20

30

40

50

S G R S D A G) を含む、請求項 1 7 に記載の複合体。

【請求項 2 2】

前記第 2 の切断可能リンカーが、配列番号 5 のアミノ酸配列 (S P L G L S G R S D A G) を含む、請求項 1 7 に記載の複合体。

【請求項 2 3】

前記第 2 の切断可能リンカーが、配列番号 6 のアミノ酸配列 (L S G R S D A G S P L G L A G) を含む、請求項 1 7 に記載の複合体。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

関連出願の相互参照

本出願は、2 0 2 0 年 8 月 1 1 日出願の米国仮特許出願第 6 3 / 0 6 4 , 2 6 8 号に基づく利益を主張し、当該出願は参照により本明細書に援用される。

【0 0 0 2】

配列表

本出願は、A S C I I フォーマットで電子的に提出されその全体を参照により本明細書に援用される配列表を含んでいる。当該 A S C I I コピーは、2 0 2 1 年 8 月 5 日作製、名称 5 2 4 2 6 _ 7 2 0 _ 6 0 1 _ S L . t x t であり、サイズは 5 8 , 3 2 5 バイトである。

【発明の概要】

【0 0 0 3】

本明細書中の特定の実施形態では、配列番号 1 のアミノ酸配列 (L S G R S D A G) による切断可能リンカーを含む単離ポリペプチドが開示される。いくつかの実施形態では、切断可能リンカーは、配列番号 3 のアミノ酸配列 (I S S G L L S G R S D A G) を含む。いくつかの実施形態では、切断可能リンカーは、配列番号 2 6 のアミノ酸配列 (A G L L A P P G G L S G R S D A G) を含む。いくつかの実施形態では、切断可能リンカーは、配列番号 4 のアミノ酸配列 (A A G L L A P P G G L S G R S D A G) を含む。いくつかの実施形態では、切断可能リンカーは、配列番号 5 のアミノ酸配列 (S P L G L S G R S D A G) を含む。いくつかの実施形態では、切断可能リンカーは、配列番号 6 のアミノ酸配列 (L S G R S D A G S P L G L A G) を含む。いくつかの実施形態では、切断可能リンカーは、プロテアーゼにより切断可能である。いくつかの実施形態では、プロテアーゼは腫瘍特異的プロテアーゼを含む。いくつかの実施形態では、プロテアーゼは、マトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) またはセリンプロテアーゼを含む。いくつかの実施形態では、マトリックスメタロプロテアーゼは、MMP 2、MMP 7、MMP 9、MMP 1 3、または MMP 1 4 を含む。いくつかの実施形態では、セリンプロテアーゼは、マトリプターゼ、ウロキナーゼ、またはヘプシンを含む。いくつかの実施形態では、単離ポリペプチドは、標的抗原に結合する抗原結合性ドメインをさらに含む。いくつかの実施形態では、抗原結合性ドメインは、切断可能リンカーに対する C 末端である。いくつかの実施形態では、単離ポリペプチドは、サイトカイン受容体に結合するサイトカインまたはサイトカインフラグメントをさらに含む。いくつかの実施形態では、サイトカインまたはサイトカインフラグメントは、切断可能リンカーに対する C 末端である。いくつかの実施形態では、切断可能リンカーは、式 I : $A_1-L_1-P_1$ による配置で、標的抗原に結合する抗原結合性ドメインに、またはサイトカイン受容体に結合するサイトカインもしくはサイトカインフラグメントにペプチドを接続し、式中、 A_1 は、標的抗原に結合する抗原結合性ドメイン、またはサイトカイン受容体に結合するサイトカインもしくはサイトカインフラグメントを含み、 L_1 は切断可能リンカーを含み、 P_1 は、標的抗原への抗原結合性ドメインの結合を損なわせるか、またはサイトカイン受容体へのサイトカインの結合を損なわせるペプチドを含む。いくつかの実施形態では、 P_1 は、N 末端で切断可能リンカーに接続され、 A_1 は、C 末端で切断可能リンカーに接続される。いくつかの実施形態では、 P_1 は、C 末端で切断可能リンカーに接続され、 A_1 は、N 末端で切断可能リンカーに接続さ

10

20

30

40

50

れる。いくつかの実施形態では、 P_1 は、イオン相互作用、静電相互作用、疎水性相互作用、 P_i ースタッキング相互作用、およびH結合相互作用、またはそれらの組合せを介して A_1 に結合される。いくつかの実施形態では、 P_1 は、標的抗原またはサイトカイン受容体に対し70%未満の配列相同性を有する。いくつかの実施形態では、 P_1 は、長さが少なくとも10のアミノ酸のペプチド配列を含む。いくつかの実施形態では、 P_1 は、長さが少なくとも10のアミノ酸および長さが20以下のアミノ酸のペプチド配列を含む。いくつかの実施形態では、 P_1 は、長さが少なくとも16のアミノ酸のペプチド配列を含む。いくつかの実施形態では、 P_1 は、長さが40以下のアミノ酸のペプチド配列を含む。いくつかの実施形態では、 P_1 は、環状ペプチドまたは直鎖ペプチドを含む。いくつかの実施形態では、 P_1 は環状ペプチドを含む。いくつかの実施形態では、 P_1 は半減期延長部分にさらに連結される。いくつかの実施形態では、半減期延長部分は単一ドメイン抗体である。いくつかの実施形態では、単一ドメイン抗体は10Gを含む。いくつかの実施形態では、 A_1 は、抗体、一本鎖可変フラグメント(s c F v)、重鎖可変ドメイン(V Hドメイン)、軽鎖可変ドメイン(V Lドメイン)、ラクダ科由来単一ドメイン抗体の可変ドメイン(V H H)、F a b、F a b'、F a b軽鎖ポリペプチド、またはF a b重鎖ポリペプチドを含む。いくつかの実施形態では、標的抗原は腫瘍抗原を含む。いくつかの実施形態では、 A_1 は、F a b軽鎖ポリペプチドまたはF a b重鎖ポリペプチドを含む。いくつかの実施形態では、 A_1 は、上皮成長因子受容体(E G F R)結合ドメインを含む。いくつかの実施形態では、標的抗原はエフェクター細胞抗原を含む。いくつかの実施形態では、 A_1 はs c F vを含む。いくつかの実施形態では、s c F vは、抗C D 3 e一本鎖可変フラグメントを含む。いくつかの実施形態では、 A_1 はサイトカインを含む。いくつかの実施形態では、サイトカインまたはサイトカインフラグメントは、野生型サイトカインである。いくつかの実施形態では、サイトカインまたはサイトカインフラグメントは、サイトカインの突然変異タンパク質である。いくつかの実施形態では、サイトカイン受容体は、インターフェロン受容体またはインターロイキン受容体である。いくつかの実施形態では、サイトカイン受容体は、インターフェロン受容体、G M - C S F受容体、I L - 2受容体、I L - 4受容体、I L - 6受容体、I L - 7受容体、I L - 10受容体、I L - 12受容体、I L - 15受容体、I L - 21受容体、またはT G F - β 受容体を含む。いくつかの実施形態では、サイトカインまたはサイトカインフラグメントは、インターフェロン、G M - C S F、I L - 2、I L - 7、I L - 12、I L - 15、またはI L - 21を含む。いくつかの実施形態では、サイトカインまたはサイトカインフラグメントは、I L - 2、I L - 12、I L - 6、I L - 4、I L - 10、またはT G F β を含む。いくつかの実施形態では、単離ポリペプチドは、第2の抗原結合性ドメインまたは第2のサイトカインもしくは第2のサイトカインフラグメントを含む第2の単離ポリペプチドと複合体を形成する。いくつかの実施形態では、第2の単離ポリペプチドは、式I I : A_2 - L_2 - P_2 による配置にあり、式中、 A_2 は第2の抗原結合性ドメインまたは第2のサイトカインを含み、 L_2 は第2の切断可能リンカーを含み、 P_2 は、第2の標的抗原への第2の抗原結合性ドメインの結合を阻害するか、または第2のサイトカイン受容体への第2のサイトカインまたは第2のサイトカインフラグメントの結合を阻害する第2のペプチドを含む。いくつかの実施形態では、第2の切断可能リンカーは、配列番号1のアミノ酸配列(L S G R S D A G)を含む。いくつかの実施形態では、第2の切断可能リンカーは、配列番号3のアミノ酸配列(I S S G L L S G R S D A G)を含む。いくつかの実施形態では、第2の切断可能リンカーは、配列番号26のアミノ酸配列(A G L L A P P G G L S G R S D A G)を含む。いくつかの実施形態では、第2の切断可能リンカーは、配列番号4のアミノ酸配列(A A G L L A P P G G L S G R S D A G)を含む。いくつかの実施形態では、第2の切断可能リンカーは、配列番号5のアミノ酸配列(S P L G L S G R S D A G)を含む。いくつかの実施形態では、第2の切断可能リンカーは、配列番号6のアミノ酸配列(L S G R S D A G S P L G L A G)を含む。いくつかの実施形態では、 P_2 は、N末端で第2の切断可能リンカーに接続され、 A_2 は、C末端で第2の切断可能リンカーに接続される。いくつかの実施形態では、 P_2 は、C末端で第2の切断可能リンカーに接

10

20

30

40

50

続され、 A_2 は、N末端で第2の切断可能リンカーに接続される。いくつかの実施形態では、 P_2 は、イオン相互作用、静電相互作用、疎水性相互作用、 π -スタッキング相互作用、およびH結合相互作用、またはそれらの組合せを介して A_2 に結合される。いくつかの実施形態では、 P_2 は、第2の標的抗原または第2のサイトカイン受容体に対し70%未満の配列相同性を有する。いくつかの実施形態では、 P_2 は、長さが少なくとも10のアミノ酸のペプチド配列を含む。いくつかの実施形態では、 P_2 は、長さが少なくとも10のアミノ酸および長さが20以下のアミノ酸のペプチド配列を含む。いくつかの実施形態では、 P_2 は、長さが少なくとも16のアミノ酸のペプチド配列を含む。いくつかの実施形態では、 P_2 は、長さが40以下のアミノ酸のペプチド配列を含む。いくつかの実施形態では、 P_2 は、環状ペプチドまたは直鎖ペプチドを含む。いくつかの実施形態では、 P_2 は環状ペプチドを含む。いくつかの実施形態では、 A_2 は、抗体、一本鎖可変フラグメント(s c F v)、重鎖可変ドメイン(V Hドメイン)、軽鎖可変ドメイン(V Lドメイン)、ラクダ科由来単一ドメイン抗体の可変ドメイン(V H H)、F a b、F a b'、F a b軽鎖ポリペプチド、またはF a b重鎖ポリペプチドを含む。いくつかの実施形態では、第2の標的抗原は腫瘍抗原を含む。いくつかの実施形態では、 A_2 は、F a b軽鎖ポリペプチドまたはF a b重鎖ポリペプチドを含む。いくつかの実施形態では、 A_2 は、上皮成長因子受容体(E G F R)結合ドメインを含む。いくつかの実施形態では、第2の標的抗原はエフェクター細胞抗原を含む。いくつかの実施形態では、 A_2 はs c F vを含む。いくつかの実施形態では、s c F vは、抗C D 3 e一本鎖可変フラグメントを含む。いくつかの実施形態では、 A_2 は第2のサイトカインを含む。いくつかの実施形態では、第2のサイトカインまたは第2のサイトカインフラグメントは、野生型サイトカインである。いくつかの実施形態では、第2のサイトカインまたは第2のサイトカインフラグメントは、サイトカインの突然変異タンパク質である。いくつかの実施形態では、第2のサイトカイン受容体は、インターフェロン受容体またはインターロイキン受容体である。いくつかの実施形態では、第2のサイトカイン受容体は、インターフェロン受容体、G M - C S F受容体、I L - 2受容体、I L - 4受容体、I L - 6受容体、I L - 7受容体、I L - 10受容体、I L - 12受容体、I L - 15受容体、I L - 21受容体、またはT G F - β 受容体を含む。いくつかの実施形態では、第2のサイトカインまたは第2のサイトカインフラグメントは、インターフェロン、G M - C S F、I L - 2、I L - 7、I L - 12、I L - 15、またはI L - 21を含む。いくつかの実施形態では、第2のサイトカインまたは第2のサイトカインフラグメントは、I L - 2、I L - 12、I L - 6、I L - 4、I L - 10、またはT G F β を含む。

【0004】

本明細書には、上記実施形態のいずれかによる切断可能リンカーを含む単離ポリペプチドと、薬学的に許容可能な賦形剤とを含む医薬組成物が開示される。

【0005】

本明細書には、上記実施形態のいずれかによる切断可能リンカーを含む単離ポリペプチドをコードする、単離された組換え核酸分子が開示される。

【0006】

本明細書には、上記実施形態による単離された組換え核酸分子を含むベクターが開示される。

【0007】

本明細書には、切断可能リンカーを含む単離ポリペプチドを産生する方法であって、ポリペプチドの発現を生じさせる条件下で、上記実施形態のベクターを含む細胞を培養する工程を含む方法が開示される。

【0008】

本明細書には、切断可能リンカーを含む単離ポリペプチドを製造する方法であって、(a)ポリペプチドの発現を生じさせる条件下で上記実施形態の単離された組換え核酸分子を含む細胞を培養する工程と、(b)ポリペプチドを単離する工程とを含む方法が開示される。

10

20

30

40

50

【図面の簡単な説明】

【0009】

本開示の新規な特徴は、添付の特許請求の範囲で具体的に記載される。本開示の特徴と利点は、本開示の原理が利用される例示的实施形態を説明する以下の詳細な説明、および添付図面を参照することで、より良く理解されるであろう。

【0010】

【図1A】EGFRマスキングを含むポリペプチド複合体PC-1、PC-2、PC-3、PC-4、およびPC-5の結合を例示する図である。

【図1B】腫瘍プロテアーゼMTSP1による切断後のポリペプチド複合体PC-1、PC-2、PC-3、PC-4、およびPC-5の結合を例示する図である。

10

【図2A】CD3εマスキングを含むポリペプチド複合体PC-1、PC-2、PC-3、PC-4、およびPC-5の結合を例示する図である。

【図2B】腫瘍プロテアーゼMTSP1による切断後のポリペプチド複合体PC-1、PC-2、PC-3、PC-4、およびPC-5の結合を例示する図である。

【図3A】ポリペプチド複合体PC-2、PC-3、PC-4、PC-5、PC-1、およびPC-6のEGFR-ビオチンへの結合を、ELISAにより測定したものを例示する図である。

【図3B】CD3ε-ビオチンへの結合を、ELISAにより測定したものを例示する図である。

【図4A】ポリペプチド複合体PC-2、PC-3、PC-4、PC-5、PC-1、およびPC-6における腫瘍標的細胞HCT116に対する細胞毒性を例示する図である。

20

【図4B】ポリペプチド複合体PC-2、PC-3、PC-4、PC-5、PC-1、およびPC-6における腫瘍標的細胞HCT116に対する細胞毒性を例示する図である。

【図4C】ポリペプチド複合体PC-2、PC-3、PC-4、PC-5、PC-1、およびPC-6における腫瘍標的細胞HCT116に対する細胞毒性を例示する図である。

【図4D】ポリペプチド複合体PC-2、PC-3、PC-4、PC-5、PC-1、およびPC-6における腫瘍標的細胞HCT116に対する細胞毒性を例示する図である。

【図4E】ポリペプチド複合体PC-2、PC-3、PC-4、PC-5、PC-1、およびPC-6における腫瘍標的細胞HCT116に対する細胞毒性を例示する図である。

【図5A】カニクイザルにおけるポリペプチドPC-1、PC-2、PC-3、PC-7、PC-4、およびPC-5の薬物動態を例示する図である。

30

【図5B】カニクイザルにおけるポリペプチドPC-1、PC-2、PC-3、PC-7、PC-4、およびPC-5の薬物動態を例示する図である。

【図5C】カニクイザルにおけるポリペプチドPC-1、PC-2、PC-3、PC-7、PC-4、およびPC-5の薬物動態を例示する図である。

【図5D】カニクイザルにおけるポリペプチドPC-1、PC-2、PC-3、PC-7、PC-4、およびPC-5の薬物動態を例示する図である。

【図6A】カニクイザルにおけるポリペプチド複合体PC-1、PC-2、PC-3、PC-7、PC-4、およびPC-5のサイトカイン放出を例示する図である。

【図6B】カニクイザルにおけるポリペプチド複合体PC-1、PC-2、PC-3、PC-7、PC-4、およびPC-5のサイトカイン放出を例示する図である。

40

【図6C】カニクイザルにおけるポリペプチド複合体PC-1、PC-2、PC-3、PC-7、PC-4、およびPC-5のサイトカイン放出を例示する図である。

【図6D】カニクイザルにおけるポリペプチド複合体PC-1、PC-2、PC-3、PC-7、PC-4、およびPC-5のサイトカイン放出を例示する図である。

【図7A】カニクイザルにおけるポリペプチド複合体PC-1、PC-2、PC-3、PC-4、およびPC-5のAST値とALT値のグラフを例示する図である。

【図7B】カニクイザルにおけるポリペプチド複合体PC-1、PC-2、PC-3、PC-4、およびPC-5のAST値とALT値のグラフを例示する図である。

【発明を実施するための形態】

50

【0011】

抗体、T細胞受容体（TCR）、サイトカイン治療薬などタンパク質による治療薬は、種々の疾患および障害に対して有効であると証明されている。あらゆる治療法と同様、健康な組織におけるタンパク質による治療薬のオフターゲット効果を最小限に抑えつつ、疾患組織におけるタンパク質による治療薬の活性を維持する必要がある。このような戦略の1つは、タンパク質による治療薬の不活性形態を作り出すことであり、このとき、タンパク質による治療薬に必要な結合部位がタンパク質による治療薬に関連するペプチドで遮断されることで、健康な組織における場合にタンパク質による治療薬がその同族受容体もしくは標的抗原に結合するかまたは相互作用するのを防止する。所望の疾患状態の微小環境でタンパク質による治療薬を活性化するべく、ペプチドは、疾患状態の微小環境に特異的なプロテアーゼにより切断可能なリンカーを用いて、タンパク質による治療薬に連結される。後にペプチドは、疾患状態の微小環境にあるときにタンパク質による治療薬から放出される。

10

【0012】

したがって、本明細書には、健康な組織でのタンパク質による治療薬のオフターゲット効果を縮小しつつ疾患組織でのタンパク質による治療薬の活性を維持するのに使用される、タンパク質による治療薬の様々な形式に適用できる切断可能リンカーが開示される。本明細書に開示される切断可能リンカーには所望の特性があり、例えば、対照リンカーと比較して、腫瘍プロテアーゼによるタンパク質分解速度上昇や、腫瘍プロテアーゼの拡張パネルにより切断可能でありながら同等の安全性プロファイルも有していることが挙げられるが、これらに限定されない。

20

【0013】

特定の定義

本明細書で使用される用語は、具体的事例のみ説明することを目的とし、限定を意図したものではない。本明細書で使用する時、単数形「a」、「an」、および「the」は、前後関係から明らかでない限り、同様に複数形も含むことが意図される。さらに、「含むこと（including）」、「含む（includes）」、「有すること（having）」、「有する（has）」、「有する（with）」、またはその変形といった用語は、詳細な説明および／または特許請求の範囲のいずれかで使用される限り、「含むこと（comprising）」という用語と同様に含まれることが意図される。

30

【0014】

「約（about）」または「およそ（approximately）」という用語は、当業者が判定した特定の値において許容可能な誤差範囲内にあることを意味し、値の測定または判定の仕方、例えば、測定システムの限界に部分的に依存することになる。例えば、「約」は、所与の値で実施されるごとに、1または1より多くの標準偏差内にあること意味し得る。特定の値が本出願および特許請求の範囲に記載されている場合、別段明記されていない限り、「約」という用語は、特定の値における許容可能な誤差範囲を意味するものと仮定されたい。

【0015】

「フラグメント」は、本明細書で使用する時、全長に満たないアミノ酸配列を含むペプチドまたはポリペプチドを示す。

40

【0016】

「ペプチド」、「P₁」、または「P₂」は、本明細書で使用する時、50未満のアミノ酸のアミノ酸配列を示しており、具体的には、サイトカインリガンド結合性ドメイン、そのフラグメント、もしくは突然変異タンパク質、サイトカイン受容体、そのフラグメント、もしくは突然変異タンパク質、および、サイトカインに結合するか同系サイトカイン受容体に結合するいずれかの抗体または抗体結合性フラグメント（例えば、単一ドメイン抗体、Fab、scFv）を除く。

【0017】

本明細書中のいくつかの実施形態では、配列番号1のアミノ酸配列（LSGRSDAG

50

）による切断可能リンカーを含む単離ポリペプチドが開示される。

【0018】

いくつかの実施形態では、切断可能リンカーは、配列番号3のアミノ酸配列（ISSGLLSGRSDAG）を含む。いくつかの実施形態では、切断可能リンカーは、配列番号26のアミノ酸配列（AGLLAPPGLSGRSDAG）を含む。いくつかの実施形態では、切断可能リンカーは、配列番号4のアミノ酸配列（AAGLLAPPGLSGRSDAG）を含む。いくつかの実施形態では、切断可能リンカーは、配列番号5のアミノ酸配列（SPLGLSGRSDAG）を含む。いくつかの実施形態では、切断可能リンカーは、配列番号6のアミノ酸配列（LSGRSDAGSPLGLAG）を含む。

【0019】

いくつかの実施形態では、切断可能リンカーは、配列番号1のアミノ酸配列（LSGRSDAG）からなる。いくつかの実施形態では、切断可能リンカーは、配列番号3のアミノ酸配列（ISSGLLSGRSDAG）からなる。いくつかの実施形態では、切断可能リンカーは、配列番号26のアミノ酸配列（AGLLAPPGLSGRSDAG）からなる。いくつかの実施形態では、切断可能リンカーは、配列番号4のアミノ酸配列（AAGLLAPPGLSGRSDAG）からなる。いくつかの実施形態では、切断可能リンカーは、配列番号5のアミノ酸配列（SPLGLSGRSDAG）からなる。いくつかの実施形態では、切断可能リンカーは、配列番号6のアミノ酸配列（LSGRSDAGSPLGLAG）からなる。

【0020】

いくつかの実施形態では、切断可能リンカーは、配列番号3、4、5、および6からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。

【0021】

いくつかの実施形態では、配列番号3（ISSGLLSGRSDAG）のリンカー1、配列番号4（AAGLLAPPGLSGRSDAG）のリンカー2、配列番号5（SPLGLSGRSDAG）のリンカー3、または配列番号6（LSGRSDAGSPLGLAG）リンカー4のアミノ酸配列による切断可能リンカーを含む単離ポリペプチド、または、リンカー1、リンカー2、リンカー3、またはリンカー4のアミノ酸配列に対して1、2、または3つのアミノ酸置換、付加、もしくは欠失を有する切断可能リンカーを含む単離ポリペプチドである。

【0022】

いくつかの実施形態では、切断可能リンカーは、リンカー1のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、切断可能リンカーは、リンカー1のアミノ酸配列からなる。いくつかの実施形態では、切断可能リンカーは、リンカー1のアミノ酸配列に対して1つのアミノ酸置換、付加、または欠失を有する。いくつかの実施形態では、切断可能リンカーは、リンカー1のアミノ酸配列に対して2つのアミノ酸置換、付加、または欠失を有する。いくつかの実施形態では、切断可能リンカーは、リンカー1のアミノ酸配列に対して3つのアミノ酸置換、付加、または欠失を有する。

【0023】

いくつかの実施形態では、切断可能リンカーは、リンカー2のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、切断可能リンカーは、リンカー2のアミノ酸配列からなる。いくつかの実施形態では、切断可能リンカーは、リンカー2のアミノ酸配列に対して1つのアミノ酸置換、付加、または欠失を有する。いくつかの実施形態では、切断可能リンカーは、リンカー2のアミノ酸配列に対して2つのアミノ酸置換、付加、または欠失を有する。いくつかの実施形態では、切断可能リンカーは、リンカー2のアミノ酸配列に対して3つのアミノ酸置換、付加、または欠失を有する。

【0024】

いくつかの実施形態では、切断可能リンカーは、リンカー3のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、切断可能リンカーは、リンカー3のアミノ酸配列からなる。いくつかの実施形態では、切断可能リンカーは、リンカー3のアミノ酸配列に対して1つのア

10

20

30

40

50

ミノ酸置換、付加、または欠失を有する。いくつかの実施形態では、切断可能リンカーは、リンカー3のアミノ酸配列に対して2つのアミノ酸置換、付加、または欠失を有する。いくつかの実施形態では、切断可能リンカーは、リンカー3のアミノ酸配列に対して3つのアミノ酸置換、付加、または欠失を有する。

【0025】

いくつかの実施形態では、切断可能リンカーは、リンカー4のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、切断可能リンカーは、リンカー4のアミノ酸配列からなる。いくつかの実施形態では、切断可能リンカーは、リンカー4のアミノ酸配列に対して1つのアミノ酸置換、付加、または欠失を有する。いくつかの実施形態では、切断可能リンカーは、リンカー4のアミノ酸配列に対して2つのアミノ酸置換、付加、または欠失を有する。いくつかの実施形態では、切断可能リンカーは、リンカー4のアミノ酸配列に対して3つのアミノ酸置換、付加、または欠失を有する。

【0026】

いくつかの実施形態では、アミノ酸置換、付加、または欠失は、本明細書に記載のいずれかのタンパク質のアミノ酸配列に対し少なくとも75%同一、例えば、77%、80%、82%、85%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%同一であるアミノ酸配列をもたらす。いくつかの実施形態では、アミノ酸置換は、保存的アミノ酸置換である。一般的なアミノ酸のうち、例えば、「保存的アミノ酸置換」は、(1)グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、およびイソロイシン、(2)フェニルアラニン、チロシン、およびトリプトファン、(3)セリンおよびトレオニン、(4)アスパルテートおよびグルタメート、(5)グルタミンおよびアスパラギン、ならびに(6)リシン、アルギニン、およびヒスチジンのそれぞれの中のアミノ酸間での置換により例示される。

【0027】

いくつかの実施形態では、切断可能リンカーは、修飾アミノ酸もしくは非天然アミノ酸、または修飾非天然アミノ酸、あるいはそれらの組合せを含む。いくつかの実施形態では、修飾アミノ酸または修飾非天然アミノ酸は、翻訳後修飾を含む。いくつかの実施形態では、切断可能リンカーは、アセチル化、アクリル化、ADP-リボシル化、アミド化、フラビンの共有結合、ヘム部分の共有結合、ヌクレオチドもしくはヌクレオチド誘導体の共有結合、脂質もしくは脂質誘導体の共有結合、ホスファチジルイノシトールの共有結合、架橋、環化、ジスルフィド結合形成、脱メチル化、共有結合架橋の形成、シスチンの形成、ピログルタメートの形成、ホルミル化、ガンマカルボシル化、グリコシル化、GPIアンカー形成、ヒドロキシル化、ヨウ素化、メチル化、ミリストイル化、酸化、タンパク質分解処理、リン酸化、プレニル化、ラセミ化、セレノイル化、硫酸化、アルギニル化などタンパク質へのアミノ酸の転移RNA媒介型付加、ユビキチン化を含むが、これらに限定されない修飾を含む。修飾は、ペプチド骨格を含む切断可能なリンカーまたはアミノ酸側鎖に対してあらゆる場所で行われる。

【0028】

いくつかの実施形態では、切断可能リンカーは、プロテアーゼにより切断可能である。いくつかの実施形態では、プロテアーゼは、健康な組織、または疾患状態の微小環境でない微小環境でのレベルと比較して、疾患状態の微小環境において高レベルで存在する。いくつかの実施形態では、プロテアーゼは腫瘍特異的プロテアーゼを含む。いくつかの実施形態では、プロテアーゼは、マトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)またはセリンプロテアーゼを含む。いくつかの実施形態では、マトリックスメタロプロテアーゼは、MMP2、MMP7、MMP9、MMP13、またはMMP14を含む。いくつかの実施形態では、または、メタロプロテアーゼは、MMP2、MMP7、MMP9、MMP13、およびMMP14からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、マトリックスメタロプロテアーゼはMMP2を含む。いくつかの実施形態では、マトリックスメタロプロテアーゼはMMP7を含む。いくつかの実施形態では、マトリックスメタロプロテアーゼはMMP9を含む。いくつかの実施形態では、マトリックスメタロプロテアーゼはMMP1

【 0 0 3 0 】

30

【 0 0 3 1 】

40

【 0 0 3 2 】

【 0 0 3 3 】

50

ペプチドと比較して、*in vitro*での腫瘍細胞死滅が向上しているか同等である。

【0034】

いくつかの実施形態では、切断可能リンカーを含む単離ポリペプチドは、同じアミノ酸配列のものではあるが配列番号2のアミノ酸配列による切断可能リンカーを含む単離ポリペプチドと比較して、カニクイザルにおける薬物動態パラメータが向上しているか同等である。

【0035】

いくつかの実施形態では、切断可能リンカーを含む単離ポリペプチドは、同じアミノ酸配列のものではあるが配列番号2のアミノ酸配列による切断可能リンカーを含む単離ポリペプチドと比較して、カニクイザルにおける肝毒性値が向上しているか同等である。

10

【0036】

いくつかの実施形態では、単離ポリペプチドは、標的抗原に結合する抗原結合性ドメインをさらに含む。いくつかの実施形態では、抗原結合性ドメインは、切断可能リンカーに対するC末端である。いくつかの実施形態では、単離ポリペプチドは、サイトカイン受容体に結合するサイトカインまたはサイトカインフラグメントをさらに含む。いくつかの実施形態では、サイトカインまたはサイトカインフラグメントは、切断可能リンカーに対するC末端である。

【0037】

いくつかの実施形態では、切断可能リンカーは、式I：



(式I)

20

による配置で、標的抗原に結合する抗原結合性ドメインに、またはサイトカイン受容体に結合するサイトカインにペプチドを接続させ、

式中、 A_1 は、標的抗原に結合する抗原結合性ドメイン、またはサイトカイン受容体に結合するサイトカインを含み、 L_1 は切断可能リンカーを含み、 P_1 は、標的抗原への抗原結合性ドメインの結合を損なわせるか、またはサイトカイン受容体へのサイトカインの結合を損なわせるペプチドを含む。いくつかの実施形態では、 P_1 は、N末端で切断可能リンカーに接続され、 A_1 は、C末端で切断可能リンカーに接続される。いくつかの実施形態では、 P_1 は、C末端で切断可能リンカーに接続され、 A_1 は、N末端で切断可能リンカーに接続される。

30

【0038】

いくつかの実施形態では、単離ポリペプチドは、第2の抗原結合性ドメインまたは第2のサイトカインを含む第2の単離ポリペプチドと複合体を形成する。いくつかの実施形態では、第2の単離ポリペプチドは、式II：



(式II)

による配置にあり、

式中、 A_2 は、第2の抗原結合性ドメインまたは第2のサイトカインを含み、 L_2 は第2の切断可能リンカーを含み、 P_2 は、第2の標的抗原への第2の抗原結合性ドメインの結合を損なわせるか、または第2のサイトカイン受容体への第2のサイトカインの結合を損なわせる第2のペプチドを含む。

40

【0039】

いくつかの実施形態では、 P_2 は、N末端で第2の切断可能リンカーに接続され、 A_2 は、C末端で第2の切断可能リンカーに接続される。いくつかの実施形態では、 P_2 は、C末端で第2の切断可能リンカーに接続され、 A_2 は、N末端で第2の切断可能リンカーに接続される。

【0040】

いくつかの実施形態では、第2の切断可能リンカーは、配列番号1のアミノ酸配列(LSGRSDAG)を含む。いくつかの実施形態では、第2の切断可能リンカーは、配列番号3のアミノ酸配列(ISSGLLSGRSDAG)を含む。いくつかの実施形態では、

50

第2の切断可能リンカーは、配列番号26のアミノ酸配列（A G L L A P P G G L S G R S D A G）を含む。いくつかの実施形態では、第2の切断可能リンカーは、配列番号4のアミノ酸配列（A A G L L A P P G G L S G R S D A G）を含む。いくつかの実施形態では、第2の切断可能リンカーは、配列番号5のアミノ酸配列（S P L G L S G R S D A G）を含む。いくつかの実施形態では、第2の切断可能リンカーは、配列番号6のアミノ酸配列（L S G R S D A G S P L G L A G）を含む。

【0041】

いくつかの実施形態では、 L_1 または L_2 は、長さが少なくとも8のアミノ酸である。いくつかの実施形態では、 L_1 または L_2 は、長さが少なくとも10のアミノ酸であるが、長さが50以下のアミノ酸である。いくつかの実施形態では、 L_1 または L_2 は、長さが少なくとも10のアミノ酸であるが、長さが30以下のアミノ酸である。いくつかの実施形態では、 L_1 または L_2 は、長さが少なくとも18のアミノ酸である。いくつかの実施形態では、 L_1 または L_2 は、長さが少なくとも26のアミノ酸である。いくつかの実施形態では、 L_1 または L_2 は、長さが少なくとも30のアミノ酸である。いくつかの実施形態では、 L_1 または L_2 は、長さが少なくとも40のアミノ酸である。いくつかの実施形態では、 L_1 または L_2 は、長さが少なくとも50のアミノ酸である。

【0042】

ペプチド（ P_1 または P_2 ）

いくつかの実施形態では、 P_1 は、標的抗原への抗原結合性ドメインの結合を損なわせるペプチドを含む。いくつかの実施形態では、 P_1 は、サイトカイン受容体へのサイトカインの結合を損なわせるペプチドを含む。いくつかの実施形態では、 P_1 は、イオン相互作用、静電相互作用、疎水性相互作用、 π -スタッキング相互作用、およびH結合相互作用、またはそれらの組合せを介して A_1 に結合される。いくつかの実施形態では、 P_1 は、サイトカイン受容体結合部位またはその付近で A_1 に結合される。いくつかの実施形態では、 P_1 は、抗原結合部位またはその付近で A_1 に結合される。いくつかの実施形態では、 P_1 は、 L_1 がプロテアーゼにより切断されて P_1 を標的抗原またはサイトカイン受容体に曝露すると、 A_1 と結合を解除されるようになる。いくつかの実施形態では、プロテアーゼは腫瘍特異的プロテアーゼを含む。いくつかの実施形態では、プロテアーゼは、マトリックスメタロプロテアーゼ（MMP）またはセリンプロテアーゼを含む。いくつかの実施形態では、マトリックスメタロプロテアーゼは、MMP2、MMP7、MMP9、MMP13、またはMMP14を含む。いくつかの実施形態では、セリンプロテアーゼは、マトリプターゼ、ウロキナーゼ、またはヘブシンを含む。いくつかの実施形態では、 P_1 は、非立体的遮断（non-steric blocking）により標的抗原またはサイトカイン受容体への A_1 の結合を損なわせる。いくつかの実施形態では、 P_1 は、共有結合相互作用により標的抗原またはサイトカイン受容体への A_1 の結合を損なわせる。いくつかの実施形態では、 P_1 は、サイトカイン、サイトカイン結合性フラグメント、サイトカイン突然変異タンパク質、またはそれらのサイトカインの同族受容体の組合せではない。いくつかの実施形態では、 A_1 は、サイトカイン受容体に結合する抗体またはそのフラグメントではない。

【0043】

いくつかの実施形態では、 P_2 は、第2の標的抗原への第2の抗原結合性ドメインの結合を損なわせるペプチドを含む。いくつかの実施形態では、 P_2 は、第2のサイトカイン受容体への第2のサイトカインの結合を損なわせるペプチドを含む。いくつかの実施形態では、 P_2 は、イオン相互作用、静電相互作用、疎水性相互作用、 π -スタッキング相互作用、およびH結合相互作用、またはそれらの組合せを介して A_2 に結合される。いくつかの実施形態では、 P_2 は、サイトカイン受容体結合部位またはその付近で A_2 に結合される。いくつかの実施形態では、 P_2 は、抗原結合部位またはその付近で A_2 に結合される。いくつかの実施形態では、 P_2 は、 L_2 がプロテアーゼにより切断されて P_2 を標的抗原またはサイトカイン受容体に曝露すると、 A_2 と結合を解除されるようになる。いくつかの実施形態では、プロテアーゼは腫瘍特異的プロテアーゼを含む。いくつかの実施形

態では、プロテアーゼは、マトリックスメタロプロテアーゼ（MMP）またはセリンプロテアーゼを含む。いくつかの実施形態では、マトリックスメタロプロテアーゼは、MMP 2、MMP 7、MMP 9、MMP 13、またはMMP 14を含む。いくつかの実施形態では、セリンプロテアーゼは、マトリプターゼ、ウロキナーゼ、またはヘプシンを含む。いくつかの実施形態では、P₂は、非立体的遮断により標的抗原またはサイトカイン受容体へのA₂の結合を損なわせる。いくつかの実施形態では、P₂は、共有結合相互作用により標的抗原またはサイトカイン受容体へのA₂の結合を損なわせる。いくつかの実施形態では、P₂は、サイトカイン、サイトカイン結合性フラグメント、サイトカイン突然変異タンパク質、またはそれらのサイトカインの同族受容体の組合せではない。いくつかの実施形態では、A₂は、サイトカイン受容体に結合する抗体またはそのフラグメントではない。

10

【0044】

いくつかの実施形態では、P₁は、標的抗原に対し70%未満の配列相同性を有する。いくつかの実施形態では、P₁は、標的抗原に対し75%未満の配列相同性を有する。いくつかの実施形態では、P₁は、標的抗原に対し80%未満の配列相同性を有する。いくつかの実施形態では、P₁は、標的抗原に対し85%未満の配列相同性を有する。いくつかの実施形態では、P₁は、標的抗原に対し90%未満の配列相同性を有する。いくつかの実施形態では、P₁は、標的抗原に対し95%未満の配列相同性を有する。いくつかの実施形態では、P₁は、標的抗原に対し98%未満の配列相同性を有する。いくつかの実施形態では、P₁は、標的抗原に対し99%未満の配列相同性を有する。

20

【0045】

いくつかの実施形態では、P₁は、サイトカイン受容体に対し70%未満の配列相同性を有する。いくつかの実施形態では、P₁は、サイトカイン受容体に対し75%未満の配列相同性を有する。いくつかの実施形態では、P₁は、サイトカイン受容体に対し80%未満の配列相同性を有する。いくつかの実施形態では、P₁は、サイトカイン受容体に対し85%未満の配列相同性を有する。いくつかの実施形態では、P₁は、サイトカイン受容体に対し90%未満の配列相同性を有する。いくつかの実施形態では、P₁は、サイトカイン受容体に対し95%未満の配列相同性を有する。いくつかの実施形態では、P₁は、サイトカイン受容体に対し98%未満の配列相同性を有する。いくつかの実施形態では、P₁は、サイトカイン受容体に対し99%未満の配列相同性を有する。

30

【0046】

いくつかの実施形態では、P₂は、第2の標的抗原に対し70%未満の配列相同性を有する。いくつかの実施形態では、P₂は、第2の標的抗原に対し75%未満の配列相同性を有する。いくつかの実施形態では、P₂は、第2の標的抗原に対し80%未満の配列相同性を有する。いくつかの実施形態では、P₂は、第2の標的抗原に対し85%未満の配列相同性を有する。いくつかの実施形態では、P₂は、第2の標的抗原に対し90%未満の配列相同性を有する。いくつかの実施形態では、P₂は、第2の標的抗原に対し95%未満の配列相同性を有する。いくつかの実施形態では、P₂は、第2の標的抗原に対し98%未満の配列相同性を有する。いくつかの実施形態では、P₂は、第2の標的抗原に対し99%未満の配列相同性を有する。

40

【0047】

いくつかの実施形態では、P₂は、第2のサイトカイン受容体に対し70%未満の配列相同性を有する。いくつかの実施形態では、P₂は、第2のサイトカイン受容体に対し75%未満の配列相同性を有する。いくつかの実施形態では、P₂は、第2のサイトカイン受容体に対し80%未満の配列相同性を有する。いくつかの実施形態では、P₂は、第2のサイトカイン受容体に対し85%未満の配列相同性を有する。いくつかの実施形態では、P₂は、第2のサイトカイン受容体に対し90%未満の配列相同性を有する。いくつかの実施形態では、P₂は、第2のサイトカイン受容体に対し95%未満の配列相同性を有する。いくつかの実施形態では、P₂は、第2のサイトカイン受容体に対し98%未満の配列相同性を有する。いくつかの実施形態では、P₂は、第2のサイトカイン受容体に対し

50

し 99%未満の配列相同性を有する。

【0048】

いくつかの実施形態では、P₁またはP₂は、サイトカイン、サイトカイン受容体、またはサイトカインもしくはサイトカイン受容体に結合する抗体もしくはそのフラグメントに対し50%未満の配列相同性を共有するデノボアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、P₁またはP₂は、サイトカイン、サイトカイン受容体、またはサイトカインもしくはサイトカイン受容体に結合する抗体もしくはそのフラグメントに対し40%未満の配列相同性を共有するデノボアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、P₁またはP₂は、サイトカイン、サイトカイン受容体、またはサイトカインもしくはサイトカイン受容体に結合する抗体もしくはそのフラグメントに対し30%未満の配列相同性を共有するデノボアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、P₁またはP₂は、サイトカイン、サイトカイン受容体、またはサイトカインもしくはサイトカイン受容体に結合する抗体もしくはそのフラグメントに対し20%未満の配列相同性を共有するデノボアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、P₁またはP₂は、サイトカイン、サイトカイン受容体、またはサイトカインもしくはサイトカイン受容体に結合する抗体もしくはそのフラグメントに対し10%未満の配列相同性を共有するデノボアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、P₁またはP₂は、ランダムアミノ酸配列を含有するペプチドライブラリから同定される。

10

【0049】

いくつかの実施形態では、P₁またはP₂は、標的抗原に対し50%未満の配列相同性を共有するデノボアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、P₁またはP₂は、標的抗原に対し40%未満の配列相同性を共有するデノボアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、P₁またはP₂は、標的抗原に対し30%未満の配列相同性を共有するデノボアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、P₁またはP₂は、標的抗原に対し20%未満の配列相同性を共有するデノボアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、P₁またはP₂は、標的抗原に対し10%未満の配列相同性を共有するデノボアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、P₁またはP₂は、ランダムアミノ酸配列を含有するペプチドライブラリから同定される。

20

【0050】

いくつかの実施形態では、P₁またはP₂は、長さが少なくとも5のアミノ酸のペプチド配列を含む。いくつかの実施形態では、P₁またはP₂は、長さが少なくとも6のアミノ酸のペプチド配列を含む。いくつかの実施形態では、P₁またはP₂は、長さが少なくとも10のアミノ酸のペプチド配列を含む。いくつかの実施形態では、P₁またはP₂は、長さが少なくとも10のアミノ酸および長さが20以下のアミノ酸のペプチド配列を含む。いくつかの実施形態では、P₁またはP₂は、長さが少なくとも16のアミノ酸のペプチド配列を含む。いくつかの実施形態では、P₁またはP₂は、長さが40以下のアミノ酸のペプチド配列を含む。いくつかの実施形態では、P₁またはP₂は、少なくとも2つのシステインアミノ酸残基を含む。いくつかの実施形態では、P₁またはP₂は、環状ペプチドまたは直鎖ペプチドを含む。いくつかの実施形態では、P₁またはP₂は、環状ペプチドを含む。いくつかの実施形態では、P₁またはP₂は、直鎖ペプチドを含む。

30

【0051】

いくつかの実施形態では、P₁またはP₂は、修飾アミノ酸もしくは非天然アミノ酸、または修飾非天然アミノ酸、あるいはそれらの組合せを含む。いくつかの実施形態では、修飾アミノ酸または修飾非天然アミノ酸は、翻訳後修飾を含む。いくつかの実施形態では、P₁またはP₂は、アセチル化、アクリル化、ADP-リボシル化、アミド化、フラビンの共有結合、ヘム部分の共有結合、ヌクレオチドもしくはヌクレオチド誘導体の共有結合、脂質もしくは脂質誘導体の共有結合、ホスファチジルイノシトールの共有結合、架橋、環化、ジスルフィド結合形成、脱メチル化、共有結合架橋の形成、シスチンの形成、ピログルタメートの形成、ホルミル化、ガンマカルボシル化、グリコシル化、GPIアンカー形成、ヒドロキシル化、ヨウ素化、メチル化、ミリストイル化、酸化、タンパク質分解

40

50

処理、リン酸化、プレニル化、ラセミ化、セレノイル化、硫酸化、アルギニル化などタンパク質へのアミノ酸の転移RNA媒介型付加、ユビキチン化を含むが、これらに限定されない修飾を含む。修飾は、ペプチド骨格、アミノ酸側鎖、および末端を含むP₁またはP₂に対してあらゆる場所で行われる。

【0052】

いくつかの実施形態では、P₁またはP₂は、アルブミンまたはアルブミンフラグメントを含まない。いくつかの実施形態では、P₁またはP₂は、アルブミン結合ドメインを含まない。

【0053】

A₁とA₂

いくつかの実施形態では、A₁またはA₂は、抗原認識分子である。いくつかの実施形態では、抗原認識分子は、抗体または抗体フラグメントである。いくつかの実施形態では、抗体またはその抗体フラグメントは、一本鎖可変フラグメント、単ドメイン抗体、Fab、Fab'を含む。いくつかの実施形態では、抗体またはその抗体フラグメントは、ラクダ科由来単ドメイン抗体の一本鎖可変フラグメント(scFv)、重鎖可変ドメイン(VHドメイン)、軽鎖可変ドメイン(VLドメイン)、または可変ドメイン(VHH)を含む。いくつかの実施形態では、抗体またはその抗体フラグメントは、一本鎖可変フラグメントを含む。いくつかの実施形態では、抗体またはその抗体フラグメントは、ヒト化またはヒトである。

【0054】

いくつかの実施形態では、A₁またはA₂は、Fabである。いくつかの実施形態では、Fabは、(a) Fab軽鎖ポリペプチドおよび(b) Fab重鎖ポリペプチドを含む。いくつかの実施形態では、L₁またはL₂は、Fab軽鎖ポリペプチドのN末端に結合される。いくつかの実施形態では、L₁またはL₂は、Fab重鎖ポリペプチドのN末端に結合される。いくつかの実施形態では、L₁またはL₂は、Fab軽鎖ポリペプチドのC末端に結合される。いくつかの実施形態では、L₁またはL₂は、Fab重鎖ポリペプチドのC末端に結合される。

【0055】

いくつかの実施形態では、A₁またはA₂は、一本鎖可変フラグメント(scFv)である。いくつかの実施形態では、L₁またはL₂は、scFvのN末端に結合される。いくつかの実施形態では、L₁またはL₂は、scFvのC末端に結合される。いくつかの実施形態では、scFvは、軽鎖可変ドメインおよび重鎖可変ドメインを含む。いくつかの実施形態では、L₁またはL₂は、一本鎖可変フラグメント(scFv)の軽鎖可変ドメインのN末端に結合される。いくつかの実施形態では、L₁またはL₂は、一本鎖可変フラグメント(scFv)の重鎖可変ドメインのN末端に結合される。

【0056】

いくつかの実施形態では、抗体またはその抗体フラグメントは、上皮成長因子受容体(EGFR)結合ドメインを含む。いくつかの実施形態では、抗体またはその抗体フラグメントは、分化クラスタ3(cluster of differentiation 3: CD3)結合ドメインを含む。いくつかの実施形態では、抗体またはその抗体フラグメントは、分化クラスタ3イプシロン(CD3ε)結合ドメインを含む。いくつかの実施形態では、標的抗原はEGFRを含む。いくつかの実施形態では、標的抗原はCD3を含む。いくつかの実施形態では、標的抗原はCD3εを含む。

【0057】

いくつかの実施形態では、A₁またはA₂は、エフェクター細胞上でTCR-CD3複合体の一部であるポリペプチドに結合する。いくつかの実施形態では、標的抗原は抗CD3エフェクター細胞抗原である。いくつかの実施形態では、TCR-CD3複合体の一部であるポリペプチドは、ヒトCD3εである。いくつかの実施形態では、A₁またはA₂は、抗CD3ε一本鎖可変フラグメントを含む。いくつかの実施形態では、A₁またはA₂は、CD3発現細胞上でのCD3に対する結合のK_Dが1 μM以下である抗CD3ε一本

10

20

30

40

50

鎖可変フラグメントを含む。いくつかの実施形態では、 A_1 または A_2 は、それぞれヒトCD3に特異的に結合可能である可変軽鎖および可変重鎖を含む。いくつかの実施形態では、 A_1 または A_2 は、ムロモナブ-CD3 (OKT3)、オテリキシズマブ (TRX4)、テプリズマブ (MGA031)、ビジリズマブ (Nuvion)、SP34、X35、VIT3、BMA030 (BW264/56)、CLB-T3/3、CRIS7、YTH12.5、F111-409、CLB-T3.4.2、TR-66、WT32、SPv-T3b、11D8、XIII-141、XIII-46、XIII-87、12F6、T3/RW2-8C8、T3/RW2-4B6、OKT3D、M-T301、SMC2、F101.01、UCHT-1、WT-31、15865、15865v12、15865v16、および15865v19からなる群から選択される相補性決定領域 (CDR) を含む。

10

【0058】

いくつかの実施形態では、 A_1 または A_2 は、可溶性T細胞受容体 (TCR) である。天然のTCRは、主要組織適合遺伝子複合体分子 (MHC) に結合される抗原を認識するT細胞の表面上に発現される膜貫通受容体である。天然のTCRはヘテロ二量体であり、ジスルフィド結合を介して連結される α ポリペプチド鎖および β ポリペプチド鎖を含む。 α ポリペプチド鎖と β ポリペプチド鎖は、例えば2個のCD3 ϵ ポリペプチド、1個のCD3 γ ポリペプチド、1個のCD3 δ ポリペプチド、および2個のCD3 ζ ポリペプチドを含む付属タンパク質との複合体の一部として発現される。TCRが標的抗原およびMHCと係合すると、T細胞は活性化され、関連する酵素、共受容体、アダプタ分子、および活性化または放出された転写因子が媒介する一連のシグナル伝達イベントが生じる。

20

【0059】

天然のTCRでは、 α ポリペプチド鎖および β ポリペプチド鎖は、細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン、および細胞質ドメインを含む。各細胞外ドメインは、可変領域 (V)、結合領域 (J)、および定常領域 (C) を含む。定常領域は膜貫通ドメインに対するN末端であり、膜貫通ドメインは細胞質ドメインに対するN末端である。 α ポリペプチド鎖と β ポリペプチド鎖両方の可変領域は、3つの超可変または相補性決定領域 (CDR) を含む。 β ポリペプチド鎖は、通常可変領域と結合領域との間に短い多様性領域を含有する。3つのCDRはフレームワーク配列に埋め込まれており、1つのCDRはCDR3という名の超可変領域である。 α 鎖可変領域 ($V\alpha$) および β 鎖可変領域 ($V\beta$) は、それらのフレームワーク配列、CDR1およびCDR2配列、ならびに部分的に定義されたCDR3配列により区別されるいくつかの種類の領域である。

30

【0060】

TCRは、International Immunogenetics (IMGT) のTCR命名法を用いて記述される。IMGT命名法で $V\alpha$ は、固有の「TRA V」番号により参照される。同様に、 $V\beta$ は固有の「TRBV」番号により参照される。対応する結合領域と定常領域は、 α 結合領域および定常領域ではそれぞれTRA JとTRACと称され、 β 結合領域および定常領域ではそれぞれTRB JとTRBCと称される。IMGT命名法により定義される配列は当該技術分野で公知であり、オンラインのIMGT公開データベース内にある。

40

【0061】

いくつかの実施形態では、可溶性TCRは、TCR α 細胞外ドメインまたはそのフラグメントの可変領域、およびTCR β 細胞外ドメインまたはそのフラグメントの可変領域を含む、一本鎖TCRである。いくつかの実施形態では、可溶性TCRは、TCR α 細胞外ドメインを含む α TCRポリペプチド、およびTCR β 細胞外ドメインを含む β TCRポリペプチドを含む。

【0062】

いくつかの実施形態では、可溶性TCRは、TCR α 細胞外ドメインまたはそのフラグメントの可変領域、およびTCR β 細胞外ドメインまたはそのフラグメントの可変領域を含む、一本鎖TCRである。いくつかの実施形態では、可溶性TCRは、TCR α 細胞外

50

10

20

30

40

50

20

30

50

では、ポリペプチドまたはポリペプチド複合体は、 L_1 または L_2 が切断されているポリペプチドまたはポリペプチド複合体の標的抗原または第2の標的抗原に対する結合親和性と比較して、標的抗原または第2の標的抗原に対する結合親和性が少なくとも50倍弱い。いくつかの実施形態では、ポリペプチドまたはポリペプチド複合体は、 L_1 または L_2 が切断されているポリペプチドまたはポリペプチド複合体の標的抗原または第2の標的抗原に対する結合親和性と比較して、標的抗原または第2の標的抗原に対する結合親和性が少なくとも60倍弱い。いくつかの実施形態では、ポリペプチドまたはポリペプチド複合体は、 L_1 または L_2 が切断されているポリペプチドまたはポリペプチド複合体の標的抗原または第2の標的抗原に対する結合親和性と比較して、標的抗原または第2の標的抗原に対する結合親和性が少なくとも70倍弱い。いくつかの実施形態では、ポリペプチドまたはポリペプチド複合体は、 L_1 または L_2 が切断されているポリペプチドまたはポリペプチド複合体の標的抗原または第2の標的抗原に対する結合親和性と比較して、標的抗原または第2の標的抗原に対する結合親和性が少なくとも75倍弱い。いくつかの実施形態では、ポリペプチドまたはポリペプチド複合体は、 L_1 または L_2 が切断されているポリペプチドまたはポリペプチド複合体の標的抗原または第2の標的抗原に対する結合親和性と比較して、標的抗原または第2の標的抗原に対する結合親和性が少なくとも80倍弱い。いくつかの実施形態では、ポリペプチドまたはポリペプチド複合体は、 L_1 または L_2 が切断されているポリペプチドまたはポリペプチド複合体の標的抗原または第2の標的抗原に対する結合親和性と比較して、標的抗原または第2の標的抗原に対する結合親和性が少なくとも90倍弱い。いくつかの実施形態では、ポリペプチドまたはポリペプチド複合体は、 L_1 または L_2 が切断されているポリペプチドまたはポリペプチド複合体の標的抗原または第2の標的抗原に対する結合親和性と比較して、標的抗原または第2の標的抗原に対する結合親和性が少なくとも100倍弱い。いくつかの実施形態では、ポリペプチドまたはポリペプチド複合体は、 L_1 または L_2 が切断されているポリペプチドまたはポリペプチド複合体の標的抗原または第2の標的抗原に対する結合親和性と比較して、標的抗原または第2の標的抗原に対する結合親和性が少なくとも120倍弱い。いくつかの実施形態では、 L_1 または L_2 は、プロテアーゼにより切断される。いくつかの実施形態では、プロテアーゼは腫瘍特異的プロテアーゼを含む。いくつかの実施形態では、プロテアーゼは、マトリックスメタロプロテアーゼ（MMP）またはセリンプロテアーゼを含む。いくつかの実施形態では、マトリックスメタロプロテアーゼは、MMP2、MMP7、MMP9、MMP13、またはMMP14を含む。いくつかの実施形態では、セリンプロテアーゼは、マトリブターゼ、ウロキナーゼ、またはヘプシンを含む。

【0065】

いくつかの実施形態では、 A_1 または A_2 は、サイトカインまたはサイトカインフラグメントである。いくつかの実施形態では、 A_1 または A_2 は、サイトカインまたはサイトカインフラグメントの突然変異タンパク質である。いくつかの実施形態では、サイトカインまたはサイトカインフラグメントは、サイトカインまたはサイトカインフラグメントの突然変異タンパク質である。

【0066】

サイトカインは、様々な生物学的経路での細胞間シグナル伝達に関与する、ケモカイン、インターフェロン、インターロイキン、リンホカイン、アディポカイン、間葉成長因子、腫瘍壊死因子を含む多様な小ペプチド群である。サイトカインは、免疫応答および炎症応答で特に重要である。シグナル伝達は、リガンド結合における細胞外ドメインとシグナル伝達を可能にする細胞内ドメインとを含む膜貫通受容体である、対応するサイトカイン受容体によるサイトカインの認識に続いて生じる。

【0067】

サイトカインの多様性はサイトカイン受容体の対応する多様性を伴い、一本鎖またはサブユニットまたは二量体／多量体ドメインを含むことができる。サイトカイン受容体として、インターロイキン受容体により例示されるI型サイトカイン受容体、およびインターフェロン受容体により例示されるII型サイトカイン受容体が挙げられ、ともにサイトカ

10

20

30

40

50

イン受容体相同ドメイン (CHD) を含む。I 型サイトカイン受容体の CHD は共通のアミノ酸モチーフ (WSXWS (配列番号 27)) を共有しているが、II 型サイトカイン受容体はこのモチーフを欠いている。サイトカイン受容体は、 α サブユニット、 β サブユニット、 γ サブユニット、またはそれらの二量体もしくは三量体の組合せを含むことができる。一例では、IL-2 に対する高親和性受容体は、IL-2 R α サブユニット、IL-2 R β サブユニット、および IL-2 R γ サブユニットを含み、IL-2 に対する中間親和性受容体は、IL-2 R β サブユニットおよび IL-2 R γ サブユニットのみを含み、IL-2 に対する低親和性受容体は、IL-2 R α サブユニットのみを含む。

【0068】

いくつかの実施形態では、サイトカインは、ケモカイン、インターフェロン、インターロイキン、リンホカイン、アディポカイン、成長因子、または腫瘍壊死因子である。いくつかの実施形態では、インターフェロン (IFN) は、IFN α 、IFN β 、IFN γ 、またはそれらのフラグメントである。いくつかの実施形態では、インターロイキン (IL) は、IL-2、IL-4、IL-6、IL-7、IL-10、IL-12、IL-15、IL-21、またはそれらのフラグメントである。いくつかの実施形態では、成長因子は、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF) またはそのフラグメントである。いくつかの実施形態では、サイトカインは TGF- β である。

【0069】

いくつかの実施形態では、サイトカイン突然変異タンパク質は、種々の野生型サイトカインである。いくつかの実施形態では、サイトカイン突然変異タンパク質は、野生型サイトカインの突然変異体である。いくつかの実施形態では、サイトカイン突然変異タンパク質は、野生型サイトカインと比べて 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、または 50 より多くのアミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態では、サイトカイン突然変異タンパク質は、野生型サイトカインと比べて多くとも 2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、または 50 より多くのアミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態では、サイトカイン突然変異タンパク質は、自然に生じないサイトカインである。いくつかの実施形態では、サイトカイン突然変異タンパク質は、自然に生じるサイトカインと比べて少なくとも 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、または 50 より多くのアミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態では、サイトカイン突然変異タンパク質は、自然に生じるサイトカインと比べて多くとも 2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、または 50 より多くのアミノ酸置換を含む。

【0070】

いくつかの実施形態では、サイトカインまたはサイトカインフラグメントは、サイトカイン受容体に結合する。いくつかの実施形態では、サイトカイン受容体は、ケモカイン、インターフェロン、インターロイキン、リンホカイン、アディポカイン、成長因子、または腫瘍壊死因子に対する受容体である。いくつかの実施形態では、サイトカイン受容体は、I 型サイトカイン受容体または II 型サイトカイン受容体である。いくつかの実施形態では、サイトカイン受容体は、二量体または三量体である。いくつかの実施形態では、サイトカイン受容体は、 α サブユニット、 β サブユニット、 γ サブユニット、またはそれらのあらゆる組合せを含む。例えば、いくつかの実施形態では、サイトカイン受容体は、 α サブユニット、 β サブユニット、および γ サブユニットを含む。別の例では、いくつかの実施形態では、サイトカイン受容体は、 β サブユニットおよび γ サブユニットを含む。いくつかの実施形態では、サイトカイン受容体は、 α サブユニットおよび β サブユニットを含む。

【0071】

いくつかの実施形態では、ポリペプチドまたはポリペプチド複合体は、 P_1 もしくは P_2 または L_1 もしくは L_2 を有していないポリペプチドまたはポリペプチド複合体のサイトカイン受容体に対する結合親和性と比較して、サイトカイン受容体に対する結合親和性が弱い。いくつかの実施形態では、ポリペプチドまたはポリペプチド複合体は、 P_1 もしく

10

20

30

40

50

50

ド複合体は、 P_1 もしくは P_2 または L_1 もしくは L_2 を有していないポリペプチドまたはポリペプチド複合体の一形態のサイトカイン受容体に対する結合親和性と比較して、サイトカイン受容体に対する結合親和性が少なくとも150倍弱い。いくつかの実施形態では、サイトカインまたはサイトカインフラグメントは、インターフェロン、GM-CSF、IL-2、IL-7、IL-12、IL-15、またはIL-21を含む。いくつかの実施形態では、サイトカインまたはサイトカインフラグメントは、IL-2、IL-12、IL-6、IL-4、IL-10、またはTGF- β を含む。いくつかの実施形態では、サイトカイン受容体は、インターフェロン受容体、GM-CSF受容体、IL-2受容体、IL-7受容体、IL-12受容体、IL-15受容体、またはIL-21受容体を含む。いくつかの実施形態では、サイトカイン受容体は、IL-2受容体、IL-12受容体、IL-6受容体、IL-4受容体、IL-10受容体、またはTGF- β 受容体を含む。

10

【0072】

いくつかの実施形態では、ポリペプチドまたはポリペプチド複合体は、 L_1 または L_2 が切断されているポリペプチドまたはポリペプチド複合体のサイトカイン受容体に対する結合親和性と比較して、サイトカイン受容体に対する結合親和性が弱い。いくつかの実施形態では、ポリペプチドまたはポリペプチド複合体は、 L_1 または L_2 が切断されているポリペプチドまたはポリペプチド複合体のサイトカイン受容体に対する結合親和性と比較して、サイトカイン受容体に対する結合親和性が少なくとも5倍弱い。いくつかの実施形態では、ポリペプチドまたはポリペプチド複合体は、 L_1 または L_2 が切断されているポリペプチドまたはポリペプチド複合体のサイトカイン受容体に対する結合親和性と比較して、サイトカイン受容体に対する結合親和性が少なくとも8倍弱い。いくつかの実施形態では、ポリペプチドまたはポリペプチド複合体は、 L_1 または L_2 が切断されているポリペプチドまたはポリペプチド複合体のサイトカイン受容体に対する結合親和性と比較して、サイトカイン受容体に対する結合親和性が少なくとも10倍弱い。いくつかの実施形態では、ポリペプチドまたはポリペプチド複合体は、 L_1 または L_2 が切断されているポリペプチドまたはポリペプチド複合体のサイトカイン受容体に対する結合親和性と比較して、サイトカイン受容体に対する結合親和性が少なくとも15倍弱い。いくつかの実施形態では、ポリペプチドまたはポリペプチド複合体は、 L_1 または L_2 が切断されているポリペプチドまたはポリペプチド複合体のサイトカイン受容体に対する結合親和性と比較して、サイトカイン受容体に対する結合親和性が少なくとも20倍弱い。いくつかの実施形態では、ポリペプチドまたはポリペプチド複合体は、 L_1 または L_2 が切断されているポリペプチドまたはポリペプチド複合体のサイトカイン受容体に対する結合親和性と比較して、サイトカイン受容体に対する結合親和性が少なくとも25倍弱い。いくつかの実施形態では、ポリペプチドまたはポリペプチド複合体は、 L_1 または L_2 が切断されているポリペプチドまたはポリペプチド複合体のサイトカイン受容体に対する結合親和性と比較して、サイトカイン受容体に対する結合親和性が少なくとも30倍弱い。いくつかの実施形態では、ポリペプチドまたはポリペプチド複合体は、 L_1 または L_2 が切断されているポリペプチドまたはポリペプチド複合体のサイトカイン受容体に対する結合親和性と比較して、サイトカイン受容体に対する結合親和性が少なくとも40倍弱い。いくつかの実施形態では、ポリペプチドまたはポリペプチド複合体は、 L_1 または L_2 が切断されているポリペプチドまたはポリペプチド複合体のサイトカイン受容体に対する結合親和性と比較して、サイトカイン受容体に対する結合親和性が少なくとも50倍弱い。いくつかの実施形態では、ポリペプチドまたはポリペプチド複合体は、 L_1 または L_2 が切断されているポリペプチドまたはポリペプチド複合体のサイトカイン受容体に対する結合親和性と比較して、サイトカイン受容体に対する結合親和性が少なくとも60倍弱い。いくつかの実施形態では、ポリペプチドまたはポリペプチド複合体は、 L_1 または L_2 が切断されているポリペプチドまたはポリペプチド複合体のサイトカイン受容体に対する結合親和性と比較して、サイトカイン受容体に対する結合親和性が少なくとも70倍弱い。いくつかの実施形態では、ポリペプチドまたはポリペプチド複合体は、 L_1 または L_2 が切断されているポリ

20

30

40

50

ペプチドまたはポリペプチド複合体のサイトカイン受容体に対する結合親和性と比較して、サイトカイン受容体に対する結合親和性が少なくとも75倍弱い。いくつかの実施形態では、ポリペプチドまたはポリペプチド複合体は、 L_1 または L_2 が切断されているポリペプチドまたはポリペプチド複合体のサイトカイン受容体に対する結合親和性と比較して、サイトカイン受容体に対する結合親和性が少なくとも80倍弱い。いくつかの実施形態では、ポリペプチドまたはポリペプチド複合体は、 L_1 または L_2 が切断されているポリペプチドまたはポリペプチド複合体のサイトカイン受容体に対する結合親和性と比較して、サイトカイン受容体に対する結合親和性が少なくとも90倍弱い。いくつかの実施形態では、ポリペプチドまたはポリペプチド複合体は、 L_1 または L_2 が切断されているポリペプチドまたはポリペプチド複合体のサイトカイン受容体に対する結合親和性と比較して、サイトカイン受容体に対する結合親和性が少なくとも100倍弱い。いくつかの実施形態では、サイトカインまたはサイトカインフラグメントは、インターフェロン、GM-CSF、IL-2、IL-7、IL-12、IL-15、またはIL-21を含む。いくつかの実施形態では、サイトカイン受容体は、インターフェロン受容体、GM-CSF受容体、IL-2受容体、IL-7受容体、IL-12受容体、IL-15受容体、またはIL-21受容体を含む。いくつかの実施形態では、 L_1 または L_2 は、プロテアーゼにより切断される。いくつかの実施形態では、プロテアーゼは腫瘍特異的プロテアーゼを含む。いくつかの実施形態では、プロテアーゼは、マトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)またはセリンプロテアーゼを含む。いくつかの実施形態では、マトリックスメタロプロテアーゼは、MMP2、MMP7、MMP9、MMP13、またはMMP14を含む。いくつかの実施形態では、セリンプロテアーゼは、マトリプターゼ、ウロキナーゼ、またはヘプシンを含む。

【0073】

半減期延長部分

いくつかの実施形態では、 P_1 は半減期延長部分にさらに連結される。いくつかの実施形態では、 P_1 は、式Ia:



(式Ia)

による配置で半減期延長部分に連結され、

式中、 H_1 は半減期延長部分であり、 L_3 は H_1 を P_1 に接続するリンカーである。いくつかの実施形態では、 L_3 は切断不能リンカーである。いくつかの実施形態では、半減期延長部分(H_1)は、 A_1 が標的抗原に結合するのを防止しない。いくつかの実施形態では、半減期延長部分(H_1)は、 A_1 に対する結合親和性を有していない。いくつかの実施形態では、半減期延長部分(H_1)は、標的抗原に対する結合親和性を有していない。いくつかの実施形態では、半減期延長部分(H_1)は、 A_1 を標的抗原から保護しない。いくつかの実施形態では、半減期延長部分(H_1)は、 A_1 に直接連結しない。

【0074】

いくつかの実施形態では、半減期延長部分(H_1)は、 A_1 がサイトカイン受容体に結合するのを防止しない。いくつかの実施形態では、半減期延長部分(H_1)は、サイトカインまたはサイトカイン受容体に対する結合親和性を有していない。いくつかの実施形態では、半減期延長部分(H_1)は、サイトカインまたはサイトカインフラグメントをサイトカイン受容体から保護しない。いくつかの実施形態では、半減期延長部分(H_1)は、サイトカインまたはサイトカインフラグメントに直接連結しない。

【0075】

いくつかの実施形態では、 H_1 は、反復配列モチーフを有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態では、 H_1 は、高秩序二次構造を有するアミノ酸配列を含む。「高度秩序二次構造」とは、本文脈で使用する時、 H_1 のアミノ酸残基の少なくとも約50%、約70%、約80%、または約90%が、分光測色法(例えば、「far-UV」スペクトル領域(190~250nm)での円偏光二色分光法、ならびにChou-FasmanアルゴリズムやGarnier-Osguthorpe-Robson(「GOR」

) アルゴリズムなどのコンピュータプログラムまたはアルゴリズムによる) を含むがこれに限定されない手段で測定したときに二次構造に寄与することを意味する。

【0076】

いくつかの実施形態では、 H_1 はポリマーを含む。いくつかの実施形態では、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、 H_1 はアルブミンを含む。いくつかの実施形態では、 H_1 は Fc ドメインを含む。いくつかの実施形態では、アルブミンは血清アルブミンである。いくつかの実施形態では、アルブミンはヒト血清アルブミンである。いくつかの実施形態では、 H_1 は、ポリペプチド、リガンド、または小分子を含む。いくつかの実施形態では、ポリペプチド、リガンド、または小分子は、血清タンパク質もしくはそのフラグメント、循環免疫グロブリンもしくはそのフラグメント、または CD35 / CR1 に結合する。いくつかの実施形態では、血清タンパク質は、チロキシン結合タンパク質、トランスサイレチン、1-酸糖タンパク質、トランスフェリン、トランスフェリン受容体もしくはそのトランスフェリン結合部分、フィブリノゲン、またはアルブミンを含む。いくつかの実施形態では、循環免疫グロブリン分子は、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、sIgA、IgM、またはIgDを含む。いくつかの実施形態では、血清タンパク質はアルブミンである。いくつかの実施形態では、ポリペプチドは抗体である。いくつかの実施形態では、抗体は、単ドメイン抗体、一本鎖可変フラグメント、または Fab を含む。いくつかの実施形態では、抗体は単ドメイン抗体を含む。いくつかの実施形態では、抗体は、アルブミンに結合する単ドメイン抗体を含む。いくつかの実施形態では、抗体は、ヒト血清アルブミンに結合する単ドメイン抗体を含む。いくつかの実施形態では、抗体は、ヒト抗体またはヒト化抗体である。いくつかの実施形態では、単ドメイン抗体は、645gH1gL1、645ds gH5gL4、23-13-A01-sc02、A10m3、またはそれらのフラグメント、DOM7r-31、DOM7h-11-15、Alb-1、Alb-8、Alb-23、10G、10GE、およびSA21からなる群から選択される。

【0077】

いくつかの実施形態では、 H_1 は単ドメイン抗体を含む。いくつかの実施形態では、 H_1 は、アルブミンに結合する単ドメイン抗体を含む。いくつかの実施形態では、 H_1 は、ヒト血清アルブミンに結合する単ドメイン抗体を含む。

【0078】

いくつかの実施形態では、 H_1 は、修飾アミノ酸もしくは非天然アミノ酸、または修飾非天然アミノ酸、あるいはそれらの組合せを含む。いくつかの実施形態では、修飾アミノ酸または修飾非天然アミノ酸は、翻訳後修飾を含む。いくつかの実施形態では、 H_1 は、アセチル化、アクリル化、ADP-リボシル化、アミド化、フラビンの共有結合、ヘム部分の共有結合、ヌクレオチドもしくはヌクレオチド誘導体の共有結合、脂質もしくは脂質誘導体の共有結合、ホスファチジルイノシトールの共有結合、架橋、環化、ジスルフィド結合形成、脱メチル化、共有結合架橋の形成、シスチンの形成、ピログルタメートの形成、ホルミル化、ガンマカルボシル化、グリコシル化、GPIアンカー形成、ヒドロキシル化、ヨウ素化、メチル化、ミリストイル化、酸化、タンパク質分解処理、リン酸化、プレニル化、ラセミ化、セレノイル化、硫酸化、アルギニル化などタンパク質へのアミノ酸の転移RNA媒介型付加、ユビキチン化を含むが、これらに限定されない修飾を含む。修飾は、ペプチド骨格、アミノ酸側鎖、および末端を含む H_1 に対してあらゆる場所で行われる。

【0079】

ポリペプチドまたはポリペプチド複合体をコードするポリヌクレオチド

本明細書中のいくつかの実施形態では、本明細書に開示されるポリペプチドまたはポリペプチド複合体をコードする、単離された組換え核酸分子が開示される。本明細書中のいくつかの実施形態では、切断可能リンカーを含むポリペプチドをコードする単離された組換え核酸分子が開示される。

【0080】

本明細書中のいくつかの実施形態では、配列番号1のアミノ酸配列（LSGRSDAG）による切断可能リンカーを含むポリペプチドをコードする、単離された組換え核酸分子が開示される。

【0081】

いくつかの実施形態では、切断可能リンカーは、配列番号3のアミノ酸配列（ISSGLLSGRSDAG）を含む。いくつかの実施形態では、切断可能リンカーは、配列番号26のアミノ酸配列（AGLLAPPGLSGRSDAG）を含む。いくつかの実施形態では、切断可能リンカーは、配列番号4のアミノ酸配列（AAGLLAPPGLSGRSDAG）を含む。いくつかの実施形態では、切断可能リンカーは、配列番号5のアミノ酸配列（SPLGLSGRSDAG）を含む。いくつかの実施形態では、切断可能リンカーは、配列番号6のアミノ酸配列（LSGRSDAGSPLGLAG）を含む。

10

【0082】

本明細書中のいくつかの実施形態では、リンカー1（ISSGLLSGRSDAG）（配列番号3）、リンカー2（AAGLLAPPGLSGRSDAG）（配列番号4）、リンカー3（SPLGLSGRSDAG）（配列番号5）、またはリンカー4（LSGRSDAGSPLGLAG）（配列番号6）のアミノ酸配列による切断可能リンカーを含む単離ポリペプチド、または、リンカー1、リンカー2、リンカー3、またはリンカー4のアミノ酸配列に対して1、2、または3つのアミノ酸置換、付加、もしくは欠失を有する切断可能リンカーを含む単離ポリペプチドをコードする、単離された組換え核酸分子が開示される。本明細書中のいくつかの実施形態では、リンカー1のアミノ酸配列（ISSGLLSGRSDAG）（配列番号3）による切断可能リンカーを含む単離ポリペプチドをコードする、単離された組換え核酸分子が開示される。本明細書中のいくつかの実施形態では、リンカー2のアミノ酸配列（AAGLLAPPGLSGRSDAG）（配列番号4）による切断可能リンカーを含む単離ポリペプチドをコードする、単離された組換え核酸分子が開示される。本明細書中のいくつかの実施形態では、リンカー3のアミノ酸配列（SPLGLSGRSDAG）（配列番号5）による切断可能リンカーを含む単離ポリペプチドをコードする、単離された組換え核酸分子が開示される。本明細書中のいくつかの実施形態では、リンカー4のアミノ酸配列（LSGRSDAGSPLGLAG）（配列番号6）による切断可能リンカーを含む単離ポリペプチドをコードする、単離された組換え核酸分子が開示される。本明細書中のいくつかの実施形態では、アミノ酸配列LSGRSDAG（配列番号1）による切断可能リンカーを含む単離ポリペプチドをコードする、単離された組換え核酸分子が開示される。

20

30

【0083】

本明細書中のいくつかの実施形態では、式I：

$$A_1-L_1-P_1$$

（式I）

によるポリペプチドまたはポリペプチド複合体をコードする、単離された組換え核酸分子が開示され、

式中、 A_1 は、標的抗原に結合する抗原結合性ドメイン、またはサイトカイン受容体に結合するサイトカインを含み、 L_1 は切断可能リンカーを含み、 P_1 は、標的抗原への抗原結合性ドメインの結合を損なわせるか、またはサイトカイン受容体へのサイトカインの結合を損なわせるペプチドを含む。本明細書中のいくつかの実施形態では、式I：

40

$$A_1-L_1-P_1$$

（式I）

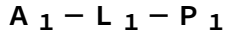
を含むポリペプチドまたはポリペプチド複合体をコードする、単離された組換え核酸分子が開示され、

【0084】

式中、 A_1 は、標的抗原に結合する抗原結合性ドメイン、またはサイトカイン受容体に結合するサイトカインを含み、 L_1 は切断可能リンカーを含み、 P_1 は、標的抗原への抗原結合性ドメインの結合を損なわせるか、またはサイトカイン受容体へのサイトカインの結

50

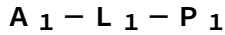
合を損なわせるペプチドを含む。本明細書中のいくつかの実施形態では、式 I :



(式 I)

によるポリペプチドまたはポリペプチド複合体をコードする、単離された組換え核酸分子が開示され、

式中、 A_1 は、標的抗原に結合する抗原結合性ドメイン、またはサイトカイン受容体に結合するサイトカインであり、 L_1 は切断可能リンカーであり、 P_1 は、標的抗原への抗原結合性ドメインの結合を損なわせるか、またはサイトカイン受容体へのサイトカインの結合を損なわせるペプチドである。本明細書中のいくつかの実施形態では、式 I :



(式 I)

を含むポリペプチドまたはポリペプチド複合体をコードする、単離された組換え核酸分子が開示され、

式中、 A_1 は、標的抗原に結合する抗原結合性ドメイン、またはサイトカイン受容体に結合するサイトカインであり、 L_1 は切断可能リンカーであり、 P_1 は、標的抗原への抗原結合性ドメインの結合を損なわせるか、またはサイトカイン受容体へのサイトカインの結合を損なわせるペプチドである。

【0085】

本明細書中のいくつかの実施形態では、ポリペプチドまたはポリペプチド複合体であって、単離ポリペプチドが、第2の抗原結合性ドメインまたは第2のサイトカインを含む第2の単離ポリペプチドと複合体を形成する、ポリペプチドまたはポリペプチド複合体が開示される。本明細書中のいくつかの実施形態では、式 II :



(式 II)

によるポリペプチドまたはポリペプチド複合体をコードする、単離された組換え核酸分子が開示され、

式中、 A_2 は、第2の抗原結合性ドメインまたは第2のサイトカインを含み、 L_2 は第2の切断可能リンカーを含み、 P_2 は、第2の標的抗原への第2の抗原結合性ドメインの結合を損なわせるか、または第2のサイトカイン受容体への第2のサイトカインの結合を損なわせる第2のペプチドを含む。本明細書中のいくつかの実施形態では、式 II :



(式 II)

を含むポリペプチドまたはポリペプチド複合体をコードする、単離された組換え核酸分子が開示され、

式中、 A_2 は、第2の抗原結合性ドメインまたは第2のサイトカインを含み、 L_2 は第2の切断可能リンカーを含み、 P_2 は、第2の標的抗原への第2の抗原結合性ドメインの結合を損なわせるか、または第2のサイトカイン受容体への第2のサイトカインの結合を損なわせる第2のペプチドを含む。本明細書中のいくつかの実施形態では、式 II :



(式 II)

によるポリペプチドまたはポリペプチド複合体をコードする、単離された組換え核酸分子が開示され、

式中、 A_2 は、第2の抗原結合性ドメインまたは第2のサイトカインであり、 L_2 は第2の切断可能リンカーであり、 P_2 は、第2の標的抗原への第2の抗原結合性ドメインの結合を損なわせるか、または第2のサイトカイン受容体への第2のサイトカインの結合を損なわせる第2のペプチドである。本明細書中のいくつかの実施形態では、式 II :



(式 II)

を含むポリペプチドまたはポリペプチド複合体をコードする、単離された組換え核酸分子が開示され、

10

20

30

40

50

式中、 A_2 は、第2の抗原結合性ドメインまたは第2のサイトカインであり、 L_2 は第2の切断可能リンカーであり、 P_2 は、第2の標的抗原への第2の抗原結合性ドメインの結合を損なわせるか、または第2のサイトカイン受容体への第2のサイトカインの結合を損なわせる第2のペプチドである。

【0086】

医薬組成物

本明細書中のいくつかの実施形態では、(a) 本明細書に開示されるポリペプチドまたはポリペプチド複合体と、(b) 薬学的に許容可能な賦形剤とを含む医薬組成物が開示される。

【0087】

いくつかの実施形態では、医薬組成物は、(a) 配列番号1のアミノ酸配列(LSGRSDAG)による切断可能リンカーを含むポリペプチドまたはポリペプチド複合体と、(b) 薬学的に許容可能な賦形剤とを含む。

【0088】

いくつかの実施形態では、医薬組成物は、(a) 配列番号3のアミノ酸配列(ISSGLLSGRSDAG)による切断可能リンカーを含むポリペプチドまたはポリペプチド複合体と、(b) 薬学的に許容可能な賦形剤とを含む。

【0089】

いくつかの実施形態では、医薬組成物は、(a) 配列番号26のアミノ酸配列(AGLLAPPGGLSGRSDAG)による切断可能リンカーを含むポリペプチドまたはポリペプチド複合体と、(b) 薬学的に許容可能な賦形剤とを含む。

【0090】

いくつかの実施形態では、医薬組成物は、(a) 配列番号4のアミノ酸配列(AAGLLAPPGGLSGRSDAG)による切断可能リンカーを含むポリペプチドまたはポリペプチド複合体と、(b) 薬学的に許容可能な賦形剤とを含む。

【0091】

いくつかの実施形態では、医薬組成物は、(a) 配列番号5のアミノ酸配列(SPLGLSGRSDAG)による切断可能リンカーを含むポリペプチドまたはポリペプチド複合体と、(b) 薬学的に許容可能な賦形剤とを含む。

【0092】

いくつかの実施形態では、医薬組成物は、(a) 配列番号6のアミノ酸配列(LSGRSDAGSPLGLAG)による切断可能リンカーを含むポリペプチドまたはポリペプチド複合体と、(b) 薬学的に許容可能な賦形剤とを含む。

【0093】

いくつかの実施形態では、医薬組成物は、(a) リンカー1(ISSGLLSGRSDAG)(配列番号3)、リンカー2(AAGLLAPPGGLSGRSDAG)(配列番号4)、リンカー3(SPLGLSGRSDAG)(配列番号5)、もしくはリンカー4(LSGRSDAGSPLGLAG)(配列番号6)のアミノ酸配列による切断可能リンカーを含むポリペプチドもしくはポリペプチド複合体、または、リンカー1、リンカー2、リンカー3、もしくはリンカー4のアミノ酸配列に対して1、2、もしくは3つのアミノ酸置換、付加、もしくは欠失を有する切断可能リンカーを含むポリペプチドもしくはポリペプチド複合体と、(b) 薬学的に許容可能な賦形剤とを含む。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、(a) リンカー1のアミノ酸配列(ISSGLLSGRSDAG)(配列番号3)による切断可能リンカーを含むポリペプチドまたはポリペプチド複合体と、(b) 薬学的に許容可能な賦形剤とを含む。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、(a) リンカー2のアミノ酸配列(AAGLLAPPGGLSGRSDAG)(配列番号4)による切断可能リンカーを含むポリペプチドまたはポリペプチド複合体と、(b) 薬学的に許容可能な賦形剤とを含む。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、(a) リンカー3のアミノ酸配列(SPLGLSGRSDAG)(配列番号5)による切断可能リンカーを含むポリペプチドまたはポリペプチド複合体と、(b) 薬学的に許容可能な賦形剤とを含む。

10

20

30

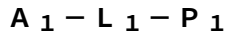
40

50

含む。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、(a) リンカー 4 のアミノ酸配列 (L S G R S D A G S P L G L A G) (配列番号 6) による切断可能リンカーを含むポリペプチドまたはポリペプチド複合体と、(b) 薬学的に許容可能な賦形剤とを含む。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、(a) アミノ酸配列 L S G R S D A G (配列番号 1) による切断可能リンカーを含むポリペプチドまたはポリペプチド複合体と、(b) 薬学的に許容可能な賦形剤とを含む。

【0094】

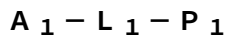
いくつかの実施形態では、医薬組成物は、(a) 式 I :



(式 I)

による単離ポリペプチドまたはポリペプチド複合体であって、

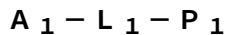
式中、 A_1 は、標的抗原に結合する抗原結合性ドメイン、またはサイトカイン受容体に結合するサイトカインを含み、 L_1 は切断可能リンカーを含み、 P_1 は、標的抗原への抗原結合性ドメインの結合を損なわせるか、またはサイトカイン受容体へのサイトカインの結合を損なわせるペプチドを含む、単離ポリペプチドまたはポリペプチド複合体と、(b) 薬学的に許容可能な賦形剤とを含む。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、(a) 式 I :



(式 I)

を含む単離ポリペプチドまたはポリペプチド複合体であって、

式中、 A_1 は、標的抗原に結合する抗原結合性ドメイン、またはサイトカイン受容体に結合するサイトカインを含み、 L_1 は切断可能リンカーを含み、 P_1 は、標的抗原への抗原結合性ドメインの結合を損なわせるか、またはサイトカイン受容体へのサイトカインの結合を損なわせるペプチドを含む、単離ポリペプチドまたはポリペプチド複合体と、(b) 薬学的に許容可能な賦形剤とを含む。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、(a) 式 I :



(式 I)

による単離ポリペプチドまたはポリペプチド複合体であって、

式中、 A_1 は、標的抗原に結合する抗原結合性ドメイン、またはサイトカイン受容体に結合するサイトカインであり、 L_1 は切断可能リンカーであり、 P_1 は、標的抗原への抗原結合性ドメインの結合を損なわせるか、またはサイトカイン受容体へのサイトカインの結合を損なわせるペプチドである、単離ポリペプチドまたはポリペプチド複合体と、(b) 薬学的に許容可能な賦形剤とを含む。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、(a) 式 I :



(式 I)

を含む単離ポリペプチドまたはポリペプチド複合体であって、

式中、 A_1 は、標的抗原に結合する抗原結合性ドメイン、またはサイトカイン受容体に結合するサイトカインであり、 L_1 は切断可能リンカーであり、 P_1 は、標的抗原への抗原結合性ドメインの結合を損なわせるか、またはサイトカイン受容体へのサイトカインの結合を損なわせるペプチドである、単離ポリペプチドまたはポリペプチド複合体と、(b) 薬学的に許容可能な賦形剤とを含む。

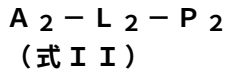
【0095】

本明細書中のいくつかの実施形態では、ポリペプチドまたはポリペプチド複合体であって、単離ポリペプチドが、第 2 の抗原結合性ドメインまたは第 2 のサイトカインを含む第 2 の単離ポリペプチドと複合体を形成する、ポリペプチドまたはポリペプチド複合体が開示される。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、(a) 式 II :

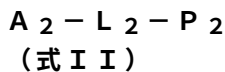


(式 II)

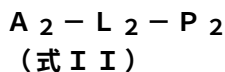
による単離ポリペプチドまたはポリペプチド複合体であって、
 式中、 A_2 は、第2の抗原結合性ドメインまたは第2のサイトカインを含み、 L_2 は第2の切断可能リンカーを含み、 P_2 は、第2の標的抗原への第2の抗原結合性ドメインの結合を損なわせるか、または第2のサイトカイン受容体への第2のサイトカインの結合を損なわせる第2のペプチドを含む、単離ポリペプチドまたはポリペプチド複合体と、(b)薬学的に許容可能な賦形剤とを含む。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、(a)式II:



を含む単離ポリペプチドまたはポリペプチド複合体であって、
 式中、 A_2 は、第2の抗原結合性ドメインまたは第2のサイトカインを含み、 L_2 は第2の切断可能リンカーを含み、 P_2 は、第2の標的抗原への第2の抗原結合性ドメインの結合を損なわせるか、または第2のサイトカイン受容体への第2のサイトカインの結合を損なわせる第2のペプチドを含む、単離ポリペプチドまたはポリペプチド複合体と、(b)薬学的に許容可能な賦形剤とを含む。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、(a)式II:



による単離ポリペプチドまたはポリペプチド複合体であって、
 式中、 A_2 は、第2の抗原結合性ドメインまたは第2のサイトカインであり、 L_2 は第2の切断可能リンカーであり、 P_2 は、第2の標的抗原への第2の抗原結合性ドメインの結合を損なわせるか、または第2のサイトカイン受容体への第2のサイトカインの結合を損なわせる第2のペプチドである、単離ポリペプチドまたはポリペプチド複合体と、(b)薬学的に許容可能な賦形剤とを含む。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、(a)式II:



を含む単離ポリペプチドまたはポリペプチド複合体であって、
 式中、 A_2 は、第2の抗原結合性ドメインまたは第2のサイトカインであり、 L_2 は第2の切断可能リンカーであり、 P_2 は、第2の標的抗原への第2の抗原結合性ドメインの結合を損なわせるか、または第2のサイトカイン受容体への第2のサイトカインの結合を損なわせる第2のペプチドである、単離ポリペプチドまたはポリペプチド複合体と、(b)薬学的に許容可能な賦形剤とを含む。

【0096】

いくつかの実施形態では、ポリペプチドまたはポリペプチド複合体は、検出可能ラベル、治療剤、または薬物動態修飾部分 (pharmacokinetic modifying moiety) をさらに含む。いくつかの実施形態では、検出可能ラベルは、蛍光ラベル、放射性ラベル、酵素、核酸プローブ、または造影剤を含む。

【0097】

対象への投与において、本明細書に開示されるポリペプチドまたはポリペプチド複合体は、1つまたは複数の薬学的に許容可能な担体または賦形剤と一体的に医薬組成物に入れて提供される場合もある。「薬学的に許容可能な担体」という用語には、成分の生体活性の有効性を妨げず投与対象である患者に対し有毒ではないいずれかの担体が含まれるが、これらに限定されない。好適な医薬担体の例は当該技術分野で周知であり、リン酸緩衝生理食塩水、水、油／水乳剤などの乳剤、種々の種類の湿潤剤、滅菌溶液などが挙げられる。このような担体は従来により製剤化可能であり、好適な用量で対象に投与できる。好ましくは、医薬組成物は無菌である。これらの組成物は、保存料、乳化剤、分散剤などの補助剤をさらに含有する場合もある。微生物作用の防止は、様々な抗菌剤および抗真菌剤を含めることにより確実となる場合もある。

【0098】

医薬組成物は、（所望の投与方法に応じて）いずれかの好適な形態にあってよい。医薬組成物は単位剤形で提供され、密封容器に入れて提供され、およびキットの一部として提供されてもよい。このようなキットには使用説明書が含まれる場合もある。上述の単位剤形が複数含まれる場合もある。

【0099】

医薬組成物は、非経口（例えば、皮下、筋肉内、または静脈内）経路を含むあらゆる適切な経路による投与に適合させられる場合もある。このような組成物は、薬学の分野で公知の方法により、例えば、滅菌条件下で有効成分を担体または賦形剤と混合することによって調製される場合がある。

【0100】

本開示の物質の投与量は、処置対象である疾患または障害、処置対象である個体の年齢や状態などに依存して広範囲間で変動する可能性があり、最終的には使用される適切な投与量を医師が決定することになる。

【0101】

表1では、本明細書に記載の構築物のアミノ酸配列を提供する。

【0102】

10

20

30

40

50

【表 1 - 1】

表 1. アミノ酸配列の概要

構築物 ID	構築物の記述	アミノ酸配列 (N から C)	配列番号
リンカー配列			
リンカー0	切断可能リンカー (対照)	ISSGLLSGRSDNH	2
リンカー1	切断可能リンカー	ISSGLLSGRSDAG	3
リンカー2	切断可能リンカー	AAGLLAPPGGLSGRSDAG	4
リンカー3	切断可能リンカー	SPLGLSGRSDAG	5
リンカー4	切断可能リンカー	LSGRSDAGSPLGLAG	6
リンカー5	切断可能リンカー	LSGRSDAG	1
リンカー6	切断可能リンカー	AGLLAPPGGLSGRSDAG	26
ペプチドマスク配列			
ペプチド 1	抗 EGFR ペプチド マスク	QQQSGQLSCEGWAMNREQCRA	7
ペプチド 2	抗 EGFR ペプチド マスク	GGPCRSHIDVAKPICV	8
ペプチド 3	抗 CD3 ペプチドマ スク	QQQSGQGYLWGCEWNCGGITT	9
ペプチド 4	抗 CD3 ペプチドマ スク	QQQSGSGYLWGCEWNCAGITT	10
半減期延長部分			
HE-1	10G 単ドメイン 抗体	EVQLVESGGGLVQPGNSLRSLCAASGFTFSKFGMSWVR QAPGKGLEWVSSISGSGRDITLYADSVKGRFTISRDNAKT TLYLQMNLSRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGTLVTVSS	11
完全長構築物			
PC-1	軽鎖配列: N-[ペプ チド 1]-[リンカー 0]-[抗 EGFR Fab 軽 鎖]-C (対照)	QQQSGQLSCEGWAMNREQCRAAGSSGGSGGSGGSGISSG LLSGRSDNHGSSGTDILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQ SIGTNIHWYQQRITNGSPRLLIKAYASESISGIPSRFSGSGSGT DFTLSINSVESEDIADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLELKR TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSSTLTLSKADY EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	12
PC-1	重鎖配列: N-[10G SDA]-[ペプチド 3]- [リンカー0]-[抗 CD3 scFv (軽鎖-重 鎖)]-[抗 EGFR Fab 重鎖]-C (対照)	EVQLVESGGGLVQPGNSLRSLCAASGFTFSKFGMSWVR QAPGKGLEWVSSISGSGRDITLYADSVKGRFTISRDNAKT TLYLQMNLSRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGTLVTVSSG GGSGGGSGQSGQGYLWGCEW NCGGITTGSSGGSGGSGGSGISSGLLSGRSDNHGSGSQTIVT QEPSTVSPGGTVTLTCSRSTGAVTTSNYANWVQKPGQ APRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLGGAALTLGSGVQPE DEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVLGGGSGGGSGG GGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGFTFNTYAM NWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTI SRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYV SWFAYWGQGLTVTVSSGGGGSGVQLKQSGPGLVQPSQS LSITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWLGVIWSSGGN TDYNTPTFTRLSINKDNSKSVFVKMNSLQSNDAIYYCA RALTYDYEFAYWGQGLTVTVSAASTKGPSVFPLAPSSK STSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD KKVEPKSCGGHHHHHHHGGGLNDIFEAQKIEWHE	13
PC-2	軽鎖配列: N-[ペプ チド 2]-[リンカー 1]-[抗 EGFR Fab 軽 鎖]-C	GGPCRSHIDVAKPICVGGGGSGGSISSGLLSGRSDAGGGG SDILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQR ITNGSPRLLIKAYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESE DIADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLELKRITVAAPSVFIFPPS DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ	14

【 0 1 0 3 】

10

20

30

40

50

【表 1 - 2】

		ESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC	
PC-2	重鎖配列: N-[10G SDA]-[ペプチド 4]- [リンカー1]-[抗 CD3 scFv (軽鎖-重 鎖)]-[抗 EGFR Fab 重鎖]-C	EVQLVESGGGLVQPGNSLRSLCAASGFTFSKFGMSWVR QAPGKGLEWVSSISGSGRDTLYADSVKGRFTISRDNACT TLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGTILTVSSG GGGSGGGSQGGSGQGYLWGCEWNCAGITGSSGSGGS GGISSGLSGRSDAGGGGSGTQVVTQEPSTLTVSPGGTIVLT CRSSTGAVTTSNYANWVQKPGQAPRGLIGGTNKRAFG TPARFSGSLGGKAALTLGSGVQPEDEAEYYCALWYSNL WVFGGGTKLTVLGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGG LVQPGGSLKLSAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEW VARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQM NNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTILV VSSGGGGSQVQLKQSGPGLVQPSQSLITCTVSGFSLTNY GVHWVRQSPGKGLEWLGVIWSSGGNTDYNTPFTSRLSIN KDNSKQVFFKMNLSQNDTAIYYCARALTYDYDEFA WGQGTILTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCAAA HHHHHHHHH	15
PC-3	軽鎖配列: N-[ペプ チド 2]-[リンカー 2]-[抗 EGFR Fab 軽 鎖]-C	GGPCRSHIDVAKPICVGGGGSSGGSAAAGLLAPPGGLSGRS DAGGGGSDILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIH WYQQRINGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLSIN SVESEDIAYYCQNNNNWPTTFGAGTKLELKRITVAAPSV FIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL QSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYA CEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	16
PC-3	重鎖配列: N-[10G SDA]-[ペプチド 4]- [linker リンカー 2]- [抗 CD3 scFv (軽鎖- 重鎖)]-[抗 EGFR Fab 重鎖]-C	EVQLVESGGGLVQPGNSLRSLCAASGFTFSKFGMSWVR QAPGKGLEWVSSISGSGRDTLYADSVKGRFTISRDNACT TLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGTILTVSSG GGGSGGGSQGGSGQGYLWGCEWNCAGITGSSGGSAA GLLAPPGGLSGRSDAGGGGSGTQVVTQEPSTLTVSPGGTIV LTCRSSTGAVTTSNYANWVQKPGQAPRGLIGGTNKRA PGTPARFSGSLGGKAALTLGSGVQPEDEAEYYCALWYSN LWVFGGGTKLTVLGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGG GLVQPGGSLKLSAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLE WVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQ MNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTILV TVSSGGGGSQVQLKQSGPGLVQPSQSLITCTVSGFSLTNY GVHWVRQSPGKGLEWLGVIWSSGGNTDYNTPFTSRLSIN KDNSKQVFFKMNLSQNDTAIYYCARALTYDYDEFA YWGQGTILTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCAA AHHHHHHHHH	17
PC-4	軽鎖配列: N-[ペプ チド 2]-[リンカー 3]-[抗 EGFR Fab 軽 鎖]-C	GGPCRSHIDVAKPICVGGGGSGGGGSLGLSGRSDAGGG GSDILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQR TNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESED IADYYCQNNNNWPTTFGAGTKLELKRITVAAPSVFIFPPS DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS QESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH QGLSSPVTKSFNRGEC	18
PC-4	重鎖配列: N-[10G SDA]-[ペプチド 4]- [リンカー3]-[抗 CD3 scFv (軽鎖-重 鎖)]-[抗 EGFR Fab 重鎖]-C	EVQLVESGGGLVQPGNSLRSLCAASGFTFSKFGMSWVR QAPGKGLEWVSSISGSGRDTLYADSVKGRFTISRDNACT TLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSVSSQGTILTVSSG GGGSGGGSQGGSGQGYLWGCEWNCAGITGSSGSGSG GSGGSLGLSGRSDAGGGGSGTQVVTQEPSTLTVSPGGTIV LTCRSSTGAVTTSNYANWVQKPGQAPRGLIGGTNKRA PGTPARFSGSLGGKAALTLGSGVQPEDEAEYYCALWYSN LWVFGGGTKLTVLGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGG GLVQPGGSLKLSAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLE	19

【 0 1 0 4 】

10

20

30

40

50

【表 1 - 3】

		WVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQ MNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTILV TVSSGGGGSQVQLKQSGPGLVQPSQSLITCTVSGFSLTN YGVHWVRQSPGKGLEWLGVIWSSGNTDYNTPFTSRLSI NKDNSKSQVFFKMNSLQSNDAIYYCARALTYDYEFAY YWGQGTILVTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDDKKEPKSCAA AHHHHHHHHH	
PC-5	軽鎖配列: N-[ペプチド 2]-[リンカー 4]-[抗 EGFR Fab 軽鎖]-C	GGPCRSIDVAKPICVGGGGSGGLSGRSDAGSPLGLAGS GGSDILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQ RTNGSPRLLIKAYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESE DIADYYCQNNNWPFTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPP SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS SQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNRGEC	20
PC-5	重鎖配列: N-[10G SDA]-[ペプチド 4]-[リンカー 4]-[抗 CD3 scFv (軽鎖-重鎖)]-[抗 EGFR Fab 重鎖]-C	EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSAASGFTFSKFGMSWVR QAPGKGLEWVSSISGSGRDTLYADSVKGRFTISRDNAKT TLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLVSSQGTILVTVSSG GGSGGGGSGGSGQGQYLWGCEWNCAGITGSSGGSGGL SGRSDAGSPLGLAGSGGGSQTVVTQEPSTLTVSPGGTVTL TCRSSTGAVTTSNYANWVQKPGQAPRGLIGGTNKRAP GTPARFSGSLLGGKAALTLGSGVQPEDEAEYYCALWYSNL WVFGGKTKLTVLGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGG LVQPGGSLKLSAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEW VARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQM NMLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTILV TVSSGGGGSQVQLKQSGPGLVQPSQSLITCTVSGFSLTN YGVHWVRQSPGKGLEWLGVIWSSGNTDYNTPFTSRLSI NKDNSKSQVFFKMNSLQSNDAIYYCARALTYDYEFAY YWGQGTILVTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDDKKEPKSCAA HHHHHHHHH	21
PC-6	N-[抗 EGFR Fab 重鎖]-C	QILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRTN GSPRLLIKAYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVEEDIA DYCQNNNWPFTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDE QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE SVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNRGEC	22
PC-6	N-[抗 CD3 scFv (軽鎖-重鎖)]-[抗 EGFR Fab 重鎖]-C	QTVVTQEPSTLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQ QKPGQAPRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTL GVQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGKTKLTVLGGGSG GGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGFTFN TYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVK DRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFG NSYVSWFAYWGQGTILVTVSSGGGGSQVQLKQSGPGLV QPSQSLITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWLGVI WSSGNTDYNTPFTSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSQDT AIYYCARALTYDYEFAYWGQGTILVTVSAASTKGPSVF PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDDKKEPKSCGGHHHHHHHHHGGGLNDIFEAQKI EWHE	23
PC-7	N-[抗 EGFR Fab 重鎖]-C	DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRTN GSPRLLIKAYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVEEDIA DYCQNNNWPFTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDE QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE SVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNRGEC	24

【 0 1 0 5 】

10

20

30

40

50

【表 1 - 4】

PC-7	N-[抗 CD3 scFv (軽鎖-重鎖)]-[抗 EGFR Fab 重鎖]-C	QTVVTQEPSTLVSPGGTVILTCRSSTGAVTTSNYANWVQ QKPGQAPRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLS GVQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVLGGGGSG GGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGFTFN TYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVK DRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFG NSYVSWFAYWGQGLTVTVSSGGGGSQVQLKQSGPGLV QPSQSLITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWLGVI WSGGNTDYNTPFTSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSDNT AIYYCARALTYDYEFAYWGQGLTVTVSAASTKGPSVF PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKKVEPKSCGGHHHHHHHHGGGLNDIFEAQKI EWHE	25
------	--	--	----

10

【0106】

いくつかの実施形態では、ポリペプチドまたはポリペプチド複合体は、表 1 に明記される配列を含む。いくつかの実施形態では、配列は、配列番号 1、2、4、5、7、8、9、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、または 25 に対して少なくともまたは約 70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または 100% の配列同一性を含む。いくつかの実施形態では、配列は、配列番号 1、2、4、5、7、8、9、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、または 25 に対して少なくともまたは約 95% の相同性を含む。いくつかの実施形態では、配列は、配列番号 1、2、4、5、7、8、9、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、または 25 に対して少なくともまたは約 97% の相同性を含む。いくつかの実施形態では、配列は、配列番号 1、2、4、5、7、8、9、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、または 25 に対して少なくともまたは約 99% の相同性を含む。いくつかの実施形態では、配列は、配列番号 1、2、4、5、7、8、9、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、または 25 に対して少なくともまたは約 100% の相同性を含む。いくつかの例では、配列は、配列番号 1、2、4、5、7、8、9、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、または 25 の、少なくともまたは約 10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、310、320、330、340、350、360、370、380、390、400、または 400 を超えるアミノ酸を有する部分を少なくとも含む。

20

30

【0107】

参照ポリペプチド配列に関する配列同一性率 (%) は、配列をアライメントし、必要な場合にギャップを導入することにより最大の配列同一性率を達成したが、いずれの保守的置換も配列同一性の一部として認めなかった後に、参照ポリペプチド配列中のアミノ酸残基と同一である候補配列中のアミノ酸残基の割合である。アミノ酸配列同一性率を求める目的のアライメントは、公知の様々な方法で、例えば、BLAST、BLAST-2、ALIGN、Megalign (DNASTAR) ソフトウェアなどの公的に利用可能なコンピュータソフトウェアを用いて達成できる。比較される配列の全長にわたり最大のアライメントを達成するために必要なアルゴリズムを含む、配列をアライメントするのに適切なパラメータの判定が可能である。しかし、本明細書中の目的では、アミノ酸配列同一性 % の値は、配列比較コンピュータプログラム ALIGN-2 を用いて生成される。ALIGN-2 配列比較コンピュータプログラムは、著者 Genentech, Inc. であり、ソースコードは、ワシントン D. C., 20559 の米国著作権局にユーザ文書とともに

40

50

に提出されており、米国著作権登録第TXU510087号の下で登録されている。ALIGN-2プログラムはカリフォルニア州サウスサンフランシスコGenentech, Inc. から公的に入手可能か、またはソースコードからコンパイルされる場合がある。ALIGN-2プログラムは、digital UNIX（登録商標）V4.0Dを含むUNIX（登録商標）オペレーティングシステムで使用するためにコンパイルする必要がある。すべての配列比較パラメータはALIGN-2プログラムにより設定され、変更はない。

【0108】

ALIGN-2がアミノ酸配列の比較に利用される状況で、所与のアミノ酸配列Aの、所与のアミノ酸Bに対する（to, with, or against）アミノ酸配列同一性率（あるいは、所与のアミノ酸配列Bに対する特定のアミノ酸配列同一性%を有するか含んでいる所与のアミノ酸配列Aという句とすることができる）は、 $100 \times \text{分数 } X / Y$ として算出され、式中、Xは、プログラムのAとBのアライメントにおける配列アライメントプログラムALIGN-2によって同一の一致としてスコア付けされたアミノ酸残基の数であり、Yは、Bのアミノ酸残基の総数である。アミノ酸配列Aの長さはアミノ酸配列Bの長さに等しく、Bに対するAのアミノ酸配列同一性%は、Aに対するBのアミノ酸配列同一性%に等しくないことを認識されたい。別段の言及のない限り、本明細書で使用するアミノ酸配列同一性%の値は全て、ALIGN-2コンピュータプログラムを用いて直前の段落に記載するように取得される。

【0109】

切断可能リンカーを含むポリペプチドの産生

いくつかの実施形態では、本明細書に記載のポリペプチド（例えば、抗体およびその結合性フラグメント）は、当該技術分野で公知であってポリペプチド（例えば、抗体）の合成に有用とされるあらゆる方法、具体的には、化学合成または組換え発現により産生され、好ましくは組換え発現技法により産生される。

【0110】

いくつかの例では、抗体またはその結合性フラグメントは組換えにより発現され、抗体またはその結合性フラグメントをコードする核酸は、化学合成されたオリゴヌクレオチド（例えば、Kutmeierらによる1994年のBioTechniques 17:242に記載するもの）から組み立てられ、このオリゴヌクレオチドは、抗体をコードする配列の複数部分を含有する重複オリゴヌクレオチドの合成、それらオリゴヌクレオチドのアニーリングとライゲーション、ならびにライゲーションされたオリゴヌクレオチドのPCR増幅に参与する。

【0111】

代替的に、抗体をコードする核酸分子は、任意選択で好適なソース（例えば、抗体cDNAライブラリ、または免疫グロブリンを発現するいずれかの組織もしくは細胞から生成したcDNAライブラリ）から、配列の3'末端と5'末端にハイブリダイズ可能な合成プライマーを用いたPCR増幅、または、特定の遺伝子配列に特異的なオリゴヌクレオチドプローブを用いたクローニングにより生成される。

【0112】

いくつかの実施形態では、抗体またはその抗原結合性フラグメントは、任意選択で動物を免疫化することにより生成されることでポリクローナル抗体を生成し、またはより好ましくは、例えばKohlerとMilstein（1975, Nature 256:495-497）に記載されるように、もしくはKozborら（1983, Immunology Today 4:72）かColeら（1985 in Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96）に記載されるように、モノクローナル抗体を生成することにより生成される。代替的に、抗体の少なくともFab部分をコードするクローンが、特異的抗原を結合するFabフラグメントのクローンに対しFab発現ライブラリ（例えば、Huseらによる1989年のScience 246:1275-1281に記載

のもの)をスクリーニングすることにより、または抗体ライブラリをスクリーニングすることにより、任意選択で取得される(例えば、Clacksonらによる1991年のNature 352:624、Haneらによる1997年のProc. Natl. Acad. Sci. USA 94:4937を参照)。

【0113】

いくつかの実施形態では、適切な抗原特異性を持つマウス抗体分子からの抗体とともに、適切な生体活性を持つヒト抗体分子からの遺伝子をスプライシングすることにより「キメラ抗体」を産生するために開発された技法(Morrisonらによる1984年のProc. Natl. Acad. Sci. 81:851-855、Neubergerらによる1984年のNature 312:604-608、Takedaらによる1985年のNature 314:452-454)が使用される。キメラ抗体は、マウスモノクローナル抗体およびヒト免疫グロブリン定常領域に由来する可変領域を有するものなど、様々な部分が様々な動物種に由来する分子である。

【0114】

いくつかの実施形態では、一本鎖抗体の産生について記述された技法(米国特許第4,694,778号、Birdによる1988年のScience 242:423-42、Houstonによる1988年のProc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883、およびWardによる1989年のNature 334:544-54)が、一本鎖抗体を産生するのに適している。一本鎖抗体は、Fv領域の重鎖フラグメントと軽鎖フラグメントとをアミノ酸架橋を介し連結することにより形成され、一本鎖ポリペプチドが生じる。大腸菌中の機能性Fvフラグメントを組み立てるための技法も任意選択で使用される(Skerraらによる1988年のScience 242:1038-1041)。

【0115】

いくつかの実施形態では、抗体のヌクレオチド配列を含む発現ベクター、または抗体のヌクレオチド配列は、従来技法(例えば、電気穿孔法、リポソームトランスフェクション、リン酸カルシウム沈殿)により宿主細胞へと導入され、その後導入された細胞は従来技法により培養されて抗体が産生される。特定の実施形態では、抗体の発現は、構成的、誘導性、または組織特異的プロモータにより調節される。

【0116】

いくつかの実施形態では、種々の宿主発現ベクター系を利用して、本明細書に記載の抗体またはその結合性フラグメントが発現される。かかる宿主発現系は、抗体のコーディング配列を産生して精製するビヒクルを表すだけでなく、適切なヌクレオチドコーディング配列で形質転換されるかトランスフェクトされると抗体またはその結合性フラグメントを*in situ*で発現する細胞も表す。これらには、抗体またはその結合性フラグメントのコーディング配列を含有する組換えバクテリオファージDNA、プラスミドDNA、もしくはコスミドDNA発現ベクターで形質転換された細菌(例えば、大腸菌や枯草菌);抗体またはその結合性フラグメントのコーディング配列を含有する組換え酵母菌発現ベクターで形質転換された酵母菌(例えば、*Saccharomyces Pichia*);抗体またはその結合性フラグメントのコーディング配列を含有する組換えウイルス発現ベクター(例えば、バキュロウイルス)に感染した昆虫細胞系;抗体またはその結合性フラグメントのコーディング配列を含有する組換えウイルス発現ベクター(例えば、カリフラワーマザイクウイルス(CaMV)やタバコモザイクウイルス(TMV))もしくは組換えプラスミド発現ベクター(例えば、Tiプラスミド)に感染した植物細胞系;または哺乳動物細胞ゲノム(例えば、メタロチオネインプロモータ)もしくは哺乳動物ウイルス(例えば、アデノウイルス後期プロモータ、ワクシニアウイルス7.5Kプロモータ)に由来するプロモータを含有する組換え発現構築物を持つ哺乳動物細胞系(例えば、COS、CHO、BH、293、293T、3T3細胞)などの微生物が挙げられるが、このようなものに限定されない。

【0117】

組換えタンパク質の長期で高収率の産生には、安定した発現が好ましい。いくつかの例では、抗体を安定して発現する細胞株は、任意選択で操作される。複製ウイルス起源を含有する発現ベクターを用いるというよりは、宿主細胞は、適切な発現制御要素（例えば、プロモータ、エンハンサ、配列、転写ターミネータ、ポリアデニル化部位など）により制御されるDNA、および選択可能なマーカで形質転換される。外来DNAを導入後、操作された細胞は濃縮培地中で1～2日間成長されて、選択的培地に切り替えられる。組換えプラスミド中の選択可能マーカは選択に対する耐性を付与し、細胞が安定してプラスミドをそれらの染色体に一体化し、クローニングされて細胞株へと拡張される病巣を生じさせるように成長するのを可能にする。この方法は、抗体またはその結合性フラグメントを発現する細胞株を操作するのに使用するのが都合の良い可能性がある。

10

【0118】

いくつかの例では、多くの選択システムが使用され、限定されないが、単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ (Wiglerらによる1977年のCell 11:223)、ヒポキサンチン-グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (SzybalskaとSzybalskiによる1972, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 48:202)、およびアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (Lowyらによる1980年のCell 22:817)の遺伝子が、それぞれtk細胞、hgprt細胞、またはaprt細胞で利用される。また、代謝拮抗薬耐性が、以下の遺伝子に対する選択の基礎として使用される：メトトレキサートに対する耐性を与えるdhfr (Wiglerらによる1980年のProc. Natl. Acad. Sci. USA 77:357; O'Hareらによる1981年のProc. Natl. Acad. Sci. USA 78:1527)、ミコフェノール酸に対する耐性を与えるgpt (MulliganとBergによる1981年のProc. Natl. Acad. Sci. USA 78:2072)、アミノグリコシドG-418に対する耐性を与えるneo (Clinical Pharmacy 12:488-505; WuとWuによる1991年のBiotherapy 3:87-95; Tolstoshevによる1993年のAnn. Rev. Pharmacol. Toxicol. 32:573-596; Mulliganによる1993年のScience 260:926-932; およびMorganとAndersonによる1993年のAnn. Rev. Biochem. 62:191-217; May 1993, TIB TECH 11(5):155-215)、ならびにヒグロマイシンに対する耐性を与えるhygro (Santerreらによる1984年のGene 30:147)。使用され得る組換えDNA技法の分野で公知の方法は、Ausubelら (編、1993年のCurrent Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY; Krieglerによる1990年のGene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY; およびDracopolisら (編)による1994年のCurrent Protocols in Human Genetics, John Wiley & Sons, NY. の12章と13章; Colberre-Garapinらによる1981年のJ. Mol. Biol. 150:1)に記載されている。

20

30

40

【0119】

いくつかの例では、抗体の発現レベルは、ベクター増幅により上昇する (検討のため、BebbingtonとHentschelによるthe use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells in DNA cloning, Vol. 3. (Academic Press, New York, 1987)を参照)。抗体を発現するベクター系のマーカが増幅可能であると、宿主細胞の培養中に存在する阻害剤のレベルが上昇することで、マーカ遺伝子のコピー数が増加することになる。増幅した領域は抗体の塩基配列と関連付けられるので、抗体の産生も増加することになる (Crouseらによる1983年のMol. Cell Biol.

50

3 : 2 5 7)。

【0120】

場合により、抗体の精製における当該技術分野で公知のあらゆる方法が、例えばクロマトグラフィー（例えば、イオン交換、親和性、具体的にはタンパク質Aの後の特異的抗原に対する親和性、およびサイジングカラムクロマトグラフィー）、遠心分離、差動的溶解性（*differential solubility*）、またはその他あらゆるタンパク質精製の標準技法により使用される。

【0121】

発現ベクター

いくつかの実施形態では、ベクターは、真核生物源または原核生物源のいずれかに由来するあらゆる好適なベクターを含む。場合により、ベクターは、細菌源（例えば、大腸菌）、昆虫源、酵母菌源（例えば、*Pichia pastoris*）、藻類源、または哺乳動物源から得られる。例示的な細菌ベクターとして、pACYC177、pASK75、pBADベクターシリーズ、pBADMベクターシリーズ、pETベクターシリーズ、pETMベクターシリーズ、pGEXベクターシリーズ、pHAT、pHAT2、pMal-c2、pMal-p2、pQEベクターシリーズ、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。

【0122】

例示的な昆虫ベクターとして、pFastBac1、pFastBac DUAL、pFastBac ET、pFastBac HTa、pFastBac HTb、pFastBac HTc、pFastBac M30a、pFastBact M30b、pFastBac、M30c、pVL1392、pVL1393、pVL1393 M10、pVL1393 M11、pVL1393 M12、pPolh-FLAG1やpPolh-MAT 2などのFLAGベクター、またはpPolh-MAT1やpPolh-MAT 2などのMATベクターが挙げられる。

【0123】

場合により、酵母菌ベクターとして、Gateway（登録商標）pDEST（商標）14ベクター、Gateway（登録商標）pDEST（商標）15ベクター、Gateway（登録商標）pDEST（商標）17ベクター、Gateway（登録商標）pDEST（商標）24ベクター、Gateway（登録商標）pYES-DEST52ベクター、pBAD-DEST49 Gateway（登録商標）デスティネーションベクター、pAO815 *Pichia*ベクター、pFLD1 *Pichi pastoris*ベクター、pGAPZA, B, & C *Pichia pastoris*ベクター、pPIC3.5K *Pichia*ベクター、pPIC6 A, B, & C *Pichia*ベクター、pPIC9K *Pichia*ベクター、pTEF1/Zeo、pYES2酵母菌ベクター、pYES2/CT酵母菌ベクター、pYES2/NT A, B, & C酵母菌ベクター、またはpYES3/CT酵母菌ベクターが挙げられる。

【0124】

例示的な藻類ベクターには、pChlamy-4ベクターやMCSベクターが挙げられる。

【0125】

哺乳動物ベクターの例には、一過性発現ベクターや安定発現ベクターが挙げられる。哺乳動物一過性発現ベクターには、pRK5、p3xFLAG-CMV 8、pFLAG-Myc-CMV 19、pFLAG-Myc-CMV 23、pFLAG-CMV 2、pFLAG-CMV 6a, b, c、pFLAG-CMV 5.1、pFLAG-CMV 5a, b, c、p3xFLAG-CMV 7.1、pFLAG-CMV 20、p3xFLAG-Myc-CMV 24、pCMV-FLAG-MAT1、pCMV-FLAG-MA

10

20

30

40

50

T2、pBICEP-CMV 3、またはpBICEP-CMV 4が挙げられ得る。哺乳動物安定発現ベクターには、pFLAG-CMV 3、p3xFLAG-CMV 9、p3xFLAG-CMV 13、pFLAG-Myc-CMV 21、p3xFLAG-Myc-CMV 25、pFLAG-CMV 4、p3xFLAG-CMV 10、p3xFLAG-CMV 14、pFLAG-Myc-CMV 22、p3xFLAG-Myc-CMV 26、pBICEP-CMV 1、またはpBICEP-CMV 2が挙げられ得る。

【0126】

いくつかの例では、無細胞系は、細胞からの細胞質成分および／または核成分の混合物であり、*in vitro*での核酸合成に使用される。場合により、無細胞系は、原核細胞成分または真核細胞成分のいずれかを利用する。時に核酸合成は、例えば、ショウジョウバエ細胞、アフリカツメガエル卵、またはHeLa細胞に基づく無細胞系で得られる。例示的な無細胞系として、E. coli S30 Extract系、E. coli T7 S30系、またはPURExpress（登録商標）が挙げられるが、これらに限定されない。

【0127】

宿主細胞

いくつかの実施形態では、宿主細胞は、天然由来細胞または遺伝子修飾細胞などのいずれかの好適な細胞を含む。いくつかの例では、宿主細胞は産生宿主細胞である。いくつかの例では、宿主細胞は真核生物細胞である。他の例では、宿主細胞は原核生物細胞である。場合により、真核生物細胞には、真菌（例えば、酵母菌細胞）、動物細胞、または植物細胞が挙げられる。場合により、原核生物細胞は細菌細胞である。細菌細胞の例には、グラム陽性菌やグラム陰性菌が挙げられる。時にグラム陰性菌は、嫌気性菌、桿菌、またはその両方である。

【0128】

いくつかの例では、グラム陽性菌には、放線菌門、ファーミキューテス門、テネリクテス門が挙げられる。場合により、グラム陰性菌には、アクウイフェクス、デイノコッカス-サーマス、フィブロボクテル-クロロビウム／バクテロイデス（FCB群）、フソバクテリウム、ゲンマティモナス、ニトロスピラ、プランクトミケス-ウェルコミクロビウム／クラミジア（PVC群）、プロテオバクテリア、スピロヘータ、またはシネルギステスが挙げられる。他の細菌は、アシドバクテリア、クロロフレキシ、クリシオゲネス、シアノバクテリア、デフェリバクター、Dictyoglomi、サーモデスルフォバクテリア、またはテルモトガであり得る。細菌細胞は、大腸菌、ボツリヌス菌、またはColibacilliであり得る。

【0129】

例示的な原核生物宿主細胞には、BL21、Mach1（商標）、DH10B（商標）、TOP10、DH5α、DH10Bac（商標）、OmniMax（商標）、Megax（商標）、DH12S（商標）、INV110、TOP10F'、InvαF、TOP10/P3、ccdB Survival、PIR1、PIR2、Stbl2（商標）、Stbl3（商標）、またはStbl4（商標）が挙げられるが、これらに限定されない。

【0130】

いくつかの例では、動物細胞は、脊椎動物または無脊椎動物由来の細胞を含む。場合により、動物細胞は、海洋無脊椎動物、魚類、昆虫、両生類、爬虫類、または哺乳動物由来の細胞を含む。場合により、真菌細胞は、ビール酵母菌、パン酵母菌、またはワイン酵母菌などの酵母菌細胞を含む。

【0131】

真菌には、酵母菌、カビ、糸状菌、担子菌、接合菌などの子囊菌類が挙げられる。いくつかの例では、酵母菌は子囊菌門または担子菌門を含む。場合により、子囊菌門には、サッカロミケス亜門（真性酵母菌、例えば、saccharomyces cerevisiae（パン酵母菌））やタフリナ菌亜門（例えば、Schizosaccharomyces（分裂酵母菌））が挙げられる。場合により、担子菌門には、ハラタケ亜門（

10

20

30

40

50

例えば、*Tremellomycetes*) やサビキン亜門 (例えば、*Microbotryomycetes*) が挙げられる。

【0132】

例示的な酵母菌または糸状菌としては、例えばサッカロミセス属、シゾサッカロミセス属、カンジダ属、ピキア属、ハンゼヌラ属、クリベロミセス、ジゴサッカロマイセス属、ヤロウイア属、トリコスポロン属、*Rhodosporidi* 属、アスペルギルス属、フザリウム属、またはトリコデルマ属が挙げられる。例示的な酵母菌または糸状菌としては、例えば、サッカロミセス・セレビスエ、シゾサッカロミセス・ポンベ、*Candida utilis*、*Candida boidini*、カンジダ・アルビカンス、カンジダ・トロピカリス、*Candida stellatoidea*、カンジダ・グラブラータ、カンジダ・クルセイ、カンジダ・パラプシローシス、カンジダ・ギリエルモンディ、カンジダ・ヴィスワナーティ、カンジダ・ルシタニエ、ロドトルラ・ムチラギノーザ、*Pichia metanolica*、*Pichia angusta*、ピキア・パストリス、ピキア・アノマラ、ハンゼヌラ・ポリモルファ、クルイベロマイセス・ラクティス、チゴサッカロミセス・ルーキシイ、*Yarrowia lipolytica*、*Trichosporon pullulans*、*Rhodosporidium torul*-*Aspergillus niger*、アスペルギルス・ニデュランス、アワモリコウジカビ (*Aspergillus awamori*)、ニホンコウジカビ (*Aspergillus oryzae*)、トリコデルマ・リーゼイ、*Yarrowia lipolytica*、ブレタノミセス・ブリュッセル、*Candida stellata*、シゾサッカロミセス・ポンベ、*Torulaspora delbrueckii*、*Zygosaccharomyces bailii*、クリプトコッカス・ネオフォルマンズ、クリプトコッカス・ガッティ、またはサッカロミセス・ブラウディが挙げられる。

【0133】

例示的な酵母菌宿主細胞には、GS115、KM71H、SMD1168、SMD1168H、X-33などのピキア・パストリス酵母菌株や、INVSclなどのサッカロミセス・セレビスエ酵母菌株が挙げられるが、これらに限定されない。

【0134】

いくつかの例では、さらなる動物細胞として、軟体動物、節足動物、環形動物、または海綿動物から得た細胞が挙げられる。場合により、さらなる動物細胞は、例えば、霊長類、類人猿、ウマ、ウシ、ブタ、イヌ、ネコ、またはげっ歯類由来の哺乳動物細胞である。場合により、げっ歯類には、マウス、ラット、ハムスター、スナネズミ、ハムスター、チンチラ、ファンシーラット、またはモルモットが挙げられる。

【0135】

例示的な哺乳動物宿主細胞として、293A細胞株、293FT細胞株、293F細胞、293H細胞、CHO DG44細胞、CHO-S細胞、CHO-K1細胞、FUT8 KO CHOK1、Exp1293F (商標) 細胞、Flp-In (商標) T-REx (商標) 293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) -Jurkat細胞株、FreeStyle (商標) 293-F細胞、FreeStyle (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、T-REx (商標) -HeLa細胞株が挙げられるが、これらに限定されない。

【0136】

いくつかの例では、哺乳動物宿主細胞は、安定な細胞株であるか、または、目的の遺伝物質をそれ自体のゲノムに組み込んでいるとともに多くの世代の細胞分裂後に遺伝物質の生成物を発現する能力を有する細胞株である。場合により、哺乳動物宿主細胞は、一過性細胞株であるか、または、目的の遺伝物質をそれ自体のゲノムに組み込まないとともに多

くの世代の細胞分裂後に遺伝物質の生成物を発現する能力を有していない細胞株である。

【0137】

例示的な昆虫宿主細胞として、ショウジョウバエS2細胞、Sf9細胞、Sf21細胞、High Five（商標）細胞、expressSF+（登録商標）細胞が挙げられるが、これらに限定されない。

【0138】

いくつかの例では、植物細胞には藻類由来の細胞が挙げられる。例示的な昆虫細胞株には、クラミドモナス・ラインハルティイ137cやSynechococcus elongatus PPC7942由来の株が挙げられるが、これらに限定されない。

【0139】

製造品

本発明の別の態様では、上述した障害の処置、予防、および／または診断に有用な材料を含有する製造品が提供される。製造品は、容器と、容器上にあるか容器に付随するラベルまたは添付文書とを備える。好適な容器には、例えば、ボトル、バイアル、シリンジ、IV溶液バッグなどが挙げられる。容器は、ガラスやプラスチックなどの種々の材料から形成されてよい。容器は、疾病を処置、予防、および／もしくは診断するのにそれ自体でまたは別の組成物と組み合わせて有効である組成物を保持し、滅菌アクセスポートを有する場合もある（例えば、溶液は、皮下注射針が貫通可能なストッパを有する点滴バッグまたはバイアルの場合がある）。組成物中の少なくとも1つの活性剤は、CD3に特異的に結合する第1の抗原結合部位と、腫瘍抗原に特異的に結合する第2の抗原結合部位とを含む二重特異性抗体である。

【0140】

ラベルまたは添付文書は、組成物が選択対象の疾病を処置するのに使用されることを示す。さらに、製造品は、（a）本発明の二重特異性抗体を含む組成物を含有する第1の容器と、（b）さらなる細胞毒性またはその他の治療剤を含む組成物を含有する第2の容器とを備えていてもよい。この本発明の実施形態における製造品は、組成物が特定の疾病を処置するのに使用され得ることを示す添付文書をさらに備える場合もある。

【0141】

代替的または付加的に、製造品は、注射用静菌水（BWFI）、リン酸緩衝生理食塩水、リンゲル液、デキストロース溶液などの薬学的に許容可能な緩衝液を含む第2（または第3）の容器をさらに備える場合もある。さらに、他の緩衝液、希釈剤、フィルタ、針、およびシリンジを含む、商業上とユーザの観点から望ましい他の材料をさらに備える場合もある。

【0142】

処置方法

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の切断可能リンカーを含む単離ポリペプチドは、癌を処置する方法に使用される。いくつかの実施形態では、癌は、EGFRを発現する細胞を有する。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のポリペプチドまたはポリペプチド複合体は、大腸癌（CRC）、頭頸部の扁平上皮癌（SCCHN）、非小細胞肺癌（NSCLC）、前立腺癌、乳癌、乳癌／直腸癌、頭頸部癌、食道癌、肝臓癌、神経膠芽腫、子宮頸癌、卵巣癌、膀胱癌、腎臓癌、または膵臓癌を処置する方法に使用される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のポリペプチドまたはポリペプチド複合体は、EGFR阻害剤による処置に耐性のある対象を処置する方法に使用される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のポリペプチドまたはポリペプチド複合体は、KRAS突然変異を有する対象を処置する方法に使用される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載のポリペプチドまたはポリペプチド複合体は、EGFR阻害剤による処置に耐性がありKRAS突然変異を有する対象を処置する方法に使用される。

【0143】

本発明の好ましい実施形態が本明細書中で示されるとともに記述されてきたが、かかる実施形態はほんの一例として提供されることは当業者に明白であろう。現在、多数の変形

10

20

30

40

50

、変更、および置換えが、本発明から逸脱することなく当業者に想到されるであろう。本明細書に記載の本発明の実施形態に対する種々の代替物が本発明の実施に使用され得ることを理解されたい。以下の特許請求の範囲は本発明の範囲を定義し、これらの特許請求の範囲内にある方法と構造、およびそれらの等価物がそれによりカバーされることが意図される。

【0144】

実施形態

実施形態1は、配列番号1のアミノ酸配列（LSGRSDAG）による切断可能リンカーを含む単離ポリペプチドを含む。

【0145】

実施形態2は、切断可能リンカーが、配列番号3のアミノ酸配列（ISSGLLSGRSDAG）を含む、実施形態1に記載の単離ポリペプチドを含む。

【0146】

実施形態3は、切断可能リンカーが、配列番号26のアミノ酸配列（AGLLAPPGGLSGRSDAG）を含む、実施形態1から2のいずれか1つに記載の単離ポリペプチドを含む。

【0147】

実施形態4は、切断可能リンカーが、配列番号4のアミノ酸配列（AAGLLAPPGGLSGRSDAG）を含む、実施形態1から3のいずれか1つに記載の単離ポリペプチドを含む。

【0148】

実施形態5は、切断可能リンカーが、配列番号5のアミノ酸配列（SPLGLSGRSDAG）を含む、実施形態1から4のいずれか1つに記載の単離ポリペプチドを含む。

【0149】

実施形態6は、切断可能リンカーが、配列番号6のアミノ酸配列（LSGRSDAGSPLGLAG）を含む、実施形態1から5のいずれか1つに記載の単離ポリペプチドを含む。

【0150】

実施形態7は、切断可能リンカーがプロテアーゼにより切断可能である、実施形態1から6のいずれか1つに記載の単離ポリペプチドを含む。

【0151】

実施形態8は、プロテアーゼが腫瘍特異的プロテアーゼを含む、実施形態7に記載の単離ポリペプチドを含む。

【0152】

実施形態9は、プロテアーゼが、マトリックスメタロプロテイナーゼ（MMP）またはセリンプロテアーゼを含む、実施形態7から8のいずれか1つに記載の単離ポリペプチドを含む。

【0153】

実施形態10は、マトリックスメタロプロテアーゼが、MMP2、MMP7、MMP9、MMP13、またはMMP14を含む、実施形態9に記載の単離ポリペプチドを含む。

【0154】

実施形態11は、セリンプロテアーゼが、マトリブターゼ、ウロキナーゼ、またはヘプシンを含む、実施形態9に記載の単離ポリペプチドを含む。

【0155】

実施形態12は、標的抗原に結合する抗原結合ドメインをさらに含む、実施形態1から11のいずれか1つに記載の単離ポリペプチドを含む。

【0156】

実施形態13は、抗原結合性ドメインが、切断可能リンカーに対するC末端である、実施形態12に記載の単離ポリペプチドを含む。

【0157】

10

20

30

40

50

実施形態 14 は、サイトカイン受容体に結合するサイトカインまたはサイトカインフラグメントをさらに含む、実施形態 1 から 11 のいずれか 1 つに記載の単離ポリペプチドを含む。

【0158】

実施形態 15 は、サイトカインまたはサイトカインフラグメントが、切断可能リンカーに対する C 末端である、実施形態 14 に記載の単離ポリペプチドを含む。

【0159】

実施形態 16 は、切断可能リンカーが、式 I : $A_1-L_1-P_1$ による配置で、標的抗原に結合する抗原結合性ドメインに、またはサイトカイン受容体に結合するサイトカインもしくはサイトカインフラグメントにペプチドを接続し、式中、 A_1 は、標的抗原に結合する抗原結合性ドメイン、またはサイトカイン受容体に結合するサイトカインもしくはサイトカインフラグメントを含み、 L_1 は切断可能リンカーを含み、 P_1 は、標的抗原への抗原結合性ドメインの結合を損なわせるか、またはサイトカイン受容体へのサイトカインの結合を損なわせるペプチドを含む、実施形態 1 から 15 のいずれか 1 つに記載の単離ポリペプチドを含む。

10

【0160】

実施形態 17 は、 P_1 が N 末端で切断可能リンカーに接続され、 A_1 が C 末端で切断可能リンカーに接続される、実施形態 16 に記載の単離ポリペプチドを含む。

【0161】

実施形態 18 は、 P_1 が C 末端で切断可能リンカーに接続され、 A_1 が N 末端で切断可能リンカーに接続される、実施形態 16 に記載の単離ポリペプチドを含む。

20

【0162】

実施形態 19 は、 P_1 が、イオン相互作用、静電相互作用、疎水性相互作用、 π - π スタッキング相互作用、および H 結合相互作用、またはそれらの組合せを介して A_1 に結合される、実施形態 16 から 18 のいずれか 1 つに記載の単離ポリペプチドを含む。

【0163】

実施形態 20 は、 P_1 が、標的抗原またはサイトカイン受容体に対し 70 % 未満の配列相同性を有する、実施形態 16 から 19 のいずれか 1 つに記載の単離ポリペプチドを含む。

【0164】

実施形態 21 は、 P_1 が、長さが少なくとも 10 のアミノ酸のペプチド配列を含む、実施形態 16 から 20 のいずれか 1 つに記載の単離ポリペプチドを含む。

30

【0165】

実施形態 22 は、 P_1 が、長さが少なくとも 10 のアミノ酸および長さが 20 以下のアミノ酸のペプチド配列を含む、実施形態 16 から 21 のいずれか 1 つに記載の単離ポリペプチドを含む。

【0166】

実施形態 23 は、 P_1 が、長さが少なくとも 16 のアミノ酸のペプチド配列を含む、実施形態 16 から 22 のいずれか 1 つに記載の単離ポリペプチドを含む。

【0167】

実施形態 24 は、 P_1 が、長さが 40 以下のアミノ酸のペプチド配列を含む、実施形態 16 から 23 のいずれか 1 つに記載の単離ポリペプチドを含む。

40

【0168】

実施形態 25 は、 P_1 が環状ペプチドまたは直鎖ペプチドを含む、実施形態 16 から 24 のいずれか 1 つに記載の単離ポリペプチドを含む。

【0169】

実施形態 26 は、 P_1 が環状ペプチドを含む、実施形態 16 から 25 のいずれか 1 つに記載の単離ポリペプチドを含む。

【0170】

実施形態 27 は、 P_1 が半減期延長部分にさらに連結される、実施形態 16 から 26 のいずれか 1 つに記載の単離ポリペプチドを含む。

50

【0171】

実施形態28は、半減期延長部分が単ドメイン抗体である、実施形態27に記載の単離ポリペプチドを含む。

【0172】

実施形態29は、単ドメイン抗体が10Gを含む、実施形態28に記載の単離ポリペプチドを含む。

【0173】

実施形態30は、A₁が、抗体、一本鎖可変フラグメント（scFv）、重鎖可変ドメイン（VHドメイン）、軽鎖可変ドメイン（VLドメイン）、ラクダ科由来単ドメイン抗体の可変ドメイン（VHH）、Fab、Fab'、Fab軽鎖ポリペプチド、またはFab重鎖ポリペプチドを含む、実施形態16から29のいずれか1つに記載の単離ポリペプチドを含む。

10

【0174】

実施形態31は、標的抗原が腫瘍抗原を含む、実施形態16から30のいずれか1つに記載の単離ポリペプチドを含む。

【0175】

実施形態32は、A₁がFab軽鎖ポリペプチドまたはFab重鎖ポリペプチドを含む、実施形態30から31のいずれか1つに記載の単離ポリペプチドを含む。

【0176】

実施形態33は、A₁が上皮成長因子受容体（EGFR）結合ドメインを含む、実施形態16から32のいずれか1つに記載の単離ポリペプチドを含む。

20

【0177】

実施形態34は、標的抗原がエフェクター細胞抗原を含む、実施形態16から30のいずれか1つに記載の単離ポリペプチドを含む。

【0178】

実施形態35は、A₁がscfvを含む、実施形態34に記載の単離ポリペプチドを含む。

【0179】

実施形態36は、scFvが抗CD3e一本鎖可変フラグメントを含む、実施形態35に記載の単離ポリペプチドを含む。

30

【0180】

実施形態37は、A₁がサイトカインを含む、実施形態16から29のいずれか1つに記載の単離ポリペプチドを含む。

【0181】

実施形態38は、サイトカインまたはサイトカインフラグメントが野生型サイトカインである、実施形態37に記載の単離ポリペプチドを含む。

【0182】

実施形態38は、サイトカインまたはサイトカインフラグメントが、サイトカインの突然変異タンパク質である、実施形態37に記載の単離ポリペプチドを含む。

【0183】

実施形態40は、サイトカイン受容体がインターフェロン受容体またはインターロイキン受容体である、実施形態37から39のいずれか1つに記載の単離ポリペプチドを含む。

40

【0184】

実施形態41は、サイトカイン受容体が、インターフェロン受容体、GM-CSF受容体、IL-2受容体、IL-4受容体、IL-6受容体、IL-7受容体、IL-10受容体、IL-12受容体、IL-15受容体、IL-21受容体、またはTGF-β受容体を含む、実施形態37から40のいずれか1つに記載の単離ポリペプチドを含む。

【0185】

実施形態42は、サイトカインまたはサイトカインフラグメントが、インターフェロン、GM-CSF、IL-2、IL-7、IL-12、IL-15、またはIL-21を含む

50

む、実施形態 37 から 41 のいずれか 1 つに記載の単離ポリペプチドを含む。

【0186】

実施形態 43 は、サイトカインまたはサイトカインフラグメントが、IL-2、IL-12、IL-6、IL-4、IL-10、または TGFβ を含む、実施形態 37 から 42 のいずれか 1 つに記載の単離ポリペプチドを含む。

【0187】

実施形態 44 は、第 2 の抗原結合性ドメインまたは第 2 のサイトカインもしくは第 2 のサイトカインフラグメントを含む第 2 の単離ポリペプチドと複合体を形成する、実施形態 1 から 43 のいずれか 1 つに記載の単離ポリペプチドを含む。

【0188】

実施形態 45 は、第 2 の単離ポリペプチドが、式 $II: A_2-L_2-P_2$ による配置にあり、式中、 A_2 は第 2 の抗原結合性ドメインまたは第 2 のサイトカインを含み、 L_2 は第 2 の切断可能リンカーを含み、 P_2 は、第 2 の標的抗原への第 2 の抗原結合性ドメインの結合を阻害するか、または第 2 のサイトカイン受容体への第 2 のサイトカインまたは第 2 のサイトカインフラグメントの結合を阻害する第 2 のペプチドを含む、実施形態 44 に記載の単離ポリペプチドを含む。

【0189】

実施形態 46 は、第 2 の切断可能リンカーが、配列番号 1 のアミノ酸配列 (LSGRSDAG) を含む、実施形態 45 に記載の単離ポリペプチドを含む。

【0190】

実施形態 47 は、第 2 の切断可能リンカーが、配列番号 3 のアミノ酸配列 (ISSGLLSGRSDAG) を含む、実施形態 45 から 46 のいずれか 1 つに記載の単離ポリペプチドを含む。

【0191】

実施形態 48 は、第 2 の切断可能リンカーが、配列番号 26 のアミノ酸配列 (AGLLAPPGGLSGRSDAG) を含む、実施形態 45 から 47 のいずれか 1 つに記載の単離ポリペプチドを含む。

【0192】

実施形態 49 は、第 2 の切断可能リンカーが、配列番号 4 のアミノ酸配列 (AAGLLAPPGGLSGRSDAG) を含む、実施形態 45 から 48 のいずれか 1 つに記載の単離ポリペプチドを含む。

【0193】

実施形態 50 は、第 2 の切断可能リンカーが、配列番号 5 のアミノ酸配列 (SPLGLSGRSDAG) を含む、実施形態 45 から 49 のいずれか 1 つに記載の単離ポリペプチドを含む。

【0194】

実施形態 51 は、第 2 の切断可能リンカーが、配列番号 6 のアミノ酸配列 (LSGRSDAGSPLGLAG) を含む、実施形態 45 から 50 のいずれか 1 つに記載の単離ポリペプチドを含む。

【0195】

実施形態 52 は、 P_2 が N 末端で第 2 の切断可能リンカーに接続され、 A_2 が C 末端で第 2 の切断可能リンカーに接続される、実施形態 45 から 51 のいずれか 1 つに記載の単離ポリペプチドを含む。

【0196】

実施形態 53 は、 P_2 が C 末端で第 2 の切断可能リンカーに接続され、 A_2 が N 末端で第 2 の切断可能リンカーに接続される、実施形態 45 から 51 のいずれか 1 つに記載の単離ポリペプチドを含む。

【0197】

実施形態 54 は、 P_2 が、イオン相互作用、静電相互作用、疎水性相互作用、 π -スタッキング相互作用、および H 結合相互作用、またはそれらの組合せを介して A_2 に結合

10

20

30

40

50

される、実施形態 4 5 から 5 3 のいずれか 1 つに記載の単離ポリペプチドを含む。

【0198】

実施形態 5 5 は、 P_2 が、第 2 の標的抗原または第 2 のサイトカイン受容体に対し 70 %未満の配列相同性を有する、実施形態 4 5 から 5 4 のいずれか 1 つに記載の単離ポリペプチドを含む。

【0199】

実施形態 5 6 は、 P_2 が、長さが少なくとも 10 のアミノ酸のペプチド配列を含む、実施形態 4 5 から 5 5 のいずれか 1 つに記載の単離ポリペプチドを含む。

【0200】

実施形態 5 7 は、 P_2 が、長さが少なくとも 10 のアミノ酸および長さが 20 以下のアミノ酸のペプチド配列を含む、実施形態 4 5 から 5 6 のいずれか 1 つに記載の単離ポリペプチドを含む。

10

【0201】

実施形態 5 8 は、 P_2 が、長さが少なくとも 16 のアミノ酸のペプチド配列を含む、実施形態 4 5 から 5 7 のいずれか 1 つに記載の単離ポリペプチドを含む。

【0202】

実施形態 5 9 は、 P_2 が、長さが 40 以下のアミノ酸のペプチド配列を含む、実施形態 4 5 から 5 6 のいずれか 1 つに記載の単離ポリペプチドを含む。

【0203】

実施形態 6 0 は、 P_2 が環状ペプチドまたは直鎖ペプチドを含む、実施形態 4 5 から 5 9 のいずれか 1 つに記載の単離ポリペプチドを含む。

20

【0204】

実施形態 6 1 は、 P_2 が環状ペプチドを含む、実施形態 4 5 から 6 0 のいずれか 1 つに記載の単離ポリペプチドを含む。

【0205】

実施形態 6 2 は、 A_2 が、抗体、一本鎖可変フラグメント (s c F v)、重鎖可変ドメイン (V Hドメイン)、軽鎖可変ドメイン (V Lドメイン)、ラクダ科由来単一ドメイン抗体の可変ドメイン (V H H)、F a b、F a b'、F a b 軽鎖ポリペプチド、または F a b 重鎖ポリペプチドを含む、実施形態 4 5 から 6 1 のいずれか 1 つに記載の単離ポリペプチドを含む。

30

【0206】

実施形態 6 3 は、第 2 の標的抗原が腫瘍抗原を含む、実施形態 4 5 から 6 2 のいずれか 1 つに記載の単離ポリペプチドを含む。

【0207】

実施形態 6 4 は、 A_2 が F a b 軽鎖ポリペプチドまたは F a b 重鎖ポリペプチドを含む、実施形態 6 2 に記載の単離ポリペプチドを含む。

【0208】

実施形態 6 5 は、 A_2 が上皮成長因子受容体 (E G F R) 結合ドメインを含む、実施形態 4 5 から 6 4 のいずれか 1 つに記載の単離ポリペプチドを含む。

【0209】

実施形態 6 6 は、第 2 の標的抗原がエフェクター細胞抗原を含む、実施形態 4 5 から 6 2 のいずれか 1 つに記載の単離ポリペプチドを含む。

40

【0210】

実施形態 6 7 は、 A_2 が s c f v を含む、実施形態 6 2 に記載の単離ポリペプチドを含む。

【0211】

実施形態 6 8 は、s c F v が抗 C D 3 e 一本鎖可変フラグメントを含む、実施形態 6 6 から 6 7 のいずれか 1 つに記載の単離ポリペプチドを含む。

【0212】

実施形態 6 9 は、 A_2 が第 2 のサイトカインを含む、実施形態 4 5 から 6 1 のいずれか

50

1つに記載の単離ポリペプチドを含む。

【0213】

実施形態70は、第2のサイトカインまたは第2のサイトカインフラグメントが野生型サイトカインである、実施形態69に記載の単離ポリペプチドを含む。

【0214】

実施形態71は、第2のサイトカインまたは第2のサイトカインフラグメントが、サイトカインの突然変異タンパク質である、実施形態69に記載の単離ポリペプチドを含む。

【0215】

実施形態72は、第2のサイトカイン受容体がインターフェロン受容体またはインターロイキン受容体である、実施形態69から71のいずれか1つに記載の単離ポリペプチドを含む。

10

【0216】

実施形態73は、第2のサイトカイン受容体が、インターフェロン受容体、GM-CSF受容体、IL-2受容体、IL-4受容体、IL-6受容体、IL-7受容体、IL-10受容体、IL-12受容体、IL-15受容体、IL-21受容体、またはTGF- β 受容体を含む、実施形態69から72のいずれか1つに記載の単離ポリペプチドを含む。

【0217】

実施形態74は、第2のサイトカインまたは第2のサイトカインフラグメントが、インターフェロン、GM-CSF、IL-2、IL-7、IL-12、IL-15、またはIL-21を含む、実施形態69から73のいずれか1つに記載の単離ポリペプチドを含む。

20

【0218】

実施形態75は、第2のサイトカインまたは第2のサイトカインフラグメントが、IL-2、IL-12、IL-6、IL-4、IL-10、またはTGF β を含む、実施形態69から74のいずれか1つに記載の単離ポリペプチドを含む。

【0219】

実施形態76は、上記実施形態のいずれか1つに記載の切断可能リンカーを含む単離ポリペプチドと、薬学的に許容可能な賦形剤とを含む医薬組成物を含む。

【0220】

実施形態77は、上記実施形態のいずれか1つに記載の切断可能リンカーを含む単離ポリペプチドをコードする、単離された組換え核酸分子を含む。

30

【0221】

実施形態78は、実施形態77に記載の単離された組換え核酸分子を含むベクターを含む。

【0222】

実施形態79は、上記実施形態のいずれか1つに記載の切断可能リンカーを含む単離ポリペプチドを産生する方法であって、ポリペプチドの発現を生じさせる条件下で、実施形態78に記載のベクターを含む細胞を培養する工程を含む方法を含む。

【0223】

実施形態80は、切断可能リンカーを含む単離ポリペプチドを製造する方法であって、(a)ポリペプチドの発現を生じさせる条件下で実施形態77に記載の単離された組換え核酸分子を含む細胞を培養する工程と、(b)ポリペプチドを単離する工程とを含む方法を含む。

40

【実施例】

【0224】

実施例1. タンパク質分解速度と血清安定性

ポリペプチド複合体を、腫瘍および血清プロテアーゼ活性について評価した。

【0225】

簡潔に説明すると、様々な腫瘍プロテアーゼにより認識される切断可能リンカーを用いてポリペプチド複合体へと遺伝的に融合したペプチドマスクを含む、ポリペプチド複合体PC-1、PC-2、PC-3、PC-4、およびPC-5を生成した。ポリペプチド複

50

合体を様々な腫瘍プロテアーゼに曝露した。切断速度は、ポリペプチド複合体を MMP 2、MMP 7、MMP 9、MMP 13、MMP 14、uPa、MTSP1、およびヘプシンに曝露したときに判定した。見かけの切断速度と相対的血清安定性に関するデータは表 2～4 に見られる。

【0226】

【表 2】

表 2. 見かけの切断速度の比較

腫瘍プロテアーゼ	PC-1	PC-2	PC-3	PC-4	PC-5
MMP2	$10^4 < r < 10^5$	$10^4 < r < 10^5$	$> 10^5$	$> 10^5$	$> 10^5$
MMP7	$\leq 2.5 \times 10^3$	$\leq 2.5 \times 10^3$	$10^4 < r < 10^5$	$> 10^5$	$> 10^5$
MMP9	$\leq 2.5 \times 10^3$	$\leq 2.5 \times 10^3$	$10^4 < r < 10^5$	$> 10^5$	$> 10^5$
MMP13	$10^4 < r < 10^5$	$10^4 < r < 10^5$	$> 10^5$	$> 10^5$	$> 10^5$
MMP14	$10^4 < r < 10^5$	$10^4 < r < 10^5$	$10^4 < r < 10^5$	$10^4 < r < 10^5$	$10^4 < r < 10^5$
uPa	$2.5 \times 10^3 < r < 10^4$	$2.5 \times 10^3 < r < 10^4$	$2.5 \times 10^3 < r < 10^4$	$2.5 \times 10^3 < r < 10^4$	$2.5 \times 10^3 < r < 10^4$
MTSP1	$2.5 \times 10^3 < r < 10^4$	$2.5 \times 10^3 < r < 10^4$	$10^4 < r < 10^5$	$10^4 < r < 10^5$	$10^4 < r < 10^5$
ヘプシン	$> 10^5$	$> 10^5$	$10^4 < r < 10^5$	$10^4 < r < 10^5$	$10^4 < r < 10^5$

【0227】

【表 3】

表 3. 見かけの切断速度の定常性

見かけの切断速度の定常性 ($M^{-1} s^{-1}$) (EGFR 側)					
腫瘍プロテアーゼ	PC-1	PC-2	PC-3	PC-4	PC-5
MMP2	1.99E+04	2.47E+04	3.63E+05	3.29E+05	3.48E+05
MMP7	1.50E+02	1.57E+02	1.34E+04	1.76E+05	9.15E+04
MMP9	2.35E+03	5.00E+01	4.10E+04	2.36E+05	2.82E+05
MMP13	1.89E+04	1.20E+04	1.56E+05	2.75E+05	3.80E+05
MMP14	1.01E+04	1.07E+04	2.78E+04	1.42E+04	1.95E+04
uPa	8.39E+03	4.32E+03	3.41E+03	4.03E+03	5.88E+03
MTSP1	9.96E+03	8.63E+03	3.83E+04	3.92E+04	5.65E+04
ヘプシン	2.53E+05	2.53E+05	7.00E+04	4.26E+04	8.28E+04

【0228】

10

20

30

40

50

【表 4】

表 4. 相対的な血清安定性

相対的な血清安定性 (1 日あたりの切断%) (EGFR 側 / CD3ε 側)					
血清	PC-1	PC-2	PC-3	PC-4	PC-5
ヒト	0.51% / 0.56%	0.52% / 0.65%	0.44% / 0.63%	0.44% / 0.82%	0.72% / 0.71%

【0229】

データより、血清タンパク質分解活性が血液より高いことが認められる。またデータより、切断可能リンカー配列がヒト血清中の安定性を維持しながらタンパク質分解速度を上昇させたことも認められる。

10

【0230】

実施例 2. 切断可能リンカーと同等のマスキングの確認

ポリペプチド複合体を EGFR および CD3ε 結合について評価した。

【0231】

簡潔に説明すると、EGFR マスキングを含むポリペプチド複合体 PC-1、PC-2、PC-3、PC-4、および PC-5 の結合を判定した。図 1 A に見られるように、EGFR マスキングは、様々なポリペプチド複合体に対する結合を遮断する。腫瘍プロテアーゼ MTSP1 による切断後、ポリペプチド複合体は結合可能となる（図 1 B）。

20

【0232】

EGFR 結合シフトの詳細は表 5 ～ 8 に見られる。

【0233】

【表 5】

表 5.

工程	時間	pH
ベースライン: Octet 緩衝液	60sec	pH 7.4
充填: 30nM EGFR-ビオチン (2.169ug/mL)	300sec	pH 7.4
ビオサイチンクエンチ (100uM)	300sec	pH 7.4
ベースライン: Octet 緩衝液	90sec	pH 7.4
会合: 25nM PC-2 25nM PC-3 25nM PC-4 25nM PC-5 25nM PC-2 + MTSP1 25nM PC-3 + MTSP1 25nM PC-4 + MTSP1 25nM PC-5 + MTSP1	300sec	pH 7.4
解離: Octet 緩衝液	600sec	pH 7.4

30

40

【0234】

【表 6】

表 6.

試料 ID	ローディング 試料 ID	濃度 (nM)	KD (M)	KD エラ ー	kon(1/Ms)	kdis(1/s)	完全 R^2	完全 X^2	反応
PC-2	EGFR	25	有意な結合を認めず						
PC-3	EGFR	25	有意な結合を認めず						
PC-4	EGFR	25	有意な結合を認めず						
PC-5	EGFR	25	有意な結合を認めず						
PC-2+MTSP1	EGFR	25	1.34E-09	2.87E-11	3.48E+05	4.66E-04	0.9735	2.3843	1.5573
PC-3+MTSP1	EGFR	25	9.46E-10	1.99E-11	4.72E+05	4.46E-04	0.9684	2.3105	1.5016
PC-4+MTSP1	EGFR	25	1.19E-09	2.56E-11	3.82E+05	4.54E-04	0.9715	2.45	1.553
PC-5+MTSP1	EGFR	25	1.45E-09	2.98E-11	3.50E+05	5.07E-04	0.9728	1.9973	1.4156

10

【 0 2 3 5 】

【表 7】

表 7.

工程	時間	pH
ベースライン: Octet 緩衝液	60sec	pH 7.4
充填: 30nM EGFR-ビオチン (2.169ug/mL)	300sec	pH 7.4
ビオサイチンクエンチ (100uM)	300sec	pH 7.4
ベースライン: 5% ヒト血清	300sec	pH 7.4
会合: 30nM PC-1, 30nM PC-1 + MTSP1 30nM PC-6, 緩衝液	300sec	pH 7.4
解離: 5% ヒト血清	600sec	pH 7.4

20

30

【 0 2 3 6 】

40

50

【表 8】

表 8.

試料 ID	ローディング 試料 ID	濃度 (nM)	KD (M)	KD エラ ー	kon(1/Ms)	kdis(1/s)	完全 R ²	完全 X ²	反応
PC-1	EGFR- ビオチ ン	50	有意な結合を認めず						
PC-1+MTSP1	EGFR- ビオチ ン	50	1.91E-09	3.85E-11	2.60E+05	4.98E-04	0.965	1.7318	1.2733
PC-6	EGFR- ビオチ ン	50	1.77E-09	3.19E-11	4.93E+05	8.72E-04	0.9535	1.4956	1.0938
緩衝液	EGFR- ビオチ ン	50	<1.0E-12	6.00E-09	1.29E+04	<1.0E-07	0.5559	0.1511	0.0151

【0237】

ポリペプチド複合体をさらにCD3ε結合について評価した。簡潔に説明すると、CD3εマスキングを含むポリペプチド複合体PC-1、PC-2、PC-3、PC-4、およびPC-5の結合を判定した。図2Aに見られるように、このマスクは、様々なポリペプチド複合体に対する結合を遮断する。腫瘍プロテアーゼMTSP1による切断後、ポリペプチド複合体は結合可能となる（図2B）。

【0238】

CD3ε結合シフトの詳細は表9～12に見られる。

【0239】

【表 9】

表 9.

工程	時間	pH
ベースライン: Octet 緩衝液	60sec	pH 7.4
充填: 30nM CD3ε-ビオチン (0.465ug/mL)	300sec	pH 7.4
ビオサイチンクエンチ (100nM)	300sec	pH 7.4
ベースライン: Octet 緩衝液	90sec	pH 7.4
会合: • 25nM PC-2 • 25nM PC-3 • 25nM PC-4 • 25nM PC-5 • 25nM PC-2 + MTSP1 • 25nM PC-3 + MTSP1 • 25nM PC-4 + MTSP1 • 25nM PC-5 + MTSP1	300sec	pH 7.4
解離: Octet 緩衝液	600sec	pH 7.4

【0240】

10

20

30

40

50

【表 10】

表 10.

試料 ID	ローディング試料 ID	濃度 (nM)	KD (M)	KD エラー	kon(1/Ms)	kdis(1/s)	完全 R ²	完全 X ²	反応
PC-2	CD3e	25	有意な結合を認めず						
PC-3	CD3e	25	有意な結合を認めず						
PC-4	CD3e	25	有意な結合を認めず						
PC-5	CD3e	25	有意な結合を認めず						
PC-2+MTSP1	CD3e	25	1.41E-08	3.66E-10	2.37E+05	3.33E-03	0.9829	1.2588	1.0342
PC-3+MTSP1	CD3e	25	1.00E-08	2.60E-10	3.37E+05	3.37E-03	0.976	2.078	1.1036
PC-4+MTSP1	CD3e	25	1.19E-08	3.14E-10	2.78E+05	3.30E-03	0.9786	1.5272	1.0227
PC-5+MTSP1	CD3e	25	1.32E-08	3.33E-10	2.91E+05	3.84E-03	0.9832	1.452	1.0526

10

【0241】

【表 11】

表 11.

工程	時間	pH
ベースライン: Octet 緩衝液	60sec	pH 7.4
充填: 30nM CD3e-ビオチン (0.46ug/mL)	300sec	pH 7.4
ビオサイチンクエンチ (100uM)	300sec	pH 7.4
ベースライン: 5% ヒト血清	300sec	pH 7.4
会合: 30nM PC-1, 30nM PC-1 + MTSP1 30nM PC-6, 緩衝液	300sec	pH 7.4
解離: 5% ヒト血清	600sec	pH 7.4

20

30

【0242】

【表 12】

表 12.

試料 ID	ローディング試料 ID	濃度 (nM)	KD (M)	KD エラー	kon(1/Ms)	kdis(1/s)	完全 R ²	完全 X ²	反応
PC-1	CD3e-ビオチン	50	有意な結合を認めず						
PC-1+MTSP1	CD3e-ビオチン	50	3.15E-08	1.01E-09	1.25E+05	3.95E-03	0.9774	2.6058	1.2556
PC-6	CD3e-ビオチン	50	2.26E-08	6.81E-10	1.33E+05	3.02E-03	0.9702	4.4245	1.5652
緩衝液	CD3e-ビオチン	50	有意な結合を認めず						

40

【0243】

50

ポリペプチド複合体の結合を、酵素結合免疫吸着アッセイ（E L I S A）を用いて評価した。ビオチン化ペプチドをニュートラアビジン被覆プレート上で捕捉した。結合したポリペプチド複合体を検出するために二次抗体を使用した。マスクを含み、かつマスク切断後のPC-2、PC-3、PC-4、PC-5、PC-1、およびPC-6に関するデータは図3A～図3Bに見られ、EC50結合データを表13～14に要約する。

【0244】

【表13】

表 13.

EC50 nM	マスク後	切断後	シフト
PC-2	21.29	0.13	169.5
PC-3	23.47	0.12	198.2
PC-4	20.59	0.15	139.3
PC-5	18.28	0.13	143.5
PC-1	44.79	--	282.8
PC-6	--	0.16	--

10

【0245】

【表14】

表 14.

EC50 nM	マスク後	切断後	シフト
PC-2	2.082	0.101	20.6x
PC-3	1.792	0.1007	17.8x
PC-4	2.439	0.119	20.5x
PC-5	2.665	0.121	22.0x
PC-1	4.598	0.1383	33.2x
PC-6	--	0.069	--

20

30

【0246】

実施例3．切断可能リンカーと同等のT細胞シフトの確認

次にポリペプチド複合体を、機能的な *in vitro* 腫瘍細胞死滅および関連するT細胞活性化試験で評価した。

【0247】

簡潔に説明すると、HCT116細胞を、96ウェルの組織培養処理済平底プレート上に蒔き、一晩かけて付着させた。翌日、培養培地と接着していない細胞を除去し、示された濃度で滴定されたポリペプチド複合体を含む新鮮な培地と交換した。PC-2、PC-3、PC-4、PC-5、PC-1、およびPC-6のデータは、図14、表15～16に見られる。

【0248】

40

50

【表 1 5】

表 15.

腫瘍細胞生存度, IC50 (pM)										
細胞毒性時間	PC-6	PC-1	PC-2	PC-3	PC-4	PC-5	PC-2 +MTSP1	PC-3 +MTSP1	PC-4 +MTSP1	PC-5 +MTSP1
24hr	1.13	555.6	326.6	578.3	539.9	869.4	0.2377	0.2811	0.3557	0.2294
48hr	0.4675	460.9	301.8	389.1	419.7	499.6	0.1998	0.1843	0.1596	0.2197
72hr	0.5507	763.5	389.3	444	522.6	588.6	0.2632	0.2402	0.218	0.3065
96hr	0.7548	1023	475.3	511.8	659.1	712.9	0.3296	0.3099	0.2809	0.394
120hr			577.5	589.6	773.2	824.2	0.3901	0.3679	0.3351	0.4737

10

【 0 2 4 9】

【表 1 6】

表 16.

腫瘍細胞生存度, 機能的シフト										
細胞毒性時間	PC-6	PC-1	PC-2	PC-3	PC-4	PC-5	PC-2 +MTSP1	PC-3 +MTSP1	PC-4 +MTSP1	PC-5 +MTSP1
24hr	1x	491.7x	289x	511.8x	477.8x	769.4x	0.2x	0.2x	0.3x	0.2x
48hr	1x	985.9x	645.6x	832.3x	897.8x	1068.7x	0.4x	0.4x	0.3x	0.5x
72hr	1x	1386.4x	706.9x	806.2x	949x	1068.8x	0.5x	0.4x	0.4x	0.6x
96hr	1x	1355.3x	629.7x	678.1x	873.2x	944.5x	0.4x	0.4x	0.4x	0.5x
120hr			765.1x	781.1x	1024.4x	1091.9x	0.5x	0.5x	0.4x	0.6x

20

【 0 2 5 0】

実施例 4. *In vivo*でのカニクイザルPK比較

30

ポリペプチド複合体をカニクイザルの薬物動態と安全性について評価した。

【 0 2 5 1】

カニクイザル

【 0 2 5 2】

若いオスのナイーブカニクイザルを対にして群ごとに収容し、身体に固有のタトゥーを入れて識別した。動物をすべて、試験開始前の3日間、収容条件に順応させた。開始前に、すべての動物が試験獣医師による身体検査を受けた。試験獣医師の見識において健康であり、その他の点で基準を満たしている動物のみを試験に登録した。食事は投与前に一晚控えた。Purina 5049を、動物の大きさに適した量で毎日与えた。自動給水装置により水道水を自由に飲めるようにした。

40

【 0 2 5 3】

薬物動態

【 0 2 5 4】

ポリペプチド複合体PC-1、PC-2、PC-3、PC-4、およびPC-5のポリペプチド複合体薬物動態を、オスのナイーブカニクイザルで2~3kgに秤量して判定した。簡潔に説明すると、収容された2群のサルを投与群ごとに使用し、投与前に周囲に順応させた。投薬と出血の前、ケタミンHCL 10~20mg/kg IMで動物を鎮静させた。濃縮被験物質を滅菌リン酸緩衝生理食塩水で希釈し、kgでの動物の質量に対する量を動物に投与した。各被験物質の用量を1mL/kgの投与量として静脈内投与した。投与において、左肢と右肢をクリップで止めてアルコールで調製した (prepped)

50

。伏在静脈を確認し、標準カテーテルを配してI V ボーラス注入を行った（左肢または右肢のいずれかに）。被験物質投与溶液をシリンジによりカテーテルに流し入れ（a t t a c h e d）、シリンジを手で圧迫することでボーラス注入を行った。

【0255】

採血において、ケタミンを用いて動物を鎮静させ、大腿三角筋を調製し、22Gの1.5インチ針、バキュテナーシース、および採取管を用いて大腿静脈から採血を行った。静脈穿刺後、止血を成し遂げるまで静脈を手で圧迫し続けた。採血は動物の体重に基づき行われ、I A C U C が明記するA G I 最大出血量を超えなかった。血液をE D T A 管に採取し、血漿へと処理した。血液試料を冷やして3000 x g で10分間遠心分離し、血漿から細胞を分離した。血漿の上清を採取し、解析前に冷凍保存した。

【0256】

カニクイザル血漿試料中のポリペプチド複合体濃度をE L I S A で判定した。簡潔に説明すると、抗h i s タグ捕捉抗体をE L I S A プレート上で直接被覆させた。カニクイザル血清中のポリペプチド複合体の標準希釈物を使用して、動物P K 試験試料を比較可能な検量線を生成した。標準試料と試験試料をプレートに添加し、一晚冷却してインキュベートした。試験試料の様々な希釈物をいくつか使用して、シグナルが標準曲線の適切なダイナミックレンジ内にたどり着いたことを確認した。プレートを洗浄し、抗ヒトH R P 検出抗体で短時間インキュベートした。標準E L I S A 技法を用いてプレートを洗浄し、発達させ、停止させた。公知のポリペプチド複合体濃度に対する450nmでの吸光度をプロットする標準曲線を使用し、マウスP K 血漿試料ごとの明らかでない被験物質濃度を算出した。ポリペプチド複合体濃度を時間に対してプロットし、標準の二段階分布と除去薬物動態モデルに適合させた。カニクイザルから得たポリペプチド複合体P C - 1、P C - 7、P C - 4、およびP C - 5において算出した薬物動態とパラメータを、図5A～5D、表17～20に示す。

【0257】

【表17】

表 17.

構築物	用量 (ug/kg)	C _{max} (nM)	T _{1/2} (hr)	Vd (L)	CL (ml/h/kg)	AUC _(0→d7) (nM・min)
PC-1	100	51	100	0.06	0.14	165,895
PC-2	100					
PC-3	100					
PC-4	100	48	91	0.07	0.16	221,875
PC-5	100	61	97	0.05	0.12	244,051

【0258】

【表 18】

表 18. カニクイザル PK パラメータ

構築物	用量 (ug/kg)	C _{max} (nM)	T _{1/2} (hr)	Vd (L)	CL (ml/h/kg)
PC-1	300	153	109	0.06	0.13
PC-1	100	51	100	0.06	0.14
PC-7	10	1.7	1.2	0.24	47
PC-7	3	0.17	0.3	0.68	491

10

【0259】

【表 19】

表 19.

構築物	用量 (ug/kg)	C _{max} (nM)	T _{1/2} (hr)	Vd (L)	CL (ml/h/kg)
PC-1	100	51	100	0.06	0.14

20

【0260】

【表 20】

表 20.

パラメータ	PC-2 100ug/kg	PC-3 100ug/kg	単位
C _{MAX}	40.37	53.78	nM
t _{1/2}	69.44	104.57	hr
Vd	0.08	0.06	L
VSS	0.06	0.11	L
CL	0.26	0.13	mL/hr/kg
BW	3.00	3.00	kg
7 日の AUC	207834	305952	nM・min

30

【0261】

これらのデータより、切断可能リンカーを含むポリペプチド複合体はカニクイザルで血清半減期を延ばしたことが認められる。

40

【0262】

実施例 5. *In vivo*でのカニクイザルのサイトカイン放出

カニクイザルのサイトカイン放出を測定した。

【0263】

処置後の血漿に存在するサイトカインを、BD Biosciences製の非ヒト霊長類 Th1/Th2 cytometric bead arrayのアッセイキット（カタログ番号 557800）を製造業者の指示に従い用いて測定した。データを図 6 A～図 6 D、表 21 に示す。

【0264】

50

【表 2 1】

表 21.

特性	PC-7	PC-7	PC-1	PC-2	PC-3	PC-4	PC-5
	3 ug/kg	10 ug/kg	100 ug/kg				
血漿サイトカイン濃度 (Cmax pg/ml)							
IL-6	1,932	5,352	BQL	TBD	TBD	234	493
TNFα	1,267	2,497	BQL	TBD	TBD	BQL	BQL
IFNγ	BQL	109	BQL	TBD	TBD	BQL	BQL
IL-2	87	412	BQL	TBD	TBD	BQL	BQL

10

【0 2 6 5】

実施例 6. *In vivo*でのカニクイザルの肝ALT／AST

ALT／AST値を測定した。図7Aと図7B、および表22に見られるように、ポリペプチド複合体はカニクイザルで肝毒性を防止した。

【0 2 6 6】

【表 2 2】

表 22.

特性	PC-1	PC-2	PC-3	PC-4	PC-5
	100 ug/kg				
血漿濃度 (U/L)					
ALT	18	TBD	TBD	40	41
AST	9	TBD	TBD	40	51

20

30

【0 2 6 7】

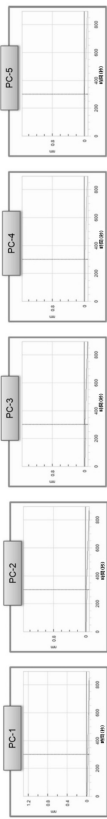
本発明の好ましい実施形態が本明細書中で示されるとともに記述されてきたが、かかる実施形態はほんの一例として提供されることは当業者に明白であろう。現在、多数の変形、変更、および置換えが、本発明から逸脱することなく当業者に想到されるであろう。本明細書に記載の本発明の実施形態に対する種々の代替物が本発明の実施に使用され得ることを理解されたい。以下の特許請求の範囲は本発明の範囲を定義し、これらの特許請求の範囲内にある方法と構造、およびそれらの等価物がそれによりカバーされることが意図される。

40

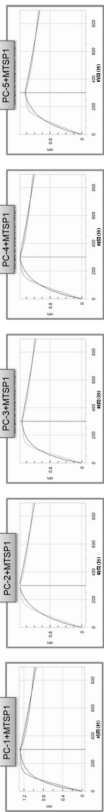
50

【図面】

【図 1 A】



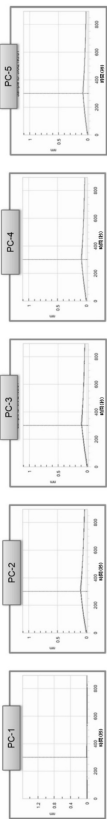
【図 1 B】



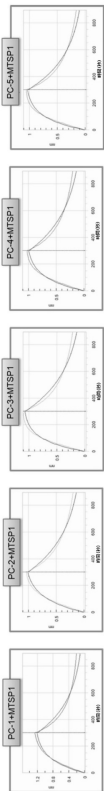
10

20

【図 2 A】



【図 2 B】

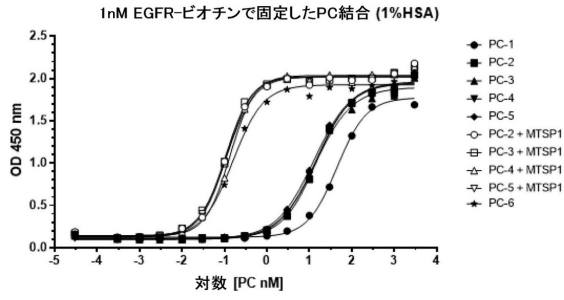


30

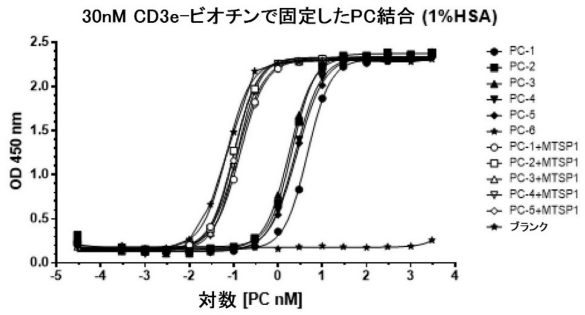
40

50

【図 3 A】

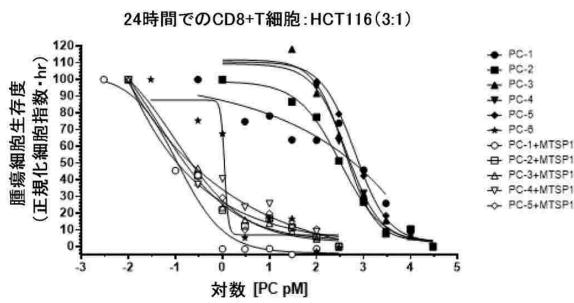


【図 3 B】

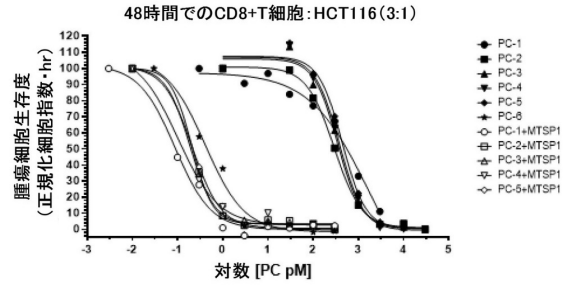


10

【図 4 A】

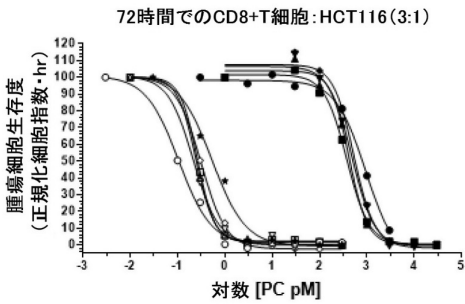


【図 4 B】

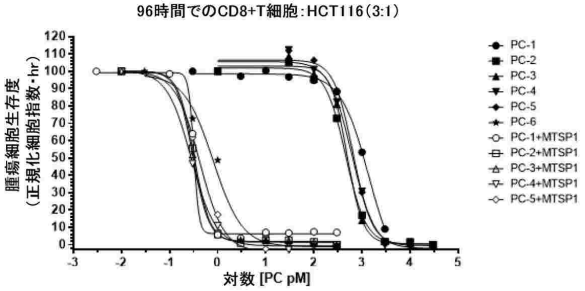


20

【図 4 C】



【図 4 D】

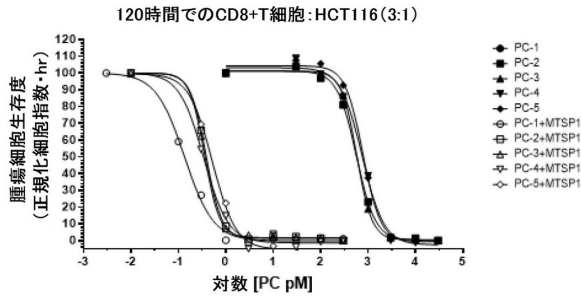


30

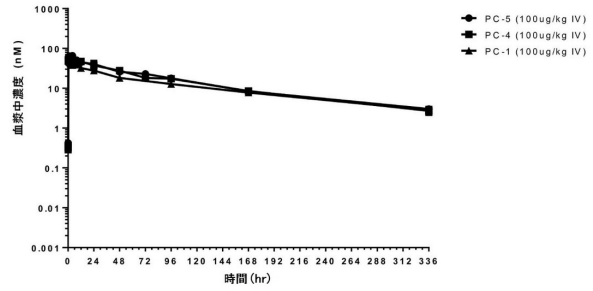
40

50

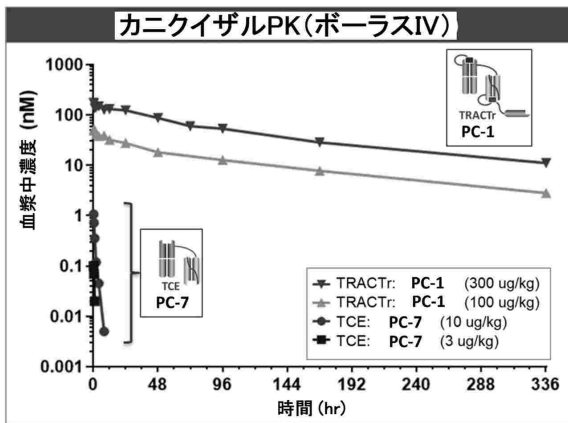
【図 4 E】



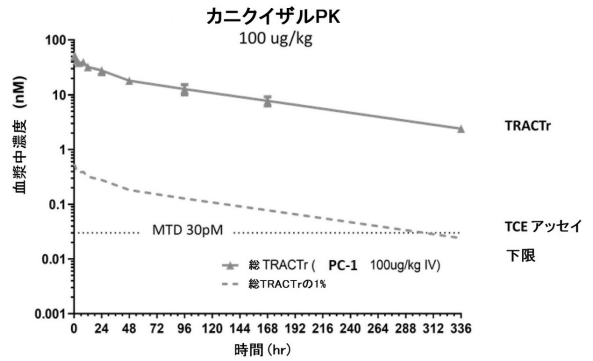
【図 5 A】



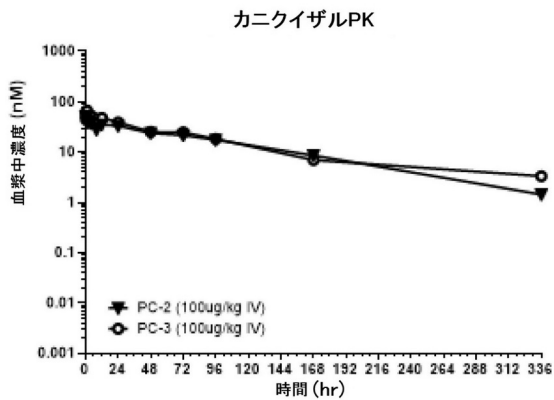
【図 5 B】



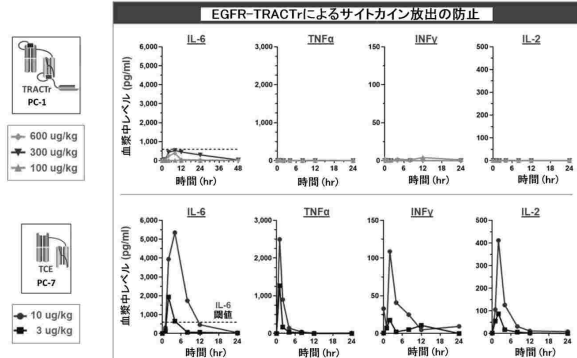
【図 5 C】



【図 5 D】



【図 6 A】



10

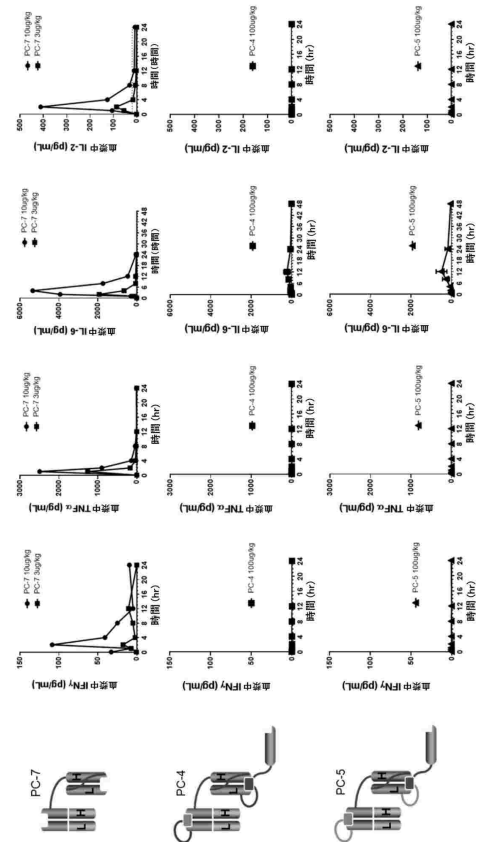
20

30

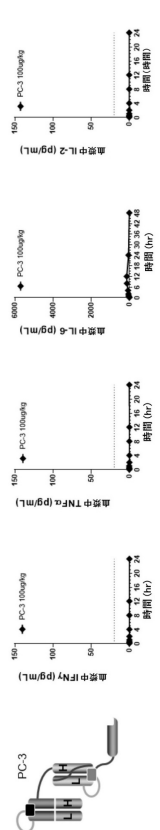
40

50

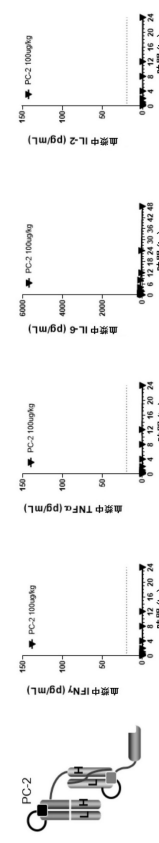
【図 6 B】



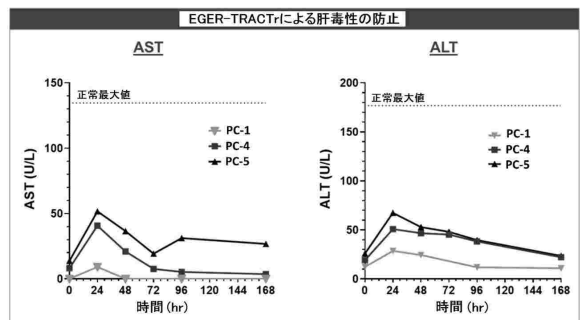
【図 6 D】



【図 6 C】



【図 7 A】



10

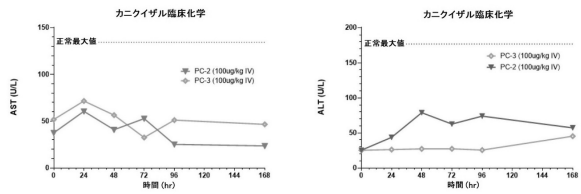
20

30

40

50

【図 7 B】



【配列表】

0007681681000001.app

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

C 1 2 N	15/63	(2006.01)	C 1 2 N	15/63	Z
C 1 2 N	15/62	(2006.01)	C 1 2 N	15/62	Z Z N A
C 1 2 N	15/13	(2006.01)	C 1 2 N	15/13	
C 1 2 N	15/12	(2006.01)	C 1 2 N	15/12	
C 0 7 K	14/47	(2006.01)	C 0 7 K	14/47	

アメリカ合衆国 9 2 1 3 0 カリフォルニア州 サンディエゴ ビスタ・ソレント・パークウェイ
1 0 9 5 5 スイート 2 0 0

審査官 齋藤 光介

(56)参考文献

特表 2 0 1 8 - 5 3 3 9 0 9 (J P , A)

特表 2 0 1 8 - 5 0 0 0 4 9 (J P , A)

国際公開第 2 0 2 0 / 1 1 8 1 0 9 (W O , A 2)

Maeder, D. L. et al., The Methanosarcina barkeri Genome: Comparative Analysis with Methanosarcina acetivorans and Methanosarcina mazei Reveals Extensive Rearrangement within Methanosarcinal Genomes, Journal of Bacteriology, 2006年, vol.188, no.22, p.7922-7931

(58)調査した分野 (Int.Cl., D B 名)

C 1 2 N

C 0 7 K

GenBank/EMBL/GeneSeq

UniProt/GeneSeq