(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2025-512357
(P2025-512357A)
(43)公表日　令和7年4月17日(2025.4.17)

(51)国際特許分類			FI			テーマコード（参考）
C07K	*16/00*	*(2006.01)*	C07K	16/00	ZNA	4B064
C07K	*14/52*	*(2006.01)*	C07K	14/52		4B065
C12P	*21/08*	*(2006.01)*	C12P	21/08		4C076
C07K	*1/34*	*(2006.01)*	C07K	1/34		4C084
C12N	*1/21*	*(2006.01)*	C12N	1/21		4C085

審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全98頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2024-560230(P2024-560230)
(86)(22)出願日　令和5年4月14日(2023.4.14)
(85)翻訳文提出日　令和6年12月6日(2024.12.6)
(86)国際出願番号　PCT/US2023/065778
(87)国際公開番号　WO2023/201336
(87)国際公開日　令和5年10月19日(2023.10.19)
(31)優先権主張番号　63/331,534
(32)優先日　令和4年4月15日(2022.4.15)
(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
最終頁に続く

(71)出願人　520347214
バリター，インコーポレイティド
アメリカ合衆国，カリフォルニア ９４７１０，バークリー，ヘインズ アベニュ ８２０
(74)代理人　100099759
弁理士　青木 篤
(74)代理人　100123582
弁理士　三橋 真二
(74)代理人　100117019
弁理士　渡辺 陽一
(74)代理人　100141977
弁理士　中島 勝
(74)代理人　100138210
弁理士　池田 達則
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　ヒト化多価タンパク質コンジュゲート

(57)【要約】
本発明は、高いヒト化度、及び／又は大腸菌（E.coli）などの培養培地中でかなりのレベルで発現できる能力を有するペプチド配列に関する。本ペプチドは、αヘリックスペプチドリンカーを介してポリマー骨格に共有結合することができる。本発明は更に、ペプチド、ペプチドを含むポリマーコンジュゲート、及びそれらの医薬組成物を調製する方法に関する。

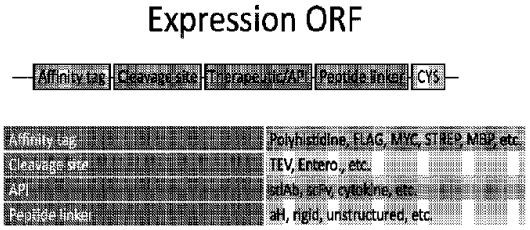


FIG. 1A

【特許請求の範囲】
【請求項１】
式（Ｉ）：
ＦＲ１－ＣＤＲ１－ＦＲ２－ＣＤＲ２－ＦＲ３－ＣＤＲ３－ＦＲ４（Ｉ）
を有するペプチドであって、
式中、ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３が、各々独立して相補性決定領域であり；
ＦＲ１が、X^{10}ＶＱＬX^{11}ＥX^{12}ＧＧＧ$X^{13}$$X^{14}$Ｑ$X^{15}$Ｇ$X^{16}$ＳＬＲＬＳＣ$X^{17}$$X^{18}$ＳＧ（配列番号１）
（式中、
X^{10}は、Ｑ、Ｅ、又はＤであり、
X^{11}は、Ｖ、Ｑ、Ａ、又はＥであり、
X^{12}は、Ｓ又はＴであり、
X^{13}は、Ｌ、Ｓ、又はＶであり、
X^{14}は、Ｖ又はＡであり、
X^{15}は、Ｐ、Ａ、又はＴであり、
X^{16}は、Ｇ、Ｄ、又はＲであり、
X^{17}は、Ａ、Ｖ、Ｔ、又はＥであり、
X^{18}は、Ａ又はＶである）を含むアミノ酸配列を有し、
ＦＲ２が、$X^{20}$$X^{21}$Ｗ$X^{22}$ＲＱ$X^{23}$ＰＧＫ$X^{24}$$X^{25}$Ｅ$X^{26}$Ｖ$X^{27}$$X^{28}$Ｉ（配列番号２）
（式中、
X^{20}は、Ｍ、Ｉ、Ｖ、又はＬであり、
X^{21}は、Ｇ、Ｓ、又はＡであり、
X^{22}は、Ｆ、Ｙ、又はＶであり、
X^{23}は、Ａ、Ｖ、Ｐ、又はＴであり、
X^{24}は、Ｅ、Ｇ、Ａ、又はＱであり、
X^{25}は、Ｒ又はＬであり、
X^{26}は、Ｆ、Ｇ、Ｗ、又はＬであり、
X^{27}は、Ａ、Ｇ、又はＳであり、
X^{28}は、Ａ、Ｓ、又はＧである）を含むアミノ酸配列を有し、
ＦＲ３が、ＹX^{30}ＤＳＶＫＧＲＦＴＩＳX^{31}Ｄ$X^{32}$$X^{33}$Ｋ$X^{34}$$X^{35}$Ｖ$X^{36}$ＬＱＭ$X^{37}$$X^{38}$ＬＲ$X^{39a}$ＥＤＴＡ$X^{39b}$ＹＹＣＡＡ（配列番号３）
（式中、
X^{30}は、Ａ、Ｇ、Ｓ、又はＴであり、
X^{31}は、Ｒ又はＱであり、
X^{32}は、Ｎ、Ｓ、又はＤであり、
X^{33}は、Ｓ、Ａ、又はＤであり、
X^{34}は、Ｎ又はＫであり、
X^{35}は、Ｔ又はＭであり、
X^{36}は、Ｙ、Ｄ、又はＳであり、
X^{37}は、Ｎ又はＤであり、
X^{38}は、Ｓ又はＮであり、
X^{39a}は、Ｐ又はＡであり、
X^{39b}は、Ｖ、Ｍ、Ｌ、又はＩである）を含むアミノ酸配列を有し、
ＦＲ４が、
ＹＷＧX^{40}ＧＴX^{41}ＶＴＶＳＳ（配列番号４）
（式中、
X^{40}は、Ｑ又はＫであり、
X^{41}は、Ｌ又はＱである）を含むアミノ酸配列を有する、ペプチド。
【請求項２】

Ｘ２７がＡである、請求項１に記載のペプチド。
【請求項３】
Ｘ３９ａがＰである、請求項１又は２に記載のペプチド。
【請求項４】
ＦＲ１が、ＱＶＱＬＶＥＳＧＧＧＬＶＱＰＧＧＳＬＲＬＳＣＡＡＳＧ（配列番号５）を含むアミノ酸配列を有する、請求項１～３のいずれか一項に記載のペプチド。
【請求項５】
ＦＲ２が、ＭＧＷＦＲＱＡＰＧＫＥＲＥＦＶＡＡＩ（配列番号６）を含むアミノ酸配列を有する、請求項１～４のいずれか一項に記載のペプチド。
【請求項６】
ＦＲ３が、ＹＡＤＳＶＫＧＲＦＴＩＳＲＤＮＳＫＮＴＶＹＬＱＭＮＳＬＲＰＥＤＴＡＶＹＹＣＡＡ（配列番号７）を含むアミノ酸配列を有する、請求項１～５のいずれか一項に記載のペプチド。
【請求項７】
ＦＲ４が、ＹＷＧＱＧＴＬＶＴＶＳＳ（配列番号８）を含むアミノ酸配列を有する、請求項１～６のいずれか一項に記載のペプチド。
【請求項８】
ＣＤＲ１、ＣＤＲ２及びＣＤＲ３が各々、抗体又はサイトカイン由来の相補性決定領域である、請求項１～７のいずれか一項に記載のペプチド。
【請求項９】
前記抗体が、モノクローナルＩｇＧ、ＩｇＧ断片、一本鎖ｓｃＦｖ、単一ドメイン重鎖ＶＨＨ、アドネクチン、アフィボディ、アンチカリン、ＤＡＲＰｉｎ、又は操作されたクニッツ型阻害剤である、請求項８に記載のペプチド。
【請求項１０】
前記相補性決定領域が各々、血管内皮増殖因子（ＶＥＧＦ）、腫瘍壊死因子－アルファ（ＴＮＦ－α）、プログラム細胞死タンパク質１（ＰＤ－１）、プログラム細胞死リガンド－１（ＰＤ－Ｌ１）、細胞傷害性Ｔリンパ球関連タンパク質４（ＣＴＬＡ４）、分化抗原群４０（ＣＤ４０）、分化抗原群１３４（ＣＤ１３４）、分化抗原群１３７（ＣＤ１３７）、グルココルチコイド誘導腫瘍壊死因子受容体関連タンパク質（ＧＩＴＲ）、Ｔ細胞活性化のＶドメイン免疫グロブリンサプレッサー（ＶＩＳＴＡ）、Ｔ細胞免疫グロブリン及びムチンドメイン含有タンパク質３（ＴＩＭ－３）、リンパ球活性化３（ＬＡＧ３）、インターロイキン－１－ベータ（ＩＬ－１β）、インターロイキン－６（ＩＬ－６）、インターロイキン－１０（ＩＬ－１０）、インターロイキン－１２（ＩＬ－１２）、又はインターロイキン－１５（ＩＬ－１５）に特異的である、請求項８又は９に記載のペプチド。
【請求項１１】
前記相補性決定領域が各々、血管内皮増殖因子（ＶＥＧＦ）に特異的である、請求項８又は９に記載のペプチド。
【請求項１２】
式Ｉからなる、請求項１～１１のいずれか一項に記載のペプチド。
【請求項１３】
（ａ）７アミノ酸長のＣＤＲ１、
（ｂ）７若しくは８アミノ酸長のＣＤＲ２、及び／又は
（ｃ）９～１６アミノ酸長のＣＤＲ３、のうちの１つ以上を有する、請求項１～１２のいずれか一項に記載のペプチド。
【請求項１４】
（ａ）ＣＤＲ１が、ＦＡＹＳＴＹＳ（配列番号９）を含むアミノ酸配列を有し、
ＣＤＲ２が、ＮＳＧＴＦＲＬＷ（配列番号１０）を含むアミノ酸配列を有し、
ＣＤＲ３が、ＲＡＷＳＰＹＳＳＴＶＤＡＧＤＦＲ（配列番号１１）を含むアミノ酸配列を有する；又は

（ｂ）ＣＤＲ１が、ＲＲＦＳＩＥＡ（配列番号１２）を含むアミノ酸配列を有し、
ＣＤＲ２が、ＤＳＧＧＳＴＤ（配列番号１３）を含むアミノ酸配列を有し、
ＣＤＲ３が、ＩＧＧＳＷＹＧＲＧＬＤ（配列番号１４）を含むアミノ酸配列を有する；又は
（ｃ）ＣＤＲ１が、ＧＴＦＳＳＩＩ（配列番号１５）を含むアミノ酸配列を有し、
ＣＤＲ２が、ＳＷＳＧＧＴＴＶ（配列番号１６）を含むアミノ酸配列を有し、
ＣＤＲ３が、ＲＰＹＱＫＹＮＷＡＳＡＳＹＮＶ（配列番号１７）を含むアミノ酸配列を有する；又は
（ｄ）ＣＤＲ１が、ＧＧＳＤＡＧＴ（配列番号１８）を含むアミノ酸配列を有し、
ＣＤＲ２が、ＳＷＡＧＴＡＷＲ（配列番号１９）を含むアミノ酸配列を有し、
ＣＤＲ３が、ＬＧＳＹＥＭＤＨＨ（配列番号２０）を含むアミノ酸配列を有する、請求項１～１３のいずれか一項に記載のペプチド。

【請求項１５】

配列番号５１～５８、６１～７３、８１～８５、９１～９８、１０１～１０９、１１１～１３１、及び１４１～１７０のいずれか１つを含むアミノ酸配列を有する、請求項１～１４のいずれか一項に記載のペプチド。

【請求項１６】

（ａ）前記ペプチドをコードする遺伝子配列を第１の反応混合物中、細菌において翻訳すること、
（ｂ）前記第１の反応混合物及びエチレンジアミン四酢酸（ＥＤＴＡ）から第２の反応混合物を形成すること、並びに
（ｃ）前記第２の反応混合物を濾過すること、を含み、
これにより前記ペプチドを調製する、請求項１～１５のいずれか一項に記載のペプチドを調製する方法。

【請求項１７】

式ＩＩａ：
$(X^1-X^2-Y)_n-Z$（ＩＩａ）
のコンジュゲートであって、
式中、
各X^1が、独立して、請求項１～１５のいずれか一項に記載のペプチドであり、
各X^2が、独立して、３～１００アミノ酸長のペプチドリンカーであり、
各Ｙが、独立して、有機リンカーであり、
Ｚが、約０．１ＭＤａ～約３ＭＤａの分子量を有する生体適合性ポリマーであり、
下付き文字ｎが、１～１５００の整数である、式ＩＩａのコンジュゲート。

【請求項１８】

式ＩＩｂ：
$(X^1-X^{2A}-Y)_n-Z$（ＩＩｂ）
のコンジュゲートであって、
式中、
各X^1が、独立して、約５ｋＤａ～約２００ｋＤａの分子量を有するペプチドであり、
各X^{2A}が、独立して、αヘリックスを含むペプチドリンカーであり、
各Ｙが、独立して、有機リンカーであり、
Ｚが、約０．１ＭＤａ～約３ＭＤａの分子量を有する生体適合性ポリマーであり、
下付き文字ｎが、１～１５００の整数である、式ＩＩｂのコンジュゲート。

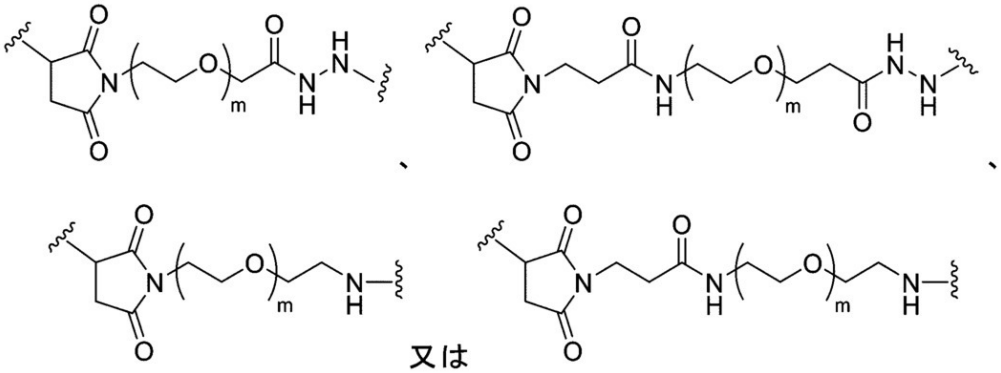
【請求項１９】

各X^1が、独立して、請求項１～１５のいずれか一項に記載のペプチドである、請求項１８に記載のコンジュゲート。

【請求項２０】

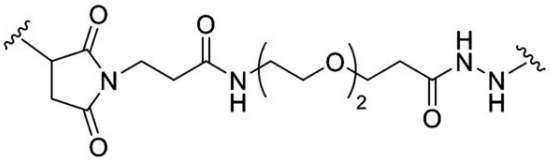
各ペプチドリンカーが、独立して、７～１００アミノ酸長である、請求項１７～１９のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

【請求項２１】
各ペプチドリンカーが、独立して、１０～３０アミノ酸長である、請求項１７～２０のいずれか一項に記載のコンジュゲート。
【請求項２２】
各ペプチドリンカーが、独立して、
ＡＥＡＡＡＫＥＡＡＡＫＥＡＡＡＫＡＧＣ（配列番号２１）、
ＡＥＥＥＫＲＫＡＥＥＥＫＲＫＡＥＥＥＡＧＣ（配列番号２２）、
ＡＥＥＥＫＲＫＡＥＥＥＫＲＫＡＥＥＥＫＲＫＡＥＥＥＡＧＣ（配列番号２３）、
ＡＥＥＥＥＫＫＫＥＥＥＥＫＫＫＡＧＣ（配列番号２４）、
ＡＥＡＡＡＫＥＡＡＡＫＡＧＣ（配列番号２５）、
ＰＳＲＬＥＥＥＬＲＲＲＬＴＥＧＣ（配列番号２６）、又は
ＡＥＥＥＥＫＫＫＱＱＥＥＥＡＥＲＬＲＲＩＱＥＥＭＥＫＥＲＫＲＲＥＥＤＥＥＲＲＲＫＥＥＥＥＲＲＭＫＬＥＭＥＡＫＲＫＱＥＥＥＥＲＫＫＲＥＤＤＥＫＲＫＫＫＡＧＣ（配列番号２７）を含むアミノ酸配列を有する、請求項１７～２１のいずれか一項に記載のコンジュゲート。
【請求項２３】
各ペプチドリンカーが、ＡＥＡＡＡＫＥＡＡＡＫＥＡＡＡＫＡＧＣ（配列番号２１）を含むアミノ酸配列を有する、請求項１７～２２のいずれか一項に記載のコンジュゲート。
【請求項２４】
前記有機リンカーが、構造：
【化１】



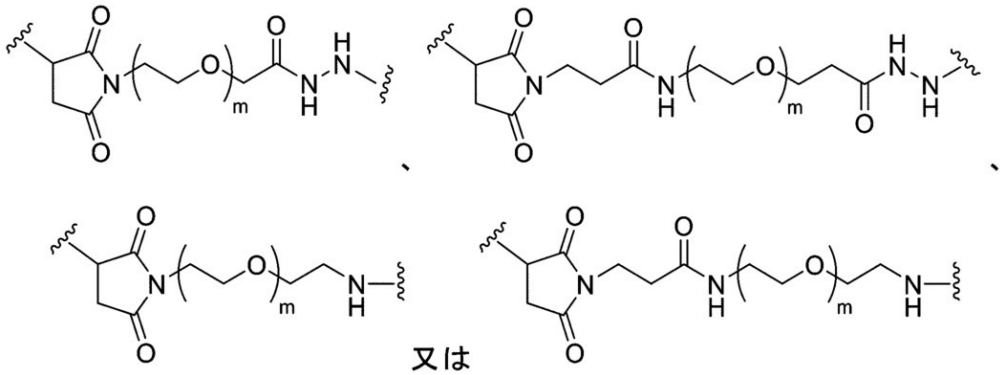
又は

を有し、
下付き文字ｍが、１～３００の整数である、請求項１７～２３のいずれか一項に記載のコンジュゲート。
【請求項２５】
前記有機リンカーが、構造：
【化２】



を有する、請求項１７～２４のいずれか一項に記載のコンジュゲート。
【請求項２６】
前記生体適合性ポリマーが多糖類である、請求項１７～２５のいずれか一項に記載のコンジュゲート。
【請求項２７】
前記生体適合性ポリマーがグリコサミノグリカンである、請求項１７～２５のいずれか一項に記載のコンジュゲート。

【請求項２８】
前記生体適合性ポリマーがヒアルロン酸である、請求項１７～２５のいずれか一項に記載のコンジュゲート。
【請求項２９】
前記生体適合性ポリマーが、約０．４ＭＤａ～約２ＭＤａの分子量を有する、請求項１７～２８のいずれか一項に記載のコンジュゲート。
【請求項３０】
前記生体適合性ポリマーが、約０．７ＭＤａ～約１．５ＭＤａの分子量を有する、請求項１７～２９のいずれか一項に記載のコンジュゲート。
【請求項３１】
前記生体適合性ポリマーが、約０．８ＭＤａの分子量を有する、請求項１７～３０のいずれか一項に記載のコンジュゲート。
【請求項３２】
下付き文字ｎが１０～４００の整数である、請求項１７～３１のいずれか一項に記載のコンジュゲート。
【請求項３３】
下付き文字ｎが１０～１００の整数である、請求項１７～３２のいずれか一項に記載のコンジュゲート。
【請求項３４】
式ＩＩａ：
$(X^1-X^2-Y)_n-Z$ （ＩＩａ）
のコンジュゲートであって、
式中、
各X^1が、独立して、請求項１～１５のいずれか一項に記載のペプチドであり、
各X^2が、ＡＥＡＡＡＫＥＡＡＡＫＥＡＡＡＫＡＧＣ（配列番号２１）を含むアミノ酸配列を有するペプチドリンカーであり、
各Ｙが、構造：
【化３】



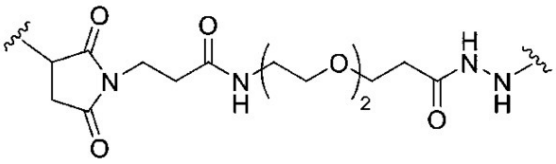
又は

を有する有機リンカーであり、
Ｚが、約０．１ＭＤａ～約３ＭＤａの分子量を有するヒアルロン酸である生体適合性ポリマーであり、
下付き文字ｍが、１～３００の整数であり、
下付き文字ｎが、１～１５００の整数である、式ＩＩａのコンジュゲート。
【請求項３５】
約０．８ＭＤａの分子量を有する式ＩＩＩａ：
$(X^1-X^2-Y-Z^1)_n-(Z^2)_p-(Z^3)_q$ （ＩＩＩａ）
のランダムポリマーであるコンジュゲートであって、
式中、
各X^1が、配列番号５５を含むアミノ酸配列を有するペプチドであり、

各Ｘ^{2}が、ＡＥＡＡＡＫＥＡＡＡＫＥＡＡＡＫＡＧＣ（配列番号２１）を含むアミノ酸配列を有するペプチドリンカーであり、

各Ｙが、構造：

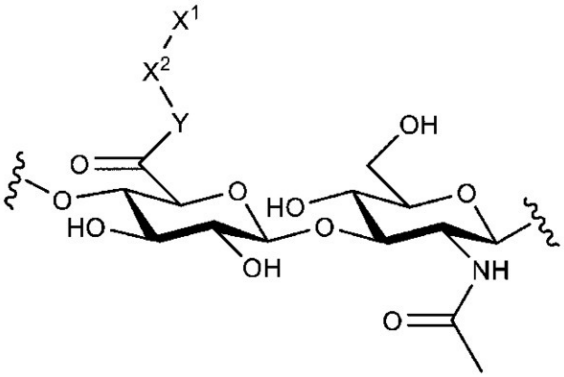
【化４】



を有する有機リンカーであり、

各Ｘ^{1}－Ｘ^{2}－Ｙ－Ｚ^{1}部分が、構造：

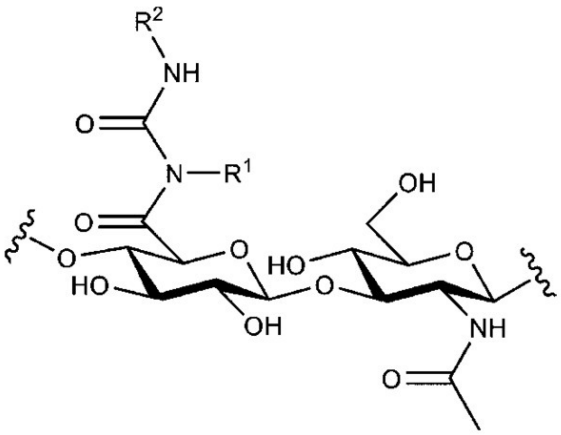
【化５】



を有し、

各Ｚ^{2}が、構造：

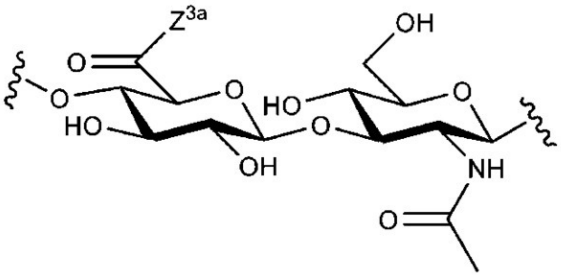
【化６】



を有し、

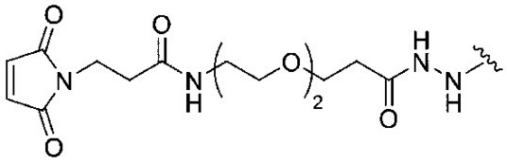
各Ｚ^{3}が、独立して、構造：

【化７】

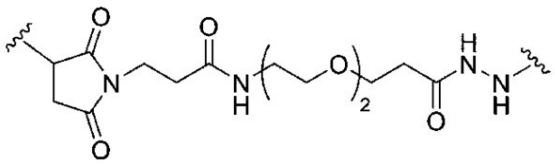


を有し、

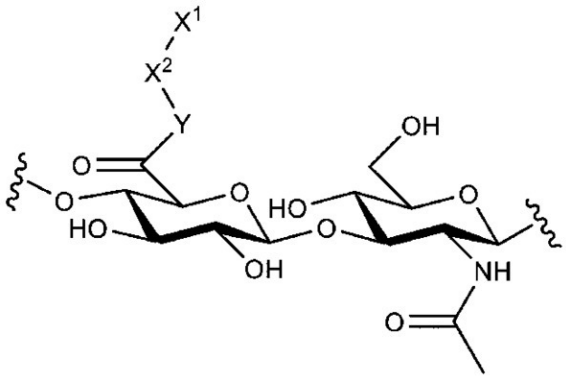
各Ｚ^{3a}が、独立して、ＯＨ又はＹ’であり、
各Ｙ’が、構造：
【化８】



を有し、
各Ｒ^{1}及びＲ^{2}が、エチル又は－（ＣＨ$_2$）$_3$－ＮＭｅ$_2$であり、
下付き文字ｎが、１０～３００の整数であり、下付き文字ｎ、ｐ、及びｑの合計の約１０％未満であり、
下付き文字ｐが、１～１５の整数であり、下付き文字ｎ、ｐ、及びｑの合計の約０．５％未満であり、
下付き文字ｑが、１０００～３０００の整数である、式ＩＩＩａのランダムポリマーであるコンジュゲート。
【請求項３６】
約０．８ＭＤａの分子量を有する式ＩＩＩａ：
（Ｘ^{1}－Ｘ^{2}－Ｙ－Ｚ^{1}）$_n$－（Ｚ^{2}）$_p$－（Ｚ^{3}）$_q$（ＩＩＩａ）
のランダムポリマーであるコンジュゲートであって、
式中、
各Ｘ^{1}が、配列番号６７を含む抗ＶＥＧＦアミノ酸配列を有するペプチドであり、
各Ｘ^{2}が、ＡＥＡＡＡＫＥＡＡＡＫＥＡＡＡＫＡＧＣ（配列番号２１）を含むアミノ酸配列を有するペプチドリンカーであり、
各Ｙが、構造：
【化９】

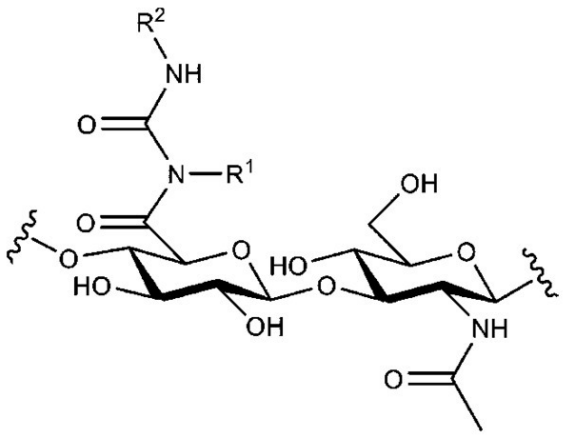


を有する有機リンカーであり、
各Ｘ^{1}－Ｘ^{2}－Ｙ－Ｚ^{1}部分が、構造：
【化１０】

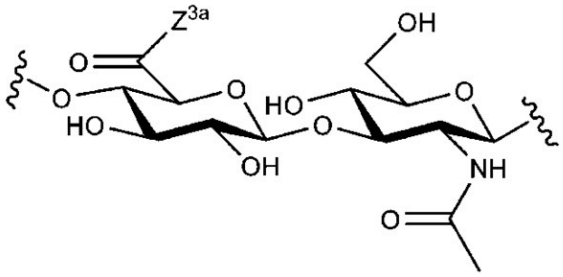


を有し、
各Ｚ^{2}が、構造：

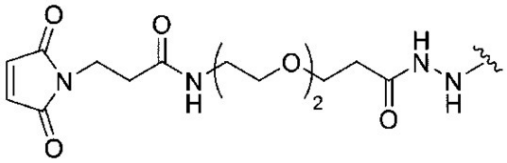
【化１１】



を有し、
各Ｚ^{3}が、独立して、構造：
【化１２】



を有し、
各Ｚ^{3a}が、独立して、ＯＨ又はＹ’であり、
各Ｙ’が、構造：
【化１３】



を有し、
各Ｒ^{1}及びＲ^{2}が、エチル又は－（ＣＨ$_{2}$）$_{3}$－ＮＭｅ$_{2}$であり、
下付き文字ｎが、１０～３００の整数であり、下付き文字ｎ、ｐ、及びｑの合計の約１０％未満であり、
下付き文字ｐが、１～１５の整数であり、下付き文字ｎ、ｐ、及びｑの合計の約０．５％未満であり、
下付き文字ｑが、１０００～３０００の整数である、式ＩＩＩａのランダムポリマーであるコンジュゲート。
【請求項３７】
請求項１７～３６のいずれか一項に記載のコンジュゲートと、薬学的に許容される賦形剤と、を含む、医薬組成物。
【請求項３８】
眼障害の治療を必要とする対象において眼障害を治療する方法であって、請求項１７～３６のいずれか一項に記載のコンジュゲートを前記対象に投与することを含む、方法。
【請求項３９】
前記コンジュゲートを硝子体内に投与することを含む、請求項３８に記載の方法。
【請求項４０】

前記コンジュゲートを毎月、２ヶ月毎、又は３ヶ月毎に投与することを含む、請求項３８又は３９に記載の方法。
【請求項４１】
前記コンジュゲートの硝子体半減期が、非コンジュゲートペプチドの半減期よりも少なくとも５倍長い、請求項３８～４０のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４２】
前記眼障害が、ブドウ膜炎、黄斑変性、脈絡膜血管新生、網膜血管新生、増殖性硝子体網膜症、緑内障、又は眼炎症である、請求項３８～４１のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４３】
関節の疾患又は障害の治療を必要とする対象において関節の疾患又は障害を治療する方法であって、請求項１７～３６のいずれか一項に記載のコンジュゲートを前記対象に投与することを含む、方法。
【請求項４４】
前記コンジュゲートを関節内に投与することを含む、請求項４３に記載の方法。
【請求項４５】
前記コンジュゲートを毎月、２ヶ月毎、又は３ヶ月毎に投与することを含む、請求項４３又は４４に記載の方法。
【請求項４６】
前記コンジュゲートの関節内半減期が、非コンジュゲートペプチドの半減期よりも少なくとも５倍長い、請求項４３～４５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項４７】
前記疾患又は障害が、関節リウマチ、摩耗に伴う変形性関節症、加齢に伴う変形性関節症、外傷後変形性関節症、乾癬性関節炎、及び無菌性のインプラントのゆるみ、関節液貯留、強直性脊椎炎、滑液包炎、痛風、反応性関節炎、滑膜炎、又は阻血性壊死である、請求項４３～４６のいずれか一項に記載の方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
（関連出願の相互参照）
本出願は、２０２２年４月１５日に出願された米国仮特許出願第６３／３３１，５３４号の優先権を主張するものであり、あらゆる目的のためにその全体が本明細書に組み込まれる。
【０００２】
配列表
添付の配列表の資料は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。２０２３－０４－１１　Ｓｅｑｕｅｎｃｅ＿Ｌｉｓｔｉｎｇ＿ＳＴ２６　０５２５６６－５０６００１ＷＯ．ｘｍｌという名称の添付ファイルは、２０２３年４月１１日に作成され、サイズは１８７，７７８バイトである。
【背景技術】
【０００３】
バイオポリマーを使用して生物学的活性物質の特性を改変することは、幅広い医学的及び生物学的応用例にわたって繰り返し見られるテーマである。様々な化学リンカーを使用して生物活性ペプチド又はタンパク質をバイオポリマーに付着させることで、得られたコンジュゲートの薬理学的特性を改変し、特定の疾患の最適な治療を提供できる薬物として利用することができる。単一のバイオポリマー鎖にコンジュゲートした１種又は複数種のペプチドの複数のコピーを含むペプチド－ポリマーコンジュゲートは、ペプチドの薬理学的特性に、（１）生物学的標的に対する結合親和性の向上、（２）標的組織内での拡散の遅延、及び（３）ペプチド又はタンパク質の生物学的活性を不活性化し得るプロテアーゼの阻害、といった特定の改善をもたらすために使用されている。
【０００４】

ペプチド－ポリマーコンジュゲートのこれらの改善された薬理学的特性は、患部組織に直接送達される強力な薬物の送達に特に有用である。薬物が標的組織に局所的に投与されるため、組織に直接送達される用量は、全身投与後に同じ治療効果を実現するのに必要とされる用量よりも低くすることができる。また、血液からの輸送特性が乏しい組織に対しても薬物を投与することが可能である。直接的な薬物投与が一般的である組織の具体例としては、硝子体内注射による後眼房及び関節内注射による関節が挙げられる。

【０００５】

しかしながら、局所的組織投与では、必要とされる注射を安全に行うために専門家が必要となり、全身投与と比較して投与することの負担が大きく、コストもかかる。ペプチド薬物がペプチド－ポリマーコンジュゲートの一部として投与される場合、薬物投与の頻度を実質的に減少させることが可能であり、それによって効果的な治療を受けるための患者の負担を軽減することができる。更に、局所注射の回数の低減は、局所的組織損傷又は注射による有害作用のリスクを低減する。最後に、投与頻度を減らすニーズは、標的組織内の薬物濃度が治療濃度を下回る時間を短縮することができ、それによって薬物の全体的な有効性を改善することができる。このような利点から、種々の疾患のためのタンパク質－ポリマー医薬品（drug product）を開発する強い動機が存在する。

【０００６】

多くのヒト化モノクローナル抗体は、安定性が低く凝集しやすいなど、生物物理学的特性が不十分である。これらの好ましくない傾向は、ヒト化抗体断片では更に顕著となる場合があり、かなりの程度の修飾を必要とすることが多い。

【０００７】

ペプチド－ポリマーコンジュゲートを医薬品として適切に製剤化するためには、患者において適切な投薬を可能にする十分に高い薬物濃度を達成することが必要である。また、高い生物活性及び保存安定性を示す精製されたペプチド－ポリマーコンジュゲートを調製することも必要であり、例えば、製造日から臨床使用日まで最長２年間、溶液中で保持できるものである。ペプチド－ポリマーコンジュゲート間の相互作用は、これらの薬物有効化特性のいずれかを完成させる能力に悪影響を及ぼす可能性がある。

【０００８】

ペプチドのヒト化度の程度及びポリマーへの結合に使用されるペプチドリンカーの二次構造は、コンジュゲートの薬理学的特性、コンジュゲート内相互作用、及びコンジュゲート間相互作用に対して実質的な影響を与え得る。したがって、所与の疾患に対して好ましい薬理学的特性を達成し、医薬品への製剤化の成功を可能にする、特定のペプチドリンカーを有するヒト化ペプチド－ポリマーコンジュゲートの開発が必要とされている。本発明は、これらのニーズ及び他のニーズに応えるものである。

【発明の概要】

【０００９】

いくつかの実施形態では、本発明のペプチドは、式（Ｉ）を有するペプチドであって、

式中、ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３が、各々独立して相補性決定領域であり；

ＦＲ１が、X^{10}ＶＱＬX^{11}ＥX^{12}ＧＧＧ$X^{13}$$X^{14}$Ｑ$X^{15}$Ｇ$X^{16}$ＳＬＲＬＳＣ$X^{17}$$X^{18}$ＳＧ（配列番号１）

（式中、

X^{10}は、Ｑ、Ｅ、又はＤであり、

X^{11}は、Ｖ、Ｑ、Ａ、又はＥであり、

X^{12}は、Ｓ又はＴであり、

X^{13}は、Ｌ、Ｓ、又はＶであり、

X^{14}は、Ｖ又はＡであり、

X^{15}は、Ｐ、Ａ、又はＴであり、

X^{16}は、Ｇ、Ｄ、又はＲであり、

X^{17}は、Ａ、Ｖ、Ｔ、又はＥであり、

X^{18}は、Ａ又はＶである）を含むアミノ酸配列を有し、

ＦＲ２が、Ｘ^{20}Ｘ^{21}ＷＸ^{22}ＲＱＸ^{23}ＰＧＫＸ^{24}Ｘ^{25}ＥＸ^{26}ＶＸ^{27}Ｘ^{28}Ｉ（配列番号２）
（式中、
Ｘ^{20}は、Ｍ、Ｉ、Ｖ、又はＬであり、
Ｘ^{21}は、Ｇ、Ｓ、又はＡであり、
Ｘ^{22}は、Ｆ、Ｙ、又はＶであり、
Ｘ^{23}は、Ａ、Ｖ、Ｐ、又はＴであり、
Ｘ^{24}は、Ｅ、Ｇ、Ａ、又はＱであり、
Ｘ^{25}は、Ｒ又はＬであり、
Ｘ^{26}は、Ｆ、Ｇ、Ｗ、又はＬであり、
Ｘ^{27}は、Ａ、Ｇ、又はＳであり、
Ｘ^{28}は、Ａ、Ｓ、又はＧである）を含むアミノ酸配列を有し、
ＦＲ３が、ＹＸ^{30}ＤＳＶＫＧＲＦＴＩＳＸ^{31}ＤＸ^{32}Ｘ^{33}ＫＸ^{34}Ｘ^{35}ＶＸ^{36}ＬＱＭＸ^{37}Ｘ^{38}ＬＲＸ^{39a}ＥＤＴＡＸ^{39b}ＹＹＣＡＡ（配列番号３）
（式中、
Ｘ^{30}は、Ａ、Ｇ、Ｓ、又はＴであり、
Ｘ^{31}は、Ｒ又はＱであり、
Ｘ^{32}は、Ｎ、Ｓ、又はＤであり、
Ｘ^{33}は、Ｓ、Ａ、又はＤであり、
Ｘ^{34}は、Ｎ又はＫであり、
Ｘ^{35}は、Ｔ又はＭであり、
Ｘ^{36}は、Ｙ、Ｄ、又はＳであり、
Ｘ^{37}は、Ｎ又はＤであり、
Ｘ^{38}は、Ｓ又はＮであり、
Ｘ^{39a}は、Ｐ又はＡであり、
Ｘ^{39b}は、Ｖ、Ｍ、Ｌ、又はＩである）を含むアミノ酸配列を有し、
ＦＲ４が、
ＹＷＧＸ^{40}ＧＴＸ^{41}ＶＴＶＳＳ（配列番号４）
（式中、
Ｘ^{40}は、Ｑ又はＫであり、
Ｘ^{41}は、Ｌ又はＱである）を含むアミノ酸配列を有する、ペプチドである。

【００１０】

いくつかの実施形態は、本発明のペプチドを調製する方法は、（ａ）該ペプチドをコードする遺伝子配列を第１の反応混合物中、細菌において翻訳すること、並びに（ｂ）第１の反応混合物及びエチレンジアミン四酢酸（ＥＤＴＡ）から第２の反応混合物を形成することによって第１の反応混合物からエンドトキシンを除去すること、を含み、これによりペプチドを調製する。

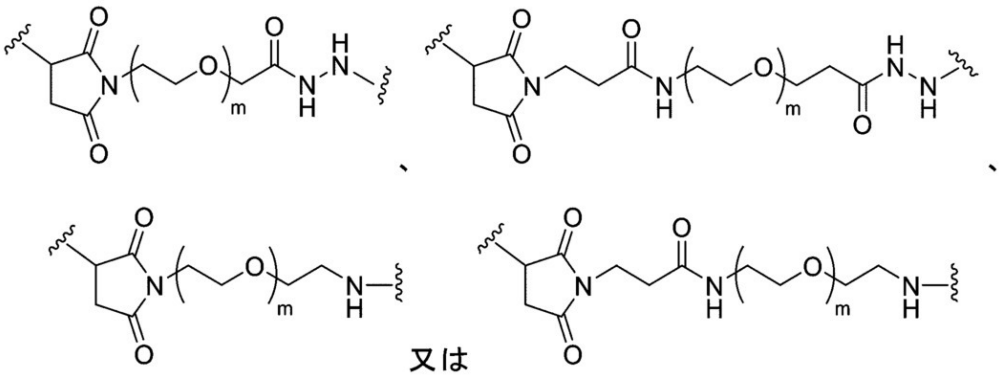
【００１１】

いくつかの実施形態では、本発明のコンジュゲートは、式ＩＩａ：
（Ｘ^{1}－Ｘ^{2}－Ｙ）$_{n}$－Ｚ（ＩＩａ）
のコンジュゲートであり、
式中、
各Ｘ^{1}は、独立して、本明細書に記載のペプチドであり、
各Ｘ^{2}は、独立して、３～１００アミノ酸長のペプチドリンカーであり、
各Ｙは、独立して、有機リンカーであり、
Ｚは、約０．１ＭＤａ～約３ＭＤａの分子量を有する生体適合性ポリマーであり、
下付き文字ｎは、１～１５００の整数である。

【００１２】

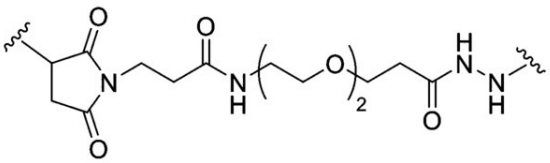
いくつかの実施形態では、本発明のコンジュゲートは、式ＩＩｂ：
（Ｘ^{1}－Ｘ^{2A}－Ｙ）$_{n}$－Ｚ（ＩＩｂ）

のコンジュゲートであり、
式中、
各X^1は、独立して、約５ｋＤａ～約２００ｋＤａの分子量を有するペプチドであり、
各X^{2A}は、独立して、αヘリックスを含むペプチドリンカーであり、
各Ｙは、独立して、有機リンカーであり、
Ｚは、約０．１ＭＤａ～約３ＭＤａの分子量を有する生体適合性ポリマーであり、
下付き文字ｎは、１～１５００の整数である。
【００１３】
いくつかの実施形態では、コンジュゲートは、式ＩＩａ：
$(X^1-X^2-Y)_n-Z$　（ＩＩａ）
のコンジュゲートであり、
式中、
各X^1は、独立して、本明細書に記載のペプチドであり、
各X^2は、ＡＥＡＡＡＫＥＡＡＡＫＥＡＡＡＫＡＧＣ（配列番号２１）を含むアミノ酸配列を有するペプチドリンカーであり、
各Ｙは、構造：
【化１】



又は

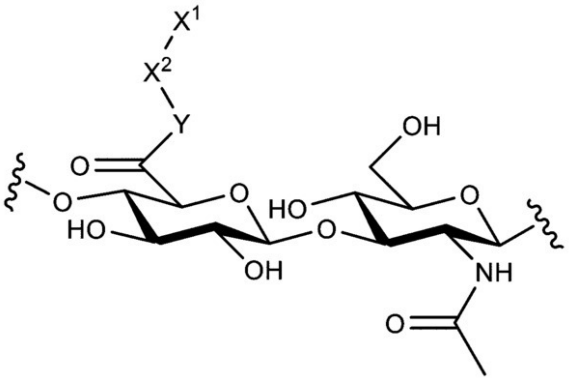
を有する有機リンカーであり、
Ｚは、約０．１ＭＤａ～約３ＭＤａの分子量を有するヒアルロン酸である生体適合性ポリマーであり、
下付き文字ｍは、１～３００の整数であり、
下付き文字ｎは、１～１５００の整数である。
【００１４】
いくつかの実施形態では、本発明のコンジュゲートは、約０．８ＭＤａの分子量を有する式ＩＩＩａ：
$(X^1-X^2-Y-Z^1)_n-(Z^2)_p-(Z^3)_q$　（ＩＩＩａ）
のランダムポリマーであるコンジュゲートであり、
式中、
各X^1は、配列番号６７を含む抗ＶＥＧＦアミノ酸配列を有するペプチドであり、
各X^2は、ＡＥＡＡＡＫＥＡＡＡＫＥＡＡＡＫＡＧＣ（配列番号２１）を含むアミノ酸配列を有するペプチドリンカーであり、
各Ｙは、構造：
【化２】



を有する有機リンカーであり、

各Ｘ^{1}－Ｘ^{2}－Ｙ－Ｚ^{1}部分は、構造：

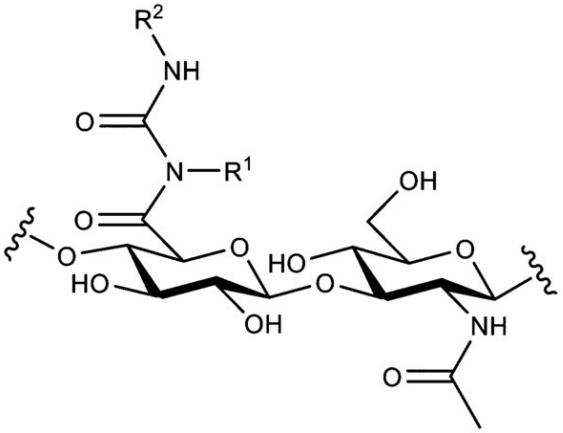
【化３】



を有し、

各Ｚ^{2}は、構造：

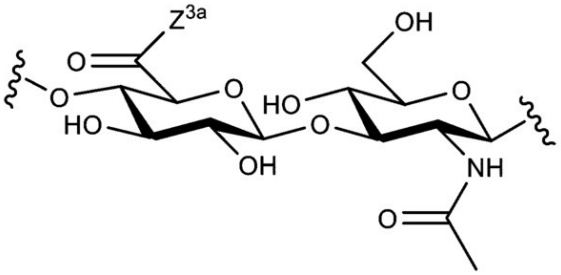
【化４】



を有し、

各Ｚ^{3}は、独立して、構造：

【化５】

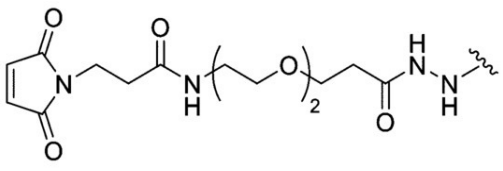


を有し、

各Ｚ^{3}^{a}は、独立して、ＯＨ又はＹ’であり、

各Ｙ’は、構造：

【化６】



を有し、

各Ｒ^{1}及びＲ^{2}は、エチル又は－（ＣＨ$_{2}$）$_{3}$－ＮＭｅ$_{2}$であり、

下付き文字ｎは、１０～３００の整数であり、下付き文字ｎ、ｐ、及びｑの合計の約１０％未満であり、
下付き文字ｐは、１～１５の整数であり、下付き文字ｎ、ｐ、及びｑの合計の約０．５％未満であり、
下付き文字ｑは、１０００～３０００の整数である。

【００１５】

いくつかの実施形態では、本発明の医薬組成物は、本明細書に記載のコンジュゲートと、薬学的に許容される賦形剤とを含む。

【００１６】

いくつかの実施形態では、本発明の方法は、眼障害の治療を必要とする対象において眼障害を治療する方法であって、本明細書に記載のコンジュゲートを該対象に投与することを含む、方法である。

【００１７】

いくつかの実施形態では、本発明の方法は、関節の疾患又は障害の治療を必要とする対象において関節の疾患又は障害を治療する方法であって、本明細書に記載のコンジュゲートを該対象に投与することを含む、方法である。

【図面の簡単な説明】

【００１８】

【図１Ａ】発現オープンリーディングフレーム（ＯＲＦ）を示す。

【図１Ｂ】は、異なるペプチドリンカーを含むＨｕ２Ｈ１０又は２Ｈ１０の可溶性発現（ｍＡＵ＊ｍＬ）を示す。

【図１Ｃ】Ｈｕ２Ｈ１０＿５ＭＵＴ（配列番号５５）、Ｈｕ２Ｈ１０＿５ＭＵＴ＿ＣＹＳ（配列番号１４１）、又はＨｕ２Ｈ１０＿５ＭＵＴ＿ａＨ＿ＣＹＳ（配列番号１４２）のＳＤＳ－ＰＡＧＥによるタンパク質発現を示す。

【図１Ｄ】ＨｕＮｂ４２＿Ａ８８Ｐ（配列番号６７）又はＨｕＮｂ４２＿Ａ８８Ｐ　ａＨ＿ＣＹＳ（配列番号１４５）の可溶性発現（フォールドプロセス収率）を示す。

【００１９】

【図２】２Ｈ１０及び点変異バリアントのアミノ酸配列を示す。

【００２０】

【図３】Ｈｕ２Ｈ１０変異体のタンパク質発現を示す。Ｙ軸は、固定化金属アフィニティクロマトグラフィー（ＩＭＡＣ）のピーク面積（ｍＡＵ＊ｍＬ）を示す。Ｘ軸は、Ｈｕ２Ｈ１０＿５ＭＵＴ（「ＷＴ（５ＭＵＴ）」）（配列番号５５）、Ｈｕ２Ｈ１０＿５ＭＵＴ＿Ｒ８６Ｋ＿Ａ８７Ｐ（「Ｒ８６Ｋ＿Ａ８７Ｐ」）（配列番号５６）、Ｈｕ２Ｈ１０＿５ＭＵＴ＿Ｌ１１５Ｑ（「Ｌ１１５Ｑ」）（配列番号５７）、Ｈｕ２Ｈ１０＿５ＭＵＴ＿Ｒ８６Ｋ＿Ａ８７Ｐ＿Ｌ１１５Ｑ（「Ｒ８６Ｋ＿Ａ８７Ｐ＿Ｌ１１５Ｑ」）（配列番号５８）のタンパク質発現を示す。

【００２１】

【図４】Ｎｂ４２及び点変異バリアントのアミノ酸配列を示す。

【００２２】

【図５】ＨｕＮｂ４２及び点変異バリアントを発現した大腸菌（E.coli）細胞抽出物のクマシーブリリアントブルー（ＣＢＢ）染色を示す。

【００２３】

【図６】細胞質及びペリプラズムにおけるＨｕＮｂ４２（配列番号６１）及びＨｕＮｂ４２　Ａ８８Ｐ（配列番号６７）点変異バリアントの相対的な大腸菌（E.coli）細胞培養収率を示す。

【００２４】

【図７】カプラシズマブ、ベバシズマブ、及びラニビズマブと比較した、Ｎｂ４２（配列番号６１）、ＨｕＮｂ４２（配列番号６２）、及びＨｕＮｂ４２＿Ａ８８Ｐ（配列番号６７）の相対的ヒト化度を示す。

【００２５】

【図８】ａＴＮＦａＭｕ（配列番号７１）又はａＴＮＦａＭｕ＿３ＭＵＴ（配列番号７２）を、室温、５０℃、６０℃、７０℃、及び８０℃で発現した大腸菌（E.coli）細胞抽出物のクマシーブリリアントブルー（ＣＢＢ）染色を示す。
【００２６】
【図９】Ｅ１－１（配列番号８１）、並びに点変異体Ｅ１－１　Ｆ１１Ｌ（配列番号８２）、Ｅ１－１　Ｓ４９Ａ（配列番号８３）、Ｅ１－１　Ｆ１１Ｌ／Ｓ４９Ａ（配列番号８４）及びＥ１－１　ＣＤＲ（配列番号８５）の相対的タンパク質発現を示す。
【００２７】
【図１０Ａ】１８℃及び３７℃で誘導した精製ＨｕＮｂ４２タンパク質（配列番号６２）のクマシーブリリアントブルー（ＣＢＢ）染色を示す。
【図１０Ｂ】１６℃、２７℃、３０℃及び３７℃で誘導した精製Ｈｕ２Ｈ１０＿５ＭＵＴタンパク質（配列番号５５）を示す。
【００２８】
【図１１Ａ】ＥＤＴＡ処理なし（「２２０１１９」）及びＥＤＴＡ処理あり（「２２０２０４」）のＨｕＮｂ４２　Ａ８８Ｐ（配列番号６７）の２つの調製物を示す。
【図１１Ｂ】ＥＤＴＡによる処理前（「インプット」）及びＥＤＴＡによる処理後に５０ｋＤａ（「５０ｋＤａ　ＦＴ」）又は１００ｋＤａ（「１００ｋＤａ　ＦＴ」）ポリエーテルスルホン膜を通した濾過後のＴＮＦα３ＭＵＴ（配列番号１０４）の回収率（左）と、濾過前（「インプット」）及び５０ｋＤａ（「５０ｋＤａ　ＦＴ」）又は１００ｋＤａ（「１００ｋＤａ　ＦＴ」）ポリエーテルスルホン膜を通した濾過後のエンドトキシンレベル（右）を示す。
【図１１Ｃ】精製ａＡｎｇ２＿Ｄ４＿ａＨ＿ＣＹＳ（配列番号１２０）のＳＤＳ－ＰＡＧＥゲルを示す。
【００２９】
【図１２】方法１（コンジュゲート５、コンジュゲート２）及び方法５（コンジュゲート３、コンジュゲート６、コンジュゲート７）によって調製されたＤＡＲＰｉｎ多価タンパク質（ＭＶＰ）のR_h分布を示す。方法５を使用して調製されたＭＶＰは、より小さいＭＶＰ半径を示した。
【００３０】
【図１３Ａ】ＭＶＰの活性を示す。図１３Ａは、異なる中間体及び抗ＶＥＧＦ　Ｅ１－１ペプチドを使用して作製された抗ＶＥＧＦ　ＭＶＰのバイオレイヤー干渉法（ＢＬＩ）のＶＥＧＦ会合及び解離曲線を示す。上：方法２のコンジュゲート１０（K_D＝０．１２３ｎＭ）の会合及び解離曲線。下：方法５のコンジュゲート８（K_D＝０．１８４ｎＭ）であり、異なる濃度のコンジュゲート８のベースライン、会合、及び解離曲線を示す（ｘ軸：秒単位の時間、ｙ軸：ＢＬＩシグナル）。両方のコンジュゲートは、類似した結合カイネティクスの曲線及び計算された解離定数を示す。図１３Ｂは、２つのペプチドのＶＥＧＦ結合親和性（「ＫＤ」、ｎＭ）を、対応するＭＶＰと比較して示す。第１のバー：非コンジュゲート２Ｈ１０＿５ＭＵＴ＿ａＨ＿ＣＹＳ（配列番号１４２）；第２のバー：非コンジュゲートＨｕＮｂ４２＿Ａ８８Ｐ＿ａＨ＿ＣＹＳ（配列番号１４５）；第３のバー：２Ｈ１０＿５ＭＵＴ＿ａＨ＿ＣＹＳ（配列番号１４２）を含有するＭＶＰ；第４のバー：ＨｕＮｂ４２＿Ａ８８Ｐ＿ａＨ＿ＣＹＳ（配列番号１４５）を含有するＭＶＰ。
【図１３Ｂ】ＭＶＰの活性を示す。図１３Ａは、異なる中間体及び抗ＶＥＧＦ　Ｅ１－１ペプチドを使用して作製された抗ＶＥＧＦ　ＭＶＰのバイオレイヤー干渉法（ＢＬＩ）のＶＥＧＦ会合及び解離曲線を示す。上：方法２のコンジュゲート１０（K_D＝０．１２３ｎＭ）の会合及び解離曲線。下：方法５のコンジュゲート８（K_D＝０．１８４ｎＭ）であり、異なる濃度のコンジュゲート８のベースライン、会合、及び解離曲線を示す（ｘ軸：秒単位の時間、ｙ軸：ＢＬＩシグナル）。両方のコンジュゲートは、類似した結合カイネティクスの曲線及び計算された解離定数を示す。図１３Ｂは、２つのペプチドのＶＥＧＦ結合親和性（「ＫＤ」、ｎＭ）を、対応するＭＶＰと比較して示す。第１のバー：非コンジュゲート２Ｈ１０＿５ＭＵＴ＿ａＨ＿ＣＹＳ（配列番号１４２）；第２のバー：非コ

ンジュゲートＨｕＮｂ４２＿Ａ８８Ｐ＿ａＨ＿ＣＹＳ（配列番号１４５）；第３のバー：２Ｈ１０＿５ＭＵＴ＿ａＨ＿ＣＹＳ（配列番号１４２）を含有するＭＶＰ；第４のバー：ＨｕＮｂ４２＿Ａ８８Ｐ＿ａＨ＿ＣＹＳ（配列番号１４５）を含有するＭＶＰ。

【００３１】

【図１４】様々なエージングでのＭＶＰの安定性試料のＳＥＣトレースを示す（ｘ軸：保持時間、ｙ軸：２８０ｎｍでの吸光度）。方法５（コンジュゲート１、上）又は方法１（コンジュゲート２、下）を使用して合成され、３７℃で最大７１日間保存された中間体を用いて作製された抗ＶＥＧＦ　ＤＡＲＰｉｎ　ＭＶＰのＳＥＣ保持時間の変化の例。方法５（上）で合成されたＭＶＰは、エージングによる半径減少が大きかった。

【００３２】

【図１５】３７℃で２８日間及び３２日間の加速条件下でのエージング後の、方法１（コンジュゲート２、上の線）又は方法５（コンジュゲート３、下の線）の中間体を使用して作製されたＤＡＲＰｉｎ　ＭＶＰの回転半径の変化を示す。

【００３３】

【図１６】３７℃でのエージング前後の方法１、方法２、又は方法５の中間体を使用して作製されたＢＩ　ＶＨＨ抗ＶＥＧＦ　ＭＶＰのＶＥＧＦ結合定数（K_D）を示す。安定性試験の４日目までに、方法５の中間体を用いて合成されたＭＶＰは、もはやＶＥＧＦに結合しなかった。ＢＬＩ検出限界（ＬＯＤ）は、０．００１ｎＭである。図に列挙されたこの値を有する試料は、K_DのＢＬＩ　ＬＯＤ未満であった。

【００３４】

【図１７】３７℃で２８日間及び３２日間の加速条件下でのエージング後の、方法１（コンジュゲート２、四角、上の線）又は方法５（コンジュゲート１、三角、下の線）の中間体を使用して作製されたＤＡＲＰｉｎ　ＭＶＰの会合定数（K_{on}）の変化を示す。コンジュゲート１では、より低いK_{on}及びより遅い会合が、最初に、そしてエージングによって観察され、このことはコンジュゲート２の低不純度のポリマーがK_{on}を安定化及び増強していたことを示唆している。

【００３５】

【図１８】ＶＨＨ及び方法１の中間体を用いて合成したＭＶＰの、ウサギでの硝子体内注射後のインビボ半減期延長を示す。コンジュゲート１２の抗ＴＮＦαＶＨＨ　ＭＶＰ（方法１の中間体）のウサギ硝子体内薬物動態（ＩＶＴ　ＰＫ）試験、非コンジュゲートに対して２倍超の半減期延長。１時点当たりｎ＝３眼。全ての眼に５０μｇのＶＨＨを投与した。

【発明を実施するための形態】

【００３６】

Ｉ．全般

本発明は、各生物学的に活性なペプチドをポリマーに共有結合させるためにペプチドリンカーを使用する多価ペプチド－ヒアルロン酸ポリマーコンジュゲート、及びそれを調製する方法を提供する。いくつかの実施形態では、ペプチドリンカーはαヘリックスである。本ペプチドは、安定性と、細菌系（例えば、大腸菌（E.coli））において許容可能なレベルで発現する能力とを保持しながら、ヒト化の程度を高めるように修飾されている。対応するコンジュゲートは、他のヒト化抗体に匹敵する免疫原性を有することが期待される。

【００３７】

ＩＩ．定義

別段の指示がない限り、本明細書で使用される全ての技術用語及び科学用語は、本発明が属する技術分野における当業者によって一般的に理解されるものと同じ意味を有する。加えて、本明細書に記載される方法又は材料と類似又は同等の任意の方法又は材料が、本発明の実施において使用することができる。本発明の目的のために、以下の用語を定義する。

【００３８】

値に言及する場合の「約」は、記載値から＋／－１０％の記載値を含む。例えば、約５０％は、４５％～５５％の範囲を含み、約２０モル当量は、１８～２２モル当量の範囲を含む。したがって、範囲に言及する場合、「約」は、その範囲の両端の各記載値から＋／－１０％の各記載値を指す。例えば、約１～約３（重量／重量）の比は、０．９～３．３の範囲を含む。

【００３９】

「アルキル」は、直鎖又は分枝鎖の飽和一価又は二価炭化水素である。例えば、アルキルは、１～１０個の炭素原子（すなわち、$C_{1～10}$アルキル）又は１～８個の炭素原子（すなわち、$C_{1～8}$アルキル）又は１～６個の炭素原子（すなわち、$C_{1～6}$アルキル）又は１～４個の炭素原子（すなわち、（$C_{1～4}$アルキル）を有してもよい。アルキル基の例としては、メチル（Ｍｅ、－CH_3）、エチル（Ｅｔ、－CH_2CH_3）、１－プロピル（ｎ－Ｐｒ、ｎ－プロピル、－$CH_2CH_2CH_3$）、２－プロピル（ｉ－Ｐｒ、ｉ－プロピル、－$CH(CH_3)_2$）、１－ブチル（ｎ－Ｂｕ、ｎ－ブチル、－$CH_2CH_2CH_2CH_3$）、２－メチル－１－プロピル（ｉ－Ｂｕ、ｉ－ブチル、－$CH_2CH(CH_3)_2$）、２－ブチル（ｓ－Ｂｕ、ｓ－ブチル、－$CH(CH_3)CH_2CH_3$）、２－メチル－２－プロピル（ｔ－Ｂｕ、ｔ－ブチル、－$C(CH_3)_3$）、１－ペンチル（ｎ－ペンチル、－$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_3$）、２－ペンチル（－$CH(CH_3)CH_2CH_2CH_3$）、３－ペンチル（－$CH(CH_2CH_3)_2$）、２－メチル－２－ブチル（－$C(CH_3)_2CH_2CH_3$）、３－メチル－２－ブチル（－$CH(CH_3)CH(CH_3)_2$）、３－メチル－１－ブチル（－$CH_2CH_2CH(CH_3)_2$）、２－メチル－１－ブチル（－$CH_2CH(CH_3)CH_2CH_3$）、１－ヘキシル（－$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_3$）、２－ヘキシル（－$CH(CH_3)CH_2CH_2CH_2CH_3$）、３－ヘキシル（－$CH(CH_2CH_3)(CH_2CH_2CH_3)$）、２－メチル－２－ペンチル（－$C(CH_3)_2CH_2CH_2CH_3$）、３－メチル－２－ペンチル（－$CH(CH_3)CH(CH_3)CH_2CH_3$）、４－メチル－２－ペンチル（－$CH(CH_3)CH_2CH(CH_3)_2$）、３－メチル－３－ペンチル（－$C(CH_3)(CH_2CH_3)_2$）、２－メチル－３－ペンチル（－$CH(CH_2CH_3)CH(CH_3)_2$）、２，３－ジメチル－２－ブチル（－$C(CH_3)_2CH(CH_3)_2$）、３，３－ジメチル－２－ブチル（－$CH(CH_3)C(CH_3)_3$、及びオクチル（－$(CH_2)_7CH_3$）が挙げられるが、これらに限定されない。

【００４０】

「シクロアルキル」は、３～２０個の環状炭素原子（すなわち、$C_{3～20}$シクロアルキル）、例えば３～１２個の環状原子、例えば３～１０個の環状原子、又は３～８個の環状原子、又は３～６個の環状原子、又は３～５個の環状原子、又は３～４個の環状原子を有する単一の飽和又は部分的に不飽和の全炭素環を指す。用語「シクロアルキル」はまた、複数の縮合した、飽和及び部分的に不飽和の全炭素環系（例えば、２、３又は４個の炭素環式環を含む環系）も含む。したがって、シクロアルキルは、二環式炭素環（例えば、ビシクロ［３．１．０］ヘキサン及びビシクロ［２．１．１］ヘキサンなどの約６～１２個の環状炭素原子を有する二環式炭素環）、及び多環式炭素環（例えば、約２０個までの環状炭素原子を有する三環式及び四環式炭素環）などの多環式炭素環を含む。複数の縮合環系の環は、価数要件によって許容される場合、縮合結合、スピロ結合、及び架橋結合を介して互いに連結され得る。単環式シクロアルキルの非限定的な例としては、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、１－シクロペンタ－１－エニル、１－シクロペンタ－２－エニル、１－シクロペンタ－３－エニル、シクロヘキシル、１－シクロヘキサ－１－エニル、１－シクロヘキサ－２－エニル、及び１－シクロヘキサ－３－エニルが挙げられる。

【００４１】

本明細書で使用される「有機リンカー」は、ペプチドをポリマーに直接的又は間接的に共有結合させる化学部分を指す。本発明において有用な有機リンカーは、約１００Ｄａ～５００Ｄａであり得る。本発明の有機リンカーのタイプとしては、イミド、アミド、アミ

ン、エステル、カルバメート、尿素、チオエーテル、チオカルバメート、チオカーボネート及びチオ尿素が挙げられるが、これらに限定されない。当業者であれば、他のタイプの有機リンカーが本発明において有用であることを理解するであろう。

【００４２】

「チオール」は、－ＳＨ官能基を指す。

【００４３】

「チオール反応性基」は、チオールと反応して硫黄原子への共有結合を形成することができる基を指す。代表的なチオール反応性基としては、チオール、ＴＮＢ－チオール、ハロアセチル、アジリジン、アクリロイル、ビニルスルホン、ＡＰＮ（３－アリールプロピオロニトリル）、マレイミド、及びピリジルジスルフィドが挙げられるが、これらに限定されない。チオール反応性基とチオールとの反応は、ジスルフィド又はチオエーテルを形成することができる。

【００４４】

本明細書で使用される「カップリング剤」は、カルボン酸（－（Ｃ＝Ｏ）－ＯＨ）とアミン（－ＮＨ$_2$）基との間の反応をもたらすことにより、アミド（－（Ｃ＝Ｏ）－ＮＨ－）を形成する試薬を指す。

【００４５】

「ペプチド」、「ポリペプチド」、及び「タンパク質」は、本明細書では互換的に使用され、任意の長さの天然に存在するアミノ酸及び合成アミノ酸、並びに天然に存在するアミノ酸と類似の様式で機能するアミノ酸類似体及びアミノ酸模倣物を指す。「ペプチド」という用語は、異種アミノ酸配列を有する融合タンパク質、異種及び同種リーダー配列を有する融合物（Ｎ末端メチオニン残基を有する又は有さない）、免疫学的にタグ付けされたタンパク質などを含むが、これらに限定されない融合タンパク質を含む。ペプチドは、翻訳後修飾ペプチドを更に含む。

【００４６】

本明細書で使用される「ＶＨＨ」は、単一ドメイン重鎖抗体を指す。

【００４７】

「ＤＡＲＰｉｎ」は、設計されたアンキリンリピートタンパク質を指し、高度な特異性及び高親和性の標的タンパク質結合を示すことができる遺伝子操作された抗体模倣タンパク質である。

【００４８】

「アルファヘリックス」又は「αヘリックス」は、タンパク質の二次構造における共通モチーフであり、全ての骨格Ｎ－Ｈ基がタンパク質配列上で４残基前に位置するアミノ酸の骨格Ｃ＝Ｏ基に水素結合する右巻き構造である。αヘリックスは、古典的なＰａｕｌｉｎｇ－Ｃｏｒｅｙ－Ｂｒａｎｓｏｎαヘリックス、又は３．６$_{13}$－ヘリックスとしても知られている。３．６$_{13}$－ヘリックスは、ヘリックス１回転当たりの残基の平均数（３．６）と、水素結合によって形成された環に含まれる１３個の原子とを表している。αヘリックスを含むペプチドは、αヘリックス状であると言われる。このようなペプチドは、部分的に又は完全にαヘリックス状であり得る。当該分野で理解されるように、αヘリックスは、少なくとも４つのアミノ酸残基を有する。いくつかの実施形態では、αヘリックスは、４～４０個のアミノ酸を有する。

【００４９】

本明細書に記載のペプチド又はコンジュゲートの薬学的に許容される塩も提供される。「薬学的に許容される」又は「生理学的に許容される」とは、獣医学的使用又はヒトの医薬的使用に好適な医薬組成物の調製に有用である化合物、塩、組成物、剤形及び他の材料を指す。

【００５０】

本明細書で使用される「医薬組成物」は、特定の成分を特定の量で含む生成物、及び特定の量の特定の成分の組み合わせから直接的又は間接的に生じる任意の生成物を指す。医薬組成物は、一般に生物学的使用に安全である。

【００５１】
本明細書で使用される「薬学的に許容される賦形剤」は、対象への活性薬剤の投与及び対象による吸収を補助する物質を指す。本発明において有用な薬学的に許容される賦形剤としては、結合剤、充填剤、崩壊剤、滑沢剤、コーティング剤、甘味料、香味料及び着色料が挙げられるが、これらに限定されない。当業者であれば、他の薬学的に許容される賦形剤が本発明において有用であることを認識するであろう。
【００５２】
本明細書に記載のコンジュゲートは、薬学的に許容される塩として、又は適切な場合には遊離塩基として調製及び／又は製剤化することができる。薬学的に許容される塩は、遊離塩基の所望の薬理学的活性を保持する化合物の遊離塩基形態の非毒性塩である。これらの塩は、無機又は有機の酸又は塩基から誘導され得る。例えば、塩基性窒素を含有するコンジュゲートは、化合物を無機酸又は有機酸と接触させることによって、薬学的に許容される塩として調製することができる。薬学的に許容される塩の非限定的な例としては、硫酸塩、ピロ硫酸塩、重硫酸塩、亜硫酸塩、重亜硫酸塩、リン酸塩、リン酸一水素塩、リン酸二水素塩、メタリン酸塩、ピロリン酸塩、塩化物、臭化物、ヨウ化物、酢酸塩、プロピオン酸塩、デカン酸塩、カプリル酸塩、アクリル酸塩、ギ酸塩、イソ酪酸塩、カプロン酸塩、ヘプタン酸塩、プロピオール酸塩、シュウ酸塩、マロン酸塩、コハク酸塩、スベリン酸塩、セバシン酸塩、フマル酸塩、マレイン酸塩、ブチン－１，４－ジオエート、ヘキシン－１，６－ジオエート、安息香酸塩、クロロ安息香酸塩、メチル安息香酸塩、ジニトロ安息香酸塩、ヒドロキシ安息香酸塩、メトキシ安息香酸塩、フタル酸塩、スルホン酸塩、メチルスルホン酸塩、プロピルスルホン酸塩、ベシル酸塩、キシレンスルホン酸塩、ナフタレン－１－スルホン酸塩、ナフタレン－２－スルホン酸塩、フェニル酢酸塩、フェニルプロピオン酸塩、フェニル酪酸塩、クエン酸塩、乳酸塩、γ－ヒドロキシ酪酸塩、グリコール酸塩、酒石酸塩、及びマンデル酸塩が挙げられる。他の好適な薬学的に許容される塩のリストは、Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ：Ｔｈｅ Ｓｃｉｅｎｃｅ ａｎｄ Ｐｒａｃｔｉｃｅ ｏｆ Ｐｈａｒｍａｃｙ，２１ｓｔ Ｅｄｉｔｉｏｎ，Ｌｉｐｐｉｎｃｏｔｔ Ｗｉｌｌｉａｍｓ ａｎｄ Ｗｉｌｋｉｎｓ，Ｐｈｉｌａｄｅｌｐｈｉａ，Ｐａ．，２００６に見出される。
【００５３】
本明細書に開示されるコンジュゲートの「薬学的に許容される塩」の例としてはまた、適切な塩基、例えば、アルカリ金属（例えば、ナトリウム、カリウム）、アルカリ土類金属（例えば、マグネシウム）、アンモニウム及びNR_4^+（式中、Ｒは、C_1～C_4アルキルである）から誘導される塩が挙げられる。塩基付加塩、例えばナトリウム塩又はカリウム塩も含まれる。
【００５４】
本明細書で使用される「治療有効量」は、投与目的の治療効果をもたらす用量を指す。正確な用量は、治療の目的によって異なり、当業者であれば公知の技術（例えば、Ｌｉｅｂｅｒｍａｎ，Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｄｏｓａｇｅ Ｆｏｒｍｓ（ｖｏｌｓ．１－３，１９９２）；Ｌｌｏｙｄ，Ｔｈｅ Ａｒｔ，Ｓｃｉｅｎｃｅ ａｎｄ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ ｏｆ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｃｏｍｐｏｕｎｄｉｎｇ（１９９９）；Ｐｉｃｋａｒ，Ｄｏｓａｇｅ Ｃａｌｃｕｌａｔｉｏｎｓ（１９９９）；及びＲｅｍｉｎｇｔｏｎ：Ｔｈｅ Ｓｃｉｅｎｃｅ ａｎｄ Ｐｒａｃｔｉｃｅ ｏｆ Ｐｈａｒｍａｃｙ，２０ｔｈ Ｅｄｉｔｉｏｎ，２００３，Ｇｅｎｎａｒｏ，Ｅｄ．，Ｌｉｐｐｉｎｃｏｔｔ，Ｗｉｌｌｉａｍｓ ＆ Ｗｉｌｋｉｎｓを参照）を用いて確認できるであろう。感作細胞では、治療有効用量は、非感作細胞に対する従来の治療有効用量よりも低くすることができる。
【００５５】
本明細書で使用される「阻害」、「阻害する」及び「阻害剤」は、特定の作用又は機能を妨げる化合物又は妨げる方法を指す。
【００５６】

本明細書で使用される「治療」又は「治療する」又は「治療すること」は、有益な又は所望の結果を得るためのアプローチを指す。本開示の目的のために、有益な又は所望の結果としては、症状の緩和及び／又は症状の程度の低下及び／又は疾患若しくは病態に関連する症状の悪化の予防が挙げられるが、これらに限定されない。一実施形態では、「治療」又は「治療すること」は、以下：ａ）疾患又は病態を抑制すること（例えば、疾患若しくは病態に起因する１つ以上の症状を軽減させる、及び／又は疾患若しくは病態の程度を低下させる）、ｂ）疾患又は病態に関連する１つ以上の症状の発症を遅延又は停止させること（例えば、疾患又は病態を安定化させること、疾患又は病態の悪化又は進行を遅らせること）、並びにｃ）疾患若しくは病態を軽減すること、例えば、臨床症状を退行させること、疾患状態を改善すること、疾患の進行を遅らせること、生活の質を向上させること、及び／又は生存期間を延長すること、のうちの１つ以上を含む。

【００５７】

「予防」は、疾患に罹患している患者における臨床的疾病の進行を予防又は遅延することを指す。

【００５８】

本発明の「対象」は、哺乳動物であり、これは、ヒト又は非ヒト哺乳動物、例えばコンパニオンアニマル、例えばイヌ、ネコ、ラットなど、又は家畜、例えばウマ、ロバ、ラバ、ヤギ、ヒツジ、ブタ若しくはウシなどであり得る。いくつかの実施形態では、対象はヒトである。

【００５９】

本明細書で使用される「関節」は、線維性又は軟骨性の関節を指し、２つ以上の骨が互いに接続する線維性又は軟骨性の領域である。

【００６０】

本明細書で使用される「拡散半減期」は、所与の体積又は空間内のコンジュゲートの初期濃度が半分に減少するのにかかる時間を指し、ここで、濃度の減少は濃度勾配の関数である。

【００６１】

本明細書で使用される「関節内半減期」は、特定の関節内のコンジュゲートの初期濃度が半分に減少するのにかかる時間を指し、ここで、関節からの輸送は対流によるものである。対流輸送は、拡散及び移流による輸送の組み合わせであり、ここで、移流輸送は、全体の動き（bulk motion）による物質の輸送である。

【００６２】

ＩＩＩ．ペプチド

いくつかの実施形態では、本発明のペプチドは、当該技術分野における比較対象のペプチドに対して、例えば、ヒト化度の向上、溶解度の向上、安定性の向上、溶液中での凝集傾向の低下、及び／又は大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）などの好都合な系での発現レベルの向上といった利点をもたらす。

【００６３】

いくつかの実施形態では、ペプチドは、式（Ｉ）：

ＦＲ１－ＣＤＲ１－ＦＲ２－ＣＤＲ２－ＦＲ３－ＣＤＲ３－ＦＲ４（Ｉ）

を有するペプチドであって、

式中、ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３が、各々独立して相補性決定領域であり；

ＦＲ１が、X^{10}ＶＱＬX^{11}ＥX^{12}ＧＧＧ$X^{13}$$X^{14}$Ｑ$X^{15}$Ｇ$X^{16}$ＳＬＲＬＳＣ$X^{17}$$X^{18}$ＳＧ（配列番号１）

（式中、

X^{10}は、Ｑ、Ｅ、又はＤであり、

X^{11}は、Ｖ、Ｑ、Ａ、又はＥであり、

X^{12}は、Ｓ又はＴであり、

X^{13}は、Ｌ、Ｓ、又はＶであり、

X^{14}は、Ｖ又はＡであり、

Ｘ^{15}は、Ｐ、Ａ、又はＴであり、
Ｘ^{16}は、Ｇ、Ｄ、又はＲであり、
Ｘ^{17}は、Ａ、Ｖ、Ｔ、又はＥであり、
Ｘ^{18}は、Ａ又はＶである）を含むアミノ酸配列を有し、
ＦＲ２が、Ｘ^{20}Ｘ^{21}ＷＸ^{22}ＲＱＸ^{23}ＰＧＫＸ^{24}Ｘ^{25}ＥＸ^{26}ＶＸ^{27}Ｘ^{28}Ｉ（配列番号２）
（式中、
Ｘ^{20}は、Ｍ、Ｉ、Ｖ、又はＬであり、
Ｘ^{21}は、Ｇ、Ｓ、又はＡであり、
Ｘ^{22}は、Ｆ、Ｙ、又はＶであり、
Ｘ^{23}は、Ａ、Ｖ、Ｐ、又はＴであり、
Ｘ^{24}は、Ｅ、Ｇ、Ａ、又はＱであり、
Ｘ^{25}は、Ｒ又はＬであり、
Ｘ^{26}は、Ｆ、Ｇ、Ｗ、又はＬであり、
Ｘ^{27}は、Ａ、Ｇ、又はＳであり、
Ｘ^{28}は、Ａ、Ｓ、又はＧである）を含むアミノ酸配列を有し、
ＦＲ３が、ＹＸ^{30}ＤＳＶＫＧＲＦＴＩＳＸ^{31}ＤＸ^{32}Ｘ^{33}ＫＸ^{34}Ｘ^{35}ＶＸ^{36}ＬＱＭＸ^{37}Ｘ^{38}ＬＲＸ^{39a}ＥＤＴＡＸ^{39b}ＹＹＣＡＡ（配列番号３）
（式中、
Ｘ^{30}は、Ａ、Ｇ、Ｓ、又はＴであり、
Ｘ^{31}は、Ｒ又はＱであり、
Ｘ^{32}は、Ｎ、Ｓ、又はＤであり、
Ｘ^{33}は、Ｓ、Ａ、又はＤであり、
Ｘ^{34}は、Ｎ又はＫであり、
Ｘ^{35}は、Ｔ又はＭであり、
Ｘ^{36}は、Ｙ、Ｄ、又はＳであり、
Ｘ^{37}は、Ｎ又はＤであり、
Ｘ^{38}は、Ｓ又はＮであり、
Ｘ^{39a}は、Ｐ又はＡであり、
Ｘ^{39b}は、Ｖ、Ｍ、Ｌ、又はＩである）を含むアミノ酸配列を有し、
ＦＲ４が、ＹＷＧＸ^{40}ＧＴＸ^{41}ＶＴＶＳＳ（配列番号４）
（式中、
Ｘ^{40}は、Ｑ又はＫであり、
Ｘ^{41}は、Ｌ又はＱである）を含むアミノ酸配列を有する、ペプチドである。

【００６４】
いくつかの実施形態では、Ｘ^{13}は、Ｌである。

【００６５】
いくつかの実施形態では、Ｘ^{27}は、Ａである。

【００６６】
いくつかの実施形態では、Ｘ^{30}は、Ａである。

【００６７】
いくつかの実施形態では、Ｘ^{39a}は、Ｐである。

【００６８】
いくつかの実施形態では、Ｘ^{40}は、Ｑである。

【００６９】
いくつかの実施形態では、ＦＲ１は、
ＱＶＱＬＶＥＳＧＧＧＬＶＱＰＧＧＳＬＲＬＳＣＡＡＳＧ（配列番号５）を含むアミノ酸配列を有する。

【００７０】
いくつかの実施形態では、ＦＲ２は、

ＭＧＷＦＲＱＡＰＧＫＥＲＥＦＶＡＡＩ（配列番号６）を含むアミノ酸配列を有する。
【００７１】
いくつかの実施形態では、ＦＲ３は、ＹＡＤＳＶＫＧＲＦＴＩＳＲＤＮＳＫＮＴＶＹＬＱＭＮＳＬＲＰＥＤＴＡＶＹＹＣＡＡ（配列番号７）を含むアミノ酸配列を有する。
【００７２】
いくつかの実施形態では、ＦＲ４は、ＹＷＧＱＧＴＬＶＴＶＳＳ（配列番号８）を含むアミノ酸配列を有する。
【００７３】
いくつかの実施形態では、ＦＲ１は、
ＱＶＱＬＶＥＳＧＧＧＬＶＱＰＧＧＳＬＲＬＳＣＡＡＳＧ（配列番号５）を含むアミノ酸配列を有し、
ＦＲ２は、ＭＧＷＦＲＱＡＰＧＫＥＲＥＦＶＡＡＩ（配列番号６）を含むアミノ酸配列を有し、
ＦＲ３は、ＹＡＤＳＶＫＧＲＦＴＩＳＲＤＮＳＫＮＴＶＹＬＱＭＮＳＬＲＰＥＤＴＡＶＹＹＣＡＡ（配列番号７）を含むアミノ酸配列を有し、
ＦＲ４は、ＹＷＧＱＧＴＬＶＴＶＳＳ（配列番号８）を含むアミノ酸配列を有する。
【００７４】
いくつかの実施形態では、ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３は各々、抗体又はサイトカイン由来の相補性決定領域である。いくつかの実施形態では、抗体は、モノクローナルＩｇＧ、ＩｇＧ断片、一本鎖ｓｃＦｖ、単一ドメイン重鎖ＶＨＨ、アドネクチン、アフィボディ、アンチカリン、ＤＡＲＰｉｎ、又は操作されたクニッツ型阻害剤である。いくつかの実施形態では、相補性決定領域は各々、血管内皮増殖因子（ＶＥＧＦ）、腫瘍壊死因子－アルファ（ＴＮＦ－α）、プログラム細胞死タンパク質１（ＰＤ－１）、プログラム細胞死リガンド－１（ＰＤ－Ｌ１）、細胞傷害性Ｔリンパ球関連タンパク質４（ＣＴＬＡ４）、分化抗原群４０（ＣＤ４０）、分化抗原群１３４（ＣＤ１３４）、分化抗原群１３７（ＣＤ１３７）、グルココルチコイド誘導腫瘍壊死因子受容体関連タンパク質（ＧＩＴＲ）、Ｔ細胞活性化のＶドメイン免疫グロブリンサプレッサー（ＶＩＳＴＡ）、Ｔ細胞免疫グロブリン及びムチンドメイン含有タンパク質３（ＴＩＭ－３）、リンパ球活性化３（ＬＡＧ３）、インターロイキン－１－ベータ（ＩＬ－１β）、インターロイキン－６（ＩＬ－６）、インターロイキン－１０（ＩＬ－１０）、インターロイキン－１２（ＩＬ－１２）、又はインターロイキン－１５（ＩＬ－１５）に特異的である。いくつかの実施形態では、相補性決定領域は各々、血管内皮増殖因子（ＶＥＧＦ）に特異的である。
【００７５】
いくつかの実施形態では、ペプチドは式Ｉからなる。
【００７６】
いくつかの実施形態では、ペプチドは、（ａ）７アミノ酸長のＣＤＲ１、（ｂ）７若しくは８アミノ酸長のＣＤＲ２、及び／又は（ｃ）９～１６アミノ酸長のＣＤＲ３、のうちの１つ以上を有する。
【００７７】
当該ペプチドのいくつかの実施形態では、（ａ）ＣＤＲ１は、ＦＡＹＳＴＹＳ（配列番号９）を含むアミノ酸配列を有し、ＣＤＲ２は、ＮＳＧＴＦＲＬＷ（配列番号１０）を含むアミノ酸配列を有し、ＣＤＲ３は、ＲＡＷＳＰＹＳＳＴＶＤＡＧＤＦＲ（配列番号１１）を含むアミノ酸配列を有する；又は
（ｂ）ＣＤＲ１は、ＲＲＦＳＩＥＡ（配列番号１２）を含むアミノ酸配列を有し、ＣＤＲ２は、ＤＳＧＧＳＴＤ（配列番号１３）を含むアミノ酸配列を有し、ＣＤＲ３は、ＩＧＧＳＷＹＧＲＧＬＤ（配列番号１４）を含むアミノ酸配列を有する；又は
（ｃ）ＣＤＲ１は、ＧＴＦＳＳＩＩ（配列番号１５）を含むアミノ酸配列を有し、ＣＤＲ２は、ＳＷＳＧＧＴＴＶ（配列番号１６）を含むアミノ酸配列を有し、ＣＤＲ３は、ＲＰＹＱＫＹＮＷＡＳＡＳＹＮＶ（配列番号１７）を含むアミノ酸配列を有する；又は
（ｄ）ＣＤＲ１は、ＧＧＳＤＡＧＴ（配列番号１８）を含むアミノ酸配列を有し、ＣＤ

ＲＲ２は、ＳＷＡＧＴＡＷＲ（配列番号１９）を含むアミノ酸配列を有し、ＣＤＲ３は、ＬＧＳＹＥＭＤＨＨ（配列番号２０）を含むアミノ酸配列を有する。

【００７８】

いくつかの実施形態では、アミノ酸配列は、配列番号５１～５８、６１～７３、８１～８５、９１～９８、１０１～１０９、１１１～１３１、及び１４１～１７０のいずれか１つを含む。いくつかの実施形態では、ペプチドは配列番号５５を含むアミノ酸配列を有する。いくつかの実施形態では、ペプチドは配列番号６７を含むアミノ酸配列を有する。いくつかの実施形態では、ペプチドは配列番号１４２を含むアミノ酸配列を有する。いくつかの実施形態では、ペプチドは配列番号１４５を含むアミノ酸配列を有する。

【００７９】

いくつかの実施形態では、アミノ酸配列は、配列番号５１～５８、６１～７３、８１～８５、９１～９５、１０１～１０６、及び１１１～１１８のいずれか１つを含む。いくつかの実施形態では、ペプチドは、配列番号７３、８１、９１、及び９２のいずれか１つを含むアミノ酸配列を有する。いくつかの実施形態では、ペプチドは、配列番号１０１～１０６のいずれか１つを含むアミノ酸配列を有する。いくつかの実施形態では、ペプチドは配列番号６７を含むアミノ酸配列を有する。

【００８０】

ＩＶ．コンジュゲート

いくつかの実施形態では、コンジュゲートは、式ＩＩａ：

$$(X^1-X^2-Y)_n-Z \quad (\text{IIa})$$

のコンジュゲートであり、

式中、

各X^1は、独立して、本明細書に記載のペプチドであり、

各X^2は、独立して、３～１００アミノ酸長のペプチドリンカーであり、

各Ｙは、独立して、有機リンカーであり、

Ｚは、約０．１ＭＤａ～約３ＭＤａの分子量を有する生体適合性ポリマーであり、

下付き文字ｎは、１～１５００の整数である。

【００８１】

いくつかの実施形態では、コンジュゲートは、式ＩＩｂ：

$$(X^1-X^{2A}-Y)_n-Z \quad (\text{IIb})$$

のコンジュゲートであり、

式中、

各X^1は、独立して、約５ｋＤａ～約２００ｋＤａの分子量を有するペプチドであり、

各X^{2A}は、独立して、αヘリックスを含むペプチドリンカーであり、

各Ｙは、独立して、有機リンカーであり、

Ｚは、約０．１ＭＤａ～約３ＭＤａの分子量を有する生体適合性ポリマーであり、

下付き文字ｎは、１～１５００の整数である。

【００８２】

いくつかの実施形態では、各X^1は、独立して、本発明のペプチドである。

【００８３】

いくつかの実施形態では、各ペプチドベクターは、独立して、７～１００アミノ酸長である。いくつかの実施形態では、各ペプチドベクターは、独立して、１０～３０アミノ酸長である。

【００８４】

いくつかの実施形態では、各ペプチドベクターは、独立して、

ＡＥＡＡＡＫＥＡＡＡＫＥＡＡＡＫＡＧＣ（配列番号２１）、

ＡＥＥＥＫＲＫＡＥＥＥＫＲＫＡＥＥＥＡＧＣ（配列番号２２）、

ＡＥＥＥＫＲＫＡＥＥＥＫＲＫＡＥＥＥＫＲＫＡＥＥＥＡＧＣ（配列番号２３）、

ＡＥＥＥＥＫＫＫＫＥＥＥＥＫＫＫＫＡＧＣ（配列番号２４）、

ＡＥＡＡＡＫＥＡＡＡＫＡＧＣ（配列番号２５）、

ＰＳＲＬＥＥＥＬＲＲＲＬＴＥＧＣ（配列番号２６）、又は
ＡＥＥＥＥＫＫＫＱＱＥＥＥＡＥＲＬＲＲＩＱＥＥＭＥＫＥＲＫＲＲＥＥＤＥＥＲＲＲＫＥＥＥＥＲＲＭＫＬＥＭＥＡＫＲＫＱＥＥＥＥＲＫＫＲＥＤＤＥＫＲＫＫＫＡＧＣ（配列番号２７）を含むアミノ酸配列を有する。

【００８５】

いくつかの実施形態では、各ペプチドリンカーは、ＡＥＡＡＡＫＥＡＡＡＫＥＡＡＡＫＡＧＣ（配列番号２１）を含むアミノ酸配列を有する。

【００８６】

各ペプチドは、Ｃｏｎｊｕ－Ｐｒｏｂｅ若しくはＢｒｏａｄＰｈａｒｍ（Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ，ＣＡ）又はＣｒｅａｔｉｖｅ Ｂｉｏｌａｂｓ（Ｓｈｉｒｌｅｙ，ＮＹ）によって提供されるものなど、抗体－薬物コンジュゲートを形成するための当該技術分野で一般に知られている種々の有機リンカーによって生体適合性ポリマーに連結することができる。バイオコンジュゲート結合を形成する方法は、Ｂｉｏｃｏｎｊｕｇａｔｅ Ｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ，３ｒｄ Ｅｄｉｔｉｏｎ，Ｇｒｅｇ Ｔ．Ｈｅｒｍａｎｓｏｎに記載されている。有機リンカーは、アミン、カルボニル、カルボキシル、及び活性化エステルと反応性であってもよく、クリックケミストリー（銅を用いて又は用いずに）を介して反応してもよく、又はチオールと反応性であってもよい。

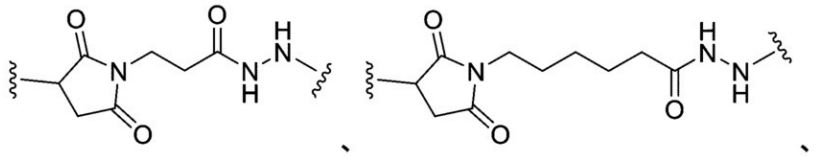
【００８７】

代表的な有機リンカーは、アミド若しくはジスルフィドを含むか、又は無水コハク酸、スクシンイミド、Ｎ－ヒドロキシスクシンイミド、Ｎ－クロロスクシンイミド、Ｎ－ブロモスクシンイミド、無水マレイン酸、マレイミド、ヒダントイン、フタルイミドなどの反応性基から形成される。本発明において有用な有機リンカーは小さく、概して、約１００Ｄａ～約５００Ｄａの分子量を有し、マレイミドと、アミン又はヒドラジドのいずれかとからなる２つの官能基を含む。いくつかの実施形態では、ペプチドは、スルフィド結合、及び約１００Ｄａ～約５００Ｄａの分子量を有する有機リンカーを介してポリマーに共有結合される。いくつかの実施形態では、有機リンカーは、約１００Ｄａ～約３００Ｄａの分子量を有する。いくつかの実施形態では、有機リンカーは、スクシンイミドを含む。いくつかの実施形態では、有機リンカーは、Ｎ－β－マレイミドプロピオン酸ヒドラジド（ＢＭＰＨ）、Ｎ－ε－マレイミドカプロン酸ヒドラジド（ＥＭＣＨ）、Ｎ－アミノエチルマレイミド、Ｎ－κ－マレイミドウンデカン酸ヒドラジド（ＫＵＭＨ）、ヒドラジド－ＰＥＧ２－マレイミド、アミン－ＰＥＧ２－マレイミド、ヒドラジド－ＰＥＧ３－マレイミド、又はアミン－ＰＥＧ３－マレイミドを用いて形成される。

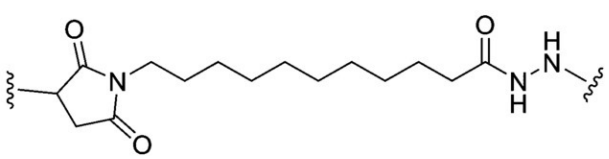
【００８８】

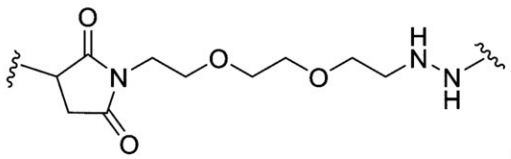
代表的な有機リンカーとしては、

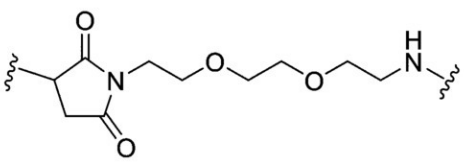
【化７】


、

、


、


、又は

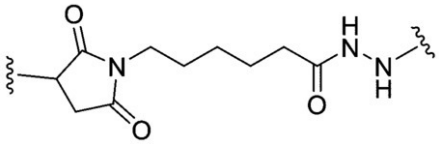


が挙げられるが、これらに限定されない。

【００８９】

いくつかの実施形態では、有機リンカーは、Ｎ－ε－マレイミドカプロン酸ヒドラジド（ＥＭＣＨ）：

【化８】

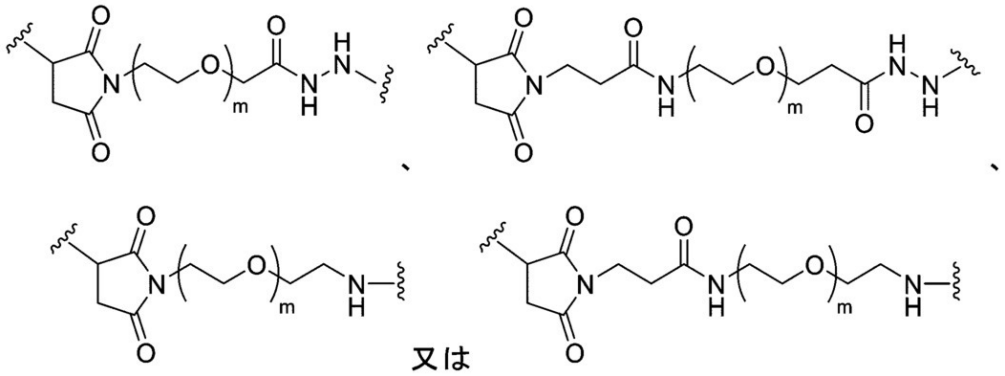


であり得る。

【００９０】

いくつかの実施形態では、有機リンカーは、構造：

【化９】



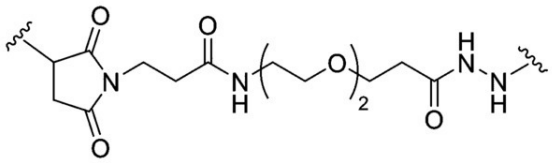
を有し、

式中、下付き文字ｍは、１～３００の整数である。

【００９１】

いくつかの実施形態では、有機リンカーは、構造：

【化１０】



を有する。

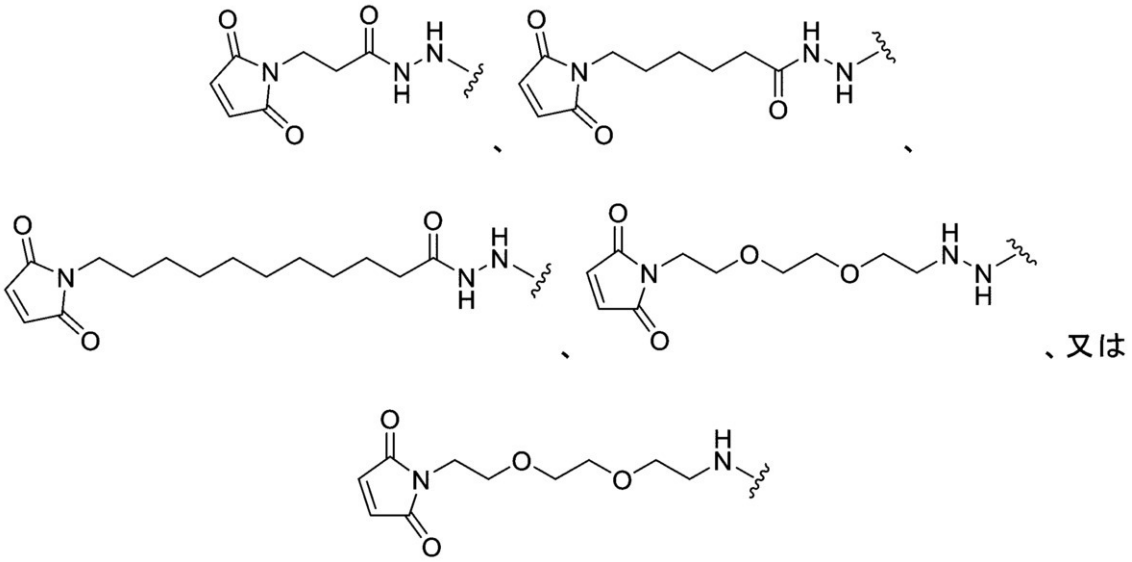
【００９２】

いくつかの実施形態では、本発明のコンジュゲートを調製することは、有機リンカーを生体適合性ポリマーに共有結合させ、次いでペプチドを有機リンカーに共有結合させることを含む。いくつかの実施形態では、本発明のコンジュゲートを調製した後、未反応の有機リンカーが生体適合性ポリマー上に存在する。未反応の有機リンカーの構造は、有機リンカーによって異なり、当業者によって理解されるであろう。

【００９３】

代表的な未反応の有機リンカーとしては、

【化１１】

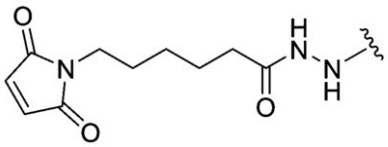


が挙げられるが、これらに限定されない。

【００９４】

いくつかの実施形態では、未反応の有機リンカーは、構造：

【化１２】

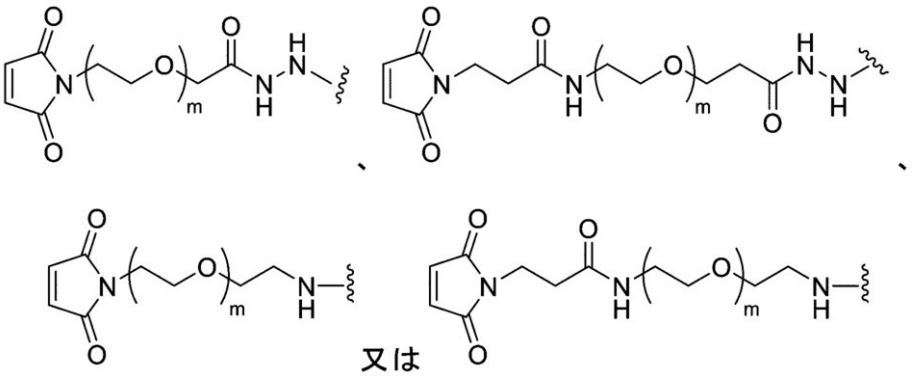


を有する。

【００９５】

いくつかの実施形態では、未反応の有機リンカーは、構造：

【化１３】



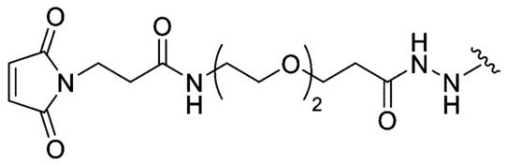
を有し、

式中、下付き文字ｍは、１～３００の整数である。いくつかの実施形態では、下付き文字ｍは、１～１００の整数である。

【００９６】

いくつかの実施形態では、未反応の有機リンカーは、構造：

【化１４】



を有する。

【００９７】

いくつかの実施形態では、生体適合性ポリマーは多糖類である。

【００９８】

いくつかの実施形態では、生体適合性ポリマーはグリコサミノグリカンである。

【００９９】

いくつかの実施形態では、生体適合性ポリマーはヒアルロン酸である。

【０１００】

いくつかの実施形態では、生体適合性ポリマーは、約０．４ＭＤａ～約２ＭＤａの分子量を有する。いくつかの実施形態では、生体適合性ポリマーは、約０．７ＭＤａ～約１．５ＭＤａの分子量を有する。いくつかの実施形態では、生体適合性ポリマーは、約０．８ＭＤａの分子量を有する。

【０１０１】

いくつかの実施形態では、下付き文字ｎは、１～１５００の整数である。いくつかの実施形態では、下付き文字ｎは、５～１０００の整数である。いくつかの実施形態では、下付き文字ｎは、１０～４００の整数である。いくつかの実施形態では、下付き文字ｎは、１０～１００の整数である。

【０１０２】

いくつかの実施形態では、コンジュゲートは、式ＩＩａ：

（X^1-X^2-Y）$_n-Z$（ＩＩａ）

のコンジュゲートであり、

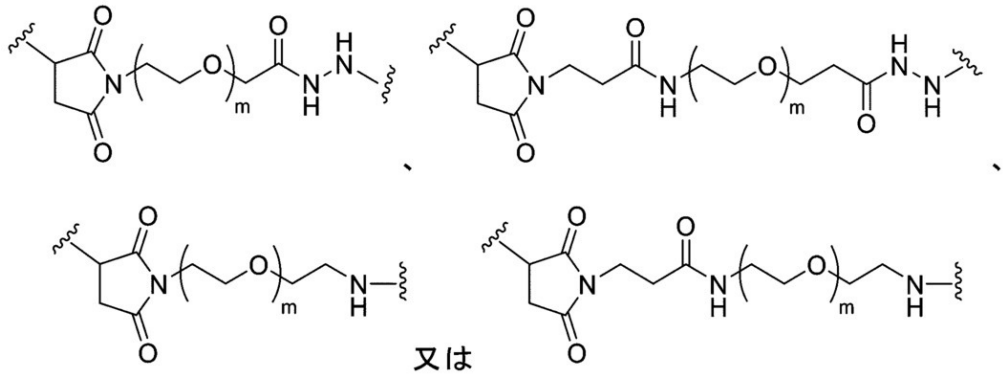
式中、

各X^1は、独立して、本明細書に記載のペプチドであり、

各X^2は、ＡＥＡＡＡＫＥＡＡＡＫＥＡＡＡＫＡＧＣ（配列番号２１）を含むアミノ酸配列を有するペプチドリンカーであり、

各Ｙは、構造：

【化１５】



又は

を有する有機リンカーであり、

Ｚは、約０．１ＭＤａ～約３ＭＤａの分子量を有するヒアルロン酸である生体適合性ポリマーであり、

下付き文字ｍは、１～３００の整数であり、

下付き文字ｎは、１～１５００の整数である。

【０１０３】

いくつかの実施形態では、本発明のコンジュゲートは、約０．１ＭＤａ～約３ＭＤａの分子量を有する式ＩＩＩ：

（Ｘ－Ｙ－Ｚ^{1}）$_{n}$－（Ｚ^{2}）$_{p}$－（Ｚ^{3}）$_{q}$（ＩＩＩ）

のランダムポリマーであるコンジュゲートであり、

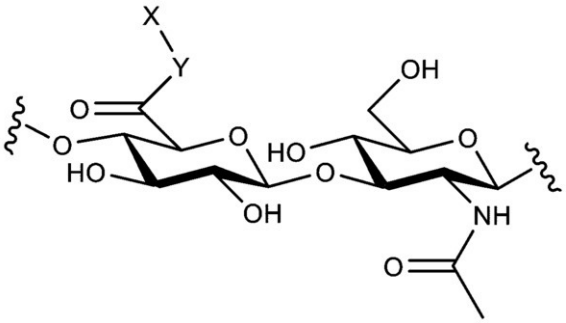
式中、

各Ｘは、独立して、約５ｋＤａ～約２００ｋＤａの分子量を有するペプチドであり、

各Ｙは、有機リンカーであり、

各Ｘ－Ｙ－Ｚ^{1}部分は、構造：

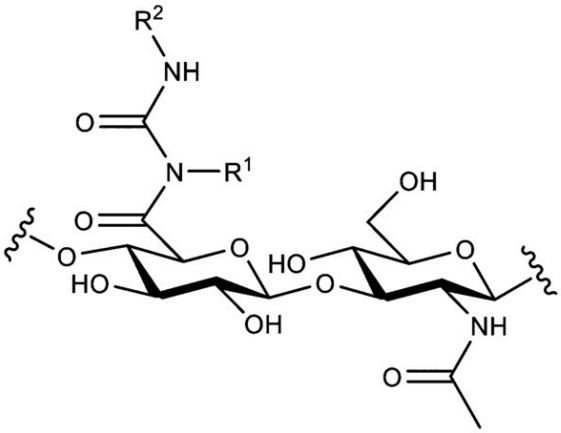
【化１６】



を有し、

各Ｚ^{2}は、構造：

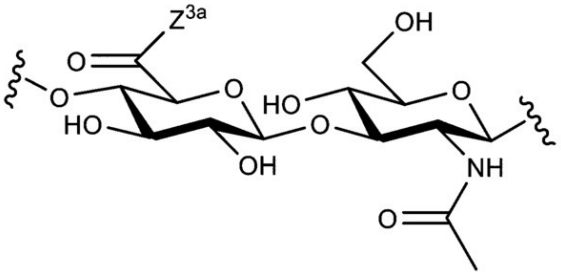
【化１７】



を有し、

各Ｚ^{3}は、独立して、構造：

【化１８】



を有し、

各Ｒ^{1}及びＲ^{2}は、独立して、Ｃ$_{1}$～Ｃ$_{6}$アルキル、－（Ｃ$_{1}$～Ｃ$_{6}$アルキル）－ＮＲ^{3}Ｒ^{4}、又はＣ$_{5}$～Ｃ$_{8}$シクロアルキルであり、

各Ｒ^{3}及びＲ^{4}は、独立して、Ｈ又はＣ$_{1}$～Ｃ$_{6}$アルキルであり、

各Ｚ^{3a}は、独立して、ＯＨ又はＹ’であり、

各Ｙ’は、未反応の有機リンカーであり、
下付き文字ｎは、１～１５００の整数であり、下付き文字ｎ、ｐ、及びｑの合計の約１５％未満であり、
下付き文字ｐは、０～１０００の整数であり、下付き文字ｎ、ｐ、及びｑの合計の約１０％未満であり、
下付き文字ｑは、１００～１００００の整数である。

【０１０４】

いくつかの実施形態では、各Ｘは、配列番号５１～５８、６１～７３、８１～８５、９１～９８、１０１～１０９、１１１～１３１、及び１４１～１７０のいずれか１つを含むアミノ酸配列を有するペプチドである。いくつかの実施形態では、各Ｘは、配列番号５５を含むアミノ酸配列を有するペプチドである。いくつかの実施形態では、各Ｘは、配列番号６７を含むアミノ酸配列を有するペプチドである。いくつかの実施形態では、各Ｘは、配列番号１４２を含むアミノ酸配列を有するペプチドである。いくつかの実施形態では、各Ｘは、配列番号１４５を含むアミノ酸配列を有するペプチドである。

【０１０５】

いくつかの実施形態では、各Ｘは、配列番号５１～５８、６１～７３、８１～８５、９１～９５、１０１～１０６、及び１１１～１１８のいずれか１つを含むアミノ酸配列を有するペプチドである。

【０１０６】

いくつかの実施形態では、コンジュゲートは、式ＩＩＩａ：

$$(X^1-X^2-Y-Z^1)_n-(Z^2)_p-(Z^3)_q \quad (\text{IIIa})$$

の構造を有し、
式中、
各X^1は、独立して、約５ｋＤａ～約２００ｋＤａの分子量を有するペプチドであり、
各X^2は、αヘリックスを含むペプチドリンカーである。

【０１０７】

いくつかの実施形態では、各X^1は、式Ｉ：
ＦＲ１－ＣＤＲ１－ＦＲ２－ＣＤＲ２－ＦＲ３－ＣＤＲ３－ＦＲ４（Ｉ）
のペプチドであって、
式中、ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３が、各々独立して相補性決定領域であり；
ＦＲ１が、X^{10}ＶＱＬX^{11}ＥX^{12}ＧＧＧ$X^{13}X^{14}$ＱX^{15}ＧX^{16}ＳＬＲＬＳＣ$X^{17}X^{18}$ＳＧ（配列番号１）
（式中、
X^{10}は、Ｑ、Ｅ、又はＤであり、
X^{11}は、Ｖ、Ｑ、Ａ、又はＥであり、
X^{12}は、Ｓ又はＴであり、
X^{13}は、Ｌ、Ｓ、又はＶであり、
X^{14}は、Ｖ又はＡであり、
X^{15}は、Ｐ、Ａ、又はＴであり、
X^{16}は、Ｇ、Ｄ、又はＲであり、
X^{17}は、Ａ、Ｖ、Ｔ、又はＥであり、
X^{18}は、Ａ又はＶである）を含むアミノ酸配列を有し、
ＦＲ２が、$X^{20}X^{21}$ＷX^{22}ＲＱX^{23}ＰＧＫ$X^{24}X^{25}$ＥX^{26}Ｖ$X^{27}X^{28}$Ｉ（配列番号２）
（式中、
X^{20}は、Ｍ、Ｉ、Ｖ、又はＬであり、
X^{21}は、Ｇ、Ｓ、又はＡであり、
X^{22}は、Ｆ、Ｙ、又はＶであり、
X^{23}は、Ａ、Ｖ、Ｐ、又はＴであり、
X^{24}は、Ｅ、Ｇ、Ａ、又はＱであり、

X^{25}は、Ｒ又はＬであり、
X^{26}は、Ｆ、Ｇ、Ｗ、又はＬであり、
X^{27}は、Ａ、Ｇ、又はＳであり、
X^{28}は、Ａ、Ｓ、又はＧである）を含むアミノ酸配列を有し、
ＦＲ３が、ＹＸ^{30}ＤＳＶＫＧＲＦＴＩＳＸ^{31}ＤＸ^{32}Ｘ^{33}ＫＸ^{34}Ｘ^{35}ＶＸ^{36}ＬＱＭＸ^{37}Ｘ^{38}ＬＲＸ^{39a}ＥＤＴＡＸ^{39b}ＹＹＣＡＡ（配列番号３）
（式中、
X^{30}は、Ａ、Ｇ、Ｓ、又はＴであり、
X^{31}は、Ｒ又はＱであり、
X^{32}は、Ｎ、Ｓ、又はＤであり、
X^{33}は、Ｓ、Ａ、又はＤであり、
X^{34}は、Ｎ又はＫであり、
X^{35}は、Ｔ又はＭであり、
X^{36}は、Ｙ、Ｄ、又はＳであり、
X^{37}は、Ｎ又はＤであり、
X^{38}は、Ｓ又はＮであり、
X^{39a}は、Ｐ又はＡであり、
X^{39b}は、Ｖ、Ｍ、Ｌ、又はＩである）を含むアミノ酸配列を有し、
ＦＲ４が、ＹＷＧＸ^{40}ＧＴＸ^{41}ＶＴＶＳＳ（配列番号４）
（式中、
X^{40}は、Ｑ又はＫであり、
X^{41}は、Ｌ又はＱである）を含むアミノ酸配列を有する、ペプチドを含む。

【０１０８】
式Ｉのペプチドのいくつかの実施形態では、X^{13}はＬである。

【０１０９】
式Ｉのペプチドのいくつかの実施形態では、X^{27}はＡである。

【０１１０】
式Ｉのペプチドのいくつかの実施形態では、X^{30}はＡである。

【０１１１】
式Ｉのペプチドのいくつかの実施形態では、X^{39a}はＰである。

【０１１２】
式Ｉのペプチドのいくつかの実施形態では、X^{40}はＱである。

【０１１３】
式Ｉのペプチドのいくつかの実施形態では、ＦＲ１は、ＱＶＱＬＶＥＳＧＧＧＬＶＱＰＧＧＳＬＲＬＳＣＡＡＳＧ（配列番号５）を含むアミノ酸配列を有する。

【０１１４】
式Ｉのペプチドのいくつかの実施形態では、ＦＲ２は、ＭＧＷＦＲＱＡＰＧＫＥＲＥＦＶＡＡＩ（配列番号６）を含むアミノ酸配列を有する。

【０１１５】
式Ｉのペプチドのいくつかの実施形態では、ＦＲ３は、ＹＡＤＳＶＫＧＲＦＴＩＳＲＤＮＳＫＮＴＶＹＬＱＭＮＳＬＲＰＥＤＴＡＶＹＹＣＡＡ（配列番号７）を含むアミノ酸配列を有する。

【０１１６】
式Ｉのペプチドのいくつかの実施形態では、ＦＲ４は、ＹＷＧＱＧＴＬＶＴＶＳＳ（配列番号８）を含むアミノ酸配列を有する。

【０１１７】
式Ｉのペプチドのいくつかの実施形態では、ＦＲ１は、ＱＶＱＬＶＥＳＧＧＧＬＶＱＰＧＧＳＬＲＬＳＣＡＡＳＧ（配列番号５）を含むアミノ酸配列を有し、
ＦＲ２は、ＭＧＷＦＲＱＡＰＧＫＥＲＥＦＶＡＡＩ（配列番号６）を含むアミノ酸配列を有し、

ＦＲ３は、ＹＡＤＳＶＫＧＲＦＴＩＳＲＤＮＳＫＮＴＶＹＬＱＭＮＳＬＲＰＥＤＴＡＶＹＹＣＡＡ（配列番号７）を含むアミノ酸配列を有し、
ＦＲ４は、ＹＷＧＱＧＴＬＶＴＶＳＳ（配列番号８）を含むアミノ酸配列を有する。
【０１１８】
式Ｉのペプチドのいくつかの実施形態では、ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、及びＣＤＲ３は各々、抗体又はサイトカイン由来の相補性決定領域である。
【０１１９】
式Ｉのペプチドのいくつかの実施形態では、抗体は、モノクローナルＩｇＧ、ＩｇＧ断片、一本鎖ｓｃＦｖ、単一ドメイン重鎖ＶＨＨ、アドネクチン、アフィボディ、アンチカリン、ＤＡＲＰｉｎ、又は操作されたクニッツ型阻害剤である。いくつかの実施形態では、抗体はモノクローナルＩｇＧである。いくつかの実施形態では、抗体はＩｇＧ断片である。いくつかの実施形態では、抗体は単一ドメイン重鎖ＶＨＨである。いくつかの実施形態では、抗体はＤＡＲＰｉｎである。
【０１２０】
式Ｉのペプチドのいくつかの実施形態では、相補性決定領域は各々、血管内皮増殖因子（ＶＥＧＦ）、腫瘍壊死因子－アルファ（ＴＮＦ－α）、プログラム細胞死タンパク質１（ＰＤ－１）、プログラム細胞死リガンド－１（ＰＤ－Ｌ１）、細胞傷害性Ｔリンパ球関連タンパク質４（ＣＴＬＡ４）、分化抗原群４０（ＣＤ４０）、分化抗原群１３４（ＣＤ１３４）、分化抗原群１３７（ＣＤ１３７）、グルココルチコイド誘導腫瘍壊死因子受容体関連タンパク質（ＧＩＴＲ）、Ｔ細胞活性化のＶドメイン免疫グロブリンサプレッサー（ＶＩＳＴＡ）、Ｔ細胞免疫グロブリン及びムチンドメイン含有タンパク質３（ＴＩＭ－３）、リンパ球活性化３（ＬＡＧ３）、インターロイキン－１－ベータ（ＩＬ－１β）、インターロイキン－６（ＩＬ－６）、インターロイキン－１０（ＩＬ－１０）、インターロイキン－１２（ＩＬ－１２）、又はインターロイキン－１５（ＩＬ－１５）に特異的である。いくつかの実施形態では、相補性決定領域は各々、血管内皮増殖因子（ＶＥＧＦ）に特異的である。いくつかの実施形態は、相補性決定領域は各々、腫瘍壊死因子－アルファ（ＴＮＦ－α）に特異的である。いくつかの実施形態では、相補性決定領域は各々、インターロイキン－１－ベータ（ＩＬ－１β）に特異的である。
【０１２１】
いくつかの実施形態では、ペプチドは式Ｉからなる。
【０１２２】
いくつかの実施形態では、ペプチドは、（ａ）７アミノ酸長のＣＤＲ１、（ｂ）７若しくは８アミノ酸長のＣＤＲ２、及び／又は（ｃ）９～１６アミノ酸長のＣＤＲ３、のうちの１つ以上を有する。
【０１２３】
ペプチドのいくつかの実施形態では、
（ａ）ＣＤＲ１は、ＦＡＹＳＴＹＳ（配列番号９）を含むアミノ酸配列を有し、
ＣＤＲ２は、ＮＳＧＴＦＲＬＷ（配列番号１０）を含むアミノ酸配列を有し、
ＣＤＲ３は、ＲＡＷＳＰＹＳＳＴＶＤＡＧＤＦＲ（配列番号１１）を含むアミノ酸配列を有する；又は
（ｂ）ＣＤＲ１は、ＲＲＦＳＩＥＡ（配列番号１２）を含むアミノ酸配列を有し、
ＣＤＲ２は、ＤＳＧＧＳＴＤ（配列番号１３）を含むアミノ酸配列を有し、
ＣＤＲ３は、ＩＧＧＳＷＹＧＲＧＬＤ（配列番号１４）を含むアミノ酸配列を有する；又は
（ｃ）ＣＤＲ１は、ＧＴＦＳＳＩＩ（配列番号１５）を含むアミノ酸配列を有し、
ＣＤＲ２は、ＳＷＳＧＧＴＴＶ（配列番号１６）を含むアミノ酸配列を有し、
ＣＤＲ３は、ＲＰＹＱＫＹＮＷＡＳＡＳＹＮＶ（配列番号１７）を含むアミノ酸配列を有する；又は
（ｄ）ＣＤＲ１は、ＧＧＳＤＡＧＴ（配列番号１８）を含むアミノ酸配列を有し、
ＣＤＲ２は、ＳＷＡＧＴＡＷＲ（配列番号１９）を含むアミノ酸配列を有し、

ＣＤＲ３は、ＬＧＳＹＥＭＤＨＨ（配列番号２０）を含むアミノ酸配列を有する。

【０１２４】

いくつかの実施形態では、各Ｘ^{1}は、配列番号５１～５８、６１～７３、８１～８５、９１～９５、１０１～１０６、及び１１１～１１８のいずれか１つを含むアミノ酸配列を有するペプチドである。いくつかの実施形態では、各Ｘ^{1}は、配列番号５５を含むアミノ酸配列を有するペプチドである。いくつかの実施形態では、各Ｘ^{1}は、配列番号６７を含むアミノ酸配列を有するペプチドである。いくつかの実施形態では、各Ｘ^{1}は、配列番号７３を含むアミノ酸配列を有するペプチドである。いくつかの実施形態では、各Ｘ^{1}は、配列番号９１を含むアミノ酸配列を有するペプチドである。

【０１２５】

いくつかの実施形態では、各Ｘ^{2}は、ＡＥＡＡＡＫＥＡＡＡＫＥＡＡＡＫＡＧＣ（配列番号２１）、

ＡＥＥＥＫＲＫＡＥＥＥＫＲＫＡＥＥＥＡＧＣ（配列番号２２）、

ＡＥＥＥＫＲＫＡＥＥＥＫＲＫＡＥＥＥＫＲＫＡＥＥＥＡＧＣ（配列番号２３）、

ＡＥＥＥＥＫＫＫＥＥＥＥＫＫＫＡＧＣ（配列番号２４）、

ＡＥＡＡＡＫＥＡＡＡＫＡＧＣ（配列番号２５）、

ＰＳＲＬＥＥＥＬＲＲＲＬＴＥＧＣ（配列番号２６）、又は

ＡＥＥＥＥＫＫＫＱＱＥＥＥＡＥＲＬＲＲＩＱＥＥＭＥＫＥＲＫＲＲＥＥＤＥＥＲＲＲＫＥＥＥＥＲＲＭＫＬＥＭＥＡＫＲＫＱＥＥＥＥＲＫＫＲＥＤＤＥＫＲＫＫＫＡＧＣ（配列番号２７）を含むアミノ酸配列を有するペプチドリンカーである。

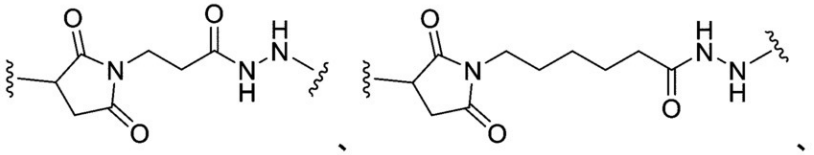
【０１２６】

いくつかの実施形態では、各Ｘ^{2}は、ＡＥＡＡＡＫＥＡＡＡＫＥＡＡＡＫＡＧＣ（配列番号２１）を含むアミノ酸配列を有するペプチドリンカーである。

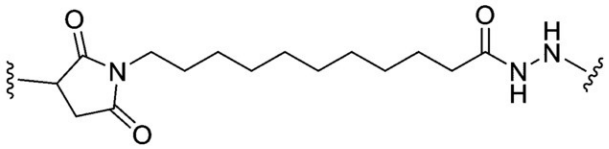
【０１２７】

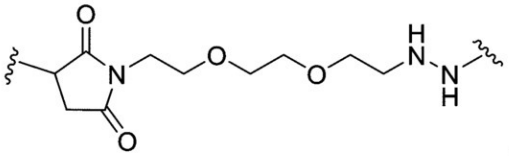
いくつかの実施形態では、有機リンカーは、構造：

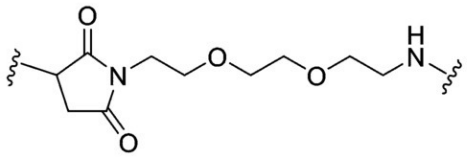
【化１９】


、

、


、


、又は

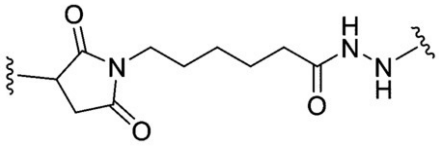


を有する。

【０１２８】

いくつかの実施形態では、有機リンカーは、Ｎ－ε－マレイミドカプロン酸ヒドラジド（ＥＭＣＨ）：

【化２０】

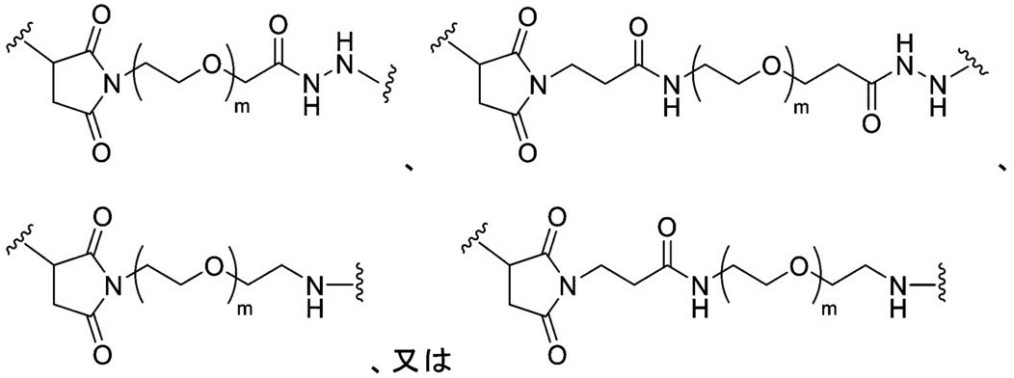


であり得る。

【０１２９】

いくつかの実施形態では、有機リンカーは、構造：

【化２１】



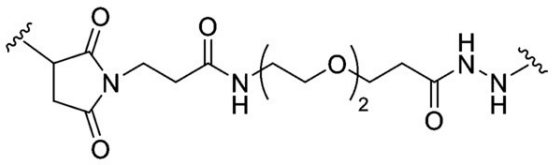
を有し、

式中、下付き文字ｍは、１～３００の整数である。いくつかの実施形態では、下付き文字ｍは、１～１００の整数である。

【０１３０】

いくつかの実施形態では、有機リンカーは、構造：

【化２２】



を有する。

上記構造を有する有機リンカーは、ＭＰ２Ｈとして知られている。

【０１３１】

いくつかの実施形態では、式ＩＩＩのランダムポリマーは、約０．４ＭＤａ～約２ＭＤａの分子量を有する。いくつかの実施形態では、式ＩＩＩのランダムポリマーは、約０．７ＭＤａ～約１．５ＭＤａの分子量を有する。いくつかの実施形態では、式ＩＩＩのランダムポリマーは、約０．８ＭＤａの分子量を有する。

【０１３２】

いくつかの実施形態では、各R^1及びR^2は、独立して、C_1～C_3アルキル又は－（C_1～C_3アルキル）－NR^3R^4である。いくつかの実施形態では、各R^1及びR^2は、エチル又は－（CH_2）$_3$－NMe_2である。いくつかの実施形態では、各R^1はエチルであり、各R^2は－（CH_2）$_3$－NMe_2である。いくつかの実施形態では、各R^1は－（CH_2）$_3$－NMe_2であり、各R^2はエチルである。

【０１３３】

いくつかの実施形態では、各R^3及びR^4は、独立して、C_1～C_3アルキルである。いくつかの実施形態では、各R^3及びR^4は、メチルである。

【０１３４】

いくつかの実施形態では、下付き文字ｎは、１～１５００の整数であり、下付き文字ｎ

、ｐ、及びｑの合計の約１５％未満であり；下付き文字ｐは、１～１０００の整数であり、下付き文字ｎ、ｐ、及びｑの合計の約１０％未満であり；下付き文字ｑは、１００～１００００の整数である。いくつかの実施形態では、下付き文字ｎは、１～１０００の整数であり、下付き文字ｎ、ｐ、及びｑの合計の約１０％未満であり；下付き文字ｐは、１～８００の整数であり、下付き文字ｎ、ｐ、及びｑの合計の約８％未満であり；下付き文字ｑは、１００～１００００の整数である。いくつかの実施形態では、下付き文字ｎは、１０～４５０の整数であり、下付き文字ｎ、ｐ、及びｑの合計の約１５％未満であり；下付き文字ｐは、１～３００の整数であり、下付き文字ｎ、ｐ、及びｑの合計の約１０％未満であり；下付き文字ｑは、１０００～３０００の整数である。いくつかの実施形態では、下付き文字ｎは、１０～３００の整数であり、下付き文字ｎ、ｐ、及びｑの合計の約１０％未満であり；下付き文字ｐは、１～２４０の整数であり、下付き文字ｎ、ｐ、及びｑの合計の約８％未満であり；下付き文字ｑは、１０００～３０００の整数である。いくつかの実施形態では、下付き文字ｎは、１０～３００の整数であり、下付き文字ｎ、ｐ、及びｑの合計の約１０％未満であり；下付き文字ｐは、１～６０の整数であり、下付き文字ｎ、ｐ、及びｑの合計の約２％未満であり；下付き文字ｑは、１０００～３０００の整数である。いくつかの実施形態では、下付き文字ｎは、１０～３００の整数であり、下付き文字ｎ、ｐ、及びｑの合計の約１０％未満であり；下付き文字ｐは、１～３０の整数であり、下付き文字ｎ、ｐ、及びｑの合計の約１％未満であり；下付き文字ｑは、１０００～３０００の整数である。いくつかの実施形態では、下付き文字ｎは、１０～３００の整数であり、下付き文字ｎ、ｐ、及びｑの合計の約１０％未満であり；下付き文字ｐは、１～１５の整数であり、下付き文字ｎ、ｐ、及びｑの合計の約０．５％未満であり；下付き文字ｑは、１０００～３０００の整数である。

【０１３５】

いくつかの実施形態では、本発明のコンジュゲートは、約０．１ＭＤａ～約３ＭＤａの分子量を有する式ＩＩＩ：

（Ｘ－Ｙ－Z^1）$_n$－（Z^2）$_p$－（Z^3）$_q$（ＩＩＩ）

のランダムポリマーであるコンジュゲートであり、

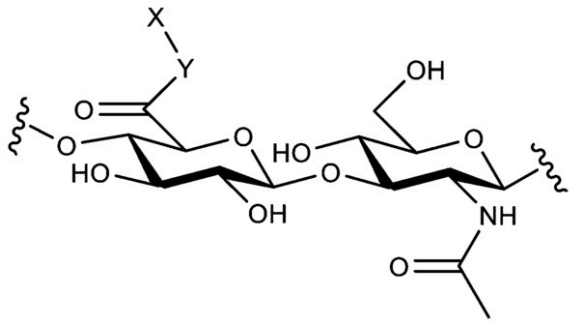
式中、

各Ｘは、独立して、約５ｋＤａ～約２００ｋＤａの分子量を有するペプチドであり、

各Ｙは、有機リンカーであり、

各Ｘ－Ｙ－Z^1部分は、構造：

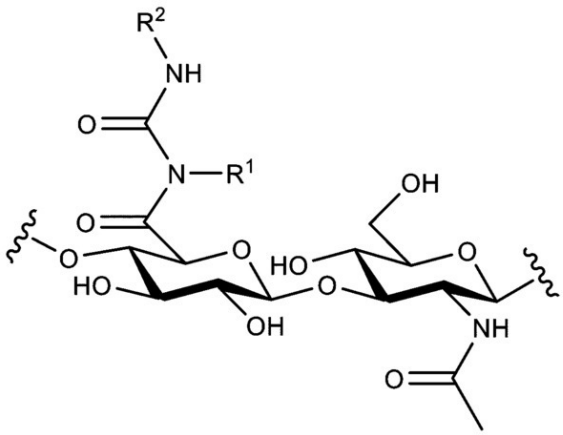
【化２３】



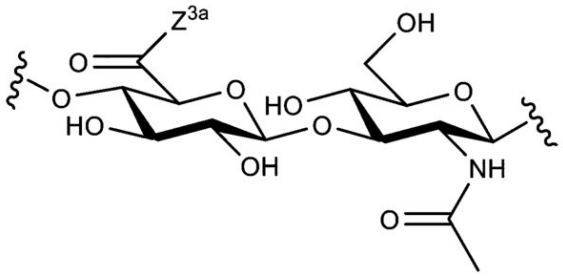
を有し、

各Z^2は、構造：

【化２４】

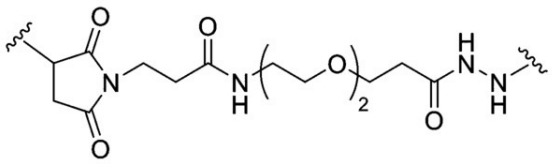


を有し、
各Ｚ^{3}は、独立して、構造：
【化２５】

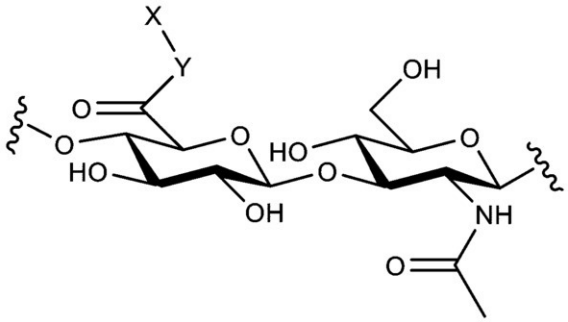


を有し、
式中、各Ｒ^{1}及びＲ^{2}は、独立して、Ｃ$_{1}$～Ｃ$_{6}$アルキル、－（Ｃ$_{1}$～Ｃ$_{6}$アルキル）－ＮＲ^{3}Ｒ^{4}、又はＣ$_{5}$～Ｃ$_{8}$シクロアルキルであり、
各Ｒ^{3}及びＲ^{4}は、独立して、Ｈ又はＣ$_{1}$～Ｃ$_{6}$アルキルであり、
各Ｚ^{3a}は、独立して、ＯＨ又はＹ’であり、
各Ｙ’は、未反応の有機リンカーであり、
下付き文字ｎは、１～１５００の整数であり、下付き文字ｎ、ｐ、及びｑの合計の約１５％未満であり、
下付き文字ｐは、０～１０００の整数であり、下付き文字ｎ、ｐ、及びｑの合計の約１０％未満であり、
下付き文字ｑは、１００～１００００の整数である。
【０１３６】
いくつかの実施形態では、各Ｘは、配列番号５１～５８、６１～７３、８１～８５、９１～９８、１０１～１０９、１１１～１３１、及び１４１～１７０のいずれか１つを含むアミノ酸配列を有するペプチドである。いくつかの実施形態では、各Ｘは、配列番号５５を含むアミノ酸配列を有するペプチドである。いくつかの実施形態では、各Ｘは、配列番号６７を含むアミノ酸配列を有するペプチドである。いくつかの実施形態では、各Ｘは、配列番号１４２を含むアミノ酸配列を有するペプチドである。いくつかの実施形態では、各Ｘは、配列番号１４５を含むアミノ酸配列を有するペプチドである。
【０１３７】
いくつかの実施形態では、本発明のコンジュゲートは、約０．１ＭＤａ～約３ＭＤａの分子量を有する式ＩＩＩ：
（Ｘ－Ｙ－Ｚ^{1}）$_{n}$－（Ｚ^{2}）$_{p}$－（Ｚ^{3}）$_{q}$（ＩＩＩ）
のランダムポリマーであるコンジュゲートであり、
式中、
各Ｘは、独立して、

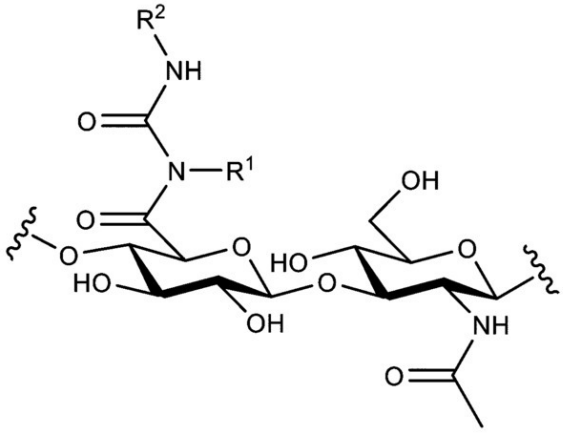
ＱＶＱＬＱＥＳ ＧＧＧＬＶＱＰＧＧＳ ＬＲＬＳＣＡＡＳＧＲ ＴＦＳＤＨＳＧＹＴ
Ｙ ＴＩＧＷＦＲＱＡＰＧ ＫＥＲＥＦＶＡＲＩＹ ＷＳＳＧＮＴＹＹＡＤ ＳＶＫＧＲ
ＦＡＩＳＲ ＤＩＡＫＮＴＶＤＬＴ ＭＮＮＬＥＰＥＤＴＡ ＶＹＹＣＡＡＲＤＧＩ Ｐ
ＴＳＲＳＶＥＳＹＮ ＹＷＧＱＧＴＱＶＴＶ ＳＳＰＳＴＰＰＴＰＳ ＰＳＴＰＰＧＧＣＤＤ
ＤＤＫ（配列番号１０１）、
ＱＶＱＬＱＥＳ ＧＧＧＬＶＱＰＧＧＳ ＬＲＬＳＣＡＡＳＧＲ ＴＦＳＤＨＳＧＹＴ
Ｙ ＴＩＧＷＦＲＱＡＰＧ ＫＥＲＥＦＶＡＲＩＹ ＷＳＳＧＮＴＹＹＡＤ ＳＶＫＧＲ
ＦＡＩＳＲ ＤＩＡＫＮＴＶＤＬＴ ＭＮＮＬＥＰＥＤＴＡ ＶＹＹＣＡＡＲＤＧＩ Ｐ
ＴＳＲＳＶＥＳＹＮ ＹＷＧＱＧＴＱＶＴＶ ＳＳＡＥＡＡＡＫＥＡ ＡＡＫＥＡＡＡＫＡＧ
Ｃ（配列番号１０２）、
ＱＶＱＬＱＤＳ ＧＧＧＬＶＱＡＧＧＳ ＬＲＬＳＣＡＡＳＧＧ ＴＦＳＳＩＩＭＡＷ
Ｆ ＲＱＡＰＧＫＥＲＥＦ ＶＧＡＶＳＷＳＧＧＴ ＴＶＹＡＤＳＶＬＧＲ ＦＥＩＳＲ
ＤＳＡＲＫ ＳＶＹＬＱＭＮＳＬＫ ＰＥＤＴＡＶＹＹＣＡ ＡＲＰＹＱＫＹＮＷＡ Ｓ
ＡＳＹＮＶＷＧＱＧ ＴＱＶＴＶＳＳＡＥＡ ＡＡＫＥＡＡＡＫＥＡ ＡＡＫＡＧＣ（配
列番号１０３）、
ＱＶＱＬＱＥＳ ＧＧＧＬＶＱＡＧＧＳ ＬＲＬＳＣＡＡＳＧＧ ＴＦＳＳＩＩＭＡＷ
Ｆ ＲＱＡＰＧＫＥＲＥＦ ＶＧＡＶＳＷＳＧＧＴ ＴＶＹＡＤＳＶＫＧＲ ＦＴＩＳＲ
ＤＳＡＲＫ ＳＶＹＬＱＭＮＳＬＫ ＰＥＤＴＡＶＹＹＣＡ ＡＲＰＹＱＫＹＮＷＡ Ｓ
ＡＳＹＮＶＷＧＱＧ ＴＱＶＴＶＳＳＡＥＡ ＡＡＫＥＡＡＡＫＥＡ ＡＡＫＡＧＣ（配
列番号１０４）、
ＣＧＧＧＶＤＮＫＦＮ ＫＥＶＧＷＡＦＧＥＩ ＧＡＬＰＮＬＮＡＬＱ ＦＲＡＦＩＩ
ＳＬＷＤ ＤＰＳＱＳＡＮＬＬＡ ＥＡＫＫＬＮＤＡＱＡ ＰＫ（配列番号１０５）、又は
ＥＩＶＭＴＱＳ ＰＳＴＬＳＡＳＶＧＤ ＲＶＩＩＴＣＱＡＳＱ ＳＩＤＮＷＬＳＷＹ
Ｑ ＱＫＰＧＫＡＰＫＬＬ ＩＹＲＡＳＴＬＡＳＧ ＶＰＳＲＦＳＧＳＧＳ ＧＡＥＦＴ
ＬＴＩＳＳ ＬＱＰＤＤＦＡＴＹＹ ＣＱＮＴＧＧＧＶＳＩ ＡＦＧＱＧＴＫＬＴＶ Ｌ
ＧＧＧＧＧＳＧＧＧ ＧＳＧＧＧＧＳＧＧＧ ＧＳＥＶＱＬＶＥＳＧ ＧＧＬＶＱＰＧＧ
ＳＬ ＲＬＳＣＴＡＳＧＦＳ ＬＳＳＡＡＭＡＷＶＲ ＱＡＰＧＫＧＬＥＷＶ ＧＩＩＹ
ＤＳＡＳＴＹ ＹＡＳＷＡＫＧＲＦＴ ＩＳＲＤＴＳＫＮＴＶ ＹＬＱＭＮＳＬＲＡＥ
ＤＴＡＶＹＹＣＡＲＥ ＲＡＩＦＳＧＤＦＶＬ ＷＧＱＧＴＬＶＴＶＳ ＳＳＰＳＴＰＰ
ＴＰＳ ＰＳＴＰＰＧＧＣ（配列番号１０６）
を含む抗ＴＮＦ－α又は抗ＩＬ－１βペプチドであり、
各Ｙは、構造：
【化２６】



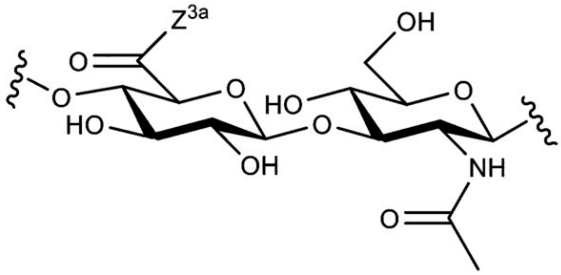
を有する有機リンカーであり、
各Ｘ－Ｙ－Ｚ^{1}部分は、構造：
【化２７】



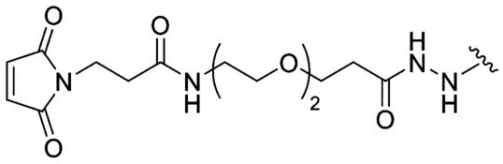
を有し、
各Ｚ^{2}は、構造：
【化２８】



を有し、
各Ｚ^{3}は、独立して、構造：
【化２９】

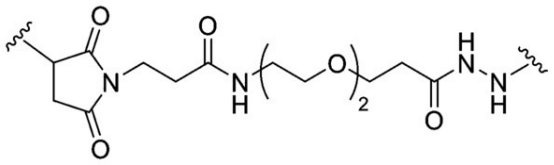


を有し、
式中、各Ｒ^{1}及びＲ^{2}は、独立して、Ｃ$_{1}$～Ｃ$_{6}$アルキル、－（Ｃ$_{1}$～Ｃ$_{6}$アルキル）－ＮＲ^{3}Ｒ^{4}、又はＣ$_{5}$～Ｃ$_{8}$シクロアルキルであり、
各Ｒ^{3}及びＲ^{4}は、独立して、Ｈ又はＣ$_{1}$～Ｃ$_{6}$アルキルであり、
各Ｚ^{3a}は、独立して、ＯＨ又はＹ’であり、
各Ｙ’は、構造
【化３０】

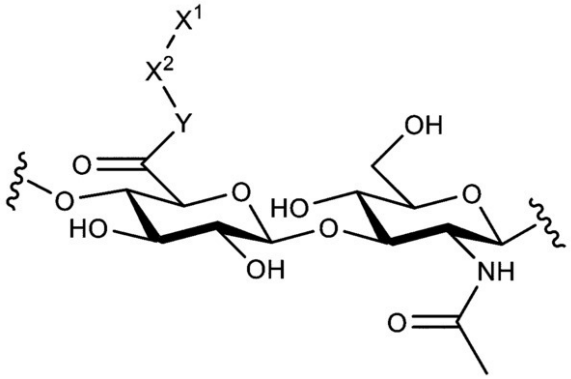


を有し、
下付き文字ｎは、１～１５００の整数であり、下付き文字ｎ、ｐ、及びｑの合計の約１５％未満であり、
下付き文字ｐは、０～１０００の整数であり、下付き文字ｎ、ｐ、及びｑの合計の約１０％未満であり、
下付き文字ｑは、１００～１００００の整数である。
【０１３８】
いくつかの実施形態では、コンジュゲートは、約０．８ＭＤａの分子量を有する式ＩＩＩａ：
（Ｘ^{1}－Ｘ^{2}－Ｙ－Ｚ^{1}）$_{n}$－（Ｚ^{2}）$_{p}$－（Ｚ^{3}）$_{q}$（ＩＩＩａ）
のランダムポリマーであるコンジュゲートであり、
式中、

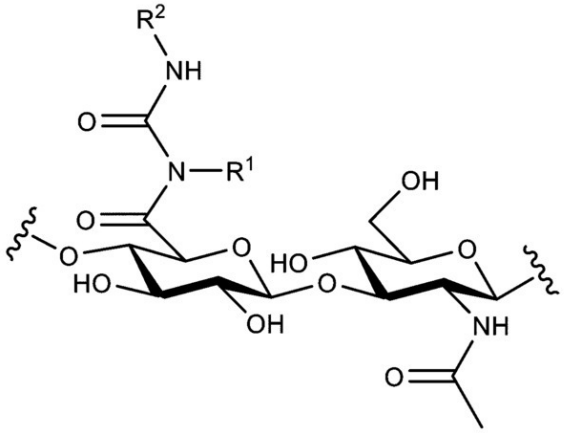
各Ｘ^{1}は、配列番号５５を含むアミノ酸配列を有するペプチドであり、
各Ｘ^{2}は、ＡＥＡＡＡＫＥＡＡＡＫＥＡＡＡＫＡＧＣ（配列番号２１）を含むアミノ酸配列を有するペプチドリンカーであり、
各Ｙは、構造：
【化３１】



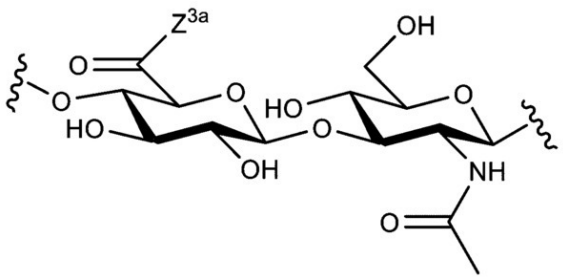
を有する有機リンカーであり、
各Ｘ^{1}－Ｘ^{2}－Ｙ－Ｚ^{1}部分は、構造：
【化３２】



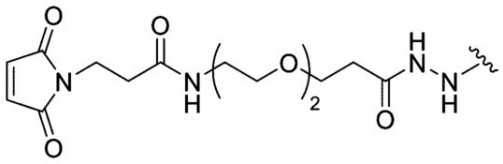
を有し、
各Ｚ^{2}は、構造：
【化３３】



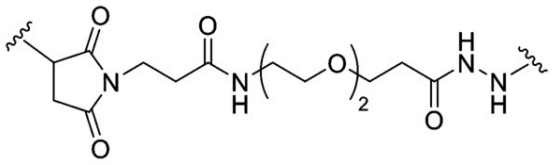
を有し、
各Ｚ^{3}は、独立して、構造：
【化３４】



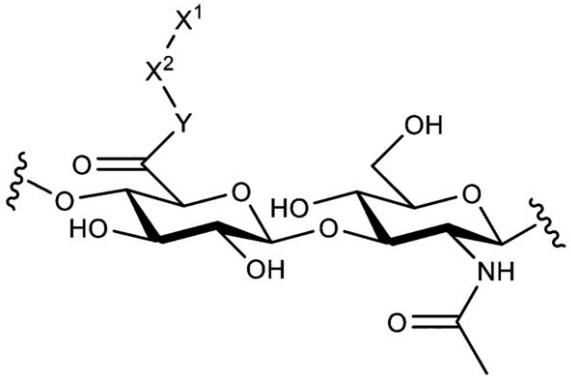
を有し、
各Ｚ^{3a}は、独立して、ＯＨ又はＹ’であり、
各Ｙ’は、構造：
【化３５】



を有し、
各Ｒ^{1}及びＲ^{2}は、エチル又は－（ＣＨ$_2$）$_3$－ＮＭｅ$_2$であり、
下付き文字ｎは、１０～３００の整数であり、下付き文字ｎ、ｐ、及びｑの合計の約１０％未満であり、
下付き文字ｐは、１～１５の整数であり、下付き文字ｎ、ｐ、及びｑの合計の約０．５％未満であり、
下付き文字ｑは、１０００～３０００の整数である。
【０１３９】
いくつかの実施形態では、コンジュゲートは、約０．８ＭＤａの分子量を有する式ＩＩＩａ：
（Ｘ^{1}－Ｘ^{2}－Ｙ－Ｚ^{1}）$_n$－（Ｚ^{2}）$_p$－（Ｚ^{3}）$_q$（ＩＩＩａ）
のランダムポリマーであるコンジュゲートであり、
式中、
各Ｘ^{1}は、配列番号６７を含む抗ＶＥＧＦアミノ酸配列を有するペプチドであり、
各Ｘ^{2}は、ＡＥＡＡＡＫＥＡＡＡＫＥＡＡＡＫＡＧＣ（配列番号２１）を含むアミノ酸配列を有するペプチドリンカーであり、
各Ｙは、構造：
【化３６】

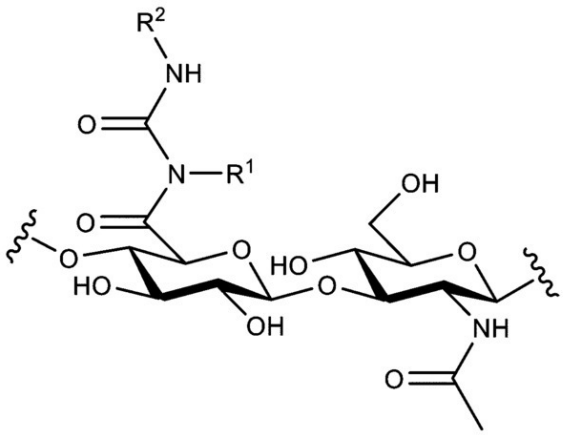


を有する有機リンカーであり、
各Ｘ^{1}－Ｘ^{2}－Ｙ－Ｚ^{1}部分は、構造：
【化３７】

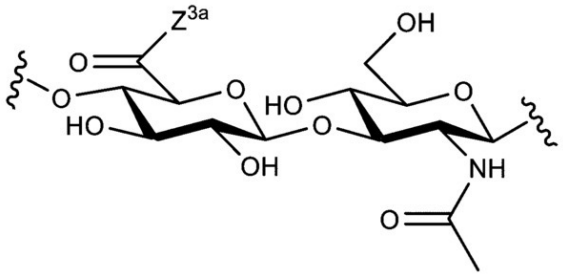


を有し、
各Ｚ^{2}は、構造：

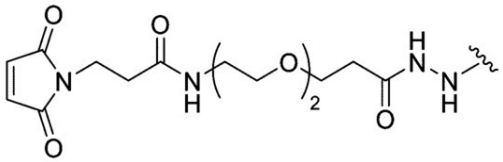
【化３８】



を有し、
各Ｚ^{3}は、独立して、構造：
【化３９】



を有し、
各Ｚ^{3a}は、独立して、ＯＨ又はＹ’であり、
各Ｙ’は、構造：
【化４０】



を有し、
各Ｒ^{1}及びＲ^{2}は、エチル又は－（ＣＨ$_{2}$）$_{3}$－ＮＭｅ$_{2}$であり、
下付き文字ｎは、１０～３００の整数であり、下付き文字ｎ、ｐ、及びｑの合計の約１０％未満であり、
下付き文字ｐは、１～１５の整数であり、下付き文字ｎ、ｐ、及びｑの合計の約０．５％未満であり、
下付き文字ｑは、１０００～３０００の整数である。
【０１４０】
いくつかの実施形態では、本発明のコンジュゲートは、約１２時間～約２４時間、約１日～約３日、約３日～約７日、１週間～約２週間、約２週間～約４週間、又は約１ヶ月～約６ヶ月のインビボ半減期を示す。
【０１４１】
いくつかの実施形態では、本発明のコンジュゲートは、約１２時間～約２４時間、約１日～約３日、約３日～約７日、１週間～約２週間、約２週間～約４週間、約１ヶ月～約３ヶ月、又は約３ヶ月～約６ヶ月のインビボでの治療的に有効な保持時間を示す。
【０１４２】
コンジュゲートの生物学的活性は、可溶性形態の対応するペプチドの活性と比較して、

例えば、ポリマーにコンジュゲートされていないペプチドの活性と比較して増強される。いくつかの実施形態では、コンジュゲートの生物学的活性は、可溶性（非コンジュゲート）形態のペプチドの生物学的活性よりも、少なくとも約２５％、少なくとも約５０％、少なくとも約７５％、少なくとも約２倍、少なくとも約５倍、少なくとも約１０倍、少なくとも約１５倍、少なくとも約２０倍、少なくとも約２５倍、少なくとも約３０倍、少なくとも約４０倍、少なくとも約５０倍、少なくとも約７５倍、少なくとも約１００倍、少なくとも約２００倍、少なくとも約５００倍、又は少なくとも約１０００倍、又は１０００倍超である。

【０１４３】

Ｖ．組成物

いくつかの実施形態では、本発明の医薬組成物は、本明細書に記載のコンジュゲートと、薬学的に許容される賦形剤とを含む医薬組成物である。

【０１４４】

Ａ．製剤

本発明のコンジュゲートから医薬組成物を調製する場合、薬学的に許容される担体は、固体又は液体のいずれかであり得る。固体形態の製剤としては、散剤、カシェ剤、及び分散性顆粒剤が挙げられる。固体担体は、希釈剤、結合剤、保存剤、崩壊剤、又はカプセル化材料としても作用し得る１種以上の物質であってもよい。製剤化及び投与のための技術の詳細は、科学文献及び特許文献に十分に記載されており、例えば、Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ’ｓ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ，Ｍａａｃｋ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ Ｃｏ，Ｅａｓｔｏｎ ＰＡ（「Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ’ｓ」）の最新版を参照されたい。

【０１４５】

散剤では、担体は細かく分割された固体であり、これは細かく分割された有効構成成分と混合されている。錠剤では、有効構成成分は、必要な結合特性を有する担体と好適な比率で混合され、所望の形状及びサイズに圧縮される。散剤及び錠剤は、好ましくは本発明のコンジュゲートを５％又は１０％～７０％含有する。

【０１４６】

液体形態の製剤としては、溶液、懸濁液、及びエマルジョン、例えば、水又は水／プロピレングリコール溶液が挙げられる。非経口注射の場合、液体製剤は、ポリエチレングリコール水溶液中の溶液として製剤化され得る。

【０１４７】

経口使用に好適な水溶液は、本発明のコンジュゲートを水に溶解し、必要に応じて好適な着色料、香味料、安定化剤、及び増粘剤を添加することによって調製され得る。経口使用に好適な水性懸濁液は、粘性材料、例えば、天然又は合成のガム、樹脂、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、アルギン酸ナトリウム、ポリビニルピロリドン、トラガカントガム及びアカシアガム、並びに分散剤又は湿潤剤、例えば、天然に存在するホスファチド（例えば、レシチン）、アルキレンオキシドと脂肪酸との縮合生成物（例えば、ポリオキシエチレンステアレート）、エチレンオキシドと長鎖脂肪族アルコールとの縮合生成物（例えば、ヘプタデカエチレンオキシセタノール（heptadecaethylene oxycetanol））、エチレンオキシドと脂肪酸及びヘキシトールに由来する部分エステルとの縮合生成物（例えばポリオキシエチレンソルビトールモノオレエート）、又はエチレンオキシドと脂肪酸及び無水ヘキシトールに由来する部分エステルとの縮合生成物（例えば、ポリオキシエチレンソルビタンモノオレエート）と共に、細かく分割された有効構成成分を水中に分散させることによって作製することができる。水性懸濁液はまた、エチル又はｎ－プロピルｐ－ヒドロキシベンゾエートなどの１種以上の保存剤、１種以上の着色剤、１種以上の香味剤、及びスクロース、アスパルテーム、又はサッカリンなどの１種以上の甘味剤を含有してもよい。製剤は、オスモル濃度について調整され得る。

【０１４８】

使用する直前に経口投与用の液体形態の製剤に変換されることが意図された固体形態の

製剤も含まれる。そのような液体形態としては、溶液、懸濁液、及びエマルジョンが挙げられる。これらの製剤は、有効構成成分に加えて、着色料、香味料、安定化剤、緩衝剤、人工及び天然甘味料、分散助剤、増粘料、可溶化剤などを含有してもよい。

【０１４９】

油性懸濁液は、本発明のコンジュゲートを落花生油、オリーブ油、ゴマ油、若しくはヤシ油などの植物油、又は流動パラフィンなどの鉱油；又はこれらの混合物に懸濁することによって製剤化され得る。油性懸濁液は、蜜蝋、固形パラフィン、又はセチルアルコールなどの増粘剤を含有し得る。甘味剤、例えば、グリセロール、ソルビトール、又はスクロースが、口当たりのよい経口製剤を提供するために添加されてもよい。これらの製剤は、アスコルビン酸などの抗酸化剤の添加によって保存することができる。注射用油性ビヒクルの一例として、Ｍｉｎｔｏ，Ｊ．Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．Ｅｘｐ．Ｔｈｅｒ．２８１：９３－１０２，１９９７を参照のこと。本発明の医薬製剤は、水中油型エマルジョンの形態であってもよい。油相は、上記の植物油若しくは鉱油、又はこれらの混合物であり得る。好適な乳化剤としては、アカシアガム及びトラガカントガムなどの天然に存在するガム、大豆レシチンなどの天然に存在するホスファチド、脂肪酸及び無水ヘキシトールに由来するエステル又は部分エステル、例えばソルビタンモノオレエート、並びにこれらの部分エステルとエチレンオキシドとの縮合生成物、例えばポリオキシエチレンソルビタンモノオレエートが挙げられる。エマルジョンはまた、シロップ剤及びエリキシル剤の製剤と同様に、甘味剤及び香味剤も含有し得る。そのような製剤はまた、粘滑剤、保存剤、又は着色剤も含有し得る。

【０１５０】

本発明の組成物は、体内で徐放するためにマイクロスフェアとして送達することもできる。例えば、マイクロスフェアは、皮下に徐放される薬物含有マイクロスフェアの皮内注射による投与のために製剤化されてもよく（Ｒａｏ，Ｊ．Ｂｉｏｍａｔｅｒ Ｓｃｉ．Ｐｏｌｙｍ．Ｅｄ．７：６２３－６４５，１９９５を参照；生分解性及び注射用ゲル製剤として製剤化されてもよく（例えば、Ｇａｏ Ｐｈａｒｍ．Ｒｅｓ．１２：８５７－８６３，１９９５）；又は経口投与のためのマイクロスフェアとして製剤化されてもよい（例えば、Ｅｙｌｅｓ，Ｊ．Ｐｈａｒｍ．Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．４９：６６９－６７４，１９９７を参照）。経皮経路及び皮内経路は両方とも、数週間又は数ヶ月間にわたる一定の送達を可能にする。

【０１５１】

別の実施形態では、本発明の組成物は、腫瘍内投与、眼への硝子体内投与、又は関節の関節腔内投与などの体腔内への非経口投与のために製剤化することができる。投与のための製剤は、一般に、薬学的に許容される担体に溶解した本発明の組成物の溶液を含む。採用され得る許容されるビヒクル及び溶媒には、水及びリンゲル液、等張塩化ナトリウム液がある。更に、無菌の不揮発性油は、溶媒又は懸濁媒体として従来から用いられている。この目的のために、合成モノジグリセリド又はジグリセリドを含む任意の無刺激性不揮発性油を使用することができる。更に、オレイン酸などの脂肪酸も同様に注射剤の調製に使用することができる。これらの溶液は無菌であり、概して望ましくない物質を含まない。これらの製剤は、従来の周知の滅菌技術によって滅菌され得る。製剤は、ｐＨ調整剤及び緩衝剤、毒性調整剤、例えば酢酸ナトリウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム、乳酸ナトリウムなどの生理学的条件に近づけるために必要とされる薬学的に許容される補助物質を含有してもよい。これらの製剤における本発明の組成物の濃度は、広範に変えることができ、選択された特定の投与様式及び患者のニーズに応じて流体量、粘度、体重などに主に基づいて選択される。静脈内、腫瘍内、又は硝子体内投与の場合、製剤は、滅菌注射用製剤、例えば滅菌注射用水性又は油性懸濁液であり得る。この懸濁液は、好適な分散剤又は湿潤剤及び懸濁化剤を使用して、公知の技術に従って調製することができる。滅菌注射用製剤はまた、非毒性の非経口的に許容される希釈剤又は溶媒（例えば、１，３－ブタンジオールの溶液）中の滅菌注射用溶液又は懸濁液であり得る。

【０１５２】

別の実施形態では、本発明の組成物の製剤は、細胞膜と融合するか又はエンドサイトーシスされるリポソームの使用によって送達することができる、すなわち、リポソームに付着した又はオリゴヌクレオチドに直接付着したリガンドを使用し、それらが細胞の表面膜タンパク質受容体に結合してエンドサイトーシスを引き起こすことによって送達することができる。リポソームを使用することによって、特に、標的細胞に特異的なリガンドをリポソーム表面に保持させるか、又はそうでなければ特定の器官に優先的に指向させる場合、本発明の組成物をインビボで標的細胞に集中的に送達することができる。（例えば、Ａｌ－Ｍｕｈａｍｍｅｄ，Ｊ．Ｍｉｃｒｏｅｎｃａｐｓｕｌ．１３：２９３－３０６，１９９６；Ｃｈｏｎｎ，Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．６：６９８－７０８，１９９５；Ｏｓｔｒｏ，Ａｍ．Ｊ．Ｈｏｓｐ．Ｐｈａｒｍ．４６：１５７６－１５８７，１９８９を参照のこと）。

【０１５３】

脂質ベースの薬物送達系としては、脂質溶液、脂質エマルジョン、脂質分散液、自己乳化型薬物送達系（ＳＥＤＤＳ）及び自己マイクロ乳化型薬物送達系（ＳＭＥＤＤＳ）が挙げられる。特に、ＳＥＤＤＳ及びＳＭＥＤＤＳは、脂質、界面活性剤、及び補助界面活性剤（ｃｏｓｕｒｆａｃｔａｎｔ）の等方性混合物であり、水性媒体中で自発的に分散し、微細エマルジョン（ＳＥＤＤＳ）又はマイクロエマルジョン（ＳＭＥＤＤＳ）を形成することができる。本発明の製剤において有用な脂質としては、任意の天然脂質又は合成脂質が挙げられ、ゴマ油、オリーブ油、ヒマシ油、ピーナッツ油、脂肪酸エステル、グリセロールエステル、Ｌａｂｒａｆｉｌ（登録商標）、Ｌａｂｒａｓｏｌ（登録商標）、Ｃｒｅｍｏｐｈｏｒ（登録商標）、Ｓｏｌｕｔｏｌ（登録商標）、Ｔｗｅｅｎ（登録商標）、Ｃａｐｒｙｏｌ（登録商標）、Ｃａｐｍｕｌ（登録商標）、Ｃａｐｔｅｘ（登録商標）、及びＰｅｃｅｏｌ（登録商標）が挙げられるが、これらに限定されない。

【０１５４】

Ｂ．投与

本発明のコンジュゲート及び組成物は、経口、非経口及び局所方法を含む任意の好適な手段によって送達することができる。いくつかの実施形態では、送達方法は関節内である。いくつかの実施形態では、送達方法は硝子体内である。いくつかの実施形態では、送達方法は腫瘍内である。

【０１５５】

医薬製剤は、好ましくは単位剤形である。このような形態において、製剤は、適切な量の本発明のコンジュゲート及び組成物を含有する単位用量に細分化される。単位剤形は、包装された製剤であり得、この包装には、個別の量の製剤、例えば、包装された錠剤、カプセル剤、及びバイアル又はアンプルに入った散剤が含まれる。

【０１５６】

本発明のコンジュゲート及び組成物は、他の薬剤と共投与してもよい。共投与は、本発明のコンジュゲート又は組成物を、他の薬剤から０．５、１、２、４、６、８、１０、１２、１６、２０、又は２４時間以内に投与することを含む。共投与はまた、同時に、ほぼ同時に（例えば、互いに約１、５、１０、１５、２０、又は３０分以内に）、又は任意の順序で逐次的に投与することを含む。更に、本発明のコンジュゲート又は組成物は各々、１日当たりの好ましい投与量を提供するように、１日１回、又は１日２回、３回、若しくはそれ以上投与することができる。

【０１５７】

いくつかの実施形態では、共投与は、共製剤化、すなわち、本発明のコンジュゲート及び組成物と任意の他の薬剤とを含む単一の医薬組成物を調製することによって達成することができる。あるいは、様々な構成成分を別々に製剤化することができる。

【０１５８】

本発明のコンジュゲート及び組成物並びに任意の他の薬剤は、任意の好適な量で存在し得、様々な因子（対象の体重及び年齢、疾患の状態などが挙げられるが、これらに限定されない）に依存し得る。好適な用量範囲は、約０．１ｍｇ～約１０，０００ｍｇ、又は約

１ｍｇ～約１０００ｍｇ、又は約１０ｍｇ～約７５０ｍｇ、又は約２５ｍｇ～約５００ｍｇ、又は約５０ｍｇ～約２５０ｍｇを含む。好適な用量はまた、約１ｍｇ、５、１０、２０、３０、４０、５０、６０、７０、８０、９０、１００、２００、３００、４００、５００、６００、７００、８００、９００又は１０００ｍｇを含む。本組成物はまた、他の適合性の治療剤を含んでもよい。本明細書に記載のコンジュゲートは、互いに組み合わせて使用しても、グルココルチコイド受容体の調節に有用であることが知られている他の活性薬剤と組み合わせて使用しても、単独では有効でない場合があるが活性薬剤の有効性に寄与する可能性のある補助剤と組み合わせて使用してもよい。

【０１５９】

ＶＩ．治療方法

いくつかの実施形態では、本発明は、疾患又は障害の治療を必要とする対象における疾患又は障害を治療するための、本明細書に記載されるコンジュゲート又は組成物を含む方法及び／又は使用に関する。

【０１６０】

いくつかの実施形態では、本方法は、コンジュゲートの複数回投与を含む。いくつかの実施形態では、本方法は、コンジュゲートを毎日、隔日、３日毎、又は毎週投与することを含む。いくつかの実施形態では、本方法は、コンジュゲートを毎週、２週間毎、３週間毎、又は毎月投与することを含む。いくつかの実施形態では、本方法は、コンジュゲートを毎月、２ヶ月毎、又は３ヶ月毎に投与することを含む。いくつかの実施形態では、本方法は、コンジュゲートを年に２回又は３回投与することを含む。いくつかの実施形態では、本方法は、コンジュゲートを毎年投与することを含む。

【０１６１】

Ａ．眼障害

いくつかの実施形態では、本発明の方法は、眼障害の治療を必要とする対象において眼障害を治療する方法であって、本明細書に記載のコンジュゲートを該対象に投与することを含む、方法である。

【０１６２】

いくつかの実施形態では、本方法は、コンジュゲートを硝子体内に投与することを含む。

【０１６３】

いくつかの実施形態では、本方法は、コンジュゲートを毎月、２ヶ月毎、又は３ヶ月毎に投与することを含む。

【０１６４】

いくつかの実施形態では、コンジュゲートの硝子体半減期は、非コンジュゲートペプチドの半減期よりも少なくとも２倍、３倍、４倍、５倍、１０倍、２０倍、５０倍、又は少なくとも１００倍長い。いくつかの実施形態では、コンジュゲートの硝子体半減期は、非コンジュゲートペプチドの半減期よりも少なくとも５倍長い。

【０１６５】

本開示の方法を使用して治療され得る眼障害としては、ブドウ膜炎、黄斑変性（加齢黄斑変性（ＡＭＤ）としても公知である）、脈絡膜血管新生、網膜血管新生、増殖性硝子体網膜症、緑内障、及び眼炎症が挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、黄斑変性は滲出型黄斑変性である。いくつかの実施形態では、黄斑変性は萎縮型黄斑変性である。

【０１６６】

本開示の方法を使用して治療され得る眼疾患としては、急性黄斑神経網膜症；ベーチェット病；脈絡膜血管新生；糖尿病性ブドウ膜炎；ヒストプラスマ症；黄斑変性、例えば、急性黄斑変性、非滲出型加齢黄斑変性及び滲出型加齢黄斑変性；浮腫、例えば、黄斑浮腫、嚢胞様黄斑浮腫及び糖尿病性黄斑浮腫；多巣性脈絡膜炎；後眼部又は位置に影響を及ぼす眼外傷；眼腫瘍；網膜障害、例えば、網膜中心静脈閉塞症、糖尿病性網膜症（増殖糖尿病網膜症を含む）、増殖性硝子体網膜症（ＰＶＲ）、網膜動脈閉塞症、網膜剥離、ブドウ

膜炎性網膜疾患（uveitic retinal disease）；交感性眼炎；フォークト－小柳－原田病；ブドウ膜拡散（uveal diffusion）；眼部レーザー治療によって引き起こされる又は影響を受ける後眼部病態；光線力学療法によって引き起こされる又は影響を受ける後眼部病態；光凝固、放射線網膜症；黄斑上膜障害；網膜静脈分枝閉塞症；前部虚血性視神経症；非網膜症糖尿病性網膜機能不全（non-retinopathy diabetic retinal dysfunction）；網膜分離症；網膜色素変性；緑内障；アッシャー症候群、錐体杆体ジストロフィー；スターガルト病（黄色斑眼底（fundus flavimaculatus））；遺伝性黄斑変性；脈絡網膜変性；レーベル先天黒内障；先天停止性夜盲；コロイデレミア；バルデー・ビードル症候群；黄斑部毛細血管拡張症；レーベル遺伝性視神経症；未熟児網膜症；並びに色覚異常（１色覚、１型２色覚、２型２色覚、及び３型２色覚を含む）が挙げられるが、これらに限定されない。

【０１６７】

場合によっては、眼疾患は、緑内障、網膜色素変性、黄斑変性、網膜分離症、レーベル先天黒内障、糖尿病性網膜症、１色覚、又は色盲である。

【０１６８】

場合によっては、コンジュゲートを含む組成物は、硝子体内、経強膜、眼周囲、結膜、テノン嚢下、前房内、網膜下、結膜下、眼球後、又は涙小管内の投与経路によって投与される。場合によっては、コンジュゲートを含む組成物は硝子体内に投与される。場合によっては、組成物は、硝子体内に、又は後眼部近傍に送達される。場合によっては、組成物は注射によって硝子体内に投与される。場合によっては、コンジュゲートを含む組成物は、眼内注射によって投与される。

【０１６９】

Ｂ．関節疾患

いくつかの実施形態では、本発明の方法は、関節の疾患又は障害の治療を必要とする対象において関節の疾患又は障害を治療する方法であって、本明細書に記載のコンジュゲートを該対象に投与することを含む、方法である。

【０１７０】

いくつかの実施形態では、本方法は、コンジュゲートを関節内投与することを含む。

【０１７１】

いくつかの実施形態では、コンジュゲートの関節内半減期は、非コンジュゲートペプチドの半減期よりも少なくとも２倍、３倍、４倍、５倍、１０倍、２０倍、５０倍、又は少なくとも１００倍長い。いくつかの実施形態では、コンジュゲートの関節内半減期は、非コンジュゲートペプチドの半減期よりも少なくとも５倍長い。

【０１７２】

本発明はまた、本発明のコンジュゲートを使用して関節組織の疾患及び障害を治療する方法を提供する。関節組織の疾患及び障害の例としては、関節リウマチ、摩耗に伴う変形性関節症、加齢に伴う変形性関節症、外傷後変形性関節症、乾癬性関節炎、及び無菌性のインプラントのゆるみ、関節液貯留、強直性脊椎炎、滑液包炎、痛風、反応性関節炎、滑膜炎、及び阻血性壊死が挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、疾患又は障害は、関節リウマチ、摩耗に伴う変形性関節症、加齢に伴う変形性関節症、外傷後変形性関節症、乾癬性関節炎、及び無菌性のインプラントのゆるみ、関節液貯留、強直性脊椎炎、滑液包炎、痛風、反応性関節炎、滑膜炎、又は阻血性壊死である。

【０１７３】

多くのポリペプチドは、免疫細胞機能を減弱させる薬剤として使用されており、多くの関節障害の治療に大いに役立っている。関節組織は、特に損傷及び疾患に対して脆弱であるが、これは、これらの攻撃に対する典型的な細胞応答、すなわち炎症メディエーターの上方制御が、関節軟骨の異化作用及び下部の骨組織の再吸収を促進するシグナルでもあるためである。関節面の変性は、関節組織の損傷の悪化及び炎症メディエーターの更なる上方制御を促進する。時間の経過とともに、これらのメカニズムはフィードフォワードループを生み、関節組織に累積的損傷をもたらす。

【０１７４】
ヒト又は動物の身体のいかなる関節も、本発明の方法及びコンジュゲートを使用して治療され得る。代表的な関節としては、線維性関節、軟骨性関節、滑膜関節、椎間関節、不動関節、半関節、及び可動関節が挙げられるが、これらに限定されない。関節は、２つの関節面を有する単関節、３つ以上の関節面を有する複関節（compound joint）、又は２つ以上の関節面及び膝関節若しくは半月板を有する複合関節（complex joint）であり得る。本発明のコンジュゲート及び方法を使用して治療することができる解剖学的関節としては、手関節（指を含む）、肘関節、手首関節、肩関節、胸骨及び鎖骨の関節、脊椎関節、顎関節及び頭蓋関節、骨盤関節及び股関節、膝関節、足首関節及び足関節（つま先を含む）が挙げられるが、これらに限定されない。関節はまた、平面関節、球関節、蝶番関節、車軸関節、楕円関節、及び鞍関節として分類することもできる。本発明のコンジュゲート及び方法は、結合組織、軟骨、関節面、滑液腔、半月板などを含むがこれらに限定されない関節の組織を治療するために使用することができる。

【０１７５】
免疫細胞機能を減弱させるように設計された薬物の例としては、腫瘍壊死因子－α及びＩＬ－１β、ＩＬ－６、又はインターフェロン－γに干渉することができる抗体が挙げられる。他の例としては、Ｔ細胞及びＢ細胞機能の選択的抗体阻害剤が挙げられる。これらの抗体は、モノクローナルＩｇＧ抗体、ＩｇＧ抗体断片、一本鎖ｓｃＦｖ抗体、単一ドメイン重鎖ＶＨＨ抗体、又は操作された抗体様足場、例えばアドネクチン、アフィボディ、アンチカリン、ＤＡＲＰｉｎ、及び操作されたクニッツ型阻害剤であり得る。他の例としては、腫瘍壊死因子－α及びＩＬ－１β、ＩＬ－６、又はインターフェロン－γなどの免疫調節サイトカインの受容体デコイも挙げられる。

【０１７６】
上記に列挙したものなどの抗炎症薬の使用による一般的な副作用の一つは、感染リスクの上昇である。それらは身体の免疫応答を減弱させるため、免疫系は、細菌、ウイルス、及び寄生虫と戦う能力が損なわれる。したがって、これらの薬物を全身的に使用する利点と、全身的な免疫抑制に伴うリスクとを慎重に比較検討する必要がある。関節リウマチなどの全身が免疫亢進障害の影響を受けている疾患の場合、免疫抑制薬の全身的使用が正当化され得る。しかしながら、関節が１つだけ又は限定された数しか影響を受けない病態では、全身的な感染リスクから、これらの薬物の全身的使用は正当化されないことが多い。

【０１７７】
代替法として、免疫調節薬の関節内（ＩＡ）投与が、変形性関節症に関連する炎症の長期的影響を予防又は阻害するために提案されている。しかしながら、これらの薬物は、関節腔から急速に排出され、関節内投与後に十分な治療の持続時間をもたらさない。関節内注射後、滑膜内の抗炎症性タンパク質の半減期は短い（＜１．５時間）。このことは、インフリキシマブ及びエタネルセプトを含む炎症阻害剤が、種々の関節障害のためにヒトに関節内注射によって投与された臨床研究から明らかである。これらの研究の中には、関節炎症の有意な軽減を報告しているものもあるが、良好な結果を得るためには頻繁な（例えば、毎週の）投与が必要であったことを認めている。したがって、既存の薬物を使用する関節内抗炎症療法は、高いコストと頻繁な関節内投薬の不便さによって制限される。関節障害を治療するためのこの治療アプローチを可能にするためには、滑液内の抗炎症薬の生物活性を延長する方法が必要とされることは明らかである。

【０１７８】
関節障害に関連する主な症状は、疼痛、関節液貯留、可動域の制限、及び関節の解剖学的構造の病的リモデリングである。関節障害を治療するための治療の有効性には、視覚評価スコアなどの一般化された評価によって測定される疼痛の軽減が含まれ得る。有効性はまた、特定の関節障害に特化したシステム、例えば、変形性関節症のためのＷＯＭＡＣスコア、関節リウマチのためのＡＣＲ２０、乾癬性関節炎のためのＰｓｏｒｉａｔｉｃ Ａｒｔｈｒｉｔｉｓ Ｑｕａｌｉｔｙ ｏｆ Ｌｉｆｅ、又は強直性脊椎炎のためのＳＡＳＳＳを使用して、改善されたスコアに基づいて判定されてもよい。有効性はまた、無痛歩

行距離の増加又は関節可動域の増加などの機能的なアウトプットを使用して測定されてもよい。有効性はまた、正常な関節の解剖学的構造の回復を示す放射線画像のエビデンスに基づいて測定されてもよい。

【０１７９】

コンジュゲートは、上記で考察した任意の好適な頻度又は量で投与することができる。いくつかの実施形態では、コンジュゲートは、約１ヶ月に１回以下で関節に注射される。いくつかの実施形態では、コンジュゲートは、約１ヶ月に１回から６ヶ月に１回まで関節に注射される。いくつかの実施形態では、コンジュゲートは、２ヶ月に１回又は３ヶ月に１回、関節に注射される。

【０１８０】

１．変形性関節症

２０１５年には、推定７７５万人の米国人が、既知の関節損傷に関連する可能性のある変形性関節症（ＯＡ）の症状を経験している。外傷後ＯＡ（ＰＴＯＡ）は、全てのＯＡ症例の少なくとも１５％を占めるが、他のＯＡ診断の多くもまた、以前の関節外傷に関連している可能性があると想定される。疾患修飾療法がないため、人工関節置換術は多くの場合、関連する不快症状を取り除き、可動性を回復するための唯一の治療選択肢である。しかしながら、ＰＴＯＡは、関節置換が実行可能な選択肢ではない若年患者で診断されることが多い。全体として、これらのＰＴＯＡ患者の治療にかかる費用は、医療費において毎年４０億ドルを超えている。

【０１８１】

損傷に関連した炎症を短期的に抑制することで、ＰＴＯＡの長期的な症状が抑えられる。脱臼、靭帯断裂、半月板損傷、及び関節内骨折を含む多くの種類の関節損傷が、ＰＴＯＡと関連している。最初の損傷は急性であり得るが、その損傷は、炎症性メディエーターのカスケードを開始するのに十分である。結果として生じる慢性的な関節全体の炎症は、関節軟骨の異化を促進し得、その結果、経時的に更なる組織損傷が蓄積され、ＰＴＯＡとして現れる。ＴＮＦα及びＩＬ－１βが関節の炎症を媒介する役割を担っていることはよく知られている。これらのサイトカインは相互作用して軟骨の破壊を促進するが、これは軟骨マトリックス成分の発現を下方制御することと、マトリックスメタロプロテイナーゼ（ＭＭＰ）の発現を上方制御することとの両方によって引き起こされる。ＴＮＦαはまた、破骨細胞の動員を刺激し、炎症環境において骨形成する骨芽細胞のアポトーシスを誘導し、関節軟骨組織の侵食に寄与する。ＴＮＦα及びＩＬ－１βは、関節損傷に対する炎症応答を和らげるための有力な標的である。関節環境におけるこれらの重要な急性炎症性サイトカインの阻害は、ＰＴＯＡの進行を遅らせる早期介入のために提案されている。

【０１８２】

２．関節内微粒子に対する免疫応答に起因する炎症

関節の関節面間で生じる摩耗は、関節の炎症及び骨溶解を引き起こすミクロンスケールの粒子を生成する可能性がある。摩耗粒子は、骨化軟骨病変（ossified cartilage lesions）、骨棘（骨増殖体）、又は露出した軟骨下骨病変などの内因性表面間の摩耗に起因して生成され得る。このタイプの摩耗粒子生成は、ＯＡの後期に頻発し、重度の関節痛及び歩行障害をもたらす。この更なる炎症応答は、ＯＡにおける関節組織の変性速度を加速させる。

【０１８３】

摩耗粒子はまた、人工関節の表面間にも形成され得る。２０１５年には、７００万人を超える米国人が人工関節を装着して生活していた。このうち２５万人近くは、デバイス周囲の骨の骨溶解が原因で最終的にデバイスのゆるみ及び破損が生じて、最終的に再置換術を必要とする。

【０１８４】

摩耗に関連する炎症は、関節面から放出された通常であれば不活性な微粒子に対する異物応答から生じる。滑膜表層内のマクロファージは、摩耗微粒子を異物として容易に認識し、他の活性免疫細胞を滑膜に動員する炎症促進因子を放出し、破骨細胞の増殖を刺激す

ると同時に骨形成を阻害する。こうして持続的な炎症は、軟骨の変性及び骨溶解が、関節面間の摩耗の増加、並びに運動及び物理的ストレスの増加をもたらし、その結果、より多くの粒子が生成されるフィードフォワードサイクルを引き起こす。

【０１８５】

いくつかの実施形態では、ペプチドは、免疫細胞機能の活性を調節する。いくつかの実施形態では、ペプチドは、腫瘍壊死因子－α、インターロイキン－１β、インターロイキン－６、又はインターフェロン－γを阻害する。いくつかの実施形態では、ペプチドは腫瘍壊死因子－αを阻害する。

【０１８６】

腫瘍壊死因子（ＴＮＦα）は、異物応答を制御するための有力な標的である。ＴＮＦαが関節の炎症を媒介する役割を担っていることはよく知られている。ＴＮＦαはまた、破骨細胞の動員を刺激し、炎症環境において骨形成する骨芽細胞のアポトーシスを誘導し、軟骨下骨の骨溶解をもたらす。全身投与された受容体拮抗薬（エタネルセプト）を使用したＴＮＦαの阻害は、マウスにおいて摩耗粒子によって誘導される骨吸収を低減することが示されているが、全身的な抗ＴＮＦαに伴うリスクは、局所的な病態に対して許容可能であるとは一般にみなされていない。代替法として、関節内摩耗粒子に対する溶骨性応答を予防又は阻害するために関節内抗ＴＮＦα療法が提案されている。

【０１８７】

いくつかの実施形態では、本発明の使用は、対象における疾患又は障害を治療する方法のための医薬の調製のための、本明細書に記載されるコンジュゲートの使用である。

【０１８８】

いくつかの実施形態では、対象はヒトである。

【０１８９】

いくつかの実施形態では、本発明の使用は、本明細書に記載されるコンジュゲート又は医薬組成物を含む、疾患又は障害を治療するための使用である。

【０１９０】

いくつかの実施形態では、本発明の医薬組成物は、本明細書に記載されるコンジュゲートを含む、疾患又は障害の治療に使用するための医薬組成物である。

【０１９１】

いくつかの実施形態では、本発明のコンジュゲートは、本明細書に記載される疾患又は障害の治療に使用するためのコンジュゲートである。

【０１９２】

ＶＩＩ．調製方法

いくつかの実施形態は、本方法は、本発明のペプチドを調製する方法であって、（ａ）該ペプチドをコードする遺伝子配列を第１の反応混合物中、細菌において翻訳すること、並びに（ｂ）第１の反応混合物及びエチレンジアミン四酢酸（ＥＤＴＡ）から第２の反応混合物を形成することによって第１の反応混合物からエンドトキシンを除去すること、を含み、これによりペプチドを調製する、方法である。

【０１９３】

いくつかの実施形態では、本方法は、本発明のペプチドを調製する方法であって、（ａ）該ペプチドをコードする遺伝子配列を第１の反応混合物中、細菌において翻訳すること、（ｂ）第１の反応混合物及びエチレンジアミン四酢酸（ＥＤＴＡ）から第２の反応混合物を形成すること、並びに（ｃ）第２の反応混合物を濾過すること、を含み、これによりペプチドを調製する、方法である。いくつかの実施形態では、第２の反応混合物は、塩化ナトリウムを更に含む。いくつかの実施形態では、第２の反応混合物は、クエン酸ナトリウムを更に含む。いくつかの実施形態では、第２の反応混合物は、クエン酸ナトリウムｐＨ５．５を更に含む。

【０１９４】

いくつかの実施形態では、細菌は大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）である。

【０１９５】

いくつかの実施形態では、第２の反応混合物は、約０．１ｍＭ～約５ｍＭのＥＤＴＡを含む。いくつかの実施形態では、第２の反応混合物は、約０．２ｍＭ～約１ｍＭのＥＤＴＡを含む。

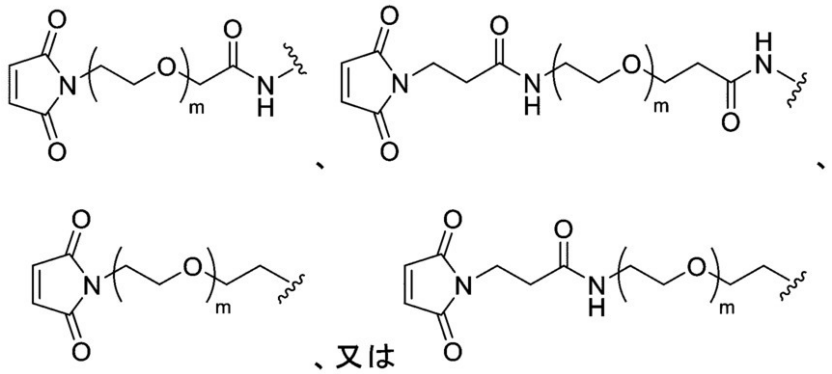
【０１９６】

第２の反応混合物の濾過は、当該技術分野で公知の任意の方法によって達成することができる。いくつかの実施形態では、第２の反応混合物の濾過は、濾過膜を含む。いくつかの実施形態では、濾過膜は、ポリエーテルスルホン（ＰＥＳ）又は再生セルロースを含む。例えば、濾過膜は、５０ｋＤａ又は１００ｋＤａのＰＥＳ膜を含むことができる。

【０１９７】

いくつかの実施形態では、本発明のコンジュゲートを調製する方法は、（ａ）約０．１ＭＤａ～約３ＭＤａの分子量を有するヒアルロン酸ポリマー、ヒアルロン酸モノマー当たり約０．１～約２当量のカップリング剤、及び式H_2N-R^Yの有機リンカー剤［式中、R^Yは、

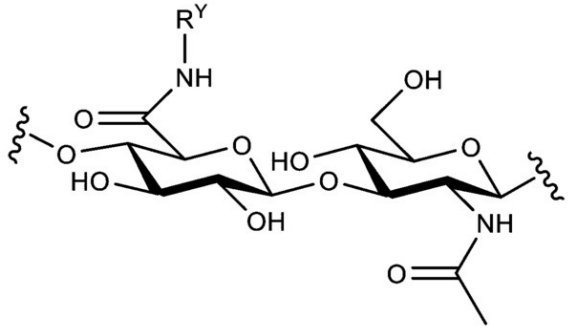
【化４１】



であり、

下付き文字ｍは、１～３００の整数である］を含む第１の反応混合物を形成することであって、これにより式ＩＶ：

【化４２】



の複数のモノマーを有する中間体ポリマーが形成される、第１の反応混合物を形成すること、並びに

（ｂ）中間体ポリマー、及び約５ｋＤａ～約２００ｋＤａの分子量を有するペプチドを含む第２の反応混合物を形成することであって、該ペプチドが１つ以上の－ＳＨを含み、これによりコンジュゲートが調製される、第２の反応混合物を形成すること、を含む。

【０１９８】

いくつかの実施形態では、ヒアルロン酸ポリマーは、約０．４ＭＤａ～約２ＭＤａの分子量を有する。いくつかの実施形態では、ヒアルロン酸ポリマーは、約０．７ＭＤａ～約１．５ＭＤａの分子量を有する。いくつかの実施形態では、ヒアルロン酸ポリマーは、約０．８ＭＤａの分子量を有する。

【０１９９】

いくつかの実施形態では、第１の反応混合物は、ヒアルロン酸モノマー当たり約０．２～約１．５当量のカップリング剤を含む。いくつかの実施形態では、第１の反応混合物は、ヒアルロン酸モノマー当たり約０．２～約１当量のカップリング剤を含む。

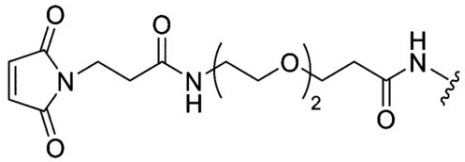
【０２００】

いくつかの実施形態では、カップリング剤はカルボジイミドを含む。いくつかの実施形態では、カップリング剤は、１－エチル－３－（３－ジメチルアミノプロピル）カルボジイミド、１，３－ジイソプロピルカルボジイミド、又はジシクロヘキシルカルボジイミド、又はその塩である。いくつかの実施形態では、カップリング剤は、１－エチル－３－（３－ジメチルアミノプロピル）カルボジイミド又はその塩である。

【０２０１】

いくつかの実施形態では、R^Yは、

【化４３】



である。

【０２０２】

いくつかの実施形態では、第１の反応混合物は、ヒアルロン酸モノマー当たり約０．２～約６当量の有機リンカー剤を含む。

【０２０３】

いくつかの実施形態では、第１の反応混合物は、触媒を含む。いくつかの実施形態では、触媒は、２－シアノ－２－（ヒドロキシイミノ）酢酸エチル（Ｏｘｙｍａ）、ヒドロキシベンゾトリアゾール、Ｎ－ヒドロキシスクシンイミド（ＮＨＳ）、Ｎ－ヒドロキシスルホスクシンイミド（スルホ－ＮＨＳ）、又は１－ヒドロキシ－７－アザベンゾトリアゾール、又はそれらの塩である。いくつかの実施形態では、触媒はヒドロキシベンゾトリアゾールである。

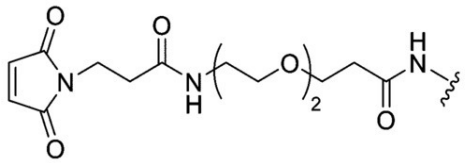
【０２０４】

いくつかの実施形態では、第２の反応混合物は、有機リンカー当たり約０．５～約１．５当量のペプチドを含む。

【０２０５】

いくつかの実施形態では、本発明のコンジュゲートを調製する方法は、（ａ）約０．８ＭＤａの分子量を有するヒアルロン酸ポリマー、ヒアルロン酸モノマー当たり約０．２～約１当量のカップリング剤、及び式H_2N-R^Yの有機リンカー剤［式中、R^Yは、

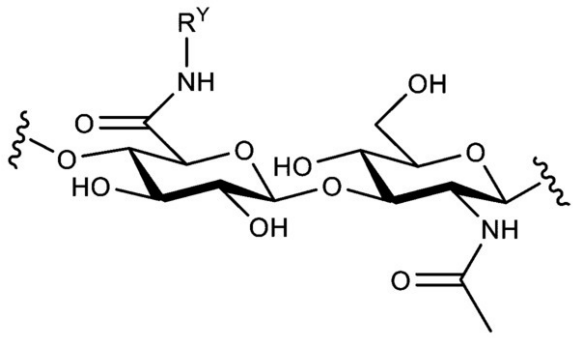
【化４４】



である］を含む第１の反応混合物を形成することであって、

これにより式ＩＶ：

【化４５】



（IV）

の複数のモノマーを有する中間体ポリマーが形成され、

該カップリング剤が、１－エチル－３－（３－ジメチルアミノプロピル）カルボジイミド又はその塩であり、

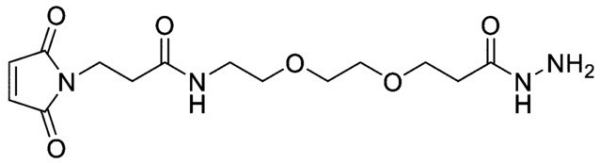
該第１の反応混合物が、ヒアルロン酸モノマー当たり約０．２～約６当量の有機リンカー剤を含む、第１の反応混合物を形成すること、並びに

（ｂ）中間体ポリマー、及び約５ｋＤａ～約２００ｋＤａの分子量を有するペプチドを含む第２の反応混合物を形成することであって、該ペプチドが１つ以上の－ＳＨを含み、これによりコンジュゲートが調製される、第２の反応混合物を形成すること、を含む。

【０２０６】

有機リンカー剤は、以下の構造：

【化４６】



を有し、

３－（２，５－ジオキソ－２，５－ジヒドロ－１Ｈ－ピロール－１－イル）－Ｎ－（２－（２－（３－ヒドラジネイル－３－オキソプロポキシ）エトキシ）エチル）プロパンアミドとして知られ、ＭＰ２Ｈという略称でも知られている。本明細書で使用される有機リンカー剤又は有機リンカーとしての「ＭＰ２Ｈ」への言及は、当業者によるその使用の文脈において理解される。

【０２０７】

ＶＩＩＩ．実施例

特定の略語及び頭字語が、実験の詳細を説明する際に使用される。これらのほとんどは当業者によって理解されるであろうが、以下の表は、これらの略語及び頭字語の多くのリストを含む。

【表１】

表１．略語及び頭字語のリスト。

略語	意味
aH	αヘリックス
BLI	バイオレイヤー干渉法
CBB	クマシーブリリアントブルー
Da	ダルトン
DMSO	ジメチルスルホキシド
DMTMM	４－（４，６－ジメトキシー１，３，５－トリアジンー２－イル）－４－メチルモルホリニウムクロリド
DPBS	ダルベッコリン酸緩衝生理食塩水
DTT	ジチオスレイトール
EDC	１－エチルー３－（３－ジメチルアミノプロピル）カルボジイミド
EDTA	エチレンジアミン四酢酸
ELISA	酵素結合免疫吸着測定法
FPLC	高速タンパク質液体クロマトグラフィー
HA	ヒアルロン酸
IL	インターロイキン
IMAC	固定化金属アフィニティクロマトグラフィー
IPTG	イソプロピルチオガラクトシド
ITV	硝子体内
kDa	キロダルトン
MDa	メガダルトン
MES	２－（Ｎ－モルホリノ）エタンスルホン酸
MVP	多価タンパク質
MW	分子量
MWCO	分子量カットオフ
NHS	Ｎ－ヒドロキシスクシンイミド
ORF	オープンリーディングフレーム
PBS	リン酸緩衝生理食塩水
RPM	毎分回転数
RT	室温
sdAb	単一ドメイン抗体
SDS－PAGE	ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動
SEC	サイズ排除クロマトグラフィー
SEC MALS	サイズ排除クロマトグラフィー多角度光散乱法
TB	テリフィックブロス
TCEP	トリス（２－カルボキシエチル）ホスフィン

【０２０８】

以下の実施例では一般的な方法を使用した。

【０２０９】

タンパク質／コンジュゲートの安定性のためのペプチドリンカーの付加

治療用タンパク質とＣ末端ペプチドリンカーとのインフレーム融合は、２つの方法によって達成された。ペプチドリンカーをコードする大腸菌（E.coli）のコドン最適化ヌクレオチドを治療用ＯＲＦ（ＭＶＰコンジュゲーションのための単一のＣ末端システイン残基が含まれる）に付加し、タンパク質発現プラスミドへの直接クローニングに適合するオーバーハング付きで、直鎖状Ｇｅｎｅｂｌｏｃｋ（ＩＤＴ製又は類似のもの）として注文した。あるいは、ペプチドリンカーをコードするコドン最適化配列を含有する治療用ＯＲＦに相補的なオリゴヌクレオチドプライマーをＰＣＲ反応で伸長及び増幅し、これによりタンパク質発現プラスミドに直接クローニングされる直鎖状アンプリコンを生成した。ペ

プチドリンカーに融合した治療薬を含有するＯＲＦの正確な配置及び完全性を確認するために、全ての単離されたプラスミドに対してサンガーシークエンシングを実施した。全てのＯＲＦは、市販のＴ７適合性大腸菌（E.coli）株内でＩＰＴＧ誘導性Ｔ７プロモータを介して発現した。

【０２１０】

大腸菌（E.coli）における細胞質発現

大腸菌（E.coli）において発現した可溶性タンパク質の量を決定するために、タンパク質をＩＰＴＧ誘導性Ｔ７プロモータ（ＮＥＢ　Ｓｈｕｆｆｌｅ　Ｔ７　Ｅｘｐｒｅｓｓ）の制御下に置き、テリフィックブロス中OD_{600nm}が０．６になるまで増殖させ、０．５ｍＭのＩＰＴＧを用いて３７℃で４時間誘導させた。培養サイズは、必要性及び目的に応じて変動したが、１０ｍＬ～１Ｌであった。

【０２１１】

大腸菌（E.coli）ペリプラズムでの発現

大腸菌（E.coli）ペリプラズム内での発現のために、大腸菌（E.coli）ＭａｌＥのペリプラズム標的配列をＯＲＦのＮ末端に付加した。その後の発現及び下流の精製技術は全て変更しなかった。

【０２１２】

ＩＭＡＣ及びアフィニティタグの除去

１Ｌの培養物から得られた大腸菌（E.coli）ペレットを、２５ｍＭ　ＨＥＰＥＳ、２０ｍＭイミダゾール、４００ｍＭ塩化ナトリウム、０．５ｍＭ　ＥＤＴＡ、５％グリセロール、０．０１％Ｔｗｅｅｎ　２０、ｐＨ７．５中に超音波処理によって溶解し、２０ｋ×ｇで清澄化し、ＧＥ　Ｎｉ－ＮＴＡ　ＨｉｓＴｒａｐ（商標）カラムに導入した。非特異的タンパク質を、４０ｍＭイミダゾールを加えた上記の緩衝液中で洗い流した。次いで、目的のタンパク質を、ＦＰＬＣを使用して２６０ｍＭイミダゾールへの勾配で溶出した。純度をＳＤＳ－ＰＡＧＥによって確認し、ＡＫＴＡ　Ｕｎｉｃｏｒｎソフトウェアによって同定された溶出ピーク面積を培養物収率の比較指標として使用した。場合によっては、Ｎ末端にＴＥＶ切断可能なＩＭＡＣアフィニティタグを有するタンパク質を発現させ、そのタグをＩＭＡＣ精製後に除去した。

【０２１３】

プロテインＡ精製

ポリヒスチジンアフィニティタグを使用しなかった場合、プロテインＡ樹脂（ＪＳＲ　Ｌｉｆｅ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ、Ａｍｓｐｈｅｒｅ　Ａ３）を使用して、２０ｍＭ　Ｔｒｉｓ、２５ｍＭ塩化ナトリウム、０．５ｍＭ　ＥＤＴＡ、ｐＨ８．５中の清澄化された大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）ライセートからｓｄＡｂを捕捉した。次いで、固定化されたｓｄＡｂを新鮮なライセート緩衝液中で洗浄し、次いで、５０ｍＭクエン酸ナトリウムｐＨ５、２５ｍＭ　ＮａＣｌ、１ｍＭ　ＥＤＴＡで溶出した。

【０２１４】

クロマトグラフィーポリッシング

タンパク質の更なる精製のために、プールしたＩＭＡＣ溶出液をナノ純水（nanopure water）で５倍に希釈し、２０ｍＭ　Ｔｒｉｓ、２５ｍＭ塩化ナトリウム、０．５ｍＭ　ＥＤＴＡ、ｐＨ８．５で予め平衡化したＧＥ　ＨｉＴｒａｐ　Ｑ　ＨＰカラムに導入した。これらの条件は、アフィニティクロマトグラフィーの溶出液プールから汚染大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）タンパク質を除去するのに十分であり、標的タンパク質はカラムのフロースルー中に残存した。Ｑカラムのフロースルーを更にナノ純水で２倍に希釈し、酢酸でｐＨを５にし、１０ｍＭクエン酸ナトリウム、０．２５ｍＭ　ＥＤＴＡ、ｐＨ５．０で予め平衡化したＧＥ　ＨｉＴｒａｐ　ＳＰ　ＨＰカラムに導入した。精製したタンパク質を、２５ｍＭクエン酸ナトリウム、０．５Ｍ塩化ナトリウム、１ｍＭ　ＥＤＴＡ、ｐＨ５．５への勾配で溶出した。純度をＳＤＳ－ＰＡＧＥによって確認し、ＡＫＴＡ　Ｕｎｉｃｏｒｎソフトウェアによって特定された溶出ピーク面積をタンパク質収率の比較指標として使用した。

【０２１５】
エンドトキシン除去及びタンパク質の仕上げ
純粋なＳＰ溶出画分をプールし、材料を１００ｋＤａの再生セルローススピンコンセントレータに２回通すことによりエンドトキシンを除去した。次いで、１００ｋＤａスピンコンセントレータのフロースルータンパク質溶液を、３ｋＤａの再生セルローススピンコンセントレータでタンパク質濃度が１７５ｍｇ／ｍＬ超になるまで濃縮した。その後、滅菌グリセロールを１０％C_F（ｖ／ｖ）になるように添加し、次いで急速凍結し、－８０℃で保存した。
【０２１６】
あるいは、Ｑ陰イオン交換クロマトグラフィーの後、陽イオン交換クロマトグラフィーで最終濃縮／精製ステップを行った。タンパク質をｐＨ５で結合させ、溶液Ａ（１０ｍＭクエン酸ナトリウムｐＨ５、０．２５ｍＭ　ＥＤＴＡ）から溶液Ｂ（２５ｍＭクエン酸ナトリウムｐＨ５．５、１Ｍ　ＮａＣｌ、１ｍＭ　ＥＤＴＡ）への勾配で溶出し、典型的には１０～２５％のＢで溶出した。次いで、ピーク画分をプールし、その後、これらのプールしたタンパク質溶液を３０００×ｇで１００ｋＤａフィルター膜（ＰＥＳ又は再生セルロースのいずれか）に通した。次いで、純粋なタンパク質を１０ｋＤａフィルター膜上で更に濃縮した。
【０２１７】
遊離システインのゲル分析
単一の遊離システインがバイオポリマーへのコンジュゲーションに利用可能であることを確認するために、約２０当量の１．２ｋＤａのＰＥＧ－マレイミド部分を４２℃で４５分間インキュベートし、４～２０％のＳＤＳ－ＰＡＧＥで泳動することで、単一の１．２ｋＤａのゲル移動度シフトによって移動度のシフトを確認した。
【０２１８】
更なるタンパク質／コンジュゲートの安定化変異
タンパク質配列を、ＰＤＢデータベースに対するＢＬＡＳＴクエリを通じて取得した。ＭＳＡ操作は、Ｃｌｕｓｔａｌ　Ｏｍｅｇａを使用する配列アラインメント、所望のトポロジーを有するｓｄＡｂのみを含むようにアラインメントから配列を手動でキュレーションすること、及びＭＳＡ内に約１００配列のみが残るように配列冗長性を除去すること、を含むＪａｌｖｉｅｗプログラムを用いて実施した。保存スコアが９以上であるＭＳＡ内の位置はコンセンサスとみなされ、ＯＲＦとコンジュゲーションシステインとの間にｃ末端αヘリックスリンカーペプチドを含むｓｄＡｂ配列に組み込まれた。
【０２１９】
部位特異的変異導入
所望のコドン最適化アミノ酸置換変異を含有する相補的オリゴヌクレオチド対を、Ａｇｉｌｅｎｔ　ＱｕｉｋＣｈａｎｇｅ部位特異的変異導入キットのプロトコル内で公開されたガイドラインに従って設計し、ＩＤＴから購入した。ＳＤＭ　ＰＣＲ反応を、製造業者のプロトコルに従って約１０ｎｇのプラスミドＤＮＡに対して行った。新たに単離されたプラスミドをサンガーシークエンシングに供することで、適切なアミノ酸置換（複数可）を確認した。
【０２２０】
可溶性ライセートタンパク質の熱沈殿
２５倍量の溶解緩衝液２５ｍＭ　ＨＥＰＥＳ、２０ｍＭイミダゾール、４００ｍＭ塩化ナトリウム、０．５ｍＭ　ＥＤＴＡ、５％グリセロール、０．０１％Ｔｗｅｅｎ　２０、ｐＨ７．５を、２５ｍＬのＴＢ培養物から採取した大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）ペレットに添加し、プローブソニケータを用いて氷上で５回、４０％の出力で超音波処理した。溶解後、全細胞抽出物を１０Ｋ×ｇで清澄化し、１００μＬの上清を分注し、５０℃、６０℃、７０℃、及び８０℃で１５分間のインキュベーションに供し、続いて氷上で１０分間インキュベートした。熱沈殿したタンパク質を１０Ｋ×ｇで５分間除去し、可溶性抽出物画分をそのままＬａｅｍｍｌｉ試料緩衝液と合わせ、変性させ、４～２０％ＳＤＳ－ＰＡＧＥ

で泳動することで、収率及び安定性を評価した。

【０２２１】

実施例１．ペプチドリンカーの評価

ポリマーへの結合の前に、ペプチドリンカーに結合した目的の生物学的活性ペプチドを含むペプチドを、図１Ａにおける発現オープンリーディングフレーム（ＯＲＦ）に基づいて大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）において発現させた。生物学的活性ペプチドをポリマーに接続する様々なペプチドリンカーを評価した（表２）。

【表２】

表２．ペプチドリンカー

リンカー名	リンカータイプ	リンカー配列
aH	αヘリックス	AEAAAKEAAAKEAAAKAGC（配列番号21）
AE3K2R(2)	αヘリックス	AEEEKRKAEEEKRKAEEEAGC（配列番号22）
AE3K2R(3)	αヘリックス	AEEEKRKAEEEKRKAEEEKRKAEEEAGC（配列番号23）
E4K4(2)	αヘリックス	AEEEEKKKKEEEEKKKKAGC（配列番号24）
EA3K(2)	αヘリックス	AEAAAKEAAAKAGC（配列番号25）
Alfa	αヘリックス	PSRLEEELRRRLTEGC（配列番号26）
ミオシンVI	αヘリックス	AEEEEKKKQQEEEAERLRRIQEEMEKERKRREEDEERRRKEEEERRMKLEMEAKRKQEEEERKKREDDEKRKKKAGC（配列番号27）
Spot	非構造	PDRVRAVSHWSSC（配列番号28）
GT9	非構造	GTGTGTGTGTGTGTGTGTGC（配列番号29）
修飾された剛性	剛性	TPTTPPTPTPGTPPGGC（配列番号30）

【０２２２】

図１Ｂは、大腸菌（E.coli）における例示的なタンパク質２Ｈ１０の可溶性発現を示す。可溶性画分における収率の改善が、αヘリックスペプチドリンカーを含有する２Ｈ１０バリアントで観察された。αヘリックスペプチドリンカーの存在は、反応性システインがタンパク質のＣ末端に存在する場合に発現を改善した。

【０２２３】

図１Ｃは、可溶性発現の増加が、同等のペプチドのＳＤＳ－ＰＡＧＥ分析において明らかであることを示す。自動誘導培地及びカルベニシリン（５ｍＬ）を含有する培養物を、３７℃で一晩、飽和するまで増殖させた。飽和した培養物を遠心分離によって収集し、１ｍＬのＰＢＳで洗浄し、遠心分離を繰り返すことによって収集した。上清を吸引し、培養物を－８０℃で凍結した。細胞を氷上でプローブソニケータによって溶解し、遠心分離で除去し、タンパク質含量に対して正規化し、４～２０％のＳＤＳ－ＰＡＧＥで泳動した。１５ｋＤａ付近のバンドによって証明されるようにＨｕ２Ｈ１０＿５ＭＵＴ（配列番号５５）及びＨｕ２Ｈ１０＿５ＭＵＴ＿ＣＹＳ（配列番号１４１）のタンパク質発現は、Ｃ末端に配列番号２１のαヘリックスペプチドリンカーを含有するＨｕ２Ｈ１０＿５ＭＵＴ＿ａＨ＿ＣＹＳ（配列番号１４２）（１７ｋＤａ付近のバンド）よりも低かった。

【０２２４】

可溶性発現の向上は、上記のタンパク質に限ったことではなかった。抗ＶＥＧＦタンパク質ＨｕＮｂ４２もまた、Ｃ末端αヘリックスペプチドの付加により可溶性発現の増加を示した。図１Ｄは、ＨｕＮｂ４２＿Ａ８８Ｐ　ａＨ＿Ｃｙｓ（配列番号１４５）（「＋ａＨ＿ＣＹＳ」）と比較したＨｕＮｂ４２＿Ａ８８Ｐ（配列番号６７）（「ｎｕｌｌ」）の可溶性発現を示す。αヘリックスリンカーを含む培養培地１リットル当たりの総プロセス収率は、Ｃ末端αヘリックスペプチドを有していない対応するタンパク質の収率よりも約４倍高かった。

【０２２５】

実施例２．可溶性発現に対するヒト化度の効果

免疫原性のリスクを低減するために、治療用ペプチド及びタンパク質には、より高いヒ

ト化度が望ましい。しかしながら、単一ドメイン抗体内の特定の残基は、ヒト化度に影響を及ぼすと同時に安定性を低下させる。したがって、ヒト化度及び安定性に関連するフレームワーク領域における特定の点変異について系統的評価を行った。

【０２２６】

配列のヒト化は、Ａｂｙｓｉｓ抗体アナライザーの計算リソース及びＬａｋｅＰｈａｒｍａのＴ２０スコアアナライザーを使用して実施した。ヒトタンパク質を標的とするｓｄＡｂについて、Ｔ２０のフレームワークのみのスコアが８５以上となるように、コンセンサス配列内の特定のアミノ酸を変更した。

【０２２７】

図２は、大腸菌（E.coli）における発現について試験した２Ｈ１０及び点変異バリアントのアミノ酸配列を示す。図３Ａに示されるように、バリアントＨｕ２Ｈ１０　Ｒ８６Ｋ　Ａ８７Ｐ（配列番号５６）及びＨｕ２Ｈ１０　Ｒ８６Ｋ　Ａ８７Ｐ　Ｌ１１５Ｑ（配列番号５８）は、Ｈｕ２Ｈ１０　５ＭＵＴ（配列番号５５）又はＨｕ２Ｈ１０　Ｌ１１５Ｑ（配列番号５７）よりもタンパク質発現が高かった。

【０２２８】

図４は、大腸菌（E.coli）における発現について試験したＮｂ４２及び点変異バリアントのアミノ酸配列を示す。図５は、ＨｕＮｂ４２　Ａ８８Ｐバリアント（配列番号６７）が可溶性発現の増加を示したことを示す。図６は、より高い相対的発現が細胞区画に依存しなかったことを示しており、細胞質区画とペリプラズム区画の両方で可溶性発現のより高い相対レベルが示された。

【０２２９】

図７は、カプラシズマブ、ベバシズマブ、及びラニビズマブと比較した、Ｎｂ４２（配列番号６１）、ＨｕＮｂ４２（配列番号６２）、及びＨｕＮｂ４２　Ａ８８Ｐバリアント（配列番号６７）のヒト化度を示す。ＨｕＮｂ４２（配列番号６２）及びＨｕＮｂ４２　Ａ８８Ｐバリアント（配列番号６７）は各々、Ｚスコア又はＴ２０スコアによって測定されるヒト化度に関して文献のヒト化抗体と同等であった。

【０２３０】

図８は、ａＴＮＦａＭｕ（配列番号７１）又はａＴＮＦａＭｕ＿３ＭＵＴ（配列番号７２）を、室温、５０℃、６０℃、７０℃、及び８０℃で発現した大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）細胞抽出物のクマシーブリリアントブルー（ＣＢＢ）染色を示す。この染色は、ａＴＮＦａＭｕ内の３つの点変異が、約７０℃までタンパク質の収率及び熱安定性を増加させたことを示す。

【０２３１】

図９は、タンパク質発現収率に対するＥ１－１における特定の点変異の効果を示す。Ｅ１－１　Ｓ４９Ａ（配列番号８３）、Ｅ１－１　Ｆ１１Ｌ　Ｓ４９Ａ（配列番号８４）、及びＥ１－１　ＣＤＲ（配列番号８５）は、Ｅ１－１（配列番号８１）又はＥ１－１　Ｆ１１Ｌ（配列番号８２）と比較して約１０倍以上の相対的タンパク質発現を示した。

【０２３２】

図１０は、より高い温度でタンパク質合成を行った場合、最終的なタンパク質調製物内の反応性システインがより少なくなることと一致するゲルシフトアッセイを示す（上のグラフ）。反応性システインの低下は、天然に存在するジスルフィド架橋が抗体内で形成され、したがって、より安定な生成物が生じたことを示している。同様のゲルシフト（下のグラフ）は、タンパク質合成の温度を上昇させた場合の、ジスルフィド架橋形成の低レベルから高レベルへの勾配を示した。

【０２３３】

実施例３．エンドトキシン除去

エンドトキシンは、薬物コンジュゲーション工程を通して運ばれ、動物試験における汚染源である（エンドトキシンは免疫応答を引き起こす）ので、タンパク質調製物において望ましくない。

【０２３４】

エンドトキシン除去は、緩衝液内のＥＤＴＡの存在に依存しており、これによりエンドトキシンを一定の大きさに凝集させ、濾過中のタンパク質損失を最小限に抑えながら濾過可能となった。図１１Ａ～１１Ｂは、エンドトキシン除去プロセスが試料中のエンドトキシンの＞９９．５％を除去したことを示す。

【０２３５】

図１１Ｂは、５０及び１００ｋＤａフィルターを用いたエンドトキシンの除去と、その抗ＴＮＦα３　ＭＵＴ　ＶＨＨ（マウス）－ａＨ（配列番号１０４）含量の回収率を示す。方法：２５ｍＭクエン酸ナトリウムｐＨ５．５、１００ｍＭ　ＮａＣｌ、１ｍＭ　ＥＤＴＡ中の約１５ｍｇ／ｍＬのタンパク質溶液を、室温で１０分間、１５Ｋ×ｇで５０ｋＤａ及び１００ｋＤａのポリエーテルスルホン膜（ＰＥＳ）フィルターに通した。タンパク質濃度をＡ２８０分光光度計（ｎａｎｏｄｒｏｐ）を使用して測定し、エンドトキシンをＣｈａｒｌｅｓ　Ｒｉｖｅｒ　Ｅｎｄｏｓａｆｅ　ＬＡＬカートリッジを使用して測定した。

【０２３６】

方法：

５ｍＬの培養物をＴＢ－自動誘導培地＋抗生物質中で３７℃で飽和するまで増殖させた。細胞を、４℃で１０分間、４０００ＲＰＭでの遠心分離によって収集した。ペレットを１ｍＬのＰＢＳで洗浄し、エッペンドルフチューブに移した。細胞を１４０００ＲＰＭで２．５分間、４℃でペレット化し、上清を吸引し、凍結した。凍結細胞ペレットを氷上で解凍し、氷上で溶解緩衝液（５０ｍＭ　ＨＥＰＥＳ　ｐＨ７．５、２０ｍＭイミダゾール、４００ｍＭ　ＮａＣｌ、５％グリセロール、０．０１％ｔｗｅｅｎ－２０、及び０．５ｍＭ　ＥＤＴＡ）中、小型チップソニケータを使用して、５秒パルスオン、５秒パルスオフを合計６０秒間、４０％出力で超音波処理した。細胞溶解物を、Ｎａｎｏｄｒｏｐ　Ａ２８０を使用して総タンパク質含量に対して正規化し、変性及び還元条件下で４～２０％ＳＤＳ－ＰＡＧＥ上で泳動した。ゲルをＩｎｓｔａＢｌｕｅタンパク質染色液で染色し、水で十分に脱色した。デンシトメトリーシグナル（％）を、ＩｍａｇｅＪソフトウェアを使用して計算し、ゲルレーン全体にわたって正規化した。総レーンタンパク質シグナルの＞１０％が予測分子量付近のバンドに起因し、非誘導試料対照では見られない場合に過剰発現が達成された。例示的なＳＤＳ－ＰＡＧＥゲルを図１１Ｃに示す。

【０２３７】

本発明の特定のペプチドについての発現のデンシトメトリー測定の概要を以下の表３に示す。

【表３】

表３．発現のデンシトメトリー値

名称	配列§	全体に占める割合（%）
aVegF_VHH	配列番号91	21．3
aVegF_VHH_3MUT	配列番号96	21．9
aVegF_VHH_5MUT	配列番号97	20．9
aVegF_VHH_6MUT	配列番号98	18．3
aTNFaHu	配列番号102*	28．3
aTNFaMu_3MUT	配列番号104*	16．9
aTNFaHu_7MUT	配列番号107	25．0
Hu_aTNFaMu_3MUT	配列番号108	12．8
Hu_aTNFaMu_5MUT	配列番号109	17．8
Hu_aEGFR_5MUT	配列番号119	11．8
aAng2_D4	配列番号120	30．0
Hu_aAng2_D4_3MUT	配列番号121	23．7
aAn2_H4	配列番号122	25．5
Hu_aAng2_H4_6MUT	配列番号123	10．7
aAng2_0027	配列番号124	34．9
Hu_aAng2_0027_2MUT	配列番号125	19．8
aEpCam_Nb4	配列番号126	15．4
Hu_aEpCAM_Nb4_4MUT	配列番号127	16．1
aEpCam_Nb5	配列番号128	15．2
Hu_aEpCAM_Nb5_11MUT	配列番号129	17．9
aEpCAM_Nb22	配列番号130	11．9
Hu_aEpCAM_Nb22_6MUT	配列番号131	14．9
aPDL1_Nb1	配列番号155	28．6
Hu_aPDL1_Nb1_4MUT	配列番号156	19．9
aPDL1_Nb104E10	配列番号157	25．0
Hu_aPDL1_Nb104E10_1MUT	配列番号158	23．4
aPDL1_NbG5	配列番号159	19．6
Hu_aPDL1_NbG5_4MUT	配列番号160	27．5
aPDL2_103E4	配列番号161	25．8
Hu_aPDL2_103E4_2MUT	配列番号162	23．4
aPDL2_103E5	配列番号163	16．2
Hu_aPDL2_103E5_4MUT	配列番号164	18．7
aPDL2_Nb103F10	配列番号165	17．8
Hu_aPDL2_Nb103F10_5MUT	配列番号166	22．2
Hu_aPD1_102C3_3MUT	配列番号113	28．4
Hu_aPD1_102C12_3MUT	配列番号114	22．2
Hu_aPD1_102E2_3MUT	配列番号115	23．3
Hu_aPD1_102E8_3MUT	配列番号116	29．1
Hu_aPD1_102H12_4MUT	配列番号117	22．6
Hu_aIL−1B_5C_5MUT	配列番号167	17．4
Hu_aIL−1B_6C_3MUT	配列番号168	20．7
Hu_aIL−1B_11H_3MUT	配列番号169	13．3
Hu_aIL−1B_12D_2MUT	配列番号170	23．3

§列挙された各配列は、アスタリスク（「＊」）と共に示される場合を除いて、配列番号２１のＣ末端αヘリックスペプチドに共有結合された。

【０２３８】

実施例４．単一ドメイン抗体のタンパク質発現のためのコンセンサス配列

上記の実施例において提示されたデータに基づいて、以下のフレームワーク配列は、単一ドメイン抗体がより安定的に発現されること、及び／又はよりヒト様であることを可能にする。表４及び表５は、許容されるアミノ酸置換を有する例示的なフレームワーク領域を示す。

【表４】

表４．フレームワーク領域

領域	長さ	配列
フレームワーク1	26	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASG（配列番号5）
CDR1	可変、例えば、7アミノ酸	
フレームワーク2	18	MGWFRQAPGKEREFVAAI（配列番号6）
CDR2	可変、例えば、8アミノ酸	
フレームワーク3	39	YADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAA（配列番号7）
CDR3	可変、例えば、18アミノ酸	
フレームワーク4	12	YWGQGTLVTVSS（配列番号8）

【表５－１】

表５．例示的なペプチドの許容される置換

位置	コンセンサスアミノ酸	許容される置換
1	Q	E、D
2	V	－
3	Q	－
4	L	－
5	V	Q、A、E
6	E	－
7	S	T
8	G	－
9	G	－
10	G	－
11	L	S、V
12	V	A
13	Q	－
14	P	A、T
15	G	－
16	G	D、R
17	S	－
18	L	－
19	R	－
20	L	－
21	S	－
22	C	－
23	A	V、T、E
24	A	V
25	S	－
26	G	－
27－33	CDR1（XXXXXXX）	
34	M	I、V、L
35	G	S、A
36	W	－
37	F	Y、V
38	R	－
39	Q	－
40	A	V、P、T
41	P	－
42	G	－
43	K	－
44	E	G、A、Q
45	R	L
46	E	－
47	F	G、W、L
48	V	－
49	A	G、S
50	A	S、G
51	I	－
52－59	CDR2（XXXXXXXX）	

【表５－２】

（表５の続き）

位置	コンセンサスアミノ酸	許容される置換
60	Y	－
61	A	G、S、T
62	D	－
63	S	－
64	V	－
65	K	－
66	G	－
67	R	－
68	F	－
69	T	－
70	I	－
71	S	－
72	R	Q
73	D	－
74	N	S、D
75	S	A、D
76	K	－
77	N	K
78	T	M
79	V	
80	Y	D、S
81	L	－
82	Q	－
83	M	－
84	N	D
85	S	N
86	L	－
87	R	－
88	P	A
89	E	－
90	D	－
91	T	－
92	A	－
93	V	M、L、I
94	Y	－
95	Y	－
96	C	－
97	A	
98	A	
99－116	CDR3 （XXXXXXXXXXXXXXXXX）	
117	Y	
118	W	－
119	G	－
120	Q	K
121	G	－
122	T	－

【表５－３】

（表５の続き）

位置	コンセンサスアミノ酸	許容される置換
123	L	Q
124	V	－
125	T	－
126	V	－
127	S	－
128	S	－

【０２３９】

実施例５．精製されたチオール反応性ヒアルロン酸コンジュゲート中間体の調製

ヒアルロン酸ナトリウム（ＨＡ、８３０ｋＤａ）を、水又は０．１Ｍの２－（Ｎ－モルホリノ）エタンスルホン酸緩衝液ｐＨ５．７中４ｍｇ／ｍＬで、室温で一晩、穏やかに回転させるか又は揺動（nutation）により混合することによって懸濁させた。ＨＡ３ｍｇ（３．６ｎｍｏｌ、量はポリマー組成及び分子量に基づいて変動する）の溶液に、ＤＭＳＯ中の約５～１００ｍｇ／ｍＬストック溶液としてヒドロキシベンゾトリアゾール（ＨＯＢｔ）水和物、１０～１００％ＤＭＳＯ（１０～１００ｍｇ／ｍＬストック）中のチオール反応性リンカー剤（例えば、ＭＰ２Ｈなどのヒドラジド－Ｘ－チオール反応性基）、及び０．１ＭのＭＥＳ緩衝液ｐＨ５．７中のカップリング剤（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））を添加する。反応を実施する異なる方法、及び例示的な方法について、ＨＡ１モル当たり及びカルボキシレート当たりの各反応物のモル当量を、以下の表６及び表７に記載する。

【表６】

表６．いくつかの方法におけるカップリング剤、触媒、及びリンカーの相対比

反応物	方法1	方法2	方法5*
カップリング剤(EDC)	500～750	1000～1500	9500～12000
HOBt	3000	2000	50
リンカー剤MP2H	3000	1500	500～1000

８３０ｋＤａのＨＡ１モル当たりのモル当量を使用して、ＥＤＣ変動幅の反応を設定。

＊特定の中間体では、示された場合にＭＰ２Ｈの代わりにＥＭＣＨを使用。

【表７】

表７．いくつかの方法におけるポリマーカルボキシレート当たりのカップリング剤、触媒、及びリンカーの比率

反応物	方法1	方法2	方法5*
カップリング剤(EDC)	0．25～0．375	0．5～0．75	4．75～6
触媒(HOBt)	1．5	1	0．025
リンカー剤MP2H	1．5	0．75	0．25～0．5

ＨＡモノマー当たりの反応物の当量（８３０ｋＤａのＨＡ当たり約２０００カルボキシレート）。

＊特定の中間体では、示された場合にＭＰ２Ｈの代わりにＥＭＣＨを使用。

【０２４０】

各試薬添加の間に溶液を穏やかにピペッティングしながら混合し、最終反応体積を緩衝液で１ｍＬに増量した。最終混合物を、方法に応じて揺動ミキサーを用いて室温で４５分間～２時間反応させた。反応後、チオール反応性バイオポリマーを、１０％ｖ／ｖグリセ

ロール（任意選択）ｐＨ６．５　ＤＰＢＳ及び０．０１％ｖ／ｖポリソルベート２０（任意選択）で平衡化した７ｋＤａのＭＷＣＯの５～１０ｍＬ　Ｚｅｂａ脱塩スピンカラムを用いて精製し、樹脂体積の２０％の粗反応物を充填した。所望の中間体は、室温で遠心分離を使用して清浄なコニカルチューブに溶出した（溶出時間約２５～６０分間）。中間体をチオールとの反応に直ちに使用するか、又は分注し、ドライアイス上で急速凍結した。マレイミド濃度及びポリマー当たりの修飾数は、ＵＶ吸光度、ＮＭＲ、又は改良型エルマン反応アッセイを使用して決定した。

【０２４１】

あるいは、反応ｐＨ又はヒドラジドリンカー、触媒、及びカップリング剤（ＥＤＣ）の当量をより高く又はより低く変更することで、バイオポリマー当たりの共有結合したチオール反応性小分子リンカーの数（価数）を増加又は減少させた。

【０２４２】

ＥＤＣ及びＨＯＢｔの代わりに、ＤＭＴＭＭ又はオキシマなどの代替カップリング試薬を使用してもよい。活性化されたバイオポリマー中間体はまた、サイズ排除クロマトグラフィー、他の脱塩カラム、タンジェンシャルフロー濾過、イオン交換クロマトグラフィー、透析、又はアルコール／アセトン沈殿を用いて反応物から精製することもできる。

【０２４３】

精製後、異なる方法を使用して調製された中間体について、ＢｉｏＴｅｋ　Ｓｙｎｅｒｇｙプレートリーダー上でＴａｋｅ３マイクロスポットプレートを使用してＵＶスペクトル（２００～３２４ｎｍ）を取得した。マレイミド濃度は、２３０ｎｍでの吸光度によって、又はスペクトルを参照標準中間体と比較することによって決定することができる。

【０２４４】

コンジュゲートのＮＭＲ分析は、ジョージア大学のＣｏｍｐｌｅｘ　Ｃａｒｂｏｈｙｄｒａｔｅ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ　Ｃｅｎｔｅｒ（ＣＣＲＣ）で、５ｍｍクライオプローブを備えたＢｒｕｋｅｒ　Ａｄｖａｎｃｅ　ＩＩＩ分光器（^{1}Ｈ、６００．１３ＭＨｚ）を２５℃で使用して行った。６ｍＬスケールで方法１及び方法５を使用して中間体を標準調製した後、その中間体を脱塩樹脂を使用してＨＰＬＣグレードの水に精製し、ウェットアイス上でＣＣＲＣに輸送した。試料を４℃で数週間放置したところ、ＮＭＲスペクトルで部分的なマレイミドの加水分解が観察された。ＮＭＲ試料の調製のために、０．７ｍｌの中間体ストック溶液（２．９ｍｇ／ｍｌ）を７ｍｌのスクリューキャップチューブにピペットで移した。１．３ｍｌのD_2O（９９．９％）を各試料に添加し、ボルテックスによって十分に混合した。次いで、室温でＳｐｅｅｄＶａｃ真空濃縮装置を用いて試料を乾燥させた。次いで、乾燥させた試料を７００μＬのD_2O（９９．９８％）に再溶解し、ＮＭＲ分析を行った。

【０２４５】

実施例の反応生成物の化学分析を以下の表８に記載する。

【表８】

表８．上記の方法を使用して調製される例示的な中間体

方法	中間体番号	マレイミドの価数（NMR）	マレイミドの価数*（エルマン）	Ｎ－アシル尿素置換（^{1}Ｈ　NMRによって測定、モル％）
１	１－１	203	128	検出不能
２	２－４	ND	128	ND
５	５－１	118	123	８．２％

ＮＤ＝決定されず、＊＝ＣＣＲＣによる試料の受領日に測定。

【０２４６】

３つの異なる方法を使用して合成された中間体のテーブル表を、それらの得られたマレイミド濃度、価数、及びＨＡモノマーに基づく反応効率と共に、以下の表９、表１０、及び表１１に示す。

【表９】

表９．方法１の中間体

中間体番号	触媒（HOBt）の当量	リンカー（MP2H）の当量	カップリング剤（EDC）の当量	［マレイミド］（μM）	HA損失がないと仮定したマレイミドの価数	HA－COOHに基づく反応効率
1－1	3000	3000	500	483．9	128	6．2%
1－2	3000	3000	500	350．14	124	6．0%
1－3	3000	3000	500	422．26	141	6．8%
1－4	3000	3000	500	393．05	139	6．7%
1－5	3000	3000	500	397．97	136	6．6%
1－6	3000	3000	500	334．1	115	5．6%
1－7	3000	3000	750	429．11	145	7．0%
1－8	3000	3000	500	361．2	136	6．6%
1－9	2000	3000	500	306	97	4．7%
1－10	1000	2000	500	104	34	1．6%
1－11	1000	2500	500	150	47	2．3%
1－12	1500	3000	750	355	112	5．4%
1－13	3000	3000	500	484	137	6．6%
1－14	3000	3000	500	305	103	5．0%

【表１０】

表１０．方法２の中間体

中間体番号	触媒（HOBt）の当量	リンカー（MP2H）の当量	カップリング剤（EDC）の当量	［マレイミド］（μM）	HA損失がないと仮定したマレイミドの価数	HA－COOHに基づく反応効率
2－1	2000	1500	1500	371．2	111	5．4%
2－2	2000	1500	1500	333．1	101	4．9%
2－3	2000	1500	1500	371．2	113	5．5%
2－4	2000	1500	1500	428．2	128	6．2%
2－5	2000	1500	1500	338	107	5．2%
2－6	3000	3000	1500	570．6	155	7．5%
2－7	2000	3000	1000	392．5	121	5．9%
2－8	2000	3000	1000	482．6	162	7．8%

【表１１】

表１１．方法５の中間体

中間体番号	リンカー	触媒（HOBt）の当量	リンカーの当量	カップリング剤（EDC）の当量	［マレイミド］（μM）	HA損失がないと仮定したマレイミドの価数	HA－COOHに基づく反応効率
5－1	MP2H	50	750	9500	415．3	123	5．9%
5－2	MP2H	50	1000	9500	399．64	138	6．7%
5－3	MP2H	50	1000	9500	476	137	6．6%
5－4*	MP2H	50	500	9500	826	171	8．3%
5－5*	MP2H	59	593	11263	707	227	11．0%
5－6	MP2H	50	1000	9500	296．43	95	4．6%
5－7	MP2H	50	500	9500	234．1	70	3．4%
5－8	MP2H	50	500	9500	349	90	4．4%
5－9	MP2H	50	500	9500	227	83	4．0%
5－10	EMCH	50	250	9500	417．9	122	5．9%

＊マレイミド濃度及び価数は、ＵＶ吸光度を使用して定量化した。

【０２４７】

あるいは、ヒアルロン酸ナトリウム（ＨＡ、８３０ｋＤａ）を、水中１０ｍｇ／ｍＬで、又は０．１Ｍの２－（Ｎ－モルホリノ）エタンスルホン酸（ＭＥＳ）緩衝液ｐＨ５．７中４ｍｇ／ｍＬで、室温で一晩、穏やかに回転させるか又は揺動により混合することによって懸濁させた。反応の前に、０．１Ｍ　ＭＥＳ中の４ｍｇ／ｍＬ　ＨＡストックを、水及び約１Ｍ　ＭＥＳ　ｐＨ５．７を使用して作製し、揺動を用いて室温で混合した。ＨＡ３ｍｇ（３．６ｎｍｏｌ、量はポリマー組成及び分子量に基づいて変動する）の溶液に、ＤＭＳＯ中の約５～１００ｍｇ／ｍＬストック溶液としてヒドロキシベンゾトリアゾール（ＨＯＢｔ）水和物、１～１０％ＤＭＳＯ（１０～１００ｍｇ／ｍＬストック）中のチオール反応性リンカー剤（例えば、ＭＰ２Ｈなどのヒドラジド－Ｘ－チオール反応性基）、及び０．１ＭのＭＥＳ緩衝液ｐＨ５．７中のカップリング剤（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））を添加する。反応を実施する異なる方法、及び例示的な方法について、ＨＡ１モル当たり及びカルボキシレート当たりの各反応物のモル当量を、以下の表１２に記載する。

【表１２】

表１２．中間体の調製方法

反応物	方法A	方法B	方法C	方法D	方法E
カップリング剤（EDC）	9500	500	1500	3000	6000
触媒（HOBt）	50	3000	2000	1000	750
リンカー剤（MP2H）	500～1000	3000	1500	1250	750

ＨＡモノマー当たりの反応物の当量（８３０ｋＤａのＨＡ当たり約２０００カルボキシレート）。

【０２４８】

各試薬添加の間に溶液を穏やかにピペッティングしながら混合し、最終反応体積を緩衝液で１ｍＬに増量した。最終混合物を、方法に応じて揺動ミキサーを用いて室温で４５分間～１．５時間反応させた。反応後、チオール反応性バイオポリマーを、１０％ｖ／ｖグリセロール（任意選択）ｐＨ６．５　ＤＰＢＳで平衡化した７ｋＤａのＭＷＣＯの５～１０ｍＬ　Ｚｅｂａ脱塩スピンカラムを用いて精製し、樹脂体積の２０％の粗反応物を充填した。ＮＭＲ試料の場合、Ｚｅｂａカラムを重水で平衡化し、中間体を重水中で溶出し、凍結はしなかった。所望の中間体は、室温で遠心分離を使用して清浄なコニカルチューブに溶出した（溶出時間約２５～６０分間）。中間体をチオールとの反応に直ちに使用する

か、又は分注し、ドライアイス上で又は－８０℃で急速凍結した。マレイミド濃度及びポリマー当たりの修飾数は、ＵＶ吸光度、ＮＭＲ、又は改良型間接的エルマン反応アッセイを使用して決定した。

【０２４９】

各反応方法についてのマレイミド濃度／価数を以下の表１３に提供する。

【表１３】

表１３．間接的エルマン法のマレイミド置換の測定

方法	マレイミドの価数*
A	290
B	185
C	227
D	223
E	180

＊ＮＭＲによって分析された中間体の反応性マレイミド濃度及びおよその価数は、エルマン反応アッセイを用いて決定した。

【０２５０】

コンジュゲートのＮＭＲ分析は、ジョージア大学のＣｏｍｐｌｅｘ　Ｃａｒｂｏｈｙｄｒａｔｅ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ　Ｃｅｎｔｅｒ（ＣＣＲＣ）で、５ｍｍクライオプローブを備えたＢｒｕｋｅｒ　Ａｄｖａｎｃｅ　ＩＩＩ分光器（^{1}Ｈ、６００．１３ＭＨｚ）を２５℃で使用して行った。方法Ａ～Ｅを３～６ｍＬスケールで使用して中間体を標準調製した後、その中間体を脱塩樹脂を使用して重水に精製し、ウェットアイス上でＣＣＲＣに輸送した。

【０２５１】

^{1}Ｈ　ＮＭＲスペクトルの分析に基づいて、全ての試料は、ＨＡ、ＭＰ２Ｈ、遊離エチルジメチルアミノプロピル尿素（ＥＤＵ）、精製中に除去されなかったＥＤＣ加水分解の副産物に対応するシグナルを含んだ。ＭＰ２Ｈ、結合型ｎ－アシル尿素付加物、及び遊離ＥＤＵの存在量を、特徴的なピークからのシグナルの積分値を計算することによって、ＨＡ（繰り返しポリマーユニット）と比較して決定した。積分値に基づいて、ＨＡ、ＭＰ２Ｈ、遊離ＥＤＵ、及び結合型Ｎ－アシル尿素付加物（結合型ＥＤＵ）の生の存在量を測定した。ＨＡに対するＭＰ２Ｈ、結合型Ｎ－アシル尿素付加物、及び遊離ＥＤＵの存在量を表１４に示す。

【表１４】

表１４．方法Ａ～ＥについてのＨＡ（１００％）に対するＭＰ２Ｈ、遊離ＥＤＵ、及びＮ－アシル尿素付加物の相対モル存在量

	MP2H	遊離EDU	N－アシル尿素付加物
方法A	21．7	11．7	15．2
方法B	23．0	1．6	n．d．
方法C	25．9	6．4	n．d
方法D	26．8	8．0	n．q
方法E	20．7	18．2	5．0

ｎ．ｄ．：種は検出されず

ｎ．ｑ．：種は存在するが、低シグナルのために定量不能

【０２５２】

実施例６．精製ペプチド－ポリマーコンジュゲートの調製

精製ペプチド－ポリマーコンジュゲートを得るために、マレイミド当たり１．１～２当

量のペプチドを、実施例１の方法によって調製された中間体と合わせ、４℃又は周囲温度のいずれかで少なくとも２時間～一晩、回転又は揺動混合しながら反応させた（ほとんどの反応は、溶解度を改善するために室温で行われた）。任意選択で、１Ｍ　ｐＨ７　ＨＥＰＥＳを最終濃度０．１Ｍになるように添加することで、反応ｐＨを調整した。場合によっては、コンジュゲーション反応の前に、ＤＴＴ又はＴＣＥＰ　ＨＣｌなどの還元剤をタンパク質当量当たり１０～１００当量添加することで、ペプチド間の任意のジスルフィド架橋を還元した。これは、脱塩カラム又は緩衝液交換によってコンジュゲーション前にペプチド溶液から除去されるか、又はポリマービーズ上に固定化されたＴＣＥＰの形態で直接的にコンジュゲーション反応に加えられた。コンジュゲーション反応中、反応効率を改善するために以下のうちの１つ以上を加えた：遊離チオールの酸化を最小限に抑えるための０．５～１０ｍＭのＥＤＴＡ、タンパク質を安定化させ、かつ／又はタンパク質と活性化バイオポリマーとの間の非特異的相互作用の低減を助けるためのｔｗｅｅｎ　２０、炭水化物、追加の緩衝液、若しくはグリセロール、タンパク質を安定化させ、かつ／又はタンパク質と活性化バイオポリマーとの間の非特異的相互作用の低減を助けるための塩濃度の増加又は減少。未反応のペプチドを、以下の方法のうちの１つ以上によってペプチド－ポリマーコンジュゲートから除去した：透析（１：１００～１：１０００）を、５０～１０００ｋＤａのＭＷＣＯを用いて、適切な緩衝液（ｐＨは、ペプチドのｐＩより１単位高いか低くあるべきである）に対して、４時間ずつ少なくとも２回、そして４℃～室温で少なくとも４時間を１回行う。未反応ペプチドからコンジュゲートを精製するために、ＥＤＴＡ及びｔｗｅｅｎ、若しくはトレハロースなどの他の添加剤をペプチドに応じて加えたクエン酸緩衝液、ＤＰＢＳ　ｐＨ６～８、又は５０ｍＭ　ｔｒｉｓ　１５０ｍＭ　ＮａＣｌ　ｐＨ８～８．５に対するタンジェンシャルフロー濾過、サイズ排除カラムを使用するＦＰＬＣポリッシング、コンジュゲートのポリマー構成成分に結合するように設計されたアフィニティクロマトグラフィーカラムによるＦＰＬＣポリッシング、又はコンジュゲートの選択的沈殿もまた使用することができる。反応効率が十分に高い場合（すなわち、＜５％の未反応タンパク質しか存在しない）、精製は必要なかった。

【０２５３】

あるいは、実施例１の中間体の各溶液に、ペプチドを適切なペプチド：ポリマーのモル供給比で添加し、Ｔｗｅｅｎ－２０を最大０．０３％の最終濃度まで添加した（任意選択）。周囲温度で回転（約５ＲＰＭ）又は揺動によって撹拌しながら、溶液を２時間から一晩反応させた。５０～１０００ｋＤａのＭＷＣＯ膜を使用して、以下の緩衝溶液の各々に対して順次透析することによって、未反応ペプチドを除去した：第１に、０．０１％Ｔｗｅｅｎ－２０（任意選択）を含むリン酸緩衝生理食塩水又は同等のクエン酸若しくはコハク酸緩衝生理食塩水（使用されるｐＨ及び緩衝塩はペプチドに依存する）に対して少なくとも４時間、第２に、０．０１％Ｔｗｅｅｎ－２０を含むリン酸緩衝生理食塩水に対して一晩、そして０．０１％Ｔｗｅｅｎ－２０を含むリン酸緩衝生理食塩水に対して４℃又は室温で４時間、加えて任意選択で第４の透析工程を行う。任意選択で、ｔｗｅｅｎ２０、ＥＤＴＡ、及び炭水化物などの添加物を、タンパク質安定性を増強するために添加した。

【０２５４】

ＭＶＰ精製後、コンジュゲートを、安定性試験の節に記載される方法を使用して、タンパク質濃度、タンパク質価数、ＭＶＰ半径、及び結合親和性について分析した。異なる中間体を使用して合成されたＭＶＰのテーブル表を、それらの得られたタンパク質濃度、価数、バイオレイヤー干渉法（ＢＬＩ）による解離定数、及び測定された半径と共に以下に示す。

【０２５５】

方法１及び方法２によって合成されたＭＶＰは、方法５を用いて合成されたＭＶＰと比較して、ＭＶＰ治療薬の特性（最終タンパク質濃度、タンパク質価数、半径、結合カイネティクス）が類似しているか又は改善されていた（表１５）。方法１又は方法５の中間体によって合成されたＤＡＲＰｉｎ　ＭＶＰの流体力学的半径の比較の例を図１２に示す。方法１又は方法５の中間体によって合成された抗ＶＥＧＦ　ＭＶＰのＶＥＧＦ結合曲線Ｂ

ＬＩデータの比較例を図１３Ａに示す。

【表１５】

表１５．コンジュゲート

コンジュゲート番号	ペプチドの配列番号	リンカーの配列番号	中間体番号	ペプチド濃度（mg／mL）	ペプチドの価数	t＝0での K_D（nM）*	t＝0での R_g（rz）又は R_h（nm）
1	92	－	5－4	1．325	68	0．001	51．5
2	92	－	1－7	2．712	117	0．001	78．2
3	92	－	5－5	1．77	67	0．001	44．3
4**	92	－	5－6	0．52	45	－	－
5	92	－	1－7	2．923	114	－	73．98
6	92	－	5－5	1．8	116	－	36．11
7	92	－	5－6	2．726	78	－	37．4
8	81	21	5－7	0．82	94	0．184	－
9	81	21	5－9	0．46	51	0．678	－
10	81	21	2－4	3．24	136	0．123	－
11	81	21	5－2	0．33	47	1．038	－
12	73	21	1－6	2．46	120	－	－
13	91	31	5－8	0．38	72	0．011	－
14	91	31	5－3	1．04	68	0．203	－
15	91	21	5－10	0．52	59	0．001	－
16	91	21	2－6	3．04	101	0．001	－
17	91	－	1－7	1．59	90	0．004	－
18	91	－	1－7	1．43	88	0．001	－
19	91	－	2－6	2．3	108	0．001	－
20	91	－	2－8	1．724	91	0．001	－
21	91	21	1－9	1．63	51	0．001	－
22	91	21	1－10	0．636	18	0．001	－
23	91	21	1－11	1．319	33	0．001	－
24	67	21	1－13	4．591	100	－	103
25	72	21	1－13	4．77	51	0．1	77
26	73	21	1－14	1．96	104		88

＊ＢＬＩの検出限界は０．００１ｎＭである。上の表に列挙されたこの値を有する試料は、K_DのＢＬＩ　ＬＯＤ未満であった。＊＊Ｃｙ７蛍光色素標識ペプチド

【０２５６】

あるいは、精製ペプチド－ポリマーコンジュゲートを得るために、マレイミド当たり１．１～２当量のペプチドを、表１６に示される方法によって調製されたＨＡコンジュゲーション基質と合わせた。コンジュゲーション反応物を、周囲温度で少なくとも２時間～一晩、回転又は揺動混合しながら反応させた。１ＭのｐＨ７　ＨＥＰＥＳを最終濃度０．１Ｍになるように添加することで、反応ｐＨを調整した。場合によっては、透析（１：４００～１：１０００）を、５０～１０００ｋＤａのＭＷＣＯを用いて、適切な緩衝液（ｐＨは、ペプチドのｐＩより１単位高いか低くあるべきである）に対して、４時間ずつ少なくとも３回、４℃～室温で行うことによって、未反応ペプチドをペプチド－ポリマーコンジュゲートから除去した。

【表１６】

表１６．ペプチドーポリマーコンジュゲートの反応条件

コンジュゲート番号	コンジュゲーション基質法	コンジュゲーション基質(nmol)	ペプチド	更なるペプチドリンカー	ペプチド(nmol)
27	方法A	0．58	抗VEGF VHH（配列番号145）	－	141
28	方法B	0．60	抗VEGF VHH（配列番号145）	－	134
29	方法A	0．31	抗TNFαVHH（配列番号102）	－	75．5
30	方法B	0．32	抗TNFαVHH（配列番号102）	－	71．4
31	方法B	0．19	抗VEGF VHH（配列番号91）	配列番号21	58
32	方法B	0．29	抗PD1－1 VHH（配列番号114）	配列番号21	88
33	方法B	0．25	抗VEGF DARPin（配列番号92）	－	76
34	方法B	0．25	抗TNFαDARPin（配列番号154）	－	74
35	方法B	0．17	抗TNFαアフィボディ（配列番号105）	－	54
36	方法B	0．054	抗IL－1βscFv（配列番号106）	－	5
37	方法B	0．054	IL－2（配列番号152）	－	18
38	方法B	0．098	IL－15（配列番号153）	－	30

【０２５７】

コンジュゲーションの成功を確認するために、コンジュゲーション反応の生成物をＳＤＳ－ＰＡＧＥ及びＤＬＳによって分析した。ＳＤＳ－ＰＡＧＥを使用して、分子量に一致したゲルへの移動によって分離された未反応ペプチドの割合（％）を測定した。コンジュゲーション反応後、かなりの割合のペプチドが、スタッキングゲルの上部に高分子量コンジュゲートとして存在しており、このペプチドはそのサイズ（＞３００ｋＤａ）のためにゲル中を移動することができなかった。ＤＬＳを使用して、反応生成物中に存在する流体力学的半径を測定した。コンジュゲーション反応後、最も強度の高いピークは、コンジュゲーション基質と一致したR_hにアラインし、このことはペプチドがヒアルロン酸基質にコンジュゲートされたことを示している。コンジュゲートのデータを表１７に示す。未反応タンパク質（％）は、質量既知のＢＳＡ標準物質を基準として非コンジュゲートタンパク質のＳＤＳ－ＰＡＧＥバンドをデンシトメトリー分析し、各ウェルに充填された総質量で除算することによって決定した。流体力学的半径を、Ｗｙａｔｔ ＤｙｎａＰｒｏプレートリーダーＩＩＩによる動的光散乱（ＤＬＳ）を使用して測定した（２５分、５秒で５～１０回の取得、コンジュゲート当たりｎ＝３試料）。適切な質のデータを抽出し、最も強度の高いピークに基づいて分析するために、Ｊｕｐｙｔｅｒ ｎｏｔｅｂｏｏｋデータ分析プログラムによってデータ分析を行った。

【表１７】

表１７．各ペプチドーポリマーコンジュゲートの特性

コンジュゲート番号	コンジュゲーション基質	ペプチド	更なるペプチドリンカー	非コンジュゲートペプチド(%)	R_h (nm)
27	方法A	抗VEGF VHH（配列番号145）	－	凝集	
28	方法B	抗VEGF VHH（配列番号145）	－	24	85
29	方法A	抗TNFαVHH（配列番号102）	－	凝集	
30	方法B	抗TNFαVHH（配列番号102）	－	54	88
31	方法B	抗VEGF VHH（配列番号91）	配列番号21	49	58
32	方法B	抗PD1－1 VHH（配列番号114）	配列番号21	－	82
33	方法B	抗VEGF DARPin（配列番号92）	－	49	
34	方法B	抗TNFαDARPin（配列番号154）	－	27	92
35	方法B	抗TNFαアフィボディ（配列番号105）	－	－	144
36	方法B	抗IL－1βscFv（配列番号106）	－	－	170
37	方法B	IL－2（配列番号152）	－	－	77
38	方法B	IL－15（配列番号153）	－	－	113

【０２５８】

高濃度の医薬製剤の実現は、多くの場合、治療閾値への到達、治療持続性の最大化、及び／又は投与量の最小化のために必要とされる。しかしながら、より高い濃度では、治療用ペプチドは凝集する可能性がある。ポリマー－ペプチドコンジュゲーションの場合、ポリマー基質との相互作用が凝集の一因となり得るか、又はコンジュゲートされたポリマーがない場合よりも低いペプチド濃度で凝集が生じ得るという更なる懸念がある。方法Ｂを使用して作製されたＨＡコンジュゲーション基質は、測定された凝集がないポリマー－ペプチドコンジュゲートを提供した。

【０２５９】

方法Ｂを使用して精製コンジュゲート＃２８を合成するために、方法Ｂからの精製コンジュゲーション中間体１７４μＬを、２ｍＬのＶ底マイクロ遠心チューブ内で、２％ｖ／ｖのＴｗｅｅｎ２０　３μＬ及び８０ｍｇ／ｍＬのＮ４２抗ＶＥＧＦ　ＶＨＨ（配列番号１４５）２６μＬ（マレイミド当たり１．１当量のペプチドの場合）と混合した。反応ｐＨを、２０μＬの１Ｍ　ｐＨ７　ＨＥＰＥＳの添加によってｐＨ７に調整して、最終濃度を０．１Ｍとした。反応を、揺動で混合しながら室温で１６時間一晩進行させた。未反応ペプチドを、１００ｋＤａ　ＭＷＣＯの２００μＬ　ｍｉｃｒｏＦｌｏａｔ－Ａ－Ｌｙｚｅｒ透析カセット（Ｒｅｐｌｉｇｅｎ）を用いて、ｐＨ５．５の２５ｍＭクエン酸塩、１００ｍＭ　ＮａＣｌ、０．０３％ｔｗｅｅｎ２０に対して、室温で撹拌しながら透析（初期反応体積に基づいて１：１０００）することによって、ペプチドーポリマーコンジュゲートから除去した。合計４回の透析工程を実施した。各４時間後に緩衝液を３回交換し、１６時間一晩透析した後に１回交換した。

【０２６０】

方法Ｂを使用して精製コンジュゲート＃３０を合成するために、方法Ｂからの精製コンジュゲーション中間体１８６μＬを、２ｍＬのＶ底マイクロ遠心チューブ内で、２％ｖ／ｖのＴｗｅｅｎ２０　３．３μＬ及び８０ｍｇ／ｍＬの抗ＴＮＦαＶＨＨ（配列番号１０２）１４．４μＬ（マレイミド当たり１．１当量のペプチドの場合）と混合した。反応ｐ

Ｈを、２０μＬの１Ｍ　ｐＨ７　ＨＥＰＥＳの添加によってｐＨ７に調整して、最終濃度を０．１Ｍとした。反応を、揺動で混合しながら室温で１６時間一晩進行させた。未反応ペプチドを、１００ｋＤａ　ＭＷＣＯの２００μＬ　ｍｉｃｒｏＦｌｏａｔ－Ａ－Ｌｙｚｅｒ透析カセット（Ｒｅｐｌｉｇｅｎ）を用いて、ｐＨ５．５の２５ｍＭクエン酸塩、１００ｍＭ　ＮａＣｌ、０．０３％ｔｗｅｅｎ２０に対して、室温で撹拌しながら透析（初期反応体積に基づいて１：１０００）することによって、ペプチド－ポリマーコンジュゲートから除去した。合計４回の透析工程を実施した。各４時間後に緩衝液を３回交換し、１６時間一晩透析した後に１回交換した。

【０２６１】

４回目の透析工程が完了した後、精製コンジュゲートを透析カセットから取り出し、４℃で保存した。反応生成物は、本明細書の実施例に記載されるように、目視検査、精製タンパク質のコンジュゲーションを測定するための紫外可視吸光度、R_hを測定するためのＤＬＳ、非コンジュゲートタンパク質の割合（％）を決定するためのＳＤＳ－ＰＡＧＥ、及び結合親和性を測定するためのバイオレイヤー干渉法、によって特性評価される。

【表１８】

表１８．方法Ｂの中間体から調製したコンジュゲート＃２８及び＃３０の特性評価

コンジュゲート	ペプチド（配列番号）	精製生成物のペプチド濃度（平均±COV）	非コンジュゲートペプチド(%)	価数	R_h（nm）	K_d（pM）
28	145	4．956±1．182%	9	129	85	1．07
30	102	2．784±0．772%	3	137	88	＜1

【０２６２】

実施例７．精製されたペプチド－ポリマーコンジュゲートの安定性分析

ＭＶＰの安定性は、ｐＨ７．３の硝子体模倣緩衝液（表１９）又はｐＨ７．４のＰＢＳ０．０１％ｔｗｅｅｎ　２０中で、ＭＶＰを治療濃度の５～１０倍で３７℃にて維持することによって長期加速インビボ安定性を設定することによって評価した。ＭＶＰの安定性は、様々な経過時間後に取り出した試料のＳＥＣ　ＭＡＬＳ又はＳＥＣ、ＤＬＳ、及び／又はＢＬＩ分析を使用して評価した。

【表１９】

表１９．硝子体模倣緩衝液の組成

構成成分	mg／mL
NaCl	7．14
KCl	0．38
$CaCl_2$ $2H_2O$	0．154
$MgCl_2$ $6H_2O$	0．2
リン酸二水素ナトリウム（NaH_2PO_4）	0．42
$NaHCO_3$	2．1
デキストロース	0．92
乳酸	0．358
$CuSO_4$	8.28×10^{-5}
$ZnSO_4$七水和物	0．000561
$FeCl_2$四水和物	0．000618
トランスフェリン（２　Fe結合部位）	0．0878
還元型グルタチオン（GSH）	0．0154

【０２６３】

長期間３７℃での安定性試験を設定することで、ＭＶＰの安定性に対する組成の影響を

評価した。ＭＶＰを滅菌条件下で合成し、滅菌濾過したヒト硝子体模倣緩衝液中約０．４ｍｇ／ｍＬに希釈した。この濃度は、本発明者らの予測臨床用量の硝子体内治療濃度よりも５倍高い。試料は、使用前に滅菌０．２μｍ又は５μｍのスピンフィルターを使用して濾過するか、又は抗菌剤である０．０１％アジ化ナトリウムと混合した。次いで、各試料のいくつかの１００μＬアリコートを、滅菌９６ウェルプレートのウェルに加え、０日目のアリコートを１つ４℃で保存した。残りのウェルは、滅菌濾過したヒト硝子体緩衝液＋０．０１％アジ化ナトリウムで満たすことで、蒸発を最小限に抑えた。プレートを標準的な組織培養インキュベータ中、３７℃、５％CO_2でインキュベートした。別々の時点で、各試料から１つのアリコートを滅菌条件下でプレートから取り出し、分析した。最初に、試料のＵＶ－ＶＩＳスペクトルを２００～６００ｎｍから１０ｎｍごとに取得することで、試料組成の劇的な変化をモニタリングした。次に、生じた可能性のある体積差を調整するために、タンパク質濃度を測定する。結合親和性は、ＢＬＩを使用して測定される。経時的なK_{on}（会合定数）又はK_Dの変化を使用して、相対的安定性を評価する。経時的な半径の変化をモニタリングするために、試料を５０００ｇで５分間遠心分離することで、大きな凝集物又はダスト粒子を除去し、いかなる試料希釈も行わずにＤＬＳを使用してR_hを測定する。

【０２６４】

安定性試験試料を、ＨＰＬＣサイズ排除クロマトグラフィー（ＳＥＣ）を使用して分析した。この方法はまた、精製後のＭＶＰ形成及び未反応タンパク質（％）を分析するために使用した。ＳＥＣによって安定性を評価するために、ＭＶＰを濾過することで粒子を除去し、Ｓｈｏｄｅｘ　１ＭＤａ　Ｏｈｐａｋ　ＬＢ－８０４、Ｓｈｏｄｅｘ　ＫＷ－４０４若しくは４０５、又はＰｈｅｎｏｍｅｎｅｘ　ＰｏｌｙＳｅｐ６０００カラムを使用して、移動相としてＤＰＢＳ又は適切な溶媒を用いて分析することで、２８０ｎｍ、２３０ｎｍなどでベースライントレースを得た。様々な時点で試料を取り出し、同じＳＥＣ方法を用いて分析した。ベースライン試料に対する保持時間及びピーク幅の増加は、分解を示した。更に、ＭＶＰピーク面積の減少、並びに／又は単量体及び二量体タンパク質種のピーク面積の増加もまたＭＶＰ分解を示す。コンジュゲート率（％）は、時間経過に伴うピーク面積差を比較することによって定量化した。将来的には、ＳＥＣ安定性分析をＭＡＬＳと組み合わせて、異なる温度でのエージングによるコンジュゲートの分子量及び価数の変化を定量化する。３７℃で最大７１日間エージングさせた方法５又は方法１の中間体ＤＡＲＰｉｎ　ＭＶＰ試料の代表的なＳＥＣデータを図１４に示す。サイズが大きいために、コンジュゲート２は、このデータにおいてコンジュゲート１を分析するために使用された同じカラム上で分析できなかった。

【０２６５】

安定性試験試料はまた、３７℃でのエージング後の異なる時点でのＭＶＰの回転半径（$R_{g,z}$）及び分子量の決定のために、ＳＥＣとＭＡＬＳ分析とを組み合わせることによって分析した。このために、コンジュゲート安定性試料を、２ｍＬのＨＰＬＣバイアル内に収納されたガラスバイアルインサート（２５０μＬ容量）に充填し、キャップをした。ＨＰＬＣ分析では、５～２０μｇのＭＶＰ（タンパク質に基づく）を、イソクラティックポンプ、オートサンプラー、恒温カラムコンパートメント、及び２８０ｎｍでモニタリングするように設定された可変波長検出器を備えた１２６０　Ｉｎｆｉｎｉｔｙ　Ａｇｉｌｅｎｔ　ＨＰＬＣシステム（又は同等の機器）に注入し、Ｓｈｏｄｅｘ　ＫＷ－４０５－４Ｆ（４．６×３００ｍｍ、流速０．３５ｍＬ／分）又はＬＢ－８０４若しくは８０６（８×３００ｍｍ、流速０．４ｍＬ／分、非コンジュゲートＶＨＨピークの分析用）を各々ガードカラムと共に使用した。分析のため、カラムコンパートメントは３０℃に保持され、イソクラティック法を使用して、ＨＰＬＣグレードの水で調製された０．１μｍで濾過したｐＨ７．４のＤＰＢＳ、２００ｍＭ　ＫＣｌ、１００ｍＭ尿素、５０ｍＭリン酸ナトリウムｐＨ６と０．０２５％アジ化ナトリウム、又は０．１μｍで濾過した３００ｍＭ　ＮａＣｌ　１０ｍＭリン酸ナトリウム、０．０２５％ＳＤＳ、０．０２５％アジ化ナトリウムｐＨ６．０の移動相を用いて、試料注入後に少なくとも２カラム容量の移動相を溶出

させるか、又は合計６０分間実行した。Ｄａｗｎ　Ｈｅｌｅｏｓ　ＩＩ　ＭＡＬＳ機器及びＯｐｔｉｌａｂ　Ｔ－ｒＥＸ示差屈折率検出器（Ｗｙａｔｔ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ）又は同等の機器を、ＨＰＬＣと直列に、ＵＶ検出器の下流に置いた。Ａｓｔｒａソフトウェア（Ｗｙａｔｔ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ）を使用するタンパク質－ポリマーコンジュゲート分析のためのＭＡＬＳ及びｄＲＩ検出器のパラメータを表２０に列挙する。分析前に、システム固有の較正数値、正規化係数、遅延容量、及びバンドブロードニングタームを、システムについて決定した。ＥＤＣ変動幅に対するＭＶＰの安定性試料の代表的なＳＥＣトレースを図１４に示す。保持時間の延長は、エージングによるＭＶＰのサイズ減少／縮小／分解を示した。図１４において、高ＥＤＣコンジュゲート（コンジュゲート１）は、低ＥＤＣ　ＭＶＰ（コンジュゲート２）と比較して、保持時間の延長及び半径の短縮が非常に大きいことが示された。ピークの広がりはまた、エージングによる試料の多分散性の増加を示唆しており、試料の分解の可能性を示している。半径の減少は、図１５に示される加速エージング試験における試料のＭＡＬＳによって更に検証された。

【表２０】

表２０．ＳＥＣ　ＭＡＬＳ分析のためのＭＡＬＳ及びｄＲＩ機器のパラメータ

溶媒	
名称	PBS、水溶液
温度	25℃
664nmで算出したRI	1．3308
モデル	Cauchy
粘度	0．8902cP
モデル	Kestin
熱膨張	2．58E－04
モデル	多項式
試料	
タンパク質dn／dc	0．185
ポリマーdn／dc*	0．159
タンパク質の吸光係数*	2．171mL／（mg*cm）
ポリマーの吸光係数*	0．022mL／（mg*cm）
MALS	
試料セル	石英ガラス
収集間隔	0．5秒
波長	664nm
温度	25℃
dRI	
波長	658nm
温度	25℃
LS分析	タンパク質－ポリマーコンジュゲート
モデル	Debye
フィット次数	2
フィットのR二乗	＞0．99

【０２６６】

安定性はまた、ＤＬＳを使用して高分子サイズ（例えば、R_h）の変化に基づいて評価した。ＤＬＳを使用する３７℃でのエージングによる半径変化に基づく安定性分析では、様々な時点での分析のために３７℃での安定性試験条件から試料を取り出す。全ての試料及び緩衝液は室温である。溶液は、ポリソルベート２０を含まない滅菌の０．１ｕｍ濾過した調製緩衝液中で、１００μＬ中最終濃度が１００ｎＭになるように希釈し（典型的には１：１０希釈）、１．５ｍＬ遠心チューブ中で穏やかにトリチュレーションすることに

よって混合する。このチューブを遠心分離機において５０００ｇで５分間遠心分離することによって、大きな凝集物及びダスト粒子を除去することができた。ＮａｎｏＳｔａｒでの単一キュベット測定では、４０μＬの試料溶液の試料を、Ｗｙａｔｔ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙのキャップ付き使い捨てマイクロキュベット（Ｗｙａｔｔカタログ番号ＷＮＤＭＣ）に充填し、軽く叩いて気泡を除去し、分析のために機器に入れた。プレートリーダーを用いた複数回の読み取りでは、２５～３５μＬの試料を底の透明な黒色ウェル３８４ウェルプレート（Ｃｏｒｎｉｎｇカタログ番号Ｐ８８０２－３８４又は同様のもの）に添加した。試料中の気泡を、プレートアダプタを備えた遠心分離機中で短時間遠心分離することによって除去した後、ピペットチップで除去するか、又は吹き付け（squirt）ボトルから７０％エタノール蒸気を穏やかに吹きかけることによって除去した。本明細書におけるＤＬＳによる本試料及び他の試料分析のための機器設定を表２１に提示する。１０００ｎｍを超えるピークはいずれも、強度が＜６％でなければならない。ＤＬＳの取得パラメータを以下の表２１に示す。

【表２１】

表２１．ＤＬＳの取得パラメータ

機器	
レーザー波長	664nm
レーザー出力	100%
自動減衰	On
温度	25℃
取得時間（秒）	5－10
取得数	5
固定パラメータ	
相関関数の低カットオフ値	1．5μs
相関関数の高カットオフ値（μs）	103000μs
ピーク半径の低カットオフ値	0nm
ピーク半径の高カットオフ値	1×10^{6}nm
分析タイプ	Dynals
測定時間制限係数	5
自動減衰時間制限	60
試料	
Mw－Rモデル	球状タンパク質
溶媒	PBS
dn／dc	0．185
Rgモデル	球

【０２６７】

以下の表２２は、異なる方法を使用して合成されたＭＶＰ試料の３７℃での加速エージングによるＭＶＰ半径変化を示す。流体力学的半径又は回転半径を、ｔ＝０及び３７℃でのエージング後の様々な時点で、ＤＬＳ又はＭＡＬＳによって決定した。これらの実施例では、低ＥＤＣ（方法１）によって合成されたＭＶＰは、エージングによる半径の短縮／変化がより小さいことから、３７℃での安定性が向上した。このことは、Ｎ－アシル尿素付加物の存在が、より多くの量のＥＤＣを使用する方法によって調製されたコンジュゲートを不安定化させることを示唆した。

【表２２】

表２２．経時的なＭＶＰ半径

コンジュゲート番号	安定性試験前のR_g(rz)又はR_h（nm）	37℃でのエージング日数、試料1	試料1のR_g(rz)又はR_h（nm）	半径変化	37℃でのエージング日数、試料2	試料2のR_g(rz)又はR_h（nm）	半径変化
1	51.5	2	34.5	−33%			
2	78.2	14	71.4	−9%	71	61.4	−21%
3	44.3	4	28.4	−36%	28	21.4	−52%

【０２６８】

バイオレイヤー干渉法（ＢＬＩ）を用いて経時的な結合親和性の変化も測定した。ＢＬＩ実験を実施するために、試料を３７℃での安定性試験条件から取り出し、様々な時点での分析を行った。全ての試薬は、使用前に少なくとも３０分間、室温に平衡化した。試料当たり２つのプローブ（１つはカイネティクスのアッセイ用、１つはリガンドフリー対照用）を、Ｇａｔｏｒ　Ｂｉｏ　Ｍａｘプレート内で最低１０分間、２５０μＬのＢＬＩ緩衝液（０．２μｍで濾過したＰＢＳ　ｐＨ７．４、０．２％Ｔｗｅｅｎ及び０．２％ＢＳＡ）中で平衡化した。リガンドを、ＢＬＩ緩衝液中での予備反応でのパフォーマンスに基づいて２５～１００ｎＭの固定濃度に希釈した。アナライトを、ＢＬＩ緩衝液中、予備反応において決定された最高濃度で調製し、ＢＬＩ緩衝液を使用して更に２～５回、１：３で連続希釈した。黒色の平底非コーティング９６ウェルプレート（Ｇｒｅｉｎｅｒ　Ｂｉｏ　Ｏｎｅカタログ番号６５５２０９又は同様のもの）に、１列ずつ、２００μＬのリガンド、アナライト希釈液、並びにリガンド及びアナライトの各列につき１列のＢＬＩ緩衝液を充填した。アナライトの各列における１つのウェルは、リファレンスの差し引きのためのブランクとして使用されるＢＬＩ緩衝液とするべきである。気泡はウェル内に存在せず、ピペットチップで除去するか、又は吹き付けボトルから７０％エタノール蒸気を穏やかに吹きかけることによって除去した。プレートは、２５℃に設定した傾斜した底部（ｐｌａｔｆｏｒｍ）のＧａｔｏｒ内に置いた。Ｇａｔｏｒ　Ｋアッセイのローディング及びカイネティクスのステップは、表２４に示すダブルリファレンス及びステップ時間を使用して設定した。シグナルが０．４～０．６ｎｍに達するまでリガンドをロードし、その後、緩衝液の列に戻って６０秒間のベースライン測定を行った。カイネティクスの読み取りは、表２４のステップパラメータを用いて開始した。リガンドがロードされたプローブによってカイネティクスの読み取りが完了すると、リガンドがロードされていない新しいプローブを使用してリガンドフリー対照を実行した。リガンドがロードされたプローブによって分析されたのと同じカイネティクスのアッセイタイミング及び同じ試料ウェルを使用した。このデータを使用して、試料とプローブとの間の非特異的相互作用を補正した。３７℃での加速エージング前後の高（方法５）及び低（方法１）ＥＤＣ　ＭＶＰ試料の代表的なＢＬＩデータを、図１６（K_D）及び図１７（K_{on}）に示す。

【０２６９】

カイネティクスのアッセイが完了すると、Ｇａｔｏｒソフトウェアの結果及び分析セクションにおいてデータを分析した。生データを、１秒後～１８０秒後の会合時間を含むように補正した。Ｙ軸を会合ステップの開始に合わせ、ステップ間補正を有効にした。データのＳａｖｉｔｚｋｙ－Ｇｏａｌｙフィルタリングを使用した。試料は、ソフトウェア内でどのプローブ及びウェルが緩衝液リファレンスであるかを指示することによってダブルリファレンスを設定した。次に、各アッセイのリファレンス差し引き式が編集され、各アッセイについて、以下の式：（カイネティクスのアッセイウェル－リガンドフリーアッセイウェル）－（カイネティクスのアッセイ緩衝液リファレンスウェル－リガンドフリーアッセイ緩衝液ウェル）を用いたダブルリファレンスとなるようにした。同じＭＶＰの全てのタイトレーションを色によってグループ分けし、パラメータを、グローバルで、Ｒｍａｘがリンクされていないフィッティングを用いた会合及び解離の両方を含む１：１結合モデルに調整した。関心対象のウィンドウを、解離の１００秒間のみを含むように移動した

。結合曲線をフィッティングし、残差が実際の曲線から１０％を超えて乖離しないこと、フルR^2が＞０．９８であること、及びフルX^2が＜３．０であることが確認された。カイネティクスを計算し、K_D、K_{on}及び応答を記録した。異なる試料が同じK_D結果であった場合、異なる構築物間の結合親和性を区別するために会合定数K_{on}を使用した（すなわち、図１７）。ここでは、より高い会合定数は、より速い結合カイネティクスを示した。

【表２３】

表２３．ＢＬＩのリガンドとアナライトのペアリング

BLIリガンド	タグ	アナライト	供給業者	カタログ番号
ヒトTNFα	Avi、His	抗TNFα	Acro Biosystems	TNA－H82E3
ヒトVEGF 165	Avi	抗VEGF	R&D Systems	AVI－293－050

【表２４】

表２４．カイネティクスの定量のためのＢＬＩ法のパラメータ及び結果の詳細

パラメータ	使用したウェル	ステップ時間又は情報
プローブの平衡化	Maxプレート中の緩衝液	＞600
基本パラメータ		5Hz、30秒の平衡化、1000rpmの振とう
緩衝液		０．２μｍで濾過したPBS pH7、０．２%Tween、及び０．２%BSA
BLI実験のパラメータ		
ベースライン	緩衝液の列1	60
リガンドのローディング	100～25nMリガンド	ローディング信号が０．４～０．６である場合
ベースライン	緩衝液の列1	90
会合	MVP試料（複数可）	180
解離	緩衝液の列2	300
リガンドフリー対照（ブランクプローブあり）		
ベースライン	緩衝液の列2	90
会合	MVP試料（複数可）	180
解離	緩衝液の列2	300

【０２７０】

異なる方法を使用して合成されたＭＶＰ試料について３７℃での加速エージング時の結合カイネティクスのテーブル表を以下に示す。試料の解離定数を、３７℃でエージングした後の様々な時点でＢＬＩによって決定した。これらの実施例では、方法１及び方法２によって合成されたＭＶＰは、治療標的結合能力に基づいて同様の又は改善された３７℃安定性と、エージングによる解離定数の同様の又はより小さい変化を有した。方法５の中間体を用いて合成された抗ＶＥＧＦ　ＶＨＨペプチドＭＶＰは、短時間のエージング後に全ての結合能力を喪失したが、方法１又は２を用いて合成された実施例では、試験を通して標的結合能力が示され、Ｎ－アシル尿素付加物の存在が治療薬を不安定化させることが示唆された。

【表２５】

表２５．経時的なコンジュゲートの結合

コンジュゲート番号	t＝0でのK_D（nM）	37℃でのエージング日数、試料1	エージング日におけるK_D（nM）	t＝0からのK_D変化	37℃でのエージング日数、試料2	エージング日におけるK_D（nM）、試料2	t＝0からのK_D変化、試料2
1	0.001	11	0.001	1	32	0.075	75
2	0.001	14	0.001	1	28	0.017	17
8	0.184	3	0.557	3	5	結合は観察されず	結合喪失
11	1.038	3	6.755	7	5	21.89	21
14	0.203	4	結合は観察されず	結合喪失	－	－	－
15	0.001	4	結合は観察されず	結合喪失	－	－	－
16	0.001	4	0.654	654	11	0.648	648
17	0.004	4	0.713	178	14	0.911	228
18	0.001	4	0.001	1	14	3.67	3670
19	0.001	4	0.185	185	－	－	－
20	0.001	4	0.001	1	14	1.44	1440
21	0.001	4	3.299	3299	14	1.137	1137
22	0.001	4	5.87	5870	14	0.1419	142
23	0.001	4	6.964	6964	14	1.949	1949

【０２７１】

実施例８．精製されたペプチド－ポリマーコンジュゲートのインビボ半減期

十分に確立された薬物動態モデルにおいて、コンジュゲートの延長された硝子体内滞留時間が示された。ニュージーランドホワイトウサギ（ｎ＝９）を、体重に基づいて無作為化した３つの群に分けた。３１Ｇインスリンシリンジを使用して、全ての動物の左眼にｈｕ＿抗ＴＮＦα＿ａＨ　ＭＶＰ（配列番号１０２）＋ＨｙＡ（８５０ｋＤａ）（「抗ＴＮＦαＭＶＰ」）、右眼に非コンジュゲートＶＨＨ（配列番号１０２）（「抗ＴＮＦα」）の５０μＬ硝子体内（ＩＴＶ）注射を行った。両眼に等モル用量の抗体を投与した。注射後１時間、５日目及び１０日目に、３匹のウサギの１群を　　殺し、硝子体内ＶＨＨの分析のためにそれらの眼を摘出した。両眼を急速凍結し、硝子体、網膜、及び房水を凍結眼から単離した。次いで、各組織試料をビーズビーターで破砕した。破砕後、ＶＨＨ濃度を、ＥＬＩＳＡを用いるか、又はトリプシンでペプチドを消化し、試料をＬＣ／質量分析法若しくは同様の方法に供するか、いずれかによって定量した。バイオコンジュゲーション後のウサギ眼における延長された硝子体内半減期の代表的な結果を図１８に示す。

【０２７２】

この試験用のペプチドの蛍光タグ付加方法は、以下の通りである。固形腫瘍からのタンパク質のクリアランス速度を評価するためのマウス腫瘍モデルを使用して、ＭＶＰの腫瘍内（ＩＴ）半減期を測定することで、腫瘍滞留性のパラメータを最大化した。本発明者らは、アミン反応性スルホ－Ｃｙ７　ＮＨＳエステル（Ｂｒｏａｄｐｈａｒｍカタログ番号ＢＰ－２２５４１）又はＡｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ　７５０近赤外蛍光色素を使用してタグ付けされた抗体を、以下の方法によって使用し、これは無菌条件下で実施した。最初に、色素を１０ｍｇ／ｍＬ濃度でＤＭＳＯに溶解した。次いで、５．０～１０．０ｍｇ／ｍＬ濃度のタンパク質を０．１Ｍ重炭酸ナトリウムと３：２体積：体積比で混合した。最後に、蛍光色素を１：２タンパク質：蛍光色素のモル比で添加し、十分に混合し、ホイルで覆うことによって光から保護した揺動装置上で室温で１時間インキュベートした。１．５ＭＴｒｉｓ緩衝液ｐＨ８．５を反応体積の１０％添加することによってＮＨＳエステルをクエンチし、揺動装置上で更に１０分間混合した。ＰＢＳ　ｐＨ７．０＋０．０１％Ｔｗｅ

ｅｎ－２０で平衡化したＮＡＰ－１０脱塩カラム（ｉｌｌｕｓｔｒａカタログ番号１７－０８５４－０１）を製造業者の指示に従って使用して、未反応蛍光色素からタグ付加タンパク質を精製した。タンパク質濃度及びＣｙ７標識の程度を、２８０ｎｍ及び７５０ｎｍでの吸光度によって決定した。氷上で保存し、スルホ－Ｃｙ７標識から３時間以内のタンパク質を、上記のプロトコルに従ってＭＶＰ合成に使用した。各場合において、最終生成物を滅菌濾過し、動物試験で使用するまで光から保護して４℃で保存した。

【０２７３】

上述の発明を、明確な理解を目的として図示及び実施例によっていくらか詳細に記載してきたが、当業者は、添付の特許請求の範囲内である特定の変更及び修正が実施できることを理解するであろう。加えて、本明細書に提供される各参考文献は、各参考文献が参照により個々に組み込まれるのと同程度に、その全体が参照により組み込まれる。本出願と本明細書で提供される参考文献との間に矛盾が存在する場合、本出願が優先するものとする。

【表２６－１】

表２６．配列

名称	配列
フレームワーク領域1	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASG（配列番号5）
フレームワーク領域2	MGWFRQAPGKEREFVAAI（配列番号6）
フレームワーク領域3	YADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAA（配列番号7）
フレームワーク領域4	YWGQGTLVTVSS（配列番号8）
Nb42 CDR1	FAYSTYS（配列番号9）
Nb42 CDR2	NSGTFRLW（配列番号10）
Nb42 CDR3	RAWSPYSSTVDAGDFR（配列番号11）
2H10 CDR1	RRFSIEA（配列番号12）
2H10 CDR2	DSGGSTD（配列番号13）
2H10 CDR3	IGSSWYGRGLD（配列番号14）
aTNFa－mu CDR1	GTFSSII（配列番号15）
aTNFa－mu CDR2	SWSGGTTV（配列番号16）
aTNFa－mu CDR3	RPYQKYNWASASYNV（配列番号17）
E1－1 CDR1	GGSDAGT（配列番号18）
E1－1 CDR2	SWAGTAWR（配列番号19）
E1－1 CDR3	LGSYEMDHH（配列番号20）
aHリンカー	AEAAAKEAAAKEAAAKAGC（配列番号21）
AE3K2R（2）リンカー	AEEEKRKAEEEKRKAEEEAGC（配列番号22）
AE3K2R（3）リンカー	AEEEKRKAEEEKRKAEEEKRKAEEEAGC（配列番号23）
E4K4（2）リンカー	AEEEEKKKKEEEEKKKKAGC（配列番号24）
EA3K（2）リンカー	AEAAAKEAAAKAGC（配列番号25）
Alfaリンカー	PSRLEEELRRRLTEGC（配列番号26）
ミオシンVIリンカー	AEEEEKKKQQEEEAERLRRIQEEMEKERKRREEDEERRRKEEEERRMKLEMEAKRKQEEEERKKREDDEKRKKKAGC（配列番号27）
Spotリンカー	PDRVRAVSHWSSC（配列番号28）
GT9リンカー	GTGTGTGTGTGTGTGTGTGC（配列番号29）
修飾された剛性のリンカー	TPTTPPTPTPGTPPGGC（配列番号30）
剛性	SPSTPPTPSPSTPPGGC（配列番号31）
ブランク	配列番号32～50
2H10	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCLASGRRFSIEAMGWYRQAPGKQRELVAIIDSGGSTDYVDSAKGRFTISRDNRKNTVDLQMNSLKDEDTGVYYCNVIGSSWYGRGLDYWGNGTQVTVSS（配列番号51）
2H10 N112Q	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCLASGRRFSIEAMGWYRQAPGKQRELVAIIDSGGSTDYVDSAKGRFTISRDNRKNTVDLQMNSLKDEDTGVYYCNVIGSSWYGRGLDYWGQGTQVTVSS（配列番号52）
2H10 5MUT	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCLASGRRFSIEAMGWYRQAPGKQRELVAIIDSGGSTDYVDSAKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCNVIGSSWYGRGLDYWGQGTQVTVSS（配列番号53）
2H10 6MUT	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCLASGRRFSIEAMGWYRQAPGKQRELVAIIDSGGSTDYADSAKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCNVIGSSWYGRGLDYWGQGTQVTVSS（配列番号54）

【表２６－２】

（表２６の続き）

名称	配列
Hu2H10 5MUT	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCLASGRRFSIEAMGWYRQAPGKQRELVAIIDSGGSTDYVDSAKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCNVIGSSWYGRGLDYWGQGTLVTVSS（配列番号55）
Hu2H10 5MUT R86K A87P	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCLASGRRFSIEAMGWYRQAPGKQRELVAIIDSGGSTDYVDSAKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCNVIGSSWYGRGLDYWGQGTLVTVSS（配列番号56）
Hu2H10 5MUT L115Q	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCLASGRRFSIEAMGWYRQAPGKQRELVAIIDSGGSTDYVDSAKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCNVIGSSWYGRGLDYWGQGTQVTVSS（配列番号57）
Hu2H10 5MUT R86K A87P L115Q	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCLASGRRFSIEAMGWYRQAPGKQRELVAIIDSGGSTDYVDSAKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCNVIGSSWYGRGLDYWGQGTQVTVSS（配列番号58）
ブランク	配列番号59～60
Nb42	QVQLQESGGGSLQAGASLRLSCAASGFAYSTYSMGWFRQVSGKEREGVATINSGTFRLWYTDSVKGSFTISRDNAKNMLYLQMNSLKPEDTAIYYCAARAWSPYSSTVDAGDFRYWGQGTQVTVSS（配列番号61）
HuNb42	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAYSTYSMGWFRQAPGKEREAVATINSGTFRLWYTDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAARAWSPYSSTVDAGDFRYWGQGTLVTVSS（配列番号62）
HuNb42 P14A	QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFAYSTYSMGWFRQAPGKEREAVATINSGTFRLWYTDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAARAWSPYSSTVDAGDFRYWGQGTLVTVSS（配列番号63）
HuNb42 T61A	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAYSTYSMGWFRQAPGKEREAVATINSGTFRLWYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAARAWSPYSSTVDAGDFRYWGQGTLVTVSS（配列番号64）
HuNb42 S75A	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAYSTYSMGWFRQAPGKEREAVATINSGTFRLWYTDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAARAWSPYSSTVDAGDFRYWGQGTLVTVSS（配列番号65）
HuNb42 L79V	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAYSTYSMGWFRQAPGKEREAVATINSGTFRLWYTDSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAARAWSPYSSTVDAGDFRYWGQGTLVTVSS（配列番号66）
HuNb42 A88P	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAYSTYSMGWFRQAPGKEREAVATINSGTFRLWYTDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARAWSPYSSTVDAGDFRYWGQGTLVTVSS（配列番号67）
HuNb42 L121Q	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAYSTYSMGWFRQAPGKEREAVATINSGTFRLWYTDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAARAWSPYSSTVDAGDFRYWGQGTQVTVSS（配列番号68）
HuNb42 T61A A88P	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAYSTYSMGWFRQAPGKEREAVATINSGTFRLWYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARAWSPYSSTVDAGDFRYWGQGTLVTVSS（配列番号69）
HuNb42 A88P L115Q	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAYSTYSMGWFRQAPGKEREAVATINSGTFRLWYTDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARAWSPYSSTVDAGDFRYWGQGTQVTVSS（配列番号70）
aTNF－a mu	QVQLQDSGGGLVQAGGSLRLSCAASGGTFSSIIMAWFRQAPGKEREFVGAVSWSGGTTVYADSVLGRFEISRDSARKSVYLQMNSLKPEDTAVYYCAARPYQKYNWASASYNVWGQGTQVTVSS（配列番号71）
aTNF－a mu 3MUT	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGGTFSSIIMAWFRQAPGKEREFVGAVSWSGGTTVYADSVKGRFTISRDSARKSVYLQMNSLKPEDTAVYYCAARPYQKYNWASASYNVWGQGTQVTVSS（配列番号72）
aTNF－a VHH	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSDHSGYTYTIGWFRQAPGKEREFVARIYWSSGNTYYADSVKGRFAISRDIAKNTVDLTMNNLEPEDTAVYYCAARDGIPTSRSVESYNYWGQGTQVTVSS（配列番号73）
ブランク	配列番号74～80
E1－1	EVQLQASGGGFVQPGGSLRLSCAASGGGSDAGTMGWFRQAPGKEREFVSAISWAGTAWRYYADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTATYYCALGSYEMDHHYWGQGTQVTVSS（配列番号81）
E1－1 F11L	EVQLQASGGGLVQPGGSLRLSCAASGGGSDAGTMGWFRQAPGKEREFVSAISWAGTAWRYYADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTATYYCALGSYEMDHHYWGQGTQVTVSS（配列番号82）

【表２６－３】

（表２６の続き）

名称	配列
E1－1 S49A	EVQLQASGGGFVQPGGSLRLSCAASGGGSDAGTMGWFRQAPGKEREFVAAIS WAGTAWRYYADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTATYYCALGSYEMD HHYWGQGTQVTVSS（配列番号83）
E1－1 F11L S49A	EVQLQASGGGLVQPGGSLRLSCAASGGGSDAGTMGWFRQAPGKEREFVAAIS WAGTAWRYYADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTATYYCALGSYEMD HHYWGQGTQVTVSS（配列番号84）
E1－1 CDR	EVQLQASGGGFVQPGGSLRLSCAASGRRFSIEAMGWFRQAPGKEREFVSAIDS GGSTDYADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTATYYCAVIGSSWYGRG LDYWGQGTQVTVSS（配列番号85）
ブランク	配列番号86～90
抗VEGF VHH	DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSSYSMGWFRQAPGKEREFVVAIS KGGYKYDAVSLEGRFTISRDNAKNTVYLQINSLRPEDTAVYYCASSRAYGSSRL RLADTYEYWGQGTLVTVSS（配列番号91）
抗VEGF DARPIN	GSDLDKKLLEAARAGQDDEVRILMANGADVNARDSTGWTPLHLAAPWGHPEIV EVLLKNGADVNAADFQGWTPLHLAAAVGHLEIVEVLLKYGADVNAQDKFGKTA FDISIDNGNEDLAEILQKAAGGGSGGGS（配列番号92）
抗VEGF HuNb22 2MUT	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYAYDTYYMGWFRQAPGKEREGVAGITS LVSGVAYYKYYTDSVKGRFTISRDNSKNTVDLQMNSLRAEDTAVYYCAASRSG LRARLLRPELYEYWGQGTLVTVSS（配列番号93）
抗VEGF HuNb23 3MUT	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGDTYSSACMGWFRQAPGKEREGVATIC TSTSMRTRYYADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCATGHTVG SSWRDPGAWRYWGQGTLVTVSS（配列番号94）
抗VEGF HuNb35 4MUT	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGLSYRPGYMGWFRQAPGKEREGVAIITT GGVTHYADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCALANWVQFPLR VDGYKYWGQGTLVTVSS（配列番号95）
Hu_aVEGF_VHH_3MUT	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSSYSMGWFRQAPGKEREFVAAIS KGGYKYDAVSLEGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCASSRAYGSSR LRLADTYEYWGQGTLVTVSS（配列番号96）
Hu_aVEGF_VHH_5MUT	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSSYSMGWFRQAPGKEREFVAAIS KGGYKYDAVSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCASSRAYGSSR LRLADTYEYWGQGTLVTVSS（配列番号97）
Hu_aVEGF_VHH_6MUT	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSSYSMGWFRQAPGKEREFVAAIS KGGYKYYAVSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCASSRAYGSSR LRLADTYEYWGQGTLVTVSS（配列番号98）
ブランク	配列番号99～100
抗TNFαVHH（ヒト）－剛性	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSDHSGYTYTIGWFRQAPGKEREFV ARIYWSSGNTYYADSVKGRFAISRDIAKNTVDLTMNNLEPEDTAVYYCAARDGIP TSRSVESYNYWGQGTQVTVSSPSTPPTPSPSTPPGGCDDDDK（配列番号101）
抗TNFαVHH（ヒト）－aH	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSDHSGYTYTIGWFRQAPGKEREFV ARIYWSSGNTYYADSVKGRFAISRDIAKNTVDLTMNNLEPEDTAVYYCAARDGIP TSRSVESYNYWGQGTQVTVSSAEAAAKEAAAKEAAAKAGC（配列番号102）
抗TNFαVHH（マウス）－aH	QVQLQDSGGGLVQAGGSLRLSCAASGGTFSSIIMAWFRQAPGKEREFVGAVS WSGGTTVYADSVLGRFEISRDSARKSVYLQMNSLKFPEDTAVYYCAARPYQKY NWASASYNVWGQGTQVTVSSAEAAAKEAAAKEAAAKAGC（配列番号103）
抗TNFα3MUT VHH（マウス）－aH	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCAASGGTFSSIIMAWFRQAPGKEREFVGAVS WSGGTTVYADSVKGRFTISRDSARKSVYLQMNSLKPEDTAVYYCAARPYQKYN WASASYNVWGQGTQVTVSSAEAAAKEAAAKEAAAKAGC（配列番号104）
抗TNFαアフィボディ	CGGGVDNKFNKEVGWAFGEIGALPNLNALQFRAFIISLWDDPSQSANLLAEAKK LNDAQAPK（配列番号105）
抗IL－1βscFv－剛性	EIVMTQSPSTLSASVGDRVIITCQASQSIDNWLSWYQQKPGKAPKLLIYRASTLA SGVPSRFSGSGSGAEFTLTISSLQPDDFATYYCQNTGGGVSIAFGQGTKLTVLG GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLSSA AMAWVRQAPGKGLEWVGIIYDSASTYYASWAKGRFTISRDTSKNTVYLQMNSL RAEDTAVYYCARERAIFSGDFVLWGQGTLVTVSSSPSTPPTPSPSTPPGGC（配列番号106）
Hu_aTNFαMu_3MUT	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGTFSSIIMAWFRQAPGKEREFVGAVSW SGGTTVYADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPYQKYNW ASASYNVWGQGTLVTVSS（配列番号107）

【表２６－４】

（表２６の続き）

名称	配列
Hu_aTNFαMu_5MUT	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGTFSSIIMAWFRQAPGKEREFVAAISW SGGTTVYADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPYQKYNW ASASYNVWGQGTLVTVSS（配列番号108）
Hu_aTNFαHu_7MUT	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSDHSGYTYTMGWFRQAPGKEREF VARIYWSSGNTYYADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAARD GIPTSRSVESYNYWGQGTLVTVSS（配列番号109）
ブランク	配列番号110
Hu_aEGFR_3MUT	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTSRSYGMGWFRQAPGKEREFVAGIS WRGDSTGYADSVKGRFTISRDNSKNTVDLQMNSLRPEDTAVYYCAAAAGSAW YGTLYEYDYWGQGTLVTVSS（配列番号111）
Hu_aHer2_3MUT	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGITFMRYAMGWYRQAPGKQREMVASIN SGGTTNYADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCNARWVKPQFI DNNYWGQGTLVTVSS（配列番号112）
Hu_aPD1_102C3 3MUT	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSIFSIHAMGWFRQAPGKEREFVAAITW SGGITYYEDSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAADRAESSWY DYWGQGTLVTVSS（配列番号113）
Hu_aPD1_102C12 3MUT	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSIASIHAMGWFRQAPGKEREFVAVITW SGGITYYADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAGDKHQSSWY DYWGQGTLVTVSS（配列番号114）
Hu_aPD1_102E2 3MUT	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSISSIHAMGWFRQAPGKEREFVAAITW SGGITYYADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAADRAQSSWY DYWGQGTLVTVSS（配列番号115）
Hu_aPD1_102E8 3MUT	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSIFSINAMAWFRQAPGKEREFVALISW SGGSTYYEDSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAADRVDSNWY DYWGQGTLVTVSS（配列番号116）
Hu_aPD1_102H12 4MUT	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRAFSSGTMGWFRQAPGKEREFVASIP WSGGRTYYADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAVKERSTGW DFAWGQGTLVTVSS（配列番号117）
Hu aCaffeine 3MUT	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTGTIYSMAWFRQAPGKEREFLATIGW SSGITYYMDSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAATRAYSVGYD YWGQGTLVTVSS（配列番号118）
Hu_aEGFR_5MUT	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTSRSYGMGWFRQAPGKEREFVAGIS WRGDSTGYADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAAAAGSAWY GTLYEYDYWGQGTLVTVSS（配列番号119）
aAng2_D4	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCVASGRIFTNTAMGWYRQAPGKWRELVATIYS GGSTKYIDSVKGRFIISRDNTRNTVHLQMNSLKPEDTAVYYCNTVGAGSYWGQG AQVTVSS（配列番号120）
Hu_aAng2_D4_3MUT	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRIFTNTAMGWYRQAPGKWRELVATIYS GGSTKYIDSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCATVGAGSYWGQ GTLVTVSS（配列番号121）
aAn2_H4	EVQLVESGGDLVQAGGSLRLSCAASGFTFGDFTIGWFRQAPGKEREGVSCINT GDGSTNYAESVKGRFTISSDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCALDQAPMWSS WSAPYEYDYWGQGTQVTVSS（配列番号122）
Hu_aAng2_H4_6MUT	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGDFTMGWFRQAPGKEREGVAAINT GDGSTNYADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCALDQAPMWSS WSAPYEYDYWGQGTLVTVSS（配列番号123）
aAng2_BI0027	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFTLDDYAIGWFRQAPGKEREGVSSIRD NDGSTYYADSVKGRFTISSDNDKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAAVPAGRLRF GEQWYPLYEYDAWGQGTLVTVSS（配列番号124）
Hu_aAng2_0027_2MUT	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLDDYAMGWFRQAPGKEREGVASIR DNDGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAAVPAGRLR FGEQWYPLYEYDAWGQGTLVTVSS（配列番号125）
aEpCam_Nb4	QVQLVQSGGGSVQGGASLRLSCAASGGERNNYCVAWFRQAPGKEREVAAISR AASGAQTTTKYYVDSVKGRFTISQDTKNTATVYLQMNSHKPEDTAYCTAKAKIY PPQCTGISRTIDYRGQGTQVTVSS（配列番号126）
Hu_aEpCAM_Nb4_4MUT	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGERNNYCMGWFRQAPGKEREVAAISR AASGAQTTTKYYVDSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRPEDTAYCAAKAKIYP PQCTGISRTIDYRGQGTLVTVSS（配列番号127）

【表２６－５】

（表２６の続き）

名称	配列
aEpCam__Nb4	QVQLVQSGGGLVQGGASLRLSCAASSGRAGLIHVAWFRAKNTLYRQVAAISSD DTGFATLYYAVDSVKGRFTISQDTESTKYSYLQMNSLKPEDTIYCTAKLFSKTSY QKFIYKFNYWGQGTQVTVSS（配列番号128）
Hu__aEpCAM__Nb5__11MUT	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGRAGLIHMGWFRQAPGKYREVAAISSD DTGFATLYYAVDSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRPEDTAYCTAKLFSKTSY QKFIYKFNYWGQGTLVTVSS（配列番号129）
aEpCAM__Nb22	QVQQVQSGGGSVQAGASLRLSCAASSGLQQAIYVAWFRQAVGKEREVAAIGY WYWYHIQVYKYYVDSVKDRFTISGDTKSTKTYLQMNSLKNEDTAYYCAKIHHLP RQRQEHGIFDYRGQGTQVTVSS（配列番号130）
Hu__aEpCAM__Nb22__6MUT	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGLQQAIYMGWFRQAPGKEREVAAIGY WYWYHIQVYKYYVDSVKDRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRPEDTAYYCAKIHHLP RQRQEHGIFDYRGQGTLVTVSS（配列番号131）
ブランク	配列番号132～140
Hu2H10 5MUT CYS	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCLASGRRFSIEAMGWYRQAPGKQRELVAIIDS GGSTDYVDSAKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCNVIGSSWYGRG LDYWGQGTLVTVSSC（配列番号141）
Hu2H10 5MUT aH__CYS	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCLASGRRFSIEAMGWYRQAPGKQRELVAIIDS GGSTDYVDSAKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCNVIGSSWYGRG LDYWGQGTLVTVSSAEAAAKEAAAKEAAAKAGC（配列番号142）
Hu2H10 5MUT R86K A87P aH__CYS	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCLASGRRFSIEAMGWYRQAPGKQRELVAIIDS GGSTDYVDSAKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCNVIGSSWYGRG LDYWGQGTLVTVSSAEAAAKEAAAKEAAAKAGC（配列番号143）
Hu2H10 5MUT L115Q aH__CYS	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCLASGRRFSIEAMGWYRQAPGKQRELVAIIDS GGSTDYVDSAKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCNVIGSSWYGRG LDYWGQGTQVTVSSAEAAAKEAAAKEAAAKAGC（配列番号144）
HuNb42 A88P aH__CYS	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAYSTYSMGWFRQAPGKEREAVATINS GTFRLWYTDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARAWSPYSS TVDAGDFRYWGQGTLVTVSSAEAAAKEAAAKEAAAKAGC（配列番号145）
HuNb42 T61A A88P aH__CYS	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAYSTYSMGWFRQAPGKEREAVATINS GTFRLWYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARAWSPYSS TVDAGDFRYWGQGTLVTVSSAEAAAKEAAAKEAAAKAGC（配列番号146）
HuNb42 A88P L115Q aH__CYS	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAYSTYSMGWFRQAPGKEREAVATINS GTFRLWYTDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARAWSPYSS TVDAGDFRYWGQGTQVTVSSAEAAAKEAAAKEAAAKAGC（配列番号147）
抗TNFαアフィボディGly	CGGGVDNKFNKEVGWAFGEIGALPNLNALQFRAFIISLWDDPSQSANLLAEAKK LNDAQAPKGGG（配列番号148）
Hu__aTNFαMu__3MUT aH__CYS	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGTFSSIIMAWFRQAPGKEREFVGAVSW SGGTTVYADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPYQKYNW ASASYNVWGQGTLVTVSSAEAAAKEAAAKEAAAKAGC（配列番号149）
Hu__aTNFαMu__5MUT aH__CYS	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGTFSSIIMAWFRQAPGKEREFVAAISW SGGTTVYADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAARPYQKYNW ASASYNVWGQGTLVTVSSAEAAAKEAAAKEAAAKAGC（配列番号150）
Hu__aTNFαHu__7MUT aH__CYS	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSDHSGYTYTMGWFRQAPGKEREF VARIYWSSGNTYYADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAARD GIPTSRSVESYNYWGQGTLVTVSSAEAAAKEAAAKEAAAKAGC（配列番号151）
IL－2__C125S aH__CYS	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTFKFYMPKKATELK HLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYAD ETATIVEFLNRWITFSQSIISTLTAEAAAKEAAAKEAAAKAGC（配列番号152）
IL－15__5MUT aH__CYS	NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVTAMQCFLSELQVISLESG DASIHDTVENLTILANNSLSSNGYVTESGCKECEELEAKNIKEFLQSFVHIVQMF INTSAEAAAKEAAAKEAAAKAGC（配列番号153）
aTNFa__DARPin G3S__CYS	DLGKKLLEVARAGQDDEVRILMANGADVNAADHQSFTPLHLYAIFGHLEIVEVL LKNGADVNASDWHGNTPLHLAAWIGHLEIVEVLLKYGADVNATDHSGSTPLHL AATLGHLEIVEVLLKYGADVNAQDKFGKTAFDISIDNGNEDLAEILQKAAGGGSG GGSC（配列番号154）
aPDL1__Nb1	QVQLQESGGGLVQAGGSLRLSCATSGSIFSIISMGWYRQAPGKQRELVALVFR GGSTVYADSVKGRFTISGDIAKNTVYLQMDSLKPEDTAVYYCNVKSIGTAQYWG QGTQVTVSS（配列番号155）

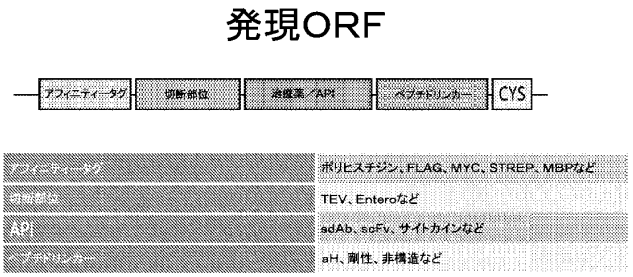
【表２６－６】

（表２６の続き）

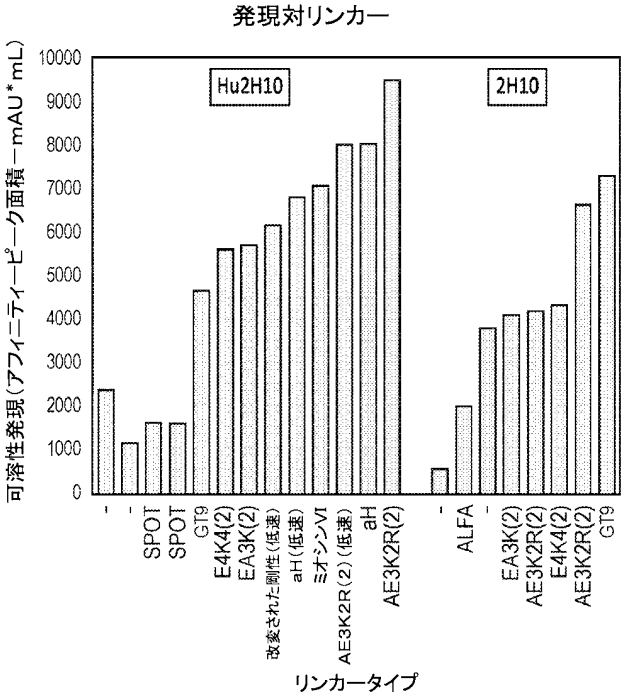
名称	配列
Hu_aPDL1_Nb1_4MUT	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSIFSIISMGWYRQAPGKQRELVALIFRG GSTVYADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAVKSIGTAQYWG QGTLVTVSS（配列番号156）
aPDL1_Nb104E10	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGVDASNSAMGWYRQAPGKQREWVARIT GGGLIAYTDSVKGRFTISRDNAKSTVYLQMNSLEPEDTAVYYCNTINSRDWGQG TQVTVSS（配列番号157）
Hu_aPDL1_Nb104E10_1MUT	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGVDASNSAMGWYRQAPGKQREWVARIT GGGLIAYTDSVKGRFTISRDNSKSTVYLQMNSLRPEDTAVYYCATINSRDWGQG TLVTVSS（配列番号158）
aPDL1_NbG5	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSFFRTYIVSWYRQAPGKRREAVAVMS NSGNTNYADSVKGRFTISRDNAVNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCNLLKVTVVPPA NYWGQGTQVTVSS（配列番号159）
Hu_aPDL1_NbG5_4MUT	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSFFRTYIMGWYRQAPGKRREAVAVISN SGNTNYADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCALLKVTVVPPA NYWGQGTLVTVSS（配列番号160）
aPDL2_103E4	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGSTFSNYVSNYAMGWGRQAPGTQRELV ASISNGDTTNYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCFEHQVAG LTWGQGTQVTVSS（配列番号161）
Hu_aPDL2_103E4_2MUT	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSTFSNYVSNYAMGWGRQAPGKQRELV ASISNGDTTNYADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAEHQVAG LTWGQGTLVTVSS（配列番号162）
aPDL2_103E5	EVQLVESGGGLVQTGGSLRLSCAASGFTLDYYGIGWFRQAPGKEREGVSFISG SDGSTYYAESVKGRFTISRDKAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAADPWGPPSIA TMTSYEYKHWGQGTQVTVSS（配列番号163）
Hu_aPDL2_103E5_4MUT	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLDYYGMGWFRQAPGKEREGVAFIS GSDGSTYYAESVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAADPWGPPS IATMTSYEYKHWGQGTLVTVSS（配列番号164）
aPDL2_Nb103F10	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTFSSGTMGWFRRAPGKEREFVASIP WSGGRTYYADSVKDRFTISRDNAQNTVFLQMNSLKPEDTAVYYCAFKERSTGW DFASWGQGIQVTVSS（配列番号165）
Hu_aPDL2_Nb103F10_5MUT	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSSGTMGWFRQAPGKEREFVASIP WSGGRTYYADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAFKERSTGW DFASWGQGTLVTVSS（配列番号166）
Hu_aIL－1B_5C_5MUT	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGYYYSSFYWGWFRQAPGQGLEAVATIP YYYTYYTDSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCASYNIHNFWGQG TLVTVSS（配列番号167）
Hu_aIL－1B_6C_3MUT	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSYSYSYSWGWFRQAPGQGLEAVAAIV YYYTYYADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCASYAPFPFWGQG TLVTVSS（配列番号168）
Hu_aIL－1B_11H_3MUT	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGYSYYSWGWFRQAPGQGLEAVASIAY YYTYYADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAYSDIISYWGQGTL VTVSS（配列番号169）
Hu_aIL－1B_12D_2MUT	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSYYSSSYGGWFRQAPGQGLEAVATIPY YTSYADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCASFFPFFYWGQGTL VTVSS（配列番号170）

【図面】

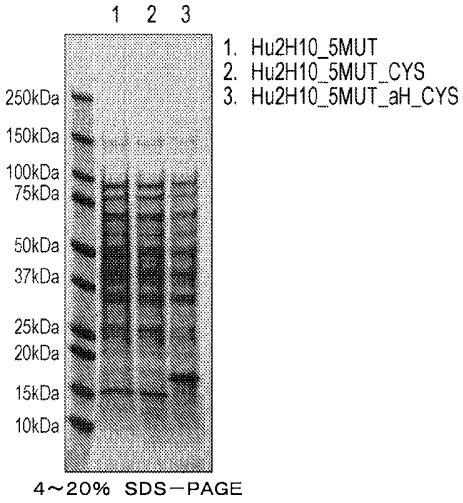
【図１Ａ】



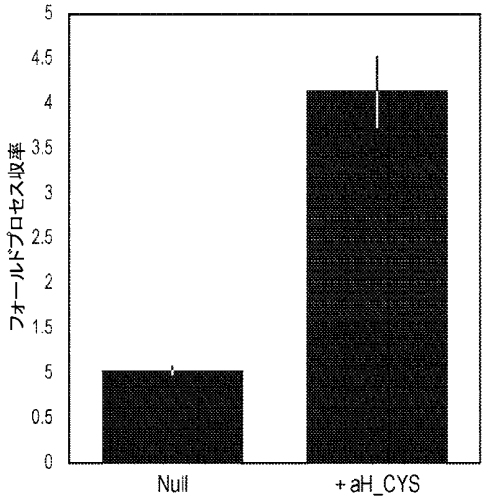
【図１Ｂ】



【図１Ｃ】



【図１Ｄ】



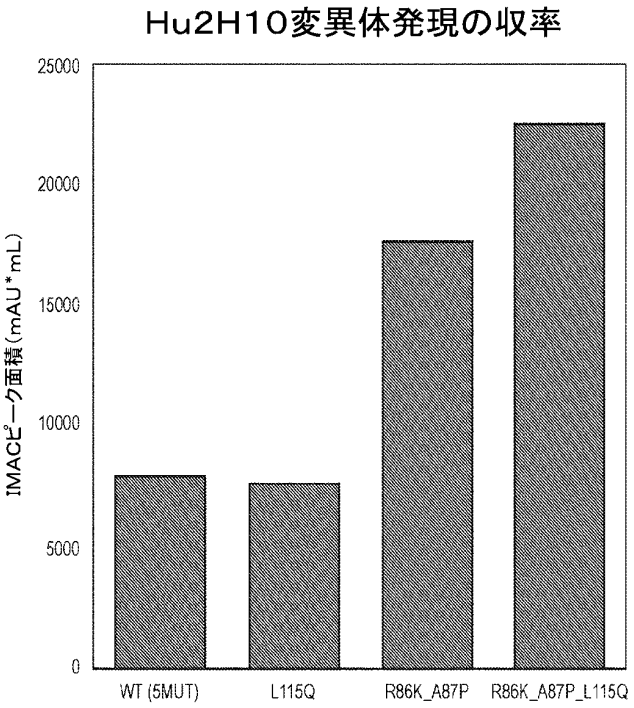
【図２】

2H10一次配列の変化

```
                                                  20                  40                  60
>2H10                                QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCLASGRRFSIEAMGWYRQAPGKQRELVAIIDSGGSTDYV
>2H10_N112Q                          QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCLASGRRFSIEAMGWYRQAPGKQRELVAIIDSGGSTDYV
>2H10_5MUT                           QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCLASGRRFSIEAMGWYRQAPGKQRELVAIIDSGGSTDYV
>2H10_6MUT                           QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCLASGRRFSIEAMGWYRQAPGKQRELVAIIDSGGSTDYA
>Hu2H10_5MUT                         QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCLASGRRFSIEAMGWYRQAPGKQRELVAIIDSGGSTDYV
>Hu2H10_5MUT_R86K_A87P               QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCLASGRRFSIEAMGWYRQAPGKQRELVAIIDSGGSTDYV
>Hu2H10_5MUT_L115Q                   QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCLASGRRFSIEAMGWYRQAPGKQRELVAIIDSGGSTDYV
>Hu2H10_5MUT_R86K_A87P_L115Q         QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCLASGRRFSIEAMGWYRQAPGKQRELVAIIDSGGSTDYV

                                                  80                  100                 120
>2H10                                DSAKGRFTISRDNRKNTVDLQMNSLKDEDTGVYYCNVIGSSWYGRGLDYWGNGTQVTVSS
>2H10_N112Q                          DSAKGRFTISRDNRKNTVDLQMNSLKDEDTGVYYCNVIGSSWYGRGLDYWGQGTQVTVSS
>2H10_5MUT                           DSAKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCNVIGSSWYGRGLDYWGQGTQVTVSS
>2H10_6MUT                           DSAKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCNVIGSSWYGRGLDYWGQGTQVTVSS
>Hu2H10_5MUT                         DSAKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCNVIGSSWYGRGLDYWGQGTLVTVSS
>Hu2H10_5MUT_R86K_A87P               DSAKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCNVIGSSWYGRGLDYWGQGTLVTVSS
>Hu2H10_5MUT_L115Q                   DSAKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCNVIGSSWYGRGLDYWGQGTQVTVSS
>Hu2H10_5MUT_R86K_A87P_L115Q         DSAKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCNVIGSSWYGRGLDYWGQGTQVTVSS
```

【図３】



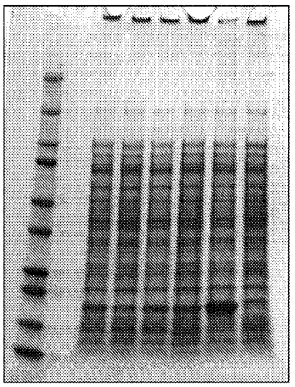
【図４】

```
                                                  20                  40                  60
>Nb42                                QVQLQESGGGSLQAGASLRLSCAASGFAYSTYSNGWFRQVSGKEREGVATINSGTFRLWY
>HuNb42                              QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAYSTYSNGWFRQAPGKEREAVATINSGTFRLWY
>HuNb42_P14A                         QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAYSTYSNGWFRQAPGKEREAVATINSGTFRLWY
>HuNb42_T61A                         QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAYSTYSNGWFRQAPGKEREAVATINSGTFRLWY
>HuNb42_S75A                         QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAYSTYSNGWFRQAPGKEREAVATINSGTFRLWY
>HuNb42_L79V                         QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAYSTYSNGWFRQAPGKEREAVATINSGTFRLWY
>HuNb42_A88P                         QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAYSTYSNGWFRQAPGKEREAVATINSGTFRLWY
>HuNb42_L121Q                        QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAYSTYSNGWFRQAPGKEREAVATINSGTFRLWY
>HuNb42_T61A_A88P                    QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAYSTYSNGWFRQAPGKEREAVATINSGTFRLWY
>HuNb42_A88P_L115Q                   QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAYSTYSNGWFRQAPGKEREAVATINSGTFRLWY

                                                  80                  100                 120
>Nb42                                TDSVKGSFTISRDNAKNMLYLQMNSLKPEDTAIYYCAARAWSPYSSTVDAGDFRYWGQGT
>HuNb42                              TDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAARAWSPYSSTVDAGDFRYWGQGT
>HuNb42_P14A                         TDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAARAWSPYSSTVDAGDFRYWGQGT
>HuNb42_T61A                         ADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAARAWSPYSSTVDAGDFRYWGQGT
>HuNb42_S75A                         TDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAARAWSPYSSTVDAGDFRYWGQGT
>HuNb42_L79V                         TDSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCAARAWSPYSSTVDAGDFRYWGQGT
>HuNb42_A88P                         TDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARAWSPYSSTVDAGDFRYWGQGT
>HuNb42_L121Q                        TDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAARAWSPYSSTVDAGDFRYWGQGT
>HuNb42_T61A_A88P                    ADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARAWSPYSSTVDAGDFRYWGQGT
>HuNb42_A88P_L115Q                   TDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAARAWSPYSSTVDAGDFRYWGQGT

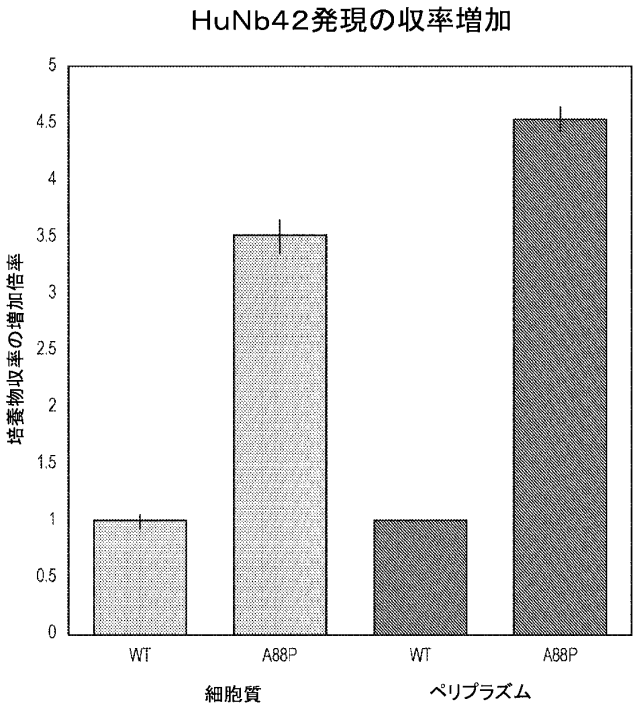
>Nb42                                QVTVSS
>HuNb42                              LVTVSS
>HuNb42_P14A                         LVTVSS
>HuNb42_T61A                         LVTVSS
>HuNb42_L79V                         LVTVSS
>HuNb42_A88P                         LVTVSS
>HuNb42_L121Q                        QVTVSS
>HuNb42_T61A_A88P                    LVTVSS
>HuNb42_A88P_L115Q                   QVTVSS
```

【図５】

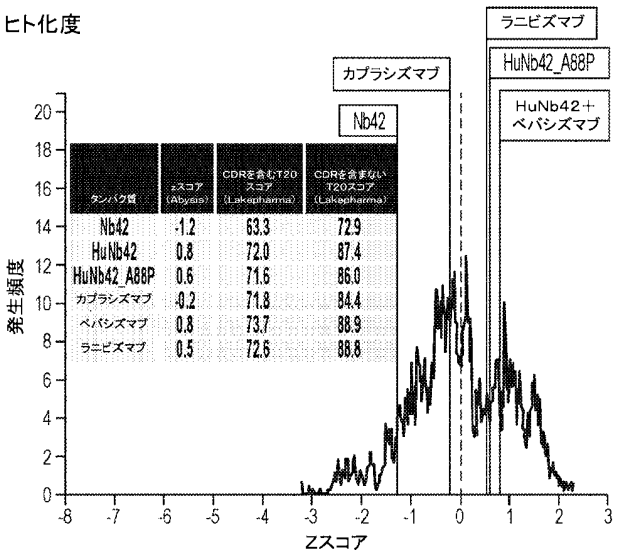


ロード:
1－分子量マーカー
2 - MT
3 - WCE, 2BT_HuNb42(reopt)_aH_CYS
4 - WCE, 2BT_HuNb42(reopt)_T61A_aH_CYS
5 - WCE, 2BT_HuNb42(reopt)_S75A_aH_CYS
6 - WCE, 2BT_HuNb42(reopt)_S75A_L79V_aH_CYS
7 - WCE, 2BT_HuNb42(reopt)_A88P_aH_CYS
8 - WCE, 2BT_HuNb42(reopt)_L121Q_aH_CYS

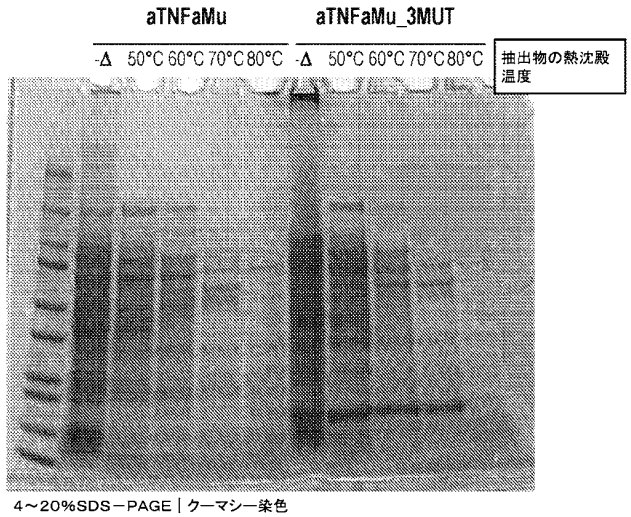
【図６】


HuNb42発現の収率増加
培養物収率の増加倍率
5
4.5
4
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
WT
A88P
WT
A88P
細胞質
ペリプラズム

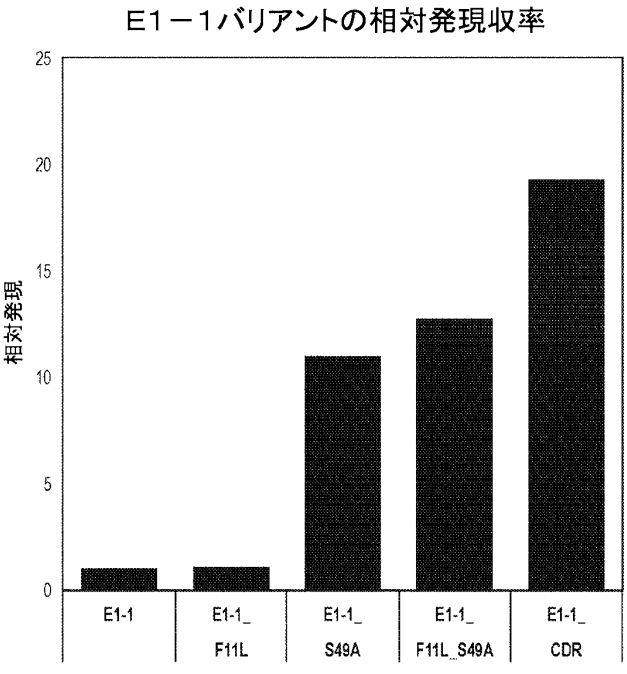
【図７】


ヒト化度
ラニビズマブ
HuNb42_A88P
カプラシズマブ
Nb42
HuNb42＋
ベバシズマブ
タンパク質
zスコア (Abysis)
CDRを含むT20スコア (Lakepharma)
CDRを含まないT20スコア (Lakepharma)
Nb42 -1.2 63.3 72.9
HuNb42 0.8 72.0 87.4
HuNb42_A88P 0.6 71.6 86.0
カプラシズマブ -0.2 71.8 84.4
ベバシズマブ 0.8 73.7 88.9
ラニビズマブ 0.5 72.6 88.8
発生頻度
Zスコア

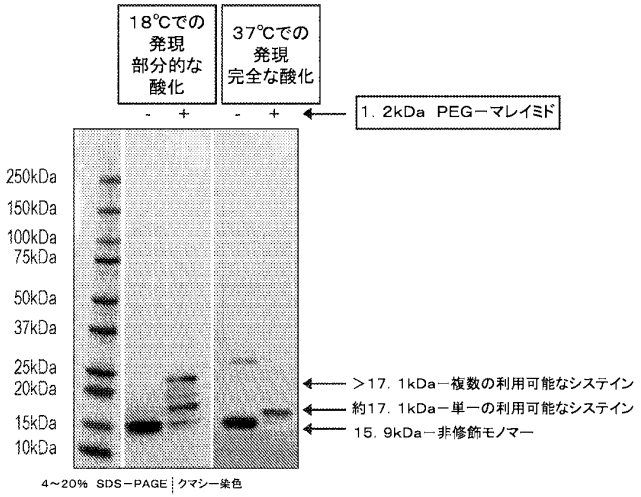
【図８】


aTNFaMu
aTNFaMu_3MUT
-Δ 50°C 60°C 70°C 80°C
-Δ 50°C 60°C 70°C 80°C
抽出物の熱沈殿温度
4～20%SDS－PAGE｜クーマシー染色

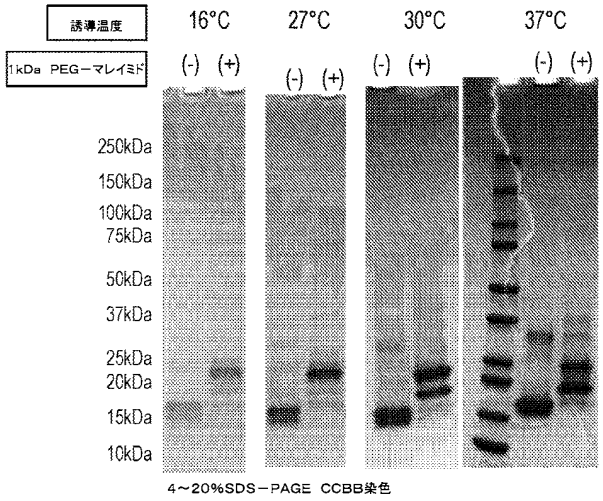
【図９】


E1－1バリアントの相対発現収率
相対発現
25
20
15
10
5
0
E1-1
E1-1_ F11L
E1-1_ S49A
E1-1_ F11L_S49A
E1-1_ CDR

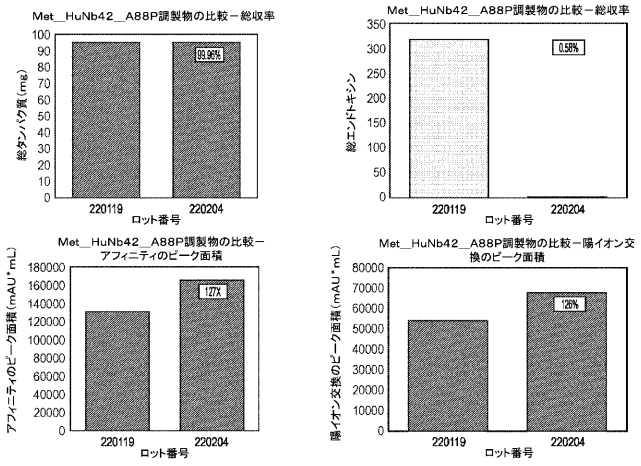
【図１０Ａ】



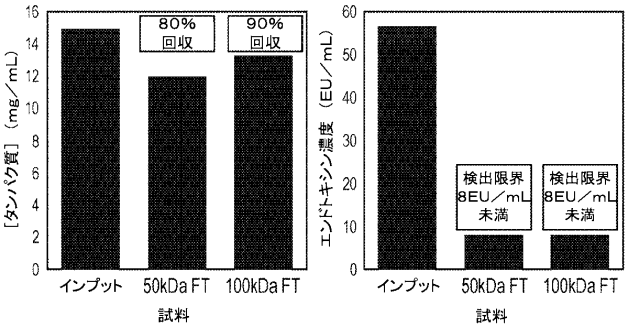
【図１０Ｂ】



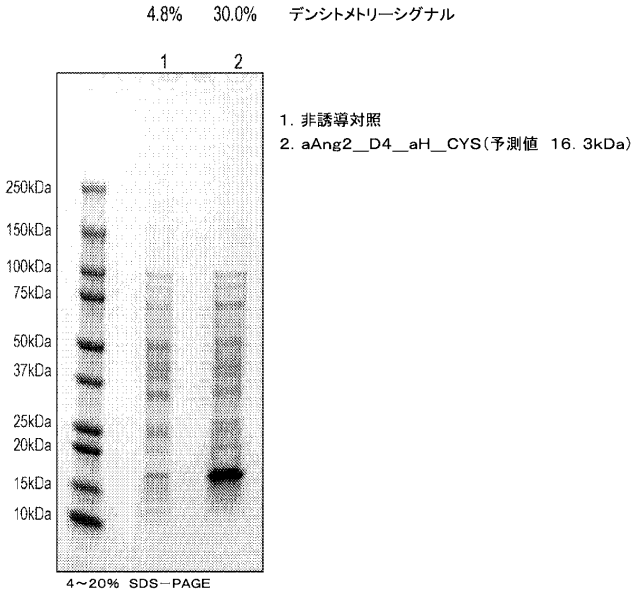
【図１１Ａ】



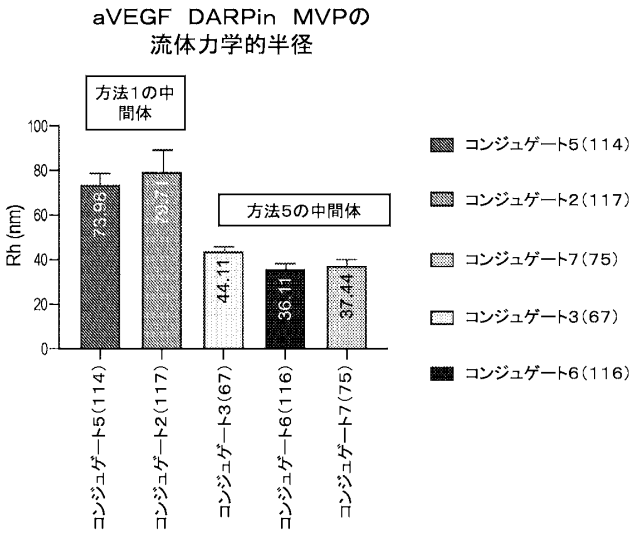
【図１１Ｂ】



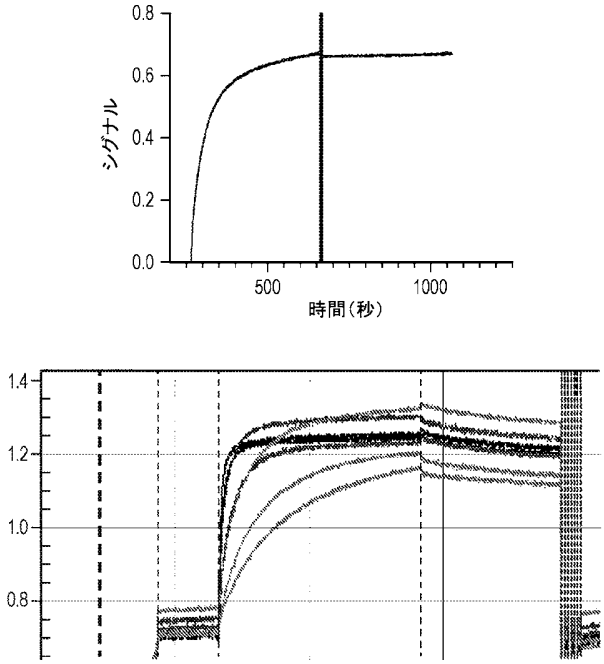
【図１１Ｃ】



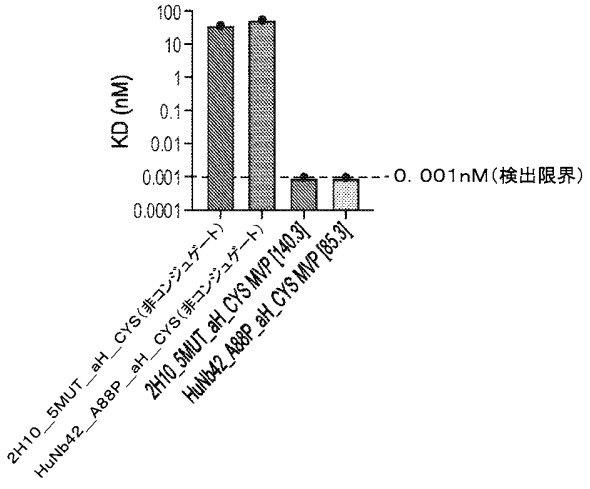
【図１２】



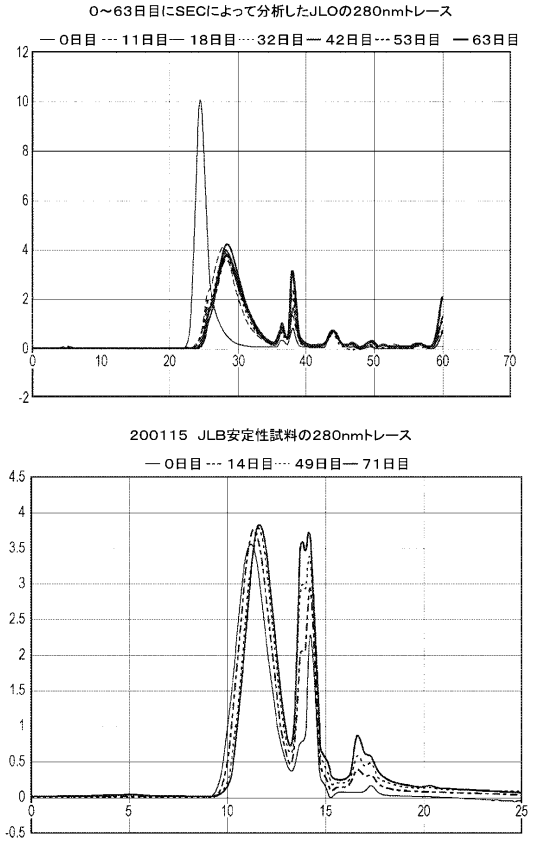
【図１３Ａ】



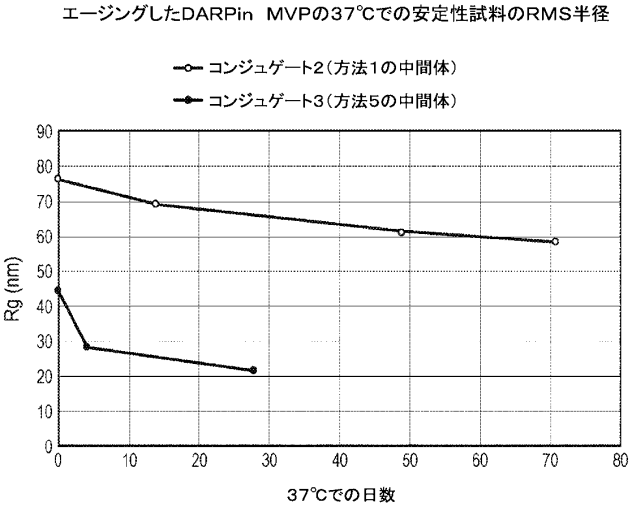
【図１３Ｂ】



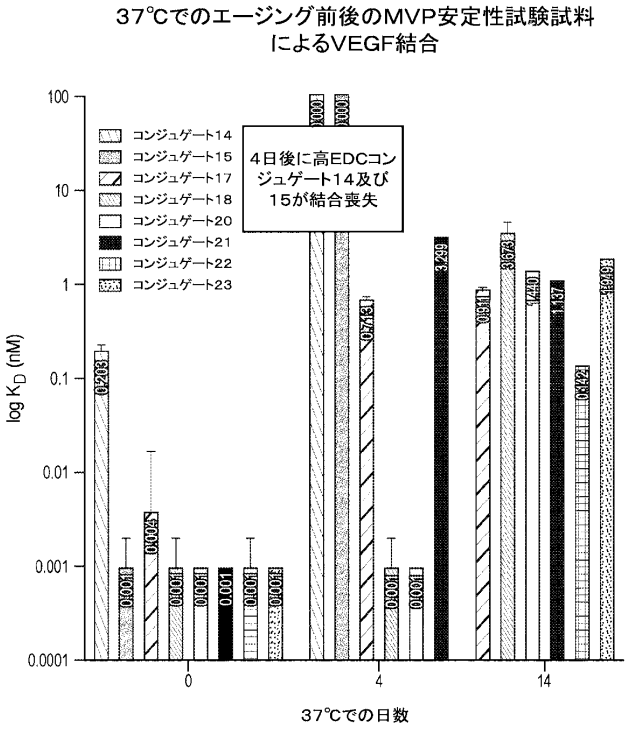
【図１４】



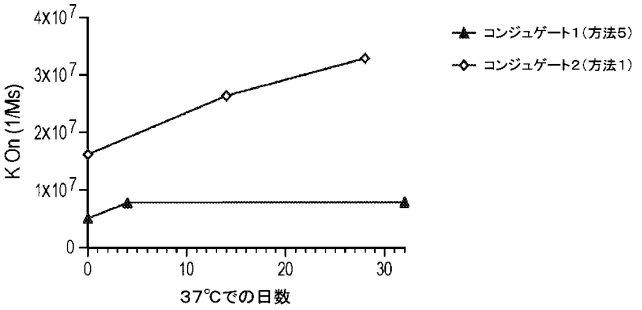
【図１５】



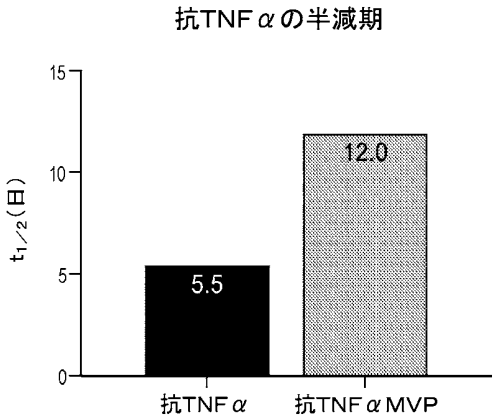
【図１６】



【図１７】



【図１８】



【配列表】

20255123570000001.xml

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 23/65778

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC - INV. C07K 16/18 (2023.01)
ADD. A61K 31/728 (2023.01)

CPC - INV. A61K 39/3955, C08L 5/08

ADD. C07K 2317/567, A61K 31/728, C07K 2317/569, C07K 2317/565
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)
See Search History document

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

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2021/0046181 A1 (VALITOR, INC.) 18 February 2021 (18.02.2021) abstract, para [0070]	1-3
A	US 2011/0053865 A1 (SAUNDERS et al.) 3 March 2011 (03.03.2011) para [0388], Fig 19, SEQ ID NO: 361	1-3
A	US 2020/0095340 A1 (HARPOON THERAPEUTICS, INC.) 26 March 2020 (26.03.2020) abstract, SEQ ID NO: 43	1-3
A	WO 2021/046159 A1 (GENENTECH, INC.) 11 March 2021 (11.03.2021) abstract, para [0013], SEQ ID NO: 4	1-3
A	WO 2022/026330 A1 (PROMAB BIOTECHNOLOGIES, INC. et al.) 3 February 2022 (03.02.2022) abstract, claim 1, SEQ ID NO: 3	1-3

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"D" document cited by the applicant in the international application
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
5 September 2023 (05.09.2023)	SEP 27 2023
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300	Authorized officer Kari Rodriquez Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2022)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 23/65778

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 13ter.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:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 23/85778

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:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☒ Claims Nos.: 4-17, 19-34, 37-47
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 extra sheet ----------

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.:
1-3, limited to SEQ ID NOs: 1-4

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/US 23/65778

Continuation of Box No. III, Observations where unity of invention is lacking:

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be searched, the appropriate additional search fees must be paid.

Group I+: Claims 1-3 directed to a peptide having Formula (I): FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4, wherein CDR1, CDR2, and CDR3 are each independently complementarity-determining regions. The Formula I peptide may be searched, for example, to the extent that X1 comprises a Formula I peptide that comprises:
a FR1 (SEQ ID NO: 1) wherein X10 is Q, X11 is V, X12 is S, X13 is L, X14 is V, X15 is P, X16 is G, X17 is A, and X18 is A; a FR2 (SEQ ID NO: 2) wherein X20 is M, X21 is G, X22 is F, X23 is A, X24 is E, X25 is R, X26 is F, X27 is A, and X28 is A;
a FR3 (SEQ ID NO: 3) wherein X30 is A, X31 is R, X32 is N, X33 is S, X34 is N, X35 is T, X36 is Y, X37 is N, X38 is S, X39a is P andX 39b is V; and ; a FR4 (SEQ ID NO: 4) wherein X40 is Q and X41 is L.
The first named invention was determined based on the amino acid sequences in claim 1.
This first named invention has been selected based on the guidance set forth in section 10.54 of the PCT International Search and Preliminary Examination Guidelines. It is believed that claims 1-3 limited to said Formula I peptide encompass this first named invention, and thus these claims will be searched without fee to the extent that the peptide encompasses said amino acid selections. Additional Formula I peptides will be searched upon the payment of additional fees. Applicants must specify the claims that encompass any additionally elected Formula I peptides. Applicants must further indicate, if applicable, the claims which encompass the first named invention, if different than what was indicated above for this group. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched. An exemplary election would be a Formula I peptide that comprises:
a FR1 (SEQ ID NO: 1) wherein X10 is E, X11 is Q, X12 is T, X13 is S, X14 is A, X15 is A, X16 is D, X17 is V, and X18 is V; a FR2 (SEQ ID NO: 2) wherein X20 is I, X21 is S, X22 is Y, X23 is V, X24 is G, X25 is L, X26 is G, X27 is G, and X28 is S;
a FR3 (SEQ ID NO: 3) wherein X30 is G, X31 is Q, X32 is S, X33 isA, X34 is K, X35 is M, X36 is D, X37 is D, X38 is N, X39a is A andX 39b is M; and ; a FR4 (SEQ ID NO: 4) wherein X40 is K and X41 is Q (Claim 1).

Group II: Claim 18, directed to a composition comprising a conjugate of Formula IIb: (X1 -X2A -Y)n-Z (IIb), wherein each X1 is independently a peptide having a molecular weight of from about 5 kDa to about 200 kDa, each X2A is a peptide linker that comprises an alpha-helix; each Y is an organic linker; Z is a biocompatible polymer of about 0.1 MDa to about 3 MDa; and subscript n is an integer of from 1 to 1500.

Group III+: Claims 35-36, directed to a conjugate composition that is a random polymer (about 0.8 MDa) of Formula IIIa, (X1-X2-Y-Z1)n-(Z2)p-(Z3)q , wherein X1 is a peptide, X2 is a linker with sequence AEAAAKEAAAKEAAAKAGC (SEQ ID NO: 21);
Y is an organic linker [see claim 32], each X1-X2-Y-Z1 moiety has the structure [see claim 35] each Z2 has structure In claim 35 (R1, R2 are ethyl or -(ch2)3-NMe2), Z3 has structure shown wherein Z3a is OH or Y (organic linker as above), and n, p, and q are integers of: 10-300 (<10% of total integer number), 1-15 (less than 0.5%) and 1000 to 3000, respectively, for n, p, and q. Group III+ will be searched upon payment of additional fees. The Formula IIIa polymer conjugate may be searched, for example, to the extent that the X1 ploypeptide comprises SEQ ID NO: 55. It is believed that claim 35, limited to said conjugate molecule, read on this exemplary invention. Additional Formula IIIa polymer conjugates will be searched upon the payment of additional fees. Applicants must specify the claims that encompass any additionally elected Formula IIIa polymer conjugates. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched. An exemplary election would be a Formula IIIa polymer conjugate wherein the X1 ploypeptide comprises an anti-VEGF amino acid sequence comprising SEQ ID NO: 67 (Claim 36).

The inventions listed as Groups I+, II and III+ do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:
Special Technical Features

No technical features are shared between the amino acid sequences of the inventions of Group I+ or Group III+ and, accordingly, these groups lack unity a priori.Additionally, even if the inventions listed as Group I+ were considered to share technical features, these shared technical features are previously disclosed by the prior art, as further discussed below.

Group I+ requires a peptide having Formula (I): FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4, wherein CDR1, CDR2, and CDR3 are each independently complementarity-determining regions, not required by Groups II and III+.

Group II requires a conjugate of Formula IIb: (X1 -X2A -Y)n-Z, not required by Groups I+ and III+.

Group III+ requires a conjugate composition that is a random polymer (about 0.8 MDa) of Formula IIIa, (X1-X2-Y-Z1)n-(Z2)p-(Z3)q, not required by Groups I+ and II.

Common Technical Features

The inventions of Groups I+, II and III+ share the technical feature of polypeptides, e.g. antibodies or a part thereof.
However, this shared technical feature does not represent a contribution over prior art, because the shared technical feature is taught by However, this shared technical feature does not represent a contribution over prior art, because the shared technical feature is made obvious by US 2021/0046181 A1 to Valitor Inc (hereinafter 'Valitor'). Valitor teaches peptides, such as antibody fragments (abstract "The present disclosure is directed to peptide-polymer conjugates", para [0070] "antibodies, such as single domain antibodies are useful in the present invention ... an antibody fragment consisting of a single monomeric variable antibody domain. Like a whole antibody, the sdAb is able to bind selectively to a specific antigen. With a molecular weight of only 12-15 kDa, single domain antibodies are much smaller than common whole antibodies (150-160 kDa). A single domain antibody is a peptide chain of about 110 amino acids in length, comprising one variable domain (VH) of a heavy chain antibody"

********** See Next Extra Sheet to continue **********

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 23/65778

Continuation of Box No. III, Observations where unity of invention is lacking:

The inventions of Groups II and III+ share the technical feature of a conjugate polymer comprising (X1 -X2A -Y)n-Z/(XI-X2-Y-Z1)n, whereln whereln each X1 is independently a peptide having a molecular weight of from about 5 kDa to about 200 kDa, each X2A is a peptide linker that comprises an alpha-helix; each Y is an organic linker; Z is a biocompatible, hyaluronic acid-based polymer of about 0.1 MDa to about 3 MDa; and subscript n is an integer of from 1 to 1500.

However, this shared technical feature does not represent a contribution over prior art, because the shared technical feature is made obvious by Valitor. Valitor teaches peptide-linker-hyaluronic acid-based polymer conjugates (para [0077] "The conjugates of the present invention can be described as compounds of Formula I: (X-Y)n-Z, where X is [a] peptide ... Z is the biocompatible polymer ... Y is an optional linker, and subscript n is from 5 to 500.") having a hyaluronic acid polymer from about 0.1 MDa to about 3 MDa (para [0047] "The present invention provides conjugates of high molecular weight polymers and a plurality of peptides that possess a potency greater than a similar concentration of the unconjugated peptide. In some embodiments, the present invention provides a conjugate of a biocompatible polymer having a molecular weight of from about 0.1 MDa to about 3 MDa", para [0050] " In some embodiments, the biocompatible polymer can be hyaluronic acid.") and peptides conjugated by organic linkers (para [0133] ", the conjugates can be engineered with specific macromolecular properties... conjugating an anti-inflammatory peptide to HyA [hyaluronic acid moiety]")and organic linkers (para [0080] "The linkers useful in the present invention are small and generally have a molecular weight from about 100 Da to about 500 Da containing two functional groups consisting of a maleimide and either an amine or hydrazide"),compare applicant organic linkers with linkers shown in para [0081] and see Fig. 1, step 2 of Valitor (bottom right): a peptide (as in applicant's X) is connected via an organic linker (as in applicant Y) to a hyaluronic acid moiety (as in Z1 of applicant), and further teaches peptide linkers (para [0083] "Linkers useful in the conjugates of the present invention can also be short peptides. A flexible, semiflexible, rigid peptide linker may be included") as in applicant X2. Since Valitor teaches peptide-linker-hyaluronic acid-based polymer conjugates having many features of the various X1 -X2A -Y)n-Z/(XI-X2-Y-Z1)n conjugates of the applicant, it would have been obvious to an artisan of ordinary skill in the art, using routine experimentation, to produce the peptide-linker-hyaluroinic acid conjugate compositions of the applicant.

As the technical features were known in the art at the time of the invention, they cannot be considered special technical features that would otherwise unify the groups.

Groups I+, II and III+ therefore lack unity under PCT Rule 13 because they do not share the same or corresponding special technical feature.

フロントページの続き

(51)国際特許分類		FI			テーマコード（参考）
Ａ６１Ｐ	*27/02 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	27/02		４Ｈ０４５
Ａ６１Ｐ	*27/06 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	27/06		
Ａ６１Ｐ	*19/02 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	19/02		
Ａ６１Ｐ	*29/00 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	29/00	１０１	
Ａ６１Ｐ	*19/06 (2006.01)*	Ａ６１Ｐ	19/06		
Ａ６１Ｋ	*47/65 (2017.01)*	Ａ６１Ｋ	47/65		
Ａ６１Ｋ	*47/61 (2017.01)*	Ａ６１Ｋ	47/61		
Ａ６１Ｋ	*38/16 (2006.01)*	Ａ６１Ｋ	38/16		
Ａ６１Ｋ	*39/395 (2006.01)*	Ａ６１Ｋ	39/395	Ｈ	
Ｃ０７Ｋ	*14/475 (2006.01)*	Ａ６１Ｋ	39/395	Ａ	
Ｃ１２Ｎ	*15/13 (2006.01)*	Ｃ０７Ｋ	14/475		
		Ｃ１２Ｎ	15/13		

,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,MU,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,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

(72)発明者　ウェスリー エム．ジャクソン
アメリカ合衆国，カリフォルニア ９４７１０，バークリー，ヘインズ アベニュ ８２０，シー／オー バリター，インコーポレイティド
(72)発明者　エイミー エー．トゥワイト
アメリカ合衆国，カリフォルニア ９４７１０，バークリー，ヘインズ アベニュ ８２０，シー／オー バリター，インコーポレイティド
(72)発明者　アダム バーネベイ
アメリカ合衆国，カリフォルニア ９４７１０，バークリー，ヘインズ アベニュ ８２０，シー／オー バリター，インコーポレイティド
(72)発明者　リビア ウィルツ ブライアー
アメリカ合衆国，カリフォルニア ９４７１０，バークリー，ヘインズ アベニュ ８２０，シー／オー バリター，インコーポレイティド
(72)発明者　ジェシー エム．マクファーランド
アメリカ合衆国，カリフォルニア ９４７１０，バークリー，ヘインズ アベニュ ８２０，シー／オー バリター，インコーポレイティド

Ｆターム（参考）　4B064　AG02 AG27 CA02 CA19 CC24 CE02 CE06 CE12 CE14 DA01 DA13
4B065　AA01X AA01Y AB01 AC14 BA01 CA44 CA46
4C076　AA95 CC09 CC10 CC41 EE59
4C084　BA03 BA34 CA59 NA14 ZA331 ZA332 ZA961 ZA962 ZB151 ZB152
4C085　AA13 AA14 BB11 BB36 DD59
4H045　AA10 AA30 BA09 BA51 BA53 BA56 CA40 DA01 DA76 EA20 EA50 FA74 GA10 GA26