(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2025-516703
(P2025-516703A)
(43)公表日　令和7年5月30日(2025.5.30)

(51)国際特許分類		FI		テーマコード（参考）
C07K 16/46 (2006.01)		C07K	16/46	ZNA　4C076
C07K 16/24 (2006.01)		C07K	16/24	4C084
C07K 16/28 (2006.01)		C07K	16/28	4C085
C07K 1/04 (2006.01)		C07K	1/04	4H045
C07K 1/10 (2006.01)		C07K	1/10	

審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全66頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2024-567520(P2024-567520)
(86)(22)出願日　令和5年5月15日(2023.5.15)
(85)翻訳文提出日　令和7年1月10日(2025.1.10)
(86)国際出願番号　PCT/US2023/067028
(87)国際公開番号　WO2023/220761
(87)国際公開日　令和5年11月16日(2023.11.16)
(31)優先権主張番号　63/342,052
(32)優先日　令和4年5月13日(2022.5.13)
(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　508087147
ユニヴァーシティー オブ ユタ リサーチ ファウンデーション
アメリカ合衆国 ユタ州 ８４１０８ ソルト レイク シティー アラピーン ドライヴ ６１５ スイート ３１０
(74)代理人　100103610
弁理士　▲吉▼田 和彦
(74)代理人　100109070
弁理士　須田 洋之
(74)代理人　100119013
弁理士　山崎 一夫
(74)代理人　100111796
弁理士　服部 博信
(74)代理人　100123766
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　ビオチン直交ストレプトアビジン系

(57)【要約】
本開示は、抗体又は抗体断片に共有結合したＤ－ストレプトアビジン又はそのバリアントを含む第１の二重特異性ポリペプチドと、治療剤又は診断剤に共有結合したＬ－ビオチンを含むコンジュゲートと、を含む直交系に関する。本開示の系は、例えば、疾患又は状態（例えば、がん、非ホジキンリンパ腫、多発性硬化症、クローン病、関節リウマチ、喘息、黄斑変性、乾癬、ホジキンリンパ腫、発作性夜間ヘモグロビン尿症、Ｘ連鎖性低リン血症）の治療に有用であり得る。開示される二重特異性ポリペプチドの調製に有用なペプチド及びポリペプチド、並びにそれらを作製する方法もまた記載される。本要約は、特定の技術分野における検索を目的とする走査ツールとして意図されており、本発明を限定することは意図されていない。
【選択図】図１

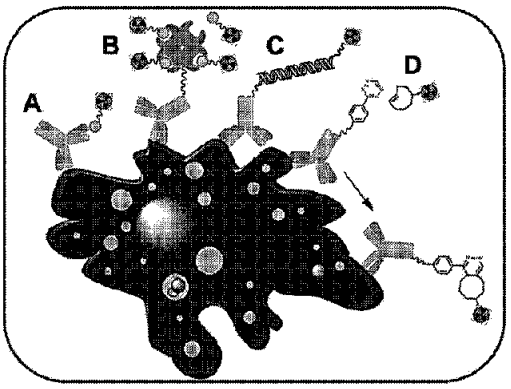


FIG. 1

【特許請求の範囲】
【請求項１】
Ｄ－ストレプトアビジン（Ｄ－ＳＡ）又はそのバリアントに共有結合した抗体又はその抗体断片を含む、二重特異性ポリペプチド。
【請求項２】
前記抗体又はその抗体断片が、抗ＩＬ－１７受容体抗体、抗ＩＬ－５受容体抗体、抗ＰＤ－Ｌ１抗体、抗ＦＧＦ２３抗体、抗上皮成長因子受容体抗体、抗ＧＤ２抗体、抗ＨＥＲ－２受容体抗体、抗ＲＡＮＫＬ抗体、抗Ｃ５抗体、抗ＶＥＧＦ受容体抗体、抗ＶＥＧＦ－Ａ抗体、抗ＶＥＧＦ受容体２抗体、抗ＩｇＥ抗体、抗ＴＮＦ－アルファ抗体、抗ＩＬ－１２／２３抗体、抗ＣＴＬＡ－４抗体、抗ＣＤ３０抗体、抗ＣＤ４抗体、抗ＣＧＲＰ受容体抗体、抗ＣＤ３抗体、抗ＣＤ２０抗体、抗ＣＤ２５抗体、又は抗ＧＰ１１ｂ／１１１ａ抗体である、請求項１に記載の二重特異性ポリペプチド。
【請求項３】
前記抗体又はその抗体断片が、抗ＣＤ３０抗体である、請求項１に記載の二重特異性ポリペプチド。
【請求項４】
前記抗体又はその抗体断片が、細胞表面マーカーに特異的に結合する、請求項１に記載の二重特異性ポリペプチド。
【請求項５】
前記細胞表面マーカーが、ＣＤ３、ＣＤ４、ＣＤ５、ＣＤ２０、ＣＤ２５、又はグリコスフィンゴリピドである、請求項４に記載の二重特異性ポリペプチド。
【請求項６】
前記グリコスフィンゴリピドが、GD_2である、請求項５に記載の二重特異性ポリペプチド。
【請求項７】
前記抗体又はその抗体断片が、一本鎖抗体（ｓｃＦｖ）又はＦ’ａｂ断片である、請求項１に記載の二重特異性ポリペプチド。
【請求項８】
前記ｓｃＦｖが、ブロスマブ、イバリズマブ、エレヌマブ、アテゾリズマブ、レスリズマブ、ペムブロリズマブ、ニボルマブ、ラムシルマブ、イピリムマブ、ブレンツキシマブ、ウステキヌマブ、パニツマウマブ（ｐａｎｉｔｕｍａｕｍａｂ）、ラニビズマブ、ネシツマウマブ（ｎｅｃｉｔｕｍａｕｍａｂ）、ジヌツキシマブ、デノスマブ、エクスリズマブ（ｅｘｕｌｉｚｕｍａｂ）、ベバシズマブ、オマリズマブ、アダリムマブ、アベルマブ、デュルバルマブ、ブロダルマブ、ムロモノアブ（ｍｕｒｏｍｏｎｏａｂ）－ＣＤ３、アブシキシマブ、リツキシマブ、ダクリズマブ、インフリキシマブ、バシリキシマブ、パリビズマブ、トラスツズマブ、ゲムツズマブ、又はそれらの生物学的に活性なバリアントに由来する、請求項７に記載の二重特異性ポリペプチド。
【請求項９】
前記抗体又はその抗体断片が、Ｄ－ＳＡに共有結合している、請求項１に記載の二重特異性ポリペプチド。
【請求項１０】
前記抗体又はその抗体断片が、Ｄ－ＳＡのバリアントに共有結合している、請求項１に記載の二重特異性ポリペプチド。
【請求項１１】
前記Ｄ－ＳＡのバリアントが、Ｄ－トラプトアビジン、Ｄ－ｓｔｒｅｐ－ｔａｃｔｉｎ、Ｄ－ｓｔｒｅｐ－ｔａｃｔｉｎ　ＸＴ、又は一価Ｄ－ＳＡである、請求項１０に記載のポリペプチド。
【請求項１２】
前記Ｄ－ＳＡ又はそのバリアントが、Ｌ－ビオチンに特異的に結合する、請求項１に記載の二重特異性ポリペプチド。

【請求項１３】
標識又は検出タグを更に含む、請求項１～１２のいずれか一項に記載の二重特異性ポリペプチド。
【請求項１４】
前記標識又は検出タグが、蛍光タグ、親和性タグ、同位体タグ、又は放射性タグである、請求項１３に記載の二重特異性ポリペプチド。
【請求項１５】
前記標識又は検出タグが、ソルターゼタグである、請求項１３に記載の二重特異性ポリペプチド。
【請求項１６】
有効量の請求項１～１５のいずれか一項に記載の二重特異性ポリペプチドと、薬学的に許容される担体と、を含む、薬学的組成物。
【請求項１７】
前記薬学的組成物が、静脈内投与のために製剤化されている、請求項１６に記載の薬学的組成物。
【請求項１８】
疾患又は状態の治療を必要とする対象において疾患又は状態を治療する方法であって、前記方法が、
（ａ）前記対象に、有効量の請求項１～１５のいずれか一項に記載の二重特異性ポリペプチドを投与することと、
（ｂ）その後、前記対象に、治療剤に共有結合したＬ－ビオチンを含む、有効量の組成物を投与することと、を含み、
前記Ｄ－ＳＡ又は前記そのバリアントが、Ｌ－ビオチンに特異的に結合する、方法。
【請求項１９】
前記有効量が、治療有効量である、請求項１８に記載の方法。
【請求項２０】
前記有効量が、予防有効量である、請求項１８に記載の方法。
【請求項２１】
前記対象が、哺乳動物である、請求項１８～２０のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２２】
前記対象が、ヒトである、請求項１８～２０のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２３】
前記対象が、投与ステップの前に、前記疾患又は前記状態の治療が必要であると診断されている、請求項１８～２２のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２４】
前記疾患又は前記状態の治療を必要とする対象を特定するステップを更に含む、請求項１８～２３のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２５】
前記疾患が、がん、非ホジキンリンパ腫、多発性硬化症、クローン病、関節リウマチ、喘息、黄斑変性、乾癬、ホジキンリンパ腫、発作性夜間ヘモグロビン尿症、又はＸ連鎖性低リン血症である、請求項１８～２４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２６】
前記疾患が、がんである、請求項１８～２４のいずれか一項に記載の方法。
【請求項２７】
前記がんが、原発がん又は二次がんである、請求項２６に記載の方法。
【請求項２８】
前記原発がん又は二次がんが、肉腫、がん腫、脳腫瘍、乳がん、腎臓がん、膵臓がん、肺がん、肝臓がん、リンパ腫、前立腺がん、結腸がん、卵巣がん、胃腸がん、結腸直腸がん、皮膚がん、甲状腺がん、精巣がん、子宮内膜がん、黒色腫、神経膠腫、白血病、神経芽細胞腫、子宮頚がん、慢性骨髄増殖性疾患、骨髄異形成症候群、血液がん、骨髄増殖性

腫瘍、非小細胞肺がん、胃食道（ｇａｓｔｒｏｅｓｐｈａｇｅａｌ）接合部がん、膀胱がん、メルケル細胞がん、尿路上皮癌がん、又は形質細胞腫瘍（骨髄腫）である、請求項２７に記載の方法。

【請求項２９】

前記がんが、神経芽細胞腫である、請求項２６に記載の方法。

【請求項３０】

前記状態が、血管形成術における血栓の予防、腎移植拒絶、片頭痛の予防、ＨＩＶ感染、又は骨損失である、請求項１８～２４のいずれか一項に記載の方法。

【請求項３１】

前記治療剤が、前記二重特異性ポリペプチドの約１時間～約１６８時間後に投与される、請求項１８～３０のいずれか一項に記載の方法。

【請求項３２】

前記治療剤が、放射性薬剤である、請求項１８～２４のいずれか一項に記載の方法。

【請求項３３】

前記治療剤が、化学療法剤である、請求項１８～２４のいずれか一項に記載の方法。

【請求項３４】

前記化学療法剤が、ドキソルビシン、シスプラチン、５－フルオロウラシン（ｆｌｕｏｒｏｕｒａｃｉｎ）（５－ＦＵ）、エトポシド、ダウノルビシン、カンプトテシン（ｃａｍｐｔｏｔｈｅｓｉｎ）、メトトレキサート、カルボプラチン、又はオキサリプラチンである、請求項３３に記載の方法。

【請求項３５】

前記Ｄ－ＳＡ又は前記そのバリアントが、Ｌ－ビオチンに特異的に結合する、請求項１８～３４のいずれか一項に記載の方法。

【請求項３６】

キットであって、請求項１～１５のいずれか一項に記載の二重特異性ポリペプチドと、

（ａ）治療剤、

（ｂ）Ｌ－ビオチン、

（ｃ）疾患又は状態の治療に関連して、前記二重特異性ポリペプチドを投与するための説明書、及び

（ｄ）前記疾患又は前記状態を治療するための説明書から選択される１つ以上と、を含む、キット。

【請求項３７】

前記治療剤が、化学療法剤である、請求項３６に記載のキット。

【請求項３８】

前記化学療法剤が、アルキル化剤、代謝拮抗剤、抗腫瘍性抗生物質剤、有糸分裂阻害剤、及びｍＴｏｒ阻害剤から選択される、請求項３７に記載のキット。

【請求項３９】

前記抗腫瘍性抗生物質剤が、ドキソルビシン、ミトキサントロン、ブレオマイシン、ダウノルビシン、ダクチノマイシン、エピルビシン、イダルビシン、プリカマイシン、マイトマイシン、ペントスタチン、及びバルルビシン、又はそれらの薬学的に許容される塩から選択される、請求項３８に記載のキット。

【請求項４０】

前記代謝拮抗剤が、ゲムシタビン、５－フルオロウラシル、カペシタビン、ヒドロキシ尿素、メルカプトプリン、ペメトレキセド、フルダラビン、ネララビン、クラドリビン、クロファラビン、シタラビン、デシタビン、プララトレキサート、フロクスウリジン、メトトレキサート、及びチオグアニン、又はそれらの薬学的に許容される塩から選択される、請求項３８に記載のキット。

【請求項４１】

前記アルキル化剤が、カルボプラチン、シスプラチン、シクロホスファミド、クロラムブシル、メルファラン、カルムスチン、ブスルファン、ロムスチン、ダカルバジン、オキ

サリプラチン、イホスファミド、メクロレタミン、テモゾロミド、チオテパ、ベンダムスチン、及びストレプトゾシン、又はそれらの薬学的に許容される塩から選択される、請求項３８に記載のキット。
【請求項４２】
前記有糸分裂阻害剤が、イリノテカン、トポテカン、ルビテカン、カバジタキセル、ドセタキセル、パクリタキセル、エトプシド（ｅｔｏｐｓｉｄｅ）、ビンクリスチン、イキサベピロン、ビノレルビン、ビンブラスチン、及びテニポシド、又はそれらの薬学的に許容される塩から選択される、請求項３８に記載のキット。
【請求項４３】
前記ｍＴｏｒ阻害剤が、エベロリムス、シロリウムス（ｓｉｒｏｌｉｕｍｕｓ）、及びテムシロリムス、又はそれらの薬学的に許容される塩から選択される、請求項３８に記載のキット。
【請求項４４】
前記治療剤が、Ｌ－ビオチンに共有結合している、請求項３６～４３のいずれか一項に記載のキット。
【請求項４５】
前記二重特異性ポリペプチド及び前記治療剤が、共包装される、請求項３６～４４のいずれか一項に記載のキット。
【請求項４６】
前記二重特異性ポリペプチド及び前記治療剤が、共製剤化されている、請求項３６～４４のいずれか一項に記載のキット。
【請求項４７】
前記疾患が、がんである、請求項３６～４６のいずれか一項に記載のキット。
【請求項４８】
治療剤又は診断剤に共有結合したＬ－ビオチンを含む、コンジュゲート。
【請求項４９】
前記治療剤が、化学療法剤である、請求項４８に記載のコンジュゲート。
【請求項５０】
前記化学療法剤が、ドキソルビシン、シスプラチン、５－フルオロウラシン（ｆｌｕｏｒｏｕｒａｃｉｎ）（５－ＦＵ）、エトポシド、ダウノルビシン、カンプトテシン（ｃａｍｐｔｏｔｈｅｓｉｎ）、メトトレキサート、カルボプラチン、又はオキサリプラチンである、請求項４９に記載のコンジュゲート。
【請求項５１】
前記診断剤が、がん診断剤である、請求項４８に記載のコンジュゲート。
【請求項５２】
抗体又は抗体断片が、一本鎖抗体（ｓｃＦｖ）又はＦ’ａｂ断片である、請求項４８～５１のいずれか一項に記載のコンジュゲート。
【請求項５３】
前記ｓｃＦｖが、ブロスマブ、イバリズマブ、エレヌマブ、アテゾリズマブ、レスリズマブ、ペムブロリズマブ、ニボルマブ、ラムシルマブ、イピリムマブ、ブレンツキシマブ、ウステキヌマブ、パニツマウマブ（ｐａｎｉｔｕｍａｕｍａｂ）、ラニビズマブ、ネシツマウマブ（ｎｅｃｉｔｕｍａｕｍａｂ）、ジヌツキシマブ、デノスマブ、エクスリズマブ（ｅｘｕｌｉｚｕｍａｂ）、ベバシズマブ、オマリズマブ、アダリムマブ、アベルマブ、デュルバルマブ、ブロダルマブ、ムロモノアブ（ｍｕｒｏｍｏｎｏａｂ）－ＣＤ３、アブシキシマブ、リツキシマブ、ダクリズマブ、インフリキシマブ、バシリキシマブ、パリビズマブ、トラスツズマブ、ゲムツズマブ、又はそれらの生物学的に活性なバリアントに由来する、請求項５２に記載のコンジュゲート。
【請求項５４】
アミノ酸配列ＡＥＡＧＩＴＧＴＷＹＮＱＬＧＳＴＦＩＶＴＡＧＡＤＧＡＬＴＧＴＹＥＳＡＶＧＮＡＥＳＲＹＶＬＴＧＲＹＤＳＡＰＡＴＤＧＳＧＴＡＬＧＷＴＶＡＷＫＮＮＹＲＮ

ＡＨＳＡＴＴＷＳＧＱＹＶＧＧＡＥＡＲＩＮＴＱＷＬＬＴＳＧＴＴＥＡＮＡＷＫＳＴＬＶＧＨＤＴＦＴＫＶＫＰＳＡＡＳ（配列番号８）に対して９０％～９９％の同一性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチドであって、前記アミノ酸配列における各アミノ酸が、Ｄ－アミノ酸である、ポリペプチド。

【請求項５５】

ペプチドが、Ｄ－トラプトアビジン、Ｄ－ｓｔｒｅｐ－ｔａｃｔｉｎ、Ｄ－ｓｔｒｅｐ－ｔａｃｔｉｎ　ＸＴ、又は一価Ｄ－ＳＡである、請求項５４に記載のポリペプチド。

【請求項５６】

一本鎖抗体（ｓｃＦｖ）又はＦ’ａｂ断片と、請求項５４又は５５に記載のペプチドと、を含む、二重特異性ポリペプチド。

【請求項５７】

前記ｓｃＦｖが、抗ＣＤ３０抗体である、請求項５６に記載のポリペプチド。

【請求項５８】

Ｌ－ＳＡ、Ｄ－ＳＡ、又はそれらのバリアントを作製する方法であって、前記方法：

（ａ）アミノ酸配列ＡＥＡＧＩＴＧＴＷＹＮＱＬＧＳＴＦＩＶＴＡＧＡＤＧＡＬＴＧＴＹＥＳ－N_2H_4（配列番号２）に対して少なくとも９０％の同一性を有するアミノ酸配列を有する第１のペプチドを提供することであって、前記アミノ酸配列における各アミノ酸が、Ｄ－アミノ酸であるか、又は前記アミノ酸配列における各アミノ酸が、Ｌ－アミノ酸である、提供すること、

（ｂ）アミノ酸配列ＡＶＧＮＡＥＳＲＹＶＬＴＧＲＹＤＳＡＰＡＴＤＧＳＧＴＡＬＧＷＴＶＡＷＫＮＮＹＲＮＡＨＳ－N_2H_4（配列番号４）に対して少なくとも９０％の同一性を有するアミノ酸配列を有する第２のペプチドを提供することであって、前記アミノ酸配列における各アミノ酸が、Ｄ－アミノ酸であるか、又は前記アミノ酸配列における各アミノ酸が、Ｌ－アミノ酸である、提供すること、

（ｃ）アミノ酸配列ＡＴＴＷＳＧＱＹＶＧＧＡＥＡＲＩＮＴＱＷＬＬＴＳＧＴＴＥＡＮＡＷＫＳＴＬＶＧＨＤＴＦＴＫＶＫＰＳＡＡＳ（配列番号５）に対して少なくとも９０％の同一性を有するアミノ酸配列を有する第３のペプチドを提供することであって、前記アミノ酸配列における各アミノ酸が、Ｄ－アミノ酸であるか、又は前記アミノ酸配列における各アミノ酸が、Ｌ－アミノ酸である、提供すること、並びに

（ｄ）前記第１、第２、及び第３のペプチドをライゲーションすること、の方法。

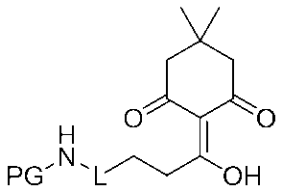
【請求項５９】

前記方法が、ライゲーションステップの前に、リンカーを前記第１のペプチドにカップリングすることを更に含む、請求項５８に記載の方法。

【請求項６０】

前記リンカーが、以下の式によって表される構造を有し、

【化１】



式中、Ｌが、リンカーであり、

ＰＧが、アミン保護基である、請求項５９に記載の方法。

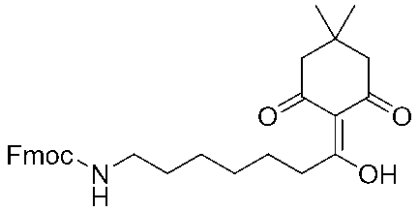
【請求項６１】

前記リンカーが、Ｃ１－Ｃ１２アルキル及び－（CH_2CH_2O）$_n$－から選択され、ｎが、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、及び１２から選択される、請求項６０に記載の方法。

【請求項６２】

前記リンカーが、Ｃ１－Ｃ１２アルキルである、請求項６０に記載の方法。

【請求項６３】
前記リンカーが、Ｃ４アルキルである、請求項６０に記載の方法。
【請求項６４】
前記リンカーが、－（CH_2CH_2O）$_n$－である、請求項６０に記載の方法。
【請求項６５】
ｎが、２である、請求項６４に記載の方法。
【請求項６６】
前記アミン保護基が、９－フルオロエニルメチル（ｆｌｕｏｒｏｅｎｙｌｍｅｔｈｙｌ）カルバメート（Ｆｍｏｃ）、ｔｅｒｔ－ブチルカルバメート（Ｂｏｃ）、ベンジルカルバメート（Ｃｂｚ）、アセトアミド（Ａｃ）、トリフルオロアセトアミド、及びフタルイミドから選択される、請求項６０～６５のいずれか一項に記載の方法。
【請求項６７】
前記アミン保護基が、Ｆｍｏｃである、請求項６６に記載の方法。
【請求項６８】
前記リンカーが、以下の構造：
【化２】



を有する、請求項６０に記載の方法。
【請求項６９】
前記方法が、前記ライゲーションステップの前に、前記リンカーを脱保護することを更に含む、請求項５９～６８のいずれか一項に記載の方法。
【請求項７０】
前記ライゲーションステップの前に、正に荷電したアミノ酸残基で前記リンカーを官能化し、それによって可溶化残基を形成することを更に含む、請求項６９に記載の方法。
【請求項７１】
前記正に荷電したアミノ酸残基が、リジンである、請求項７０に記載の方法。
【請求項７２】
遊離アミンが、２つ以上の正に荷電したアミノ酸残基で官能化される、請求項７０に記載の方法。
【請求項７３】
各正に荷電したアミノ酸残基が、リジンである、請求項７２に記載の方法。
【請求項７４】
前記遊離アミンが、６つのリジン残基で官能化される、請求項７０に記載の方法。
【請求項７５】
前記第１のペプチドが、前記第３のペプチドにライゲーションされる前に、前記第２のペプチドにライゲーションされる、請求項７０に記載の方法。
【請求項７６】
前記可溶化残基を切断することを更に含む、請求項７５に記載の方法。
【請求項７７】
ライゲーションが、トランスチオエステル化を介して行われる、請求項５８～７６のいずれか一項に記載の方法。
【請求項７８】
前記方法が、Ｌ－ＳＡ又はそのバリアントを作製する、請求項５８～７７のいずれか一項に記載の方法。

【請求項７９】
前記方法が、Ｄ－ＳＡ又はそのバリアントを作製する、請求項５８～７７のいずれか一項に記載の方法。
【請求項８０】
Ｌ－ＳＡ、Ｄ－ＳＡ、又はそれらのバリアントを作製する方法であって、前記方法が、
（ａ）アミノ酸配列ＡＥＡＧＩＴＧＴＷＹＮＱＬＧＳＴＦＩＶＴＡＧＡＤＧＡＬＴＧＴＹＥＳ－N_2H_4（配列番号２）に対して少なくとも９０％の同一性を有するアミノ酸配列を有する第１のペプチド及びリンカーをカップリングすることであって、前記アミノ酸配列における各アミノ酸が、Ｄ－アミノ酸であるか、又は前記アミノ酸配列における各アミノ酸が、Ｌ－アミノ酸である、カップリングすることと、
（ｂ）前記リンカーを正に荷電したアミノ酸残基で官能化し、それによって可溶化残基を提供することと、
（ｃ）前記第１のペプチドを、アミノ酸配列ＡＶＧＮＡＥＳＲＹＶＬＴＧＲＹＤＳＡＰＡＴＤＧＳＧＴＡＬＧＷＴＶＡＷＫＮＮＹＲＮＡＨＳ－N_2H_4（配列番号４）に対して少なくとも９０％の同一性を有するアミノ酸配列を有する第２のペプチドにライゲーションすることであって、前記アミノ酸配列における各アミノ酸が、Ｄ－アミノ酸であるか、又は前記アミノ酸配列における各アミノ酸が、Ｌ－アミノ酸である、ライゲーションすることと、
（ｄ）前記第２のペプチドを、アミノ酸配列ＡＴＴＷＳＧＱＹＶＧＧＡＥＡＲＩＮＴＱＷＬＬＴＳＧＴＴＥＡＮＡＷＫＳＴＬＶＧＨＤＴＦＴＫＶＫＰＳＡＡＳ（配列番号５）に対して少なくとも９０％の同一性を有するアミノ酸配列を有する第３のペプチドにライゲーションすることであって、前記アミノ酸配列における各アミノ酸が、Ｄ－アミノ酸であるか、又は前記アミノ酸配列における各アミノ酸が、Ｌ－アミノ酸である、ライゲーションすることと、
（ｅ）前記可溶化残基をポリペプチドから切断することと、を含む、方法。
【請求項８１】
タンパク質が、Ｌ－ＳＡ又はそのバリアントである、請求項８０に記載の方法。
【請求項８２】
前記タンパク質が、Ｄ－ＳＡ又はそのバリアントである、請求項８０に記載の方法。
【請求項８３】
アミノ酸配列ＫＫＫＫＫＫX_{HH}ＡＥＡＧＩＴＧＴＷＹＮＱＬＧＳＴＦＩＶＴＡＧＡＤＧＡＬＴＧＴＹＥＳ　ＡＶＧＮＡＥＳＲＹＶＬＴＧＲＹＤＳＡＰＡＴＤＧＳＧＴＡＬＧＷＴＶＡＷＫＮＮＹＲＮＡＨＳ　ＡＴＴＷＳＧＱＹＶＧＧＡＥＡＲＩＮＴＱＷＬＬＴＳＧＴＴＥＡＮＡＷＫＳＴＬＶＧＨＤＴＦＴＫＶＫＰＳＡＡＳ（配列番号１０）に対して少なくとも９０％の同一性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチドを作製する方法であって、前記アミノ酸配列における各アミノ酸が、Ｄ－アミノ酸であるか、又は前記アミノ酸配列における各アミノ酸が、Ｌ－アミノ酸であり、前記方法が、
（ａ）アミノ酸配列ＫＫＫＫＫＫX_{HH}ＡＥＡＧＩＴＧＴＷＹＮＱＬＧＳＴＦＩＶＴＡＧＡＤＧＡＬＴＧＴＹＥＳ　ＡＶＧＮＡＥＳＲＹＶＬＴＧＲＹＤＳＡＰＡＴＤＧＳＧＴＡＬＧＷＴＶＡＷＫＮＮＹＲＮＡＨＳ－N_2H_4（配列番号９）に対して少なくとも９０％の同一性を有するアミノ酸配列を有する第１のポリペプチドを提供することであって、前記アミノ酸配列における各アミノ酸が、Ｄ－アミノ酸であるか、又は前記アミノ酸配列における各アミノ酸が、Ｌ－アミノ酸である、提供することと、
（ｂ）アミノ酸配列ＡＴＴＷＳＧＱＹＶＧＧＡＥＡＲＩＮＴＱＷＬＬＴＳＧＴＴＥＡＮＡＷＫＳＴＬＶＧＨＤＴＦＴＫＶＫＰＳＡＡＳ（配列番号５）に対して少なくとも９０％の同一性を有するアミノ酸配列を有する第３のペプチドを提供することであって、前記アミノ酸配列における各アミノ酸が、Ｄ－アミノ酸であるか、又は前記アミノ酸配列における各アミノ酸が、Ｌ－アミノ酸である、提供することと、
（ｃ）前記第１のポリペプチドを前記第３のペプチドにライゲーションすることと、を含む、方法。

【請求項８４】
Ｌ－ＳＡ、Ｄ－ＳＡ、又はそれらのバリアントを作製する方法であって、前記方法が、
（ａ）アミノ酸配列ＫＫＫＫＫＫＸ$_{HH}$ＡＥＡＧＩＴＧＴＷＹＮＱＬＧＳＴＦＩＶＴＡＧＡＤＧＡＬＴＧＴＹＥＳ　ＡＶＧＮＡＥＳＲＹＶＬＴＧＲＹＤＳＡＰＡＴＤＧＳＧＴＡＬＧＷＴＶＡＷＫＮＮＹＲＮＡＨＳ　ＡＴＴＷＳＧＱＹＶＧＧＡＥＡＲＩＮＴＱＷＬＬＴＳＧＴＴＥＡＮＡＷＫＳＴＬＶＧＨＤＴＦＴＫＶＫＰＳＡＡＳ（配列番号１０）に対して少なくとも９０％の同一性を有するアミノ酸配列を有するポリペプチドを提供することであって、前記アミノ酸配列における各アミノ酸が、Ｄ－アミノ酸であるか、又は前記アミノ酸配列における各アミノ酸が、Ｌ－アミノ酸であり、ＫＫＫＫＫＫ及びＸ$_{HH}$が、ともに可溶化残基を含む、提供することと、
（ｂ）前記可溶化残基を前記ポリペプチドから切断することと、を含む、方法。
【請求項８５】
アミノ酸配列ＡＥＡＧＩＴＧＴＷＹＮＱＬＧＳＴＦＩＶＴＡＧＡＤＧＡＬＴＧＴＹＥＳ（配列番号１）に対して少なくとも９０％の同一性のアミノ酸配列を含むペプチドであって、前記アミノ酸配列における各アミノ酸が、Ｄ－アミノ酸であるか、又は前記アミノ酸配列における各アミノ酸が、Ｌ－アミノ酸である、ペプチド。
【請求項８６】
アミノ酸配列ＡＶＧＮＡＥＳＲＹＶＬＴＧＲＹＤＳＡＰＡＴＤＧＳＧＴＡＬＧＷＴＶＡＷＫＮＮＹＲＮＡＨＳ（配列番号３）に対して少なくとも９０％の同一性のアミノ酸配列を含むペプチドであって、前記アミノ酸配列における各アミノ酸が、Ｄ－アミノ酸であるか、又は前記アミノ酸配列における各アミノ酸が、Ｌ－アミノ酸である、ペプチド。
【請求項８７】
アミノ酸配列ＡＴＴＷＳＧＱＹＶＧＧＡＥＡＲＩＮＴＱＷＬＬＴＳＧＴＴＥＡＮＡＷＫＳＴＬＶＧＨＤＴＦＴＫＶＫＰＳＡＡＳ（配列番号５）に対して少なくとも９０％の同一性のアミノ酸配列を含むペプチドであって、前記アミノ酸配列における各アミノ酸が、Ｄ－アミノ酸であるか、又は前記アミノ酸配列における各アミノ酸が、Ｌ－アミノ酸である、ペプチド。
【請求項８８】
アミノ酸配列Ｘ$_{HH}$ＡＥＡＧＩＴＧＴＷＹＮＱＬＧＳＴＦＩＶＴＡＧＡＤＧＡＬＴＧＴＹＥＳ－Ｎ$_2$Ｈ$_4$（配列番号６）に対して少なくとも９０％の同一性のアミノ酸配列を含むペプチドであって、前記アミノ酸配列における各アミノ酸が、Ｄ－アミノ酸であるか、又は前記アミノ酸配列における各アミノ酸が、Ｌ－アミノ酸であり、Ｘ$_{HH}$が、リンカーである、ペプチド。
【請求項８９】
アミノ酸配列ＫＫＫＫＫＫＸ$_{HH}$ＡＥＡＧＩＴＧＴＷＹＮＱＬＧＳＴＦＩＶＴＡＧＡＤＧＡＬＴＧＴＹＥＳ－Ｎ$_2$Ｈ$_4$（配列番号７）に対して少なくとも９０％の同一性のアミノ酸配列を含むペプチドであって、前記アミノ酸配列における各アミノ酸が、Ｄ－アミノ酸であるか、又は前記アミノ酸配列における各アミノ酸が、Ｌ－アミノ酸であり、ＫＫＫＫＫＫ及びＸ$_{HH}$が、ともに可溶化残基を含む、ペプチド。
【請求項９０】
アミノ酸配列ＫＫＫＫＫＫＸ$_{HH}$ＡＥＡＧＩＴＧＴＷＹＮＱＬＧＳＴＦＩＶＴＡＧＡＤＧＡＬＴＧＴＹＥＳ　ＡＶＧＮＡＥＳＲＹＶＬＴＧＲＹＤＳＡＰＡＴＤＧＳＧＴＡＬＧＷＴＶＡＷＫＮＮＹＲＮＡＨＳ－Ｎ$_2$Ｈ$_4$（配列番号９）に対して少なくとも９０％の同一性のアミノ酸配列を含むポリペプチドであって、前記アミノ酸配列における各アミノ酸が、Ｄ－アミノ酸であるか、又は前記アミノ酸配列における各アミノ酸が、Ｌ－アミノ酸であり、ＫＫＫＫＫＫ及びＸ$_{HH}$が、ともに可溶化残基を含む、ポリペプチド。
【請求項９１】
アミノ酸配列ＫＫＫＫＫＫＸ$_{HH}$ＡＥＡＧＩＴＧＴＷＹＮＱＬＧＳＴＦＩＶＴＡＧＡＤＧＡＬＴＧＴＹＥＳ　ＡＶＧＮＡＥＳＲＹＶＬＴＧＲＹＤＳＡＰＡＴＤＧＳＧＴＡＬＧＷＴＶＡＷＫＮＮＹＲＮＡＨＳ　ＡＴＴＷＳＧＱＹＶＧＧＡＥＡＲＩＮＴＱＷＬＬＴＳＧＴ

ＴＥＡＮＡＷＫＳＴＬＶＧＨＤＴＦＴＫＶＫＰＳＡＡＳ（配列番号１０）に対して少なくとも９０％の同一性のアミノ酸配列を含むポリペプチドであって、前記アミノ酸配列における各アミノ酸が、Ｄ－アミノ酸であるか、又は前記アミノ酸配列における各アミノ酸が、Ｌ－アミノ酸であり、ＫＫＫＫＫＫ及びX_{HH}が、ともに可溶化残基を含む、ポリペプチド。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【０００１】

連邦政府支援の研究に関する声明

本発明は、Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅｓ ｏｆ Ｈｅａｌｔｈが授与したＵ５４ ＡＩ１７０８５６に基づく政府の支援を受けて行われた。政府は、本発明において特定の権利を有する。

【０００２】

関連出願の相互参照

本出願は、２０２２年５月１３日に出願された米国出願第６３／３４２，０５２号の利益を主張し、その内容は、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる。

【０００３】

配列表の参照

２０２３年５月３日に作成され、２０，４８０バイトのサイズを有する「２１１０１．０４３８Ｐ１＿Ｕｐｄａｔｅｄ．ｘｍｌ」という名称のｘｍｌファイルとして２０２３年５月１２日に提出された配列表は、３７Ｃ．Ｆ．Ｒ．§１．５２（ｅ）（５）に従って参照により本明細書に組み込まれる。

【背景技術】

【０００４】

ストレプトアビジン（ＳＡ）は、ビオチンを隔離することによって競合細菌の増殖を妨げるためにＳｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ ａｖｉｄｉｎｉｉ（Ｓ．ａｖｉｄｉｎｉｉ）において進化した[24、25]。ＳＡは、ビオチンとの水素結合及び他の非共有結合相互作用の複雑なネットワークを形成し[26、27]、フェムトモル範囲のK_D（４．８×１０$^{-14}$Ｍ）で自然界で最も強力な既知の小分子－タンパク質非共有結合相互作用を形成する[1]。この並外れた結合親和性は、イムノアッセイ[2]、親和性クロマトグラフィー[28]、近接標識[4、5]、及びファージディスプレイ[29]を含む、生物医学研究におけるＳＡの複数の応用をもたらしている。加えて、ＳＡ／ビオチンに基づく診断試験[6]が広く使用されている（例えば、心臓疾患及び甲状腺疾患のために）。

【０００５】

ＳＡ／ビオチンは、様々なバイオテクノロジー用途で大きな成功を収めているが、特に治療環境では、いくつかの課題がその有用性を制限している。例えば、ビオチンの補充は、ＳＡ及びビオチンを使用する診断において干渉をもたらす可能性がある[30～33]。同様に、近接標識は、ＩＤ結合パートナーに近接して分子をタグ付けするために非特異的ビオチンリガーゼを用いる強力な最近の技術である[4、5]。しかしながら、内因性ビオチンリガーゼによるビオチン化が、低存在量標的の特定を制限するバックグラウンドノイズをもたらす[4]。治療用途にとって最も重要なのは、ストレプトアビジンは、免疫原性の高い外来タンパク質である[3、20、34～36]。

【０００６】

前標的化（ｐｒｅｔａｒｇｅｔｅｄ）免疫療法（ＰＴＩ）にＳＡを使用することに大きな関心が寄せられている[7～19]。ＰＴＩの概念は、腫瘍特異的抗原を標的とする抗体に放射性ペイロードが結合している標的化免疫療法（ＴＩ）[19]から進化した。抗体コンジュゲートは、腫瘍細胞に結合し、放射線照射を細胞に集中させるが、非結合の抗体は、健康な組織に放射線照射し、損傷させながら[9、14]、数日間循環内に留まる[9、10、20、35]ことができる。この問題を克服するために、ＰＴＩ方法は、高親和性結合パートナーを抗体及び薬物にコンジュゲートすることを含む。抗体は、薬物の前に投与され、これにより、

健康な組織を放射線照射することなく腫瘍細胞に結合することが可能になる。非結合の抗体が循環から除去された後、薬物が注射される。薬物は、結合パートナーと会合して、腫瘍部位に濃縮する。薬物は小分子であるため、過剰分は循環から迅速に除去され、健康な組織に危害を加えない。

【０００７】

ＰＴＩには、４つの方法でアプローチされている。（１）二重特異性抗体を用い[34、36、37]、抗体の一方のアームが腫瘍細胞に結合し、他方のアームが薬物に結合する、（２）ＳＡ及びビオチンを用い（ＳＡ　ＰＴＩ）[34、36、37]、ストレプトアビジンが抗体にコンジュゲートされ、薬物がビオチン化されている、（３）一方の鎖が抗体に結合し、相補鎖が薬物に結合している、オリゴヌクレオチドを用いる[36、37]、並びに（４）逆電子要求ディールス－アルダー化学（ＩＥＤＤＡＣ）[35]などの高速クリック反応を用いる[20、34、36、37]。他の方法と直接比較すると、ＳＡ　ＰＴＩが最も効果が低かった。ＳＡは免疫原性であり、抗体は、それを循環から迅速に除去する[3、20、34～36]。二重特異性抗体は、より高い治療有効性及びより低い免疫原性を有する[3]。ＩＥＣＣＡＣは、速い動力学（３×１０^{4}Ｍ$^{-1}$ｓ$^{-1}$）[35]及び共有結合を形成する利点を有する。しかしながら、これらの方法の各々は、深刻な欠点を有する。二重特異性抗体は、産生するのが困難であり[3、35、36]、それらが結合する薬物に対して親和性が弱い[36]。オリゴヌクレオチド[35]及びＩＥＤＤＡＣ方法は、インビボ安定性が低い[35]。

【０００８】

ＳＡ－ビオチン結合は、ＩＥＣＣＡＣより最大１０００倍速い[35、38]。加えて、ＩＥＣＣＡＣは、共有結合を形成するが、ＳＡの高い親和性及び低いオフ速度により、ほぼ不可逆的な相互作用となる[1、39]。要約すると、ＳＡ　ＰＴＩは大きな可能性を秘めているが、その有効性は内因性ビオチン干渉[3、16、20、34、36]及び極端な免疫原性[3、20、34～36]によって減少する。

【０００９】

Ｄ－タンパク質は、ＳＡ　ＰＴＩの問題に対する見事な解決策を提供する。Ｄ－タンパク質は、その天然に存在するＬ－カウンターパートの鏡像又はエナンチオマーを表す。鏡像対称性の法則によれば、その鏡像リガンドとのＤ－タンパク質相互作用は、その天然に存在するＬ－カウンターパートと同じ結合親和性を有しなければならない。加えて、免疫系へのＭＨＣ提示[22]のためにＤタンパク質をタンパク質分解することができず[21]、循環中の半減期を顕著に増加する。したがって、Ｌ－ビオチン及びＤ－ＳＡに基づく系は、ＰＴＩ分野を劇的に前進させる可能性を有する。残念ながら、規模を変更可能で再現可能なＤ－ＳＡにアクセスするための合成方法は、依然として捉えどころのないままである。したがって、Ｄ－ＳＡ及びそのバリアントの合成方法、これらのＤ－タンパク質を含むコンジュゲート、及びとりわけＰＴＩにおけるコンジュゲートの使用方法の必要性が依然として存在する。これらのニーズ及び他のニーズは、以下の開示により満たされる。

【発明の概要】

【００１０】

本明細書で具体化され、広範に説明されている本発明の目的（複数可）によれば、本発明は、一態様では、抗体又は抗体断片に共有結合したＤ－ＳＡ又はそのバリアントを含む第１の二重特異性ポリペプチドと、治療剤又は診断剤に共有結合したＬ－ビオチンを含むコンジュゲートと、を含む直交系に関する。本開示の系は、例えば、疾患又は状態（例えば、がん、非ホジキンリンパ腫、多発性硬化症、クローン病、関節リウマチ、喘息、黄斑変性、乾癬、ホジキンリンパ腫、発作性夜間ヘモグロビン尿症、Ｘ連鎖性低リン血症）の治療に有用であり得る。開示される二重特異性ポリペプチドの調製に有用なペプチド及びポリペプチド、並びにそれらを作製する方法もまた記載される。

【００１１】

したがって、一態様では、アミノ酸配列ＡＥＡＧＩＴＧＴＷＹＮＱＬＧＳＴＦＩＶＴＡＧＡＤＧＡＬＴＧＴＹＥＳ（配列番号１）に対して少なくとも９０％の同一性のアミノ酸配列を含むペプチドであって、アミノ酸配列における各アミノ酸が、Ｄ－アミノ酸である

か、又はアミノ酸配列における各アミノ酸が、Ｌ－アミノ酸である、ペプチドが、開示される。

【００１２】

一態様では、アミノ酸配列ＡＶＧＮＡＥＳＲＹＶＬＴＧＲＹＤＳＡＰＡＴＤＧＳＧＴＡＬＧＷＴＶＡＷＫＮＮＹＲＮＡＨＳ（配列番号３）に対して少なくとも９０％の同一性のアミノ酸配列を含むペプチドであって、アミノ酸配列における各アミノ酸が、Ｄ－アミノ酸であるか、又はアミノ酸配列における各アミノ酸が、Ｌ－アミノ酸である、ペプチドが、開示される。

【００１３】

一態様では、アミノ酸配列ＡＴＴＷＳＧＱＹＶＧＧＡＥＡＲＩＮＴＱＷＬＬＴＳＧＴＴＥＡＮＡＷＫＳＴＬＶＧＨＤＴＦＴＫＶＫＰＳＡＡＳ（配列番号５）に対して少なくとも９０％の同一性のアミノ酸配列を含むペプチドであって、アミノ酸配列における各アミノ酸が、Ｄ－アミノ酸であるか、又はアミノ酸配列における各アミノ酸が、Ｌ－アミノ酸である、ペプチドが、開示される。

【００１４】

一態様では、アミノ酸配列X_{HH}ＡＥＡＧＩＴＧＴＷＹＮＱＬＧＳＴＦＩＶＴＡＧＡＤＧＡＬＴＧＴＹＥＳ－N_2H_4（配列番号６）に対して少なくとも９０％の同一性のアミノ酸配列を含むペプチドであって、アミノ酸配列における各アミノ酸が、Ｄ－アミノ酸であるか、又はアミノ酸配列における各アミノ酸が、Ｌ－アミノ酸であり、X_{HH}が、リンカーである、ペプチドが、開示される。

【００１５】

一態様では、アミノ酸配列ＫＫＫＫＫＫX_{HH}ＡＥＡＧＩＴＧＴＷＹＮＱＬＧＳＴＦＩＶＴＡＧＡＤＧＡＬＴＧＴＹＥＳ－N_2H_4（配列番号７）に対して少なくとも９０％の同一性のアミノ酸配列を含むペプチドであって、アミノ酸配列における各アミノ酸が、Ｄ－アミノ酸であるか、又はアミノ酸配列における各アミノ酸が、Ｌ－アミノ酸であり、ＫＫＫＫＫＫ及びX_{HH}が、ともに可溶化残基を含む、ペプチドが、開示される。

【００１６】

一態様では、アミノ酸配列ＡＥＡＧＩＴＧＴＷＹＮＱＬＧＳＴＦＩＶＴＡＧＡＤＧＡＬＴＧＴＹＥＳ　ＡＶＧＮＡＥＳＲＹＶＬＴＧＲＹＤＳＡＰＡＴＤＧＳＧＴＡＬＧＷＴＶＡＷＫＮＮＹＲＮＡＨＳ　ＡＴＴＷＳＧＱＹＶＧＧＡＥＡＲＩＮＴＱＷＬＬＴＳＧＴＴＥＡＮＡＷＫＳＴＬＶＧＨＤＴＦＴＫＶＫＰＳＡＡＳ（配列番号８）に対して９０％～９９％の同一性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチドであって、アミノ酸配列における各アミノ酸が、Ｄ－アミノ酸である、ポリペプチドが、開示される。

【００１７】

一態様では、アミノ酸配列ＫＫＫＫＫＫX_{HH}ＡＥＡＧＩＴＧＴＷＹＮＱＬＧＳＴＦＩＶＴＡＧＡＤＧＡＬＴＧＴＹＥＳ　ＡＶＧＮＡＥＳＲＹＶＬＴＧＲＹＤＳＡＰＡＴＤＧＳＧＴＡＬＧＷＴＶＡＷＫＮＮＹＲＮＡＨＳ－N_2H_4（配列番号９）に対して少なくとも９０％の同一性のアミノ酸配列を含むポリペプチドであって、アミノ酸配列における各アミノ酸が、Ｄ－アミノ酸であるか、又はアミノ酸配列における各アミノ酸が、Ｌ－アミノ酸であり、ＫＫＫＫＫＫ及びX_{HH}が、ともに可溶化残基を含む、ポリペプチドが、開示される。

【００１８】

一態様では、アミノ酸配列ＫＫＫＫＫＫX_{HH}ＡＥＡＧＩＴＧＴＷＹＮＱＬＧＳＴＦＩＶＴＡＧＡＤＧＡＬＴＧＴＹＥＳ　ＡＶＧＮＡＥＳＲＹＶＬＴＧＲＹＤＳＡＰＡＴＤＧＳＧＴＡＬＧＷＴＶＡＷＫＮＮＹＲＮＡＨＳ　ＡＴＴＷＳＧＱＹＶＧＧＡＥＡＲＩＮＴＱＷＬＬＴＳＧＴＴＥＡＮＡＷＫＳＴＬＶＧＨＤＴＦＴＫＶＫＰＳＡＡＳ（配列番号１０）に対して少なくとも９０％の同一性のアミノ酸配列を含むポリペプチドであって、アミノ酸配列における各アミノ酸が、Ｄ－アミノ酸であるか、又はアミノ酸配列における各アミノ酸が、Ｌ－アミノ酸であり、ＫＫＫＫＫＫ及びX_{HH}が、ともに可溶化残基を含む、ポリペプチドが、開示される。

【００１９】
一態様では、Ｌ－ＳＡ、Ｄ－ＳＡ、又はそれらのバリアントを作製する方法であって、方法：（ａ）アミノ酸配列ＡＥＡＧＩＴＧＴＷＹＮＱＬＧＳＴＦＩＶＴＡＧＡＤＧＡＬＴＧＴＹＥＳ－N_2H_4（配列番号２）に対して少なくとも９０％の同一性を有するアミノ酸配列を有する第１のペプチドを提供することであって、アミノ酸配列における各アミノ酸が、Ｄ－アミノ酸であるか、又はアミノ酸配列における各アミノ酸が、Ｌ－アミノ酸である、提供すること、（ｂ）アミノ酸配列ＡＶＧＮＡＥＳＲＹＶＬＴＧＲＹＤＳＡＰＡＴＤＧＳＧＴＡＬＧＷＴＶＡＷＫＮＮＹＲＮＡＨＳ－N_2H_4（配列番号４）に対して少なくとも９０％の同一性を有するアミノ酸配列を有する第２のペプチドを提供することであって、アミノ酸配列における各アミノ酸が、Ｄ－アミノ酸であるか、又はアミノ酸配列における各アミノ酸が、Ｌ－アミノ酸である、提供すること、（ｃ）アミノ酸配列ＡＴＴＷＳＧＱＹＶＧＧＡＥＡＲＩＮＴＱＷＬＬＴＳＧＴＴＥＡＮＡＷＫＳＴＬＶＧＨＤＴＦＴＫＶＫＰＳＡＡＳ（配列番号５）に対して少なくとも９０％の同一性を有するアミノ酸配列を有する第３のペプチドを提供することであって、アミノ酸配列における各アミノ酸が、Ｄ－アミノ酸であるか、又はアミノ酸配列における各アミノ酸が、Ｌ－アミノ酸である、提供すること、並びに（ｄ）第１、第２、及び第３のペプチドをライゲーションすること、の方法が、開示される。

【００２０】
一態様では、Ｌ－ＳＡ、Ｄ－ＳＡ、又はそれらのバリアントを作製する方法であって、方法が、（ａ）アミノ酸配列ＡＥＡＧＩＴＧＴＷＹＮＱＬＧＳＴＦＩＶＴＡＧＡＤＧＡＬＴＧＴＹＥＳ－N_2H_4（配列番号２）に対して少なくとも９０％の同一性を有するアミノ酸配列を有する第１のペプチドであって、アミノ酸配列における各アミノ酸が、Ｄ－アミノ酸であるか、又はアミノ酸配列における各アミノ酸が、Ｌ－アミノ酸である、第１のペプチド、及びリンカーをカップリングすることと、（ｂ）リンカーを正に荷電したアミノ酸残基で官能化し、それによって可溶化残基を提供することと、（ｃ）第１のペプチドを、アミノ酸配列ＡＶＧＮＡＥＳＲＹＶＬＴＧＲＹＤＳＡＰＡＴＤＧＳＧＴＡＬＧＷＴＶＡＷＫＮＮＹＲＮＡＨＳ－N_2H_4（配列番号４）に対して少なくとも９０％の同一性を有するアミノ酸配列を有する第２のペプチドにライゲーションすることであって、アミノ酸配列における各アミノ酸が、Ｄ－アミノ酸であるか、又はアミノ酸配列における各アミノ酸が、Ｌ－アミノ酸である、ライゲーションすることと、（ｄ）第２のペプチドを、アミノ酸配列ＡＴＴＷＳＧＱＹＶＧＧＡＥＡＲＩＮＴＱＷＬＬＴＳＧＴＴＥＡＮＡＷＫＳＴＬＶＧＨＤＴＦＴＫＶＫＰＳＡＡＳ（配列番号５）に対して少なくとも９０％の同一性を有するアミノ酸配列を有する第３のペプチドにライゲーションすることであって、アミノ酸配列における各アミノ酸が、Ｄ－アミノ酸であるか、又はアミノ酸配列における各アミノ酸が、Ｌ－アミノ酸である、ライゲーションすることと、（ｅ）可溶化された残基をポリペプチドから切断することと、を含む、方法が、開示される。

【００２１】
一態様では、アミノ酸配列ＫＫＫＫＫＫX_{HH}ＡＥＡＧＩＴＧＴＷＹＮＱＬＧＳＴＦＩＶＴＡＧＡＤＧＡＬＴＧＴＹＥＳ　ＡＶＧＮＡＥＳＲＹＶＬＴＧＲＹＤＳＡＰＡＴＤＧＳＧＴＡＬＧＷＴＶＡＷＫＮＮＹＲＮＡＨＳ　ＡＴＴＷＳＧＱＹＶＧＧＡＥＡＲＩＮＴＱＷＬＬＴＳＧＴＴＥＡＮＡＷＫＳＴＬＶＧＨＤＴＦＴＫＶＫＰＳＡＡＳ（配列番号１０）に対して少なくとも９０％の同一性のアミノ酸配列を含むポリペプチドを作製する方法であって、アミノ酸配列における各アミノ酸が、Ｄ－アミノ酸であるか、又はアミノ酸配列における各アミノ酸が、Ｌ－アミノ酸であり、ＫＫＫＫＫＫ及びX_{HH}が、ともに可溶化残基を含み、方法が、（ａ）アミノ酸配列ＫＫＫＫＫＫX_{HH}ＡＥＡＧＩＴＧＴＷＹＮＱＬＧＳＴＦＩＶＴＡＧＡＤＧＡＬＴＧＴＹＥＳ　ＡＶＧＮＡＥＳＲＹＶＬＴＧＲＹＤＳＡＰＡＴＤＧＳＧＴＡＬＧＷＴＶＡＷＫＮＮＹＲＮＡＨＳ－N_2H_4（配列番号９）に対して少なくとも９０％の同一性を有するアミノ酸配列を有する第１のポリペプチドを提供することであって、アミノ酸配列における各アミノ酸が、Ｄ－アミノ酸であるか、又はアミノ酸配列における各アミノ酸が、Ｌ－アミノ酸である、提供することと、（ｂ）アミノ酸配

列ＡＴＴＷＳＧＱＹＶＧＧＡＥＡＲＩＮＴＱＷＬＬＴＳＧＴＴＥＡＮＡＷＫＳＴＬＶＧＨＤＴＦＴＫＶＫＰＳＡＡＳ（配列番号５）に対して少なくとも９０％の同一性を有するアミノ酸配列を有する第３のペプチドを提供することであって、アミノ酸配列における各アミノ酸が、Ｄ－アミノ酸であるか、又はアミノ酸配列における各アミノ酸が、Ｌ－アミノ酸である、提供することと、（ｃ）第１のポリペプチドを第３のペプチドにライゲーションすることと、を含む、方法が、開示される。

【００２２】

一態様では、Ｌ－ＳＡ、Ｄ－ＳＡ、又はそれらのバリアントを作製する方法であって、方法が、（ａ）アミノ酸配列ＫＫＫＫＫＫＸ$_{HH}$ＡＥＡＧＩＴＧＴＷＹＮＱＬＧＳＴＦＩＶＴＡＧＡＤＧＡＬＴＧＴＹＥＳ　ＡＶＧＮＡＥＳＲＹＶＬＴＧＲＹＤＳＡＰＡＴＤＧＳＧＴＡＬＧＷＴＶＡＷＫＮＮＹＲＮＡＨＳ　ＡＴＴＷＳＧＱＹＶＧＧＡＥＡＲＩＮＴＱＷＬＬＴＳＧＴＴＥＡＮＡＷＫＳＴＬＶＧＨＤＴＦＴＫＶＫＰＳＡＡＳ（配列番号１０）に対して少なくとも９０％の同一性を有するアミノ酸配列を有するポリペプチドを提供することであって、アミノ酸配列における各アミノ酸が、Ｄ－アミノ酸であるか、又はアミノ酸配列における各アミノ酸が、Ｌ－アミノ酸であり、ＫＫＫＫＫＫ及びＸ$_{HH}$が、ともに可溶化残基を含む、提供することと、（ｂ）可溶化された残基をポリペプチドから切断することと、を含む、方法が、開示される。

【００２３】

一態様では、一本鎖抗体（ｓｃＦｖ）又はＦ’ａｂ断片と、開示されるポリペプチドと、を含む二重特異性ポリペプチドが、開示される。

【００２４】

一態様では、Ｄ－ＳＡ又はそのバリアントに共有結合した抗体又はその抗体断片を含む、二重特異性ポリペプチドが、開示される。

【００２５】

一態様では、治療剤又は診断剤に共有結合したＬ－ビオチンを含む、コンジュゲートが、開示される。

【００２６】

一態様では、有効量の開示される二重特異性ポリペプチドと、薬学的に許容される担体と、を含む薬学的組成物が、開示される。

【００２７】

一態様では、疾患又は状態の治療を必要とする対象において疾患又は状態を治療する方法であって、方法が、（ａ）対象に、有効量の開示される二重特異性ポリペプチドを投与することと、（ｂ）その後、対象に、治療剤に共有結合したＬ－ビオチンを含む、有効量の組成物を投与することと、を含み、Ｄ－ＳＡ又はそのバリアントが、Ｌ－ビオチンに特異的に結合する、方法が、開示される。

【００２８】

一態様では、キットであって、開示される二重特異性ポリペプチドと、（ａ）治療剤、（ｂ）Ｌ－ビオチン、（ｃ）疾患又は病態の治療に関連して、二重特異性ポリペプチドを投与するための説明書、及び（ｄ）疾患又は病態を治療するための説明書から選択される１つ以上と、を含む、キットが、開示される。

【００２９】

本発明の態様は、システム法定クラスなどの特定の法定クラスで説明及び特許請求され得るが、これは、便宜上のみのものであり、当業者は、本発明の各態様が任意の法定クラスで説明及び特許請求され得ることを理解するであろう。別段明記されない限り、本明細書に記載の任意の方法又は態様が、そのステップが特定の順序で実施されることを必要とすると解釈されることは、決して意図されていない。したがって、方法請求項は、特許請求の範囲又は明細書において、ステップが特定の順序に限定されるべきであると具体的に記述しない場合、いかなる点においても、順序が推論されることは決して意図されない。これは、ステップ又は操作フローの配置、文法的な構成若しくは句読点に由来する明白な意味、又は明細書に記載される態様の数若しくはタイプに関する論理事項を含む、解釈の

ための任意の可能な非明示的根拠について保持される。
【００３０】
本明細書に援用され、本明細書の一部を構成する添付図は、いくつかの態様を例示し、本明細書とともに本発明の原理を説明するのに役立つ。
【図面の簡単な説明】
【００３１】
【図１】二重特異性抗体ＰＴＩ（Ａ）、ＳＡ　ＰＴＩ（Ｂ）、オリゴヌクレオチドＰＴＩ（Ｃ）、及びクリック化学ＰＴＩ（Ｄ）の４つの前標的化技術（ＰＴＩ）を示す代表的なスキームを示す。
【図２Ａ】ＩＴＣデータを示す代表的なプロットである。具体的には、図２Ａは、Ｄ－ビオチンでのＬ－ＳＡの滴定の代表的なＩＴＣデータを示す。図２Ａは、Ｌ－ビオチンでのＬ－ＳＡの滴定についての代表的なＩＴＣデータを示す。
【図２Ｂ】ＩＴＣデータを示す代表的なプロットである。具体的には、図２Ａは、Ｄ－ビオチンでのＬ－ＳＡの滴定の代表的なＩＴＣデータを示す。図２Ａは、Ｌ－ビオチンでのＬ－ＳＡの滴定についての代表的なＩＴＣデータを示す。
【図３】ネイティブケミカルライゲーション（ＮＣＬ）反応：システイン上の硫黄がチオエステルのカルボニルに対して求核攻撃を行い、次いで、Ｓ－アシルからＮ－アシルへのシフトが天然ペプチドを形成する、トランスチオエステル化を例示する代表的なスキームを示す。
【図４】ヘルピングハンド（ＨＨ）分子を示す代表的なスキームを示す。ヘルピングハンドは、ペプチド中の一級アミンに付加され、正に荷電した残基で官能化されて溶解度を増加させる。タグは、後で傷を残さないように取り除かれ得る。
【図５】ストレプトアビジンの合成戦略を例示する代表的なスキームを示す。ＳＡ１、ＳＡ２、及びＳＡ３配列を示す。下線付きＡｌａは、ＮＣＬ後にＣｙｓを脱硫することによって形成される。
【図６Ａ】全長合成Ｌ－ＳＡの代表的なスペクトルデータを示す代表的なプロットを示す。具体的には、図６Ａは、代表的な質量スペクトルである。図６Ｂは、代表的なＲＰ－ＨＰＬＣクロマトグラムである。
【図６Ｂ】全長合成Ｌ－ＳＡの代表的なスペクトルデータを示す代表的なプロットを示す。具体的には、図６Ａは、代表的な質量スペクトルである。図６Ｂは、代表的なＲＰ－ＨＰＬＣクロマトグラムである。
【図７Ａ】ＳＡ１、ＳＡ２、及びＳＡ３のＬＣ－ＭＳ特性評価の代表的なプロットを示す。具体的には、図７Ａは、ＳＡ１に対応する代表的なＲＰ－ＨＰＬＣクロマトグラムである。図７Ｂは、ＳＡ１に対応する代表的な質量スペクトルである。図７Ｃは、ＳＡ２に対応する代表的なＲＰ－ＨＰＬＣクロマトグラムである。図７Ｄは、ＳＡ２に対応する代表的な質量スペクトルである。図７Ｅは、ＳＡ３に対応する代表的なＲＰ－ＨＰＬＣクロマトグラムである。図７Ｆは、ＳＡ３に対応する代表的な質量スペクトルである。
【図７Ｂ】ＳＡ１、ＳＡ２、及びＳＡ３のＬＣ－ＭＳ特性評価の代表的なプロットを示す。具体的には、図７Ａは、ＳＡ１に対応する代表的なＲＰ－ＨＰＬＣクロマトグラムである。図７Ｂは、ＳＡ１に対応する代表的な質量スペクトルである。図７Ｃは、ＳＡ２に対応する代表的なＲＰ－ＨＰＬＣクロマトグラムである。図７Ｄは、ＳＡ２に対応する代表的な質量スペクトルである。図７Ｅは、ＳＡ３に対応する代表的なＲＰ－ＨＰＬＣクロマトグラムである。図７Ｆは、ＳＡ３に対応する代表的な質量スペクトルである。
【図７Ｃ】ＳＡ１、ＳＡ２、及びＳＡ３のＬＣ－ＭＳ特性評価の代表的なプロットを示す。具体的には、図７Ａは、ＳＡ１に対応する代表的なＲＰ－ＨＰＬＣクロマトグラムである。図７Ｂは、ＳＡ１に対応する代表的な質量スペクトルである。図７Ｃは、ＳＡ２に対応する代表的なＲＰ－ＨＰＬＣクロマトグラムである。図７Ｄは、ＳＡ２に対応する代表的な質量スペクトルである。図７Ｅは、ＳＡ３に対応する代表的なＲＰ－ＨＰＬＣクロマトグラムである。図７Ｆは、ＳＡ３に対応する代表的な質量スペクトルである。
【図７Ｄ】ＳＡ１、ＳＡ２、及びＳＡ３のＬＣ－ＭＳ特性評価の代表的なプロットを示す

。具体的には、図７Ａは、ＳＡ１に対応する代表的なＲＰ－ＨＰＬＣクロマトグラムである。図７Ｂは、ＳＡ１に対応する代表的な質量スペクトルである。図７Ｃは、ＳＡ２に対応する代表的なＲＰ－ＨＰＬＣクロマトグラムである。図７Ｄは、ＳＡ２に対応する代表的な質量スペクトルである。図７Ｅは、ＳＡ３に対応する代表的なＲＰ－ＨＰＬＣクロマトグラムである。図７Ｆは、ＳＡ３に対応する代表的な質量スペクトルである。

【図７Ｅ】ＳＡ１、ＳＡ２、及びＳＡ３のＬＣ－ＭＳ特性評価の代表的なプロットを示す。具体的には、図７Ａは、ＳＡ１に対応する代表的なＲＰ－ＨＰＬＣクロマトグラムである。図７Ｂは、ＳＡ１に対応する代表的な質量スペクトルである。図７Ｃは、ＳＡ２に対応する代表的なＲＰ－ＨＰＬＣクロマトグラムである。図７Ｄは、ＳＡ２に対応する代表的な質量スペクトルである。図７Ｅは、ＳＡ３に対応する代表的なＲＰ－ＨＰＬＣクロマトグラムである。図７Ｆは、ＳＡ３に対応する代表的な質量スペクトルである。

【図７Ｆ】ＳＡ１、ＳＡ２、及びＳＡ３のＬＣ－ＭＳ特性評価の代表的なプロットを示す。具体的には、図７Ａは、ＳＡ１に対応する代表的なＲＰ－ＨＰＬＣクロマトグラムである。図７Ｂは、ＳＡ１に対応する代表的な質量スペクトルである。図７Ｃは、ＳＡ２に対応する代表的なＲＰ－ＨＰＬＣクロマトグラムである。図７Ｄは、ＳＡ２に対応する代表的な質量スペクトルである。図７Ｅは、ＳＡ３に対応する代表的なＲＰ－ＨＰＬＣクロマトグラムである。図７Ｆは、ＳＡ３に対応する代表的な質量スペクトルである。

【図８Ａ】ＳＡ１及びＳＡ２ライゲーション産物のＬＣ－ＭＳ特性評価の代表的なプロットである。具体的には、図８Ａは、ＳＡ１及びＳＡ２ライゲーション産物に対応する代表的なＲＰ－ＨＰＬＣクロマトグラムである。図８Ｂは、ＳＡ１及びＳＡ２ライゲーション産物に対応する代表的な質量スペクトルである。

【図８Ｂ】ＳＡ１及びＳＡ２ライゲーション産物のＬＣ－ＭＳ特性評価の代表的なプロットである。具体的には、図８Ａは、ＳＡ１及びＳＡ２ライゲーション産物に対応する代表的なＲＰ－ＨＰＬＣクロマトグラムである。図８Ｂは、ＳＡ１及びＳＡ２ライゲーション産物に対応する代表的な質量スペクトルである。

【００３２】

本発明の更なる利点は、以下の説明に部分的に記載され、部分的には説明から明らかであるか、又は本発明の実施によって学ぶことができる。本発明の利点は、添付の特許請求の範囲に特に指摘される要素及び組み合わせにより実現され、達せられるであろう。前述の一般的な説明及び以下の詳細な説明の両方は、単に例示的かつ説明的なものであり、特許請求の範囲に記載された本発明を制限するものではないことを理解されたい。

【発明を実施するための形態】

【００３３】

本発明は、以下の発明の詳細な説明及びその中に含まれる実施例を参照することによって、より容易に理解することができる。

【００３４】

本ペプチド、組成物、及び方法を開示し、説明する前に、それらは、別段明記しされない限り、特定の合成方法に限定されず、別段明記されない限り、特定の試薬に限定されず、当然ながらそれらは変化する場合があるためであることを理解されたい。また、本明細書で使用される用語は、特定の態様を説明することのみを目的とし、限定することが意図されないことも理解されるべきである。本明細書に記載のものと類似又は同等の任意の方法及び材料が本発明の実施又は試験に使用され得るが、ここでは例示的な方法及び材料について説明する。

【００３５】

本発明の態様は、システム法定クラスなどの特定の法定クラスで説明及び特許請求され得るが、これは、便宜上のみのものであり、当業者は、本発明の各態様が任意の法定クラスで説明及び特許請求され得ることを理解するであろう。別段明記されない限り、本明細書に記載の任意の方法又は態様が、そのステップが特定の順序で実施されることを必要とすると解釈されることは、決して意図されていない。したがって、方法請求項は、特許請求の範囲又は明細書において、ステップが特定の順序に限定されるべきであると具体的に

記述しない場合、いかなる点においても、順序が推論されることは決して意図されない。これは、ステップ又は操作フローの配置、文法的な構成若しくは句読点に由来する明白な意味、又は明細書に記載される態様の数若しくはタイプに関する論理事項を含む、解釈のための任意の可能な非明示的根拠について保持される。

【００３６】

本出願全体を通して、様々な刊行物が参照される。これらの刊行物の開示は、それらの全体が、本出願に関係する技術水準をより完全に説明するために参照により本出願に組み込まれる。開示される参考文献はまた、参考文献に依る文章で考察され、それらに含まれる材料について、個別にかつ具体的に参照により本明細書に組み込まれる。本明細書のいかなるものも、本発明が先行発明によってそのような刊行物に先行する権利を与えられないという承認として解釈されるべきではない。更に、本明細書で提供される刊行物の日付は、実際の刊行日とは異なる場合があり、独立して確認することができる。

【００３７】

Ａ．定義

本明細書及び添付の特許請求の範囲で使用される場合、単数形の「ａ」、「ａｎ」、及び「ｔｈｅ」は、別段文脈が明らかに指示しない限り、複数の指示対象を含む。したがって、例えば、「官能基」、「アルキル」、又は「残基」への言及は、２つ以上のかかる官能基、アルキル、又は残基などの混合物を含む。

【００３８】

本明細書及び特許請求の範囲で使用される場合、「含む（ｃｏｍｐｒｉｓｉｎｇ）」という用語は、「からなる（ｃｏｎｓｉｓｔｉｎｇ　ｏｆ）」及び「から本質的になる（ｃｏｎｓｉｓｔｉｎｇ　ｅｓｓｅｎｔｉａｌｌｙ　ｏｆ）」の態様を含むことができる。

【００３９】

本明細書において、範囲は、「約」一方の特定の値から、及び／又は「約」別方の特定の値までとして表され得る。そのような範囲が表される場合、別の態様は、一方の特定の値から、及び／又は他方の特定の値までを含む。同様に、値が近似値として表現される場合、先行語「約」の使用によって、その特定の値が別の態様を形成することが理解されるであろう。範囲の各々の終点は、他の終点と関係した、及び他の終点とは独立した両方において、重要であることが更に理解されよう。また、本明細書では、いくつかの値が開示されており、各値は、本明細書では、その値自体に加えて、「約」その特定の値としても開示されることが理解される。例えば、「１０」という値が開示されていれば、「約１０」もまた開示されている。また、２つの特定の単位間の各単位も開示されていることが理解される。例えば、１０及び１５が開示されていれば、１１、１２、１３、及び１４もまた開示されている。

【００４０】

本明細書で使用される場合、「約」及び「約」という用語は、問題の量又は値が、ほぼ又はだいたい同じいくつかの他の値を示す値であり得ることを意味する。本明細書で使用される場合、概して、別段示されない限り、又は推測されない限り、それは±１０％の変動を示す公称値であることが理解される。この用語は、類似の値が特許請求の範囲に記載される同等の結果又は効果を促進することを伝えることを意図している。すなわち、量、サイズ、配合、パラメータ、並びに他の量及び特性は、正確ではなく、かつ正確である必要はないが、所望により、公差、変換係数、四捨五入、測定誤差など、及び当業者に既知の他の因子を反映して、近似及び／又はより大きい若しくはより小さくなり得ることが理解される。概して、量、サイズ、配合、パラメータ、又は他の量若しくは特性は、そのようであると明示的に記載されているか否かにかかわらず、「約」又は「近似」である。定量的値の前に「約」が使用されるとき、パラメータはまた、特に明記されない限り、特定の定量的値自体を含むことが理解される。

【００４１】

明細書及び結論の特許請求の範囲における組成物中の特定の要素又は構成要素の重量部への言及は、重量部が表される組成物又は製品中の要素又は構成要素と任意の他の要素又

は構成要素との間の重量関係を示す。したがって、２重量部の構成要素Ｘ及び５重量部の構成要素Ｙを含有する組成物において、Ｘ及びＹは、２：５の重量比で存在し、追加の構成要素が組成物中に含有されるか否かにかかわらず、そのような比で存在する。

【００４２】

構成要素の重量パーセント（重量％）は、別途特に記載されていない限り、その構成要素が含まれる製剤又は組成物の総重量に基づく。

【００４３】

本明細書で使用される場合、「任意選択的な」又は「任意選択的に」という用語は、その後に記載される事象又は状況が、発生する場合又は発生しない場合があること、及び当該事象又は状況が、発生する例と発生しない例が記載に含まれることを意味する。

【００４４】

本明細書で使用される場合、「対象」という用語は、哺乳動物、魚、鳥、爬虫類、又は両生類などの、脊椎動物であり得る。したがって、本明細書に開示される方法の対象は、ヒト、非ヒト霊長類、ウマ、ブタ、ウサギ、イヌ、ヒツジ、ヤギ、ウシ、ネコ、モルモット、又はげっ歯類であり得る。この用語は、特定の年齢又は性別を示すものではない。したがって、成人及び新生児の対象、並びに雌雄を問わない胎児が包含されることが意図される。一態様では、対象は、哺乳動物である。患者は、疾患又は障害に罹患している対象を指す。「患者」という用語は、ヒト及び獣医学的対象を含む。

【００４５】

本明細書で使用される場合、「治療」という用語は、疾患、病態、又は障害を治癒、改善、安定化、又は予防することを意図した患者の医学的管理を指す。この用語は、積極的治療、すなわち、疾患、病態、又は障害の改善に特異的に向けられた治療を含み、原因治療、すなわち、関連する疾患、病態、又は障害の原因の除去に向けられた治療もまた含む。加えて、この用語は、緩和治療、すなわち、疾患、病態、又は障害の治癒ではなく、症状の軽減のために設計された治療、予防的治療、すなわち、関連する疾患、病態、又は障害の発症を最小限に抑えるか、又は部分的に若しくは完全に阻害することに向けられた治療、並びに支持治療、すなわち、関連する疾患、病態、又は障害の改善に向けられた別の特定の治療法を補完するために用いられる治療を含む。様々な態様では、この用語は、哺乳動物（例えば、ヒト）を含む対象の任意の治療を包含し、（ｉ）疾患の素因があり得るが、まだそれを有すると診断されていない対象において疾患が発生するのを予防すること、（ｉｉ）疾患を阻害すること、すなわち、その発症を阻止すること、又は（ｉｉｉ）疾患を軽減すること、すなわち、疾患の退縮を引き起こすことを含む。一態様では、対象は霊長類などの哺乳動物であり、更なる態様では、対象はヒトである。「対象」という用語には、飼い慣らされた動物（例えば、ネコ、イヌなど）、家畜（例えば、ウシ、ウマ、ブタ、ヒツジ、ヤギなど）、及び実験動物（例えば、マウス、ウサギ、ラット、モルモット、ショウジョウバエなど）も含まれる。

【００４６】

本明細書で使用される場合、「予防する」又は「予防すること」という用語は、特に事前の行為によって、何かが起こるのを妨げる、回避する、排除する、未然に防ぐ、阻止する、又は妨害することを指す。低減させる、阻害する、又は予防するが本明細書で使用される場合、別段特に示されない限り、他の２つの語の使用も明示的に開示されることが理解される。

【００４７】

本明細書で使用される場合、「診断された」という用語は、当業者、例えば、医師による身体検査を受け、本明細書に開示される脂肪酸、組成物、又は方法によって診断又は治療され得る状態を有することが見出されたことを意味する。

【００４８】

本明細書で使用される場合、「投与すること」及び「投与」という用語は、対象に医薬調製物を提供する任意の方法を指す。そのような方法は、当業者に周知であり、経口投与、経皮投与、吸入による投与、経鼻投与、局所投与、膣内投与、眼科投与、耳内投与、脳

内投与、直腸投与、舌下投与、口腔投与、並びに静脈内投与、動脈内投与、筋肉内投与、及び皮下投与などの注射可能なものを含む、非経口投与を含むが、これらに限定されない。投与は、連続的又は断続的であり得る。様々な態様では、調製物は、治療的に投与することができる、すなわち、既存の疾患又は状態を治療するために投与される。更なる様々な態様では、調製物は、予防的に投与され得る、すなわち、疾患又は状態の予防のために投与され得る。

【００４９】

本明細書で使用される場合、「有効量」及び「有効な量」という用語は、所望の結果を達成するのに十分であるか、又は望ましくない状態に影響を及ぼすのに十分な量を指す。例えば、「治療有効量」は、所望の治療結果を達成するか、又は望ましくない症状に対して効果を有するのに十分であるが、概して有害な副作用を引き起こすのに不十分である量を指す。任意の特定の患者への具体的な治療有効用量レベルは、治療される障害及び障害の重症度、使用される特定の組成物、患者の年齢、体重、全身の健康、性別、及び食事、投与時期、投与経路、使用される特定の化合物の排泄率、治療期間、用いられる特定の脂肪酸と組み合わせて又は同時に使用される薬物、並びに医学分野において周知の同様の因子を含む、様々な因子に依存する。例えば、所望の治療効果を達成するために必要なレベルよりも低いレベルで脂肪酸の用量を開始し、所望の効果が達成されるまで徐々に投与量を増加させることは、十分に当該技術分野の技術の範囲内である。所望であれば、有効な１日用量は、投与のために複数の用量に分割することができる。結果的に、単回用量組成物は、１日用量を構成するためにそのような量又はその約数を含有することができる。任意の禁忌の事象では、個々の医師によって投与量が調整され得る。投与量は、変化し得、１日又は数日間、毎日１回以上の用量投与で投与され得る。ガイダンスは、所与のクラスの医薬品の適切な投与量についての文献に見出され得る。更なる様々な態様では、調製物は、「予防有効量」、すなわち、疾患又は状態の予防に有効な量で投与され得る。

【００５０】

本明細書で使用される場合、「剤形」は、対象への投与に好適な培地、担体、ビヒクル、又はデバイス中の薬理学的に活性な材料を意味する。剤形は、本発明の開示される脂肪酸、開示される作製方法の産物、又はその塩、溶媒和物、若しくは多形体を、防腐剤、緩衝剤、生理食塩水、又はリン酸緩衝生理食塩水などの薬学的に許容される賦形剤と組み合わせて含むことができる。剤形は、従来の医薬品製造及び配合技術を使用して作製され得る。剤形は、無機又は有機緩衝剤（例えば、リン酸塩、炭酸塩、酢酸塩、又はクエン酸塩のナトリウム又はカリウム塩）及びｐＨ調整剤（例えば、塩酸、水酸化ナトリウム又は水酸化カリウム、クエン酸塩又は酢酸塩の塩、アミノ酸及びそれらの塩）、抗酸化剤（例えば、アスコルビン酸、アルファ－トコフェロール）、界面活性剤（例えば、ポリソルベート２０、ポリソルベート８０、ポリオキシエチレン９－１０ノニルフェノール、デソキシコール酸ナトリウム）、溶液及び／又は低温／凍結安定剤（例えば、スクロース、ラクトース、マンニトール、トレハロース）、浸透圧調整剤（例えば、塩又は糖）、抗菌剤（例えば、安息香酸、フェノール、ゲンタマイシン）、消泡剤（例えば、ポリジメチルシロゾン）、防腐剤（例えば、チメロサール、２－フェノキシエタノール、ＥＤＴＡ）、ポリマー安定剤及び粘度調整剤（例えば、ポリビニルピロリドン、ポリオキサマー４８８、カルボキシメチルセルロース）及び共溶媒（例えば、グリセロール、ポリエチレングリコール、エタノール）を含むことができる。注射可能な使用のために製剤化された剤形は、防腐剤と一緒に注射用の滅菌生理食塩水中に懸濁された、開示される脂肪酸、開示される作製方法の産物、又はその塩、溶媒和物、若しくは多形体を有し得る。

【００５１】

本明細書で使用される場合、「キット」は、キットを構成する少なくとも２つの構成要素の集合体を意味する。一緒に、構成要素は、所与の目的のための機能単位を構成する。個々のメンバー構成要素は、物理的に一緒に又は別々に包装され得る。例えば、キットを使用するための説明書を含むキットは、他の個々のメンバー構成要素とともに説明書を物理的に含んでもよく、又は含まなくてもよい。代わりに、説明書は、紙形式、又はコンピ

ュータ可読メモリデバイス上で供給され得るか、若しくはインターネットウェブサイトからダウンロードされ得る電子形式のいずれかで、又は記録されたプレゼンテーションとして、別個のメンバー構成要素として供給され得る。

【００５２】

本明細書で使用される場合、「説明書（複数可）」は、キットに関連する関連資料又は方法論を記載する文書を意味する。これらの資料は、以下、背景情報、構成要素のリスト及びそれらの入手可能性の情報（購入情報など）、キットを使用するための簡単な又は詳細なプロトコル、トラブルシューティング、参考文献、テクニカルサポート、並びに任意の他の関連文書の任意の組み合わせを含み得る。説明書は、紙形態、又はコンピュータ可読メモリデバイス上で供給され得るか、若しくはインターネットウェブサイトからダウンロードされ得るか、若しくは記録されたプレゼンテーションとしての、電子形態のいずれかとして、キットとともに又は別個のメンバー構成要素として供給することができる。説明書は、１つ又は複数の文書を含むことができ、将来の更新を含むことを意味する。

【００５３】

本明細書で使用される場合、「治療剤」という用語は、生物（ヒト又は非ヒト動物）に投与される場合、局所及び／又は全身作用によって所望の薬理学的、免疫原性、及び／又は生理学的効果を誘導する、任意の合成又は天然に生じる生物学的に活性な化合物又は物質の組成物を含む。したがって、この用語は、タンパク質、ペプチド、ホルモン、核酸、遺伝子構築物などのような分子を含む、薬物、ワクチン、及びバイオ医薬品と従来からみなされている化合物又は化学物質を包含する。治療剤の例は、Ｍｅｒｃｋ　Ｉｎｄｅｘ（第１４版）、Ｐｈｙｓｉｃｉａｎｓ’　Ｄｅｓｋ　Ｒｅｆｅｒｅｎｃｅ（第６４版）、及びＴｈｅ　Ｐｈａｒｍａｃｏｌｏｇｉｃａｌ　Ｂａｓｉｓ　ｏｆ　Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓ（第１２版）などの周知の参考文献に記載されており、これらには、薬剤；ビタミン；ミネラルサプリメント；疾患若しくは病気の治療、予防、診断、治癒若しくは緩和に使用される物質；身体の構造若しくは機能に影響を与える物質、又は生理学的環境に置かれた後に生物学的に活性になるか、若しくはより活性になるプロドラッグが含まれるが、これらに限定されない。例えば、「治療剤」という用語は、主な治療領域の全てで使用するための化合物又は組成物を含み、限定されないが、アジュバント、抗生物質及び抗ウイルス剤などの抗感染剤、キナーゼ阻害剤、ポリＡＤＰリボースポリメラーゼ（ＰＡＲＰ）阻害剤及び他のＤＮＡ損傷応答修飾剤などの抗がん剤及び抗腫瘍剤、ブロモドメイン及び末端外（ＢＥＴ）阻害剤などのエピジェネティック剤、ヒストンデアセチラーゼ（ＨＤＡｃ）阻害剤、鉄キロター及び他のリボヌクレオチド還元酵素阻害剤、プロテアソーム阻害剤及びＮｅｄｄ８活性化酵素（ＮＡＥ）阻害剤、ラパマイシンの哺乳動物標的（ｍＴＯＲ）阻害剤、パクリタキセル、ドックス、イリノテカン、及び白金化合物などの従来の細胞毒性剤、細胞毒性Ｔリンパ球抗原－４（ＣＴＬＡ－４）モノクローナル抗体（ｍＡＢ）、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）ｍＡＢ、分化クラスター４７（ＣＤ４７）ｍＡＢ、トール様受容体（ＴＬＲ）アゴニスト及び他の免疫修飾剤などの免疫チェックポイント遮断剤、キメラ抗原受容体Ｔ細胞（ＣＡＲ－Ｔ）／キメラ抗原受容体ナチュラルキラー（ＣＡＲ－ＮＫ）などの細胞治療剤、インターフェロン（ＩＦＮ）、インターロイキン（ＩＬ）、及びｍＡｂなどのタンパク質、進入阻害剤、融合阻害剤、非ヌクレオシド逆転写酵素阻害剤（ＮＮＲＴＩ）、ヌクレオシド逆転写酵素阻害剤（ＮＲＴＩ）、ヌクレオチド逆転写酵素阻害剤、ＮＣＰ７阻害剤、プロテアーゼ阻害剤、及びインテグラーゼ阻害剤などの抗ＡＬＳ剤、鎮痛剤及び鎮痛剤の組み合わせ、拒食症剤、抗炎症剤、抗てんかん剤、局所及び全身麻酔剤、催眠剤、鎮静剤、抗精神病剤、神経弛緩剤、抗うつ剤、抗不安剤、拮抗剤、ニューロン遮断剤、抗コリン剤及びコリノ作用剤、抗ムスカリン剤及びムスカリン作用剤、抗アドレナリン剤、抗不整脈剤、抗高血圧剤、ホルモン及び栄養素、抗関節炎剤、抗喘息剤、抗痙攣剤、抗ヒスタミン剤、抗嘔吐剤、抗腫瘍剤、抗掻痒剤、解熱剤、鎮痙剤、心血管製剤（カルシウムチャネル遮断剤、β遮断剤、βアゴニスト及び抗不整脈剤を含む）、抗高血圧剤、利尿剤、血管拡張剤、中枢神経系刺激剤、咳及び風邪製剤、うっ血除去剤、診断薬、ホルモン、骨成長刺激

剤及び骨吸収阻害剤、免疫抑制剤、筋肉弛緩剤、精神刺激剤、鎮静剤、精神安定剤、タンパク質、ペプチド、及びそれらの断片（天然由来、化学的合成、又は組換え生成かにかかわらず）、並びに核酸分子（２つ以上のヌクレオチドのポリマー形態、リボヌクレオチド（ＲＮＡ）又は二本鎖及び一本鎖分子の両方を含むデオキシリボヌクレオチド（ＤＮＡ）、遺伝子構築体、発現ベクター、アンチセンス分子など）、小分子（例えば、ドキソルビシン）、及び他の生物学的に活性な巨大分子、例えば、タンパク質及び酵素が含まれる。薬剤は、獣医学を含む、医学的用途、及び植物などの農業、並びに他の領域で使用される生物学的に活性な薬剤であり得る。「治療剤」という用語にはまた、薬剤、ビタミン、ミネラルサプリメント、疾患若しくは病気の治療、予防、診断、治癒若しくは緩和のために使用される物質、又は身体の構造若しくは機能に影響を与える物質、又は所定の生理学的環境に置かれた後に生物学的に活性になるか、若しくはより活性になるプロドラッグも含まれるが、これらに限定されない。

【００５４】

「薬学的に許容される」という用語は、生物学的に又は他の方法で望ましくないものではない、すなわち、許容できないレベルの望ましくない生物学的効果を引き起こすか、又は有害な方法で相互作用することのない、材料を記載する。

【００５５】

本明細書で使用される場合、「誘導体」という用語は、親化合物（例えば、本明細書に開示される化合物）の構造に由来する構造を有し、その構造が本明細書に開示されるものと十分に類似しており、その類似性に基づいて、当業者によって特許請求される化合物と同じ若しくは類似の活性及び有用性を示すか、又は前駆体として特許請求される化合物と同じ若しくは類似の活性及び有用性を誘導することが期待される化合物を指す。例示的な誘導体としては、親化合物の塩、エステル、アミド、エステル若しくはアミドの塩、及びＮ－酸化物が挙げられる。

【００５６】

本明細書で使用される場合、「薬学的に許容される担体」という用語は、滅菌水性若しくは非水性溶液、分散物、懸濁液、又はエマルジョン、及び使用の直前に滅菌注射可能溶液又は分散物に再構築するための滅菌粉末を指す。好適な水性及び非水性担体、希釈剤、溶媒又はビヒクルの例としては、水、エタノール、ポリオール（グリセロール、プロピレングリコール、ポリエチレングリコールなど）、カルボキシメチルセルロース及びそれらの好適な混合物、植物油（オリーブ油など）、並びにエチルオレエートなどの注射可能な有機エステルが挙げられる。適切な流動性は、例えば、レシチンなどのコーティング材料を使用することによって、分散液の場合には必要とされる粒径を維持することによって、及び界面活性剤を使用することによって維持され得る。これらの組成物はまた、防腐剤、湿潤剤、乳化剤及び分散剤などのアジュバントも含有することができる。微生物の作用の予防は、パラベン、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸などの様々な抗菌剤及び抗真菌剤の包含によって保証することができる。また、糖、塩化ナトリウムなどの等張剤を含めることが望ましい場合もある。注射可能な医薬品形態の長期吸収は、吸収を遅延させるモノステアリン酸アルミニウム及びゼラチンなどの薬剤の包含によってもたらされ得る。注射可能なデポー形態は、ポリラクチド－ポリグリコリド、ポリ（オルトエステル）、及びポリ（無水物）などの生分解性ポリマー中に、薬物のマイクロカプセルマトリックスを形成することによって作製される。薬物対ポリマーの比、及び使用される特定のポリマーの性質に応じて、薬物放出速度を制御することができる。デポー注射用製剤はまた、体組織と適合性のあるリポソーム又はマイクロエマルジョン中に薬物を封入することによっても調製される。注射用製剤は、例えば、細菌保持フィルタを通した濾過によって、又は使用直前に滅菌水若しくは他の滅菌注射用媒体に溶解又は分散することができる滅菌固体組成物の形態で滅菌剤を組み込むことによって、滅菌され得る。好適な不活性担体としては、ラクトースなどの糖を挙げることができる。望ましくは、活性成分の粒子の少なくとも９５重量％が、０．０１～１０マイクロメートルの範囲の有効粒径を有する。

【００５７】

本明細書で使用される場合、「アミノ酸」及び「アミノ酸同一性」という用語は、開示されている抗体、バリアント、又は断片のうちのいずれかに存在し得る２０種の天然に存在するアミノ酸又は任意の非天然類似体のうちの１つを指す。したがって、本明細書で使用される「アミノ酸」は、天然に存在するアミノ酸及び合成アミノ酸の両方を意味する。例えば、ホモフェニルアラニン、シトルリン、及びノルロイシンは、本発明の目的ではアミノ酸とみなされる。「アミノ酸」にはまた、プロリン及びヒドロキシプロリンなどのアミノ酸残基も含まれる。側鎖は、（Ｒ）又は（Ｓ）配置のいずれかにあり得る。いくつかの態様では、アミノ酸は、本明細書に更に記載のＤ－又はＬ－配置である。天然に存在しない側鎖が使用される場合、非アミノ酸置換基は、例えば、分解を防止又は遅延させるために使用され得る。

【００５８】

本明細書で使用される場合、「ポリペプチド」という用語は、天然に存在する構造バリアントに関連するアミノ酸残基、及びペプチド結合又は修飾されたペプチド結合を介して連結されたその合成の天然に存在しない類似体（すなわち、ペプチドアイソスティア）、関連の天然に存在する構造バリアント、及びその合成の天然に存在しない類似体、グリコシル化ポリペプチド、並びに全ての「模倣」及び「ペプチド模倣」ポリペプチド形態から構成されるポリマーを指す。合成ポリペプチドは、例えば、自動ポリペプチド合成装置を使用して合成され得る。この用語は、オリゴペプチド、ペプチド、ポリペプチド、若しくはタンパク質配列、又はこれらのいずれかの断片、部分、若しくはサブユニットを指し得る。「タンパク質」という用語は、典型的には、大きなポリペプチドを指す。「ペプチド」という用語は、典型的には、短いポリペプチドを指す。様々な態様では、ポリペプチド又はポリマーにおける各アミノ酸残基は、例えば、Ｄタンパク質（例えば、Ｄ－ＳＡ）などにおけるＤ－アミノ酸であり得る。代替的には、様々な更なる態様では、ポリペプチド又はポリマーにおける各アミノ酸残基は、例えば、Ｄタンパク質（例えば、Ｌ－ＳＡ）などにおけるＤ－アミノ酸であり得る。

【００５９】

ポリペプチド又はタンパク質の「部分」は、ポリペプチドの少なくとも約３つの連続したアミノ酸残基を意味する。ポリペプチドの部分は、ポリペプチドの全てのアミノ酸残基を含み得ることが理解される。

【００６０】

本明細書で使用される場合、「断片」及び「セグメント」という用語は、参照ペプチドと実質的に同一であり、参照ペプチドの生物学的活性を保持するペプチドの部分（例えば、少なくとも５、１０、２５、５０、１００、１２５、１５０、２００、２５０、３００、３５０、４００、又は５００個などのアミノ酸又は核酸）を指し得る。いくつかの態様では、ペプチドの断片又は部分は、本明細書に記載の参照ペプチドの生物学的活性の少なくとも５０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、又は９９％を保持する。参照ペプチドの断片は、参照ポリペプチドの連続（ｃｏｎｔｉｎｕｏｕｓ）部分又は連続（ｃｏｎｔｉｇｕｏｕｓ）部分であり得る（例えば、１０アミノ酸長である参照ペプチドの断片は、その参照ペプチド内の任意の２～９個の連続残基であり得る）。

【００６１】

ポリペプチド（又はそれをコードする核酸）の「変異体」、「誘導体」、及び「バリアント」は、ペプチド（又は核酸）が野生型配列と同一ではないが、野生型ポリペプチド（又は核酸）と相同性を有するように、１つ以上のアミノ酸（又は１つ以上のヌクレオチド）において修飾又は改変され得るポリペプチド（又は核酸）である。

【００６２】

「バリアント」という用語は、野生型ペプチド又は遺伝子産物と比較した場合、配列及び／又は機能的特性の修飾（すなわち、変化した特性）を示すペプチド又は遺伝子産物を指し得る。概して、本明細書に開示される遺伝子及びタンパク質の任意の既知のバリアント及び誘導体又は現れ得るものを定義する１つの方式は、特定の既知の配列に対する相同性の観点からバリアント及び誘導体を定義することによるものであることを理解されたい

。本明細書に開示される特定の配列のこの同一性はまた、本明細書の他の場所でも考察される。概して、本明細書に開示される遺伝子及びタンパク質のバリアントは、典型的には、記載された配列又は天然の配列に対して少なくとも約７０、７１、７２、７３、７４、７５、７６、７７、７８、７９、８０、８１、８２、８３、８４、８５、８６、８７、８８、８９、９０、９１、９２、９３、９４、９５、９６、９７、９８、９９パーセントの相同性を有する。当業者であれば、２つのタンパク質又は核酸、例えば、遺伝子の相同性を決定する方法を、容易に理解する。例えば、相同性は、相同性が最も高いレベルにあるように、２つの配列を整列した後に計算することができる。いくつかの態様では、「バリアント」という用語は、Ｎ末端及び／又はＣ末端アミノ酸残基（複数可）の単純な欠失以外の参照配列との何らかの方法での違いを意味し得る。一態様では、バリアントは、アミノ酸残基の置換を含み得、置換は、保存的又は非保存的とみなされ得る。保存的置換は、以下の群内のものである：Ｓｅｒ、Ｔｈｒ、及びＣｙｓ；Ｌｅｕ、ｌｉｅ、及びＶａｌ；Ｇｌｕ及びＡｓｐ；Ｌｙｓ及びＡｒｇ；Ｐｈｅ、Ｔｙｒ、及びＴｒｐ；並びにＧｉｎ、Ａｓｎ、Ｇｌｕ、Ａｓｐ、及びＨｉｓ。バリアントは、少なくとも１つの置換及び／又は少なくとも１つの付加を含み得、少なくとも１つの欠失もまた存在し得る。バリアントは、１つ以上の天然に存在しない残基を含み得る。例えば、それらは、システインの場所を含む任意の位置にセレノシステイン（例えば、セレノ－Ｌ－システイン）を含み得る。多くの他の「非天然」アミノ酸置換物が当該技術分野で既知であり、市販の供給源から入手可能である。天然に存在しないアミノ酸の例としては、Ｄ－アミノ酸、システインの硫黄原子に結合したアセチルアミノメチル基を有するアミノ酸残基、ペグ化アミノ酸、並びに式$NH_2(CH_2)_nCOOH$（式中、ｎは、２～６個）のオメガアミノ酸、サルコシン、ｔ－ブチルアラニン、ｔ－ブチルグリシン、Ｎ－メチルイソロイシン、及びノルロイシンなど、中性非極性アミノ酸が挙げられる。フェニルグリシンは、Ｔｒｐ、Ｔｙｒ、又はＰｈｅを置き換えてもよく、シトルリン及びメチオニンスルホキシドは、中性非極性であり、システイン酸は、酸性であり、オルニチンは、塩基性である。プロリンは、ヒドロキシプロリンで置換され得、プロリンの性質を付与するコンフォメーションを保持し得る。

【００６３】

本明細書で使用される場合、「置換された」という用語は、有機化合物の全ての許容される置換基を含むことが企図される。広い態様では、許容される置換基は、有機化合物の非環状及び環状、分岐及び非分岐、炭素環式及び複素環式、並びに芳香族及び非芳香族の置換基を含む。例示的な置換基としては、例えば、後述するものが挙げられる。許容される置換基は、１つ以上であり得、適切な有機化合物と同じか又は異なり得る。本開示の目的のために、窒素などのヘテロ原子は、ヘテロ原子の原子価を満たす、本明細書に記載の有機化合物の水素置換基及び／又は任意の許容される置換基を有し得る。本開示は、いかなる方法によっても、有機化合物の許容される置換基によって制限されることを意図しない。また、「置換」又は「で置換された」という用語は、そのような置換が、置換された原子及び置換基の許容される原子価に従い、置換が、安定な化合物、例えば、再配列、環化、排除などによる形質変換を自発的に受けない化合物を生じるという暗示的な条件を含む。また、ある特定の態様では、別段明示的な反対の指示がない限り、個々の置換基は、更に任意選択的に置換され得る（すなわち、更に置換又は非置換であり得る）ことが企図される。

【００６４】

本明細書で使用される、「安定性」という用語は、保管安定性（例えば、室温安定性）、及びインビボ安定性を指す。前述の保護基は、インビボでタンパク質切断酵素の攻撃から本明細書に記載のペプチドを保護し得る。

【００６５】

本明細書に開示されるペプチド及びその断片はまた、本明細書に記載のペプチドの機能的等価物を含み得る。本明細書で使用される場合、「機能的等価物」という用語は、本明細書に記載のペプチドと比較して、ペプチドのアミノ酸配列の一部でアミノ酸置換、付加、又は欠失を有し、同時に、同様の又は改善された生物学的活性を有するアミノ酸配列バ

リアントを指し得る。いくつかの態様では、アミノ酸置換は、保存的置換であり得る。天然に存在するアミノ酸の保存的置換の例としては、例えば、脂肪族アミノ酸（Ｇｌｙ、Ａｌａ、及びＰｒｏ）、疎水性アミノ酸（Ｉｌｅ、Ｌｅｕ、及びＶａｌ）、芳香族アミノ酸（Ｐｈｅ、Ｔｙｒ、及びＴｒｐ）、酸性アミノ酸（Ａｓｐ及びＧｌｕ）、塩基性アミノ酸（Ｈｉｓ、Ｌｙｓ、Ａｒｇ、Ｇｌｎ、及びＡｓｎ）、並びに硫黄含有アミノ酸（Ｃｙｓ及びＭｅｔ）が挙げられる。いくつかの態様では、アミノ酸欠失は、本明細書に開示のペプチドの活性に直接関与しない領域に位置され得る。

【００６６】

いくつかの態様では、本明細書に開示されるペプチド及びその断片のアミノ酸配列は、本明細書に開示されるペプチドの配列のうちのいずれかに対して実質的な同一性を有するペプチド配列を含み得る。本明細書で使用される場合、「実質的な同一性」という用語は、２つのアミノ酸配列が、最適に整列され、次いで、ＢＬＡＳＴ、ＧＡＰ、又はＢＥＳＴＦＩＴなどの当該技術分野で通常使用されるアルゴリズムによって、又は目視検査によって分析される場合、少なくとも約６０％、７０％、８０％、８５％、９０％、又は９５％の配列同一性を共有することを意味する。配列比較のための整列方法は当該技術分野で既知である。

【００６７】

いくつかの態様では、本明細書に開示されるペプチド及びその断片のアミノ酸配列は、本明細書に開示されるペプチドの配列のうちのいずれかに対してある程度の同一性又は相同性を有するペプチド配列を含み得る。同一性の程度は、当業者に既知の方法によって変化し、決定され得る。「相同性」及び「同一性」という用語は各々、２つのポリペプチド配列間の配列類似性を指す。相同性及び同一性は各々、比較の目的で整列され得る各配列における位置を比較することによって決定され得る。比較される配列における位置が、同じアミノ酸残基によって占有される場合、したがって、ポリペプチドは、その位置で同一であると称され得、同等の部位が、同じアミノ酸（例えば、同一である）又は類似のアミノ酸（例えば、立体及び／又は電子的性質が類似）によって占有される場合、分子は、その位置で相同であると称され得る。配列間の相同性又は同一性の割合は、それらの配列が共有する一致する位置又は相同な位置の数の関数である。本明細書に記載のペプチドは、ペプチド又はポリペプチドに対して少なくとも又は約２５％、５０％、６５％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、又は９９％の同一性又は相同性を有し得、本明細書に更に記載のように、ペプチド若しくはポリペプチドは、例えば、配列番号１～８のうちの１つ以上であるか、又はペプチド若しくはポリペプチドは、例えば、Ｄ－ＳＡ若しくはＬ－ＳＡである。

【００６８】

別段明記されない限り、本明細書に示される任意の方法は、そのステップが特定の順序で実施されることを要求するものとして解釈されることは決して意図されない。したがって、方法請求項がそのステップが従う順序を実際に列挙しないか、又は特許請求の範囲若しくは明細書において、ステップが特定の順序に限定されるべきであると別段具体的に記述されない場合、いかなる点においても、順序が推論されることは決して意図されない。これは、ステップ又は操作フローの配置、文法的な構成又は句読点に由来する明白な意味、及び明細書に記載される実施形態の数又はタイプに関する論理事項を含む、解釈のための任意の可能な非明示的根拠について保持される。

【００６９】

開示されるのは、本発明の組成物を調製するために使用される構成要素、及び本明細書に開示される方法内で使用される組成物自体である。これら及び他の材料は、本明細書で開示され、これらの材料の組み合わせ、サブセット、相互作用、群などが開示されるとき、これらの化合物の各々の様々な個別及び集合的組み合わせ及び順列の具体的な参照は、明示的に開示することができないが、各々は本明細書で具体的に企図及び記載されることが理解される。例えば、特定の化合物が開示され、考察され、その化合物を含むいくつかの分子に対して行われ得るいくつかの修飾が考察される場合、特に反対の指示がない限り

、その化合物及び可能である修飾の各々の及び全ての組み合わせ及び順列が、具体的に企図される。したがって、分子Ａ、Ｂ、及びＣのクラス、並びにＤ、Ｅ、及びＦのクラスが開示され、組み合わせ分子の一例、Ａ－Ｄが開示されている場合、各々が個々に列挙されていない場合でさえ、各々が、個々にかつ集合的に企図される意味である、組み合わせＡ－Ｅ、Ａ－Ｆ、Ｂ－Ｄ、Ｂ－Ｅ、Ｂ－Ｆ、Ｃ－Ｄ、Ｃ－Ｅ、及びＣ－Ｆが開示されているとみなされる。同様に、これらの任意のサブセット又は組み合わせもまた開示される。したがって、例えば、Ａ－Ｅ、Ｂ－Ｆ、及びＣ－Ｅのサブグループが、開示されているとみなされる。この概念は、本発明の組成物を作製及び使用する方法におけるステップを限定することなく含む、本出願の全ての態様に適用される。したがって、実施され得る様々な追加ステップがある場合、これらの追加ステップの各々は、本発明の方法の任意の特定の実施形態又は実施形態の組み合わせで実施され得ることが理解される。

【００７０】

本明細書に開示される化合物及び組成物は、特定の機能を有することが理解される。本明細書に開示されるのは、開示される機能を実施するためのある特定の構造要件であり、開示される構造に関連する同じ機能を実施することができる様々な構造が存在し、これらの構造が、典型的には同じ結果を達成するであろうことが理解される。

【００７１】

Ｂ．ペプチド

一態様では、開示されるポリペプチド及び／又は開示される二重特異性ポリペプチドの調製に有用なペプチドが、開示される。理論に拘束されることを望まないが、開示されるペプチドは、当業者に既知の方法によって、及び本明細書の他の場所に記載のように調製され得る。例示的なペプチドを以下の表１に示す。

【表１】

表１.

ID	配列
断片1前駆体	AEAGITGTWYNQLGSTFIVTAGADGALTGTYES(配列番号1)
断片1	AEAGITGTWYNQLGSTFIVTAGADGALTGTYES-N_2H_4(配列番号2)
断片2前駆体	AVGNAESRYVLTGRYDSAPATDGSGTALGWTVAWKNNYRNAHS-N_2H_4(配列番号3)
断片2	AVGNAESRYVLTGRYDSAPATDGSGTALGWTVAWKNNYRNAHS-N_2H_4(配列番号4)
断片3	ATTWSGQYVGGAEARINTQWLLTSGTTEANAWKSTLVGHDTFTKVKPSAAS(配列番号5).
リンカー+断片1	X_{HH}AEAGITGTWYNQLGSTFIVTAGADGALTGTYES-N_2H_4(配列番号6)
可溶化残基+断片1	KKKKKKX$_{HH}$AEAGITGTWYNQLGSTFIVTAGADGALTGTYES-N_2H_4(配列番号7)

【００７２】

様々な態様では、アミノ酸配列における各アミノ酸は、Ｄ－アミノ酸であるか、又はアミノ酸配列における各アミノ酸は、Ｌ－アミノ酸である。例えば、一態様では、アミノ酸配列における各アミノ酸は、Ｄ－アミノ酸である。当業者によって理解されるように、各アミノ酸がＤ－アミノ酸であるペプチドは、例えば、Ｄ－ポリペプチド（例えば、Ｄ配置の二重特異性ポリペプチド）の調製に有用であり得る。更なる態様では、アミノ酸配列における各アミノ酸は、Ｌ－アミノ酸である。各アミノ酸がＬ－アミノ酸であるペプチドは、例えば、Ｌ－ポリペプチド（例えば、Ｌ配置の二重特異性ポリペプチド）の調製に有用であり得る。

【００７３】
したがって、様々な態様では、アミノ酸配列ＡＥＡＧＩＴＧＴＷＹＮＱＬＧＳＴＦＩＶＴＡＧＡＤＧＡＬＴＧＴＹＥＳ（配列番号１）に対して少なくとも９０％の同一性のアミノ酸配列を含むペプチドであって、アミノ酸配列における各アミノ酸が、Ｄ－アミノ酸であるか、又はアミノ酸配列における各アミノ酸が、Ｌ－アミノ酸である、ペプチドが、開示される。更なる態様では、アミノ酸配列ＡＥＡＧＩＴＧＴＷＹＮＱＬＧＳＴＦＩＶＴＡＧＡＤＧＡＬＴＧＴＹＥＳ－N_2H_4（配列番号２）に対して少なくとも９０％の同一性のアミノ酸配列を含むペプチドであって、アミノ酸配列における各アミノ酸が、Ｄ－アミノ酸であるか、又はアミノ酸配列における各アミノ酸が、Ｌ－アミノ酸である、ペプチドが、開示される。

【００７４】
様々な態様では、アミノ酸配列ＡＶＧＮＡＥＳＲＹＶＬＴＧＲＹＤＳＡＰＡＴＤＧＳＧＴＡＬＧＷＴＶＡＷＫＮＮＹＲＮＡＨＳ（配列番号３）に対して少なくとも９０％の同一性のアミノ酸配列を含むペプチドであって、アミノ酸配列における各アミノ酸が、Ｄ－アミノ酸であるか、又はアミノ酸配列における各アミノ酸が、Ｌ－アミノ酸である、ペプチドが、開示される。更なる態様では、アミノ酸配列X_{HH}ＡＥＡＧＩＴＧＴＷＹＮＱＬＧＳＴＦＩＶＴＡＧＡＤＧＡＬＴＧＴＹＥＳ－N_2H_4（配列番号４）に対して少なくとも９０％の同一性のアミノ酸配列を含むペプチドであって、アミノ酸配列における各アミノ酸が、Ｄ－アミノ酸であるか、又はアミノ酸配列における各アミノ酸が、Ｌ－アミノ酸である、ペプチドが、開示される。

【００７５】
様々な態様では、アミノ酸配列ＡＴＴＷＳＧＱＹＶＧＧＡＥＡＲＩＮＴＱＷＬＬＴＳＧＴＴＥＡＮＡＷＫＳＴＬＶＧＨＤＴＦＴＫＶＫＰＳＡＡＳ（配列番号５）に対して少なくとも９０％の同一性のアミノ酸配列を含むペプチドであって、アミノ酸配列における各アミノ酸が、Ｄ－アミノ酸であるか、又はアミノ酸配列における各アミノ酸が、Ｌ－アミノ酸である、ペプチドが、開示される。

【００７６】
様々な態様では、アミノ酸配列X_{HH}ＡＥＡＧＩＴＧＴＷＹＮＱＬＧＳＴＦＩＶＴＡＧＡＤＧＡＬＴＧＴＹＥＳ－N_2H_4（配列番号６）に対して少なくとも９０％の同一性のアミノ酸配列を含むペプチドであって、アミノ酸配列における各アミノ酸が、Ｄ－アミノ酸であるか、又はアミノ酸配列における各アミノ酸が、Ｌ－アミノ酸であり、X_{HH}が、リンカーである、ペプチドが、開示される。更なる態様では、アミノ酸配列ＫＫＫＫＫＫX_{HH}ＡＥＡＧＩＴＧＴＷＹＮＱＬＧＳＴＦＩＶＴＡＧＡＤＧＡＬＴＧＴＹＥＳ－N_2H_4（配列番号７）に対して少なくとも９０％の同一性のアミノ酸配列を含むペプチドであって、アミノ酸配列における各アミノ酸が、Ｄ－アミノ酸であるか、又はアミノ酸配列における各アミノ酸が、Ｌ－アミノ酸であり、ＫＫＫＫＫＫ及びX_{HH}が、ともに可溶化残基を含む、ペプチドが、開示される。

【００７７】
Ｃ．ポリペプチド
一態様では、開示される二重特異性ポリペプチドの調製に有用なポリペプチドが開示される。理論に拘束されることを望まないが、開示されるペプチドは、本明細書の他の場所に記載の方法によって調製され得る。例示的なポリペプチドを以下の表２に示す。

【表２】

表２.

ID	配列
断片1+断片2+断片3	AEAGITGTWYNQLGSTFIVTAGADGALTGTYESAVGNAE SRYVLTGRYDSAPATDGSGTALGWTVAWKNNYRNAHSA TTWSGQYVGGAEARINTQWLLTSGTTEANAWKSTLVGHD TFTKVKPSAAS(配列番号8)
可溶化残基+断片1+断片2	$KKKKKKX_{HH}$AEAGITGTWYNQLGSTFIVTAGADGALT GTYESAVGNAESRYVLTGRYDSAPATDGSGTALGWTV AWKNNYRNAHS-N_2H_4(配列番号9).
可溶化残基+断片1+断片2+断片3	$KKKKKKX_{HH}$AEAGITGTWYNQLGSTFIVTAGADG ALTGTYESAVGNAESRYVLTGRYDSAPATDGSGT ALGWTVAWKNNYRNAHSATTWSGQYVGGAEAR INTQWLLTSGTTEANAWKSTLVGHDTFTKVKPSAAS(配列番号10).

【００７８】

様々な態様では、アミノ酸配列における各アミノ酸は、Ｄ－アミノ酸であるか、又はアミノ酸配列における各アミノ酸は、Ｌ－アミノ酸である。例えば、一態様では、アミノ酸配列における各アミノ酸は、Ｄ－アミノ酸である。当業者によって理解されるように、各アミノ酸がＤ－アミノ酸であるポリペプチドは、例えば、Ｄ配置での二重特異性ポリペプチドの調製に有用であり得る。更なる態様では、アミノ酸配列における各アミノ酸は、Ｌ－アミノ酸である。各アミノ酸がＬ－アミノ酸であるポリペプチドは、例えば、Ｌ配置での二重特異性ポリペプチドの調製に有用であり得る。

【００７９】

したがって、一態様では、アミノ酸配列ＡＥＡＧＩＴＧＴＷＹＮＱＬＧＳＴＦＩＶＴＡＧＡＤＧＡＬＴＧＴＹＥＳ　ＡＶＧＮＡＥＳＲＹＶＬＴＧＲＹＤＳＡＰＡＴＤＧＳＧＴＡＬＧＷＴＶＡＷＫＮＮＹＲＮＡＨＳ　ＡＴＴＷＳＧＱＹＶＧＧＡＥＡＲＩＮＴＱＷＬＬＴＳＧＴＴＥＡＮＡＷＫＳＴＬＶＧＨＤＴＦＴＫＶＫＰＳＡＡＳ（配列番号８）に対して９０％～９９％の同一性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチドであって、アミノ酸配列における各アミノ酸が、Ｄ－アミノ酸である、ポリペプチドが、開示される。

【００８０】

一態様では、アミノ酸配列ＫＫＫＫＫＫX_{HH}ＡＥＡＧＩＴＧＴＷＹＮＱＬＧＳＴＦＩＶＴＡＧＡＤＧＡＬＴＧＴＹＥＳ　ＡＶＧＮＡＥＳＲＹＶＬＴＧＲＹＤＳＡＰＡＴＤＧＳＧＴＡＬＧＷＴＶＡＷＫＮＮＹＲＮＡＨＳ－N_2H_4（配列番号９）に対して少なくとも９０％の同一性のアミノ酸配列を含むポリペプチドであって、アミノ酸配列における各アミノ酸が、Ｄ－アミノ酸であるか、又はアミノ酸配列における各アミノ酸が、Ｌ－アミノ酸である、ポリペプチドが、開示される。

【００８１】

一態様では、アミノ酸配列ＫＫＫＫＫＫX_{HH}ＡＥＡＧＩＴＧＴＷＹＮＱＬＧＳＴＦＩＶＴＡＧＡＤＧＡＬＴＧＴＹＥＳ　ＡＶＧＮＡＥＳＲＹＶＬＴＧＲＹＤＳＡＰＡＴＤＧＳＧＴＡＬＧＷＴＶＡＷＫＮＮＹＲＮＡＨＳ　ＡＴＴＷＳＧＱＹＶＧＧＡＥＡＲＩＮＴＱＷＬＬＴＳＧＴＴＥＡＮＡＷＫＳＴＬＶＧＨＤＴＦＴＫＶＫＰＳＡＡＳ（配列番号１０）に対して少なくとも９０％の同一性のアミノ酸配列を含むポリペプチドであって、アミノ酸配列における各アミノ酸が、Ｄ－アミノ酸であるか、又はアミノ酸配列における各アミノ酸が、Ｌ－アミノ酸である、ポリペプチドが、開示される。

【００８２】

様々な態様では、ポリペプチドは、Ｄ－トラプトアビジン、Ｄ－ｓｔｒｅｐ－ｔａｃｔｉｎ、Ｄ－ｓｔｒｅｐ－ｔａｃｔｉｎ　ＸＴ、又は一価Ｄ－ＳＡである。

【００８３】
Ｄ．ポリペプチドを作製する方法
一態様では、Ｌ－ＳＡ、Ｄ－ＳＡ、又はそれらのバリアントを作製する方法であって、方法：（ａ）アミノ酸配列ＡＥＡＧＩＴＧＴＷＹＮＱＬＧＳＴＦＩＶＴＡＧＡＤＧＡＬＴＧＴＹＥＳ－N_2H_4（配列番号２）に対して少なくとも９０％の同一性を有するアミノ酸配列を有する第１のペプチドを提供することであって、アミノ酸配列における各アミノ酸が、Ｄ－アミノ酸であるか、又はアミノ酸配列における各アミノ酸が、Ｌ－アミノ酸である、提供すること、（ｂ）アミノ酸配列ＡＶＧＮＡＥＳＲＹＶＬＴＧＲＹＤＳＡＰＡＴＤＧＳＧＴＡＬＧＷＴＶＡＷＫＮＮＹＲＮＡＨＳ－N_2H_4（配列番号４）に対して少なくとも９０％の同一性を有するアミノ酸配列を有する第２のペプチドを提供することであって、アミノ酸配列における各アミノ酸が、Ｄ－アミノ酸であるか、又はアミノ酸配列における各アミノ酸が、Ｌ－アミノ酸である、提供すること、（ｃ）アミノ酸配列ＡＴＴＷＳＧＱＹＶＧＧＡＥＡＲＩＮＴＱＷＬＬＴＳＧＴＴＥＡＮＡＷＫＳＴＬＶＧＨＤＴＦＴＫＶＫＰＳＡＡＳ（配列番号５）に対して少なくとも９０％の同一性を有するアミノ酸配列を有する第３のペプチドを提供することであって、アミノ酸配列における各アミノ酸が、Ｄ－アミノ酸であるか、又はアミノ酸配列における各アミノ酸が、Ｌ－アミノ酸である、提供すること、並びに（ｄ）第１、第２、及び第３のペプチドをライゲーションすること、の方法が、開示される。
【００８４】
一態様では、Ｌ－ＳＡ、Ｄ－ＳＡ、又はそれらのバリアントを作製する方法であって、方法が、（ａ）アミノ酸配列ＡＥＡＧＩＴＧＴＷＹＮＱＬＧＳＴＦＩＶＴＡＧＡＤＧＡＬＴＧＴＹＥＳ－N_2H_4（配列番号２）に対して少なくとも９０％の同一性を有するアミノ酸配列を有する第１のペプチド及びリンカーをカップリングすることであって、アミノ酸配列における各アミノ酸が、Ｄ－アミノ酸であるか、又はアミノ酸配列における各アミノ酸が、Ｌ－アミノ酸である、カップリングすることと、（ｂ）リンカーを正に荷電したアミノ酸残基で官能化し、それによって可溶化残基を提供することと、（ｃ）第１のペプチドを、アミノ酸配列ＡＶＧＮＡＥＳＲＹＶＬＴＧＲＹＤＳＡＰＡＴＤＧＳＧＴＡＬＧＷＴＶＡＷＫＮＮＹＲＮＡＨＳ－N_2H_4（配列番号４）に対して少なくとも９０％の同一性を有するアミノ酸配列を有する第２のペプチドにライゲーションすることであって、アミノ酸配列における各アミノ酸が、Ｄ－アミノ酸であるか、又はアミノ酸配列における各アミノ酸が、Ｌ－アミノ酸である、ライゲーションすることと、（ｄ）第２のペプチドを、アミノ酸配列ＡＴＴＷＳＧＱＹＶＧＧＡＥＡＲＩＮＴＱＷＬＬＴＳＧＴＴＥＡＮＡＷＫＳＴＬＶＧＨＤＴＦＴＫＶＫＰＳＡＡＳ（配列番号５）に対して少なくとも９０％の同一性を有するアミノ酸配列を有する第３のペプチドにライゲーションすることであって、アミノ酸配列における各アミノ酸が、Ｄ－アミノ酸であるか、又はアミノ酸配列における各アミノ酸が、Ｌ－アミノ酸である、ライゲーションすることと、（ｅ）可溶化残基をポリペプチドから切断することと、を含む、方法が、開示される。
【００８５】
一態様では、アミノ酸配列ＫＫＫＫＫＫX_{HH}ＡＥＡＧＩＴＧＴＷＹＮＱＬＧＳＴＦＩＶＴＡＧＡＤＧＡＬＴＧＴＹＥＳ　ＡＶＧＮＡＥＳＲＹＶＬＴＧＲＹＤＳＡＰＡＴＤＧＳＧＴＡＬＧＷＴＶＡＷＫＮＮＹＲＮＡＨＳ　ＡＴＴＷＳＧＱＹＶＧＧＡＥＡＲＩＮＴＱＷＬＬＴＳＧＴＴＥＡＮＡＷＫＳＴＬＶＧＨＤＴＦＴＫＶＫＰＳＡＡＳ（配列番号１０）に対して少なくとも９０％の同一性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチドを作製する方法であって、アミノ酸配列における各アミノ酸が、Ｄ－アミノ酸であるか、又はアミノ酸配列における各アミノ酸が、Ｌ－アミノ酸であり、方法が、（ａ）アミノ酸配列ＫＫＫＫＫＫX_{HH}ＡＥＡＧＩＴＧＴＷＹＮＱＬＧＳＴＦＩＶＴＡＧＡＤＧＡＬＴＧＴＹＥＳ　ＡＶＧＮＡＥＳＲＹＶＬＴＧＲＹＤＳＡＰＡＴＤＧＳＧＴＡＬＧＷＴＶＡＷＫＮＮＹＲＮＡＨＳ－N_2H_4（配列番号９）に対して少なくとも９０％の同一性を有するアミノ酸配列を有する第１のポリペプチドを提供することであって、アミノ酸配列における各アミノ酸が、Ｄ－アミノ酸であるか、又はアミノ酸配列における各アミノ酸が、Ｌ－アミノ酸であ

る、提供することと、（ｂ）アミノ酸配列ＡＴＴＷＳＧＱＹＶＧＧＡＥＡＲＩＮＴＱＷＬＬＴＳＧＴＴＥＡＮＡＷＫＳＴＬＶＧＨＤＴＦＴＫＶＫＰＳＡＡＳ（配列番号５）に対して少なくとも９０％の同一性を有するアミノ酸配列を有する第３のペプチドを提供することであって、アミノ酸配列における各アミノ酸が、Ｄ－アミノ酸であるか、又はアミノ酸配列における各アミノ酸が、Ｌ－アミノ酸である、提供することと、（ｃ）第１のポリペプチドを第３のペプチドにライゲーションすることと、を含む、方法が、開示される。

【００８６】

一態様では、Ｌ－ＳＡ、Ｄ－ＳＡ、又はそれらのバリアントを作製する方法であって、方法が、（ａ）アミノ酸配列ＫＫＫＫＫＫＸ$_{HH}$ＡＥＡＧＩＴＧＴＷＹＮＱＬＧＳＴＦＩＶＴＡＧＡＤＧＡＬＴＧＴＹＥＳ　ＡＶＧＮＡＥＳＲＹＶＬＴＧＲＹＤＳＡＰＡＴＤＧＳＧＴＡＬＧＷＴＶＡＷＫＮＮＹＲＮＡＨＳ　ＡＴＴＷＳＧＱＹＶＧＧＡＥＡＲＩＮＴＱＷＬＬＴＳＧＴＴＥＡＮＡＷＫＳＴＬＶＧＨＤＴＦＴＫＶＫＰＳＡＡＳ（配列番号１０）に対して少なくとも９０％の同一性を有するアミノ酸配列を有するポリペプチドを提供することであって、アミノ酸配列における各アミノ酸が、Ｄ－アミノ酸であるか、又はアミノ酸配列における各アミノ酸が、Ｌ－アミノ酸であり、ＫＫＫＫＫＫ及びＸ$_{HH}$が、ともに可溶化残基を含む、提供することと、（ｂ）可溶化残基をポリペプチドから切断することと、を含む、方法が、開示される。

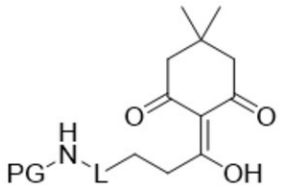
【００８７】

様々な態様では、本方法は、ライゲーションステップの前に、リンカーを第１のペプチドにカップリングすることを更に含む。本明細書で使用される場合、「リンカー」という用語は、例えば、ペプチド（例えば、不溶性ペプチド）に対して高可溶化ペプチド配列（例えば、リジン残基の配列）を一時的に結合させるために使用され得る二官能性トレースレスリンカーを指す。例えば、Ｊａｃｏｂｓｅｎ　ｅｔ　ａｌ．（２０１６）ＪＡＣＳ　１３８：　１１７７５－１１７８２を参照されたい。これらの高可溶化ペプチド配列が結合すると、リンカーは、高可溶化ペプチド配列と組み合わせて可溶化残基を形成し、それはその後ペプチドから除去され得る。

【００８８】

したがって、様々な態様では、リンカーは、以下の式によって表される構造を有し、

【化１】

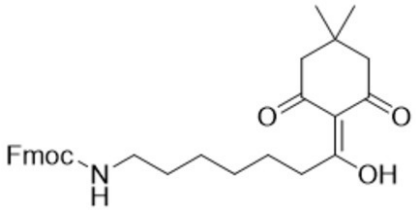


式中、Ｌが、リンカーであり、ＰＧが、アミン保護基である。例示的なリンカーとしては、アルキル及びアルコキシ残基が挙げられるが、これらに限定されない。当業者によって容易に理解されるように、アミン保護基は、例えば、ペプチド合成において使用され得、ペプチド上の他の官能基が求電子物との選択的反応を受けることを可能にし、それによって保護されたアミンは選択的反応を受けない。その後、保護基は除去され得る。例示的なアミン保護基としては、９－フルオロエニルメチル（ｆｌｕｏｒｏｅｎｙｌｍｅｔｈｙｌ）カルバメート（Ｆｍｏｃ）、ｔｅｒｔ－ブチルカルバメート（Ｂｏｃ）、ベンジルカルバメート（Ｃｂｚ）、アセトアミド（Ａｃ）、トリフルオロアセトアミド、及びフタルイミドが挙げられるが、これらに限定されない。

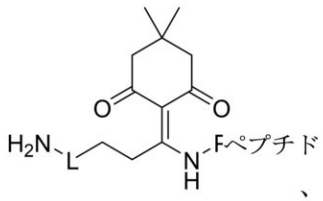
【００８９】

したがって、様々な態様では、リンカーは、Ｃ１－Ｃ１２アルキル及び－（ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$Ｏ）$_n$－から選択され、ｎが、１、２、３、及び４から選択される。更なる態様では、リンカーは、Ｃ１－Ｃ１２アルキルである。なお更なる態様では、リンカーは、Ｃ１－Ｃ８アルキルである。更に更なる態様では、リンカーは、Ｃ１－Ｃ４アルキル（例えば、－ＣＨ$_2$－、－ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$－、－ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$ＣＨ$_2$－、－ＣＨ（ＣＨ$_3$）ＣＨ$_2$－など）であ

る。より更なる態様では、リンカーは、Ｃ４アルキルである。
【００９０】
更なる態様では、リンカーは、－（CH_2CH_2O）$_n$－であり、ｎが、１、２、３、及び４から選択される（例えば、－CH_2CH_2O－、－（CH_2CH_2O）$_2$－、－（CH_2CH_2O）$_3$－など）。なお更なる態様では、ｎは、１、２、及び３から選択される。更に更なる態様では、ｎは、１及び２から選択される。より更なる態様では、ｎは、１である。なお更なる態様では、ｎは、２である。
【００９１】
様々な態様では、アミン保護基は、９－フルオロエニルメチル（ｆｌｕｏｒｏｅｎｙｌｍｅｔｈｙｌ）カルバメート（Ｆｍｏｃ）、ｔｅｒｔ－ブチルカルバメート（Ｂｏｃ）、ベンジルカルバメート（Ｃｂｚ）、アセトアミド（Ａｃ）、トリフルオロアセトアミド、及びフタルイミドから選択される。更なる態様では、アミン保護基は、Ｆｍｏｃである。
【００９２】
更なる態様では、リンカーは、以下の構造：
【化２】



を有する。
【００９３】
更なる態様では、本方法は、ライゲーションステップの前に、リンカーを脱保護することを更に含む。例えば、上に示されるように、脱保護リンカーは、以下を含み得、
【化３】

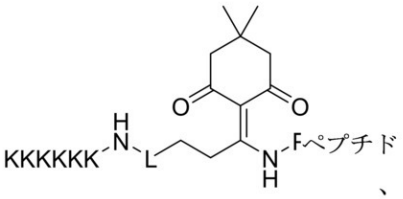


、

式中、ペプチドが、例えば、断片１（配列番号２）である。したがって、様々な態様では、本方法は、配列番号６に示されるペプチドを調製することを含み、次いで、ペプチドは、続いて、追加のペプチド断片（例えば、断片２（配列番号４）及び断片３（配列番号５））にライゲーションされ得る。
【００９４】
更なる態様では、本方法は、ライゲーションステップの前に、リンカーを正に荷電したアミノ酸残基で官能化することを更に含む。なお更なる態様では、正に荷電したアミノ酸残基は、リジンである。更に更なる態様では、遊離アミンは、２つ以上の正に荷電したアミノ酸残基（例えば、１、２、３、４、５、シズ、７、８個の正に荷電したアミノ酸残基）で官能化され、正に荷電したアミノ酸残基は、同じであるか、又は異なる。より更なる態様では、各正に荷電したアミノ酸残基は、リジンである。なお更なる態様では、遊離アミンは、６つのリジン残基で官能化される。例えば、上に示されるように、正に荷電したアミノ酸残基（すなわち、可溶化残基）で官能化された脱保護リンカーは、以下を含み得

、

【化４】



、

式中、ペプチドが、例えば、断片１（配列番号２）である。したがって、様々な態様では、本方法は、配列番号７に示されるペプチドを調製することを含み、次いで、ペプチドは、続いて、追加のペプチド断片（例えば、断片２（配列番号４）及び断片３（配列番号５））にライゲーションされ得る。

【００９５】

更なる態様では、第１のペプチドは、第３のペプチドにライゲーションされる前に、第２のペプチドにライゲーションされる。したがって、様々な態様では、本方法は、配列番号９に示されるポリペプチドを調製することを含み、次いで、ポリペプチドは、続いて、追加のペプチド断片（例えば、断片３（配列番号５））にライゲーションされ得る。

【００９６】

更なる態様では、方法は、可溶化残基を切断することを更に含む。例えば、配列番号８を参照されたい。

【００９７】

更なる態様では、ライゲーションは、ネイティブケミカルライゲーション又は任意の他のライゲーション化学を用いることを介して行われる。なお更なる態様では、ライゲーションは、トランスチオエステル化を介して行われる。Ｉ

【００９８】

更なる態様では、本方法は、Ｌ－ＳＡ又はそのバリアント（例えば、Ｌ－トラプトアビジン、一価Ｌ－ＳＡ）を作製する。

【００９９】

更なる態様では、本方法は、Ｄ－ＳＡ又はそのバリアント（例えば、Ｄ－トラプトアビジン、一価Ｄ－ＳＡ）を作製する。

【０１００】

Ｅ．二重特異性ポリペプチドＤ－ＳＡ又はそのバリアント

一態様では、一本鎖抗体（ｓｃＦｖ）又はＦ’ａｂ断片と、開示されるポリペプチドと、を含む二重特異性ポリペプチドが、開示される。更なる態様では、ポリペプチドは、アミノ酸配列ＡＥＡＧＩＴＧＴＷＹＮＱＬＧＳＴＦＩＶＴＡＧＡＤＧＡＬＴＧＴＹＥＳ　ＡＶＧＮＡＥＳＲＹＶＬＴＧＲＹＤＳＡＰＡＴＤＧＳＧＴＡＬＧＷＴＶＡＷＫＮＮＹＲＮＡＨＳ　ＡＴＴＷＳＧＱＹＶＧＧＡＥＡＲＩＮＴＱＷＬＬＴＳＧＴＴＥＡＮＡＷＫＳＴＬＶＧＨＤＴＦＴＫＶＫＰＳＡＡＳ（配列番号８）に対して９０％～９９％の同一性を有するアミノ酸配列を含み、アミノ酸配列における各アミノ酸が、Ｄ－アミノ酸である。なお更なる態様では、ｓｃＦｖは、抗ＣＤ３０抗体である。更に更なる態様では、ｓｃＦｖは、５Ｆ１１ｓｃＦｖである。

【０１０１】

一態様では、Ｄ－ＳＡ又はそのバリアントに共有結合した抗体又はその抗体断片を含む、二重特異性ポリペプチドが、開示される。

【０１０２】

様々な態様では、抗体又はその抗体断片は、抗ＩＬ－１７受容体抗体、抗ＩＬ－５受容

体抗体、抗ＰＤ－Ｌ１抗体、抗ＦＧＦ２３抗体、抗上皮成長因子受容体抗体、抗ＧＤ２抗体、抗ＨＥＲ－２受容体抗体、抗ＲＡＮＫＬ抗体、抗Ｃ５抗体、抗ＶＥＧＦ受容体抗体、抗ＶＥＧＦ－Ａ抗体、抗ＶＥＧＦ受容体２抗体、抗ＩｇＥ抗体、抗ＴＮＦ－アルファ抗体、抗ＩＬ－１２／２３抗体、抗ＣＴＬＡ－４抗体、抗ＣＤ３０抗体、抗ＣＤ４抗体、抗ＣＧＲＰ受容体抗体、抗ＣＤ３抗体、抗ＣＤ２０抗体、抗ＣＤ２５抗体、又は抗ＧＰ１１ｂ／１１１ａ抗体である。更なる態様では、抗体又はその抗体断片は、抗ＣＤ３０抗体である。

【０１０３】

様々な態様では、抗体又はその抗体断片は、細胞表面マーカーに特異的に結合する。更なる態様では、細胞表面マーカーは、ＣＤ３、ＣＤ４、ＣＤ５、ＣＤ２０、ＣＤ２５、又はグリコスフィンゴリピドである。なお更なる態様では、グリコスフィンゴリピドは、GD_2である。

【０１０４】

様々な態様では、抗体又はその抗体断片は、一本鎖抗体（ｓｃＦｖ）又はＦ’ａｂ断片である。なお更なる態様では、ｓｃＦｖは、ブロスマブ、イバリズマブ、エレヌマブ、アテゾリズマブ、レスリズマブ、ペムブロリズマブ、ニボルマブ、ラムシルマブ、イピリムマブ、ブレンツキシマブ、ウステキヌマブ、パニツマウマブ（ｐａｎｉｔｕｍａｕｍａｂ）、ラニビズマブ、ネシツマウマブ（ｎｅｃｉｔｕｍａｕｍａｂ）、ジヌツキシマブ、デノスマブ、エクスリズマブ（ｅｘｕｌｉｚｕｍａｂ）、ベバシズマブ、オマリズマブ、アダリムマブ、アベルマブ、デュルバルマブ、ブロダルマブ、ムロモノアブ（ｍｕｒｏｍｏｎｏａｂ）－ＣＤ３、アブシキシマブ、リツキシマブ、ダクリズマブ、インフリキシマブ、バシリキシマブ、パリビズマブ、トラスツズマブ、ゲムツズマブ、又はそれらの生物学的に活性なバリアントに由来する。

【０１０５】

様々な態様では、抗体又はその抗体断片は、Ｄ－ＳＡに共有結合している。

【０１０６】

様々な態様では、抗体又はその抗体断片は、Ｄ－ＳＡのバリアントに共有結合している。更なる態様では、Ｄ－ＳＡのバリアントは、Ｄ－トラプトアビジン、Ｄ－ｓｔｒｅｐ－ｔａｃｔｉｎ、Ｄ－ｓｔｒｅｐ－ｔａｃｔｉｎ　ＸＴ、又は一価Ｄ－ＳＡである。

【０１０７】

様々な態様では、Ｄ－ＳＡ又はそのバリアントは、Ｄ－ビオチンに特異的に結合する。

【０１０８】

様々な態様では、二重特異性ポリペプチドは、標識又は検出タグを更に含む。様々な更なる態様では、標識又は検出タグは、ソルターゼタグである。

【０１０９】

１．標識

様々な態様では、本明細書に記載の二重特異性ポリペプチド及び組成物は、１つ以上の標識又は検出タグ（例えば、ＦＬＡＧ（商標）タグ、ｍｙｃタグ、６Ｈｉｓ、及び蛍光融合タンパク質などのエピトープ又はタンパク質タグ）を更に含み得る。様々な態様では、標識（例えば、ＦＬＡＧ（商標）タグ）は、開示される二重特異性ポリペプチド（例えば、Ｄ－ＳＡ又はそのバリアントを含む二重特異性ポリペプチド）の構成要素に融合され得る。様々な態様では、開示される方法及び組成物は、融合タンパク質、又はそれをコードするポリヌクレオチドを更に含む。様々な態様では、二重特異性ポリペプチド又は融合タンパク質は、少なくとも１つのエピトープ提供アミノ酸配列（例えば、「エピトープタグ」）を含み、エピトープタグは、ｉ）タンパク質（例えば、Ｄ－ＳＡ又はそのバリアント）のＮ末端及び／若しくはＣ末端に付加されたエピトープタグ、又はｉｉ）タンパク質（例えば、Ｄ－ＳＡ又はそのバリアント）の領域に挿入されたエピトープタグ、及びタンパク質（例えば、Ｄ－ＳＡ又はそのバリアント）中のいくつかのアミノ酸を置き換えるエピトープタグから選択される。

【０１１０】

様々な態様では、本明細書に記載の二重特異性ポリペプチド及び組成物は、ポリグリシン及びソルターゼタグ（すなわち、Ｌｅｕ－Ｐｒｏ－Ｘｘｘ－Ｔｈｒ－Ｇｌｙ－Ｘｘｘ、Ｘｘｘは任意のアミノ酸である）を更に含み得る。そのようなタグは、例えば、（例えば、Ｄ－ＳＡとｓｃＦｖとの間での）ソルターゼライゲーションの実施において有用であり得る。

【０１１１】

当業者には理解されるように、タグは、ペプチドのＮ末端又はＣ末端に設置され得るが、より小さなタグは、合成タンパク質（例えば、Ｄ－ＳＡ）内の多くとも任意の位置に設置され得る。

【０１１２】

エピトープタグは、特定の抗体が生成され得るアミノ酸の短いストレッチであり、様々な態様では、生体又は培養細胞に添加されたタグ付けされたタンパク質を特異的に特定及び追跡することを可能にする。タグ付き分子の検出は、いくつかの異なる技術を使用して達成され得る。そのような技術の例としては、免疫組織化学、免疫沈降、フローサイトメトリー、免疫蛍光顕微鏡、ＥＬＩＳＡ、免疫ブロッティング（「ウェスタンブロッティング」）、及び親和性クロマトグラフィーが挙げられる。エピトープタグは、既知のエピトープ（例えば、抗体結合部位）を対象タンパク質に追加し、既知の、多くの場合高親和性の抗体の結合を提供し、それによって、生体又は培養細胞に添加されたタグ付きタンパク質を特異的に特定及び追跡することが可能になる。エピトープタグの例として、ｍｙｃ、Ｔ７、ＧＳＴ、ＧＦＰ、ＨＡ（ヘマグルチニン）、Ｖ５、及びＦＬＡＧタグが挙げられるが、これらに限定されない。最初の４つの例は、既存の分子に由来するエピトープである。対照的に、ＦＬＡＧは、高い抗原性のために設計された合成エピトープタグである（例えば、米国特許第４，７０３，００４号及び同第４，８５１，３４１号を参照されたい）。エピトープタグは、抗体による認識を超えた１つ以上の追加の機能を有し得る。

【０１１３】

様々な態様では、開示される方法、二重特異性ポリペプチド、及び組成物は、エピトープタグを含み、エピトープタグは、６～１５アミノ酸の長さを有する。代替的な態様では、エピトープタグは、９～１１アミノ酸の長さを有する。開示される方法及び組成物はまた、間隔をあけるか、又は直接タンデムのいずれかで、２つ以上のエピトープタグを含む二重特異性ポリペプチドを含み得る。更に、開示される方法及び二重特異性ポリペプチド又は組成物は、二重特異性ポリペプチドがその生物学的活性（複数可）（例えば、「機能的」）を維持する限り、２、３、４、５個、又は更に多くのエピトープタグを含み得る。

【０１１４】

様々な態様では、エピトープタグは、ＶＳＶ－Ｇタグ、ＣＤタグ、カルモジュリン結合ペプチドタグ、Ｓタグ、Ａｖｉｔａｇ、ＳＦ－ＴＡＰタグ、ｓｔｒｅｐタグ、ｍｙｃタグ、ＦＬＡＧタグ、Ｔ７タグ、ＨＡ（ヘマグルチニン）タグ、Ｈｉｓタグ、ＧＳＴタグ、又はＧＦＰタグであり得る。これらのタグの配列は、文献に記載されており、当業者に周知である。

【０１１５】

本明細書に記載のように、「免疫学的結合」という用語は、抗原のエピトープ（例えば、エピトープタグ）と抗体又はその断片の抗原特異的部分との間の非共有結合形態の結合である。抗体は、好ましくはモノクローナルであり、使用されるそれぞれのエピトープタグ（複数可）に特異的である必要がある。抗体には、マウス、ヒト、及びヒト化抗体が含まれる。抗体断片は、当業者に知られており、とりわけ、一本鎖Ｆｖ抗体断片（ｓｃＦｖ断片）及びＦａｂ断片を含む。この抗体は、通常のハイブリドーマ及び／又は他の組換え技術によって産生され得る。多くの抗体は、市販されている。

【０１１６】

既知のタンパク質のドメインから、又は全タンパク質若しくはタンパク質及びペプチドからの二重特異性ポリペプチドの構築は、周知である。概して、所望のタンパク質及び／又はペプチド部分をコードする核酸分子は、遺伝子操作技術を使用して連結され、単一の

作動可能に連結された融合オリゴヌクレオチドを作製する。適切な分子生物学的技術は、Sambrook et al.（Molecular Cloning: A laboratory manual Second Edition Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold spring harbor,NY,USA,１９８９）に見出され得る。様々なリンカーによって結合されたもの及びペプチドタグを含有するものを含む遺伝子操作された複数ドメインタンパク質の例は、以下の特許文献において見出され得る：米国特許第５，９９４，１０４号（“Interleukin－１２ fusion protein”）、米国特許第５，９８１，１７７号（“Protein fusion method and construction”）、米国特許第５，９１４，２５４号（“Expression of fusion polypeptides transported out of the cytoplasm without leader sequences”）、米国特許第５，８５６，４５６号（“Linker for linked fusion polypeptides”）、米国特許第５，７６７，２６０号（“Antigen－binding fusion proteins”）、米国特許第５，６９６，２３７号（“Recombinant antibody－toxin fusion protein”）、米国特許第５，５８７，４５５号（“Cytotoxic agent against specific virus infection”）、米国特許第４，８５１，３４１号（“Immunoaffinity purification system”）、米国特許第４，７０３，００４号（“Synthesis of protein with an identification peptide”）、及びWO９８／３６０８７（“Immunological tolerance to HIV epitopes”）。

【０１１７】

対象融合タンパク質内の官能化ペプチド部分（エピトープタグ）の配置は、官能化ペプチド部分の活性、及び融合における少なくとも実質的なＴＣＲなどの融合タンパク質の生物学的活性を維持する必要性によって影響され得る。官能化ペプチドの配置のための２つの方法は、Ｎ末端、及び挿入に対する順応性を示すタンパク質部分内の位置である。これらは、機能化ペプチドが挿入され得る唯一の位置ではないが、それらは良い例として役立ち、例示として使用されるであろう。他の適切な挿入位置は、種々の位置で試験ペプチドコード配列（例えば、ＦＬＡＧペプチドをコードする配列）を構築物に挿入し、次いで、融合物を構築するために使用される特定の部分に適切であるアッセイを使用して、得られた融合物を適切な生物学的活性及び機能化ペプチド活性についてアッセイすることによって特定され得る。対象タンパク質の活性は、本明細書に記載のものを含む、様々な既知の技術のうちのいずれかを使用して測定され得る。

【０１１８】

Ｆ．Ｌ－ビオチンを含むコンジュゲート

一態様では、治療剤又は診断剤に共有結合したＬ－ビオチンを含む、コンジュゲートが、開示される。

【０１１９】

様々な態様では、コンジュゲートは、治療剤に共有結合している。更なる態様では、治療剤は、化学療法剤である。化学療法剤の例としては、ドキソルビシン、シスプラチン、５－フルオロウラシン（ｆｌｕｏｒｏｕｒａｃｉｎ）（５－ＦＵ）、エトポシド、ダウノルビシン、カンプトテシン（ｃａｍｐｔｏｔｈｅｓｉｎ）、メトトレキサート、カルボプラチン、又はオキサリプラチンが挙げられるが、これらに限定されない。

【０１２０】

様々な態様では、コンジュゲートは、診断剤に共有結合している。更なる態様では、診断剤は、がん診断剤である。

【０１２１】

Ｇ．薬学的組成物

一態様では、有効量の開示される二重特異性ポリペプチドと、薬学的に許容される担体と、を含む薬学的組成物が、開示される。更なる態様では、薬学的組成物は、有効量の、開示される二重特異性ポリペプチドと、薬学的に許容される担体と、を含む組成物を含む。

【０１２２】

様々な態様では、二重特異性ポリペプチドは、一本鎖抗体（ｓｃＦｖ）又はＦ’ａｂ断片と、アミノ酸配列ＡＥＡＧＩＴＧＴＷＹＮＱＬＧＳＴＦＩＶＴＡＧＡＤＧＡＬＴＧＴＹＥＳ　ＡＶＧＮＡＥＳＲＹＶＬＴＧＲＹＤＳＡＰＡＴＤＧＳＧＴＡＬＧＷＴＶＡＷＫＮＮＹＲＮＡＨＳ　ＡＴＴＷＳＧＱＹＶＧＧＡＥＡＲＩＮＴＱＷＬＬＴＳＧＴＴＥＡＮＡＷＫＳＴＬＶＧＨＤＴＦＴＫＶＫＰＳＡＡＳ（配列番号８）に対して９０％～９９％の同一性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチドと、を含み、アミノ酸配列における各アミノ酸は、Ｄ－アミノ酸である。様々な更なる態様では、二重特異性ポリペプチドは、Ｄ－ＳＡ又はそのバリアントに共有結合した抗体又はその抗体断片を含む。

【０１２３】

様々な態様では、二重特異性ポリペプチドは、治療剤又は診断剤に共有結合したＬ－ビオチンを含む。

【０１２４】

組成物は、様々な投与経路のいずれかによる投与のために製剤化することができ、１つ以上の生理学的に許容される賦形剤を含んでいてもよく、これは投与経路に応じて様々であってもよい。本明細書で使用される場合、「賦形剤」という用語は、「担体」又は「希釈剤」とも称され得るものを含む、任意の化合物又は物質を意味する。薬学的及び生理学的に許容される組成物を調製することは、当該技術分野では日常的であると考えられ、したがって、当業者は、必要に応じて、多数の当局に指導を求めることができる。

【０１２５】

本明細書に開示される薬学的組成物は、経口投与又は非経口投与のために調製され得る。非経口投与のために調製される薬学的組成物には、静脈内（又は動脈内）、筋肉内、皮下、腹腔内、経粘膜（例えば、鼻腔内、膣内、又は直腸）、又は経皮（例えば、局所）投与のために調製されるものが含まれる。エアロゾル吸入もまた、ナノ粒子を送達するために使用され得る。したがって、組成物は、水、緩衝水、生理食塩水、緩衝生理食塩水（例えば、ＰＢＳ）などの水性担体を含むが、これらに限定されない許容される担体中に溶解又は懸濁されたナノ粒子を含む、非経口投与のために調製され得る。含まれる賦形剤のうちの１つ以上は、ｐＨ調節剤及び緩衝剤、張力調整剤、湿潤剤、洗剤などの生理学的状態に近似させるのを助けることができる。組成物が、固体成分（経口投与のためのものであり得る）を含む場合、賦形剤のうちの１つ以上は、結合剤又は充填剤として機能することができる（例えば、錠剤、カプセルなどの製剤化のために）。組成物が、皮膚又は粘膜表面への適用のために製剤化される場合、賦形剤のうちの１つ以上は、クリーム、軟膏などの製剤化のための溶媒又は乳化剤であり得る。

【０１２６】

薬学的組成物は、滅菌されてもよく、従来の滅菌技術によって滅菌されてもよく、又は滅菌濾過されてもよい。水溶液は、そのまま使用するために包装されてもよく、又は本開示によって包含される凍結乾燥された凍結乾燥調製剤を、投与前に滅菌水性担体と合わせてもよい。薬学的組成物のｐＨは、典型的には、３～１１（例えば、約５～９）、又は６～８（例えば、約７～８）であろう。固体形態で得られた組成物は、複数の単回投与単位で包装されてもよく、各々が所定量の上述の１つ以上の薬剤を含む（例えば、錠剤又はカプセルの密封された包装）。固体形態の組成物はまた、局所的に適用可能なクリーム又は軟膏のために設計された圧縮可能なチューブなど、柔軟な量のための容器で包装されてもよい。

【０１２７】

様々な態様では、薬学的組成物は、静脈内投与のために製剤化されている。

【０１２８】

Ｈ．疾患又は状態を治療する方法

一態様では、疾患又は状態の治療を必要とする対象において疾患又は状態を治療する方法であって、方法が、（ａ）対象に、有効量の開示される二重特異性ポリペプチドを投与することと、（ｂ）その後、対象に、治療剤に共有結合したＬ－ビオチンを含む、有効量の組成物を投与することと、を含み、Ｄ－ＳＡ又はそのバリアントが、Ｌ－ビオチンに特異的に結合する、方法が、開示される。

【０１２９】

当業者によって理解されるように、高親和性でビオチンに結合する他のタンパク質（すなわち、ストレプトアビジン以外のタンパク質）を含む二重特異性ポリペプチドも、開示される方法で使用され得る。したがって、例えば、様々な態様では、アビジンは、ストレプトアビジン（例えば、Ｌ－アビジン、Ｄ－アビジン）の代わりに使用され得る。

【０１３０】

本明細書に記載の組成物のうちのいずれかは、「組み合わせ」として投与され得る。

【０１３１】

本明細書に記載の薬学的組成物は、対象（例えば、ヒト患者）に、臨床疾患の発病を遅延、低減、又は好ましくは予防するのに十分な量で投与され得る。したがって、様々な態様では、患者は、ヒト患者であり得る。治療用途において、組成物は、既にがん（又は自己免疫疾患若しくは障害）を有するか、又はがん（又は自己免疫疾患若しくは障害）と診断された対象（例えば、ヒト患者）に、徴候若しくは症状を少なくとも部分的に改善するか、又は状態の症状、その合併症、及び結果の進行を阻害する（及び好ましくは阻止する）のに十分な量で投与され得る。様々な態様では、組成物は、既にがん（又は自己免疫疾患若しくは障害）を有するか、又はがん（又は自己免疫疾患若しくは障害）と診断された対象（例えば、ヒト患者）に投与され得る。様々な態様では、組成物は、既にがんを有するか、又はがんと診断され、かつ自己免疫疾患若しくは障害を有するか、又は自己免疫疾患若しくは障害と診断された対象（例えば、ヒト患者）に、徴候若しくは症状を少なくとも部分的に改善するか、又は状態の症状、その合併症、及び結果の進行を阻害する（及び好ましくは阻止する）のに十分な量で投与され得る。これを達成するのに十分な量を「治療有効量」と定義する。治療有効量の薬学的組成物は、治癒を達成する量であり得るが、その転帰は、達成され得るいくつかのうちの１つに過ぎない。前述のとおり、治療効果量は、がん（又は自己免疫疾患若しくは障害）の発病若しくは進行が、遅延、妨害、若しくは予防されるか、又はがん（又は自己免疫疾患若しくは障害）の症状が、改善される治療を提供する量を含む。症状のうちの１つ以上は、それほど深刻ではない場合がある。治療された個体では、回復が加速され得る。

【０１３２】

この使用に有効な量は、がんの重症度並びに対象の体重及び一般的な状態及び健康に依存し得るが、概して、対象当たりの用量当たり約０．１ｍｇ／ｋｇ体重～約１０．０ｍｇ／ｋｇ体重の範囲である。初回投与及びブースター投与のための好適なレジームは、初回投与、続いて、後続の投与による毎時、毎日、毎週、又は毎月１回以上の間隔での反復投与によって典型化される。例えば、対象は、用量当たり約０．１ｍｇ／ｋｇ体重～約１０ｍｇ／ｋｇ体重の範囲のナノ粒子を週に１回以上（例えば、週に２、３、４、５、６、又は７回以上）受けることができる。例えば、対象は、週に０．１ｍｇ／ｋｇ体重～１０ｍｇ／ｋｇ体重（例えば、０．３、１．０、３．０、１０．０ｍｇ／ｋｇ体重）の用量を受けることができる。対象はまた、２週間又は３週間に１回、用量当たり０．１ｍｇ／ｋｇ体重～１０ｍｇ／Ｋｇ体重の範囲でナノ粒子を受けることができる。本明細書に開示される薬学的組成物中のナノ粒子の総有効量は、ボーラス又は比較的短い期間にわたる注入のいずれかとして単回用量として哺乳動物に投与され得るか、又は複数の用量がより長い期間にわたって投与される分割治療プロトコル（例えば、４～６、８～１２、１４～１６、又は１８～２４時間ごと、又は２～４日、１～２週間ごと、又は月に１回の用量）を使用して投与され得る。代替的には、血液中の治療上有効な濃度を維持するのに十分な連続静脈内注入もまた本開示の範囲内である。

【０１３３】
本明細書に記載の組成物内に存在し、哺乳動物（例えば、ヒト）に適用される本明細書に開示される方法において使用される治療剤のうちの１つ以上の治療有効量は、（上記のように）年齢、体重、及び他の一般的な状態における個々の差異を考慮して、当業者によって決定され得る。
【０１３４】
本明細書に開示される併用療法は、１つ以上の薬学的組成物として投与され得、別個の場合、任意の順序で同時に又は順次に投与され得る。
【０１３５】
様々な態様では、組成物は、等量又は不等量の２つ以上のそのようなコンポンドの混合物を含み得る。
【０１３６】
薬剤の特定の組み合わせは、多くの要因、例えば、特定の種類のがん、がんの重症度、任意の併存疾患、及び患者の健康に応じて変化し得る。
【０１３７】
本明細書に開示される組成物のうちのいずれかの組み合わせが同じ患者に投与される場合、それらは、単一の製剤（例えば、共製剤）、又は同時に若しくは順次に投与され得る別個の製剤（同じ又は異なる場合がある）で投与され得る。
【０１３８】
様々な態様では、有効量は、治療有効量である。様々な更なる態様では、有効量は、予防有効量である。
【０１３９】
様々な態様では、対象は、哺乳動物である。様々な更なる態様では、対象は、ヒトである。
【０１４０】
様々な態様では、対象は、投与ステップの前に、疾患又は状態の治療が必要であると診断されている。様々な更なる態様では、方法は、疾患又は状態の治療を必要とする対象を特定するステップを更に含む。
【０１４１】
様々な態様では、本方法は、疾患を治療する。例示的な疾患としては、がん、非ホジキンリンパ腫、多発性硬化症、クローン病、関節リウマチ、喘息、黄斑変性、乾癬、ホジキンリンパ腫、発作性夜間ヘモグロビン尿症、又はＸ連鎖性低リン血症が挙げられるが、これらに限定されない。更なる態様では、疾患は、がんである。なお更なる態様では、がんは、原発がん又は二次がんである。更に更なる態様では、原発がん又は二次がんは、肉腫、がん腫、脳腫瘍、乳がん、腎臓がん、膵臓がん、肺がん、肝臓がん、リンパ腫、前立腺がん、結腸がん、卵巣がん、胃腸がん、結腸直腸がん、皮膚がん、甲状腺がん、精巣がん、子宮内膜がん、黒色腫、神経膠腫、白血病、神経芽細胞腫、子宮頚がん、慢性骨髄増殖性疾患、骨髄異形成症候群、血液がん、骨髄増殖性腫瘍、非小細胞肺がん、胃食道（ｇａｓｔｒｏｅｓｐｈａｇｅａｌ）接合部がん、膀胱がん、メルケル細胞がん、尿路上皮膚がん、又は形質細胞腫瘍（骨髄腫）である。より更なる態様では、がんは、神経芽細胞腫である。
【０１４２】
様々な態様では、方法は、状態を治療する。例示的な状態としては、血管形成術における血栓の予防、腎移植拒絶、片頭痛の予防、ＨＩＶ感染、又は骨損失が挙げられるが、これらに限定されない。
【０１４３】
様々な態様では、治療剤は、二重特異性ポリペプチドの少なくとも１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、又は２４時間後に投与される。更なる態様では、治療剤は、二重特異性ポリペプチドの２４時間後に投与される。なお更なる態様では、治療剤は、二重特

異性ポリペプチドの４８時間後に投与される。更に更なる態様では、治療剤は、二重特異性ポリペプチドの１週間後に投与される。より更なる態様では、治療剤は、二重特異性ポリペプチドの１週間以上後に投与される。

【０１４４】

様々な態様では、治療剤は、化学療法剤である。化学療法剤の例としては、ドキソルビシン、シスプラチン、５－フルオロウラシン（ｆｌｕｏｒｏｕｒａｃｉｎ）（５－ＦＵ）、エトポシド、ダウノルビシン、カンプトテシン（ｃａｍｐｔｏｔｈｅｓｉｎ）、メトトレキサート、カルボプラチン、又はオキサリプラチンが挙げられるが、これらに限定されない。

【０１４５】

様々な態様では、Ｄ－ＳＡ又はそのバリアントは、Ｌ－ビオチンに特異的に結合する。

【０１４６】

Ｉ．キット

一態様では、キットであって、開示される二重特異性ポリペプチドと、（ａ）治療剤、（ｂ）Ｌ－ビオチン、（ｃ）疾患又は病態の治療に関連して、二重特異性ポリペプチドを投与するための説明書、及び（ｄ）疾患又は病態を治療するための説明書から選択される１つ以上と、を含む、キットが、開示される。

【０１４７】

様々な態様では、治療剤は、化学療法剤である。化学療法剤の例としては、アルキル化剤、代謝拮抗剤、抗腫瘍性抗生物質剤、有糸分裂阻害剤、及びｍＴｏｒ阻害剤が挙げられるが、これらに限定されない。

【０１４８】

様々な態様では、化学療法剤は、抗腫瘍剤である。更なる態様では、抗腫瘍性抗生物質剤は、ドキソルビシン、ミトキサントロン、ブレオマイシン、ダウノルビシン、ダクチノマイシン、エピルビシン、イダルビシン、プリカマイシン、マイトマイシン、ペントスタチン、及びバルルビシン、又はそれらの薬学的に許容される塩から選択される。

【０１４９】

様々な態様では、化学療法剤は、代謝拮抗剤である。更なる態様では、代謝拮抗剤は、ゲムシタビン、５－フルオロウラシル、カペシタビン、ヒドロキシ尿素、メルカプトプリン、ペメトレキセド、フルダラビン、ネララビン、クラドリビン、クロファラビン、シタラビン、デシタビン、プララトレキサート、フロキサリジン、メトトレキサート、及びチオグアニン、又はそれらの薬学的に許容される塩から選択される。

【０１５０】

様々な態様では、化学療法剤は、アルキル化剤である。更なる態様では、アルキル化剤は、カルボプラチン、シスプラチン、シクロホスファミド、クロラムブシル、メルファラン、カルムスチン、ブスルファン、ロムスチン、ダカルバジン、オキサリプラチン、イホスファミド、メクロレタミン、テモゾロミド、チオテパ、ベンダムスチン、及びストレプトゾシン、又はそれらの薬学的に許容される塩から選択される。

【０１５１】

様々な態様では、化学療法剤は、有糸分裂阻害剤である。なお更なる態様では、有糸分裂阻害剤は、イリノテカン、トポテカン、ルビテカン、カバジタキセル、ドセタキセル、パクリタキセル、エトプシド（ｅｔｏｐｓｉｄｅ）、ビンクリスチン、イキサベピロン、ビノレルビン、ビンブラスチン、及びテニポシド、又はそれらの薬学的に許容される塩から選択される。

【０１５２】

様々な態様では、化学療法剤は、ｍＴｏｒ阻害剤である。なお更なる態様では、ｍＴｏｒ阻害剤は、エベロリムス、シロリウムス（ｓｉｒｏｌｉｕｍｕｓ）、及びテムシロリムス、又はそれらの薬学的に許容される塩から選択される。

【０１５３】

様々な態様では、治療剤は、Ｌ－ビオチンに共有結合している。

【０１５４】
様々な態様では、二重特異性ポリペプチド及び治療剤は、共包装される。様々な更なる態様では、二重特異性ポリペプチド及び治療剤は、共製剤化されている。
【０１５５】
様々な態様では、疾患は、がんである。
【実施例】
【０１５６】
Ｊ．実施例
以下の実施例は、本明細書に特許請求される化合物、組成物、物品、デバイス、及び／又は方法がどのように作製及び評価されるかの完全な開示及び説明を当業者に提供するために提示され、純粋に本発明の例示であることを意図しており、本発明者らが自分たちの発明とみなすものの範囲を限定することを意図していない。数値（例えば、量、温度など）に関して精度を保証するように努力がなされてはいるが、いくらかの誤差及び偏差が考慮されるべきである。別段示されない限り、部は重量部であり、温度は、℃であるか、又は周囲温度であり、圧力は、大気圧又はその付近である。
【０１５７】
実施例は、本発明を例示するために本明細書に提供され、いかなる方法でも本発明を限定するものと解釈されるべきではない。実施例は、本発明を例解するために本明細書に提供され、いかなる方式でも本発明を限定するものと解釈されるべきではない。
【０１５８】
１．提案された戦略
本明細書で詳述されるように、鏡像ＳＡ及びビオチン（Ｄ－ＳＡ／Ｌ－ビオチン）は、Ｌ－ＳＡ／Ｄ－ビオチン系で遭遇する制限を回避するための見事な解決策を提供する。例えば、Ｄ－タンパク質は、Ｌ－プロテアーゼに対して不活性であり、したがって、免疫系へのＭＨＣ提示のために消化されることができない。この特性は、Ｄ－ＳＡがＬ－ＳＡと比較して、免疫原性が大幅に減少し、半減期が増加することを意味する。加えて、対称性は、鏡像対（Ｄ－ＳＡ／Ｌ－ビオチン）が天然対（Ｌ－ＳＡ／Ｄ－ビオチン）とまったく同じ並外れた親和性を有することを規定する。重要なことに、Ｄ－ビオチンがＤ－ＳＡへの結合が最小限であることが発見されている。したがって、Ｄ－ＳＡ／Ｌ－ビオチンは、ビオチン直交ストレプトアビディング系（ＢＯＳＳ）として使用され得ることを提案する。理論に拘束されることを望まないが、Ｄ－ＳＡの低い免疫原性とともに、ＢＯＳＳの直交性が、天然のＳＡ／ビオチンの限界を克服すると仮定される。
【０１５９】
ＢＯＳＳは、鏡像ＳＡ及びビオチン（Ｄ－ＳＡ及びＬ－ビオチン）を使用することによって作製され得る。鏡像、又はＤ－タンパク質（鏡像Ｄ－アミノ酸で構成される）は、Ｌ－プロテアーゼ[21]に対して不活性であり、したがって、免疫系にＭＨＣを提示するために消化されることができない[22]。これらの特性は、Ｄ－ＳＡが、Ｌ－ＳＡと比較して、免疫原性が大幅に減少し、半減期が増加することを意味する。天然のＳＡ（Ｌ－ＳＡ）及び天然のビオチン（Ｄ－ビオチン）は、並外れた親和性を有するため、Ｄ－ＳＡ及びＬ－ビオチンは、まったく同じ親和性を有することもまた（鏡像対称性の法則によって）真実である。しかしながら、低い免疫原性、増加した半減期、及びＤ－ＳＡとＬ－ビオチンとの間の強い結合相互作用は、ＢＯＳＳを作製するのに十分ではない。ＢＯＳＳが成功するためには、天然のＤ－ビオチンがＤ－ＳＡへの最小限の結合を示すこと（すなわち、直交性）を実証することが有用であり得る。鏡像ＳＡの有用性は、最近、イムノアッセイ診断におけるビオチン干渉を回避しようとした短い事前印刷で報告された[40]。
【０１６０】
Ｄ－タンパク質を組換え的に産生することができないため、Ｄ－ＳＡはＤ－アミノ酸を使用した化学タンパク質合成（ＣＰＳ）を介して化学的に合成される。このサイズのタンパク質（１２７アミノ酸）は、固相ペプチド合成（ＳＰＰＳ）を介して複数のセグメントでの合成（通常、樹脂上の凝集のために約６０アミノ酸に制限される）を必要とする[41]

。次いで、ネイティブケミカルライゲーション（ＮＣＬ）[42]を、セグメントを一緒に連結するために使用する（図３）。ＮＣＬは、Ｎ末端Ｃｙｓを有する一方のペプチド、及びＣ末端チオエステルを有する他方のペプチドを必要とする。チオエステルペプチドは、ＳＰＰＳ中に樹脂上のＣ末端ヒドラジンを使用して作製される。アジドへの切断後の変換は、ヒドラジンをより良い脱離基にし、次いで、様々なチオールによって置き換えられてチオエステルを作製することができる。次いで、Ｃ末端チオエステルを別個のセグメント上のＮ末端Ｃｙｓと反応させることによって、ＮＣＬを達成する。この反応は、２つのセグメントの間に可逆的なチオエステル結合を形成し、Ｓ－アシルからＮ－アシルへのシフトのために十分に近いＮ末端をもたらし、不可逆的な天然アミド結合を形成する（図３）。多くのタンパク質（ＳＡを含む）は、Ｃｙｓ残基を欠くため、天然のＮ末端Ａｌａ残基は、ＮＣＬで使用するために、システイン残基で置き換えられ得る。ライゲーション後、Ｃｙｓは、単純な脱硫反応で天然のＡｌａに変換され得る[43]。この戦略は、利用可能なライゲーション接合部の数を大幅に増加させる。

【０１６１】

ＳＡの大きさのタンパク質は、長い間、ＣＰＳによって作製するのが困難であると考えられてきた。最近、このサイズのタンパク質の合成をより実現可能にするツールが開発された。これらのツールのうちの１つは、Ａｕｔｏｍａｔｅｄ Ｌｉｇａｔｏｒ（Ａｌｉｇａｔｏｒ）[23]であり、ペプチドセグメントの数及びその長さを最小限に抑え、ライゲーション接合部を最適化するパラメータに基づいて、最適な合成戦略を予測するように開発されたプログラムである。このプログラムは、タンパク質を合成するための最大の律速ステップのうちの１つであるＣＰＳの試行錯誤を大幅に低減する。加えて、ペプチド溶解性が、律速ステップである場合がある。タンパク質をセグメントに分割すると、多くの場合、高密度の疎水性又は負に荷電した残基を有する領域が露出し、溶解性の低下をもたらし、セグメント及びライゲーションの精製が困難になる。不溶性ペプチドに対抗するために、ヘルピングハンド（ＨＨ）と呼ばれるトレースレスリンカーを使用した。可溶化残基（通常はＬｙｓ又はＡｒｇ）で官能化され得る、一級アミンに結合するＨＨ[44、45]（図４）。完全なタンパク質が組み立てられ、溶解度の増強がもはや必要とされなくなった後、穏やかな条件下でＨＨが除去され、天然アミノ酸側鎖を得る。

【０１６２】

２．Ｌ－ビオチン及びＬ－ストレプトアビジン結合の特性評価

緊密な交差結合は、ＢＯＳＳの直交性を損なうため、Ｄ－ビオチンのＤ－ストレプトアビジンへの結合を特性評価する必要がある。鏡像対称性の法則により、Ｌ－ビオチンのＬ－ストレプトアビジンへの結合挙動は、Ｄ－ビオチン相互作用と同等である。まず、対照等温滴定熱量測定（ＩＴＣ）実験を実施した。Ｄ－ビオチンをＬ－ＳＡに滴定して、組換えＳＡ（Ｎｏｖｕｓ Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌｓ）の折り畳み及び活性を確認した。この滴定データを、図２Ａに示されるように、Ｏｒｉｇｉｎソフトウェアを使用して適合させ、結合化学量論（Ｎ＝０．９７±０．００３部位）及びエンタルピー（ΔＨ＝－２７．７２±０．１８ｋｃａｌ／ｍｏｌ）を計算した。これらの値は文献値と一致した[27、39]。Ｌ－ＳＡとＤ－ビオチンとの間の並外れて強い相互作用は、この実験からのK_D値の決定を妨げるが、結合定数はより感度の高い技術を使用して測定され、４．８ｘ１０$^{-14}$Ｍであることが見出された[1]。

【０１６３】

次いで、ＩＴＣ実験をＬ－ビオチン（Ｃａｒｂｏｓｙｎｔｈ）及びＬ－ＳＡで繰り返した。この相互作用は、Ｌ－ビオチンとＬ－ＳＡとの間の仮定された立体化学的ミスマッチへのより弱い結合を示すことが予想された。この場合、結合は、全てのパラメータを良好な信頼性で適合することができるように十分に弱かった（Ｎ＝０．９６±０．０８部位、ΔＨ＝－１０．０９±１．２６ｋｃａｌ／ｍｏｌ、及びK_D＝６．１３±２．１６μＭ、図２Ｂ）。この残余結合は、天然の対よりも約１０億倍弱く、Ｌ－ビオチンがＤ－ビオチンの存在下でＬ－ＳＡに結合しないことを示唆する。理論に拘束されることを望まないが、これらのデータは、ＢＯＳＳがＤ－ビオチンと非常に直交し、ＢＯＳＳ ＰＴＩが内因

性ビオチンの干渉なしでインビボでの使用に好適であることを示唆する。

【０１６４】

３．Ｌ－ストレプトアビジンの化学合成

合成されるストレプトアビジンは、理想的なビオチン親和性及び四量体安定性を有し、最も一般的に使用される形態である１２７残基「コア」ＳＡである[46]。Ｌ－ＳＡは、初期のトラブルシューティングコストを節約し、合成Ｌ－ＳＡを組換えＬ－ＳＡと比較することによって合成及び折り畳みの品質を評価するために、Ｄ－合成の前に合成された。Ｄ－ＳＡが同じ手順を使用して作製される場合、合成Ｌ－ＳＡがＤ－ビオチンに対して有するのと同一のＬ－ビオチンに対する親和性を有するため、この検証は、実施された。Ａｌｉｇａｔｏｒ[23]によって導かれた、３つのセグメントの合成戦略（図５に示されるＳＡ１、ＳＡ２、及びＳＡ３）。ＳＡ１及びＳＡ２を、Ｃ末端上にヒドラジドを有して合成した。ＳＡ３をペプチド酸として作製した。

【０１６５】

３つのペプチド全てをＳＰＰＳを介して合成し、逆相ＨＰＬＣ（ＲＰ－ＨＰＬＣ）を介して精製した。ＳＡ１及びＳＡ２は、チオエステルに変換された後のＮＣＬでの使用のためにＣ末端ヒドラジンを有して合成された。ＳＡ１は、ライゲーション緩衝液中では最小の溶解度を有するため、ヘルピングハンド（ＨＨ）分子をＮ末端に付加した。次いで、６つのＬｙｓ残基をＨＨに付加して、K_6－ＨＨ－ＳＡ１を作製し、これは、溶解性を劇的に改善した。ＳＡ２及びＳＡ３は、ＨＨ修飾なしでＮＣＬに十分に可溶性であった。K_6－ＨＨ－ＳＡ１をＳＡ２に成功裏にライゲーションして、K_6－ＨＨ－ＳＡ１－ＳＡ２を得た。次いで、ＳＡ３をK_6－ＨＨ－ＳＡ１－ＳＡ２にライゲーションして、K_6－ＨＨ－ＳＡ１－ＳＡ２－ＳＡ３を得た。この最終ライゲーションの後、ＨＨを１Ｍのヒドロキシルアミンを使用して切断し、続いて脱硫して、少量のＳＡ１－ＳＡ２－ＳＡ３（天然Ｌ－ＳＡ）を得た。全長産物は、ＬＣ－ＭＳを介して特性評価され（図６）、ＳＡ１のＳＰＰＳ中の不完全なＡｌａカップリングに起因する可能性が高い、小さなＡｌａ欠失を有する。

【０１６６】

ペプチドを、Ｆｍｏｃ固相ペプチド合成（ＳＰＰＳ）を５０μｍｏｌスケールで使用して、Ｐｒｅｌｕｄｅ　Ｘ機器（Ｇｙｒｏｓ　Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ）で合成した。脱保護サイクルは、２分間の４ｍＬのＤＭＦ中の２０％のピペリジンの処理を２回、続いて４ｍＬのＤＭＦを使用して３０秒間洗浄を３回、用いた。カップリングサイクルは、１．３ｍＬのＤＭＦ中の２００ｍＭのアミノ酸、１．３ｍＬのＤＭＦ中の１９５ｍＭのＨＡＴＵ、及び１ｍＬのＤＭＦ中の６００ｍＭのＮＭＭの添加からなる。次いで、樹脂及びカップリング試薬を、窒素バブリングを使用して室温で２５分間混合した後、４ｍＬのＤＭＦで３回洗浄した。ペプチド酸（ＳＡ３）の場合、０．０３ｍｍｏｌのＦｍｏｃ－ＡＡを２ｍＬのＤＭＦ／ＤＣＭに溶解し、次いで、０．３ｍｍｏｌのＤＩＰＥＡをＦｍｏｃ－ＡＡ溶液に添加した。この溶液を、３００ｍｇのポリスチレン２－コロロトリチルクロリド樹脂に添加し、ロティサリーで、室温で１時間混合した。未反応基を、２０ｍＬの１７：２：１のＤＣＭ：ＭｅＯＨ：ＤＩＰＥＡで樹脂をすすぐことによってキャッピングした。３００ｍｇの２－ＣＴＣ樹脂を、６ｍＬの１：１のＤＣＭ及びＤＭＦ並びに０．５３２ｍＬのＤＩＰＥＡ中の６１．２μｍｏｌのＦｍｏｃ－ヒドラジンで２時間反応させることによって、ポリスチレン２－クロロトリチルクロリド樹脂を、２－クロロトリチルＦｍｏｃ－ヒドラジンに変換した。未反応残基を、６０μＬのＭｅＯＨを添加し、１０分間反応させることによってキャッピングした。樹脂をＤＣＭ及びＤＭＦで十分にすすいだ。合成完了後、ペプチド樹脂をＤＣＭで完全に洗浄し、真空下で乾燥させた。

【０１６７】

シュードプロリンジペプチドを使用して、十分な純度のペプチドを合成した。ＧＴ、ＶＴ、ＤＳ、ＬＴ、ＫＳ、及びＤＴを、ＳＡ１－３の合成に利用した。ＴＭＢ－Ｇｌｙもまた、合成収率を増加させるために使用した。下線付きＡｌａ残基をＣｙｓ残基として合成して、ネイティブケミカルライゲーションを容易にし、次いで、脱硫して、天然のアラニ

ン残基を得た。

【０１６８】

ペプチド樹脂の切断は、５０μｍｏｌのペプチド樹脂当たり２．５％の水及び２．５％のＴＩＳを含有する６ｍＬのＴＦＡで３時間攪拌することによって達成された。Ｃｙｓを含有するペプチドについては、２．５％のＥＤＴを切断カクテルに添加した。ＴＦＡ溶液を、５０μｍｏｌの粗ペプチド当たり４０ｍＬの氷冷ジエチルエーテル中に沈殿させ、４℃及び４，０００ｇで１０分間遠心分離した。ペレットをエーテルで２回洗浄しながら上清をデカントした後、水中の５０％アセトニトリルに溶解し、一晩凍結乾燥した。次いで、各ペプチドを、Ｃ４（ＳＡ１）又はＣ１２（ＳＡ２及びＳＡ３）カラムのいずれかを用いた分取ＲＰ－ＨＰＬＣによって精製した。ＲＰ－ＨＰＬＣ及びＬＣ－ＭＳによるＳＡ１、ＳＡ２、及びＳＡ３の純度を図７に示す。

【０１６９】

４．ネイティブケミカルライゲーション、ヘルピングハンド除去、及び脱硫

ＳＡ１は、ネイティブケミカルライゲーション（ＮＣＬ）のために十分に可溶性ではなかったため、２つの別個のヘルピングハンド戦略が用いられた。まず、グルタミン酸ヘルピングハンドを、ＳＡ１中のＧｌｕ２でのＳＰＰＳ中にＦｍｏｃ保護アミノ酸として組み込み、次いで６個のリジン残基で官能化した。得られたペプチドは、溶解性を大幅に増加させ、非常に効率的にＮＣＬを受けたが、このヘルピングハンドの除去には複雑な問題があった。この失敗した試みの後、最終残留物のＦｍｏｃ除去後に、ＤｄａｐヘルピングハンドをＳＡ１のＮ末端に付加し、樹脂をＤＭＦで洗浄した。樹脂を、４ｍＬのＮＭＰ中の２００ｍＭのＤｄａｐ中で、３７℃で２４時間攪拌した。樹脂をＤＭＦで洗浄し、６つのリジン残基を、ＳＰＰＳを介してそれに付加した。このペプチドは、同じ増加した溶解度及びライゲーション効率を有したが、Ｄｄａｐは容易に除去された。

【０１７０】

チオール添加剤ＭＰＡＡ及びＴＣＥＰ還元剤を使用して、標準的な方法に従ってネイティブケミカルライゲーション反応を実施した。全てのライゲーション反応は、ペプチドヒドラジド法を用い、それによって、ペプチドを溶解させ、新鮮に調製した亜硝酸ナトリウム溶液（１５当量）を添加することによって、活性化緩衝液（６ＭのＧｕＨＣｌ、１００ｍＭのリン酸塩、ｐＨ３）中で２０分間、－２０℃で、活性化した（ヒドラジドのアシルアジドへの変換）。活性化後、ライゲーション緩衝液（６ＭのＧｕＨＣｌ、１００ｍＭのリン酸塩、ｐＨ７）中のｐＨ７の新鮮に調製されたＭＰＡＡを含有する溶液を添加し、最終ｐＨを７に調整して、チオリシス及びライゲーション反応を開始した。（分析ＨＰＬＣ及びＬＣ／ＭＳに基づいて）完了すると、反応物を、６ＭのＧｕＨＣｌ中の新鮮に調製された１５０ｍＭのＴＣＥＰで処理し、水中の５％の酢酸で希釈し、５０００ｇで回転させ、上清を、分取ＨＰＬＣによって精製した。第２のライゲーションの後、ライゲーション緩衝液（６ＭのＧｕＨＣｌ、１００ｍＭのリン酸、ｐＨ７）中の２Ｍのヒドロキシルアミンを添加して、ライゲーション反応体積と１：１の最終組成物にし、室温で一晩反応させることによって、ヘルピングハンドを除去した。反応混合物を、数日間にわたってライゲーション緩衝液（６ＭのＧｕＨＣｌ、１００ｍＭのリン酸塩、ｐＨ７）中に透析し、緩衝液を１回交換した。脱硫は、金属を含まないラジカル媒介手順を使用して実施された。脱硫緩衝液（６ＭのＧｕＨＣｌ、１００ｍＭのリン酸塩、ｐＨ６．５）を使用して、溶液Ａ（１２０ｍＭのＶＡ－０４４及び２４０ｍＭの還元ＧＳＨ）及び溶液Ｂ（５００ｍＭのＴＣＥＰ）の２つのストック溶液を調製した。等体積の溶液Ａ及びＢを透析されたライゲーション反応に添加した。最終ｐＨを６．５に調整し、脱硫が完了するまで（約３時間）、室温で反応物を攪拌した。反応物を５％のＡｃＯＨで希釈し、５０００ｇで遠心分離し、溶液を、Ｃ４カラムでの分取ＨＰＬＣによって精製した。ＳＡ１及びＳＡ２ライゲーションのための精製されたライゲーション産物を図８に示す。ヘルピングハンドが除去された脱硫及び精製された全長合成ストレプトアビジンを図６に示す。

【０１７１】

Ｋ．預言的な実施例

１．Ｌ／Ｄ－ＳＡの化学合成、特性評価、及び薬物動態の最適化

ａ．合成

合成をスケールアップする前に、Ａｌａ欠失を除去するためのＳＡ１のＳＰＰＳのトラブルシューティングを行う。露出されたアミンは、Ａｌａカップリング後にアシル基でキャッピングされ、Ａｌａを完全にカップリングしていないペプチドが合成を進めるのを防ぐ。そのようなキャッピングされた産物は、切断され、ＲＰ－ＨＰＬＣ精製中に容易に分離される。次いで、全長Ｌ－ＳＡの合成は、小規模合成からのライゲーション手順を介して、事前に合成されたＳＡ２及びＳＡ３を使用してスケールアップされ得る。

【０１７２】

ＮＬＣは変性条件下で実施されるため、Ｌ－ＳＡは折り畳まれる必要がある。ＳＡは非常に安定したタンパク質であるが、組換えＳＡは、６Ｍのグアニジンチオシアネート中で完全に変性されている可能性がある[47]。この折り畳まれていないＳＡは、中性緩衝液に透析されると（シャペロンとは無関係に）自発的に再折り畳まれる[47]。化学的に合成されたＳＡは、組換えＳＡと同じ一次アミノ酸配列を有する。このため、組換えＳＡと同じ条件下で折り畳まれる。折り畳まれると、組換えＳＡと同じ活性を有する。この折り畳み手順は、Ｌ－ＳＡに対して使用する前に、組換えＳＡで再現される。最適化された合成手順を使用して、Ｄ－アミノ酸を使用してＤ－ＳＡ１、Ｄ－ＳＡ２、及びＤ－ＳＡ３を作製する。ＨＨは、アキラルであり、Ｌ－又はＤ－ペプチドのＮ末端に付加される。Ｎ末端K_6－ＨＨをＤ－ＳＡ１に付加し、溶解度を増加させ、ＮＣＬを促進する。最適化されたＮＣＬ、ＨＨ除去、脱硫、及び折り畳み手順を使用して、Ｄ－ＳＡを作製する（Ｄ－タンパク質は、Ｌ－タンパク質と同じように折り畳むため、最適化された手順は、両方のエナンチオマーを折り畳むように機能することが期待される）。

【０１７３】

ｂ．特性評価

合成及び折り畳み後、合成Ｄ－及びＬ－ＳＡのＣＤスペクトルを組換えタンパク質のＣＤスペクトルと比較して、折り畳み状態を確認する。ＳＡは、四量体状態にある場合にのみ、高い親和性でビオチンに結合する。このため、分析用超遠心分離（ＡＵＣ）及びサイズ排除クロマトグラフィー（ＳＥＣ）を用いてタンパク質のオリゴマー化状態を解析することもまた重要になる。ＳＥＣはまた、ＳＡ四量体複合体を精製し、凝集体及び／又は低次オリゴマー化状態を除去するためにも使用され得る。

【０１７４】

上で言及されるように、組換えＬ－ＳＡ及びＬ－ビオチンのK_Dを測定した。合成タンパク質の結合親和性が組換え体と同じかどうかは、ＩＴＣを使用して確認される。上記のＩＴＣ実験を、合成Ｌ－ＳＡ、次いでＤ－ＳＡで繰り返す。データは、Ｌ－ＳＡで観察されるものとほぼ同一であると予想される。このデータは、正しいタンパク質が作製され、正しく折り畳まれていることを裏付ける。

【０１７５】

Ｌ－ビオチンの組換えＳＡへの結合が特に興味深いものである。Ｄ－ビオチンは、そのような高親和性でＳＡに結合するように進化したので、Ｌ－ビオチンがまったく結合しないことは驚くべきことである。２つのエナンチオマー間の結合における差異の背後にある機序を明らかにするために、Ｌ－ＳＡを、Ｌ－ビオチンで結晶化し、Ｘ線結晶学を介してその構造を決定する。天然構造（Ｄ－ビオチン／Ｌ－ＳＡ）をミスマッチ構造（Ｌ－ビオチン／Ｌ－ＳＡ）と重ね合わせて、ＳＡがビオチンエナンチオマーを１０億倍の特異性でどのように区別するかを決定する。天然のＳＡ及びビオチンを使用した結晶成長条件が開発され、高解像度のデータが収集されている。同じ条件でＳＡをＬ－ビオチンと共結晶化させるため液滴を設定し、ミリモル濃度のＬ－ビオチンを得ている。これらの条件からの予備的な結晶は、サブ２Åの分解能で回折している。

【０１７６】

ｃ．薬物動態

Ｄ－ＳＡの生体内分布、半減期、及びクリアランス経路もまた興味深い。放射線研究と

比較してコストの減少及び安全性の増加のため、これらのデータを収集するために蛍光に基づく全身画像化（ＦＦＩ）を使用することへの関心が高まっている[48~50]。Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ ｏｆ Ｕｔａｈ’ｓ Ｐｒｅｃｌｉｎｉｃａｌ Ｒｅｓｅａｒｃｈ Ｒｅｓｏｕｒｃｅ（ＰＲＲ）と協力して、ＦＦＩを使用してこの研究を行う。マウスの毛が蛍光測定に干渉する可能性があるため、ＳＫＨ１無毛マウス（Ｃｈａｒｌｅｓ Ｒｉｖｅｒ）をこの研究のために選択した。Ａｌｅｘａ Ｆｌｕｏｒ ６４７ ＮＨＳエステル（マゼンタ色の蛍光を発する、ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ）を、アミン官能化Ｌ－ビオチンに付加して、蛍光標識Ｌ－ビオチン（Ｍａｇ－Ｌ－ビオチン）を作製する。蛍光標識Ｄ－ビオチンもまた同じ方法を使用して作製されるが、Ａｌｅｘａ Ｆｌｕｏｒ ５６８ ＮＨＳエステル（赤色の蛍光を発する、ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ）を使用してＲｅｄ－Ｄ－ビオチンを作製する。次いで、ＰＢＳ中のＭａｇ－Ｌ－ビオチン対Ｄ－ＳＡモノマーが１：１の混合物、及びＰＢＳ中のＲｅｄ－Ｄ－ビオチン対Ｌ－ＳＡが１：１の混合物を作製する。次いで、以前に行ったように、２００μＬのＰＢＳ中の４ｎｍｏｌの混合物をマウスに静脈内注射する[48]。インビボ蛍光を、ＩＶＩＳ Ｓｐｅｃｔｒｕｍ Ｉｎ Ｖｉｖｏ Ｉｍａｇｉｎｇ Ｓｙｓｔｅｍ（ＰｅｒｋｉｎＥｌｍｅｒ）を使用して、０、１、２、３、４、６、８、２４、及び４８時間で測定され、Ｄ－ＳＡ対Ｌ－ＳＡと比較する。各時点で、各臓器における蛍光体の濃度を追跡する。これは、Ｄ－ＳＡが循環からどのように除去されるかを示すであろう（すなわち、肝臓における蛍光濃度は、それが肝臓によって除去されることを意味する）。半減期は、異なる時点でのマウス全体の蛍光の総レベルを定量することによって決定される。統計学的有意性を確実にするために、この研究における時点及び測定は、８匹のマウスで実施される（群サイズは、パワー分析によって推定され、８０％のパワーは、ｐ＜０．０５で５０％の差を検出する）。生物学的変数として、性別に起因する任意の差を説明するために、同数の雄マウス及び雌マウスを使用する。

【０１７７】

ＰＲＲと協力して、ＳＫＨ１無毛マウスにおけるＤ－ＳＡの免疫原性も試験し、Ｌ－ＳＡと比較する。８匹のマウスの群に、０、１０、２０、及び４０日で、３０μｇ[51]のＬ－又はＤ－ＳＡのいずれかを静脈内注射する。血液試料は、１０日目、２０日目、及び４０日目の注射の前に採取され、以前に行われたように間接的なＥＬＩＳＡアッセイを使用して分析される[51]。Ｄ－ＳＡは、プレートのウェルに固定される。これは通常、ウェルのプラスチックとタンパク質上の疎水性残基との間の非特異的相互作用によって達成される。相互作用はキラル特異的ではないため、これはＬ－タンパク質を用いるのと同様にＤ－ＳＡを用いても同様に良好に機能するはずである。ブロッキングは、ウシ血清アルブミンを使用して達成され、次いで、ヤギ抗マウスＩｇＧ二次抗体－ホースラディッシュペルオキシダーゼコンジュゲート（ＴｈｅｒｍｏＦｉｓｈｅｒ）を添加して、任意の抗体がＤ－ＳＡに結合しているかどうかを調べる。理論に拘束されることを望まないが、Ｄ－ＳＡは、Ｌ－ＳＡと比較して最小限の免疫原性を有することが予想される。

【０１７８】

２．ＢＯＳＳ ＰＴＩの論証

ａ．ＢＯＳＳ標的化構築物

概念実証のために、Ｃｈｅｕｎｇ ｅｔ ａｌ．[7]によって以前に説明されたＳＡ ＰＴＩ法を、ＢＯＳＳを使用して再現する（ＢＯＳＳ ＰＴＩ）。５Ｆ１１抗体に由来する、本研究で使用された一本鎖可変断片（ｓｃＦｖ）を使用する。ｓｃＦｖは、抗体の重鎖及び軽鎖の可変領域の融合タンパク質である。これらの小さな抗体誘導体は、完全なサイズの抗体よりもはるかに速く、２４時間未満[52、53]で循環から除去され得る[9、10、20、35]。この特性は、薬物が投与される前に、非結合の前標的化剤が循環を迅速に除去するように、ＰＴＩに不可欠である。５Ｆ１１ｓｃＦｖは、灰白質及びシナプス接合部に濃縮されるグリコスフィンゴリピドである、GD_2に結合する。GD_2は、神経芽細胞腫（ＮＢ）を含むいくつかの種類の腫瘍で上方調節されている[7、54、55]。ＮＩＨが最も有望な腫瘍抗原のうちの１つとしてGD_2をランク付けする原因となったのは、この上方調節である[56]。Ｃｈｅｕｎｇ ｅｔ ａｌ．[7]は、ＳＡに融合されたｓｃＦｖを発現した。次

いで、彼らは、この融合物を前標的化ツールとして使用した。それらのｓｃＦｖ－ＳＡコンジュゲートは、全てＬ－アミノ酸から構成され、Ｅ．ｃｏｌｉで組換え的に発現された。Ｄ－タンパク質を組換え的に発現させる方法は現在存在しないため、コンジュゲーション化学を使用して、化学的に合成されたＤ－ＳＡを組換え的に発現されたＬ－５Ｆ１１ｓｃＦｖに結合させる。ｓｃＦｖは、公開された手順に従って発現されるが、Ｃ末端ソルターゼタグ（Ｌｅｕ－Ｐｒｏ－Ｘｘｘ－Ｔｈｒ－Ｇｌｙ－Ｘｘｘ、Ｘｘｘは任意のアミノ酸である）が追加される[57]。ソルターゼは、このタグを認識し、ＴｈｒとＧｌｙとの間で切断して、ｓｃＦｖのＣ末端上に酵素結合チオエステルを形成する。ｓｃＦｖに結合すると、ソルターゼは、オリゴグリシンモチーフのＮ末端アミンと優先的に反応する[57]。グリシンは、キラリティを有しないため、ソルターゼは、Ｄ－ＳＡのＮ末端に付加されたオリゴグリシンモチーフを認識する。このコンジュゲート（ｓｃＦｖ－Ｄ－ＳＡ）は、前標的化実験のために使用される。この構築物のＬバージョン（ｓｃＦｖ－Ｌ－ＳＡ）はまた、対照として、組換え発現によって作製される。

【０１７９】

ｂ．ＮＢ細胞におけるＢＯＳＳ　ＰＴＩ

細胞におけるｓｃＦｖ－Ｄ－ＳＡの有効性は、まず蛍光顕微鏡を使用して示される。神経芽細胞腫（ＮＢ）細胞（ＡＴＣＣからのＳＫ－Ｎ－ＳＨ）及び不死化ヒト大脳皮質脳細胞（ＡＴＣＣからのＨＢＥＣ－５ｉ）を培養する。健全な大脳皮質（ＣＣ）細胞は、ＮＢ細胞より５倍低いガングリオシドの密度を有し[55、58～61]、対照細胞株として機能する。４つの別個の実験が実施される：ｓｃＦｖ－Ｄ－ＳＡを有するＮＢ又はＣＣ細胞、及びｓｃＦｖ－Ｌ－ＳＡを有するＮＢ又はＣＣ細胞。以前の研究では、３時間のインキュベーション期間でのｓｃＦｖ構築物の５μＭの溶液は、それが細胞に結合するのに十分であるはずであることが示唆されている[48]。３時間後、培地を交換し、ＰＢＳ緩衝液ですすぎ、確実に過剰な（非結合の）ｓｃＦｖＬ／Ｄ－ＳＡが確実に除去されるようにする。次いで、Ｒｅｄ－Ｄ－ビオチン及びＭａｇ－Ｌ－ビオチンの１：１の混合物（各５μＭ）を添加する。結合に時間を置いた（３時間）後、培地を交換し、緩衝液ですすぐ。これらのステップの後、ｓｃＦｖ－Ｄ－ＳＡ及びｓｃＦｖ－Ｌ－ＳＡは、ＣＣ細胞よりもはるかに高い濃度でＮＢ細胞に結合し、ビオチンコンジュゲートは、Ｄ－及びＬ－ＳＡに結合するはずである。Ｒｅｄ－Ｄ－ビオチン及びＭａｇ－Ｌ－ビオチンの任意の交差結合があるかどうかは、蛍光顕微鏡を使用して決定する。Ｒｅｄ－Ｄ－ビオチンは、ｓｃＦｖ－Ｌ－ＳＡに排他的に結合するはずであり、Ｍａｇ－Ｌ－ビオチンは、ｓｃＦｖ－Ｄ－ＳＡに排他的に結合するはずである。加えて、競合するビオチンの欠如により、ｓｃＦｖ－Ｄ－ＳＡの方がｓｃＦｖ－Ｌ－ＳＡよりも高い蛍光シグナルが予想される。

【０１８０】

ｃ．マウスにおけるＢＯＳＳ　ＰＴＩ

上記の手順を使用して、ＦＦＩを使用して、マウスにおけるｓｃＦｖ－Ｌ－ＳＡ及びｓｃＦｖ－Ｄ－ＳＡの半減期及び生体内分布を決定する。この研究は、ＢＯＳＳ　ＰＴＩ実験のために、非結合の抗体が循環から除去されるまでにどれくらいの時間がかかるかを決定する。次いで、ＢＡＬＢ／ｃヌードマウス（Ｃｈａｒｌｅｓ　Ｒｉｖｅｒ）にＮＢ細胞を異種移植（ｘｅｎｏｇｒａｐｈｔ）するためのＰＲＲとの協業を実施する。これらのマウスは、異種移植片を受け入れ、ＦＦＩを促進するために無毛であるように免疫不全である。４ｎｍｏｌのｓｃＦｖ－Ｄ－ＳＡ及びｓｃＦｖ－Ｌ－ＳＡは、以前に公開された手順に従って、異種移植（ｘｅｎｏｇｒａｐｈｅｄ）及び非異種移植マウスに投与される[7]。次いで、非結合のｓｃＦｖ－Ｄ－ＳＡ及びｓｃＦｖ－Ｌ－ＳＡが除去されるまでの経験的に決定された時間が経過することを可能にする。次いで、５ｎｍｏｌ[48]のＲｅｄ－Ｄ－ビオチン及びＭａｇ－Ｌ－ビオチンの１：１の混合物を注射する。蛍光を、０、１、２、３、４、６、８、２４、及び４８時間で測定する。蛍光は、異種移植マウスにおいて腫瘍の周りに局在し、非異種移植マウスにおいて急速に消失することが予想される。ＢＯＳＳ　ＰＴＩ又はＳＡ　ＰＴＩでのＲｅｄ－Ｄ－ビオチン及びＭａｇ－Ｌ－ビオチンの交差結合はないはずである。加えて、干渉ビオチンの欠如も起因して、蛍光シグナルがＳＡ　ＰＴ

ＩよりもＢＯＳＳ　ＰＴＩでより明るくなると予想される。
【０１８１】
Ｌ．参考文献
１．Ｈｏｗａｒｔｈ，Ｍ．，Ｃｈｉｎｎａｐｅｎ，Ｄ．Ｊ．，Ｇｅｒｒｏｗ，Ｋ．，Ｄｏｒｒｅｓｔｅｉｎ，Ｐ．Ｃ．，Ｇｒａｎｄｙ，Ｍ．Ｒ．，Ｋｅｌｌｅｈｅｒ，Ｎ．Ｌ．，Ｅｌ－Ｈｕｓｓｅｉｎｉ，Ａ．，ａｎｄ Ｔｉｎｇ，Ａ．Ｙ．（２００６）Ａ ｍｏｎｏｖａｌｅｎｔ ｓｔｒｅｐｔａｖｉｄｉｎ ｗｉｔｈ ａ ｓｉｎｇｌｅ ｆｅｍｔｏｍｏｌａｒ ｂｉｏｔｉｎ ｂｉｎｄｉｎｇ ｓｉｔｅ，Ｎａｔ．Ｍｅｔｈｏｄｓ ３，２６７－２７３．
【０１８２】
２．Ｈｏｈｓａｋａ，Ｔ．，Ｋａｊｉｈａｒａ，Ｄ．，Ａｓｈｉｚｕｋａ，Ｙ．，Ｍｕｒａｋａｍｉ，Ｈ．，ａｎｄ Ｓｉｓｉｄｏ，Ｍ．（１９９９）Ｅｆｆｉｃｉｅｎｔ ｉｎｃｏｒｐｏｒａｔｉｏｎ ｏｆ ｎｏｎｎａｔｕｒａｌ ａｍｉｎｏ ａｃｉｄｓ ｗｉｔｈ ｌａｒｇｅ ａｒｏｍａｔｉｃ ｇｒｏｕｐｓ ｉｎｔｏ ｓｔｒｅｐｔａｖｉｄｉｎ ｉｎ ｉｎ ｖｉｔｒｏ ｐｒｏｔｅｉｎ ｓｙｎｔｈｅｓｉｚｉｎｇ ｓｙｓｔｅｍｓ，Ｊ．Ａｍ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．１２１，３４－４０．
【０１８３】
３．Ｓｔｅｅｎ，Ｅ．Ｊ．Ｌ．，Ｅｄｅｍ，Ｐ．Ｅ．，Ｎｏｒｒｅｇａａｒｄ，Ｋ．，Ｊｏｒｇｅｎｓｅｎ，Ｊ．Ｔ．，Ｓｈａｌｇｕｎｏｖ，Ｖ．，Ｋｊａｅｒ，Ａ．，ａｎｄ Ｈｅｒｔｈ，Ｍ．Ｍ．（２０１８）Ｐｒｅｔａｒｇｅｔｉｎｇ ｉｎ ｎｕｃｌｅａｒ ｉｍａｇｉｎｇ ａｎｄ ｒａｄｉｏｎｕｃｌｉｄｅ ｔｈｅｒａｐｙ：Ｉｍｐｒｏｖｉｎｇ ｅｆｆｉｃａｃｙ ｏｆ ｔｈｅｒａｎｏｓｔｉｃｓ ａｎｄ ｎａｎｏｍｅｄｉｃｉｎｅｓ，Ｂｉｏｍａｔｅｒｉａｌｓ １７９，２０９－２４５．
【０１８４】
４．Ｑｉｎ，Ｗ．，Ｃｈｏ，Ｋ．Ｆ．，Ｃａｖａｎａｇｈ，Ｐ．Ｅ．，ａｎｄ Ｔｉｎｇ，Ａ．Ｙ．（２０２１）Ｄｅｃｉｐｈｅｒｉｎｇ ｍｏｌｅｃｕｌａｒ ｉｎｔｅｒａｃｔｉｏｎｓ ｂｙ ｐｒｏｘｉｍｉｔｙ ｌａｂｅｌｉｎｇ，Ｎａｔ．Ｍｅｔｈｏｄｓ １８，１３３－１４３．
【０１８５】
５．Ｂｒａｎｏｎ，Ｔ．Ｃ．，Ｂｏｓｃｈ，Ｊ．Ａ．，Ｓａｎｃｈｅｚ，Ａ．Ｄ．，Ｕｄｅｓｈｉ，Ｎ．Ｄ．，Ｓｖｉｎｋｉｎａ，Ｔ．，Ｃａｒｒ，Ｓ．Ａ．，Ｆｅｌｄｍａｎ，Ｊ．Ｌ．，Ｐｅｒｒｉｍｏｎ，Ｎ．，ａｎｄ Ｔｉｎｇ，Ａ．Ｙ．（２０１８）Ｅｆｆｉｃｉｅｎｔ ｐｒｏｘｉｍｉｔｙ ｌａｂｅｌｉｎｇ ｉｎ ｌｉｖｉｎｇ ｃｅｌｌｓ ａｎｄ ｏｒｇａｎｉｓｍｓ ｗｉｔｈ ＴｕｒｂｏＩＤ，Ｎａｔ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．３６，８８０－８８７．
【０１８６】
６．Ｓｃｈｅｔｔｅｒｓ，Ｈ．（１９９９）Ａｖｉｄｉｎ ａｎｄ ｓｔｒｅｐｔａｖｉｄｉｎ ｉｎ ｃｌｉｎｉｃａｌ ｄｉａｇｎｏｓｔｉｃｓ，Ｂｉｏｍｏｌ．Ｅｎｇ．１６，７３－７８．
【０１８７】
７．Ｃｈｅｕｎｇ，Ｎ．－Ｋ．Ｖ．，Ｍｏｄａｋ，Ｓ．，Ｌｉｎ，Ｙ．，Ｇｕｏ，Ｈ．，Ｚａｎｚｏｎｉｃｏ，Ｐ．，Ｃｈｕｎｇ，Ｊ．，Ｚｕｏ，Ｙ．，Ｓａｎｄｅｒｓｏｎ，Ｊ．，Ｗｉｌｂｅｒｔ，Ｓ．，ａｎｄ Ｔｈｅｏｄｏｒｅ，Ｌ．Ｊ．（２００４）Ｓｉｎｇｌｅ－ｃｈａｉｎ Ｆｖ－ｓｔｒｅｐｔａｖｉｄｉｎ ｓｕｂｓｔａｎｔｉａｌｌｙ ｉｍｐｒｏｖｅｄ ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃ ｉｎｄｅｘ ｉｎ ｍｕｌｔｉｓｔｅｐ ｔａｒｇｅｔｉｎｇ ｄｉｒｅｃｔｅｄ ａｔ ｄｉｓｉａｌｏｇａｎｇｌｉｏｓｉｄｅ ＧＤ２，Ｊ．Ｎｕｃｌ．Ｍｅｄ．４５，８６７－８７７．
【０１８８】
８．Ｓｃｈｕｌｔｚ，Ｊ．，Ｌｉｎ，Ｙ．，Ｓａｎｄｅｒｓｏｎ，Ｊ．，Ｚｕｏ，Ｙ．，Ｓｔｏｎｅ，Ｄ．，Ｍａｌｌｅｔｔ，Ｒ．，Ｗｉｌｂｅｒｔ，Ｓ．，ａｎｄ Ａｘｗｏ

rthy, D. (2000) A tetravalent single-chain antibody-streptavidin fusion protein for pretargeted lymphoma therapy, Cancer Res. 60, 6663-6669.

【0189】

9. Axworthy, D., Reno, J., Hylarides, M., Mallett, R., Theodore, L., Gustavson, L., Su, F.-M., Hobson, L., Beaumier, P., and Fritzberg, A. (2000) Cure of human carcinoma xenografts by a single dose of pretargeted yttrium-90 with negligible toxicity, Proc. Natl. Acad. Sci. 97, 1802-1807.

【0190】

10. Gu, W., Yudistiro, R., Hanaoka, H., Katsumata, N., and Tsushima, Y. (2021) Potential of three-step pretargeting radioimmunotherapy using biotinylated bevacizumab and succinylated streptavidin in triple-negative breast cancer xenograft, Ann. Nucl. Med. 35, 514-522.

【0191】

11. Hamblett, K. J., Kegley, B. B., Hamlin, D. K., Chyan, M.-K., Hyre, D. E., Press, O. W., Wilbur, D. S., and Stayton, P. S. (2002) A streptavidin- biotin binding system that minimizes blocking by endogenous biotin, Bioconj. Chem. 13, 588-598.

【0192】

12. Hamblett, K. J., Press, O. W., Meyer, D. L., Hamlin, D. K., Axworthy, D., Wilbur, D. S., and Stayton, P. S. (2005) Role of biotin-binding affinity in streptavidin-based pretargeted radioimmunotherapy of lymphoma, Bioconj. Chem. 16, 131-138.

【0193】

13. Parker, C. L., Yang, Q., Yang, B., McCallen, J. D., Park, S. I., and Lai, S. K. (2017) Multivalent interactions between streptavidin-based pretargeting fusion proteins and cell receptors impede efficient internalization of biotinylated nanoparticles, Acta Biomater. 63, 181-189.

【0194】

14. Press, O. W., Corcoran, M., Subbiah, K., Hamlin, D. K., Wilbur, D. S., Johnson, T., Theodore, L., Yau, E., Mallett, R., and Meyer, D. L. (2001) A comparative evaluation of conventional and pretargeted radioimmunotherapy of CD20-expressing lymphoma xenografts, Blood 98, 2535-2543.

【０１９５】
１５．Ｚｈａｎｇ，Ｍ．，Ｚｈａｎｇ，Ｚ．，Ｇａｒｍｅｓｔａｎｉ，Ｋ．，Ｓｃｈｕｌｔｚ，Ｊ．，Ａｘｗｏｒｔｈｙ，Ｄ．Ｂ．，Ｇｏｌｄｍａｎ，Ｃ．Ｋ．，Ｂｒｅｃｈｂｉｅｌ，Ｍ．Ｗ．，Ｃａｒｒａｓｑｕｉｌｌｏ，Ｊ．Ａ．，ａｎｄ Ｗａｌｄｍａｎｎ，Ｔ．Ａ．（２００３）Ｐｒｅｔａｒｇｅｔ ｒａｄｉｏｔｈｅｒａｐｙ ｗｉｔｈ ａｎ ａｎｔｉ－ＣＤ２５ ａｎｔｉｂｏｄｙ－ｓｔｒｅｐｔａｖｉｄｉｎ ｆｕｓｉｏｎ ｐｒｏｔｅｉｎ ｗａｓ ｅｆｆｅｃｔｉｖｅ ｉｎ ｔｈｅｒａｐｙ ｏｆ ｌｅｕｋｅｍｉａ／ｌｙｍｐｈｏｍａ ｘｅｎｏｇｒａｆｔｓ，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．１００，１８９１－１８９５．
【０１９６】
１６．Ｐａｒｋ，Ｓ．Ｉ．，Ｓｈｅｎｏｉ，Ｊ．，Ｆｒａｙｏ，Ｓ．Ｍ．，Ｈａｍｌｉｎ，Ｄ．Ｋ．，Ｌｉｎ，Ｙ．，Ｗｉｌｂｕｒ，Ｄ．Ｓ．，Ｓｔａｙｔｏｎ，Ｐ．Ｓ．，Ｏｒｇｕｎ，Ｎ．，Ｈｙｌａｒｉｄｅｓ，Ｍ．，ａｎｄ Ｂｕｃｈｅｇｇｅｒ，Ｆ．（２０１１）Ｐｒｅｔａｒｇｅｔｅｄ ｒａｄｉｏｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒａｐｙ ｕｓｉｎｇ ｇｅｎｅｔｉｃａｌｌｙ ｅｎｇｉｎｅｅｒｅｄ ａｎｔｉｂｏｄｙ－ｓｔｒｅｐｔａｖｉｄｉｎ ｆｕｓｉｏｎ ｐｒｏｔｅｉｎｓ ｆｏｒ ｔｒｅａｔｍｅｎｔ ｏｆ ｎｏｎ－ｈｏｄｇｋｉｎ ｌｙｍｐｈｏｍａ，Ｃｌｉｎ．Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．１７，７３７３－７３８２．
【０１９７】
１７．Ｆｏｒｓｔｅｒ，Ｇ．Ｊ．，Ｓａｎｔｏｓ，Ｅ．Ｂ．，Ｓｍｉｔｈ－Ｊｏｎｅｓ，Ｐ．Ｍ．，Ｚａｎｚｏｎｉｃｏ，Ｐ．，ａｎｄ Ｌａｒｓｏｎ，Ｓ．Ｍ．（２００６）Ｐｒｅｔａｒｇｅｔｅｄ ｒａｄｉｏｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒａｐｙ ｗｉｔｈ ａ ｓｉｎｇｌｅ－ｃｈａｉｎ ａｎｔｉｂｏｄｙ／ｓｔｒｅｐｔａｖｉｄｉｎ ｃｏｎｓｔｒｕｃｔ ａｎｄ ｒａｄｉｏｌａｂｅｌｅｄ ＤＯＴＡ－ｂｉｏｔｉｎ：ｓｔｒａｔｅｇｉｅｓ ｆｏｒ ｒｅｄｕｃｔｉｏｎ ｏｆ ｔｈｅ ｒｅｎａｌ ｄｏｓｅ，Ｊ．Ｎｕｃｌ．Ｍｅｄ．４７，１４０－１４９．
【０１９８】
１８．Ｙａｏ，Ｚ．，Ｚｈａｎｇ，Ｍ．，Ａｘｗｏｒｔｈｙ，Ｄ．Ｂ．，Ｗｏｎｇ，Ｋ．Ｊ．，Ｇａｒｍｅｓｔａｎｉ，Ｋ．，Ｐａｒｋ，Ｌ．，Ｐａｒｋ，Ｃ．Ｗ．，Ｍａｌｌｅｔｔ，Ｒ．Ｗ．，Ｔｈｅｏｄｏｒｅ，Ｌ．Ｊ．，ａｎｄ Ｙａｕ，Ｅ．Ｋ．（２００２）Ｒａｄｉｏｉｍｍｕｎｏｔｈｅｒａｐｙ ｏｆ Ａ４３１ ｘｅｎｏｇｒａｆｔｅｄ ｍｉｃｅ ｗｉｔｈ ｐｒｅｔａｒｇｅｔｅｄ Ｂ３ ａｎｔｉｂｏｄｙ－ｓｔｒｅｐｔａｖｉｄｉｎ ａｎｄ ９０Ｙ－ｌａｂｅｌｅｄ １，４，７，１０－ｔｅｔｒａａｚａｃｙｃｌｏｄｏｄｅｃａｎｅ－Ｎ，Ｎ’，Ｎ’’，Ｎ’’’－ｔｅｔｒａａｃｅｔｉｃ ａｃｉｄ（ＤＯＴＡ）－ｂｉｏｔｉｎ，Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．６２，５７５５－５７６０．
【０１９９】
１９．Ｚｈｏｕ，Ｈ．，Ｆｕ，Ｊ．，Ｆｕ，Ｑ．，Ｆｅｎｇ，Ｙ．，Ｈｏｎｇ，Ｒ．，Ｌｉ，Ｐ．，Ｗａｎｇ，Ｚ．，Ｈｕａｎｇ，Ｘ．，ａｎｄ Ｌｉ，Ｆ．（２０２１）Ｂｉｏｔｉｎ－ｓｔｒｅｐｔａｖｉｄｉｎ－ｇｕｉｄｅｄ ｔｗｏ－ｓｔｅｐ ｐｒｅｔａｒｇｅｔｉｎｇ ａｐｐｒｏａｃｈ ｕｓｉｎｇ ＰＬＧＡ ｆｏｒ ｍｏｌｅｃｕｌａｒ ｕｌｔｒａｓｏｕｎｄ ｉｍａｇｉｎｇ ａｎｄ ｃｈｅｍｏｔｈｅｒａｐｙ ｆｏｒ ｏｖａｒｉａｎ ｃａｎｃｅｒ，ＰｅｅｒＪ ９，ｅ１１４８６．
【０２００】
２０．Ｒｏｎｄｏｎ，Ａ．，ａｎｄ Ｄｅｇｏｕｌ，Ｆ．（２０１９）Ａｎｔｉｂｏｄｙ ｐｒｅｔａｒｇｅｔｉｎｇ ｂａｓｅｄ ｏｎ ｂｉｏｏｒｔｈｏｇｏｎａｌ ｃｌｉｃｋ ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ ｆｏｒ ｃａｎｃｅｒ ｉｍａｇｉｎｇ ａｎｄ ｔａｒｇｅｔｅｄ ｒａｄｉｏｎｕｃｌｉｄｅ ｔｈｅｒａｐｙ，Ｂｉｏｃｏｎｊ．Ｃｈｅｍ．３１，１５９－１７３．
【０２０１】
２１．Ｄｅｌ Ｍｉｌｔｏｎ，Ｒ．，Ｍｉｌｔｏｎ，Ｓ．，ａｎｄ Ｋｅｎｔ，Ｓ．（

1992) Total chemical synthesis of a D-enzyme: The enantiomers of HIV-1 protease show demonstration of reciprocal chiral substrate specificity, Science 256, 1445-1448.

【0202】

22. Dintzis, H.M., Symer, D.E., Dintzis, R.Z., Zawadzke, L.E., and Berg, J.M. (1993) A comparison of the immunogenicity of a pair of enantiomeric proteins, Proteins 16, 306-308.

【0203】

23. Jacobsen, M.T., Erickson, P.W., and Kay, M.S. (2017) Aligator: A computational tool for optimizing total chemical synthesis of large proteins, Bioorg. Med. Chem. 25, 4946-4952.

【0204】

24. Pahler, A., Hendrickson, W.A., Kolks, M., Argarana, C., and Cantor, C.R. (1987) Characterization and crystallization of core streptavidin, J. Biol. Chem. 262, 13933-13937.

【0205】

25. Weber, P.C., Ohlendorf, D.H., Wendoloski, J., and Salemme, F. (1989) Structural origins of high-affinity biotin binding to streptavidin, Science 243, 85-88.

【0206】

26. Hyre, D.E., Le Trong, I., Merritt, E.A., Eccleston, J.F., Green, N.M., Stenkamp, R.E., and Stayton, P.S. (2006) Cooperative hydrogen bond interactions in the streptavidin-biotin system, Protein Sci. 15, 459-467.

【0207】

27. Klumb, L.A., Chu, V., and Stayton, P.S. (1998) Energetic roles of hydrogen bonds at the ureido oxygen binding pocket in the streptavidin- biotin complex, Biochemistry 37, 7657-7663.

【0208】

28. Schmidt, T.G., and Skerra, A. (1994) One-step affinity purification of bacterially produced proteins by means of the "Strep tag" and immobilized recombinant core streptavidin, J. Chromatogr. A 676, 337-345.

【0209】

29. Thie, H., Voedisch, B., Dubel, S., Hust, M., and Schirrmann, T. (2009) Affinity maturation by phage display, In Therapeutic Antibodies, pp 309-322, Springer.

【０２１０】
３０．Piketty，M．－L．，Polak，M．，Flechtner，I．，Gonzales－Briceno，L．，and Souberbielle，J．－C．（２０１７）False biochemical diagnosis of hyperthyroidism in streptavidin－biotin－based immunoassays：the problem of biotin intake and related interferences，Clin．Chem．Lab．５５，７８０－７８８．
【０２１１】
３１．Ardabilygazir，A．，Afshariyamchlou，S．，Mir，D．，and Sachmechi，I．（２０１８）Effect of high－dose biotin on thyroid function tests：case report and literature review，Cureus １０．
【０２１２】
３２．Li，J．，Wagar，E．A．，and Meng，Q．H．（２０１８）Comprehensive assessment of biotin interference in immunoassays，Clin．Chim．Acta ４８７，２９３－２９８．
【０２１３】
３３．Frame，I．J．，Joshi，P．H．，Mwangi，C．，Gunsolus，I．，De Lemos，J．A．，Das，S．R．，Sarode，R．，Balani，J．，Apple，F．S．，and Muthukumar，A．（２０１９）Susceptibility of cardiac troponin assays to biotin interference，Am．J．Clin．Pathol．１５１，４８６－４９３．
【０２１４】
３４．Liu，G．（２０１８）A revisit to the pretargeting concept－A target conversion，Front．Pharmacol．９，１４７６．
【０２１５】
３５．Sarrett，S．M．，Keinanen，O．，Dayts，E．J．，Dewaele－Le Roi，G．，Rodriguez，C．，Carnazza，K．E．，and Zeglis，B．M．（２０２１）Inverse electron demand Diels－Alder click chemistry for pretargeted PET imaging and radioimmunotherapy，Nat．Protoc．，１－３４．
【０２１６】
３６．Knight，J．C．，and Cornelissen，B．（２０１４）Bioorthogonal chemistry：implications for pretargeted nuclear（PET／SPECT）imaging and therapy，Am．J．Nucl．Med．Mol．Imaging ４，９６．
【０２１７】
３７．Jallinoja，V．I．，and Houghton，J．L．（２０２１）Current Landscape in Clinical Pretargeted Radioimmunoimaging and Therapy，J．Nucl．Med．６２，１２００－１２０６．
【０２１８】
３８．Srisa－Art，M．，Dyson，E．C．，deMello，A．J．，and Edel，J．B．（２００８）Monitoring of real－t

ime streptavidin－biotin binding kinetics using droplet microfluidics, Anal. Chem. 80, 7063－7067.
【0219】
39. Chilkoti, A., and Stayton, P. S. (1995) Molecular origins of the slow streptavidin－biotin dissociation kinetics, J. Am. Chem. Soc. 117, 10622－10628.
【0220】
40. Suganuma, M., Kubo, T., Ishiki, K., Tanaka, K., Suto, K., Ejima, D., Toyota, M., Tsumoto, K., Sato, T., and Nishikawa, Y. (2022) Mirror－image Streptavidin with Specific Binding to“Non－natural”L－biotin, Pre－Print, Research Square.
【0221】
41. Behrendt, R., White, P., and Offer, J. (2016) Advances in Fmoc solid－phase peptide synthesis, J. Pept. Sci. 22, 4－27.
【0222】
42. Dawson, P. E., Muir, T. W., Clarklewis, I., and Kent, S. B. H. (1994) Synthesis of Proteins by Native Chemical Ligation, Science 266, 776－779.
【0223】
43. Yan, L. Z., and Dawson, P. E. (2001) Synthesis of peptides and proteins without cysteine residues by native chemical ligation combined with desulfurization, J. Am. Chem. Soc. 123, 526－533.
【0224】
44. Fulcher, J. M., Petersen, M. E., Giesler, R. J., Cruz, Z. S., Eckert, D. M., Francis, J. N., Kawamoto, E. M., Jacobsen, M. T., and Kay, M. S. (2019) Chemical synthesis of Shiga toxin subunit B using a next－generation traceless“helping hand”solubilizing tag, Org. Biomol. Chem. 17, 10237－10244.
【0225】
45. Jacobsen, M. T., Petersen, M. E., Ye, X., Galibert, M., Lorimer, G. H., Aucagne, V., and Kay, M. S. (2016) A helping hand to overcome solubility challenges in chemical protein synthesis, J. Am. Chem. Soc. 138, 11775－11782.
【0226】
46. Sano, T., Pandori, M. W., Chen, X., Smith, C. L., and Cantor, C. R. (1995) Recombinant core streptavidins:a minimum－sized core streptavidin has enhanced structural stability and higher accessibility to biotinyl

ated macromolecules, J. Biol. Chem. 270, 28204-28209.
【0227】
47. Kurzban, G., Bayer, E., Wilchek, M., and Horowitz, P. (1991) The quaternary structure of streptavidin in urea, J. Biol. Chem. 266, 14470-14477.
【0228】
48. Zhang, X., Wang, B., Zhao, N., Tian, Z., Dai, Y., Nie, Y., Tian, J., Wang, Z., and Chen, X. (2017) Improved tumor targeting and longer retention time of NIR fluorescent probes using bioorthogonal chemistry, Theranostics 7, 3794.
【0229】
49. Bojkowska, K., De Sio, F. S., Barde, I., Offner, S., Verp, S., Heinis, C., Johnsson, K., and Trono, D. (2011) Measuring in vivo protein half-life, Chem. Biol. 18, 805-815.
【0230】
50. Meng, F., Wang, J., Ping, Q., and Yeo, Y. (2018) Quantitative assessment of nanoparticle biodistribution by fluorescence imaging, revisited, ACS Nano 12, 6458-6468.
【0231】
51. Chinol, M., Casalini, P., Maggiolo, M., Canevari, S., Omodeo, E., Caliceti, P., Veronese, F., Cremonesi, M., Chiolerio, F., and Nardone, E. (1998) Biochemical modifications of avidin improve pharmacokinetics and biodistribution, and reduce immunogenicity, Br. J. Cancer 78, 189-197.
【0232】
52. Wu, A. M., Chen, W., Raubitschek, A., Williams, L. E., Neumaier, M., Fischer, R., Hu, S.-z., Odom-Maryon, T., Wong, J. Y., and Shively, J. E. (1996) Tumor localization of anti-CEA single-chain Fvs: improved targeting by non-covalent dimers, Immunotechnology 2, 21-36.
【0233】
53. Asano, R., Koyama, N., Hagiwara, Y., Masakari, Y., Orimo, R., Arai, K., Ogata, H., Furumoto, S., Umetsu, M., and Kumagai, I. (2016) Anti-EGFR scFv tetramer (tetrabody) with a stable monodisperse structure, strong anticancer effect, and a long in vivo half-life, FEBS open bio 6, 594-602.
【0234】
54. Richman, S. A., Nunez-Cruz, S., Moghimi, B

.,Li,L.Z.,Gershenson,Z.T.,Mourelatos,Z.,Barrett,D.M.,Grupp,S.A.,and Milone,M.C.(2018)High-affinity GD2-specific CAR T cells induce fatal encephalitis in a preclinical neuroblastoma model,Cancer Immunol.Res.6,36-46.

【0235】

55.Rodden,F.A.,Wiegandt,H.,and Bauer,B.L.(1991)Gangliosides:the relevance of current research to neurosurgery,J.Neurosurg.74,606-619.

【0236】

56.Cheever,M.A.,Allison,J.P.,Ferris,A.S.,Finn,O.J.,Hastings,B.M.,Hecht,T.T.,Mellman,I.,Prindiville,S.A.,Viner,J.L.,and Weiner,L.M.(2009)The prioritization of cancer antigens:a national cancer institute pilot project for the acceleration of translational research,Clin.Cancer Res.15,5323-5337.

【0237】

57.Guimaraes,C.P.,Witte,M.D.,Theile,C.S.,Bozkurt,G.,Kundrat,L.,Blom,A.E.,and Ploegh,H.L.(2013)Site-specific C-terminal and internal loop labeling of proteins using sortase-mediated reactions,Nat.Protoc.8,1787-1799.

【0238】

58.Wu,Z.-L.,Schwartz,E.,Seeger,R.,and Ladisch,S.(1986)Expression of GD2 ganglioside by untreated primary human neuroblastomas,Cancer Res.46,440-443.

【0239】

59.Schengrund,C.L.,Repman,M.A.,and Shochat,S.J.(1985)Ganglioside composition of human neuroblastomas correlation with prognosis A pediatric oncology group study,Cancer 56,2640-2646.

【0240】

60.LAMMIE,G.A.,Cheung,N.,GERALD,W.,ROSENBLUM,M.,and CORDONCARDO,C.(1993)Ganglioside gd(2)expression in the human nervous-system and in neuroblastomas-an immunohistochemical study,Int.J.Oncol.3,909-915.

【0241】

61.Eto,Y.,and Shinoda,S.(1982)Gangliosides and neutral glycosphingolipids in human brain tumors:specificity and their significance,Adv.Exp.Med.Biol.152,279-290

.

【0242】

62. Witte, M. D., Theile, C. S., Wu, T., Guimaraes, C. P., Blom, A. E., and Ploegh, H. L. (2013) Production of unnaturally linked chimeric proteins using a combination of sortase-catalyzed transpeptidation and click chemistry, Nat. Protoc. 8, 1808-1819.

【0243】

63. Cho, H., Daniel, T., Buechler, Y. J., Litzinger, D. C., Maio, Z., Putnam, A. M., Kraynov, V. S., Sim, B. C., Bussell, S., Javahishvili, T., Kaphle, S., Viramontes, G., Ong, M., Chu, S., Becky, G. C., Lieu, R., Knudsen, N., Castiglioni, P., Norman, T. C., Axelrod, D. W., Hoffman, A. R., Schultz, P. G., DiMarchi, R. D., and Kimmel, B. E. (2011) Optimized clinical performance of growth hormone with an expanded genetic code, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 108, 9060-9065.

【0244】

64. Mu, J., Pinkstaff, J., Li, Z., Skidmore, L., Li, N., Myler, H., Dallas-Yang, Q., Putnam, A.-M., Yao, J., and Bussell, S. (2012) FGF21 analogs of sustained action enabled by orthogonal biosynthesis demonstrate enhanced antidiabetic pharmacology in rodents, Diabetes 61, 505-512.

【0245】

65. Ou, W. J., Uno, T., Chiu, H. P., Grunewald, J., Cellitti, S. E., Crossgrove, T., Hao, X. S., Fan, Q., Quinn, L. L., Patterson, P., Okach, L., Jones, D. H., Lesley, S. A., Brock, A., and Geierstanger, B. H. (2011) Site-specific protein modifications through pyrroline-carboxy-lysine residues, Proc. Natl. Acad. Sci. 108, 10437-10442.

【0246】

66. Dumas, A., Spicer, C. D., Gao, Z., Takehana, T., Lin, Y. A., Yasukohchi, T., and Davis, B. G. (2013) Self-liganded Suzuki-Miyaura coupling for site-selective protein PEGylation, Angew. Chem. Int. Ed. 52, 3916-3921.

【0247】

67. Wilding, K. M., Smith, A. K., Wilkerson, J. W., Bush, D. B., Knotts IV, T. A., and Bundy, B. C. (2018) The locational impact of site-specific PEGylation: streamlined screening with cell-free protein expression and coarse-grain simulation, ACS Synth. Biol. 7, 5

１０－５２１．
【０２４８】
６８．Ｊｕｎｇｈａｎｓ，Ｒ．，ａｎｄ Ａｎｄｅｒｓｏｎ，Ｃ．（１９９６）Ｔｈｅ ｐｒｏｔｅｃｔｉｏｎ ｒｅｃｅｐｔｏｒ ｆｏｒ ＩｇＧ ｃａｔａｂｏｌｉｓｍ ｉｓ ｔｈｅ ｂｅｔａ２－ｍｉｃｒｏｇｌｏｂｕｌｉｎ－ｃｏｎｔａｉｎｉｎｇ ｎｅｏｎａｔａｌ ｉｎｔｅｓｔｉｎａｌ ｔｒａｎｓｐｏｒｔ ｒｅｃｅｐｔｏｒ，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．９３，５５１２－５５１６．
【０２４９】
６９．Ｖｉｅｉｒａ，Ｐ．，ａｎｄ Ｒａｊｅｗｓｋｙ，Ｋ．（１９８８）Ｔｈｅ ｈａｌｆ－ｌｉｖｅｓ ｏｆ ｓｅｒｕｍ ｉｍｍｕｎｏｇｌｏｂｕｌｉｎｓ ｉｎ ａｄｕｌｔ ｍｉｃｅ，Ｅｕｒ．Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１８，３１３－３１６．
【０２５０】
７０．Ｃｈｉｖｅｒｓ，Ｃ．Ｅ．，Ｃｒｏｚａｔ，Ｅ．，Ｃｈｕ，Ｃ．，Ｍｏｙ，Ｖ．Ｔ．，Ｓｈｅｒｒａｔｔ，Ｄ．Ｊ．，ａｎｄ Ｈｏｗａｒｔｈ，Ｍ．（２０１０）Ａ ｓｔｒｅｐｔａｖｉｄｉｎ ｖａｒｉａｎｔ ｗｉｔｈ ｓｌｏｗｅｒ ｂｉｏｔｉｎ ｄｉｓｓｏｃｉａｔｉｏｎ ａｎｄ ｉｎｃｒｅａｓｅｄ ｍｅｃｈａｎｏｓｔａｂｉｌｉｔｙ，Ｎａｔ．Ｍｅｔｈｏｄｓ ７，３９１－３９３．
【０２５１】
本発明の範囲又は趣旨から逸脱することなく、本発明において様々な修正及び変形を行うことが可能であることは、当業者には明らかであろう。本発明の他の実施形態は、本明細書に開示される本発明の仕様及び実践の考慮から、当業者には明らかとなるであろう。本明細書及び実施例は例示的なものとしてのみ考慮されることを意図しており、本発明の真の範囲及び趣旨は以下の特許請求の範囲によって示される。
【図面】
【図１】

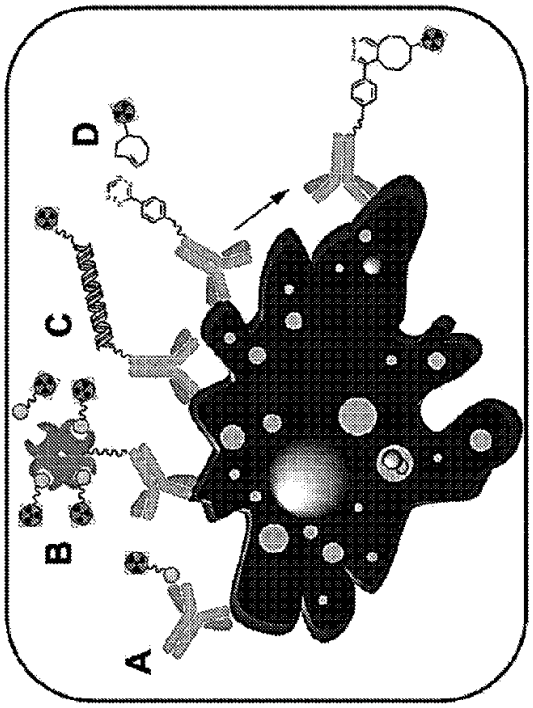
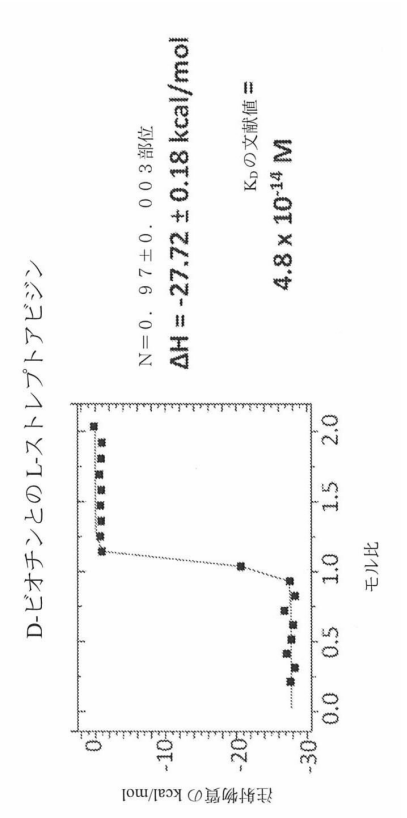
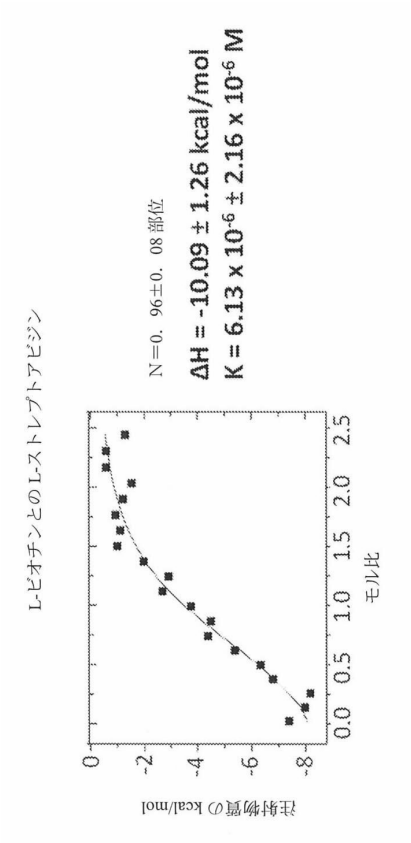


FIG. 1

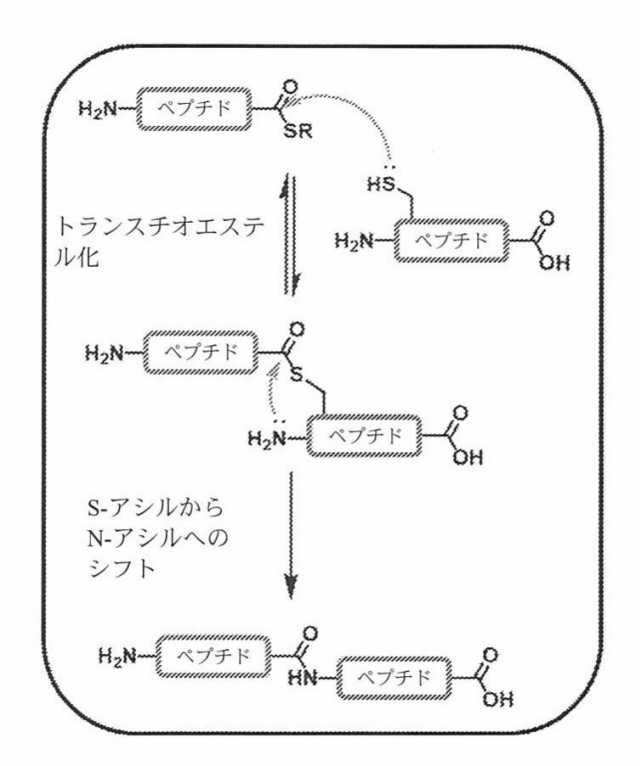
【図２Ａ】



【図２Ｂ】



【図３】



【図４】

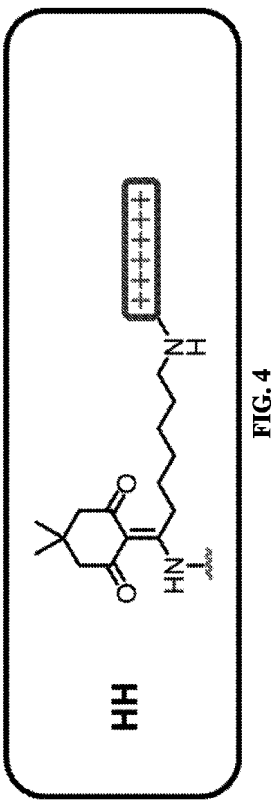


FIG. 4

【図５】

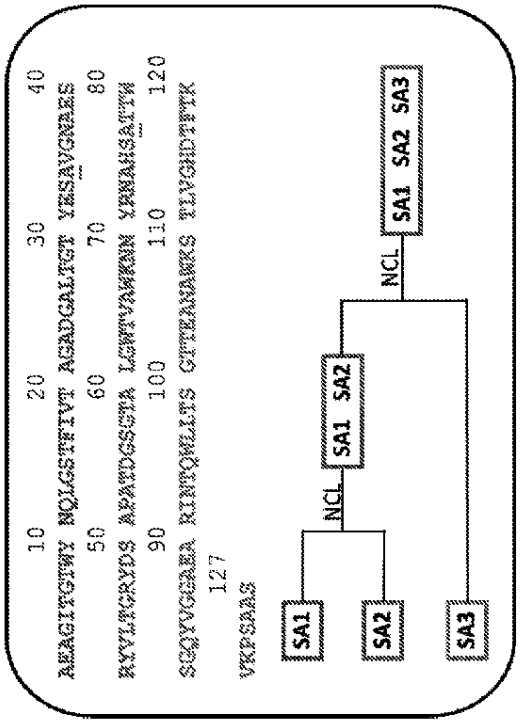
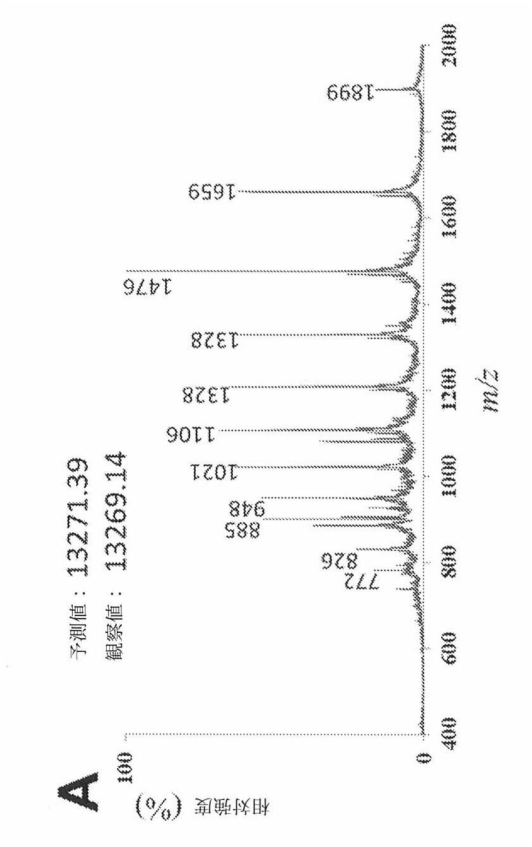
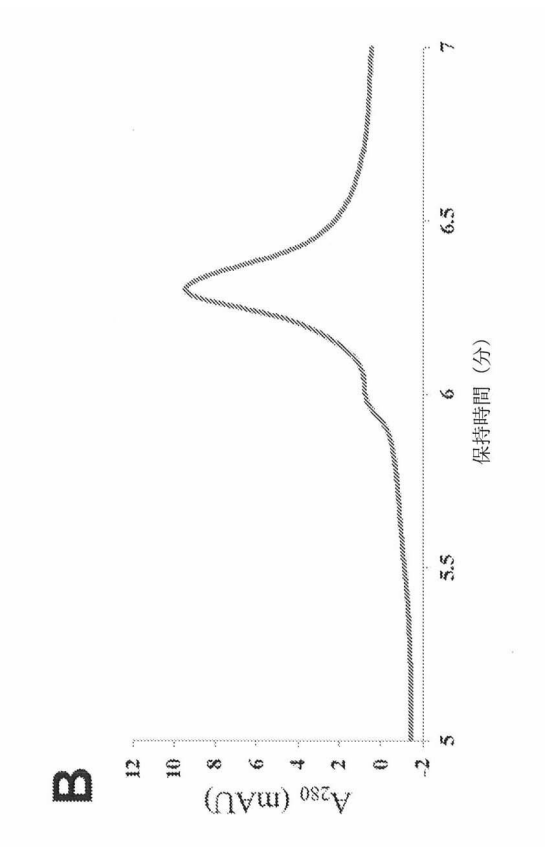


FIG. 5

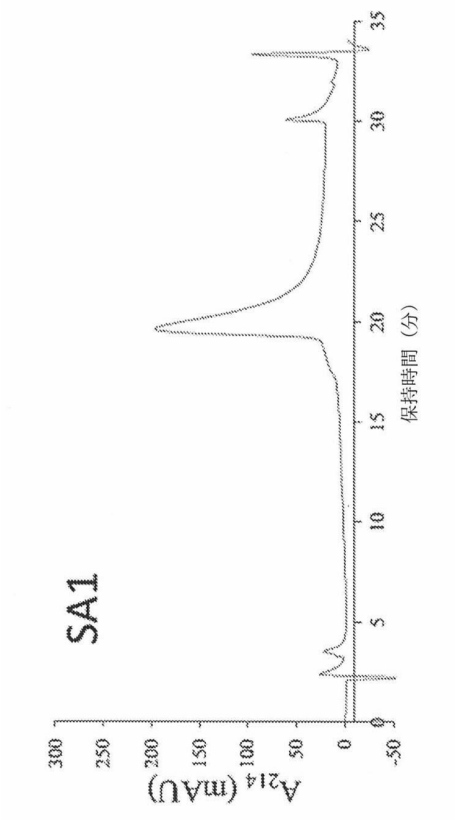
【図６Ａ】



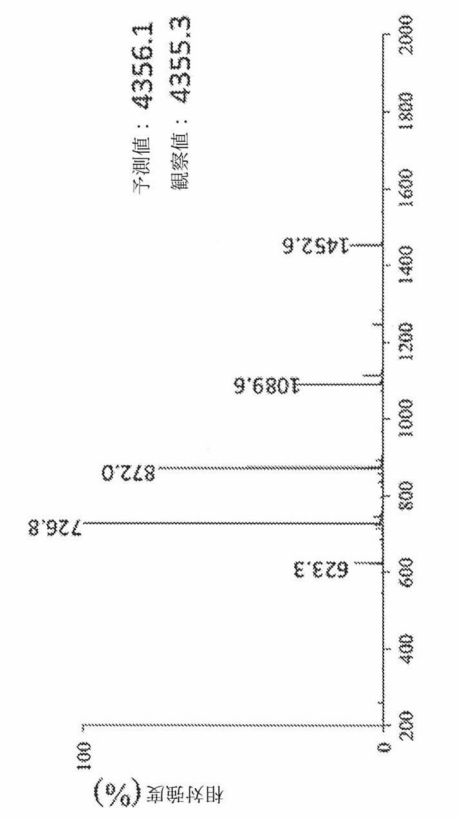
【図６Ｂ】



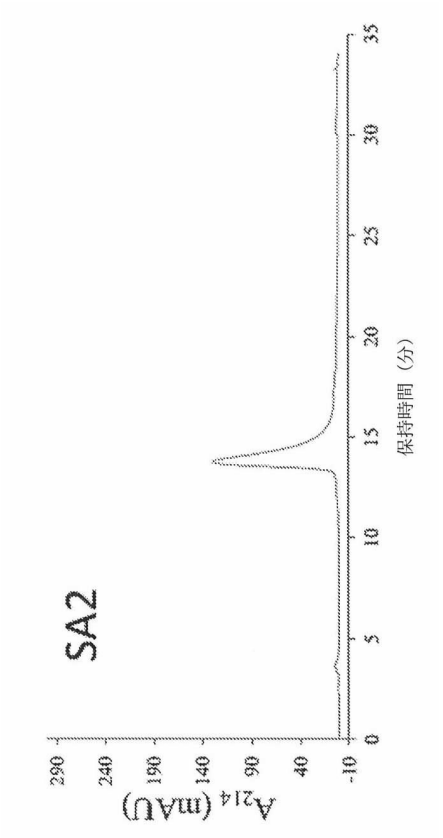
【図７Ａ】



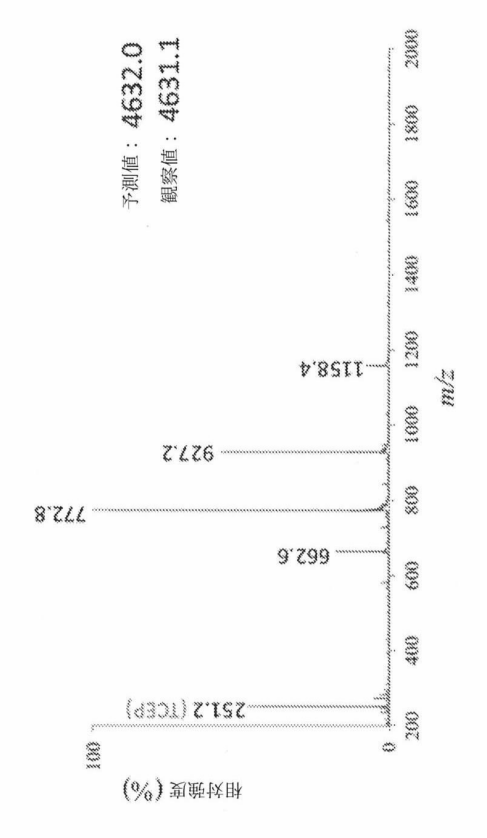
【図７Ｂ】



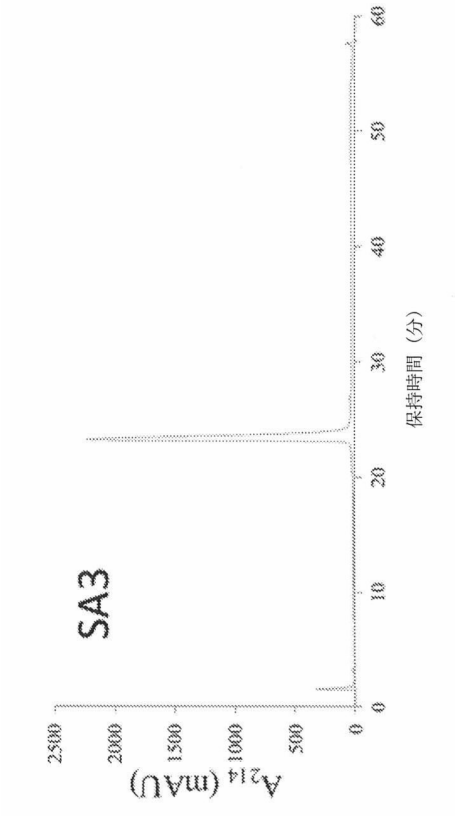
【図７Ｃ】



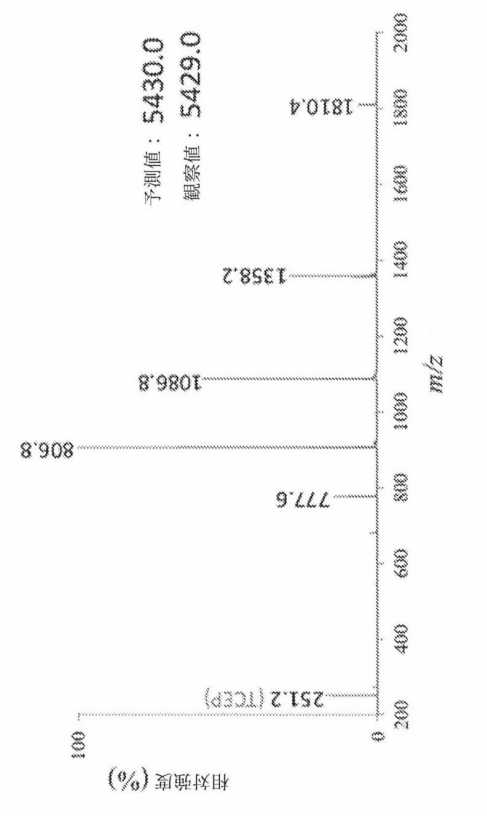
【図７Ｄ】



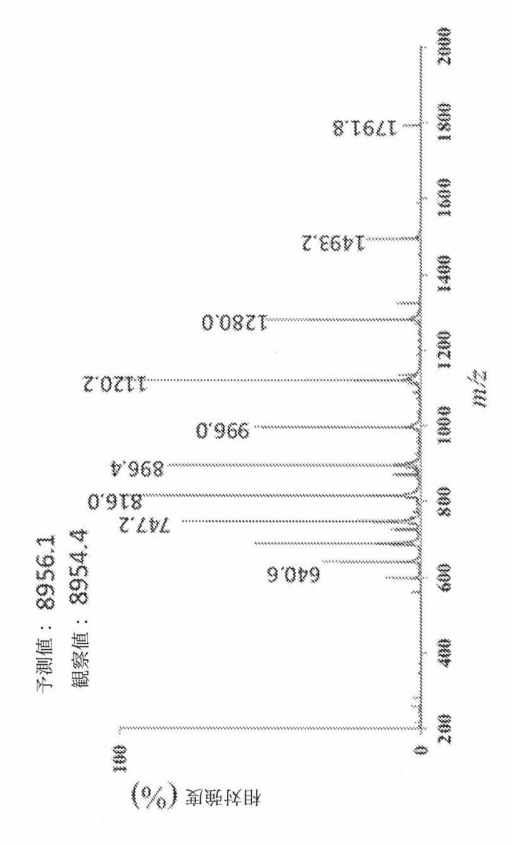
【図７Ｅ】



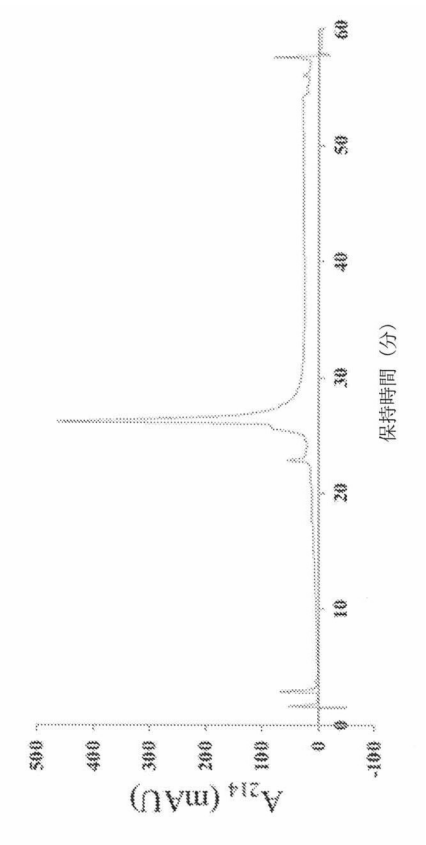
【図７Ｆ】



【図８Ａ】



【図８Ｂ】



【配列表】

2025516703000001.xml

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2023/067028

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC: *A61K 9/00* (2024.01); ***A61K 47/68*** (2024.01); ***A61K 51/04*** (2024.01); ***A61P 35/00*** (2024.01); ***C07K 16/28*** (2024.01); ***C07K 16/46*** (2024.01)

CPC: ***A61K 47/6898; A61K 47/6851; A61K 51/0453; A61P 35/00; C07K 16/2866; C07K 16/468;*** *C07K 2319/20; C07K 2319/33; C07K 2319/60; A61K 9/0019; C07K 14/36*

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.
Y	US 2014/0186850 A1 (AKRIVIS TECHNOLOGIES LLC) 03 July 2014 (03.07.2014) entire document	1, 2, 4-15
Y	WO 2021/092672 A1 (IPROGEN BIOTECH INC.) 20 May 2021 (20.05.2021) entire document	1, 2, 4-15
Y	WO 2022/080486 A1 (SYSMEX CORPORATION) 21 April 2022 (21.04.2022) entire document	1, 2, 4-15
Y	US 2003/0147808 A1 (CHEUNG et al.) 07 August 2003 (07.08.2003) entire document	6
Y	CHIVERS et al., A streptavidin variant with slower biotin dissociation and increased mechanostability, Nature Methods, Vol. 7, Iss. 5, May 2010, Pgs. 391-393. entire document	11

☑ 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
15 March 2024 (15.03.2024)	**07 May 2024 (07.05.2024)**
Name and mailing address of the ISA/US **Mail Stop PCT, Attn: ISA/US** **Commissioner for Patents** **P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450** Facsimile No. **571-273-8300**	Authorized officer **MATOS** **TAINA** Telephone No. **571-272-4300**

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2023/067028

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2021/226290 A1 (10X GENOMICS INC. et al.) 11 November 2021 (11.11.2021) entire document	1, 2, 4-15
A	US 2021/0071169 A1 (ROOTPATH GENOMICS INC.) 11 March 2021 (11.03.2021) entire document	1, 2, 4-15
E, X	WO 2023/220761 A2 (UNIVERSITY OF UTAH RESEARCH FOUNDATION) 16 November 2023 (16.11.2023) entire document	1, 2, 4-15

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2023/067028

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

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
   a. ☐ forming part of the international application as filed.
   b. ☑ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13*ter*.1(a)),
      ☑ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.

2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2023/067028

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.: **16-47, 69-79**
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:

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 examined, the appropriate additional examination fees need to be paid.

Group I+: claims 1-15, 48-68, and 80-91 are drawn to bi-specific polypeptides and methods of making the same.

The first invention of Group I+ is restricted to an antibody covalently linked to D-streptavidin, where the antibody is selected to be burosumab, and methods comprising the same. The 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. Specifically, the first named invention was selected based on the antibodies listed in instant claim 8. It is believed that claims 1, 2, and 4-15 read on this first named invention and thus these claims will be searched without fee to the extent that they read on burosumab.

Applicant is invited to elect additional polypeptides, streptavidin variants, biotin variants, and their respective, corresponding, SEQ ID NOs to be searched in a specific combination by paying additional fee for each set of election. An exemplary election would be an antibody covalently linked to D-streptavidin, where the antibody is selected to be ibalizumab, and methods comprising the same. Additional polypeptides, streptavidin variants, biotin variants, and their respective, corresponding, SEQ ID NOs will be searched upon the payment of additional fees. Applicants must specify the claims that read on any additional elected inventions. Applicants must further indicate, if applicable, the claims which read on 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/examined.

The inventions listed in Groups I+ 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:

The Groups I+ formulas do not share a significant structural element responsible for conjugating antibodies to therapeutics, requiring the selection of alternative antibodies where "the scFv is derived from burosumab, ibalizumab, erenumab, atezolizumab, reslizumab, pembrolizumab, nivolumab, ramucirumab, ipilimumab, brentuximab, ustekinumab, panitumaumab, ranibizumab, necitumaumab, dinutuximab, denosumab, exulizumab, bevacizumab, omalizumab, adalimumab, avelumab, durvalumab, brodalumab, muromonoab-CD3, abciximab, rituximab, daclizumab, infliximab, basiliximab, palivizumab, trastuzumab, gemtuzumab or a biologically active variant thereof," and streptavidins "polypeptide

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2023/067028

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first 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, 2, 4-15**

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/US2023/067028

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

comprising an amino acid sequence that has from 90% to 99% identity to the amino acid sequence AEAGITGTWYNQLGSTFIVTAGADGALTGTYESAVGNAESRYVLTGRYDSAPATDGSGTALGWTVAWKNNYRNAHS (SEQ ID NO: 8), wherein each amino acid in the amino acid sequence is a D-amino acid."

Additionally, even if Groups I+ were considered to share the technical features of a bi-specific polypeptide comprising: an antibody or antibody fragment thereof covalently linked to D-streptavidin (D-SA) or a variant thereof; a conjugate comprising L-biotin covalently linked to a therapeutic agent or a diagnostic agent; a polypeptide comprising an amino acid sequence wherein each amino acid in the amino acid sequence is a D-amino acid; a method of making L-SA, D-SA, or a variant thereof, the method: (a) providing a first peptide having an amino acid sequence; (b) providing a second peptide having an amino acid sequence; (c) providing a third peptide having an amino acid sequence; (d) ligating the first, second, and third peptides; a method of making L-SA, D-SA, or a variant thereof, the method comprising: (a) coupling a first peptide having an amino acid sequence, and a linker; (b) functionalizing the linker with a positively charged amino acid residue, thereby providing a solubilizing residue; (c) ligating the first peptide to a second peptide; (d) ligating the second peptide to a third peptide. However, these shared technical features do not represent a contribution over the prior art.

Specifically, US 2021/0071169 to Rootpath Genomics Inc. discloses a bi-specific polypeptide (the antibody is a bispecific antibody, Para. [0071]) comprising: an antibody or antibody fragment thereof covalently linked to D-streptavidin (D-SA) or a variant thereof (the peptide is conjugated with avidin or streptavidin, Para. [0119]); a conjugate comprising L-biotin covalently linked to a therapeutic agent or a diagnostic agent (a target binding moiety can be coupled with biotin through a suitable reactive group, Para. [0195]; each of the population of target binding moieties further comprises a puromycin moiety or a variant thereof, Para. [0014]); a polypeptide comprising an amino acid sequence wherein each amino acid in the amino acid sequence is a D-amino acid ([p]eptides are two or more amino acid monomers long, and often can be more than 20 amino acid monomers long. A polypeptide can be linearly unstructured or folded in three-dimensional structure. Stereoisomers (e.g., D-amino acids) of the twenty conventional amino acids, Para. [0051]); a method of making L-SA, D-SA, or a variant thereof (method further comprises making the population of target binding moieties each linked, Para. [0181]; the peptide is conjugated with avidin or streptavidin, Para. [0119]), the method: (a) providing a first peptide having an amino acid sequence; (b) providing a second peptide having an amino acid sequence; (c) providing a third peptide having an amino acid sequence; (d) ligating the first, second, and third peptides (the spacer comprises a first peptide chain, a second peptide chain, and a third peptide chain, wherein the second peptide chain interacts with a first portion of the first peptide chain, and wherein the third peptide chain interacts with a second portion of the first peptide chain, Para. [0008]; method further comprises making the population of target binding moieties each linked, Para. [0181]); a method of making L-SA, D-SA, or a variant thereof (method further comprises making the population of target binding moieties each linked, Para. [0181]; the peptide is conjugated with avidin or streptavidin, Para. [0119]), the method comprising: (a) coupling a first peptide having an amino acid sequence, and a linker; (b) functionalizing the linker with a positively charged amino acid residue, thereby providing a solubilizing residue; (c) ligating the first peptide to a second peptide; (d) ligating the second peptide to a third peptide (the spacer comprises a first peptide chain, a second peptide chain, and a third peptide chain, wherein the second peptide chain interacts with a first portion of the first peptide chain, and wherein the third peptide chain interacts with a second portion of the first peptide chain, Para. [0008]; method further comprises making the population of target binding moieties each linked, Para. [0181]; peptide sequence is the binding element fused to a peptide linker, Para. [0132]; a second molecule which is positively charged, Para. [0118]; soluble, Para. [0006]).

The inventions listed in Groups I+ therefore lack unity under Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical features.

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）
C07K 19/00	*(2006.01)*	C07K	19/00		
A61K 47/68	*(2017.01)*	A61K	47/68		
A61K 39/395	*(2006.01)*	A61K	39/395	C	
A61P 35/00	*(2006.01)*	A61K	39/395	L	
A61P 35/02	*(2006.01)*	A61P	35/00		
A61P 25/00	*(2006.01)*	A61P	35/02		
A61P 29/00	*(2006.01)*	A61P	25/00		
A61P 19/02	*(2006.01)*	A61P	29/00	101	
A61P 1/04	*(2006.01)*	A61P	19/02		
A61P 11/06	*(2006.01)*	A61P	1/04		
A61P 13/00	*(2006.01)*	A61P	11/06		
A61P 27/02	*(2006.01)*	A61P	13/00		
A61P 7/00	*(2006.01)*	A61P	27/02		
A61K 45/00	*(2006.01)*	A61P	7/00		
A61K 51/04	*(2006.01)*	A61K	45/00		
A61K 47/54	*(2017.01)*	A61K	51/04	100	
A61P 43/00	*(2006.01)*	A61K	47/54		
A61K 38/16	*(2006.01)*	A61P	43/00	121	
		A61K	38/16		

,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

弁理士　松田 七重

(74)代理人　100183379

弁理士　藤代 昌彦

(72)発明者　ケイ マイケル エス

アメリカ合衆国 ユタ州 ８４１０８ ソルト レイク シティ パッドリー ストリート ８６７

(72)発明者　ドレイパー スティーブン アール イー

アメリカ合衆国 ユタ州 ８４６０４ プロボ ノース ２２０ イースト ２１８０

Ｆターム（参考）　4C076 AA95 BB13 CC27 CC41 EE59 FF67 FF70

4C084 AA02 AA07 AA12 AA19 BA01 BA09 BA22 BA23 BA44 CA59
MA65 NA05 ZB261 ZB262 ZB271 ZB272 ZC412 ZC751 ZC752

4C085 AA13 AA21 BB43 DD51 EE03 GG02

4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 CA40 DA75 DA76 EA20
FA33 FA74 GA21