

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7008014号
(P7008014)

(45)発行日 令和4年2月10日(2022.2.10)

(24)登録日 令和4年1月12日(2022.1.12)

(51)国際特許分類

C 0 7 K	7/08 (2006.01)	F I	C 0 7 K	7/08	Z N A
C 0 7 K	19/00 (2006.01)		C 0 7 K	19/00	
C 1 2 N	15/11 (2006.01)		C 1 2 N	15/11	Z
C 0 7 K	16/00 (2006.01)		C 0 7 K	16/00	
A 6 1 P	35/00 (2006.01)		A 6 1 P	35/00	

請求項の数 19 (全49頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2018-506297(P2018-506297)

(86)(22)出願日 平成28年8月4日(2016.8.4)

(65)公表番号 特表2018-529321(P2018-529321)

A)

(43)公表日 平成30年10月11日(2018.10.11)

(86)国際出願番号 PCT/EP2016/001344

(87)国際公開番号 WO2017/025179

(87)国際公開日 平成29年2月16日(2017.2.16)

審査請求日 令和1年8月2日(2019.8.2.)

(31)優先権主張番号 15180278.2

(32)優先日 平成27年8月7日(2015.8.7)

(33)優先権主張国・地域又は機関

欧州特許庁(EP)

(73)特許権者 591032596

メルク パテント ゲゼルシャフト ミット

ベシュレンクテル ハフツング

Merck Patent Gesell
schaft mit beschräe
nkter Haftung

ドイツ連邦共和国 デー-64293 ダ

ルムシュタット フランクフルター シュ

トラーゼ 250

Frankfurter Str. 25

0, D-64293 Darmstad

t, Federal Republic

of Germany

(74)代理人 100094569

弁理士 田中 伸一郎

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 有効な部位特異的バイオコンジュゲーションのためのトランスクルタミンタグ

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】

- グルタミル - アミド結合を介して、アミノ供与体を含む基質に共有結合で連結された、少なくとも 1 つのアシルグルタミン含有アミノ供与体配列を含むタンパク質であって、前記アシルグルタミン含有アミノ酸供与体配列が、アミノ酸配列 X₁X₂X₃T Y F Q A Y G X₄X₅X₆

(式中

X₁は、疎水性アミノ酸であり、X₂は、負に荷電したアミノ酸であり、X₃は、C または N であり、X₄は、C または N であり、X₅は、極性の非荷電側鎖を有するアミノ酸の 1 つであり、X₆は、負に荷電したアミノ酸である；又は

式中

X₁が、A、V、I、L、M または G のいずれか 1 つであり、X₂が、D または E の 1 つであり、X₃が、C であり、X₄が、C または N であり、X₅が、S、T、または N であり、X₆が、D または E の 1 つである；又は

式中

X₁が、A、V、I、L、MまたはGのいずれか1つであり、
X₂が、DまたはEの1つであり、
X₃が、Cであり、
X₄が、Cであり、
X₅が、S、TまたはNであり、
X₆が、DまたはEの1つである；又は

式中

X₁が、A、V、I、L、MまたはGのいずれか1つであり、
X₂が、Eであり、
X₃が、Cであり、
X₄が、Cであり、
X₅が、Tであり、
X₆が、Eである；又は

10

式中

X₁が、Gであり、
X₂が、Eであり、
X₃が、Cであり、
X₄が、Cであり、
X₅が、Tであり、
X₆が、Eである（配列番号90）を含む、タンパク質。

20

【請求項2】

前記アミノ供与体を含む基質が、少なくとも-アミノ基を含むか、または第1級アミノ末端アミノ基を有するGGGの配列を有する少なくとも1つのトリペプチドを含む、請求項1に記載のタンパク質。

【請求項3】

前記アミノ供与体を含む基質が、リシン残基、リシンが染料またはビオチンとカップリングしてなるリシン誘導体、または少なくとも1つのリシン残基を含むポリペプチドである、請求項1または2に記載のタンパク質。

30

【請求項4】

前記アミノ供与体を含む基質がさらなる分子に共有結合している、請求項1から3までのいずれか1項に記載のタンパク質。

【請求項5】

前記さらなる分子が、染料、放射性同位体、薬物、リボザイム、ナノボディ、酵素、またはリンカーの1つである、請求項4に記載のタンパク質。

【請求項6】

前記リンカーが切断可能であるかまたは非切断性であり、前記リンカーが、染料、放射性同位体、または細胞毒とカップリングまたは共有結合している、請求項5に記載のタンパク質。

40

【請求項7】

抗体、抗原結合抗体フラグメント、Fcドメイン、非免疫グロブリンスキャフォールド、または酵素のいずれか1つである、請求項1から6までのいずれか1項に記載のタンパク質。

【請求項8】

アミノ供与体を含む基質を、配列番号2のポリペプチド配列を含むアシルグルタミン含有アミノ酸供与体に共有結合でカップリングさせる方法であって、トランスグルタミナーゼの存在下で、前記アミノ供与体を含む基質と前記アシルグルタミン含有アミノ酸供与体とを接触させて、請求項1から7までのいずれか1項に記載のタンパク質を得るステップを含む、方法。

【請求項9】

50

前記トランスグルタミナーゼが、m T G 2 である、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 10】

前記アシルグルタミン含有アミノ酸供与体が、抗体、抗原結合抗体フラグメント、非免疫グロブリンスキャフォールド、または酵素である、請求項 8 または 9 に記載の方法。

【請求項 11】

前記アミノ供与体を含む基質が、染料、薬物、リボザイム、ナノボディ、酵素、またはリンカーとカップリングまたは共有結合している、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

前記リンカーが切断可能または非切断性であり、染料、放射性同位体、または細胞毒とカップリングしている、請求項 11 に記載の方法。

10

【請求項 13】

請求項 8 から 12 までのいずれか 1 項に記載の方法による方法により得ることができるタンパク質。

【請求項 14】

請求項 8 から 12 までのいずれか 1 項に記載の方法における配列番号 2 のポリペプチド配列の使用。

【請求項 15】

配列番号 2 のアミノ酸配列を含むタンパク質。

【請求項 16】

配列番号 2 のアミノ酸配列からなるポリペプチド。

20

【請求項 17】

配列番号 2 のアミノ酸配列を含むポリペプチド配列をコードするポリヌクレオチド。

【請求項 18】

少なくとも 1 つの配列番号 2 のアミノ酸配列を含む抗体またはその抗原結合フラグメント、二価抗体、または VHH 抗体。

【請求項 19】

請求項 11 または 12 に記載の方法により少なくとも 1 つのリンカーに共有結合でカップリングしている、請求項 18 に記載の抗体。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

30

【0001】

本発明は、バイオコンジュゲーションの分野、特に、微生物のトランスグルタミナーゼに媒介されるバイオコンジュゲーション、およびバイオコンジュゲート、例えば抗体 - 薬物コンジュゲートなどを製造するためのその使用の分野に関する。

【背景技術】

【0002】

合成分子または天然分子を用いたタンパク質の改変は、タンパク質の機能を研究するために、またはタンパク質に追加の性質を付け加えるために役立つ技法である。天然または合成高分子、特にタンパク質を含むバイオコンジュゲーションは、それらの構造を要求に合わせて作るためおよび機能的性質を操作するための強力な手段として出現した（例えば、Perez et al. Drug Discovery Today, 2014 Vol 19 (7): 869-881 を参照されたい）。タンパク質の改変またはバイオコンジュゲーションは、典型的には、対象のタンパク質へのさらなる分子の化学的連結により、または酵素的に、のいずれかで行われる。

生体分子のコンジュゲーションのために現在利用されている化学的戦略は、システインおよびリシン残基が容易に改変され得るという事実を使用している。システイン残基は、それらを - ハロケトンまたはマイケル反応受容体、例えばマレイミド誘導体などと反応させることによりアルキル化することができる。リシン残基の改変は、リシンの第 1 級アミノ基を介してタンパク質を標識する最も古く最も簡単な方法である。対象のタンパク質内のリシンの - アミノ基は、活性化されたエステル、スルホニル塩化物、イソシアネートおよびイソチオシアネートと容易に反応して、対応するアミド、スルホンアミド、ウレア

40

50

およびチオウレアを生じることができる（例えば、Takaoka et al., Angew. Chem. Int. Ed. 2013, 52, 4088-4106を参照されたい）。バイオコンジュゲーションのためには非常に効率的であるが、これらの化学的手法は必然的に不均一な混合物を生じる。この効果は、リシンを少ししか有しないより小さい分子で、例えばIgGタイプの分子と比較してFc領域を欠く抗体フラグメントにおいて、より顕著になる。バイオコンジュゲーションのさらなる例は、蛍光性タンパク質、染料のコンジュゲーション、または機能性分子、例えばPEG、ポルフィン、ペプチド、ペプチド核酸、および薬物を繋ぐことを含む（Takaoka et al., Angew. Chem. Int. Ed. 2013, 52, 4088 - 4106）。

【0003】

タンパク質バイオコンジュゲートの調製は、所望の成果に応じて困難のレベルが変化し得る。例えば、バイオコンジュゲーションは、ポリエチレン glycole (PEG) の血清アルブミンへの単純且つ非特異的な接続 (Abuchowski et al. J. of Biological Chemistry (1977) Vol. 252 (11): 3578-3581) から、非常に高度の技能を要する均一な抗体薬物バイオコンジュゲートの調製までの範囲にわたり得る。

10

【0004】

この難題は、他の手法の中でも、酵素に媒介されるコンジュゲーションを適用することにより対処することができる。例えば、WO 2014 / 001325 A1 には、抗体のFc領域への部位特異的バイオコンジュゲーションのためのソルターゼAの使用が開示されている。ソルターゼA (SrtA) は、黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) で最初に記載された、細菌の膜内在性タンパク質である。SrtAは、細菌の細胞壁にタンパク質を固定するペプチド転移反応を触媒する。選別シグナルLPXTG、(X = D、E、A、N、Q、またはK) の認識で、触媒的システインが残基TとGの間のペプチド結合を切断して、その結果チオアシル中間体の形成が生じる。次に、このチオアシル中間体は、求核剤として作用するアミノ末端グリシンと繋いで反応することができる。SrtAは、N末端（オリゴ）グリシンを求核剤として受け入れ、2分子間の新しいペプチド結合を創り出す。SrtAは、生理学的条件下で機能して、タンパク質を例えばビオチンで標識する、またはHER2 - 特異的組み替えFabを植物細胞毒ゲロニンで機能化するバイオコンジュゲーション反応のために使用されてきた（例えば、Popp et al. (2011) Angew Chemie Int. Ed. 50: 5024-5032; Kornberger et al (2014) mAbs 6 (2): 354-366を参照されたい）。典型的には、標的のタンパク質をLPXTGモチーフ、繋いで精製タグによりカルボキシ末端で標識し、SrtAで媒介されるペプチド転移により、精製タグを除去して、標識されたタンパク質が生じる。

20

【0005】

バイオコンジュゲーション反応におけるSrtAの使用の主要な弱点の1つは、トランスペプチダーゼ反応を触媒するために必要な酵素の高濃度である。SrtAの分子進化を使用して反応速度を改善するための試みがなされた結果、該酵素 (enzyme) のLPXTGモチーフに対する親和性が約140倍に増大した（例えば、Proc Natl Acad Sci U S A. 2011 Jul 12; 108(28): 11399-11404を参照されたい）。SrtAに媒介されるバイオコンジュゲーション反応を使用する別の欠点は、触媒される反応の可逆性である。ここで、ジケトピペラジンの形成を通して、SrtAにより切除されたペプチドフラグメントの失活を経てアミノ末端グリシン含有部分を不可逆的に連結することができる化学的に変更されたSrtA基質LPETGG - イソアシル - セリンおよびLPETGG - イソアシル - ホモセリンの使用により、この限界を克服するための試みもなされた（例えば、Liu et al., J. Org. Chem. 2014, 79, 487-492を参照されたい）。

30

【0006】

酵素に媒介される別の重要なバイオコンジュゲーション手法は、トランスグルタミナーゼ (TGアーゼ)、特に微生物のトランスグルタミナーゼ(mTGアーゼ)の使用を含む。TGアーゼは、哺乳動物、爬虫類、植物および微生物を含む数種類の生物体で検出される酵素の大きいファミリーである。トランスグルタミナーゼは、タンパク質 - グルタミン - グルタミルトランスフェラーゼ (E.C.2.3.2.13) であり、それは、典型的

40

50

には、グルタミン残基のリシン残基への pH 依存性アミド基転移を触媒する。大部分の TG アーゼは、リシン基質に関して無差別のように思われ、アミン供与体として役立つリシンの代用基として 5 - アミノ - ペンチル基を受け入れるようにさえ思われる。しかしながら、グルタミン残基を基質として認識する TG アーゼの選択性は、グルタミン残基が TG アーゼにより受け入れられるためには、残基がタンパク質の可撓性領域に位置していなければならぬことにおいて、はるかにより厳格であるように思われる（例えば、Jeger et al. Angew. Chem Int. Ed. 2010, 49, 9995-9997; Fontana et al. Adv Drug Deliv Rev. 2008 Jan 3; 60(1): 13-28 を参照されたい）。

【 0 0 0 7 】

トランスグルタミナーゼは、大部分の組織および体液中に広く分布しており、種々の生理学的機能に関与すると考えられている。トランスグルタミナーゼに媒介される反応の 1 例は、第 X I I I a 因子による血液凝固中の出血の停止であり、それは、フィブリン分子間の架橋を触媒する活性化された血漿トランスグルタミナーゼの形態である（例えば、Griffin et al. Biochem. J. (2002) 368, 377-396 を参照されたい）。しかしながら、細菌のトランスグルタミナーゼの生物学的機能は、大きく未知のままである。ストレプトマイセス・モバラエンシス (*S t r e p t o m y c e s m o b a r a e n s i s*) の mTG アーゼが、気中菌糸 (*a e r i a l h y p h a e*) および胞子の発達中に阻害タンパク質を架橋させると推測されてきた。

【 0 0 0 8 】

S . モバラエンシスからのトランスグルタミナーゼは、哺乳動物の TG アーゼに有意の相同意を示さず、最も詳細に特性決定されているヒトの TG アーゼファミリーのメンバーであるヒト TG 2 と比較して、独特の構造を有する。その哺乳動物のオルソログと対照的に、S . モバラエンシスの mTG 2 は、カルシウムに依存せず、分子量は僅か 37.9 kDa であり、それは、第 X I I I 因子様 TG アーゼの分子量の約半分にすぎない。mTG 2 は、その哺乳動物のオルソログより高い反応速度によっても特徴づけられる。mTG 2 の広く行きわたった使用に寄与した別の態様は、該酵素は、組み替えタンパク質として容易に大量に製造することができるという事実であり、そのことがその生化学的性質に関連して、食品産業においても mTG 2 の広い用途に導いた（例えば、Sommer et al. (2011) Protein Expression and Purification 77:9-19; Marx et al., (2008) Enzyme and Microbial technology 42:568-575 を参照されたい）。mTG 2 のランダムな突然変異生成も、酵素の熱力学的安定性を向上させるために使用してきた（例えば、Journal of Biotechnology 136 (2008) 156- 162 を参照されたい）。注目すべきこととして、上昇した温度における mTG 2 の向上した安定性を生じているすべての変異は、酵素のアミノ末端領域に位置する。

【 0 0 0 9 】

微生物のトランスグルタミナーゼ、mTG 2 は、β - ラクトアルブミン、ヒト成長ホルモンおよびインターロイキン - 2 などのタンパク質の部位特異的および化学量論的 PEG 化、または抗体の部位特異的および化学量論的改変のためにも使用してきた（例えば、Jeger et al. Angew. Chem Int. Ed. 2010, 49, 9995-9997; Fontana et al., Adv Drug Deliv Rev 2008 Jan 3; 60(1): 13-28 を参照されたい）。全体として、反応性グルタミンの数は、表面に露出したグルタミンの合計数と比較して低いことが見出された。

【 0 0 1 0 】

mTG 2 は、天然の、完全にグリコシル化されたモノクローナル抗体上でトランスグルタミン化を触媒するために使用される場合、それぞれのモノクローナル抗体中の如何なるグルタミン残基も基質として認識しないことが見出された。脱グリコシル化抗体または非グリコシル化抗体のみが、mTG 2 によって基質として認識されることが見出された。興味あることに、脱グリコシル化抗体または非グリコシル化抗体 (Q 295) 中で、1つのグルタミン残基のみがアシルグルタミン基質として役立つことが見出された。このことは、抗体薬物コンジュゲートを生成させるための抗体の部位特異的バイオコンジュゲーションのための、特にヒトにおける使用のための mTG 2 の使用を強く制限する。興味あること

10

20

30

40

50

に、Fc変異体(N297Q)抗体が使用される場合、この第2のグルタミン残基もそれとの基質とともにmTG2により改変されることが見出された(Fontana et al. *Adv Drug Deliv Rev.* 2008 Jan;60(1):13-28)。

【0011】

mTGに媒介されるPEG化について最も詳細に特性決定されたタンパク質の1つはヒト成長ホルモン(hGH)である。hGHについて、2つのグルタミン残基が主要なコンジュゲーション部位、すなわちQ40およびQ141として同定された。mTGの突然変異生成は、Q141に対する選択性が増大したmTGバリアントを生じた。別の研究で、サケのカルシトニンおよびヒト成長ホルモンについて、反応性グルタミンの周囲の二次構造における変化を生じさせると推定される溶媒中における変化は、単一のグルタミン残基とのコンジュゲーションを制限するために使用することができ、それ故、選択性を向上させることが見出された。10

ヒトイントロイキン2(h1L-2)の場合には、単一の反応性グルタミン(Gln74)が見出され、12kDaのPEGまたはガラクトースが末端の3つの触覚をもつグリコシドとコンジュゲーションされる。

【0012】

人工的(Artificial)なペプチド配列が、mTG2の基質特異性をさらに調べるためにこれまで使用してきた。例えば、基質のグルタミン残基周囲の配列効果は、各グリシンが数種のアミノ酸に個々に置換されたヘプタペプチド基質(GGGQGGG)に関して最初に究明された(Ohtsuka et al. *Biosci., Biotechnol., Biochem.* 64, 2608-13)。グルタミンのN末端における疎水性残基が、GGGQGGGペプチド(-3、-2、および-1位で)に比して反応を加速するが、しかしながら、全体として反応速度は低いことが見出された。20

mTGの好みの基質配列も、約1011個の線状ペプチドのはるかに大きいライブラリーを利用するファージディスプレイベプチドライブラリーを使用して評価した。大部分の同定されたクローンは、芳香族アミノ酸(W、F、またはY)を-5~-3位に、アルギニンまたは疎水性残基を+1または+2位に、および疎水性残基を-2および-1位に含有した(例えば、Sugimura et al., *Archives of Biochemistry and Biophysics* 477 (2008) 379-383を参照されたい)。

抗体薬物コンジュゲートの生成のためのmTG2の使用は、機能的ペイロードのモノクローナル抗体対応物とのバイオコンジュゲーションを必要とする。抗体薬物コンジュゲート(ADC)において、抗体は、非常に強い毒素のがん細胞への取り込みおよび放出を特異的に指示して、がん患者のための新規なおよび効果的な新しい治療の選択肢として近年大きな関心を引くようになった技法である。30

【0013】

販売の承認を受けたADCの例は、転移性乳がんおよびホジキンリンパ腫の治療のためのKadcyla(登録商標)(トラスツズマブエムタンシン)およびAdcetris(登録商標)(ブレンツキシマブベドチン)を含む。これらの抗体ならびに現在臨床開発中の他の抗体候補は、例えばmTG2を使用するバイオコンジュゲーションによっては得られず、異なる数の薬物分子がそれらに結合した抗体の不均一な混合物を生じるそれらの製造のための化学的コンジュゲーション方法に依存する(例えば、*Handbook of Therapeutic Antibodies*, 2nd edition, edited by S. Dubel and J. M. Reichert, John Wiley & Sons (2014), pp. 369を参照されたい)。40

【0014】

ADCの不均一性は、特に材料の重要な部分のコンジュゲーションが不十分な場合、薬効に不利に影響し得る。コンジュゲーションが不十分な抗体は、標的結合に関してADCと競合して、適当にコンジュゲーションされたADCの効力の低下を生じることが示された。抗体への増大した薬物負荷は、ADCの効力に不利に影響し得る。データは、薬物:抗体比の高いADCは、血流からより急速に除去されて、その結果効力は減少することを示した(例えば、Sanderson et al., *Clin. Cancer Res.* 2005; 11: 843-52を参照された50

い）。抗CD30モノクローナル抗体 - アウリストチンE (MMAE) コンジュゲートを用いる研究により、1:2 ~ 1:4の抗体 : 薬物の化学量論を有するADCが最も効果的であり、1:4の比が最も好ましいことが示された（例えば、Hamblett et al. *zz Clinical Cancer Research* (2004) Vol. 10, 7063-7070を参照されたい）。

【0015】

WO 2013 / 092983には、TGアーゼを使用する薬物で免疫グロブリンを機能化する方法が開示されている。この手法は、抗体の重鎖の内側にQ供与体を生じさせるように指向された突然変異生成により新しい部位を得る方法を記載する。この経験的方法は、改変のためのグルタミン残基のTGアーゼによる選択を支配する規則が、まだ大いに未知なので、多数の変異体を試験する必要がある。その結果として、Q供与体を担持する新しい抗体を開発するためにこの方法を使用することは、時間を消費し且つコストが増大することである。

WO 2012 / 059882は、特異的に操作されたポリペプチドコンジュゲートおよびトランスグルタミナーゼを使用してそのようなコンジュゲートを作製する方法をさらに開示している。

WO 2015 / 097267は、mTG2に媒介されるコンジュゲーション反応のために利用され得るS.モバラエンシスのmTG2などのトランスグルタミナーゼと、グルタミン供与体として、選択的に反応するペプチド配列を開示している。

タンパク質とmTG2とのバイオコンジュゲーションに関する研究およびバイオコンジュゲーション反応のためのグルタミン供与体として利用することができる新しい配列モチーフの探査にもかかわらず、天然MTGの基質部位の配列も構造的環境も知られていない。したがって、バイオコンジュゲートのより効率的な製造のための、特に抗体 : 薬物の化学量論が十分限定されたADCの製造のためのmTG2により認識される基質の範囲を広げる必要がある。

【発明の概要】

【0016】

本発明者らは、驚くべきことに、少なくともアミノ酸配列TYFQAYGを含むストレプトマイセス・モバラエンシス株40847のタンパク質を誘導するディスパーーゼ自己分解から誘導されるアシルグルタミン含有供与体配列は、mTG2に媒介されるトランスグルタミン化反応で効率的に使用できることを見出した。

【0017】

したがって、本発明は、第1の実施形態で、-グルタミル-アミド結合を介してアミノ供与体を含む基質に共有結合で連結した少なくとも1つのアシルグルタミン含有アミノ供与体配列を含むタンパク質であって、少なくとも1つのアシルグルタミン含有アミノ酸供与体配列は、配列番号1（配列番号1（TYFQAYG））によるアミノ酸配列を含む、タンパク質を提供する。

1実施形態により、本発明によるアミノ供与体を含む基質は、少なくとも1個の-アミノ基、または第1級アミノ末端アミノ基を有するGGGの配列を有する少なくとも1個のトリペプチドを含む。

1実施形態において、本発明によるアミノ供与体を含む基質は、リシン残基、リシン誘導体、リシン薬物コンジュゲート、少なくとも1個のリシン残基を含むポリペプチドである。

1実施形態により、本発明の上の実施形態のいずれか1つによりアミノ供与体を含む基質は、さらなる分子に共有結合している。

1実施形態により、アミノ供与体を含む基質のトリペプチドGGGは、そのカルボキシ末端を介してさらなる分子に共有結合している。

1実施形態において、本発明によるさらなる分子（model molecule）は、染料、放射性同位体、薬物、リボザイム、ナノボディ、酵素、またはリンカーのいずれか1つである。

1実施形態において、本発明によるさらなる分子は、切断可能であるかまたは非切断性であるリンカーである。

1実施形態により、本発明によるリンカーは、染料、放射性同位体、または細胞毒とカッ

10

20

30

40

50

プリングまたは共有結合している。

【0018】

好ましい実施形態において、上の実施形態のいずれか1つによる本発明のタンパク質は、アシルグルタミン含有アミノ酸供与体配列を含み、その配列は、配列番号2(X₁X₂X₃TYFQAYGX₄X₅X₆)のアミノ酸配列を含み、ここで、X₁は、疎水性アミノ酸であり、X₂は、負に荷電したアミノ酸であり、X₃は、CまたはNであり、X₄は、CまたはNであり、X₅は、極性の非荷電側鎖を有するアミノ酸の1つであり、X₆は、負に荷電したアミノ酸である。

【0019】

好ましい実施形態において、上の実施形態のいずれか1つによる本発明のアシルグルタミン含有アミノ酸供与体配列は、

X₁が、A、V、I、L、MまたはGのいずれか1つであり、X₂が、DまたはEの1つであり、X₃が、Cであり、X₄が、CまたはNであり、X₅が、S、T、またはNであり、X₆が、D、またはEの1つである
配列番号2のアミノ酸配列を含む。

好ましい実施形態によれば、本発明のアシルグルタミン含有アミノ酸供与体配列は、

X₁が、A、V、I、L、MまたはGのいずれか1つであり、X₂が、DまたはEの1つであり、X₃が、Cであり、X₄が、Cであり、X₅が、S、T、またはNであり、X₆が、DまたはEの1つである
配列番号2のアミノ酸配列を含む。

【0020】

より好ましい実施形態により、本発明のアシルグルタミン含有アミノ酸供与体配列は、

X₁が、A、V、I、L、MまたはGのいずれか1つであり、X₂が、Eであり、X₃が、Cであり、X₄が、Cであり、X₅が、Tであり、X₆が、Eである
配列番号2のアミノ酸配列を含む。

さらにより好ましい実施形態によれば、本発明のアシルグルタミン含有アミノ酸供与体配列は、配列番号90のアミノ酸配列を含む。

1実施形態において、本発明によるタンパク質は、抗体、抗原結合抗体フラグメント、Fcドメイン、酵素、非免疫グロブリンスキンフォールド(scaffold)の1つである。

1実施形態において、本発明によるタンパク質は、モノクローナル抗体、二価抗体、VH、Fab、F(ab)₂またはscFvである。

好ましい実施形態により、本発明によるタンパク質は、ヒトのまたはヒト化されたモノクローナル抗体またはそれらのフラグメントである。

【0021】

一様において本発明は、アミノ供与体を含む本発明の基質を、配列番号2のポリペプチド配列を含むアシルグルタミン含有アミノ酸供与体に共有結合でカップリングさせる方法

10

20

30

40

50

であって、トランスグルタミナーゼ、好ましくはmTG2の存在下で、本発明によるアミノ供与体を含む基質と本発明によるアシルグルタミン含有アミノ酸供与体とを接触させて、上の実施形態のいずれか1つによる本発明のタンパク質を得るステップを含む、方法を提供する。

1 実施形態において、本発明の方法のアシルグルタミン含有アミノ酸供与体は、抗体、抗原結合抗体フラグメント、酵素、または非免疫グロブリンスキャフォールドである。

1 実施形態により、本発明の方法のアミノ供与体を含む基質は、染料、薬物、リボザイム、ナノボディ、酵素、またはリンカーとカップリングまたは共有結合する。

本発明の1実施形態により、リンカーは、切断可能であるかまたは非切断性であり、染料、放射性同位体、または細胞毒とカップリングする。

1 実施形態において、本発明は、本明細書で開示された本発明の方法により得ることができるタンパク質を提供する。

1 実施形態において、本発明は、本明細書で開示された実施形態のいずれか1つによる本発明の方法における、配列番号2のいずれか1つによるポリペプチド配列の使用を提供する。

1 実施形態により、本発明は、配列番号2のアミノ酸配列を含むポリペプチドを含むタンパク質を提供する。

1 実施形態において、本発明は、配列番号2のポリペプチドを提供する。

1 実施形態において、本発明は、本発明の配列番号2のポリペプチド配列をコードするポリヌクレオチドを提供する。

1 実施形態において、本発明は、配列番号2のポリペプチド配列をコードするポリヌクレオチドを含むベクターを提供する。

1 実施形態において、本発明は、本発明のポリヌクレオチドまたは本明細書で開示された本発明によるベクターを含む宿主細胞を提供する。

1 実施形態において、本発明は、配列番号2の少なくとも1つのアミノ酸配列を含む、本発明による抗体またはそれらの抗原結合フラグメント、二価抗体、またはVHH抗体を提供する。

したがって、本発明の抗体またはそれらの抗原結合フラグメント、二価抗体、またはVHH抗体は、ヒト化されているかまたはヒトのものである。

好ましい実施形態において、上で開示された本発明による抗体またはそれらの抗原結合フラグメントは、ヒト化されているかまたはヒトモノクローナル抗体である。

好ましい実施形態において、上で開示された本発明の抗体は、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、またはIgMタイプの抗体である。

1 実施形態において、上で開示された本発明の抗体は、上で開示された少なくとも1つのリンカーと、上で開示された本発明の方法により共有結合でカップリングさせる。

1 実施形態により、本発明のモノクローナル抗体の少なくとも1つのリンカーが、染料、放射性同位体、または細胞毒とさらにカップリングさせる。

好ましい実施形態において、本明細書で開示された本発明のモノクローナル抗体は、がん細胞表面抗原に特異的に結合する。

より好ましい実施形態では、上で開示された本発明のモノクローナル抗体はモノクローナル抗体c225(セツキシマブ)である。

【0022】

より好ましい実施形態において、本明細書で開示された本発明の抗体は、がんの治療で使用するためのものであり、より好ましくは、上で開示された本発明の抗体は、乳がん、前立腺がん、卵巣がん、子宮頸がん、皮膚がん、膵がん、好ましくは転移性結直腸がん(mCRC)、切除不能の肝臓転移、頭頸部の扁平上皮細胞癌、非小細胞肺癌(NSCLC)、頭頸部の扁平上皮細胞がん(HNSCC)の治療で使用するためのものである。

1 実施形態により、本発明は、本発明の抗体および少なくとも1種のさらなる薬学的活性成分を含む組成物を提供する。

1 実施形態において、本発明は、本明細書で開示された本発明の抗体を含む医薬または本

10

20

30

40

50

発明による組成物および少なくとも1種のさらなる成分を含む医薬を提供する。

1 実施形態において、本発明は、治療を必要とするがんに罹患した対象を治療する方法であって、前記患者に治療有効量の本発明による医薬組成物を投与することを含む、方法に関する。

【図面の簡単な説明】

【0023】

【図1】a) トランスグルタミナーゼに媒介される、グルタミン(Q)のアミン供与体基質とのコンジュゲーション。b) 基質タンパク質D A I Pから取られた天然トランスグルタミナーゼ認識配列のアミノ酸配列(1)および操作された配列(2)およびコンジュゲーションのためのこの研究で使用される配列(3)。c) D A I Pにおける機能的Q 2 9 8 ループを模倣した操作されたトランスグルタミナーゼ認識配列(M T G タグ)のデザインの模式的描写。

10

【図2】操作されたモデルペプチドと全長モノクローナル抗体とのM T Gに媒介されるコンジュゲーション。a) トランスグルタミナーゼ認識モチーフを含有する操作されたモデルペプチド2および3を、モノビオチニルカダベリン(4、M B C)を用いてM T Gに触媒される反応でビオチン化した。b) 配座が束縛されたペプチド2() (例えば、配列番号4の本発明のペプチド)を線状ペプチド3() (例えば、配列番号3または配列番号5の本発明のペプチドと)と比較したビオチン化速度。標準偏差を表す誤差バーは3組の実験から計算した。C末端にM T Gタグを有するビオチン化セツキシマップバリアントのS D S - P A G E ゲルおよびウェスタンプロット分析(9:配列番号90の本発明のM T Gタグ付き、10:配列番号246の本発明のM T Gタグ付き)。ビオチン化は、ストレプトアビシン-アルカリ性ホスファターゼコンジュゲートおよびN B T / B C I P(右パネル)を使用して可視化した。d) M T Gで促進されるビオチン化のために使用されるC末端M T Gタグを有するセツキシマップバリアントの全体図(7および8)およびそれぞれのコンジュゲート抗体(9および10)。

20

【図3】細胞アッセイおよびフローサイトメトリーにより研究されたビオチン化セツキシマップの結合。a) E G F R陽性E B C - 1細胞およびE G F R陰性C H O - K 1細胞(+ M T G r x .、中央および下側のパネル)を使用してセツキシマップw tと比較するビオチン化セツキシマップバリアント9および10の細胞結合アッセイ。細胞は、P r o L o n g(登録商標)D i a m o n d A n t i f a d e M o u n t a n tを使用して固定されてD A P I(青色)で標識され、ビオチン化はストレプトアビシン-A F 4 8 8で標識することにより可視化された(緑色)。細胞を、共焦点顕微鏡を使用して走査した。合併写真(M e r g e d p i c t u r e s)を示差干渉対照で示した(D I C)。b) ビオチン化セツキシマップバリアント9とインキュベートされたE G F R陽性E B C - 1細胞のフローサイトメトリー。ビオチン化セツキシマップと結合した細胞をストレプトアビシンA 1 e x a F l u o r(登録商標)4 8 8コンジュゲートの添加により蛍光標識した。

30

【図4】酸化されたペプチド2のトランスグルタミナーゼにより促進されたビオチン化のR P - H P L C分析(勾配10~80%)。2および5のピーク面積を分析してバックグラウンドを差し引いた。

【図5】精製された野性型セツキシマップ(レーン1)およびセツキシマップバリアント7および8のクーマシー染色された15%S D S - P A G E ゲル分析(例えば、バリアント7は、本発明によるセツキシマップに対応し、カルボキシ末端で配列番号90と融合して、ジスルフィド架橋により拘束または束縛されており、バリアントは、ジスルフィド架橋が形成されずにカルボキシ末端で配列番号246と融合して、配座は束縛されていないセツキシマップに対応する。抗体は、2-メルカプトエタノールの存在下で還元してからゲルに載せる(2 μg/レーン)。予め染色されたタンパク質の梯子(New England Bi o l a b s)は、タンパク質サイズをk D aで示している)。

40

【図6】トランスグルタミナーゼに媒介されるセツキシマップコンジュゲーションの対照実験、a) 埋め込まれたエンド-グルタミンをタンパク質から放出して、それらをトランスグルタミナーゼに接近可能にすると記載された活性物質である増大する濃度のアニオン界

50

面活性剤N - ラウロイルサルコシン(L S)の存在下における野性型セツキシマブとモノビオチニルカダベリン(M B C)とのトランスグルタミナーゼに媒介されるコンジュゲーションのクーマシー染色された 15 % SDS - PAGE ゲル分析。 b) 増大する濃度のアニオン界面活性剤N - ラウロイルサルコシン(L S)の存在下における野性型セツキシマブとモノビオチニルカダベリン(M B C)とのトランスグルタミナーゼに媒介されるコンジュゲーションのウェスタンプロット分析。ビオチン化は、ストレプトアビジン - アルカリ性ホスファターゼコンジュゲートおよび NBT / BCIP を使用して検出した。予め染色されたタンパク質の梯子(New England Biolabs)がタンパク質サイズを kDa で示している。

【図 7】 MALDI - MS 分析に先立ってトリプシン消化のために使用された 10 の重鎖の模式的図。 10

【図 8】 10 のトリプシンで消化された重鎖の MALDI - TOF - MS スペクトル。

【図 9】 10 のトリプシンで消化された重鎖の詳細な MALDI - TOF - MS スペクトル。

【図 10】 (A) トリプシン消化から誘導されたペプチドを、バイオインフォマティクスツール GPM AW を使用することにより分析した。システイン残基におけるカルバミドメチル(CAM)またはグルタミン残基におけるモノビオチニルカダベリン(M B C)のいずれかにより改変されたペプチドに藍色で下線を引き、改変なく同定されたペプチドに赤紫色で下線を引いた。 (B) 残基の 56 % 網羅率が達成されたことを示す残基網羅率の統計分析。 20

【図 11】セツキシマブの野生型配列からの C 末端リシンを有する(+ K 447)抗体とこの C 末端リシンを欠く(- K 447)抗体を比較する、セツキシマブの野生型(wt)およびバリアント 9 および 10 の SDS - PAGE ゲル分析。 MTG により触媒される分子内架橋が、 MTG タグとセツキシマブの野生型配列からの C 末端 Lys 残基(+ K 447)との予備実験で観察された。この架橋はこのリシンを削除する(- K 447)ことにより完全に撤廃することができた。

【図 12】 TAMRA - カダベリンおよび蛍光分析を使用する抗体コンジュゲーション有効度の決定。

【図 13】 Eleven 試薬を使用する抗体 7 および 8 中の遊離チオールの決定。

【図 14】 (A) ビオチン化セツキシマブを検出するためのストレプトアビジン - AP 、 NBT / BCIP を使用するウェスタンプロット。矢印は、セツキシマブ(ビオチニル化された)および mTG 2 の位置を示す。 (B) 指示されたものを積載するレーンでクーマシー染色されたタンパク質ゲル(C) 蛍光性アミノ供与体基質 GGG - TAMRA または TAMRA - カダベリン(cadavarine)とコンジュゲーションされた MTG タグ 1 (配列番号 90)、または MTG タグ 2 (配列番号 246)を含むセツキシマブを検出するための蛍光読み取り。 30

【図 15】トランスグルタミナーゼに媒介されるコンジュゲーション反応で使用される種々の第 1 級アミンについての細胞傷害性ペイロード。 (1) 非切断性ポリエチレンギリコール(PEG)リンカーおよび第 1 級アミノ基を有するモノメチルアウリスタチン E (MMAE)、 (2) 切断可能バリン - シトルリン - p - アミノベンジルカルバメート(vc - PABC)リンカー、 PEG - スペーサーおよび第 1 級アミンを有するモノメチルアウリスタチン E (MMAE)、 (3) 切断可能バリン - シトルリン - p - アミノベンジルカルバメート(vc - PABC)リンカーおよび脂肪族アミノ基を有するモノメチルアウリスタチン E (MMAE)、 (4) 切断可能バリン - シトルリン - p - アミノベンジルカルバメート(vc - PABC)リンカーおよび脂肪族アミノ基を有するモノメチルアウリスタチン F (MMAF)。 40

【図 16】：微生物のトランスグルタミナーゼ(MTG)の触媒作用により合成された抗体薬物コンジュゲート(ADC)の疎水性相互作用クロマトグラフィー(HIC)。 ADC は、図 15 に示した細胞傷害性ペイロードの 1 ~ 4 とその重鎖の各々にカルボキシ末端 MTG タグを有する IgG1 抗体(セツキシマブ)との酵素に媒介されるコンジュゲーシ

10

20

30

40

50

ヨンにより生成された。(A)空試験、(B)非コンジュゲーション抗体対照、(C)ペイロード1に対するコンジュゲーションにより得られた種々の薬物対抗体比(DAR)を有するADC、(D)ペイロード2に対するコンジュゲーションにより得られた種々の薬物対抗体比(DAR)を有するADC、(E)ペイロード3に対するコンジュゲーションにより得られた種々の薬物対抗体比(DAR)を有するADC、(F)ペイロード4に対するコンジュゲーションにより得られた種々の薬物対抗体比(DAR)を有するADC。

【発明を実施するための形態】

【0024】

配列表

配列番号1～配列番号294に記載の配列は本発明によるものであり、本発明の実施形態に従って使用することができる。

配列番号1 TYFQAYG

配列番号2 X₁X₂X₃ TYFQAYG X₄X₅X₆

配列番号3 X₁X₂C TYFQAYG NX₅X₆

配列番号4 X₁X₂C TYFQAYG CX₅X₆

配列番号5 X₁X₂N TYFQAYG NX₅X₆

配列番号6 X₁X₂N TYFQAYG CX₅X₆

配列番号7 ADC TYFQAYG CSD

配列番号8 VDC TYFQAYG CSD

配列番号9 IDC TYFQAYG CSD

配列番号10 LDC TYFQAYG CSD

配列番号11 MDC TYFQAYG CSD

配列番号12 GDC TYFQAYG CSD

配列番号13 AEC TYFQAYG CSD

配列番号14 VEC TYFQAYG CSD

配列番号15 IEC TYFQAYG CSD

配列番号16 LEC TYFQAYG CSD

配列番号17 MEC TYFQAYG CSD

配列番号18 GEC TYFQAYG CSD

配列番号19 ADC TYFQAYG NSD

配列番号20 VDC TYFQAYG NSD

配列番号21 IDC TYFQAYG NSD

配列番号22 LDC TYFQAYG NSD

配列番号23 MDC TYFQAYG NSD

配列番号24 GDC TYFQAYG NSD

配列番号25 AEC TYFQAYG NSD

配列番号26 VEC TYFQAYG NSD

配列番号27 IEC TYFQAYG NSD

配列番号28 LEC TYFQAYG NSD

配列番号29 MEC TYFQAYG NSD

配列番号30 GEC TYFQAYG NSD

配列番号31 ADC TYFQAYG CSE

配列番号32 VDC TYFQAYG CSE

配列番号33 IDC TYFQAYG CSE

【0025】

配列番号34 LDC TYFQAYG CSE

配列番号35 MDC TYFQAYG CSE

配列番号36 GDC TYFQAYG CSE

配列番号37 AEC TYFQAYG CSE

配列番号38 VEC TYFQAYG CSE

10

20

30

40

50

配列番号 3 9	I E C	T Y F Q A Y G	C S E
配列番号 4 0	L E C	T Y F Q A Y G	C S E
配列番号 4 1	M E C	T Y F Q A Y G	C S E
配列番号 4 2	G E C	T Y F Q A Y G	C S E
配列番号 4 3	A D C	T Y F Q A Y G	N S E
配列番号 4 4	V D C	T Y F Q A Y G	N S E
配列番号 4 5	I D C	T Y F Q A Y G	N S E
配列番号 4 6	L D C	T Y F Q A Y G	N S E
配列番号 4 7	M D C	T Y F Q A Y G	N S E
配列番号 4 8	G D C	T Y F Q A Y G	N S E
配列番号 4 9	A E C	T Y F Q A Y G	N S E
配列番号 5 0	V E C	T Y F Q A Y G	N S E
配列番号 5 1	I E C	T Y F Q A Y G	N S E
配列番号 5 2	L E C	T Y F Q A Y G	N S E
配列番号 5 3	M E C	T Y F Q A Y G	N S E
配列番号 5 4	G E C	T Y F Q A Y G	N S E
配列番号 5 5	A D C	T Y F Q A Y G	C T D
配列番号 5 6	V D C	T Y F Q A Y G	C T D
配列番号 5 7	I D C	T Y F Q A Y G	C T D
配列番号 5 8	L D C	T Y F Q A Y G	C T D
配列番号 5 9	M D C	T Y F Q A Y G	C T D
配列番号 6 0	G D C	T Y F Q A Y G	C T D
配列番号 6 1	A E C	T Y F Q A Y G	C T D
配列番号 6 2	V E C	T Y F Q A Y G	C T D
配列番号 6 3	I E C	T Y F Q A Y G	C T D
配列番号 6 4	L E C	T Y F Q A Y G	C T D
配列番号 6 5	M E C	T Y F Q A Y G	C T D
配列番号 6 6	G E C	T Y F Q A Y G	C T D
配列番号 6 7	A D C	T Y F Q A Y G	N T D
配列番号 6 8	V D C	T Y F Q A Y G	N T D
配列番号 6 9	I D C	T Y F Q A Y G	N T D
配列番号 7 0	L D C	T Y F Q A Y G	N T D
配列番号 7 1	M D C	T Y F Q A Y G	N T D
配列番号 7 2	G D C	T Y F Q A Y G	N T D
配列番号 7 3	A E C	T Y F Q A Y G	N T D
配列番号 7 4	V E C	T Y F Q A Y G	N T D
配列番号 7 5	I E C	T Y F Q A Y G	N T D
配列番号 7 6	L E C	T Y F Q A Y G	N T D
配列番号 7 7	M E C	T Y F Q A Y G	N T D
配列番号 7 8	G E C	T Y F Q A Y G	N T D
配列番号 7 9	A D C	T Y F Q A Y G	C T E
配列番号 8 0	V D C	T Y F Q A Y G	C T E
【 0 0 2 6 】			
配列番号 8 1	I D C	T Y F Q A Y G	C T E
配列番号 8 2	L D C	T Y F Q A Y G	C T E
配列番号 8 3	M D C	T Y F Q A Y G	C T E
配列番号 8 4	G D C	T Y F Q A Y G	C T E
配列番号 8 5	A E C	T Y F Q A Y G	C T E
配列番号 8 6	V E C	T Y F Q A Y G	C T E
配列番号 8 7	I E C	T Y F Q A Y G	C T E

10

20

30

40

50

配列番号 8 8	L E C	T Y F Q A Y G	C T E	
配列番号 8 9	M E C	T Y F Q A Y G	C T E	
配列番号 9 0	G E C	T Y F Q A Y G	C T E	
配列番号 9 1	A D C	T Y F Q A Y G	N T E	
配列番号 9 2	V D C	T Y F Q A Y G	N T E	
配列番号 9 3	I D C	T Y F Q A Y G	N T E	
配列番号 9 4	L D C	T Y F Q A Y G	N T E	
配列番号 9 5	M D C	T Y F Q A Y G	N T E	
配列番号 9 6	G D C	T Y F Q A Y G	N T E	
配列番号 9 7	A E C	T Y F Q A Y G	N T E	10
配列番号 9 8	V E C	T Y F Q A Y G	N T E	
配列番号 9 9	I E C	T Y F Q A Y G	N T E	
配列番号 1 0 0	L E C	T Y F Q A Y G	N T E	
配列番号 1 0 1	M E C	T Y F Q A Y G	N T E	
配列番号 1 0 2	G E C	T Y F Q A Y G	N T E	
配列番号 1 0 3	A D C	T Y F Q A Y G	C N D	
配列番号 1 0 4	V D C	T Y F Q A Y G	C N D	
配列番号 1 0 5	I D C	T Y F Q A Y G	C N D	
配列番号 1 0 6	L D C	T Y F Q A Y G	C N D	
配列番号 1 0 7	M D C	T Y F Q A Y G	C N D	20
配列番号 1 0 8	G D C	T Y F Q A Y G	C N D	
配列番号 1 0 9	A E C	T Y F Q A Y G	C N D	
配列番号 1 1 0	V E C	T Y F Q A Y G	C N D	
配列番号 1 1 1	I E C	T Y F Q A Y G	C N D	
配列番号 1 1 2	L E C	T Y F Q A Y G	C N D	
配列番号 1 1 3	M E C	T Y F Q A Y G	C N D	
配列番号 1 1 4	G E C	T Y F Q A Y G	C N D	
配列番号 1 1 5	A D C	T Y F Q A Y G	N N D	
配列番号 1 1 6	V D C	T Y F Q A Y G	N N D	
配列番号 1 1 7	I D C	T Y F Q A Y G	N N D	30
配列番号 1 1 8	L D C	T Y F Q A Y G	N N D	
配列番号 1 1 9	M D C	T Y F Q A Y G	N N D	
配列番号 1 2 0	G D C	T Y F Q A Y G	N N D	
配列番号 1 2 1	A E C	T Y F Q A Y G	N N D	
配列番号 1 2 2	V E C	T Y F Q A Y G	N N D	
配列番号 1 2 3	I E C	T Y F Q A Y G	N N D	
配列番号 1 2 4	L E C	T Y F Q A Y G	N N D	
配列番号 1 2 5	M E C	T Y F Q A Y G	N N D	
配列番号 1 2 6	G E C	T Y F Q A Y G	N N D	
配列番号 1 2 7	A D C	T Y F Q A Y G	C N E	40
【 0 0 2 7 】				
配列番号 1 2 8	V D C	T Y F Q A Y G	C N E	
配列番号 1 2 9	I D C	T Y F Q A Y G	C N E	
配列番号 1 3 0	L D C	T Y F Q A Y G	C N E	
配列番号 1 3 1	M D C	T Y F Q A Y G	C N E	
配列番号 1 3 2	G D C	T Y F Q A Y G	C N E	
配列番号 1 3 3	A E C	T Y F Q A Y G	C N E	
配列番号 1 3 4	V E C	T Y F Q A Y G	C N E	
配列番号 1 3 5	I E C	T Y F Q A Y G	C N E	
配列番号 1 3 6	L E C	T Y F Q A Y G	C N E	50

配列番号 1 3 7	M E C	T Y F Q A Y G	C N E
配列番号 1 3 8	G E C	T Y F Q A Y G	C N E
配列番号 1 3 9	A D C	T Y F Q A Y G	N N E
配列番号 1 4 0	V D C	T Y F Q A Y G	N N E
配列番号 1 4 1	I D C	T Y F Q A Y G	N N E
配列番号 1 4 2	L D C	T Y F Q A Y G	N N E
配列番号 1 4 3	M D C	T Y F Q A Y G	N N E
配列番号 1 4 4	G D C	T Y F Q A Y G	N N E
配列番号 1 4 5	A E C	T Y F Q A Y G	N N E
配列番号 1 4 6	V E C	T Y F Q A Y G	N N E
配列番号 1 4 7	I E C	T Y F Q A Y G	N N E
配列番号 1 4 8	L E C	T Y F Q A Y G	N N E
配列番号 1 4 9	M E C	T Y F Q A Y G	N N E
配列番号 1 5 0	G E C	T Y F Q A Y G	N N E
配列番号 1 5 1	A D N	T Y F Q A Y G	C S D
配列番号 1 5 2	V D N	T Y F Q A Y G	C S D
配列番号 1 5 3	I D N	T Y F Q A Y G	C S D
配列番号 1 5 4	L D N	T Y F Q A Y G	C S D
配列番号 1 5 5	M D N	T Y F Q A Y G	C S D
配列番号 1 5 6	G D N	T Y F Q A Y G	C S D
配列番号 1 5 7	A E N	T Y F Q A Y G	C S D
配列番号 1 5 8	V E N	T Y F Q A Y G	C S D
配列番号 1 5 9	I E N	T Y F Q A Y G	C S D
配列番号 1 6 0	L E N	T Y F Q A Y G	C S D
配列番号 1 6 1	M E N	T Y F Q A Y G	C S D
配列番号 1 6 2	G E N	T Y F Q A Y G	C S D
配列番号 1 6 3	A D N	T Y F Q A Y G	N S D
配列番号 1 6 4	V D N	T Y F Q A Y G	N S D
配列番号 1 6 5	I D N	T Y F Q A Y G	N S D
配列番号 1 6 6	L D N	T Y F Q A Y G	N S D
配列番号 1 6 7	M D N	T Y F Q A Y G	N S D
配列番号 1 6 8	G D N	T Y F Q A Y G	N S D
配列番号 1 6 9	A E N	T Y F Q A Y G	N S D
配列番号 1 7 0	V E N	T Y F Q A Y G	N S D
配列番号 1 7 1	I E N	T Y F Q A Y G	N S D
配列番号 1 7 2	L E N	T Y F Q A Y G	N S D
配列番号 1 7 3	M E N	T Y F Q A Y G	N S D
配列番号 1 7 4	G E N	T Y F Q A Y G	N S D
【 0 0 2 8 】			
配列番号 1 7 5	A D N	T Y F Q A Y G	C S E
配列番号 1 7 6	V D N	T Y F Q A Y G	C S E
配列番号 1 7 7	I D N	T Y F Q A Y G	C S E
配列番号 1 7 8	L D N	T Y F Q A Y G	C S E
配列番号 1 7 9	M D N	T Y F Q A Y G	C S E
配列番号 1 8 0	G D N	T Y F Q A Y G	C S E
配列番号 1 8 1	A E N	T Y F Q A Y G	C S E
配列番号 1 8 2	V E N	T Y F Q A Y G	C S E
配列番号 1 8 3	I E N	T Y F Q A Y G	C S E
配列番号 1 8 4	L E N	T Y F Q A Y G	C S E
配列番号 1 8 5	M E N	T Y F Q A Y G	C S E

10

20

30

40

50

配列番号 1 8 6	G E N	T Y F Q A Y G	C S E
配列番号 1 8 7	A D N	T Y F Q A Y G	N S E
配列番号 1 8 8	V D N	T Y F Q A Y G	N S E
配列番号 1 8 9	I D N	T Y F Q A Y G	N S E
配列番号 1 9 0	L D N	T Y F Q A Y G	N S E
配列番号 1 9 1	M D N	T Y F Q A Y G	N S E
配列番号 1 9 2	G D N	T Y F Q A Y G	N S E
配列番号 1 9 3	A E N	T Y F Q A Y G	N S E
配列番号 1 9 4	V E N	T Y F Q A Y G	N S E
配列番号 1 9 5	I E N	T Y F Q A Y G	N S E
配列番号 1 9 6	L E N	T Y F Q A Y G	N S E
配列番号 1 9 7	M E N	T Y F Q A Y G	N S E
配列番号 1 9 8	G E N	T Y F Q A Y G	N S E
配列番号 1 9 9	A N D	T Y F Q A Y G	C T D
配列番号 2 0 0	V D N	T Y F Q A Y G	C T D
配列番号 2 0 1	I D N	T Y F Q A Y G	C T D
配列番号 2 0 2	L D N	T Y F Q A Y G	C T D
配列番号 2 0 3	M D N	T Y F Q A Y G	C T D
配列番号 2 0 4	G D N	T Y F Q A Y G	C T D
配列番号 2 0 5	A E N	T Y F Q A Y G	C T D
配列番号 2 0 6	V E N	T Y F Q A Y G	C T D
配列番号 2 0 7	I E N	T Y F Q A Y G	C T D
配列番号 2 0 8	L E N	T Y F Q A Y G	C T D
配列番号 2 0 9	M E N	T Y F Q A Y G	C T D
配列番号 2 1 0	G E N	T Y F Q A Y G	C T D
配列番号 2 1 1	A D N	T Y F Q A Y G	N T D
配列番号 2 1 2	V D N	T Y F Q A Y G	N T D
配列番号 2 1 3	I D N	T Y F Q A Y G	N T D
配列番号 2 1 4	L D N	T Y F Q A Y G	N T D
配列番号 2 1 5	M D N	T Y F Q A Y G	N T D
配列番号 2 1 6	G D N	T Y F Q A Y G	N T D
配列番号 2 1 7	A E N	T Y F Q A Y G	N T D
配列番号 2 1 8	V E N	T Y F Q A Y G	N T D
配列番号 2 1 9	I E N	T Y F Q A Y G	N T D
配列番号 2 2 0	L E N	T Y F Q A Y G	N T D
配列番号 2 2 1	M E N	T Y F Q A Y G	N T D
【 0 0 2 9 】			
配列番号 2 2 2	G E N	T Y F Q A Y G	N T D
配列番号 2 2 3	A D N	T Y F Q A Y G	C T E
配列番号 2 2 4	V D N	T Y F Q A Y G	C T E
配列番号 2 2 5	I D N	T Y F Q A Y G	C T E
配列番号 2 2 6	L D N	T Y F Q A Y G	C T E
配列番号 2 2 7	M D N	T Y F Q A Y G	C T E
配列番号 2 2 8	G D N	T Y F Q A Y G	C T E
配列番号 2 2 9	A E N	T Y F Q A Y G	C T E
配列番号 2 3 0	V E N	T Y F Q A Y G	C T E
配列番号 2 3 1	I E N	T Y F Q A Y G	C T E
配列番号 2 3 2	L E N	T Y F Q A Y G	C T E
配列番号 2 3 3	M E N	T Y F Q A Y G	C T E
配列番号 2 3 4	G E N	T Y F Q A Y G	C T E

10

20

30

40

50

配列番号 2 3 5	A D N	T Y F Q A Y G	N T E	
配列番号 2 3 6	V D N	T Y F Q A Y G	N T E	
配列番号 2 3 7	I D N	T Y F Q A Y G	N T E	
配列番号 2 3 8	L D N	T Y F Q A Y G	N T E	
配列番号 2 3 9	M D N	T Y F Q A Y G	N T E	
配列番号 2 4 0	G D N	T Y F Q A Y G	N T E	
配列番号 2 4 1	A E N	T Y F Q A Y G	N T E	
配列番号 2 4 2	V E N	T Y F Q A Y G	N T E	
配列番号 2 4 3	I E N	T Y F Q A Y G	N T E	
配列番号 2 4 4	L E N	T Y F Q A Y G	N T E	10
配列番号 2 4 5	M E N	T Y F Q A Y G	N T E	
配列番号 2 4 6	G E N	T Y F Q A Y G	N T E	
配列番号 2 4 7	A D N	T Y F Q A Y G	C N D	
配列番号 2 4 8	V D N	T Y F Q A Y G	C N D	
配列番号 2 4 9	I D N	T Y F Q A Y G	C N D	
配列番号 2 5 0	L D N	T Y F Q A Y G	C N D	
配列番号 2 5 1	M D N	T Y F Q A Y G	C N D	
配列番号 2 5 2	G D N	T Y F Q A Y G	C N D	
配列番号 2 5 3	A E N	T Y F Q A Y G	C N D	
配列番号 2 5 4	V E N	T Y F Q A Y G	C N D	20
配列番号 2 5 5	I E N	T Y F Q A Y G	C N D	
配列番号 2 5 6	L E N	T Y F Q A Y G	C N D	
配列番号 2 5 7	M E N	T Y F Q A Y G	C N D	
配列番号 2 5 8	G E N	T Y F Q A Y G	C N D	
配列番号 2 5 9	A D N	T Y F Q A Y G	N N D	
配列番号 2 6 0	V D N	T Y F Q A Y G	N N D	
配列番号 2 6 1	I D N	T Y F Q A Y G	N N D	
配列番号 2 6 2	L D N	T Y F Q A Y G	N N D	
配列番号 2 6 3	M D N	T Y F Q A Y G	N N D	
配列番号 2 6 4	G D N	T Y F Q A Y G	N N D	30
配列番号 2 6 5	A E N	T Y F Q A Y G	N N D	
配列番号 2 6 6	V E N	T Y F Q A Y G	N N D	
配列番号 2 6 7	I E N	T Y F Q A Y G	N N D	
配列番号 2 6 8	L E N	T Y F Q A Y G	N N D	
【 0 0 3 0 】				
配列番号 2 6 9	M E N	T Y F Q A Y G	N N D	
配列番号 2 7 0	G E N	T Y F Q A Y G	N N D	
配列番号 2 7 1	A D N	T Y F Q A Y G	C N E	
配列番号 2 7 2	V D N	T Y F Q A Y G	C N E	
配列番号 2 7 3	I D N	T Y F Q A Y G	C N E	40
配列番号 2 7 4	L D N	T Y F Q A Y G	C N E	
配列番号 2 7 5	M D N	T Y F Q A Y G	C N E	
配列番号 2 7 6	G D N	T Y F Q A Y G	C N E	
配列番号 2 7 7	A E N	T Y F Q A Y G	C N E	
配列番号 2 7 8	V E N	T Y F Q A Y G	C N E	
配列番号 2 7 9	I E N	T Y F Q A Y G	C N E	
配列番号 2 8 0	L E N	T Y F Q A Y G	C N E	
配列番号 2 8 1	M E N	T Y F Q A Y G	C N E	
配列番号 2 8 2	G E N	T Y F Q A Y G	C N E	
配列番号 2 8 3	A D N	T Y F Q A Y G	N N E	50

配列番号 284 VDN TYFQAYG NNE
 配列番号 285 IDN TYFQAYG NNE
 配列番号 286 LDN TYFQAYG NNE
 配列番号 287 MDN TYFQAYG NNE
 配列番号 288 GDN TYFQAYG NNE
 配列番号 289 AEN TYFQAYG NNE
 配列番号 290 VEN TYFQAYG NNE
 配列番号 291 IEN TYFQAYG NNE
 配列番号 292 LEN TYFQAYG NNE
 配列番号 293 MEN TYFQAYG NNE
 配列番号 294 GEN TYFQAYG NNE
 配列番号 295 GGGSLLQG
 配列番号 296 5' - TGGCTGAACGGCAAGAGTAC
 配列番号 297 5' - CCTGAAAGTAGGTGCACTCGCCGCCAGGGC
 T C A G G G A C A G
 配列番号 298 5' - CGGGGGATCCTCATTCGGTGCAGCCGTAGG
 CCTGAAAGTAGGTGCACTCG
 配列番号 299 5' - CTGAAAGTAGGTGTTCTCGCCGCCAGGGCT
 C A G G G A C A G
 配列番号 300 5' - CGGGGGATCCTCATTCGGTATTGCCGTAGG
 CCTGAAAGTAGGTGTTCTCG
 配列番号 301 5' - NNNNNN₂NNN₃ACNTAYTTYCARGCNTAYG
 GN NNN4NNN5NNN6
 配列番号 302 LPXTG、X = D、E、A、N、Q、またはKである。
 配列番号 303 GGGYK

【0031】

本発明を、下で詳細に説明するが、これらは変化してもよいので、本発明はここで記載された特定の方法、プロトコルおよび試薬に限定されないことが理解されるべきである。本明細書で使用される用語は、特定の実施形態を記載する目的のためだけのものであり、添付の請求項によってのみ限定される本発明の範囲を限定することは意図されないことも理解されるべきである。特に断りのない限り、ここで使用される全ての技術的および科学的用語は、当業者により共通して理解される同じ意味を有する。

【0032】

以下に、本発明の構成要素を説明する。これらの構成要素は特定の実施形態でリストに挙げるが、それらは追加の実施形態を創るための任意の様式および任意の数で組み合わされてもよいことが理解されるべきである。種々に記載される例および好ましい実施形態は、本発明を、明示的に記載された実施形態にのみ限定すると解釈されるべきでない。この記載は、明示的に記載された実施形態を任意の数の開示されたおよび / または好ましい構成要素と組み合わせた実施形態を支持し、包含すると理解されるべきである。さらに、本出願中の全ての記載された構成要素の任意の入れ替えおよび組合せは、前後関係が他のように指示しない限り、本出願の記載により開示されたとみなされるべきである。

【0033】

以下の本明細書および請求項全体を通して、前後関係で他のように要求されない限り、用語「comprise」、および「comprises」および「comprising」などの変形形態は、述べられているメンバー、整数またはステップの包含を意味するが、如何なる他の述べられていないメンバー、整数またはステップの排除も意味しないと理解される。用語「consist of」は用語「comprise」の特定の実施形態であり、その場合如何なる他の述べられていないメンバー、整数またはステップも排除される。本発明の関係で、用語「comprise」は用語「consist of」を包含する。

10

20

30

40

50

用語「a」および「an」および「the」および本発明を記載する文脈で（特に請求項の文脈中で）使用される同様な言及は、特に断りのない限り、または文脈で明らかに矛盾しない限り、単数および複数の両方を含むと解釈されるべきである。本明細書中の値の範囲の記載は、範囲内に入る別々の各値を個々に言及する省略方法として役立つことが単に意図されているものである。明細書で他のように指示されない限り、個々の各値は、恰もそれが本明細書で個々に記載されたように本明細書に組み込まれる。本明細書中の如何なる言語も、本発明の実行に必須の如何なる特許請求されていない要素を指示すると解釈されるべきではない。

数件の文献が本明細書の本文全体にわたって引用されている。本明細書で引用された文献の各々（全ての特許、特許公開、科学的発表、メーカーの仕様書、使用説明書、その他を含む）は、前出であっても後掲であっても、それらの全体で参照により本明細書に組み込まれる。本明細書中の如何なるものも、先行発明のおかげで、本発明がそのような開示に先んずる権利を与えられないと承認するものと解釈されるべきでない。

【0034】

記載された目的は、本発明により、好ましくは、添付の請求項の主題により解決される。より好ましくは、本発明は、第1の実施形態に従って - グルタミルアミド結合を介してアミノ供与体を含む基質と共有結合で連結した少なくとも1つのアシルグルタミン含有アミノ酸供与体配列を含むタンパク質により解決され、ここで、少なくとも1つのアシルグルタミン含有アミノ酸供与体配列は、少なくとも配列番号1のアミノ酸配列（配列番号1（T Y F Q A Y G））を含む。したがって、本発明は、少なくとも1個、例えば1、2、3、4、5、6、7、または8個、好ましくは1～6個（例えば1、2、3、4、5、6個）、より好ましくは1～4個（例えば1、2、3、4個）のアシルグルタミン含有アミノ酸供与体配列を含むタンパク質を提供し、それにより本発明による少なくとも1個のアシルグルタミン含有アミノ酸供与体配列が - グルタミルアミド結合を介してアミノ供与体を含む基質に共有結合で連結し、少なくとも1個のアシルグルタミン含有アミノ酸供与体配列が少なくとも配列番号1のアミノ酸配列（T Y F Q A Y G）を含む。本発明による「アシルグルタミン含有アミノ酸供与体配列」という用語は、長さが少なくとも7個のアミノ酸、例えば、長さが少なくとも7、8、9、10、11、12、13、14、または15個のアミノ酸であるアミノ酸配列に関し、それは、少なくとも配列番号1のアミノ酸配列を含む。本発明によるアシルグルタミン含有アミノ酸供与体配列は、例えば、配列番号1のアミノ酸配列に加えて天然または非天然のアミノ酸、または天然に生じるアミノ酸誘導体を含んでいてもよい。例えば、本発明のアシルグルタミン含有アミノ酸供与体配列は、1、2、3、4、5、6、7または8個の非天然アミノ酸、または天然に生じるアミノ酸誘導体を含んでいてもよい。

【0035】

例えば、本発明のアシルグルタミン含有アミノ酸供与体配列に含まれてもよい非天然アミノ酸は、アジドノルロイシン、3-(1-ナフチル)アラニン、3-(2-ナフチル)アラニン、p-エチニル-フェニルアラニン、p-プロパルギル-オキシ-フェニルアラニン、m-エチニル-フェニルアラニン、6-エチニル-トリプトファン、5-エチニル-トリプトファン、(R)-2-アミノ-3-(4-エチニル-1H-ピロール-3-イル)プロパン酸、p-ブロモフェニルアラニン、p-ヨードフェニルアラニン、p-アジドフェニルアラニン、3-(6-クロロインドリル)アラニン、3-(6-ブロモインドリル)アラニン、3-(5-ブロモインドリル)アラニン、アジドホモアラニン、およびp-クロロフェニルアラニンを含んでいてもよい。例えば、天然に生じるアミノ酸誘導体は、4-ヒドロキシプロリン、-，-，-トリメチルリシン、3-メチルヒスチジン、5-ヒドロキシリシン、O-ホスホセリン、-カルボキシグルタメート、-，-アセチルリシン、-，-メチルアルギニン、N-アセチルセリン、-，-トリメチルアラニンを含んでもよい。

【0036】

本発明による用語「 - グルタミルアミド結合」は、イソペプチド結合、例えば、それぞ

10

20

30

40

50

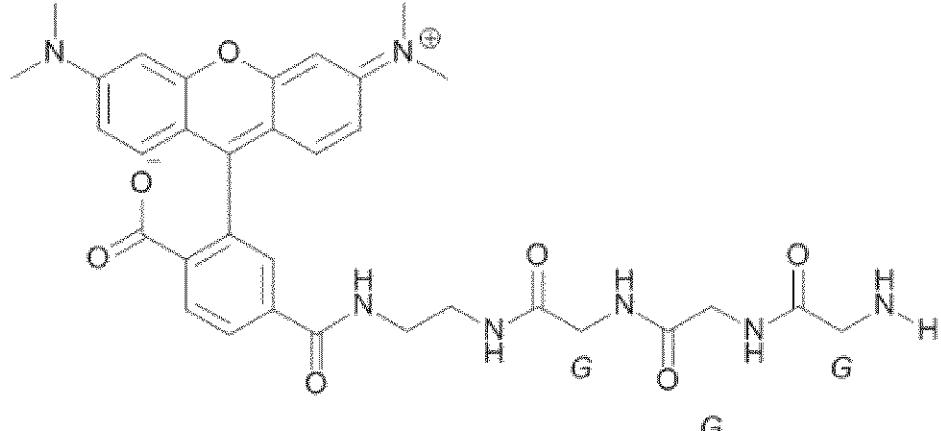
れのポリペプチドまたはタンパク質のペプチド結合骨格の部分を形成しないアミド結合を指し、それは、本発明のアシルグルタミン含有アミノ酸供与体配列のグルタミル残基の - 炭素と本発明によるアミノ供与体を含む基質の第 1 級 (1°) アミンとの間で形成される。

【0037】

1 実施形態により、本発明によるアミノ供与体を含む基質は、第 1 級アミノ末端アミノ基を有する GGG の配列を有する少なくとも 1 アミノ基または少なくとも 1 個のトリペプチドを含む。例えば、本発明によるアミノ供与体を含む基質は、L-リシンなどのリシン、またはリシン誘導体、またはそれらの構造的模倣体、例えばジアミノ酪酸 (DAB)、2,3-ジアミノプロパン酸、(2S)-2,8ジアミノオクタン酸、オルニチン (ornithinem)、チアリシン、1,5-ジアミノペンタン、または N-(ビオチニル)カダベリンなどであってもよい。本発明によるアミノ供与体を含む基質は、例えば、染料 (例えば TAMRA、または Alexa - Fluor (登録商標) 染料)、または例えばビオチンなどの他の分子とカップリングしたリシン誘導体も含んでいてもよい。本発明によるアミノ供与体を含む基質は、例えば GGG トリペプチドであってもよく、それは、例えば、染料または、例えば、TAMRA - エチレンジアミンまたはビオチン、例えば：

【0038】

【化1】



または例えば：

【0039】

10

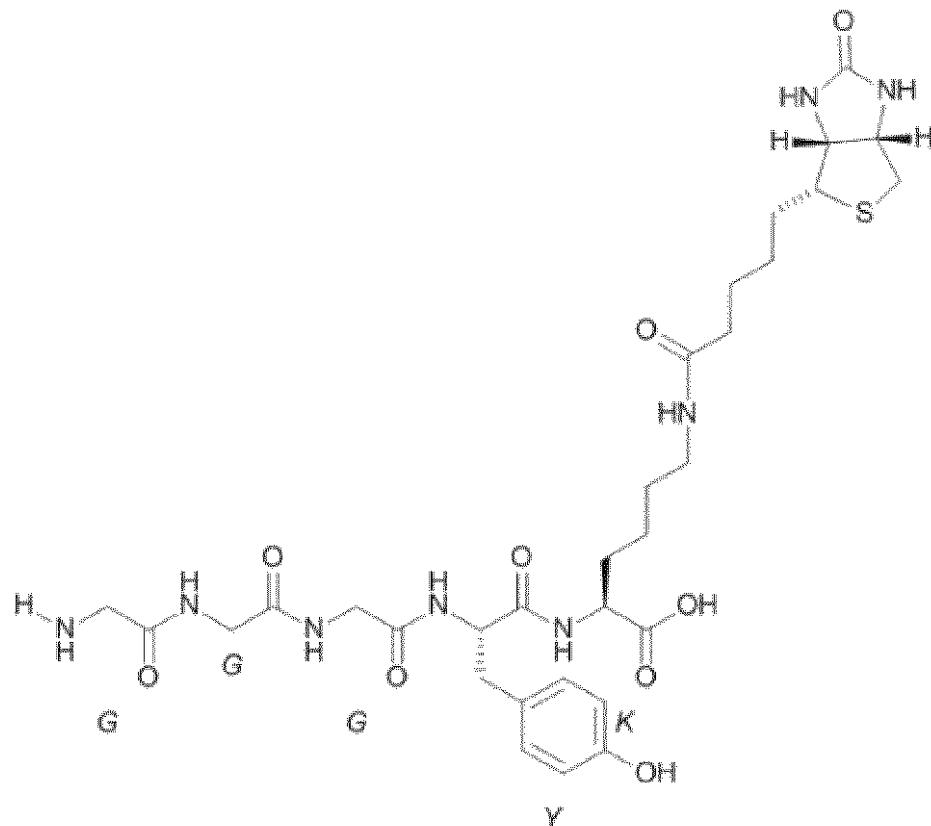
20

30

40

50

【化 2】



10

20

などの分子とさらにカップリングしていくてもよい。

1 実施形態において、本発明によるアミノ供与体を含む基質は、例えば、ポリペプチドを含む少なくとも1個のリシン残基を含んでいてもよい。

【0040】

1 実施形態により、本発明のアミノ供与体を含む基質は、さらなる分子に共有結合している。例えば、上で開示された本発明によるアミノ供与体を含む基質、例えば上で開示されたトリペプチドは、好ましくは、そのカルボキシ末端を介してさらなる分子に共有結合していくてもよい。例えば、さらなる分子は、ペプチド結合、イソペプチド結合、または任意の他の共有結合、例えばジスルフィド結合などを介して共有結合していくてもよい。

30

【0041】

1 実施形態により、上で開示された本発明によるさらなる分子は、染料、放射性同位体、薬物、リボザイム、ナノボディ、酵素、またはリンカーの1つである。例えば、本発明によるアミノ供与体を含む基質に共有結合した染料は、蛍光団であってもよい。したがって、本発明によるアミノ供与体を含む基質は、蛍光団に共有結合していくてもよい。用語「蛍光団」は、本発明で使用される場合、特定の波長の光に曝露されることにより励起すると、異なる波長で発光する化合物を指し、例えば、本発明によるアミノ供与体を含む基質に共有結合していくてもよい蛍光団は、1,8-ANS、4-メチルウンベリフェロン、7-アミノ-4-メチルクマリン、7-ヒドロキシ-4-メチルクマリン、アクリジン、Alexa Fluor 350(商標)、Alexa Fluor 405(商標)、AMCA、AMCA-X、ATTO Rho 6G、ATTO Rho 11、ATTO Rho 12、ATTO Rho 13、ATTO Rho 14、ATTO Rho 101、Pacific Blue、Alexa Fluor 430(商標)、Alexa Fluor 480(商標)、Alexa Fluor 488(商標)、BODIPY 492/515、Alexa Fluor 532(商標)、Alexa Fluor 546(商標)、Alexa Fluor 555(商標)、Alexa Fluor 594(商標)、BODIPY 505/515、Cyanine 2、CyQuant GR、FITC、Fluo-3、Fluo-4、GFP

40

50

(EGFP)、mHoneydew、Oregon Green(商標)488、Oregon Green(商標)514、EYFP、DsRed、DsRed2、dTomat0、Cy3.5、Phycoerythrin(PE)、ローダミンレッド、mTangerine、mStrawberry、mOrange、mBanana、テトラメチルローダミン(TRITC)、R-Phycoerythrin、ROX、DyLight 594、カルシウムクリムソン、Alexa Fluor 594(商標)、Alexa Fluor 610(商標)、テキサスレッド、mCherry、mKate、Alexa Fluor 660(商標)、Alexa Fluor 680(商標)allophycocyanin、DRAQ-5、カルボキシナフトフルオレセイン、C7、DyLight 750、Cellvue NIR 780、DM-NERF、エオシン、エリスロシン、フルオレセイン、FAM、ヒドロキシクマリン、赤外染料(IRD40、IRD700、IRD800)、JOE、Lissamine rhodamine B、Marina Blue、メトキシクマリン、ナフトフルオレセイン、PyMPO、5-カルボキシ-4'，5'-ジクロロ-2'，7'-ジメトキシフルオレセイン、5-カルボキシ-2'，4'，5'，7'-テトラクロロフルオレセイン、5-カルボキシフルオレセイン、5-カルボキシローダミン、6-カルボキシローダミン、6-カルボキシテトラメチルアミノ、カスケードブルー、Cy2、Cy3、Cy5，6-FAM、塩化ダンシル、HEX、6-JOE、NB D(7-ニトロベンゾ-2-オキサ-1，3-ジアゾール)、Oregon Green 488、Oregon Green 500、Oregon Green 514、Pacific Blue、フタル酸、テレフタル酸、イソフタル酸、クレジルファストバイオレット、クレジルブルーバイオレット、ブリリアントクレジルブルー、バラ-アミノ安息香酸、エリスロシン、フタロシアニン、アゾメチン、シアニン、キサンチン、スクシニルフルオレセイン、希土類金属クリプテート、ユウロピウムトリスピリジンジアミン、ユウロピウムクリプテートまたはキレート、ジアミン、ジシアニン、またはラホーヤブルー染料を含むことができる。本発明による蛍光団は、例えば、量子ドットを含むこともできる。本発明で使用される量子ドットという用語は、ナノ結晶の半径がその半導体材料の励起子のボーア半径のサイズ以下である半導体材料の単一の球形のナノ結晶を指す(励起子のボーア半径の値は、the CRC Handbook of Chemistry and Physics, 83rd ed., Lide, David R. (Editor), CRC Press, Boca Raton, Fla. (2002)などの半導体の性質に関する情報を含むハンドブックに見出されるデータから計算することができる)。量子ドットは、参考文献、例えば、Weller, Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 32: 41-53 (1993), Alivisatos, J. Phys. Chem. 100: 13226-13239 (1996)およびAlivisatos, Science 271: 933-937 (1996)などに記載されているので、当技術分野において知られている。

【0042】

量子ドットは、例えば、直径が、約1nm～約1000nm、例えば10nm、20nm、30nm、40nm、50nm、60nm、70nm、80nm、90nm、100nm、150nm、200nm、250nm、300nm、350nm、400nm、450nm、または500nm、好ましくは少なくとも約2nm～約50nmであってもよく、より好ましくは、QDは直径が、少なくとも約2nm～約20nm(例えば約2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または20nm)である。QDは、それらの実質的に均一なナノメートルサイズにより特徴づけられ、しばしば約10%～15%の多分散またはサイズ範囲を示す。QDは、励起されると電磁放射線を放出することができて(即ち、QDは発光性である)、1種または複数の第1の半導体材料の「コア」を含み、第2の半導体材料の「シェル」により取り囲まれ得る。半導体シェルにより取り囲まれたQDコアは「コア/シェル」QDと称される。取り囲む「シェル」材料は、好ましくはコア材料のバンドギャップエネルギーより大きいバンドギャップエネルギーを有し、「コア」基質の原子間隔に近い原子間隔を有するように選択され得る。コアおよび/またはシェルは、II～VI族(ZnS、ZnSe、ZnTe、US、CdSe、CdTe、HgS、HgSe、HgTe、MgS、MgSe、MgTe、CaS、CaSe、CaTe、SrS、SrSe、SrTe、BaS、B

a Se、BaTe等)の材料およびIII~V族(GaN、GaP、GaAs、GaSb、InN、InP、InAs、InSb等)およびIV族(Ge、Si等)の材料、PbS、PbSe、およびそれらの合金または混合物を含むが、これらに限定されない半導体材料であることができる。好ましいシェル材料はZnSを含む。量子ドットは、本発明のリンカー、酵素、またはタンパク質と、当技術分野において知られた任意の方法、例えば、*Nanotechnology*. 2011 Dec 9;22(49):494006; *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 84 (2011) 360-368で開示された方法などによりカップリングしていくてもよい。

【0043】

1 実施形態により、本発明のアミノ供与体を含む基質は、放射性同位体、例えば⁴⁷Ca、¹⁴C、¹³⁷Cs、¹⁵⁷Cr、⁵⁷Co、⁶⁰Co、⁶⁷Cu、⁶⁷Ga、¹²³I、¹²⁵I、¹²⁹I、¹³¹I、³²P、⁷⁵Se、⁸⁵Sr、³⁵S、²⁰¹Tl、³Hなどと共に結合していくてもよく、好ましくは、放射性同位体は、さらなる分子(molecule)、例えばキレート化剤などに組み込まれる。例えば、本発明のアミノ供与体を含む基質に共有結合したさらなる分子として使用され得る典型的なキレート化剤は、DPTA、EDTA(エチレンジアミン-テトラ酢酸)、EGTA(エチレングリコール-O,O'-ビス(2-アミノエチル)-N,N,N',N'-テトラ酢酸、NTA(ニトリロトリ酢酸)、HEDTA(N-(2-ヒドロキシエチル)-エチレンジアミン-N,N',N'-トリ酢酸)、DTPA(2-[ビス[2-[ビス(カルボキシメチル)アミノ]-エチル]アミノ]酢酸)、またはDOTA(1,4,7,10-テトラアザシクロ-ドデカン-1,4,7,10-テトラ酢酸)である。
10
20

【0044】

例えば、1実施形態において、本発明によるアミノ供与体を含む基質は、薬物に共有結合していくてもよい。用語「薬物」は、本発明で使用される場合、細胞、例えばがんまたは腫瘍細胞の生理学的機能を妨げる任意の化合物または分子を指す。本発明によるアミノ供与体を含む基質と連結し得る薬物は、細胞分裂抑制剤、または細胞傷害性活性物質を含むことができる。例えば、本発明によるアミノ供与体を含む基質に対する共有結合カップリングのために使用することができる細胞分裂抑制剤は、アルキル化剤、代謝拮抗物質、抗生物質、有糸分裂阻害剤、ホルモン、またはホルモンアンタゴニストを含む。アルキル化剤は、例えば、ブスフラン(Myleran)、カルボプラチン(Paraplatin)、クロラムブシリ、シスプラチン、シクロホスファミド(Cytosan)、ダカルバジン(DTIC-Dome)、エストラムスチンホスフェート、イホスファミド、メクロレタミン(ナイトロジエンマスター)、メルファラン(フェニルアラニンマスター)、プロカルバジン、チオテバ、ウラシルマスターを含むことができ；代謝拮抗物質は、例えば、クラドリビン、シタラビン(シトシンアラビノシド)、フロキシウリジン(FUDR、5-フルオロデオキシウリジン)、フルダラビン、5-フルオロウラシル(5FU)、ゲミシタビン、ヒドロキシウレア、6-メルカプトプリン(6MP)、メトトレキセート(Amethopterin)、6-チオグアニン、ペントスタチン、ピボプロマン、テガフルール、トリメトレキセート、グルクロネートを含むことができ；抗生物質は、例えば、アクラルビシン(acclarubicin)、ブレオマイシン、ダクチノマイシン(アクチノマイシンD)、ダウノルビシン、ドキソルビシン(アドリアマイシン)、エピルビシン、イダルビシン、マイトイマイシンC、ミトキサントロン、プリカマイシン(Mithramycin)を含むことができ；または有糸分裂阻害剤は、例えば、エトポシド(VP-16、VePesid)、テニポシド(VM-26、Vumon)、ビンプラスチン、ビンクリスチン、ビンデシンを含むことができ；使用することができるホルモン、もしくは、ホルモンアンタゴニストは、例えば、ブセレリン、コンジュゲートウマエストロゲン(プレマリン)、コルチゾン、Chlorotriansene(Tace)、デキサメタゾン(Decadron)、ジエチルスチルベストロール(DES)、エチニルエストラジオール(Estiny1)、フルオキシメステロン(Halotestin)、フルタミド、ゴセレリンアセテート(Zoladex)、ヒドロキシプロゲステロンカプ
30
40
50

ロエート (D e l a l u t i n) 、リュープロリド、メドロキシプロゲステロンアセテート (P r o v e r a) 、メgestrolアセテート (M e g a c e) 、プレドニゾン、タモキシフェン (N o l v a d e x) 、テストラクトン (T e s t a c) 、テストステロンを含む。これらの上で開示されたような細胞分裂抑制または抗新生物化合物は、先行技術で知られており、例えば、D. S. Fischer & T. M. Knobf (1989), The cancer chemotherapy handbook (3rd ed.). Chicago: Year Book Medical and Association of Community Cancer Centers (Spring, 1992), Compendia-based drug bulletin, Rockville、MDに見出すことができる。

例えば、1実施形態において、本発明によるアミノ供与体を含む基質は、L - アスパラギナーゼなどの酵素に共有結合していてもよい。

【0045】

1実施形態により、本発明のアミノ供与体を含む基質は、例えば、リボザイムまたはナノボディに共有結合していてもよい。用語「リボザイム」は、本発明で使用される場合、トランススプライシング活性および自己スプライシング活性を有する酵素的に活性なRNA分子を指す。本発明の目的に対して、リボザイムは、トランススプライシング反応によりがん特異的遺伝子の活性を阻害し、それにより選択的抗がん効果を示すよう機能することができる。がん特異的遺伝子を不活性化することおよびがん治療遺伝子を活性化することができる限り、任意のリボザイムを本発明で使用することができる。

【0046】

1実施形態において、本発明のアミノ供与体を含む基質は、例えば、ナノボディに共有結合していてもよい。本明細書において使用する場合、用語「ナノボディ」は、例えば、ラマ種 (L a m a p a c c o s 、 L a m a g l a m a および L a m a v i c u g n a) などの世界の新しいメンバーを含む、ラクダ科動物およびヒトコブラクダ、例えば C a m e l u s b a c l r i a n u s および C a m e l u s d r o m a d e r i u s から得られるVHH抗体などの、小さい単一の可変領域を含む抗体を指す。これらの種からの抗体は、サイズ、構造的複雑性およびヒト被験者に対する抗原性に関して特徴づけられてきた。見出されたこのファミリーの哺乳動物からのあるIgG抗体は、生来軽鎖を欠き、したがって他の動物からの抗体の2個の重鎖および2個の軽鎖を有する典型的な4鎖の第4級構造から構造的に区別される（例えば、WO 94 / 04678、Hamers-Casterman C, Nature 363: 446-448; Harmsen (2007) Appl Microb Biotechnol 77:13-22を参考されたい）。

【0047】

1実施形態により、本発明のアミノ供与体を含む基質は、例えば、リンカーに共有結合していてもよい。用語「リンカー」または「リンカーベプチド」は、2個の分子、例えば2個のポリペプチドドメインを連結する2個のポリペプチド配列、または例えばタンパク質および細胞分裂抑制薬、または毒素を接続または連結する合成または人工的アミノ酸配列を指す。用語「合成」または「人工的」は、本発明で使用される場合、天然には生じないアミノ酸配列を指す。

【0048】

1実施形態により、本発明のアミノ供与体を含む基質と共有結合したリンカーは、切断可能であるかまたは非切断性である。用語「切断可能」は、本発明で使用される場合、プロテアーゼ、酸により、またはジスルフィド体（例えばグルタチオンに媒介されるまたはグルタチオンに敏感な）の還元により、切断され得るリンカーを指す。例えば、切断可能なリンカーは、バリン - シトルリンリンカー、ヒドラゾンリンカー、またはジスルフィドリンinkerを含むことができる。例えば、本発明のアミノ供与体を含む基質に共有結合していてもよい非切断性リンカーは、M M A F (m c - M M A F) へのマレイミドカブロイルリンカー、N - マレイミドメチルシクロヘキサン - 1 - カルボキシレート (M C C) 、またはメルカブト - アセトアミドカブロイルリンカーを含む。

1実施形態により、本発明によるリンカーは、染料、放射性同位体、または細胞毒とカップリングまたは共有結合している。したがって、本発明のアミノ供与体を含む基質に共有

10

20

30

40

50

結合している本発明によるリンカーは、例えば、染料、放射性同位体、または細胞毒とカップリングまたは共有結合していてもよい。用語「カップリングしている」は、本発明によるリンカーについて使用される場合、染料、放射性同位体または細胞毒(*c y t o x i n*)が、本発明によるリンカー分子に、非共有結合で、例えばイオン性、または疎水性相互作用により結び付けられている事実を指す。例えば、リンカーは、ストレプトアビジンを含むことができ、染料、放射性同位体または細胞毒がビオチン(*b i o t i o n*)に共有結合していてもよい。例えば、放射性同位体の場合に、放射性同位体が、ビオチン(*b i o t i o n*)に共有結合していてもよい、上で開示されたキレート化剤の1種にキレートされていてもよい。あるいは、放射性同位体は、例えば、ビオチン、例えば[8, 9-³H]ビオチン中に組み込まれていてもよい(例えば、Robinson et al., J Biol Chem. 1983 May 25; 258(10): 6660-4を参照されたい)。

好ましくは、リンカーは、例えば「ペイロード」と称されることもある細胞毒に例えば共有結合で結合されていてもよい(例えばPerez et al. Drug Discovery Today Vol 19 (7), July 2014を参照されたい)。

【0049】

リンカー分子に共有結合で接続するために適する細胞毒は、例えば上で開示されたものを含み、2つの主要なクラスにグループ分けすることができる。第1のクラスは、微小管アセンブリーを不適にする細胞毒を含み、第2のクラスの細胞毒はDNA構造を標的とする。したがって、本発明によるリンカーに、例えば共有結合で結合されていてもよい細胞毒は、ドキソルビシン、カリケアマイシン、アウリスタチン、メイタンシン、デュオカルマイシン(*d u o a r m y c i n*)およびそれらのアナログ、-アマニチン(*a m a n i t i n*)、ツブリシンおよびそれらのアナログを含む。細胞毒を共有結合でリンカーに結び付ける方法は、当技術分野において知られており、例えば、Mol. Pharmaceutics 2015, 12, 1813-1835で開示された方法に従って行うことができる。したがって、上で開示された切断可能または非切断性リンカーに結び付けられて、さらに上で開示された細胞毒に結び付けられた本発明のアミノ供与体を含む基質は、例えば、トランスグルタミナーゼに媒介されるバイオコンジュゲーション反応で使用することができる。好ましくは、バイオコンジュゲーション反応は、mTG2により触媒される。バイオコンジュゲーション反応は、mTG2で触媒される反応を可能にする条件下で、mTG2の存在下に、少なくとも配列番号1(TYFQAYG)によるアミノ酸配列を含む上で開示された本発明による少なくとも1個のアシルグルタミン含有アミノ酸供与体配列基質、および上で開示された本発明のアミノ供与体を含む基質を例えば含むことができる。

【0050】

1実施形態により、本発明のアシルグルタミン含有アミノ酸供与体配列は、配列番号2のアミノ酸配列(X₁X₂X₃TYFQAYGX₄X₅X₆)を含み、式中、

X₁は、疎水性アミノ酸であり、

X₂は、負に荷電したアミノ酸であり、

X₃は、CまたはNであり、

X₄は、CまたはNであり、

X₅は、極性、非荷電側鎖を有する1つのアミノ酸であり、X₆、は負に荷電したアミノ酸である。

【0051】

したがって、本発明のアシルグルタミン含有アミノ酸供与体配列において、X₁は、アミノ酸A、I、L、M、F、W、Y、Vの任意の1つを含むことができ、X₂は、アミノ酸D、Eを含むことができ、X₃、X₄は、CまたはNの1つであってもよく、X₅は、S、T、NまたはQの1つであってもよく、X₆は、D、またはEの1つであってもよい。したがって、本発明のアシルグルタミン含有アミノ酸供与体配列は、配列番号1～配列番号294のいずれか1つによるアミノ酸配列を含むことができて、例えば本発明のアシルグルタミン含有アミノ酸供与体配列は、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10、配列番号11、配

10

20

30

40

50

列番号 1 2、配列番号 1 3、配列番号 1 4、配列番号 1 5、配列番号 1 6、配列番号 1 7
、配列番号 1 8、配列番号 1 9、配列番号 2 0、配列番号 2 1、配列番号 2 2、配列番号
2 3、配列番号 2 4、配列番号 2 5、配列番号 2 6、配列番号 2 7、配列番号 2 8、

【 0 0 5 2 】

配列番号 2 9、配列番号 3 0、配列番号 3 1、配列番号 3 2、配列番号 3 3、配列番号 3
4、配列番号 3 5、配列番号 3 6、配列番号 3 7、配列番号 3 8、配列番号 3 9、配列番
号 4 0、配列番号 4 1、配列番号 4 2、配列番号 4 3、配列番号 4 4、配列番号 4 5、配
列番号 4 6、配列番号 4 7、配列番号 4 8、配列番号 4 9、配列番号 5 0、配列番号 5 1
、配列番号 5 2、配列番号 5 3、配列番号 5 4、配列番号 5 5、配列番号 5 6、配列番号
5 7、配列番号 5 8、配列番号 5 9、配列番号 6 0、配列番号 6 1、配列番号 6 2、配列
番号 6 3、配列番号 6 4、配列番号 6 5、配列番号 6 6、配列番号 6 7、配列番号 6 8、
配列番号 6 9、配列番号 7 0、配列番号 7 1、配列番号 7 2、配列番号 7 3、配列番号 7
4、配列番号 7 5、配列番号 7 6、配列番号 7 7、配列番号 7 8、配列番号 7 9、配列番
号 8 0、配列番号 8 1、配列番号 8 2、配列番号 8 3、配列番号 8 4、配列番号 8 5、配
列番号 8 6、配列番号 8 7、配列番号 8 8、配列番号 8 9、配列番号 9 0、配列番号 9 1
、配列番号 9 2、配列番号 9 3、配列番号 9 4、配列番号 9 5、配列番号 9 6、配列番号
9 7、配列番号 9 8、配列番号 9 9、配列番号 1 0 0、配列番号 1 0 1、配列番号 1 0 2
、配列番号 1 0 3、配列番号 1 0 4、配列番号 1 0 5、配列番号 1 0 6、配列番号 1 0 7
、配列番号 1 0 8、配列番号 1 0 9、配列番号 1 1 0、配列番号 1 1 1、配列番号 1 1 2
、配列番号 1 1 3、配列番号 1 1 4、配列番号 1 1 5、配列番号 1 1 6、配列番号 1 1 7
、配列番号 1 1 8、配列番号 1 1 9、配列番号 1 2 0、配列番号 1 2 1、配列番号 1 2 2
、配列番号 1 2 3、配列番号 1 2 4、配列番号 1 2 5、配列番号 1 2 6、配列番号 1 2 7
、配列番号 1 2 8、配列番号 1 2 9、配列番号 1 3 0、配列番号 1 3 1、配列番号 1 3 2
、配列番号 1 3 3、配列番号 1 3 4、配列番号 1 3 5、配列番号 1 3 6、配列番号 1 3 7
、配列番号 1 3 8、配列番号 1 3 9、配列番号 1 4 0、配列番号 1 4 1、配列番号 1 4 2
、配列番号 1 4 3、配列番号 1 4 4、配列番号 1 4 5、配列番号 1 4 6、配列番号 1 4 7
、配列番号 1 4 8、配列番号 1 4 9、配列番号 1 5 0、配列番号 1 5 1、配列番号 1 5 2
、配列番号 1 5 3、配列番号 1 5 4、配列番号 1 5 5、配列番号 1 5 6、配列番号 1 5 7
、配列番号 1 5 8、配列番号 1 5 9、配列番号 1 6 0、配列番号 1 6 1、配列番号 1 6 2
、配列番号 1 6 3、配列番号 1 6 4、配列番号 1 6 5、配列番号 1 6 6、配列番号 1 6 7
、配列番号 1 6 8、配列番号 1 6 9、配列番号 1 7 0、配列番号 1 7 1、配列番号 1 7 2
、配列番号 1 7 3、配列番号 1 7 4、配列番号 1 7 5、配列番号 1 7 6、配列番号 1 7 7
、配列番号 1 7 8、配列番号 1 7 9、配列番号 1 8 0、配列番号 1 8 1、配列番号 1 8 2
、配列番号 1 8 3、配列番号 1 8 4、配列番号 1 8 5、配列番号 1 8 6、配列番号 1 8 7
、配列番号 1 8 8、配列番号 1 8 9、配列番号 1 9 0、配列番号 1 9 1、配列番号 1 9 2
、配列番号 1 9 3、配列番号 1 9 4、配列番号 1 9 5、配列番号 1 9 6、配列番号 1 9 7
、配列番号 1 9 8、配列番号 1 9 9、配列番号 2 0 0、配列番号 2 0 1、配列番号 2 0 2
、配列番号 2 0 3、配列番号 2 0 4、配列番号 2 0 5、配列番号 2 0 6、配列番号 2 0 7
、配列番号 2 0 8、配列番号 2 0 9、配列番号 2 1 0、配列番号 2 1 1、配列番号 2 1 2
、配列番号 2 1 3、配列番号 2 1 4、配列番号 2 1 5、配列番号 2 1 6、配列番号 2 1 7
、配列番号 2 1 8、配列番号 2 1 9、配列番号 2 2 0、配列番号 2 2 1、配列番号 2 2 2
、配列番号 2 2 3、配列番号 2 2 4、配列番号 2 2 5、

【 0 0 5 3 】

配列番号 2 2 6、配列番号 2 2 7、配列番号 2 2 8、配列番号 2 2 9、配列番号 2 3 0、
配列番号 2 3 1、配列番号 2 3 2、配列番号 2 3 3、配列番号 2 3 4、配列番号 2 3 5、
配列番号 2 3 6、配列番号 2 3 7、配列番号 2 3 8、配列番号 2 3 9、配列番号 2 4 0、
配列番号 2 4 1、配列番号 2 4 2、配列番号 2 4 3、配列番号 2 4 4、配列番号 2 4 5、
配列番号 2 4 6、配列番号 2 4 7、配列番号 2 4 8、配列番号 2 4 9、配列番号 2 5 0、
配列番号 2 5 1、配列番号 2 5 2、配列番号 2 5 3、配列番号 2 5 4、配列番号 2 5 5、
配列番号 2 5 6、配列番号 2 5 7、配列番号 2 5 8、配列番号 2 5 9、配列番号 2 6 0、

10

20

30

40

50

配列番号 2 6 1、配列番号 2 6 2、配列番号 2 6 3、配列番号 2 6 4、配列番号 2 6 5、配列番号 2 6 6、配列番号 2 6 7、配列番号 2 6 8、配列番号 2 6 9、配列番号 2 7 0、配列番号 2 7 1、配列番号 2 7 2、配列番号 2 7 3、配列番号 2 7 4、配列番号 2 7 5、配列番号 2 7 6、配列番号 2 7 7、配列番号 2 7 8、配列番号 2 7 9、配列番号 2 8 0、配列番号 2 8 1、配列番号 2 8 2、配列番号 2 8 3、配列番号 2 8 4、配列番号 2 8 5、配列番号 2 8 6、配列番号 2 8 7、配列番号 2 8 8、配列番号 2 8 9、配列番号 2 9 0、配列番号 2 9 1、配列番号 2 9 2、配列番号 2 9 3、配列番号 2 9 4 のいずれか 1 つを含むことができる。

【 0 0 5 4 】

1 実施形態により、本発明のアシルグルタミン含有アミノ酸供与体配列において、 X_1 は、アミノ酸 A、V、I、L、M または G のいずれか 1 つを含むことができ、 X_2 は、アミノ酸 D、E を含むことができ、 X_3 は、C であってもよく、 X_4 は、C または N であってもよく、 X_5 は、S、T、または N のいずれか 1 つであってもよく、 X_6 は、D または E の 1 つであってもよい。したがって、本発明のアシルグルタミン含有アミノ酸供与体配列は、配列番号 7、配列番号 8、配列番号 9、配列番号 10、配列番号 11、配列番号 19、配列番号 20、配列番号 2 1、配列番号 2 2、配列番号 2 3、配列番号 6 7、配列番号 6 8、配列番号 6 9、配列番号 7 0、配列番号 7 1、配列番号 1 1 5、配列番号 1 1 6、配列番号 1 1 7、配列番号 1 1 8、配列番号 1 1 9、配列番号 1 3 9、配列番号 1 4 0、配列番号 1 4 1、配列番号 1 4 2、配列番号 1 4 3、配列番号 5 5、配列番号 5 6、配列番号 5 7、配列番号 5 8、配列番号 5 9、配列番号 1 0 3、配列番号 1 0 4、配列番号 1 0 5、配列番号 1 0 6、配列番号 1 0 7、配列番号 1 2 7、配列番号 1 2 8、配列番号 1 2 9、配列番号 1 3 0、配列番号 1 3 1、配列番号 1 3、配列番号 1 4、配列番号 1 5、配列番号 1 6、配列番号 1 7、配列番号 1 8、配列番号 8 5、配列番号 8 6、配列番号 8 7、配列番号 8 8、配列番号 8 9、配列番号 9 0、配列番号 1 0 9、配列番号 1 1 0、配列番号 1 1 1、配列番号 1 1 2、配列番号 1 1 3、配列番号 1 1 4、配列番号 1 3 3、配列番号 1 3 4、配列番号 1 3 5、配列番号 1 3 6、配列番号 1 3 7、配列番号 1 3 8、配列番号 2 5、配列番号 2 6、配列番号 2 7、配列番号 2 8、配列番号 2 9、配列番号 3 0、配列番号 7 3、配列番号 7 4、配列番号 7 5、配列番号 7 6、配列番号 7 7、配列番号 7 8、配列番号 1 2 1、配列番号 1 2 2、配列番号 1 2 3、配列番号 1 2 4、配列番号 1 2 5、配列番号 1 2 6、配列番号 1 4 5、配列番号 1 4 6、配列番号 1 4 7、配列番号 1 4 8、配列番号 1 4 9、配列番号 1 5 0 のいずれか 1 つによるアミノ酸配列を含むことができる。

【 0 0 5 5 】

好ましい実施形態によれば、本発明のアシルグルタミン含有アミノ酸供与体配列は、 X_3 および X_4 が両方とも C である配列番号 4 ($X_1 X_2 C T Y F Q A Y G C X_5 X_6$) によるアミノ酸配列を含み、その結果、ジスルフィド結合が 2 個のシステイン残基 X_3 および X_4 の間で形成され得て、それがループ様構造を形成し、アミノ残基 T Y F Q A G がループ様構造を形成する。本発明のアシルグルタミン含有アミノ酸供与体配列において、 X_1 は、アミノ酸 A、V、I、L、M または G のいずれか 1 つであってもよく、 X_2 は、D または E であってもよく、 X_3 および X_4 は、両方とも C であり、 X_5 は、S、T または N の 1 つであってもよく、 X_6 は、アミノ酸 D または E の 1 つであってもよい。したがって、本発明のアシルグルタミン含有アミノ酸供与体配列は、配列番号 7、配列番号 8、配列番号 9、配列番号 10、配列番号 11、配列番号 5 5、配列番号 5 6、配列番号 5 7、配列番号 5 8、配列番号 5 9、配列番号 1 0 3、配列番号 1 0 4、配列番号 1 0 5、配列番号 1 0 6、配列番号 1 0 7、配列番号 3 1、配列番号 3 2、配列番号 3 3、配列番号 3 4、配列番号 3 5、配列番号 3 6、配列番号 7 9、配列番号 8 0、配列番号 8 1、配列番号 8 2、配列番号 8 3、配列番号 8 4、配列番号 1 2 7、配列番号 1 2 8、配列番号 1 2 9、配列番号 1 3 0、配列番号 1 3 1、配列番号 1 3、配列番号 1 4、配列番号 1 5、配列番号 1 6、配列番号 1 7、配列番号 1 8、配列番号 6 1、配列番号 6 2、配列番号 6 3、配列番号 6 4、配列番号 6 5、配列番号 6 6、配列番号 1 0 9、配列番号 1 1 0、配列番号 1 1 1

10

20

30

40

50

、配列番号 112、配列番号 113、配列番号 114、配列番号 37、配列番号 38、配列番号 39、配列番号 40、配列番号 41、配列番号 42、配列番号 85、配列番号 86、配列番号 87、配列番号 88、配列番号 89、配列番号 90、配列番号 133、配列番号 134、配列番号 135、配列番号 136、配列番号 137、配列番号 138 のいずれか 1 つによるアミノ酸配列を含むことができる。

【0056】

本発明のペプチドは、当技術分野で任意の知られた方法により、例えば、Atherton, E.; Sheppard, R.C. (1989). *Solid Phase peptide synthesis: a practical approach.* Oxford, England: IRL Press. ISBN 0-19-963067-4、または Stewart, J.M.; Young, J.D. (1984). *Solid phase peptide synthesis (2nd ed.).* ISBN 0-935940-03-0)で開示された方法に従って合成することができる。ペプチドは、例えば、Amphiphores 40 RAM樹脂 (Agilent、0.27 mmol/g) 上で Liberty Blue (商標) マイクロ波ペプチド合成機を 0.1 mmol スケールで使用してマイクロ波で補助される Fmoc - SPPS によって合成することもできる。それぞれのカルボキシ官能性アミノ酸の活性化は、例えば Oxyma / N, N' - デイソプロピルカルボジイミド (DIC) により実施することができる。アミノ末端の Fmoc 基の脱保護は、例えば、Oxyma の存在下で DMF 中 20% ピペリジンを使用して行うことができる。合成サイクル中に、全てのアミノ酸は、例えば、90 に (システインを 50 に) 加熱されてもよい。その場合、ペプチドは、例えば、94% TFA、2% トリエチルシラン、2% アニソール、2% H₂O の標準的切断カクテルにより樹脂から切断され得る。例えば、配列番号 4 のアシルグルタミン含有アミノ酸供与体ペプチドが合成されたときに、例えば、約 1 mM から約 50 mM、または約 10 mM から約 40 mM の濃度ジチオトレイトール (DTT) の存在下などの非酸化的合成および切断条件下で。残基 X₃ と X₄ の間のジスルフイド架橋形成は、酸化条件下で、例えば pH 8.4 の 100 mM (NH₄)₂CO₃ 水溶液中 1 mg ml⁻¹ で達成することができて、その場合、酸化反応は RP - HPLC によりモニターすることができる。

【0057】

より好ましい実施形態では、本発明のアシルグルタミン含有アミノ酸供与体配列において、X₁ は、アミノ酸 A、V、I、L、M または G のいずれか 1 つであってもよく、X₂ は、E であり、X₃、X₄ は、両方とも C であり、X₅ は、T であり、X₆ は、E である。したがって、本発明のアシルグルタミン含有アミノ酸供与体配列は、配列番号 85、配列番号 86、配列番号 87、配列番号 88、配列番号 89、または配列番号 90 のいずれか 1 つを含むことができる。

より好ましい実施形態によれば、本発明のアシルグルタミン含有アミノ酸供与体配列において、配列は配列番号 90 (GECTYFQAYGCTE) によるアミノ酸配列を含む。

【0058】

上で開示された本発明によるアシルグルタミン含有アミノ酸供与体配列は、対象のタンパク質、例えば酵素または抗体などに、例えば共有結合で結合されていてもよい。例えば、本発明のアシルグルタミン含有アミノ酸供与体配列をコードするポリヌクレオチドは、抗体の軽鎖または重鎖をコードする cDNA 構造にポリメラーゼ鎖反応 (PCR) により付加することができる。例えば、SOE - PCR は、PCR Methods Appl. 1993 May; 2(4): 301-4、または例えば、Critical Reviews in Oral Biology and Medicine, 4 (3/4): 581-590 (1993) で開示された原理に従って使用することができる。

1 実施形態において、上で開示された本発明によるアシルグルタミン含有アミノ酸供与体配列を含むタンパク質は、抗体、抗原結合抗体フラグメント、Fc ドメイン、酵素、非免疫グロブリンスキャフォールドであってもよい。したがって、本発明のアシルグルタミン含有アミノ酸供与体配列は、抗体、抗原結合フラグメント、Fc ドメイン、酵素、非免疫グロブリンスキャフォールドに共有結合で結合していてもよい。

【0059】

例えば、本発明のアシルグルタミン含有アミノ酸供与体配列を含む本発明によるタンパク

10

20

30

40

50

質は、抗体であってもよく、ここで、用語「抗体」は、標的、例えば炭水化物、ポリヌクレオチド、脂質、ポリペプチド、その他などに、免疫グロブリン分子の可変領域に位置する少なくとも1つの抗原認識部位を通して特異的に結合することができる免疫グロブリン分子を指す。本発明で使用される場合、用語「抗体」は、完全なポリクローナルまたはモノクローナル抗体だけでなく、特に断りのない限り、完全抗体と特異的結合を競合するそれらの任意の抗原結合フラグメント、抗原結合部分を含む融合タンパク質、抗原認識部位を含む免疫グロブリン分子の任意の他の改変された形態、多エピトープ特異性を有する抗体組成物、多重特異性抗体（例えば、二重特異性抗体）も包含する。

【0060】

用語「モノクローナル抗体」は、本発明によるタンパク質について使用される場合、単一の結合特異性を示す抗体を指し、抗体の実質的に均一な集団から得られる抗体の特性を示すものであり、何らかの特定の方法による抗体の製造を必要とするものとして解釈されるべきでない。例えば、本発明に従って使用されるモノクローナル抗体は、最初にKohler et al., *Nature*, 256:495 (1975)により記載されたハイブリドーマ（例えばマウスのまたはヒトの）の方法により作製されてもよく、または組み替えDNAの方法（例えば、米国特許第4,816,567号を参照されたい）により作製されてもよい。「モノクローナル抗体」は、Clackson et al., *Nature*, 352: 624-628 (1991) およびMarks et al., *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991)に記載された技法を使用してファージ抗体ライブラリーから単離することもできる。

用語「ヒトモノクローナル抗体」は、本発明によるタンパク質について使用される場合、ヒトの生殖細胞系列の免疫グロブリン配列から誘導された可変領域および定常領域を有するモノクローナル抗体を指す。用語「ヒト化」は、本発明に関して使用される場合、好ましくは、抗体のその標的抗原に結合する能力を担当するその相補性決定領域（CDR）セグメントの一部が非ヒト起源であるが、アミノ酸配列がヒトバリエントのものと本質的に同一であるモノクローナル抗体を指す。用語「キメラモノクローナル抗体」は、本発明で使用される場合、マウスのFabフラグメントがヒトFcに接合されたモノクローナル抗体を指す。

【0061】

1 実施形態において、上で開示された本発明によるタンパク質は、抗原結合フラグメントである。用語「抗原結合フラグメント」は、本発明のタンパク質について使用される場合、例えば、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fd、Fv、ドメイン抗体を指し、「ナノボディ」（dAbs、またはVHH、例えば、サメおよびラクダ科の動物の抗体、例えば、mAbs (2015) 7:1, 15-25; *Current Opinion in Structural Biology* 2015, 32: 1-8を参照されたい）とも称され、フラグメントは、相補性決定領域（CDR）、単鎖可変フラグメント抗体（scFv）、マキシボディ、低分子化抗体、細胞内発現抗体、二重特異性抗体、三重特異性抗体、四重特異性抗体、V-NARおよびビス-scFv、およびポリペプチドに特異的抗原結合を与えるのに十分な、免疫グロブリンの少なくとも一部分を含有するポリペプチドを含む。本発明により使用される「二重特異性抗体」とは、2個の異なる標的分子に結合し得る抗体であり、本発明による「二価抗体」は、1個の標的分子の2個の異なる部位に結合することができる抗体である。用語「scFv」は、本発明で使用される場合、リンカーにより接続された抗体重鎖可変ドメイン（または領域； VH）および抗体軽鎖可変ドメイン（または領域； VL）を含み、定常ドメインを欠く分子を指す。例えば、本発明のタンパク質は、例えば、ナノボディのカルボキシ末端に融合した本発明によるアシリルグルタミン含有アミノ酸供与体配列を含むナノボディであってよい。したがって、本発明によるナノボディは、例えば、mTg2に媒介されるバイオコンジュゲーションで使用することもできて、それにより、アミノ供与体を含む基質は、例えば、上で開示されたリンカー-細胞毒とさらにカップリングしてもよく、または例えば、上で開示された放射性同位体もしくは染料とさらにカップリングしてもよい。本発明のナノボディは、例えば、がんの治療、または撮像の目的に使用することができる。例えば、EGFR、またはHER2に特異的に結合する⁶⁸Gaとカップリングした本発明のナノボ

10

20

30

40

50

ディは、EGFRまたはHER2を発現している腫瘍を検出または撮像するためのPet撮像のために使用することができる。用語「特異的結合」またはそれらの任意の語法の変動は、本発明の抗体、抗原結合フラグメント（例えばFab、Fab'、F(ab')2、Fd、Fv）、モノクローナル抗体、单鎖抗体（scFv）またはナノボディの、そのそれぞれの標的（例えばEGFR、またはHER2）に、少なくとも約 1×10^{-6} 、例えば 1×10^{-6} 、 $1 \times 10^{-7} M$ 、 $1 \times 10^{-8} M$ 、 $1 \times 10^{-9} M$ 、 $1 \times 10^{-10} M$ 、 $1 \times 10^{-11} M$ 、 $1 \times 10^{-12} M$ 、 $1 \times 10^{-13} M$ 、 $1 \times 10^{-14} M$ 、 $1 \times 10^{-15} M$ 、好ましくは $1 \times 10^{-10} M$ と $1 \times 10^{-15} M$ の間、より好ましくは約 $1 \times 10^{-12} M$ ～約 $1 \times 10^{-15} M$ の間のKDで結合する能力を指す。

【0062】

用語「免疫グロブリン」（Ig）は、本発明で使用される場合、用語「抗体」と互換的に使用することができる。基本的な4鎖抗体ユニットは、2個の同一の軽（L）鎖および2個の同一の重（H）鎖で構成されるヘテロテトラマー糖タンパク質である。IgM抗体は、J鎖と呼ばれる追加のポリペプチドと一緒にになった5個の基本的ヘテロテトラマーユニットからなり、10個の抗原結合部位を含有するが、一方、IgA抗体は、J鎖との組合せで重合して多価集合体を形成することができる2～5個の基本的4鎖ユニットを含む。IgGの場合に、4鎖ユニットは一般的に約150,000ダルトンである。各L鎖は、H鎖に1個の共有結合のジスルフィド結合により連結しているが、それに対して、2個のH鎖は、H鎖のイソタイプに依存して1個または複数のジスルフィド結合により相互に連結されている。各HおよびL鎖は、規則的な間隔の鎖内ジスルフィド架橋も有する。各H鎖は、N末端に、可変ドメイン（VH）、それに続くおよび鎖の各々に対する3個の定常ドメイン（CH）およびμおよびイソタイプに対する4個のCHドメインを有する。各L鎖は、N末端に、可変ドメイン（VL）、続いてその他端に定常ドメインを有する。VLはVHと位置を揃え、CLは重鎖（CH1）の第1の定常ドメインと位置を揃える。特定のアミノ酸残基が、軽鎖と重鎖の可変ドメインの間の界面を形成していると考えられる。VHおよびVLの対が一緒にになって单一の抗原結合部位を形成する。種々のクラスの抗体の構造および性質については、例えば、Basic and Clinical Immunology, 8th Edition, Daniel P. Sties, Abba I. Terr and Tristram G. Parsow (eds), Appleton & Lange, Norwalk, CT, 1994, page 71 and Chapter 6を参照されたい。任意の脊椎動物種からのL鎖は、それらの定常ドメインのアミノ酸配列に基づいて、カッパおよびラムダと呼ばれる2個の明確に識別されるタイプの1つと帰属させることができる。それらの重鎖（CH）の定常ドメインのアミノ酸配列に依存して、免疫グロブリンは、異なったクラスまたはイソタイプに帰属させることができる。5クラスの免疫グロブリン：IgA、IgD、IgE、IgGおよびIgMがあり、それれ、μと命名される重鎖を有する。およびクラスは、CH配列および機能における比較的小さい差を基準にしてサブクラスにさらに分けられて、例えば、ヒトは、以下のサブクラス：IgG1、IgG2A、IgG2B、IgG3、IgG4、IgA1およびIg1を発現している。IgGは、それが正常では血漿中に見出される第2の最も豊富なタンパク質として存在するので、主要なクラスを構成する。免疫グロブリン融合タンパク質では、IgG1サブクラスのFcドメインが、しばしば免疫グロブリン部分として使用され、その理由はIgG1は任意の血清タンパク質のなかで最長の血清半減期を有するからである。Fc部分は、例えば、WO02/094852で開示されたものなどのFcバリエントも含んで（例えばそこで開示された変形Fc-488、Fc4、Fc5、Fc6、Fc7、およびFc8を有するFcアミノ酸配列）、Fc部分のエフェクター（effector）機能を低下させることがある。

【0063】

例えば、本発明によるタンパク質は、本発明によるアシルグルタミン含有アミノ酸供与体配列およびFcドメインを含む融合タンパク質であってもよく、その血清中の半減期を延長させることができ、その際、本発明によるアシルグルタミン含有アミノ酸供与体配列は、Fc部分のカルボキシ末端で融合している。末端のリシン（K）残基は、例えばFc部

10

20

30

40

50

分で、例えば Ig G タイプの抗体で、または F c 融合タンパク質で、 P C R に基づく部位指向突然変異生成により除去されて分子間架橋を回避することができる。 P C R に基づく部位指向突然変異生成は、例えば、 Nucleic Acids Res. 1989 Aug 25;17(16):6545-51, Biotechniques. 1993 Oct; 15(4):700-4, Nucl. Acids Res., 32: e115, 2004 で開示された方法に従って行うことができる。例えば、部位指向突然変異生成のために使用され得るプライマー対は、例えば、 <http://Bioinformatics.org/primerx> で利用可能な web ベースで自動化されたツールにより選択することもできる。あるいは、末端リシン残基を欠く本発明によるタンパク質をコードする対応する c D N A は、カスタム遺伝子合成により得ることができる（例えば、 Nature 432, 1050-1054 (23 December 2004); Nucleic Acids Res. 2007 Apr; 35(8): e61.; ACS Synth. Biol. 3, 97-106 (2014); Nat. Methods 6, 343-345 (2009); Nucleic Acids Res. 40, e55 (2012); Proc. Natl. Acad. Sci. USA 105, 20404-20409 (2008) を参照されたい）。 10

【 0 0 6 4 】

1 実施形態において、本発明によるタンパク質は、本発明のアシルグルタミン含有アミノ酸供与体配列を含む非免疫グロブリンスキャフォールドである。用語、非免疫グロブリンスキャフォールドは、本発明によるタンパク質について使用される場合、 Ig 分子に基づかない親和性タンパク質を指す。非免疫グロブリンスキャフォールドタンパク質は、例えば、 Nature Biotechnology 23 , 1257-1268 , 2005 , Trends Biotechnol. 2015 Jul;33(7):408-18 で開示されたものを含む。例えば、本発明によるタンパク質は、アルブミン結合ドメイン、フィトシスタチンタンパク質 (p h y t o c y s t a t o n) (Ad h i r o n) 、アドネクチン、黄色ブドウ球菌のタンパク質 A の Z - ドメイン、 - - クリストラリン (アフィリン) 、 s t e f i n A 、 D N A 結合タンパク質 S a c 7 a 、 a l p h a b o d y m l i p o c a l i n s (アンチカリン) 、または - カテニンの同族体（例えばアルマジロのタンパク質）であってもよい。例えば、本明細書で開示された本発明によるタンパク質は、本発明のアシルグルタミン含有アミノ酸供与体配列を含むことができ、それにより、本発明のアシルグルタミン含有アミノ酸供与体配列は、本発明によるタンパク質のアミノ末端またはカルボキシ末端に存在することができる。本発明のアシルグルタミン含有アミノ酸供与体配列を、上で開示された本発明のタンパク質のアミノ - またはカルボキシ末端に位置させることにおける決定要因は、それが該タンパク質の意図される使用を妨げるか否かである。例えば、本発明によるタンパク質が、抗体は、例えばモノクローナル抗体である場合、本発明のアシルグルタミン含有アミノ酸供与体配列とカルボキシ末端で融合したタンパク質が好ましく、それにより、配列番号 2 のアシルグルタミン含有アミノ酸供与体配列は、軽鎖または重鎖、または重鎖および軽鎖の両方と融合することができ、それにより 2 個（例えば両軽鎖（ L C ）で、または両重鎖（ H C ）で）または 4 個の本発明によるアシルグルタミン含有アミノ酸供与体配列を含むモノクローナル抗体を提供する。 20 30

【 0 0 6 5 】

1 実施形態において、本発明は、上で開示された本発明によるアミノ供与体を含む基質を、配列番号 2 のポリペプチド配列を含む本発明のアシルグルタミン含有アミノ酸供与体に共有結合でカップリングする方法を提供し、該方法は、

本発明によるアミノ供与体を含む基質と本発明によるアシルグルタミン含有アミノ酸供与体とを、トランスグルタミナーゼ、好ましくは m T G 2 の存在下で接触させて、上で開示された本発明のタンパク質を得るステップを含む。したがって、本発明の方法では、上で開示された本発明によるアミノ供与体を含む基質と本発明によるアシルグルタミン含有アミノ酸供与体、例えば、本明細書で開示された配列番号 7 ~ 2 9 4 のいずれかとを、 m T G 2 の存在下で接触させて上で開示された本発明のタンパク質を得る。用語「接触させる」は、本発明の方法で使用される場合、 2 個以上の分子、例えば、本発明によるアミノ供与体を含む基質およびアシルグルタミン含有アミノ酸供与体などが、互いに密接して物理的接触にもたらされ、例えば同じ反応混合物または水溶液の一部を形成する任意の状況を指す。例えば、本発明の方法による m T G 2 に媒介される反応は、本発明によるアシルグ 40 50

ルタミン含有アミノ酸供与体を、1～60モル当量の、または1～50モル当量の本発明によるアミノ供与体を含む基質と、例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49モル当量で、または例えば、約2モルから約45モル、約5モルから約40モル、約10モルから約35モル、約12.5モルから約30モル、約15モルから約32.5モル、約7.5モルから約27.5モル、約17.5モルから約25モル、約0.5モルから約1モルのモル当量で反応させることを含むことができる。本発明によるアシルグルタミン含有アミノ酸供与体の濃度は、約0.1mg/mlから約100mg/ml、例えば約0.5mg/mlから約75mg/ml、約1mg/mlから約50mg/ml、約2.5mg/mlから約45mg/ml、約5mg/mlから約40mg/ml、約10mg/mlから約35mg/ml、約12.5mg/mlから約30mg/ml、約15mg/mlから約25mg/ml、約17.5から約20mg/ml、例えば、0.15mg/ml、0.2mg/ml、0.25mg/ml、0.3mg/ml、0.35mg/ml、0.4mg/ml、0.45mg/ml、0.5mg/ml、0.55mg/ml、0.6mg/ml、0.7mg/ml、0.8mg/ml、0.9mg/ml、2mg/ml、3mg/ml、4mg/ml、6mg/ml、7mg/ml、8mg/ml、9mg/ml、11mg/ml、12mg/ml、13mg/ml、14mg/ml、16mg/ml、19mg/ml、23mg/ml、27mg/ml、31mg/ml、33mg/ml、37.5mg/ml、41mg/ml、42mg/ml、43mg/ml、44mg/ml、46mg/ml、47mg/ml、48mg/ml、49mg/mlであってよい。

【0066】

本発明の方法において、mTG2は、例えば、基質に対して、例えばアシルグルタミン含有アミノ酸供与体配列を含むタンパク質に対して、約0.01モル当量から約2モル当量の量で、約0.05モル当量から約1.5モル当量、約0.1モル当量から約1.125モル当量、約0.125モル当量から約1.75モル当量、約0.25モル当量、0.3モル当量、0.4モル当量、0.5モル当量、0.6モル当量、0.7モル当量、0.8モル当量から約1モル当量、または約1モル当量から約2.5モル当量で存在してもよく、好ましくはmTG2は本発明の方法で約1モル当量の量で使用される。本発明の方法で、反応は、例えば、25～37で約1～5時間、または約2～4時間、または約2.5時間から約3.5時間、または約1時間、2時間、3時間、4時間進行させてよい。本発明の方法は、例えば、任意の適当な緩衝液、例えばHEPES(4-2-ヒドロキシエチル-1-ピペラジンエタンスルホン酸)、MOPS(3-(N-モルホリノ)プロパンスルホン酸)、またはPIPES(ピペラジン-N,N'-ビス(2-エタンスルホン酸))などの中に約pH7.0のpHで実施することができる。

【0067】

1実施形態により、本発明の方法で使用することができる本発明によるアシルグルタミン含有アミノ酸供与体は、上で開示されたものであってもよく、例えば本発明のアシルグルタミン含有アミノ酸供与体は、上で開示された抗体、抗原結合抗体フラグメント、酵素、または非免疫グロブリンスキャフォールドであってよい。

【0068】

微生物のトランスクルタミナーゼ、例えば本発明の実施形態に従って使用され得るmTG2などは、Biochem. J. (1994) 299: 825-829で開示された方法により、ストレプトベルチシリウム・モバラエンスまたは任意のその亜株、例えば40847などから得ることができる。例えば、ストレプトベルチシリウム・モバラエンスは、例えば、Ando et al. (1989) Agric. Biol. Chem. 53, 2613-2617に記載されたように培養することができる。2Lのエルレンマイヤフラスコで、0.1mlの胞子懸濁液を、ポリペプトン、2.0%；酵母抽出物、0.2%；K₂HPO₄、0.2%；MgSO₄7H₂O、0.1%；ジ

10

20

30

30

40

50

ヤガイモデンプン、2.0%；グルコース、0.5%；pH 7.0を含有する500mlの培地中で成長させることができる。培養は30で継続することができ、培養には通気して90回転/分で9~11日間、最大酵素活性に達するまで振盪する。次に、培養液を、菌糸体から遠心分離により10000gで10分間分離することができ、続いてひだ折り濾紙で濾過する。上清は、直接クロマトグラフィーで利用するかまたは-20で後の使用のために貯蔵することもできる。スケールアップされた製造のために、1.0mlの細胞懸濁液を、2.0%の代わりに2.5%ジャガイモデンプン、0.5%の代わりに1.0%グルコースを含有する3.5Lの培地に移すことができる。培養は、第1日の間、通気(2リットル/分)および攪拌して、140~180回転/分で、その後300~350回転/分で成長させることができる。最大の酵素活性は通常7日後に達成される。ストレプトベルチシリウム・モバラエンスは、例えばATCC(登録商標)(ATCC 29032)、または例えばDSM Braunschweig、ドイツから得ることができる。

【0069】

1 実施形態において、本発明の方法で使用される本発明のアミノ供与体を含む基質は、上で開示された染料、薬物、リボザイム、ナノボディ、酵素、またはリンカーとカップリングまたは共有結合する。例えば、アシルグルタミン含有アミノ酸供与体は、そのカルボキシ末端に配列番号2の、または例えば本明細書で開示された配列番号7~294のいずれ1つかによる本発明のアシルグルタミン含有アミノ酸配列を含む、上で定義された抗体または抗原結合フラグメントであってもよい。例えば、アミノ供与体を含む基質は、上で定義された通りでもよく、例えば、少なくとも1個のリシン残基を含むペプチド、または上で開示されたトリペプチドGGGであってもよく、それらは、例えば上で開示されたリンカー、染料、薬物、リボザイム、ナノボディ、または酵素とカップリングしていくてもよい。

【0070】

1 実施形態により、本発明の方法で使用されるリンカーは、例えば、上で定義された細胞傷害性薬物(ペイロード)、染料、または放射性同位体とさらに連結されていてもよい。本発明の方法では、アシルグルタミン含有アミノ酸供与体およびアミノ供与体を含む基質は、上で開示された量で存在する微生物のトランスクルタミナーゼ2と、例えば、反応混合物中に約1:40モル当量の比で(抗体:アミノ供与体を含む基質)、または上で開示された任意のモル当量で、例えば上で開示された本発明のアシルグルタミン含有アミノ酸供与体配列を含む抗体に対して1:1モル当量で存在してもよい。本発明の方法により、反応は、例えば、約1~5時間、25~37で、例えば1時間、2時間、2.5時間、3時間、3.5時間、4時間または5時間、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、または37で進行するに任せてもよい。

【0071】

1 実施形態において、本発明は、上で開示された本発明の方法により得ることができる本発明によるタンパク質を提供する。したがって、本発明により得ることができるタンパク質は、本明細書で開示された任意のタンパク質、例えば、配列番号2のアミノ酸配列を含む本明細書で開示された抗体、抗原結合フラグメント、酵素、または非免疫グロブリンスキャリフォールドであってもよい。例えば、本発明の方法により得ることができるタンパク質は、本明細書で開示された配列番号2の少なくとも1個のアシルグルタミン含有アミノ酸供与体配列、好ましくは、本発明のアシルグルタミン含有アミノ酸供与体(例えば、X₁X₂X₃TYFQAYGX₄X₅X₆)の間で形成されたイソペプチド結合を介して共有結合で結合された2個、より好ましくは4個の上で開示されたアシルグルタミン含有アミノ酸供与体配列を含む抗体薬物コンジュゲートを含むことができて、その場合、イソペプチド結合は中央のグルタミン残基(下線を引いた)とアミノ供与体を含む基質のアミノ基との間で形成される。

【0072】

1 実施形態において、本発明は、上で開示された本発明の方法における配列番号2のポリ

10

20

30

30

40

50

ペプチド配列の使用に関する。したがって、本発明は、本発明の方法における本明細書で開示された1個または2個以上の、例えば1、2、3、4、5個、またはそれを超える本発明のポリペプチド配列の使用に関する。例えば、本発明は、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10、配列番号11、配列番号12、配列番号13、配列番号14、配列番号15、配列番号16、配列番号17、配列番号18、配列番号19、配列番号20、配列番号21、配列番号22、配列番号23、配列番号24、配列番号25、配列番号26、配列番号27、配列番号28、配列番号29、配列番号30、配列番号31、配列番号32、配列番号33、配列番号34、配列番号35、配列番号36、配列番号37、配列番号38、配列番号39、配列番号40、配列番号41、配列番号42、配列番号43、配列番号44、配列番号45、配列番号46、配列番号47、配列番号48、配列番号49、配列番号50、配列番号51、配列番号52、配列番号53、配列番号54、配列番号55、配列番号56、配列番号57、配列番号58、配列番号59、配列番号60、配列番号61、配列番号62、配列番号63、配列番号64、配列番号65、配列番号66、配列番号67、配列番号68、配列番号69、配列番号70、配列番号71、配列番号72、配列番号73、配列番号74、配列番号75、配列番号76、配列番号77、配列番号78、配列番号79、配列番号80、配列番号81、配列番号82、配列番号83、配列番号84、配列番号85、配列番号86、配列番号87、配列番号88、配列番号89、配列番号90、配列番号91、配列番号92、配列番号93、配列番号94、配列番号95、配列番号96、配列番号97、配列番号98、配列番号99、配列番号100、配列番号101、配列番号102、配列番号103、配列番号104、配列番号105、配列番号106、配列番号107、配列番号108、配列番号109、配列番号110、配列番号111、配列番号112、配列番号113、配列番号114、配列番号115、配列番号116、配列番号117、配列番号118、配列番号119、配列番号120、配列番号121、配列番号122、配列番号123、配列番号124、配列番号125、配列番号126、配列番号127、配列番号128、配列番号129、配列番号130、配列番号131、配列番号132、配列番号133、配列番号134、配列番号135、配列番号136、配列番号137、配列番号138、配列番号139、配列番号140、配列番号141、配列番号142、配列番号143、配列番号144、配列番号145、配列番号146、配列番号147、配列番号148、配列番号149、配列番号150、配列番号151、配列番号152、配列番号153、配列番号154、配列番号155、配列番号156、配列番号157、配列番号158、配列番号159、配列番号160、配列番号161、配列番号162、配列番号163、配列番号164、配列番号165、配列番号166、配列番号167、配列番号168、配列番号169、配列番号170、配列番号171、配列番号172、配列番号173、配列番号174、配列番号175、配列番号176、配列番号177、配列番号178、配列番号179、配列番号180、配列番号181、配列番号182、配列番号183、配列番号184、配列番号185、配列番号186、配列番号187、配列番号188、配列番号189、配列番号190、配列番号191、配列番号192、配列番号193、配列番号194、配列番号195、配列番号196、配列番号197、配列番号198、配列番号199、配列番号200、配列番号201、配列番号202、配列番号203、配列番号204、配列番号205、配列番号206、配列番号207、配列番号208、配列番号209、配列番号210、配列番号211、配列番号212、配列番号213、配列番号214、配列番号215、配列番号216、配列番号217、配列番号218、配列番号219、配列番号220、配列番号221、配列番号222、配列番号223、配列番号224、配列番号225、配列番号226、配列番号227、配列番号228、配列番号229、配列番号230、配列番号231、配列番号232、配列番号233、配列番号234、配列番号235、配列番号236、配列番号237、配列番号238、配列番号239、配列番号240、配列番号241、配列番号242、配列番号243、配列番号244、配列番号245、配列番号246、配列番号247、配列番号248、配列番号249、配列番号250。
10
20
30
40
50

配列番号251、配列番号252、配列番号253、配列番号254、配列番号255、
配列番号256、配列番号257、配列番号258、配列番号259、配列番号260、
配列番号261、配列番号262、配列番号263、配列番号264、配列番号265、
配列番号266、配列番号267、配列番号268、配列番号269、配列番号270、
配列番号271、配列番号272、配列番号273、配列番号274、配列番号275、
配列番号276、配列番号277、配列番号278、配列番号279、配列番号280、
配列番号281、配列番号282、配列番号283、配列番号284、配列番号285、
配列番号286、配列番号287、配列番号288、配列番号289、配列番号290、
配列番号291、配列番号292、配列番号293、または配列番号294の本発明の方
法における使用に関する。

【 0 0 7 3 】

例えば、配列番号 2 のポリペプチドは、上で開示された抗体の H C または L C とカルボキシ末端で融合されていてもよい。例えば、X₃、X₄が両方とも上で開示された C である配列が好ましく、したがって、ポリペプチド配列、配列番号 7、配列番号 8、配列番号 9、配列番号 10、配列番号 11、配列番号 55、配列番号 56、配列番号 57、配列番号 58、配列番号 59、配列番号 103、配列番号 104、配列番号 105、配列番号 106、配列番号 107、配列番号 31、配列番号 32、配列番号 33、配列番号 34、配列番号 35、配列番号 36、配列番号 79、配列番号 80、配列番号 81、配列番号 82、配列番号 83、配列番号 84、配列番号 127、配列番号 128、配列番号 129、配列番号 130、配列番号 131、配列番号 13、配列番号 14、配列番号 15、配列番号 16、配列番号 17、配列番号 18、配列番号 61、配列番号 62、配列番号 63、配列番号 64、配列番号 65、配列番号 66、配列番号 109、配列番号 110、配列番号 111、配列番号 112、配列番号 113、配列番号 114、配列番号 37、配列番号 38、配列番号 39、配列番号 40、配列番号 41、配列番号 42、配列番号 85、配列番号 86、配列番号 87、配列番号 88、配列番号 89、配列番号 90、配列番号 133、配列番号 134、配列番号 135、配列番号 136、配列番号 137、または配列番号 138 の使用、配列番号 85、配列番号 86、配列番号 87、配列番号 88、配列番号 89、または配列番号 90 のいずれかの使用がより好ましい。

〔 0 0 7 4 〕

1 実施形態において、本発明は、本発明の配列番号2のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドも提供する。したがって、本発明は、以下の構造の配列番号2の本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを提供する：

5' - N N N N N N N 2 N N N 3 A C N T A Y T T Y C A R G C N T A Y G G N N N N 4 N N
N 5 N N N 6 - 3' (配列番号301)、

式中、Nは任意のヌクレオチド(A、C、T、G)、Yは、ピリミジン塩基(CまたはT)を表し、Rはプリン塩基(AまたはG)を表す。塩基の命名法は、生化学国際連合命名委員会(Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry(NC-IUB))によった、例えばJ. Biol. Chem., 1986, 261, 13-17を参照されたい。NNN₁～NNN₆はコドン1～6を示し、ここで、コドンNNN₁は配列番号2のアミノ酸X₁をコードし、NNN₂は配列番号2のアミノ酸X₂、NNN₃は配列番号2のアミノ酸X₃、NNN₄は配列番号2のアミノ酸X₄、NNN₅は配列番号2のアミノ酸X₅、およびNNN₆は配列番号2のアミノ酸X₆を示す。例えば、ポリヌクレオチドの意図される使用に依存して、コドンの使用法は、特定の宿主に対して、例えばポリヌクレオチドが、上で開示された本発明のペプチドまたは本発明のタンパク質を、哺乳動物、原核生物または真核生物の宿主で発現させるために使用された場合、最適化されるべきであり、それぞれの宿主により異なったコドン用法が考慮されるべきである。例えば、本発明のポリヌクレオチドが、治療薬を製造するために、齧歯目またはヒトの細胞系統、例えばCHOまたはHEK293細胞などで発現させるために使用される場合に、対応するコドン用法は、例えばタンパク質の製造を増大させるように使用されるべきである(Trends in Molecular Medicine, November

2014, Vol. 20, No. 11)。しかしながら、本発明によるコドン NNN₁ ~ NNN₆ は、停止コドン、例えば TAG (琥珀色)、TAA (黄土色)、または TGA (オパール色) をコードすることができない。

【0075】

したがって、NNN₁ は、コドン GCT、GCC、GCA、GCG、GTT、GTC、GTA、GTG、ATT、ATC、ATA、CTT、CTC、CTA、CTG、TTA、TTG、ATG、GGT、GGC、GGA、GGG のいずれか 1 つであることができ、NNN₂ は、コドン GAT、GAC、GAA、GAG のいずれか 1 つであることができ、NNN₃、NNN₄ は、コドン TGT、TGC、AAT、AAC のいずれか 1 つであることができ、NNN₅ は、コドン TCT、TCC、TCA、TCG、AGT、AGC、ACT、AC₁₀C、ACA、ACG、AAT、AAC、CAA、CAG のいずれか 1 つであることができ、NNN₆ は、コドン GAT、GAC、GAA、GAG のいずれか 1 つであることができる。

【0076】

1 実施形態において、本発明は、上で開示された本発明のポリヌクレオチドを含むベクターも提供する。本発明によるベクターは、例えば発現ベクターであってもよい。用語「発現ベクター」は、本発明によるベクターについて使用される場合、少なくとも 1 種のオリペプチド、例えば少なくとも配列番号 2 ~ 配列番号 294 のいずれかの本発明のオリペプチド配列をコードするヌクレオチド配列と作動的に連結されたプロモーターまたはプロモーター成分などの遺伝子発現制御領域を含む核酸ベクターを指す。例えば、pCMVベース発現ベクター、または pD912ベースベクターおよびそれらのバリエント、Gate way (登録商標) 発現ベクター、pcDNAベース発現ベクター、または pJ ベクター (例えば、Nucleic Acids Research, Vol. 18, No. 4 を参照されたい)、またはレトロウイルスまたはレンチウイルスの製造のために使用され得るベクター (例えば、Front Biosci. 1999 Jun 1;4: D481-96 を参照されたい) を含んでいてもよい発現ベクター。例えば抗体の軽鎖または重鎖をコードする対応する cDNA が、MCS 中にクローニングされる場合、本発明によるベクターにおいて、ポリヌクレオチドは、例えば、インフレームの融合タンパク質を発生させることを可能にする 5' または 3' からの複数のクローニング部位 (MCS) を含んでいてもよい。MCS の位置に依存して、本発明のポリヌクレオチドは、アミノ末端またはカルボキシ末端融合タンパク質として発現されるであろう。₂₀₃₀

【0077】

1 実施形態において、本発明は、上で開示された、例えば、配列番号 2 の、もしくは例えば配列番号 7 ~ 294 のいずれかによる本発明のポリヌクレオチド配列を含む、または上で開示された本発明によるベクターを含む宿主細胞も提供する。例えば、本発明のポリヌクレオチドまたは上で開示された本発明によるベクターを含む本発明による宿主細胞は、本発明によるベクターを含有することができる任意のタイプの細胞を指す。該宿主細胞は、真核生物の細胞、例えば、植物、動物、カビ、または藻 (例えばフェオダクチラム・トリコルヌツム (Phaeodactylum tricornutum)、コナミドリムシ (Chlamydomonas reinhardtii) であってもよく、または原核生物の細胞、例えば、細菌または原生動物であってもよい。宿主細胞は、培養された細胞または初生細胞、即ち、生物体、例えば、ヒトから直接単離された細胞であってもよい。宿主細胞は、接着性細胞または懸濁された細胞、即ち、懸濁液中で成長する細胞であってもよい。本発明による宿主細胞は、例えば、HEK293、HEK293T、HEK293E、HEK293F、NS0、per.C6、MCF-7、HeLa、Cos-1、Cos-7、PC-12、3T3、Vero、vero-76、PC3、U87、SAO S-2、LNCAP、DU145、A431、A549、B35、H1299、HUVEC、Jurkat、MDA-MB-231、MDA-MB-468、MDA-MB-435、Caco-2、CHO、CHO-K1、CHO-B11、CHO-DG44、BHK、AGE1.HN、Namalwa、WI-38、MRC-5、HepG2、L-929、RAB-9、SIRC、RK13、11B11、1D3、2.4G2、A-10、B-₄₀₅₀

35、C-6、F4/80、IEC-18、L2、MH1C1、NRK、NRK-49F、NRK-52E、RMC、CV-1、BT、MDBK、CPAE、MDCK.1、MDCK.2、D-17、または例えば、出芽酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、ハンセンラ・ポリモルファ(*Hansenula polymorpha*)、分裂酵母(*Schizosaccharomyces pombe*)、シュワニオミセス・オクシデンタリス(*Schwanniomyces occidentalis*)、クルイベロミセス・ラクチス(*Kluyveromyces lactis*)、ヤロウイア・リポリティカ(*Yarrowia lipolytica*)およびメタノール資化性酵母(*Pichia pastoris*)、または例えばSf9、Sf21、S2、Hi5、またはBTI-TN-5B1-4細胞、または例えばDH5 大腸菌(*E. coli*)を含むことができる。10

【0078】

1実施形態において本発明は、抗体またはそれらの抗原結合フラグメント、二価抗体、または配列番号2の少なくとも1つのアミノ酸配列を含むVHH抗体も提供する。抗体、それらの抗原結合フラグメント、二価抗体、または本発明によるVHH抗体は、上で開示された通りである。例えば、本発明による抗体は、配列番号2の少なくとも1つのアミノ酸配列(例えば本発明によるアシルグルタミン含有アミノ酸供与体)を、例えば軽鎖または重鎖に対するカルボキシ末端融合体として含むことができる。本発明による抗体は、好ましくは、配列番号2の2または4個の本発明のアミノ酸配列を含み、例えば本発明の抗体は、それらのカルボキシ末端に配列番号2の本発明のアミノ酸配列を含む2本の軽鎖、または2本の重鎖を含むことができる。好ましくは、重鎖および軽鎖は両方ともカルボキシ末端融合体として配列番号2の本発明のアミノ酸配列を含む。本発明の抗体は、例えば、上で開示されたPCRに基づく部位指向突然変異生成により改変されて、Fcドメインにおける末端リシン残基が除去されることもある。20

【0079】

1実施形態により、上で開示された本発明による抗体は、上で開示されたヒトのまたはヒト化されたモノクローナル抗体、好ましくは、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、またはIgMタイプの抗体である。本発明の抗体は、上で開示された本発明の方法によりそれに共有結合でカップリングした少なくとも1つのリンカーを含む。例えば、本発明の抗体は、1、2、3、または4つのリンカー(例えば、上で開示された切断可能または非切斷性の)を含むことができて、それらは本明細書で開示された本発明の方法により抗体と共有結合でカップリングしている。1実施形態により、本発明のリンカーは、上で開示された染料、放射性同位体、または細胞毒とさらにカップリングする。30

【0080】

1実施形態において、上で開示された本発明の抗体は、がん細胞の表面抗原に特異的に結合する。本発明によるがん細胞の表面抗原は、EGFR(上皮成長因子受容体)、HER2、HER4、AFP、3インテグリン、MUC16、CD4、CD20、CD222、CD30、CD33、CD52、CD56、CD66e、CD140b、CD227、EpCam、GD3、PSMA、またはVEGFを含むが、これらに限定されない。本発明によるがん細胞の表面抗原は、がん幹細胞、例えばCD123、CLL-1、SLAMの組合せなど(シグナル伝達リノバ球活性化分子ファミリー受容体; Yilmaz et al., "SLAM family markers are conserved among hematopoietic stem cells from old and reconstituted mice and markedly increase their purity," *Hematopoiesis* 107: 924-930 (2006)を参照されたい)、例えば、CD150、CD244、およびCD48、および米国特許第6,004,528号で開示されたこれらのマーカーなども含む。40

【0081】

好ましい実施形態において、本発明による抗体は、セツキシマブ(c225)、または例えばEGFRに結合するそのバイオシミラーである。用語「バイオシミラー」は、本発明のセツキシマブについて使用される場合、バイオシミラー製品を(臨床的に不活性な成分における微量の差はあるが)参考製品と「高度に類似した」製品として定義しているUS50

F D A により公表された実用的定義と一致するように使用される。実際、安全性、純度、および効能に関して、参照製品とバイオシミラー製品の間に臨床的に意味のある相違はないものとし得る（アメリカ合衆国公衆衛生局（P H S）条例 § 2 6 2）。

【 0 0 8 2 】

例えば、本発明によるセツキシマブ（または例えばそのバイオシミラー）は、少なくとも 1 つ、好ましくは少なくとも 2 つ、より好ましくは 4 つの本発明によるアシルグルタミン含有アミノ酸供与体配列を含む。例えば、本発明によるセツキシマブは上で定義された、さらに上記の細胞毒とカップリングした 2 個、または好ましくは 4 個のリンカーを含む。

【 0 0 8 3 】

1 実施形態により、本発明によるセツキシマブ（または例えばそのバイオシミラー）は、がんの治療に使用することができる。用語「がん」は、本発明で使用される場合、制御されないかもしくは調節されない細胞増殖、低下した細胞分化、周囲組織に侵入する不適切な能力、および／または正規の場所外の部位で新しい成長を確立する能力により特徴づけられる細胞の障害を指す。用語「がん」は、原発性および転移性がんをさらに包含する。本発明の抗体セツキシマブは、例えば、乳がん、前立腺がん、卵巣がん、子宮頸がん、皮膚がん、肺がん、好ましくは結直腸がん、転移性（m C R C）、切除不能の肝転移、頭頸部の扁平上皮細胞癌、非小細胞肺がん（N S C L C）、頭頸部の扁平上皮細胞癌（H N S C C）の 1 つを治療するために使用することができる。セツキシマブ（c 2 2 5、またはそのバイオシミラー）は、例えば、そのような治療から特に恩恵を受ける患者、例えば上皮成長因子受容体（E G F R）を発現するR A S 野生型転移性結直腸がんを有する患者で使用することができる。本発明によるセツキシマブ（またはそのバイオシミラー）は、イリノテカンを主とする化学療法との組合せで、または例えばF O L F O X と組み合せた第 1 選択の治療で、または例えば、オキサリプラチニンを主とするおよびイリノテカンを主とする療法が不成功であった患者およびイリノテカンに不耐性の患者で、単一の活性物質として使用することもできる。

【 0 0 8 4 】

1 実施形態において、本発明は、上で開示された本発明の抗体を含み、少なくとも 1 種のさらなる薬学的活性成分を含む組成物を提供する。例えば、本発明による組成物は、水性または凍結乾燥された形態にあるセツキシマブ（または例えばそのバイオシミラー）および少なくとも 1 種のさらなら化学療法剤を含むことができて、ここで該活性物質は、カペシタビン、5 - フルオロ - 2' - デオキシリジン（d e o x y u i r i d i n e）、イリノテカン、6 - メルカブトプリン（6 - M P）、クラドリビン、クロファラビン、シタラビン、フロキシウリジン、フルダラビン、ゲムシタビン、ヒドロキシウレア、メトトレキサート、ブレオマイシン、パクリタキセル、クロラムプシル、ミトキサントロン、カンプトテシン、トポテカン、テニポシド、コルセミド、コルヒチン、ペメトレキセド、ペントスタチン、チオグアニン；リューコボリン、シスプラチニン、カルボプラチニン、オキサリプラチニン、または 5 - F U とリューコボリンの組合せ、5 - フルオロウラシルとフォリン酸の組合せ（5 - F U / F A）、5 - フルオロウラシル／フォリン酸（5 - F U / F A）とオキサリプラチニン（F L O X）の組合せ、5 - F U、リューコボリン、オキサリプラチニン（F O L F O X）の組合せ、または 5 - F U、リューコボリン、およびイリノテカン（F O L F I R I）の組合せ、またはリューコボリン、5 - F U、オキサリプラチニン、およびイリノテカン（F O L F O X I R I）の組合せ、またはカペシタビンとオキサリプラチニンの組合せ（C a p e O x）を含む群から選択される。

【 0 0 8 5 】

1 実施形態により、本発明は、上で開示された本発明の抗体、または本発明による組成物および少なくとも 1 種のさらなる成分を含む医薬組成物を提供する。したがって、本発明は、本発明の抗体を含み、賦形剤および／または安定剤および／または界面活性剤および／または防腐剤を含んでいてもよい医薬組成物を提供する。本明細書において使用する用語「賦形剤」は、例えば、希釈剤などの活性成分でない医薬製品の成分を意味する。本発明の医薬組成物を調製することに有用な賦形剤は、一般的に安全で無毒性である。本発明

10

20

30

40

50

の医薬組成物で使用することができる界面活性剤には、例えば、アルキル硫酸ナトリウムの混合物などのアニオン性界面活性剤、例えば第四級アンモニウムおよびピリジニウムカチオン性界面活性剤などのカチオン性界面活性剤、または非イオン性界面活性剤、例えばソルビタンエステル、ポリソルベート、例えばポリソルバト20（ポリオキシエチレン-（20）-ソルビタンモノラウラート）、ポリソルバト21（ポリオキシエチレン-（4）-ソルビタンモノラウラート）、ポリソルバト40（ポリオキシエチレン-（20）-ソルビタンモノパルミタート）、ポリソルバト60（ポリオキシエチレン-（20）-ソルビタン-モノステアラート）、ポリソルバト61（ポリオキシエチレン-（4）-ソルビタンモノステアラート）、ポリソルバト65（ポリオキシエチレン-（20）-ソルビタントリステアラート）、ポリソルバト80（ポリオキシエチレン-（20）-ソルビタンモノオレアート）、ポリソルバト81（ポリオキシエチレン-（5）-ソルビタンモノオレアート）ポリソルバト85（ポリオキシエチレン-（20）-ソルビタントリオレアート）、ポリソルバト120（ポリオキシエチレン-（20）-ソルビタンモノイソステアラート）、またはポロキサマー、例えばポロキサマー105、ポロキサマー108、ポロキサマー122、ポロキサマー124、ポロキサマー105安息香酸塩などが含まれる。本発明による医薬（pharmaceutical）組成物に含まれ得る防腐剤は、0.004%～0.01%の濃度の塩化ベンズアルコニウムであってもよい。

【0086】

1 実施形態において、本発明は、治療を必要とするがんに罹患した対象を治療する方法であって、前記対象（例えば、好ましくはヒトである患者）に治療有効量の本明細書で開示された医薬組成物を投与することを含む、方法を提供する。したがって、本発明は、例えば上で開示された、治療を必要とするがんに罹患した対象を、治療有効量の本発明のc225（セツキシマブ）抗体で治療する方法を提供する。例えば、本発明によるセツキシマブは、約125mg/m²から約500mg/m²身体表面、好ましくは約250mg/m²から約400mg/m²身体表面の濃度で投与することができて、その場合、セツキシマブの投薬は、例えば、Duboisの方法に従って計算することができて、対象の体表面積(m²)は対象の体重を使用して計算される：m² = (質量kg^{0.425} × 高さcm^{0.725}) × 0.007184。

【実施例】

【0087】

以下の例は、本発明をさらに例示することが意図されている。それらは、本発明の主題の事物または範囲をそれらに限定することを意図されない。

（例1）

ペプチドの固相合成および精製

ペプチドは、Amphiphospholipid 40 RAM樹脂（Agilent、0.27mmol/g）上で、マイクロ波に補助されるFmoc-PPSにより、Liberty Blue TMマイクロ波ペプチド合成機を0.1mmolスケールで使用して合成された。それぞれのカルボキシ官能性アミノ酸の活性化は、Oxytama/-, -ジイソプロピルカルボジイミド(DIC)により実施した。アミノ末端Fmoc基の脱保護は、DMF中20%のピペリジンをOxytamaの存在で使用して達成した。合成サイクル中、全てのアミノ酸を90℃に（システインは50℃に）加熱した。ペプチドを、樹脂から、94%TFA、2%トリエチルシラン、2%アニソール、2%H₂Oの標準的切断カクテルにより切断した。システインを含有するペプチドは、ジチオトレイトール(DTT)の存在下で切断してシステインの望ましくない酸化を抑制した。2時間切断した後、ペプチドを冷ジエチルエーテル中で沈殿させて、ジエチルエーテルで2回洗浄した。ジスルフィドで架橋された粗ペプチドを100mM(NH₄)₂CO₃水溶液(pH 8.4)中において1mgml⁻¹で酸化して、酸化はRP-HPLCによりモニターした。その後、ペプチドを分取RP-HPLCによって単離した。

【0088】

RP-HPLC

10

20

30

40

50

ペプチドをVarian製の分析RP-HPLC(920-LC)でPhenomenex Hypersil 5 μ BDS C18LCカラム($150 \times 4.6\text{ mm}$ 、 $5\text{ }\mu\text{m}$ 、130)を使用して、クロマトグラフィーにより分析した。ペプチドをPhenomenex Luna 5 μ C18LCカラム($250 \times 12.2\text{ mm}$ 、 $5\text{ }\mu\text{m}$ 、100)を使用して、半分取RP-HPLC(Varian)により単離した。溶離剤A(水)および溶離剤B(90%aq. MeCN)は、各々0.1%トリフルオロ酢酸(TFA)を含有した。

【0089】

ESI-MS分析

ESI質量スペクトルは、Phenomenex Jupiter 5 μ C4LCカラム($50 \times 1\text{ mm}$ 、 $5\text{ }\mu\text{m}$ 、300A)を備えたShimadzu LCMS-2020で、0.1%ギ酸水溶液(溶離剤A)および0.1%ギ酸を含有するアセトニトリル(溶離剤B)の溶離剤系を使用することにより収集した。

【0090】

(例2)

ペプチドビオチン化アッセイ

ペプチドをDMSO中に $50\text{ mg}/\text{mL}$ で溶解して、酵素によるコンジュゲーションのためにpH 7.0の100mM HEPESで $1.25\text{ mg}/\text{mL}$ に希釈した。モノビオチニルカダベリンをペプチドに対して5倍モル過剰で加えて、1/50(質量/質量)の酵素/基質比で酵素反応を微生物のトランスクレタミナーゼの添加により開始した。ペプチド2(配列番号90)および参照ペプチドGGGSLLQG(配列番号295)を含むペプチドビオチン化アッセイのためには、微生物のトランスクレタミナーゼの量を、それぞれ1/385および1/182(質量/質量)の酵素/基質比に減らした。反応混合物を37でインキュベートした。反応混合物のアリコートを0、15、30、60、120、および180分後に採取して、反応を、遠心分離透析(Microcon-10、10.000NMWL、Merck Millipore)を使用してトランスクレタミナーゼ除去により停止させた。アリコートをRP-HPLCによって10~80%溶離剤B(MeCNの90%水溶液)の勾配を使用することにより $1\text{ mL}/\text{分}$ で20分かけて分析した(図4を参照されたい)。RP-HPLC分析から集めた分画をESI-MSによりさらに分析した。

【0091】

(例3)

トランスクレタミナーゼを使用する酵素抗体コンジュゲーション

抗体の発現および精製。野性型セツキシマブ(Eribitux(登録商標))をコードするプラスミドは、Merck Serono(Darmstadt)の好意で提供された。重鎖のC末端にTGタグを含有するセツキシマブ変異体を、下に記載する標準的SOE PCR技法により調製した。C末端リシンは、両方の構造で-アミノ基とトランスクレタミナーゼに接近可能なグルタミンとの交差反応性を避けるために除去した。抗体を、HEK293F細胞からExp 293発現系(Life Technologies)を使用して一時的に発現させた。状態調節した上清をPROSEPA培地を含むスピンドカラムに適用して(Montage、Merck Millipore)、1.5Mグリシン/NaOH、3M NaCl、pH 9.0で洗浄した。タンパク質をpH 2.5の0.2Mグリシン/HClで溶離させて、pH 9.0の1M Tris/HClで中和した。溶離したタンパク質を1xDPBS(Life Technologies)で透析して4で貯蔵した。

【0092】

タグ付きセツキシマブ(重鎖末端のリシンを欠く)のPCRに基づく生成

PCRを使用して、重鎖のカルボキシ末端リシン残基を欠くc225(セツキシマブ)構造を生成した。末端リシン残基および配列番号246のカルボキシ末端アミノ酸配列を含むC225をコードするプラスミドを、配列番号296、配列番号299の配列を有する

10

20

30

40

50

プライマー（両方とも 1 ピコモルで）を使用して 10 サイクル（P C R 条件：3 分@ 98 （初期変性）、10 秒@ 98 、30 秒@ 55 、15 秒@ 72 ）、続いて配列番号 296、配列番号 300 の配列を有するプライマー（10 ピコモルのプライマー）を使用して、以下のサイクル条件：10 秒@ 98 、30 秒@ 55 、15 秒@ 72 、最終の延長 5 分@ 72 で 20 サイクルにより増幅した。

【 0093 】

生じた増幅生成物をゲルで精製して、その後 E c o R V / B a m H I を使用して（3 時間@ 37 ）制限（r e s t r i c t o i n ）消化にかけた。次に、P C R 精製キットを使用して、制限フラグメントを精製した。次に、フラグメントを E c o R V / B a m H I で消化された p T T 5 _ C 2 2 5 _ H C ベクター中にクローニングした（C 2 2 5 重鎖をコードする）。

【 0094 】

トランスグルタミナーゼを使用する抗体コンジュゲーション

抗体を 0.5 m g / m l に調節して、コンジュゲーション部位当たり 40 モル当量のモノビオチニルカダベリン（M B C ）および 1 モル当量の微生物のトランスグルタミナーゼ（m T G アーゼ）と、p H 7.0 の 100 m M H E P E S 緩衝液中で 3 時間 25 でインキュベートした。分析結果のために、反応混合物を 15 % S D S - P A G E により分析して、ビオチン化重鎖を半乾燥ウェスタンプロットによりストレプトアビジン - アルカリホスファターゼコンジュゲートおよび N B T / B C I P で可視化した。抗体複合体を分取で製造するために、過剰の基質および m T G アーゼをサイズ排除クロマトグラフィーにより、50 m M リン酸ナトリウム緩衝液、150 m M N a C l 、p H 7.0 (S u p e r d e x S 2 0 0 1 0 / 3 0 0 G L 、G E H e a l t h c a r e 、0.5 m l / 分) を用いて除去した。

【 0095 】

コンジュゲーションされた抗体の M A L D I - T O F - M S 分析。M S - 分析に先立って、抗体（6 μ g ）を 2 - メルカプトエタノールを含有する S D S ローディング染料中で還元して、重鎖と軽鎖を、変性条件下で 15 % S D S - P A G E を使用して分離した。タンパク質をクーマシー M e O H 染色により可視化した。改変された重鎖に対応するタンパク質のバンドを切り出して、小片に切り、M Q 水で 15 分間 2 回洗浄して、A c O H および M e O H を染色から除去した。その後、ゲル片を p H 8.0 の 2 : 3 M e C N : 50 m M 重炭酸アンモニウムで 2 回 30 分間洗浄して、染色を除去した。ゲル片を M e C N で脱水して 50 で乾燥した。50 m M 重炭酸アンモニウム中で 20 m M のジチオスレイトール（D T T ）を加え、試料を 60 で 45 分間インキュベートしてジスルフィド結合を還元した。試料が室温に冷却された後、D T T 溶液を除去して、還元されたシステインを暗所で 50 m M の重炭酸アンモニウム中の 55 m M ヨードアセトアミド（I A A ）の添加により 45 分間アルキル化した。過剰のアルキル化混合物を除去して、ゲル片を 50 m M 重炭酸アンモニウムを用いて p H 8.0 で 2 回洗浄した。次に、ゲル片を M e C N で 2 回脱水して、50 m M 重炭酸アンモニウムで膨潤させた後、それらを脱水して 20 n g / μ l トリプシン（N E B 、トリプシン - ウルトラ、質量分析法規格）を含有する 50 m M 重炭酸アンモニウム中で膨潤させて最終の 1 : 20 の酵素 / 基質比を得た。トリプシン消化は、終夜 37 で実施した。ペプチドを、50 % M e C N 、1 % 半胱酸の添加により 30 分間振盪により 2 回抽出した。ペプチドを含有する合わされた上清を凍結乾燥して、M A L D I - T O F - M S により分析した。ゲル消化において、手順は、文献（M. Wilm, A. Shevchenko, T. Houthaeve, S. Breit, L. Schweigerer, T. Fotsis, M. Mann, Nature 1996, 379, 466-469 ）から採用した。

【 0096 】

蛍光測定による抗体コンジュゲーション有効度の決定

抗体コンジュゲーション有効度を N - （テトラメチルロダミニル）カダベリン（T A M R A - カダベリン）を用いる抗体標識および 547 n m の励起波長および 573 n m の発光波長における蛍光の測定により決定した。この目的のために、抗体を、1.0 m g / m l

10

20

30

40

50

に調節してT A M R A - カダベリンのコンジュゲーション部位当たり20モル当量およびpH7.0の100mM H E P E S緩衝液中0.5モル当量の微生物トランスグルタミナーゼ(M T G)と3時間25でインキュベートした。結合していないT A M R A - カダベリンをP B Sで平衡化されたタンパク質脱塩スピンカラム(Thermo Scie nt i f i c)を使用して2回ゲル濾過により除去した。非抗体試料を同じ様式でインキュベートして処理し、ゲル濾過後、残存する遊離T A M R A - カダベリンを排除した。この対照から測定された弱い蛍光を、その後、抗体試料の蛍光から差し引いた。T A M R A - カダベリンのコンジュゲーションされた抗体の濃度は、P B S中9.72~0.19μの範囲のT A M R A - カダベリンの標準的曲線を使用して(ウェル当たり40μl)、
10 およびプレートリーダー(Tecan Infinite M1000)を使用する蛍光読み取りにより決定した。標識された抗体/標識されていない抗体のパーセンテージは、各標識された抗体が、M T Gタグに接続した重鎖における2つのT A M R A部分にコンジュゲーションされていると仮定して、全抗体濃度から計算した(280nmで決定した、9:MW=148211.72g/Mоль 280=223400M-1m-1、10:MW=148259.55g/Mоль 280=223150M-1m-1)。分析結果のために、反応混合物も15%SDS-PAGEにより分析して、T A M R Aで標識された重鎖を蛍光読み取りにより可視化した。

【0097】

(例4)

細胞結合の実験

細胞系統。E B C - 1およびC H O - K 1細胞を、両方ともそれぞれ10%ウシ胎児(Sigma - Aldrich)で補完された4mMのL-グルタミン(Sigma - Aldrich)およびD M E M - F 1 2 + G l u t a M a x(商標)(Gibco(登録商標))が添加されたD M E M中において、37および5%CO₂で培養した。
20

【0098】

細胞結合の実験。細胞結合の実験は、E G F Rを過発現するE B C - 1[3]およびE G F R - 陰性C H O - K 1細胞を、共焦点の蛍光顕微鏡およびフローサイトメトリーとそれ組み合わせて使用することにより実施した。洗浄およびインキュベーションステップは、1%B S Aが添加されたP B Sを使用して4で実施した。顕微鏡に基づく実験のために、細胞をガラスのカバースリップ上で成長させ、続いてそれぞれ100nMの抗体複合体および1:200の希釈ストレプトアビジンA l e x a F l u o r(登録商標)488コンジュゲート(Life Technologies)で次々に標識した。次に、細胞を4%パラホルムアルデヒドで固定して、D A P I(Life Technologies)を含むP r o L o n g(登録商標)D i a m o n d A n t i f a d e M o u n t a n tを用いて検鏡板に固定し、100×対物レンズ(Leica Microsystems)を備えたLeicaのT C S S P 5共焦点顕微鏡を使用して走査した。フローサイトメトリーのためには、2×105個の細胞を、100nMのそれぞれの抗体複合体および1:200に希釈されたストレプトアビジンA l e x a F l u o r(登録商標)488コンジュゲート(Life Technologies)と、引き続くステップでインキュベートした。細胞の蛍光をB D I n f l u x細胞ソーターおよびB D F A C S S o r t w a r eを使用して2×10⁴事象の検出で決定した。
30

【0099】

(例5)

M T G 2およびG G Gアミノ供与体を含む基質を使用するセツキシマブ(c 225)のバイオコンジュゲーション

末端のリシン残基(K447)が除去されたセツキシマブの重鎖バリアント9および10(9:配列番号90の本発明のM T Gタグ付き、10:配列番号246の本発明のM T Gタグ付き)を、ビオチン-カダベリン(cadavarine)、またはG G G Y K - ビオチンとコンジュゲーションさせた。

M T G 2に媒介されるコンジュゲーション反応を実施するためのアッセイ条件は下記の通
40

10

20

30

40

50

りであった。

アッセイ条件

	濃度 [μ]
50 mM Tris - HCl pH 7.5、150 mM NaCl 1×	
mTG (0.4 eq.)	1.364
セツキシマブ(本発明による)	0.5 mg / ml
MBC / GGG - ビオチン / GGG - TAMRA / TAMRA - カダベリン (50 モル当量)	170.4
インキュベーション時間 :	3 時間@ 22

22 で 3 時間のインキュベーションの後、反応を $2.5 \mu l$ の SDS ローディング染料を加えることにより停止させ、続いて 98 で 5 分間変性させた。15% SDS ポリアクリルアミドゲルに試料を加えて 300 V、40 mA で、所望の分離が達成されるまで行った(図 14 B を参照されたい)。ウェスタンプロットを行った(12 V、400 mA、45 分)。蛍光の検出は、ポリアクリルアミドゲルを UV スクリーン上に置くことにより行なった(= 260 ~ 280 nm)(図 14 C)。

10

結果

本発明の M T G - タグ 1、または M T G - タグ 2 を含むセツキシマブだけが蛍光で標識されたが、それに対して本発明の配列番号 90、配列番号 246 のポリペプチド配列を有しない野生型セツキシマブは蛍光で標識されず、本発明の M T G タグが m T G 2 により効率的に認識されたことを示した。

【0100】

20

(例 6)

M T G で促進されるコンジュゲーション反応

抗体薬物コンジュゲート(ADC)を、配列番号 246 でタグ付けされた 1 mg / ml のセツキシマブ(例えば、重鎖の各々のカルボキシ末端に配列番号 246 を含むセツキシマブ)、20 当量の細胞傷害性ペイロード 1 ~ 4、および 0.1 当量の微生物トランスクルタミナーゼ(MTG)を含有する、MTG に触媒される反応で合成した。反応は、PBS 中 pH 7.4、37 で 16 時間実施して、1 体積の HIC 緩衝液 A の添加により停止させた。

【0101】

30

疎水性相互作用クロマトグラフィー(HIC)による ADC の分析

ADC を、疎水性相互作用クロマトグラフィー(HIC)により TSK ゲルブチル - N P R カラム(Tosoh Bioscience、4.6 mm × 3.5 cm、2.5 μm)で Agilent Infinity 1260 HPLC を使用して評価した。HIC の方法を、50 mM NaH₂PO₄、1.5 M (NH₄)₂SO₄ pH 7.5(緩衝液 A)および 50 mM NaH₂PO₄ pH 7.5(緩衝液 B)の移動相を使用して適用し、0.75 M (NH₄)₂SO₄ 中の ADC(45 μg)を載せて、0% 緩衝液 B で 2.5 分、それに続いて 25 分かけて 100% 緩衝液 B になる線形勾配からなる勾配で、0.9 ml / 分の流速で溶離させた。

40

50

【図面】

【図 1】

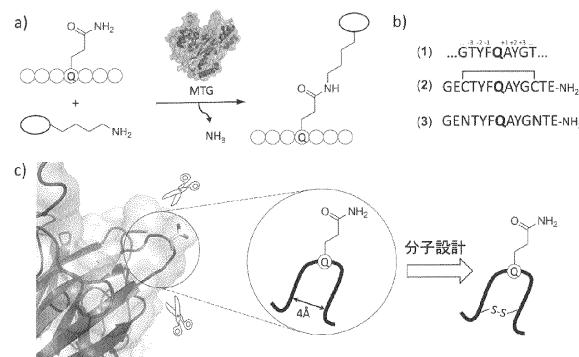


Figure 1

【図 2】

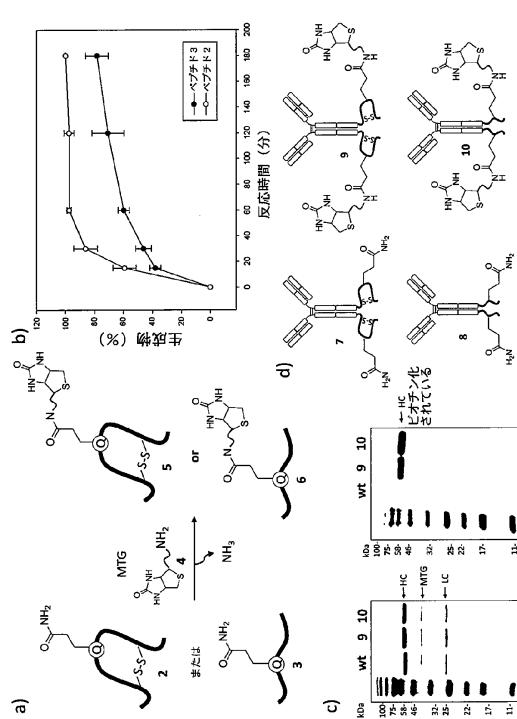


Figure 2

【図 3】

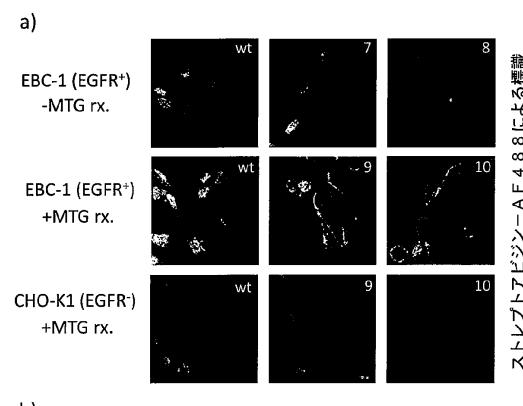
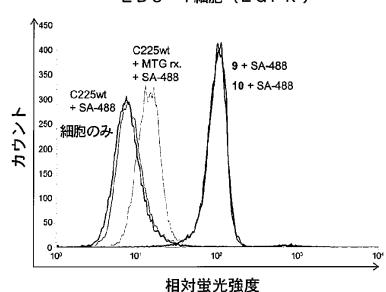
b) EBC-1 細胞 (EGFR⁺)

Figure 3

【図 4】

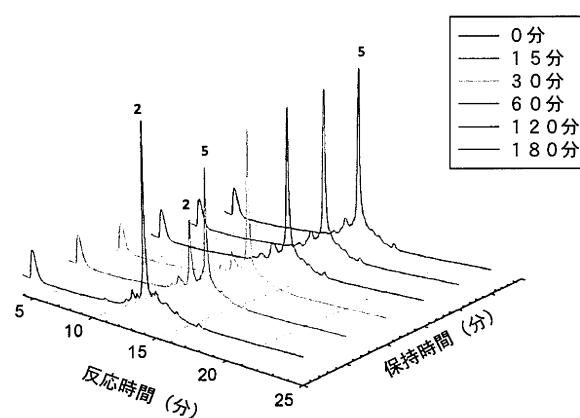


Figure 4

10

20

30

40

50

【図 5】

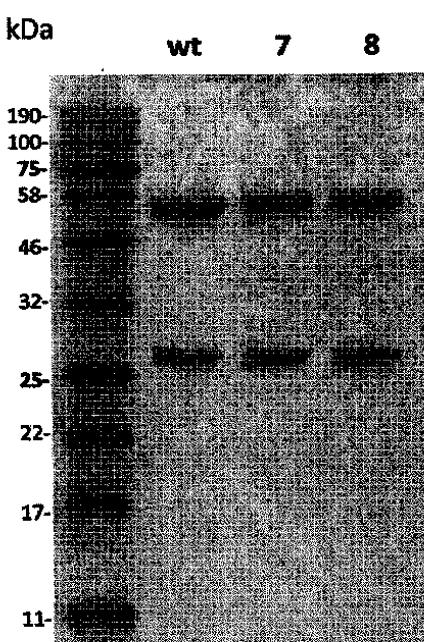


Figure 5

【図 6】

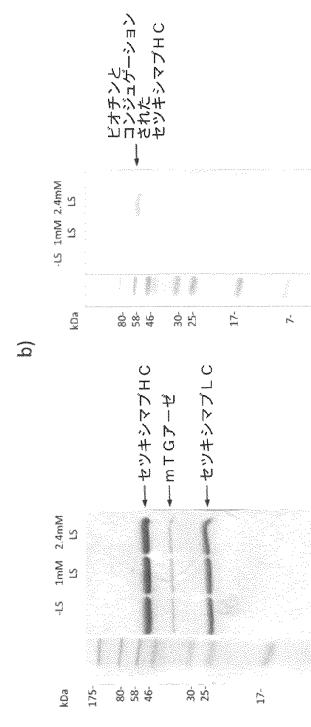


Figure 6

【図 7】

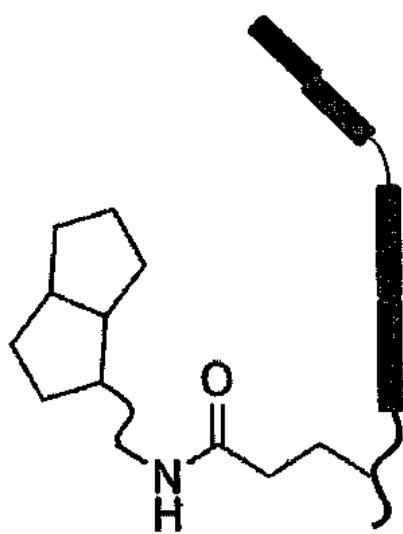


Figure 7

【図 8】

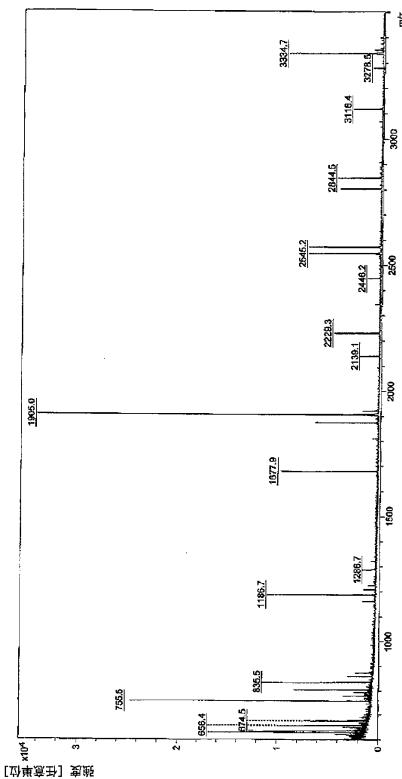


Figure 8

10

20

30

40

50

【図9】

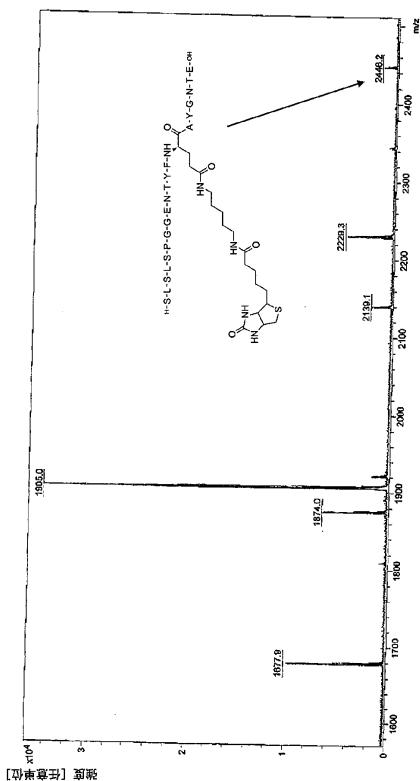


Figure 9

【図10A】

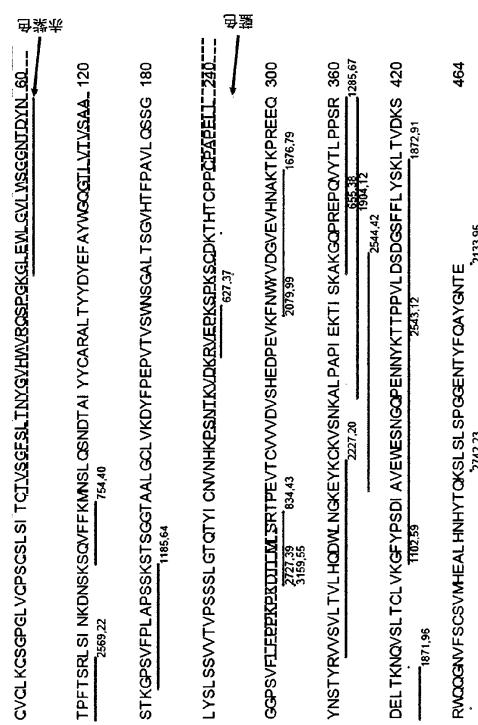


Figure 10A

【図10B】

残基網羅率: 5.6% [464のうち261]
ペプチドの中: 14[12] 改変: 6[6] 同定されず: 8
改変されずに同定されたペプチド:
入力 実測値 偏差 mc 配列の範囲
628,400 / 627,370 -0,022 1 216-220 RVEPK
656,400 / 655,377 -0,016 1 344-349 AKGQPR 消失した切断
755,500 / 754,401 -0,091 0 76-81 SQVFFK
835,500 / 834,427 -0,063 0 254-260 DTLMISR me t O x 消失
1186,700 / 1185,639 -0,053 0 124-135 GPSVFLAPSSK
1286,700 / 1285,667 -0,026 0 350-360 EPQVYTLPPSR
1677,900 / 1676,795 -0,098 0 280-293 FNWYVVDGVEVHNAK
1874,000 / 1872,915 -0,078 0 398-414 TPPVLDSDGSFLYSK
1874,000 / 1871,963 -1,030 1 350-365 EPQVYTLPPSRDELK
1905,000 / 1904,121 0,128 3 332-349 ALPAIEKTIKAKGQPR Missed cleavage
2229,300 / 2227,200 -1,093 1 307-322 VVSVLTVLHQDWLNGKEYK
2545,200 / 2544,124 0,230 5 323-345 EYKCKVSNKALPAPI EKTI SKAKCOPREPQVYTLPPSR
2545,200 / 2543,124 -1,069 0 376-397 GFYPSDIAVEWESNGOPENNYK
2570,290 / 2569,224 -0,059 0 44-66 GLEWLGVIVWESGGNTDYNTPFTSR
改変されて同定されたペプチド:
1161,700 / 1102,593 -0,070 0 366-375 CAM NQVSLTCLVK
2139,200 / 2079,991 -0,073 0 261-279 CAM TPEVTCV VDVSHEDPEVK
2446,200 / 2133,949 -0,077 -1 445-464 MBC SLSLSPGGENTYFQAYGNTE
2801,300 / 2742,231 -0,033 0 422-444 CAM WQQGNVFSCSVMEALHNHYTOK
2844,500 / 2727,392 -0,042 0 228-253 CAM THTCPPCPAPEL...GPSVFLFPPKPK
3334,700 / 3159,547 -0,058 1 224-253 CAM SCDKTHCPPC...GPSVFLFPPKPK
同定されない質量値:
674.50 777.40 804.30 860.50 876.50
1208.70 3116.40 3278.50
改質のためにチェックされた質量のリスト[3]:
CAM (58,029 Da) [C]
MBC (311,167 Da) [Q]

Figure 10B

【図11】

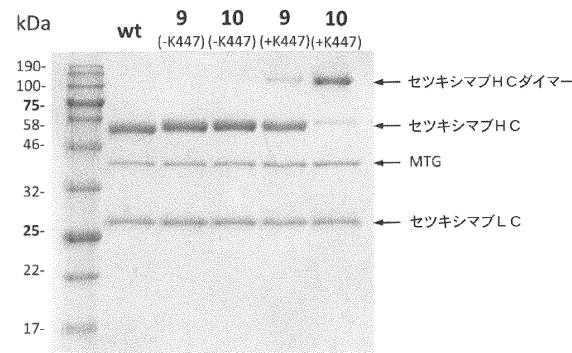


Figure 11

【図 1 2】

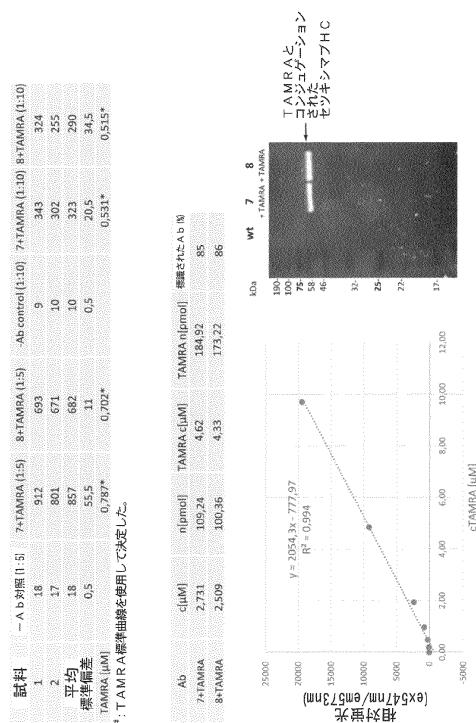


Figure 12

【図 1 3】

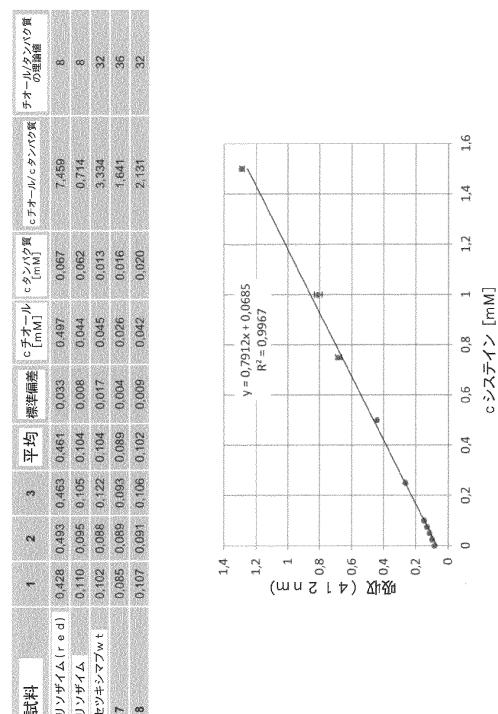
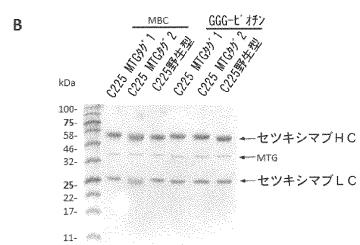
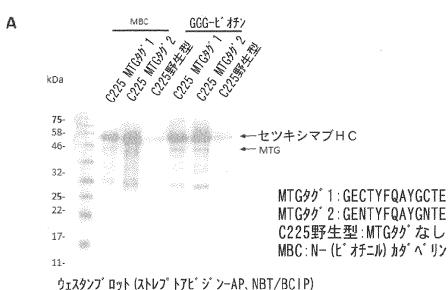


Figure 13

【図 1 4 A - B】

微生物トランスクレミナーゼ(MTG)によるセツキシマフとGGG基質とのコンjugーション

15% SDS-PAGE (クマシ染色)

Figure 14 A, B

【図 1 4 C】

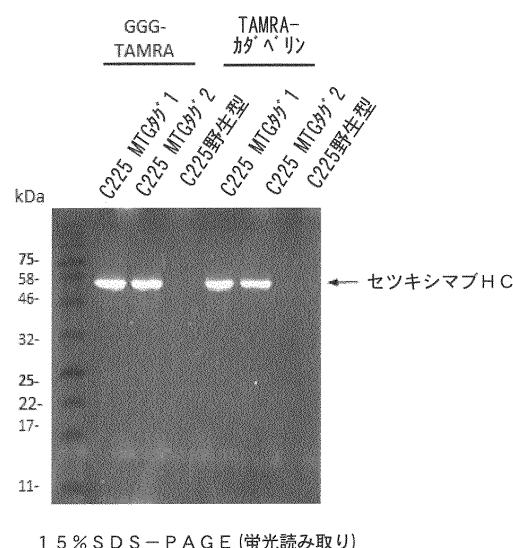


Figure 14 C

【図 15】

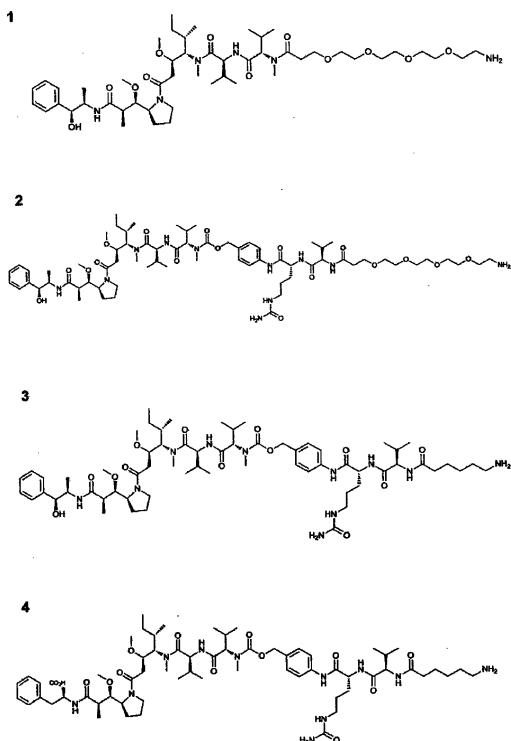


Figure 15

【図 16】

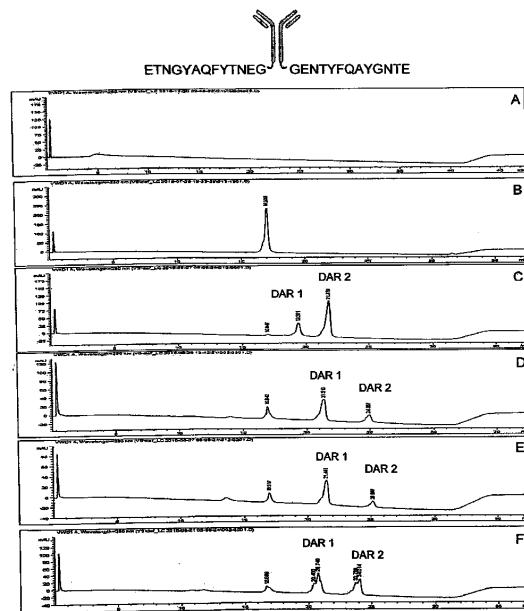


Figure 16

【配列表】
0007008014000001.app

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

	F I		
A 6 1 K	39/395 (2006.01)	A 6 1 K	39/395
A 6 1 K	47/68 (2017.01)	A 6 1 K	39/395
C 1 2 P	21/08 (2006.01)	A 6 1 K	39/395
		A 6 1 K	39/395
		A 6 1 K	47/68
		C 1 2 P	21/08

(74)代理人 100088694

弁理士 弟子丸 健

(74)代理人 100103610

弁理士 吉田 和彦

(74)代理人 100084663

箱田 篤

(74)代理人 100093300

弁理士 浅井 賢治

(74)代理人 100119013

弁理士 山崎 一夫

(74)代理人 100123777

弁理士 市川 さつき

(74)代理人 100111796

弁理士 服部 博信

(74)代理人 100154988

弁理士 小林 真知

(72)発明者 ピアター ビルギット

ドイツ連邦共和国 6 4 2 8 5 ダルムシュタット ハイデルベルガー シュトラーセ 6 6

(72)発明者 ベツ ヴルリヒ

ドイツ連邦共和国 6 4 3 5 4 ラインハイム ヴァルトシュトラーセ 8 5

(72)発明者 コルマー ハーラルト

ドイツ連邦共和国 6 4 3 6 7 ミュールタール イン デア レーデ 7

(72)発明者 ジークムント ヴァネサ

ドイツ連邦共和国 6 4 2 9 5 ダルムシュタット ホルツホーフアレー 1 2 アー

審査官 鈴木 崇之

(56)参考文献 国際公開第 2 0 1 5 / 0 9 7 2 6 7 (WO , A 1)

BIOMOLECULES , 2013年 , Vol. 3, No. 4 , pp. 870-888

Biosci. Biotechnol. Biochem. , 2009年 , Vol. 73, No. 5 , pp. 993-999

日本農芸化学会大会講演要旨集 2 0 0 8 年度 (平成 2 0 年度) 大会 , 2008年03月05日 ,
シ66, 4SY18-1

(58)調査した分野 (Int.Cl. , D B 名)

C 0 7 K 1 / 0 0 - 1 9 / 0 0

C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0

C 1 2 N 9 / 0 0 - 9 / 9 9

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)

C a p l u s / R E G I S T R Y (S T N)

G e n B a n k / E M B L / D D B J / G e n e S e q

P u b M e d