

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6585600号  
(P6585600)

(45) 発行日 令和1年10月2日(2019.10.2)

(24) 登録日 令和1年9月13日(2019.9.13)

(51) Int.Cl.

F 1

|             |           |      |        |       |
|-------------|-----------|------|--------|-------|
| C07K 19/00  | (2006.01) | C07K | 19/00  | Z N A |
| C07K 16/18  | (2006.01) | C07K | 16/18  |       |
| C07K 16/00  | (2006.01) | C07K | 16/00  |       |
| C07K 14/725 | (2006.01) | C07K | 14/725 |       |
| C12N 15/62  | (2006.01) | C12N | 15/62  |       |

請求項の数 34 (全 75 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2016-543004 (P2016-543004)  
 (86) (22) 出願日 平成26年12月23日 (2014.12.23)  
 (65) 公表番号 特表2017-501728 (P2017-501728A)  
 (43) 公表日 平成29年1月19日 (2017.1.19)  
 (86) 國際出願番号 PCT/CA2014/051263  
 (87) 國際公開番号 WO2015/095972  
 (87) 國際公開日 平成27年7月2日 (2015.7.2)  
 審査請求日 平成29年12月18日 (2017.12.18)  
 (31) 優先権主張番号 61/920,425  
 (32) 優先日 平成25年12月23日 (2013.12.23)  
 (33) 優先権主張国・地域又は機関  
米国(US)

(73) 特許権者 516186636  
ザイムワークス インコーポレイティド  
カナダ国, ブリティッシュコロンビア ブ  
イ6エイチ 3ブイ9, バンクーバー, ウ  
エスト エイス アベニュー 1385ース  
イート 540  
(74) 代理人 100099759  
弁理士 青木 篤  
(74) 代理人 100077517  
弁理士 石田 敏  
(74) 代理人 100087871  
弁理士 福本 積  
(74) 代理人 100087413  
弁理士 古賀 哲次

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 C末端軽鎖ポリペプチド伸長を含有する抗体、ならびにその複合体及びその使用方法

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

システイン残基を含有するC末端アミノ酸伸長を含有する軽鎖ポリペプチドを含有する抗体又はその抗原結合断片であって、前記C末端アミノ酸伸長は、4～50アミノ酸長を有し、ここで、

前記C末端アミノ酸伸長は、内因性ヒトアミノ酸配列又は修飾ヒトアミノ酸配列を含み、  
前記ヒトアミノ酸配列は、ヒト抗体ヒンジ領域もしくは、その一部、又はT細胞受容体ヒンジ領域もしくはその一部を含み、

前記C末端アミノ酸伸長は抗原に特異的に結合しない、抗体又はその抗原結合断片。

## 【請求項2】

前記C末端アミノ酸伸長は5～50アミノ酸長である、請求項1に記載の抗体又はその抗原結合断片。

## 【請求項3】

前記C末端アミノ酸伸長は5～25アミノ酸長である、請求項1に記載の抗体又はその抗原結合断片。

## 【請求項4】

前記C末端アミノ酸伸長は、システイン残基を含有しないアミノ酸スペーサーを含有する、請求項1～3のいずれか1項に記載の抗体又はその抗原結合断片。

## 【請求項5】

前記スペーサーは、3～20のアミノ酸を含有する、請求項4に記載の抗体又はその抗

10

20

原結合断片。

**【請求項 6】**

前記スペーサーは、1以上のグリシン(G)残基、及び1以上のセリン(S)残基を含む、請求項4又は5に記載の抗体又はその抗原結合断片。

**【請求項 7】**

前記スペーサーは、配列GGGS(配列番号1)を含有する、請求項4～6のいずれか1項に記載の抗体又はその抗原結合断片。

**【請求項 8】**

前記抗体がIgGである、請求項1～7のいずれか1項に記載の抗体又はその抗原結合断片。10

**【請求項 9】**

前記抗原結合断片が、Fab、F(ab')<sub>2</sub>、Fab'、Fv、又はscFvである、請求項1～8のいずれか1項に記載の抗体又はその抗原結合断片。

**【請求項 10】**

前記内因性ヒトアミノ酸配列が、ヒト抗体ヒンジ領域の少なくとも2、3、4、5又は6個の連続アミノ酸を含む、請求項1～9のいずれか1項に記載の抗体又はその抗原結合断片。

**【請求項 11】**

前記C末端アミノ酸伸長が、1又はそれ以上のシステイン残基が挿入又は置換によって導入されている内因性ヒトアミノ酸配列を含む、請求項1～9のいずれか1項に記載の抗体又はその抗原結合断片。20

**【請求項 12】**

前記C末端アミノ酸伸長は、配列番号32、33、34、35、36、37、38、39もしくは40のいずれか1つに記載の配列、又はその一部分を含む、請求項1～9のいずれか1項に記載の抗体又はその抗原結合断片。

**【請求項 13】**

前記C末端アミノ酸伸長が、配列番号92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、又は103のいずれか1つで表される配列を含む、請求項1～9のいずれか1項に記載の抗体又はその抗原結合断片。

**【請求項 14】**

2つの軽鎖ポリペプチドであって、それぞれがシステイン残基を含むC末端アミノ酸伸長を含むポリペプチドを含有する、請求項1～13のいずれか1項に記載の抗体又はその抗原結合断片。

**【請求項 15】**

抗体が、第1重鎖ポリペプチド及び第1軽鎖ポリペプチドを含む第1モノエピトープ性抗原結合ドメイン、並びに第2重鎖ポリペプチド及び第2軽鎖ポリペプチドを含む第2モノエピトープ性抗原結合ドメインを含み、第1軽鎖ポリペプチド及び第2軽鎖ポリペプチドのうちの1つがシステイン残基を含むC末端アミノ酸慎重を含む、請求項1～13のいずれか1項に記載の抗体又はその抗原結合断片。30

**【請求項 16】**

抗体が、第1重鎖ポリペプチド及び第1軽鎖ポリペプチドを含む第1モノエピトープ性抗原結合ドメイン、並びに第2重鎖ポリペプチド及び第2軽鎖ポリペプチドを含む第2モノエピトープ性抗原結合ドメインを含み、第1軽鎖ポリペプチド及び第2軽鎖ポリペプチドの両方がシステイン残基を含むC末端アミノ酸伸長を含む、請求項1～13のいずれか1項に記載の抗体又はその抗原結合断片。40

**【請求項 17】**

二重特異性抗体である、請求項1～16のいずれか1項に記載の抗体又はその抗原結合断片。

**【請求項 18】**

請求項1～17のいずれか1項に記載の抗体又はその抗原結合断片；及び

10

20

30

40

50

前記 C 末端アミノ酸伸長の前記システイン残基を介して前記抗体又はその抗原結合断片に結合されている剤、

を含有する複合体であって、当該剤が治療剤又は標識剤である、複合体。

【請求項 19】

前記剤が、リンカーを介して前記システイン残基に結合されている、請求項 18 に記載の複合体。

【請求項 20】

前記剤が、治療剤である、請求項 18 又は 19 に記載の複合体。

【請求項 21】

前記治療剤が、オーリスタチンもしくはそのアナログ、又はヘミアステリンもしくはそのアナログである、請求項 20 に記載の複合体。 10

【請求項 22】

前記剤が、標識剤である、請求項 18 又は 19 に記載の複合体。

【請求項 23】

前記標識剤が、*in vivo* イメージング剤である、請求項 22 に記載の複合体。

【請求項 24】

前記抗体又はその抗原結合断片が、前記 C 末端アミノ酸伸長のシステイン残基以外のシステイン残基に結合された剤を含有しない、請求項 18 ~ 23 のいずれか 1 項に記載の複合体。 20

【請求項 25】

前記 C 末端アミノ酸伸長が、2 以上のシステイン残基を含有し、及び、ここで、前記 2 以上のシステイン残基のうちの少なくとも 2 つは、治療剤及び標識剤から独立して選択される剤に結合されている、請求項 18 ~ 24 のいずれか 1 項に記載の複合体。

【請求項 26】

請求項 1 ~ 17 のいずれか 1 項に記載の抗体又はその抗原結合断片の軽鎖ポリペプチドをコードする核酸。

【請求項 27】

請求項 26 に記載の核酸を含有するベクター。

【請求項 28】

請求項 26 に記載の核酸、または請求項 27 に記載のベクターを含有する宿主細胞。 30

【請求項 29】

請求項 1 ~ 17 のいずれか 1 項に記載の抗体又はその抗原結合断片、または請求項 18 ~ 25 のいずれか 1 項に記載の複合体；及び

薬学的に受容可能な添加剤

を含有する医薬組成物。

【請求項 30】

請求項 26 に記載の核酸を宿主細胞中で発現することを含む、抗体又はその抗原結合断片の軽鎖を作製する方法。

【請求項 31】

請求項 1 ~ 17 のいずれか 1 項に記載の抗体又はその抗原結合断片に剤を結合させることを含む、抗体複合体を作製する方法であって、ここで、前記剤は、前記 C 末端アミノ酸伸長の前記システイン残基に結合され、前記剤は治療剤又は診断剤である、方法。 40

【請求項 32】

前記抗体又はその抗原結合断片に前記剤を結合させる前に、前記 C 末端アミノ酸伸長の前記システイン残基の前記スルフヒドリル基を還元することをさらに含む、請求項 31 に記載の方法。

【請求項 33】

前記還元することが、

(a) 前記 C 末端アミノ酸伸長中ではないシステイン残基ではなく、前記 C 末端アミノ酸伸長中のシステイン残基を優先的に 1 つ以上還元すること、又は 50

(b) 前記C末端アミノ酸伸長中の1以上のシステイン残基を還元し、前記C末端アミノ酸伸長中でない任意のシステイン残基を還元しないこと、  
を含む、請求項3\_2に記載の方法。

**【請求項3\_4】**

前記結合することが、マレイミド化学反応、ハロアセチル化学反応、ビニルスルホン化  
学反応、またはピリジルジスルフィド化学反応を用いて、前記還元スルフヒドリル基に前  
記剤を架橋させることを含む、請求項3\_2又は3\_3に記載の方法。

**【発明の詳細な説明】**

**【背景技術】**

**【0001】**

10

関連文献の相互参照

米国特許法第119条(e)の定めに従い、本出願は、2013年12月23日に出願  
された米国仮特許出願第61/920,425号の優先権を主張するものであり、当該開  
示は、参照により本明細書に援用される。

**【0002】**

近年、治療対象となる特定疾患の病因の根底にある細胞に対する選択性が改善され、治  
療剤の開発は目覚ましい発展を遂げている。抗体の抗原特異性を利用し、薬剤ペイロード  
の抗原特異的な送達が行われている。

**【0003】**

そのような薬剤を担持した抗体は、抗体薬剤複合体(antibody drug conjugates、ADC)と呼称される。ADCは一般的に化学的または酵素的に薬  
剤(たとえば、細胞毒性薬剤)に、多くの場合リンカーを介して連結された抗体から構成  
される。典型的には、ADCは循環中で安定であり、抗原特異的結合後に細胞内に薬剤が  
放出され、及び一部の例においては、ADCが内在化されるよう設計される。ADCは「  
ペイロード」(たとえば細胞毒性剤等)を細胞標的に送達するよう設計されるため、当該  
剤による標的細胞調節の有効性(たとえば、標的細胞の殺傷)は、対応する抗体単独または  
薬剤単独と比較して、ADCが関連することにより、より強力なものとなりうる。

20

**【0004】**

抗体の選択された部位(複数含む)での薬剤ペイロードの結合をもたらすADCは、抗  
体薬剤複合体製剤では製品が均質であることが望ましい等の多くの理由により、興味の対  
象となっている。この目的に対し、一部のグループでは、抗体の構造及び機能を維持しつ  
つ、部位特異的なペイロードの付加を促進するための試みにおいて、抗体内の特定部位で  
のアミノ酸置換について、研究を行っている。たとえば、Sheenらは、抗体重鎖及び軽  
鎖内の様々な位置で体系的にシステイン置換を検証し、複合体の安定性に対する部位選択  
の影響を明らかにした(たとえば、Nat. Biotech., 30:184-189, 2012)。特に、これらの研究により、抗体上の付加部位へ溶媒が近づきやすい  
場合、得られたADCの安定性に負の影響を与えることが明らかとなっている。

30

**【0005】**

さらに、重鎖と軽鎖の関連性を含む、抗体安定性に負の影響を与える変更は、抗原に対  
する抗体のアフィニティ、ならびにADCの安定性を損なう可能性があり、それにより毒  
性が高まり、特異性が低下し、及び有用性が損なわれる。抗体のアフィニティ、または得  
られたADCの安定性を著しく損ねることなく、部位特異的な様式でペイロードを付加す  
ることに適した部位を決定する、または作り出すことが非常に望ましい。

40

**【0006】**

また、抗体の抗原特異性を利用して、標識された剤を組み込み、診断的決定もしくは予後  
診断的決定、及び治療過程に関する情報を伝えるエピトープならびに/または細胞を認識  
する診断ツール及び画像解析ツールが提供される。そのような診断ツール及び予後診断ツ  
ールは、抗原検出に対するツールとしての抗体のアフィニティに依存しており、及び特定  
のシグナル伝達に対するツールとしての抗体による標識剤の保持に依存している。したが  
って、ADCと同様に、抗体のアフィニティを損なうことなく、または得られた複合体の

50

安定性を損なうことなく、部位特異的な様式で付加を標識することに適した部位を決定すること、または作り出すことが非常に望ましい。

【発明の概要】

【0007】

本発明は、C末端アミノ酸伸長を含む抗体軽鎖ポリペプチド、ならびに当該改変軽鎖ポリペプチドを含有する抗体及び抗体複合体を提示するものであり、当該C末端伸長は、1以上のシステイン残基を含有する。また、当該C末端アミノ酸伸長のシステイン残基を介して剤に結合された、本発明の抗体を含む複合体も提示される。本発明はさらに、システイン残基を含有するC末端アミノ酸伸長を含む抗体軽鎖ポリペプチドをコードする核酸を提示する。本開示の抗体または複合体を含む医薬組成物もまた提示され、同様に、本開示の抗体及び複合体の作製方法ならびに使用方法も提示される。10

【0008】

ある態様において、本開示は、システイン残基を含有するC末端アミノ酸伸長を含む軽鎖ポリペプチドを含む抗体を提示するものである。

【0009】

一部の実施形態において、本開示により、システイン残基を含有するC末端アミノ酸伸長を含む軽鎖ポリペプチドを含む抗体が提示され、ここで、当該C末端アミノ酸伸長は、抗原に特異的に結合しない（たとえば、当該伸長は、抗体の抗原結合部分、または抗体断片の抗原結合部分を含まない）。

【0010】

ある態様において、本開示は、少なくとも1つのモノエピトープ性の抗原結合二量体を含有する抗体を提示するものであり、当該モノエピトープ性抗原結合二量体は、重鎖ポリペプチド、及びC末端アミノ酸伸長を含有する軽鎖ポリペプチドを含有し、当該伸長はシステイン残基を含有する。当該2つのモノエピトープ性二量体の各々は、同じエピトープに結合してもよい。他の態様においては、当該2つのモノエピトープ性二量体の各々は、異なるエピトープに結合する。20

【0011】

ある実施形態によると、上記に要約される任意の抗体のC末端アミノ酸伸長は、システイン残基を含有していないアミノ酸スペーサーを含有する。ある態様において、当該スペーサーは、1～30アミノ酸、3～20アミノ酸、または4～17アミノ酸である。ある実施形態において、当該スペーサーは、グリシン(G)残基及びセリン(S)残基を含有する。たとえば、当該スペーサーは、1以上のグリシン(G)残基及び1以上のセリン(S)残基からなってもよい。そのようなスペーサーは、任意選択的に、配列GGGSを有する。ある実施形態において、当該伸長は、内因性ヒトアミノ酸配列、または改変ヒトアミノ酸配列を含有する。これらは、ヒト抗体ヒンジ領域配列、T細胞受容体配列、または他のヒト配列を含有してもよい。ある態様において、当該伸長は、細胞外タンパク質アミノ酸配列、及び/または細胞表面上に存在するタンパク質の細胞外ドメインのアミノ酸配列を含有してもよい。1つの実施形態において、当該伸長は、1以上の天然型システイン残基を含有する内因性ヒトアミノ酸配列を含有する。これらは、ヒト抗体ヒンジ領域配列、T細胞受容体配列、または他のヒトタンパク質システイン含有配列を含有してもよい。30  
ある態様において、当該伸長は、細胞外タンパク質アミノ酸配列、及び/または細胞表面上に存在するタンパク質の細胞外ドメインのアミノ酸配列を含有してもよい。1つの実施形態において、当該伸長は、改変ヒトアミノ酸配列を含有し、ここで、1以上のシステインが、挿入または置換により当該内因性ヒトアミノ酸配列に導入されている。40

【0012】

本開示抗体のC末端アミノ酸伸長は、2以上のスペーサーを含有してもよい。たとえば、当該C末端アミノ酸伸長は、2～10のスペーサーを含有してもよい。当該スペーサーは、同じアミノ酸配列を有してもよい。他の態様において、当該スペーサーのうちの少なくとも2つのアミノ酸配列は、異なっている。ある実施形態によると、システインが、当該各スペーサーの間に存在する。あるいは、当該スペーサーのうちの少なくとも2つは、50

隣接していてもよく、たとえば、C末端アミノ酸伸長中の当該スペーサーのうちの少なくとも2つは、当該スペーサーの間にいずれのアミノ酸（たとえば、いずれのシステイン）も含有していない。1つの実施形態において、当該C末端アミノ酸伸長は、システインで停止する。

#### 【0013】

ある態様において、本開示抗体のC末端アミノ酸伸長内のシステインは、還元されたスルフヒドリル基を含有する。ある実施形態によると、当該抗体は、当該C末端アミノ酸伸長のシステイン残基に結合された剤を含有する。1つの実施形態において、当該剤は、当該C末端アミノ酸伸長のシステイン残基に直接結合されている。1つの実施形態において、当該剤は、当該C末端アミノ酸伸長のシステイン残基にリンカーを介して間接的に結合されている。1つの実施形態において、当該剤は、当該C末端アミノ酸伸長の外側のシステイン残基よりも、軽鎖のC末端アミノ酸伸長のシステインに優先的に結合される。1つの実施形態において、当該剤は、抗体軽鎖のC末端アミノ酸伸長のシステインを介して、抗体に排他的に結合される。ある態様において、当該剤は、治療剤（たとえば細胞毒性剤）または標識剤（たとえば、in vivoイメージング剤）である。ある実施形態によると、当該C末端アミノ酸伸長は、治療剤及び標識剤から独立して選択される剤に各々結合されるシステインを2つ以上含有する。10

#### 【0014】

1つの実施形態において、2以上の剤が、独立して、C末端アミノ酸伸長の2以上のシステイン残基に直接または間接的に結合される。1つの実施形態において、当該剤は、当該C末端アミノ酸伸長の外側のシステインよりも、当該軽鎖のC末端アミノ酸伸長のシステインに優先的に結合される。1つの実施形態において、当該剤は、抗体軽鎖の当該C末端アミノ酸伸長のシステインを介して、抗体に排他的に結合される。20

#### 【0015】

本開示の抗体は、抗体またはその結合断片であってもよい。たとえば、当該抗体は、IgG、Fab、F(ab')<sub>2</sub>、Fab'、Fv、ScFv、二特異性抗体等であってもよい。

#### 【0016】

また、本開示により、複合体が提示される。一部の実施形態によると、当該複合体は、システイン残基を含有するC末端アミノ酸伸長を含む軽鎖ポリペプチドを含有する抗体を含む。30

#### 【0017】

ある態様において、当該複合体は、システイン残基を含むC末端アミノ酸伸長を含む軽鎖ポリペプチドを含有する抗体を含み、当該C末端アミノ酸伸長は、抗原に特異的に結合しない（たとえば、抗体の抗原結合部分を含まないか、または抗体断片の抗原結合部分を含まない）。

#### 【0018】

一部の実施形態において、当該複合体は、少なくとも1つのモノエピトープ性の抗原結合二量体を含有する抗体を含有し、当該モノエピトープ性抗原結合二量体は、重鎖ポリペプチド、及びC末端アミノ酸伸長を含有する軽鎖ポリペプチドを含有し、当該伸長はシステイン残基を含有する。そのような複合体の抗体は、2つのモノエピトープ性抗原結合二量体を含有してもよい。当該2つのモノエピトープ性二量体の各々は、同じエピトープに結合してもよい。他の態様においては、当該2つのモノエピトープ性二量体の各々は、異なるエピトープに結合する。40

#### 【0019】

さらに、当該複合体は、当該C末端アミノ酸伸長のシステイン残基を介して抗体に結合された剤を含有する。本開示の複合体の抗体及び剤は、上記に要約され、または以下の詳細な説明及び実施例において記述される抗体の特性ならびに剤の特性のいずれかを有してもよく、ならびに本明細書に記述される結合戦略、または同じ結合結果が得られる任意の他の適切な戦略を用いて結合されてもよい。50

**【 0 0 2 0 】**

本開示の態様には、本開示の抗体のすべて、または一部をコードする核酸が含有される。たとえば、システイン残基を含有するC末端アミノ酸伸長を含む抗体軽鎖ポリペプチドをコードする核酸が提示される。当該C末端アミノ酸伸長は、本開示抗体に関し上述され、ならびに以下の詳細な説明及び実施例において記述される特性のいずれかを含有してもよい。そのような核酸を含有するベクター、ならびに本開示の核酸及びベクターを含有する宿主細胞（たとえば原核宿主細胞または真核宿主細胞）もまた提示される。

**【 0 0 2 1 】**

ある態様において、本開示により、医薬組成物が提示される。ある実施形態によると、当該医薬組成物は、本開示抗体及び複合体に関し上記に要約され、ならびに以下の詳細な説明及び実施例において記述される抗体または複合体のいずれかを含有する。また、本開示の抗体及び複合体に関し上記に要約され、ならびに以下の詳細な説明及び実施例において記述される医薬組成物、抗体、または複合体のいずれかの治療有効量を、その必要のある患者に投与することを含む方法が開示される。10

**【 0 0 2 2 】**

また、抗体軽鎖を作製する方法が開示される。当該方法には、システイン残基を含有するC末端アミノ酸伸長を含有する抗体軽鎖ポリペプチドをコードする核酸を宿主細胞中で発現することが含まれる。ある態様において、当該方法はさらに、当該C末端アミノ酸伸長中のシステイン残基のスルフヒドリル基を還元することを含む。1つの実施形態において、当該方法は、当該C末端アミノ酸伸長の外側のシステイン残基の還元よりも、当該C末端アミノ酸伸長中のシステイン残基のスルフヒドリル基を優先的（または偏向的）に還元することを含有する。1つの実施形態において、当該方法は、当該C末端アミノ酸伸長の外側のシステイン残基の還元よりも、当該C末端アミノ酸伸長中のシステイン残基のスルフヒドリル基を排他的に還元することを含む。20

**【 0 0 2 3 】**

ある態様において、当該C末端アミノ酸伸長は、2以上のシステイン残基を含有する。ある態様において、当該方法はさらに、当該C末端アミノ酸伸長中のシステイン残基のスルフヒドリル基を還元することを含む。1つの実施形態において、当該方法は、当該C末端アミノ酸伸長の外側のシステイン残基の還元よりも、当該C末端アミノ酸伸長中のシステイン残基のスルフヒドリル基を優先的（または偏向的）に還元することを含有する。1つの実施形態において、当該方法は、当該C末端アミノ酸伸長の外側のシステイン残基の還元よりも、当該C末端アミノ酸伸長中のシステイン残基のスルフヒドリル基を排他のに還元することを含む。30

**【 0 0 2 4 】**

本開示の態様には、抗体複合体を作製することが含まれる。当該方法は、システイン残基を含有するC末端アミノ酸伸長を含有する軽鎖ポリペプチドを含む抗体に、剤を結合させることを含み、当該剤は、当該C末端アミノ酸伸長のシステイン残基に結合されている。当該抗体複合体の作製方法はさらに、抗体に剤を結合させる前に、当該C末端アミノ酸伸長中のシステインのスルフヒドリル基を還元させることを含んでもよい。ある態様において、当該結合させることは、マレイミド化学反応、ハロアセチル化学反応、ビニルスルホン化学反応、またはピリジルジスルフィド化学反応を用いて、還元スルフヒドリル基に剤を架橋させることを含む。ある態様によると、当該C末端アミノ酸伸長のシステイン残基に結合された剤は、治療剤または標識剤である。1つの実施形態において、当該剤は、当該C末端アミノ酸伸長の外側のシステイン残基よりも、当該C末端アミノ酸伸長のシステイン残基に優先的に結合される。1つの実施形態において、当該剤は、当該C末端アミノ酸伸長の外側の任意のシステイン残基ではなく、当該C末端アミノ酸伸長のシステイン残基に結合される。40

**【 0 0 2 5 】**

ある態様において、当該C末端アミノ酸伸長は、2以上のシステイン残基を含有し、2以上の剤が当該C末端アミノ酸伸長の当該システイン残基に結合されている。当該抗体複50

合体を作製する方法はさらに、抗体に剤を結合させる前に、当該C末端アミノ酸伸長のシステイン残基のスルフヒドリル基を還元することを含んでもよい。ある態様において、当該結合することは、マレイミド化学反応、ハロアセチル化学反応、ビニルスルホン化学反応、またはピリジルジスルフィド化学反応を用いて、還元スルフヒドリル基に剤を架橋させることを含む。ある態様によると、当該C末端アミノ酸伸長のシステイン残基に結合された剤は、治療剤及び／または標識剤である。1つの実施形態において、当該剤は、当該C末端アミノ酸伸長の外側のシステイン残基よりも、当該C末端アミノ酸伸長中のシステイン残基に優先的に結合される。1つの実施形態において、当該剤は、当該C末端アミノ酸伸長の外側の任意のシステイン残基ではなく、当該C末端アミノ酸伸長のシステイン残基に結合される。

10

【図面の簡単な説明】

【0026】

【図1】本発明の1つの実施形態に従う、C末端軽鎖伸長を含有する抗体の概略図である。

【図2】本開示の1つの実施形態に従う複合体の概略図である。

【図3】本開示の実施形態に従う、2例の抗体複合体に関する、がん細胞活性データを示す。

【図4】パネルA及びBは、本開示のある実施形態に従う、非複合化抗体に対する抗体結合データを示す。

20

【図5】パネルA及びBは、本開示のある実施形態に従う、抗体-薬剤複合体に対する抗体結合データを示す。

【図6】本開示の1つの実施形態に従う、C末端軽鎖伸長を有する抗体に対する示差走査熱量測定法(DSC)のデータを示す。

【図7】本開示の1つの実施形態に従う、抗体へのAlexa 488結合を示すゲルの画像である。

【図8】本開示のある態様に従う、抗体または抗体複合体が投与されたマウスにおける、継時的なin vivo腫瘍体積変化を示す。

【図9】パネルA～Cは、本開示の1つの実施形態に従う、C末端軽鎖伸長を有する抗体(T-VLcys1)に対するサイズ排除クロマトグラフィー-質量分析法(SEC-MS)のデータを示す。

30

【図10】パネルA～Cは、本開示の1つの実施形態に従う、C末端軽鎖伸長を有する抗体(T-VLcys2)に対するSEC-MSデータを示す。

【図11】パネルA及びBは、本開示の1つの実施形態に従う、C末端軽鎖伸長を有する抗体(T-VLcys4)に対するSEC-MSデータを示す。

【図12】パネルA及びBは、本開示の1つの実施形態に従う、C末端軽鎖伸長を有する抗体(T-SP2)に対するSEC-MSデータを示す。

【図13】パネルA～Cは、本開示の1つの実施形態に従う、C末端軽鎖伸長を有する抗体(T-SP3)に対するSEC-MSデータを示す。

40

【図14】パネルA～Cは、本開示の1つの実施形態に従う、C末端軽鎖伸長を有する抗体(T-SP4)に対するSEC-MSデータを示す。

【図15】パネルA及びBは、本開示の1つの実施形態に従う、C末端軽鎖伸長を有する抗体(T-SP5)に対するSEC-MSデータを示す。

【図16】パネルA～Cは、本開示の1つの実施形態に従う、C末端軽鎖伸長を有する抗体(T-SP6)に対するSEC-MSデータを示す。

【図17】パネルA～Cは、本開示の1つの実施形態に従う、C末端軽鎖伸長を有する抗体(T-SP7)に対するSEC-MSデータを示す。

【図18】パネルA～Cは、本開示の1つの実施形態に従う、C末端軽鎖伸長を有する抗体(T-SP10)に対するSEC-MSデータを示す。

【図19】パネルA～Cは、本開示の1つの実施形態に従う、C末端軽鎖伸長を有する抗体(T-SP11)に対するSEC-MSデータを示す。

50

【図20】T s p 2 - Toxin 3に対する複合体反応産物のH I Cクロマトグラフを示す。平均薬剤担持量は、1.92であった。

【図21】T s p 3 - Toxin 3に対する複合体反応産物のH I Cクロマトグラフを示す。平均薬剤担持量は、1.12であった。

【図22】T s p 4 - Toxin 3に対する複合体反応産物のH I Cクロマトグラフを示す。平均薬剤担持量は、1.16であった。

【図23】T s p 5 - Toxin 3に対する複合体反応産物のH I Cクロマトグラフを示す。平均薬剤担持量は、1.46であった。

【図24】T s p 6 - Toxin 3に対する複合体反応産物のH I Cクロマトグラフを示す。平均薬剤担持量は、0.98であった。

【図25】T s p 9 - Toxin 3に対する複合体反応産物のH I Cクロマトグラフを示す。平均薬剤担持量は、1.64であった。

【図26】T s p 10 - Toxin 3(ラージスケール)に対する複合体反応産物のH I Cクロマトグラフを示す。平均薬剤担持量は、2.0であった。

【図27】T s p 11 - Toxin 3に対する複合体反応産物のH I Cクロマトグラフを示す。平均薬剤担持量は、2.66であった。

【図28】T V L C y s 1 - Toxin 3に対する複合体反応産物のH I Cクロマトグラフを示す。平均薬剤担持量は、2.66であった。

【図29】T V L C y s 2 - Toxin 3に対する複合体反応産物のH I Cクロマトグラフを示す。平均薬剤担持量は、0.22であった。

【図30】T V L C y s 4 - Toxin 3に対する複合体反応産物のH I Cクロマトグラフを示す。平均薬剤担持量は、0.70であった。

【図31】T s p 10 - Toxin 3(ラージスケール)に対する複合体反応産物のH I Cクロマトグラフを示す。平均薬剤担持量は、2.12であった。

【図32】T s p 10 - Toxin 4(ラージスケール)に対する複合体反応産物のH I Cクロマトグラフを示す。平均薬剤担持量は、3.76であり、平均付加は1.88であった。

【図33】T s p 10 - Toxin 1(ラージスケール)に対する複合体反応産物のH I Cクロマトグラフを示す。平均薬剤担持量は、1.94であった。

【図34】T s p 4 - Toxin 3(ラージスケール)に対する複合体反応産物のH I Cクロマトグラフを示す。平均薬剤担持量は、2.46であった。

【図35】T s p 6 - Toxin 3(ラージスケール)に対する複合体反応産物のH I Cクロマトグラフを示す。平均薬剤担持量は、1.82であった。

【図36】T - Toxin 3に対する複合体反応産物のH I Cクロマトグラフを示す。平均薬剤担持量は、0.16であった。

【図37】B s p 10 - M C v c P A B C - M M A Eに対する複合体反応産物のH I Cクロマトグラフを示し、「B」は、ブレンツキシマブ抗CD30抗体に対する略語である。平均薬剤担持量は、2.12であった。

【図38】B s p 10 - Toxin 4に対する複合体反応産物のH I Cクロマトグラフを示す。平均薬剤担持量は、1.96であった。

【図39】B s p 10 - Toxin 5に対する複合体反応産物のH I Cクロマトグラフを示す。平均薬剤担持量は、2.18であった。

【図40】B s p 10 - Toxin 3に対する複合体反応産物のH I Cクロマトグラフを示す。平均薬剤担持量は、1.98であった。

【図41】B s p 10 - Toxin 6に対する複合体反応産物のH I Cクロマトグラフを示す。平均薬剤担持量は、1.87であった。

【図42】T s p 4 - Toxin 3、T s p 3 - Toxin 3、T s p 2 - Toxin 3、及びフリー-Toxin 1で処置されたHe r 2発現H C C 1 9 5 4細胞を用いた、in vitro細胞増殖アッセイの結果のプロットを示す。

【図43】T s p 5 - Toxin 3、T s p 6 - Toxin 3、T s p 9 - Toxin 3

10

20

30

40

50

、及びフリー-Toxin 1で処置されたHer 2発現HCC1954細胞を用いた、in vitro細胞増殖アッセイの結果のプロットを示す。

【図44】Tsp10-Toxin3、Tsp11-Toxin3、TVLCys1-Toxin3、及びフリー-Toxin1で処置されたHer 2発現HCC1954細胞を用いた、in vitro細胞増殖アッセイの結果のプロットを示す。

【図45】Tsp4-Toxin3、Tsp3-Toxin3、Tsp2-Toxin3、及びフリー-Toxin1で処置されたHER 2抗原陰性Jurkat細胞を用いた、in vitro細胞増殖アッセイの結果のプロットを示す。

【図46】Tsp5-Toxin3、Tsp6-Toxin3、Tsp9-Toxin3、及びフリー-Toxin1で処置されたHER 2抗原陰性Jurkat細胞を用いた、in vitro細胞増殖アッセイの結果のプロットを示す。  
10

【図47】Tsp10-Toxin3、Tsp11-Toxin3、TVLCys1-Toxin3、及びフリー-Toxin1で処置されたHER 2抗原陽性HCC1954細胞を用いた、in vitro細胞増殖アッセイの結果のプロットを示す。

【図48】Tsp10-Toxin3、Tsp11-Toxin3、TVLCys1-Toxin3、及びフリー-Toxin1で処置されたHER 2抗原陰性Jurkat細胞を用いた、in vitro細胞増殖アッセイの結果のプロットを示す。

【図49】Tsp10-Toxin3、Tsp11-Toxin3、及びTVLCys1-Toxin3で処置されたHER 2抗原陽性N87細胞を用いた、in vitro細胞増殖アッセイの結果のプロットを示す。  
20

【図50】Tsp10-Toxin1、及びTsp10-Toxin4で処置されたHER 2抗原陽性N87細胞を用いた、in vitro細胞増殖アッセイの結果のプロットを示す。

【図51】Tsp10-Toxin1、及びTsp10-Toxin4で処置されたHER 2抗原陰性Jurkat細胞を用いた、in vitro細胞増殖アッセイの結果のプロットを示す。

【図52】Tsp5-Toxin3、Tsp6-Toxin3、及びTsp9-Toxin3で処置されたHER 2抗原陽性N87細胞を用いた、in vitro細胞増殖アッセイの結果のプロットを示す。

【図53】Tsp2-Toxin3、Tsp3-Toxin3、及びTsp4-Toxin3で処置されたHER 2抗原陽性N87細胞を用いた、in vitro細胞増殖アッセイの結果のプロットを示す。  
30

【図54】ブレンツキシマブ、及びBsp10で処置されたCD30抗原陽性Karpas299細胞を用いた、in vitro細胞増殖アッセイの結果のプロットを示す。

【図55】Bsp10-Toxin5で処置されたCD30抗原陽性Karpas299細胞を用いた、in vitro細胞増殖アッセイの結果のプロットを示す。

【図56】Bsp10-Toxin3、及びBsp10-Toxin4で処置されたCD30抗原陽性Karpas299細胞を用いた、in vitro細胞増殖アッセイの結果のプロットを示す。

【図57】Bsp10-Toxin6で処置されたCD30抗原陽性Karpas299細胞を用いた、in vitro細胞増殖アッセイの結果のプロットを示す。  
40

【図58】Bsp10-MCvCPABC-MMAEで処置されたCD30抗原陽性Karpas299細胞を用いた、in vitro細胞増殖アッセイの結果のプロットを示す。

【図59】固相化タンパク質上での精製後のトラスツズマブ軽鎖伸長変異体の非還元変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動(PAGE)を示すゲル画像である。左から右へ、レーン1～12：分子サイズマーカー；TSp2；TSp3；TSp4；TSp5；TSp6；TSp9；TSp10；TSp11；TVLCys1；TVLCys2；TVLCys4。レーン1のサイズマーカーラダーは、元のタンパク質が約150kDaであることを示す。  
50

【図60】トラスツズマブ軽鎖伸長変異体の還元(+DTT)変性PAGEを示すゲル画像である。左から右へ、レーン1～12：分子サイズマーカー；TSp2；TSp3；TSp4；TSp5；TSp6；TSp9；TSp10；TSp11；TVLCys1；TVLCys2；TVLCys4。レーン1のサイズマーカーラダーは、還元タンパク質が約50kDaの重鎖断片及び約25kDaの軽鎖断片を含有することを示す。

【図61】トラスツズマブ軽鎖伸長抗体薬剤複合体の非還元変性PAGEを示すゲル画像である。左から右へ、レーン1～12：分子サイズマーカー；TSp2-Toxin3(DAR1.92)；TSp3-Toxin3(DAR1.88)；TSp4-Toxin3(DAR2.06)；TSp5-Toxin3(DAR1.46)；TSp6-Toxin3(DAR1.80)；TSp9-Toxin3(DAR1.32)；TSp10-Toxin3(DAR2.12)；TSp10-Toxin4(DAR1.66)；TSp10-Toxin1(DAR2.04)；TSp11-Toxin3(DAR2.02)；TVLCys1-Toxin3(DAR1.06)。 10

【図62】トラスツズマブ軽鎖伸長抗体薬剤複合体の還元(+DTT)変性PAGEを示すゲル画像である。左から右へ、レーン1～12：分子サイズマーカー；TSp2-Toxin3(DAR1.92)；TSp3-Toxin3(DAR1.88)；TSp4-Toxin3(DAR2.06)；TSp5-Toxin3(DAR1.46)；TSp6-Toxin3(DAR1.80)；TSp9-Toxin3(DAR1.32)；TSp10-Toxin3(DAR2.12)；TSp10-MP-Toxin4(DAR1.66)；TSp10-Toxin1(DAR2.04)；TSp11-Toxin3(DAR2.02)；TVLCys1-Toxin3(DAR1.06)。 20

【図63】熱安定性試験を用いて測定されたトラスツズマブ軽鎖伸長抗体薬剤複合体の安定性データを示す。

#### 【発明を実施するための形態】

##### 【0027】

発明者らは、抗体軽鎖間の構造的差異、及び抗体安定性に対するその影響を評価し、抗体軽鎖のC末端にアミノ酸を付加することにより、不安定化するという効果があることを見出した(Shen et al., mAbs 5:3, 418-431, 2013)。他者らも、多特異抗体を作製するための、IgG軽鎖のC末端への單一ドメインタンパク質スキャホールドとscFvの連結は、軽鎖 重鎖のジスルフィド結合を不安定化させ、それにより部分的にアセンブリされたIgG融合分子が増加すると報告している(Orcutt et al., Prot. Eng. Des. Sel., 23:221-228, 2010; Spangler et al., J. Mol. Biol., 422:532-544, 2012)。さらに、溶媒のペイロード付加部分へのアクセスのし易さは、ADCの安定性に影響を与えることが報告されている(Shen et al., Nat. Biotech., 30:184-189, 2012)。これら報告とは逆に、本発明は、C末端アミノ酸伸長(本明細書において「ペイロードアダプター」とも呼称される)が、その伸長部分として抗体軽鎖C末端に共有結合されることにより、ペイロードに対する安定した付加点をもたらし、それにより安定で、抗原に対するアフィニティを保持した抗体ペイロード複合体が得られるという驚くべき発見に一部基づくものである。 30 40

##### 【0028】

従って、本開示により、C末端アミノ酸伸長を含有する抗体軽鎖ポリペプチド、ならびにそのような改変軽鎖ポリペプチドを含有する抗体及び抗体複合体が提示され、当該C末端伸長は、1以上のシステイン残基を含有している。当該C末端アミノ酸伸長のシステイン残基を介して剤に結合された本開示抗体を含む複合体もまた開示される。本開示はさらに、システイン残基を含有するC末端アミノ酸伸長を含む抗体軽鎖ポリペプチドをコードする核酸を提示するものである。本開示抗体または複合体を含有する医薬組成物もまた提示され、ならびに本開示の改変抗体及び複合体を作製する方法及び使用する方法も提示される。 50

**【 0 0 2 9 】**

本開示の抗体、複合体、核酸、医薬組成物、及び方法を詳細に記述する前に、本開示の当該態様は、記述される特定の実施形態に限定されるものではなく、もちろん、変化しうるものであることを理解されたい。また、本明細書に用いられている専門用語は特定の実施形態を記述する目的のためのみであり、限定の意図はなく、本開示の抗体、複合体、核酸、医薬組成物及び方法の範囲は、添付のクレームにのみ定義されるものである。

**【 0 0 3 0 】**

値の範囲が開示されている場合、他で明確に述べられない限り、当該範囲の上限値と下限値の間にある各値、及び当該記述された範囲の他の記述された値または間にある値は、下限値の単位の 10 分の 1 まで、本発明抗体、複合体、核酸、医薬組成物、及び方法内に包含される。これら小範囲の上限値及び下限値は、当該小範囲に独立して含まれ得、及び本抗体、複合体、核酸、医薬組成物及び方法内に包含され、当該記述された範囲の任意の具体的な除外限界値に供される。当該記述される範囲が 1 つ、または両方の限界値を含有する場合、それら含有される限界値のいずれか、または両方を除外する範囲もまた本抗体、複合体、核酸、医薬組成物及び方法に含まれる。

10

**【 0 0 3 1 】**

本明細書において、ある範囲は、「約」という用語が先行する数値を用いて表される。「約」という用語は、本明細書において、それが先行するまさにその数値、ならびに当該用語が先行する数値の近似または前後の数値に対する文言上の支持を与えるために用いられる。数値が具体的に列記された数値の近似または前後のいずれであるかを決定するなかで、それが表された文脈において、近似または前後の列記されていない数値は、具体的に列記された数値と実質的な同等性を備える数値でありうる。

20

**【 0 0 3 2 】**

他で定義されない限り、本明細書において用いられるすべての技術用語及び科学用語は、本抗体、複合体、核酸、医薬組成物及び本方法が属する分野の当業者により普遍的に理解されるものと同じ意味を有する。本明細書に記載されるものと類似または同等の任意の抗体、複合体、核酸、医薬組成物及び方法もまた、本抗体、複合体、核酸、医薬組成物、及び方法の実施または検証に用いることができるが、本明細書では代表的な実例のための抗体、複合体、核酸、医薬組成物及び方法が記載されている。

30

**【 0 0 3 3 】**

本明細書において引用されるすべての公表文献及び特許は、個々の各公表物または特許が具体的に、及びここに参照により援用されると示されるように、参照により本明細書に援用され、及び当該公表物が引用された事物と関連し、当該方法及び / または物質を開示ならびに記述するために、参照により本明細書に援用される。任意の公表物の引用は、出願日の前のその開示を目的としており、当該公表物が先行するために、先行発明を理由として、本発明方法が権利を与えられないことに承認を与えるとはみなされない。さらに、提示される公表日は、実際の公表日とは異なっている可能性があり、個々に確認を行う必要がある。

**【 0 0 3 4 】**

本明細書及び添付のクレームにおいて、単数形の「ひとつ ( a ) 」、「(an)」及び「当該 ( t h e ) 」は、文脈において異なることを明確に指定されない限り、複数の指示対象を含むことに注意されたい。たとえば、本明細書において、「システインを含有する」 C 末端アミノ酸伸長、または「システイン含有」と記述される C 末端アミノ酸伸長は、複数のシステイン残基を含有しうる（すなわち、当該伸長は、少なくとも 1 つのシステインを含有する）。さらに、クレームは、任意の選択的な構成要素を除外するよう起草されうる。そのため当該記述は、たとえば、クレーム構成要素の列挙と関連し、「唯一」、「のみ」といった排他的な用語の使用の先行詞として、または「負の」限定の使用の先行詞として用いられることが意図される。

40

**【 0 0 3 5 】**

抗体、複合体、核酸、医薬組成物及び方法のある特性は、明確性を目的とし、別々の実

50

施形態に関連して記述され、また1つの実施形態において組み合わせて提示されうる。逆に、抗体、複合体、核酸、医薬組成物及び方法の様々な特性が、簡潔性を目的とし、1つの実施形態において記述され、また別々に提示され、もしくは任意の適切な別の組み合わせで提示されうる。実施形態のすべての組み合わせは、本発明により具体的に包含され、ならびに各組合せ及び全ての組み合わせが個々に、及び明白に開示されているように、当該組合せが操作可能な抗体、複合体、核酸、医薬組成物及び方法を包含する範囲内で、本明細書に開示される。さらに、そのような可変性を記述する実施形態に列記されている全ての別の組み合わせもまた、本発明抗体、複合体、核酸、医薬組成物、及び方法に具体的に包含され、そのような別の組み合わせの各組合せ、及び全ての組み合わせが個々に及び明白に本明細書に開示されるように本明細書に開示される。

10

#### 【0036】

当業者には本開示を読み取ることで明白であるが、本明細書に記述され、解説される個々の実施形態の各々は、本発明抗体、複合体、核酸、医薬組成物及び方法の範囲または主旨から逸脱することなく、いくつかの他の実施形態の任意の特性から容易に分離される、または組み合わされる個々の構成要素及び特性を有している。任意の列記された方法は、列記された事象の順序で、または論理的に可能な任意の他の順序で、実施することができる。

#### 【0037】

##### 定義

「抗体」及び「イムノグロブリン」という用語は、任意のアイソタイプの抗体またはイムノグロブリンである、完全抗体（たとえば、テトラマーから構成される抗体であり、当該テトラマーは同様に重鎖ポリペプチドと軽鎖ポリペプチドの2つのヘテロダイマーから構成され、完全IgG、IgA、IgD、IgEまたはIgM抗体を含む）；半抗体（たとえば、重鎖ポリペプチドと軽鎖ポリペプチドの1つの二量体を含む抗体）；限定されないが、Fab、F(ab')2、Fab'、Fv、scFv、二特異性抗体、及びダイアボディを含む、対象抗原への特異的結合を保持している抗体断片（たとえば、IgG、IgA、IgD、IgEまたはIgM抗体等の完全抗体の断片）；キメラ抗体；モノクローナル抗体；ヒト化抗体（たとえば、ヒト化モノクローナル抗体、またはヒト化抗体断片）；または完全なヒト抗体（ヒトイムノグロブリンタンパク質配列のみを含有する抗体）を含む。また、体細胞変異ならびに／またはV-D-J再構成の結果としてN末端オチドもしくはP末端オチドの付加及び欠失を含むヒトモノクローナル抗体が含まれる。また、合成配列がCDRに挿入されているヒト抗体が含まれる（たとえば、Miersch S & Sidhu SS (2012) Synthetic antibodies: concepts, potential and practical considerations. Methods 57(4):486-98；及びKnappik et al. (2000) Fully synthetic human combinatorial antibody libraries (HuCAL) based on modular consensus frameworks and CDRs randomized with trinucleotides. J. Mol. Biol. 296(1):57-86）を参照のこと）。ある態様において、本開示抗体は、IgG（たとえば、IgG1、IgG2、IgG3またはIgG4抗体）、Fab、F(ab')2、及びFab'から選択される。

20

30

40

#### 【0038】

抗体のパパイン消化により、2つの同一な抗原結合断片（いわゆる「Fab」断片）が得られ、各々、1つの抗原結合部位を有しており、残りの「Fc」断片は、容易に結晶化する能力を意味する。ペプシン処置により、2つの抗原結合部位を有し、さらに抗原に架橋する能力を保持しているF(ab')2断片が产生される。

#### 【0039】

「Fv」は、完全な抗原認識部位及び抗原結合部位を有する最小の抗体断片を含む。この領域は、緊密な非共有結合の1つの重鎖可変ドメインと1つの軽鎖可変ドメインの二量

50

体からなる。この構成において、各可変ドメインの3つのCDRは、相互作用し、V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub>二量体表面上の抗原結合部位を規定する。合わせて、6つのCDRにより、抗原結合の特異性が抗体に与えられる。しかしながら、全結合部位よりもアフィニティは低いが、1つの可変ドメイン（または抗原特異的な3つのCDRのみを含有するFvの半分）であっても、抗原を認識し、結合する能力はある。

#### 【0040】

また、「Fab」断片は、軽鎖定常ドメイン及び重鎖の第一定常ドメイン（CH<sub>1</sub>）を含有する。Fab断片は、抗体ヒンジ領域由来の1以上のシステインを含有する、重鎖CH<sub>1</sub>ドメインのカルボキシ末端での数残基の付加により、Fab'断片とは異なっている。Fab' SHとは、本明細書において、定常ドメインのシステイン残基（複数含む）が遊離チオール基を保有しているFab'を表すものである。F(ab')<sub>2</sub>抗体断片は、対の間にヒンジシステインを有するFab'断片対として元々作製された。他の抗体断片の化学的結合もまた公知である。10

#### 【0041】

「一本鎖Fv」または「sFv」抗体断片は、抗体のV<sub>H</sub>及びV<sub>L</sub>ドメインを含有し、これらドメインは、1つのポリペプチド鎖中に存在する。一部の実施形態において、Fvポリペプチドはさらに、V<sub>H</sub>ドメインとV<sub>L</sub>ドメインの間にポリペプチドリンカーを含有し、それにより、sFvは、抗原結合に望ましい構造を形成することができる。

#### 【0042】

「ダイアボディ」という用語は、2つの抗原結合部位を有する小さな抗体断片を指し、それら断片は、同じポリペプチド鎖（V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub>）中で、軽鎖可変ドメイン（V<sub>L</sub>）に連結された重鎖可変ドメイン（V<sub>H</sub>）を含有する。同一鎖上で2つのドメインの間に対を形成するには短すぎるリンカーを用いることにより、当該ドメインは、他の鎖の相補性ドメインと対を形成することを余儀なくされ、2つの抗原結合部位が形成される。20

#### 【0043】

本明細書において、「軽鎖ポリペプチド」とは、少なくとも抗体軽鎖可変領域（V<sub>L</sub>）を有しているポリペプチドを指す。軽鎖ポリペプチドは、部分的な、または全長の抗体軽鎖定常領域（C<sub>L</sub>）を含有していてもよい。「全長軽鎖ポリペプチド」は、全長軽鎖可変領域（V<sub>L</sub>）と全長軽鎖定常領域（C<sub>L</sub>）を含有する。軽鎖ポリペプチドは、任意の脊椎動物種（たとえば、ヒト、げっ歯類等の哺乳類）由来であってもよい。30

#### 【0044】

本明細書において、「重鎖ポリペプチド」または「重鎖」とは、少なくとも抗体重鎖可変領域（V<sub>H</sub>）を有するポリペプチドを指す。重鎖ポリペプチドは、CH<sub>1</sub>、CH<sub>2</sub>及びCH<sub>3</sub>ドメインを含有する抗体重鎖定常領域を部分的または全長で含有してもよい。「全長重鎖ポリペプチド」は、全長重鎖可変領域（V<sub>L</sub>）と全長重鎖定常領域（C<sub>H</sub>）を含有する。任意の脊椎動物種（たとえば、げっ歯類、ヒト等の哺乳類）由来の抗体（イムノグロブリン）及び任意のクラスのイムノグロブリンの重鎖ポリペプチドが包含される。重鎖ポリペプチド、及び当該重鎖ポリペプチドを含有する抗体は、当該重鎖ポリペプチドの定常ドメインのアミノ酸配列に基づいてクラスに分類される。イムノグロブリンの5つの主要なクラスが存在する：IgA、IgD、IgE、IgG及びIgM。そしてこれらのうちいくつかは、サブクラス（アイソタイプ）にさらに分けられてもよい（たとえば、IgG<sub>1</sub>、IgG<sub>2</sub>、IgG<sub>3</sub>、IgG<sub>4</sub>、IgA<sub>1</sub>及びIgA<sub>2</sub>）。40

#### 【0045】

本明細書において、「組み換え」抗体という用語は、組み換え手法により作製され、発現され、生成され、または単離されるすべての抗体を含むことが意図され、たとえば、（i）宿主細胞にトランスフェクトされた組み換え発現ベクターを用いて発現された抗体；（ii）組み換えコンビナトリアル抗体ライブラリから単離された抗体；（iii）ヒトイムノグロブリンに関しトランスジェニックである動物（たとえばマウス）から単離された抗体；または（iv）他のDNA配列へのヒトイムノグロブリン遺伝子配列のスプライシングを含む任意の他の手段（たとえば、in vitro翻訳銀術に関しては、Yin

10

20

30

40

50

et al. (2012) *A glycosylated antibodies and antibody fragments produced in a scalable in vitro transcription-translation system*, Landes Bioscience, Volume 4, Issue 2 を参照のこと)により作製され、発現され、生成され、または単離された抗体、が挙げられる。そのような組み換え抗体は、ヒト化、CDR移植、キメラ、脱免疫化(deimmunized)、及びin vitro作製抗体を含み；及び任意選択的に、ヒト生殖細胞イムノグロブリン配列由来の定常領域を含有してもよい。

## 【0046】

「ヒト化抗体」という用語は、イムノグロブリン、半抗体、イムノグロブリン鎖(たとえば軽鎖ポリペプチド)、またはそれらの断片(たとえばFv、scFv、Fab、Fab'、Fc(ab')2、または抗体の他の抗原結合部分配列)を指し、それらは最小限の非ヒトイムノグロブリン由来の配列を含有する。ヒト化抗体は、レシピエントの相補性決定領域(CDR)由来の残基が、所望される特異性、アフィニティ、及び能力を有する、非ヒト種(たとえばマウス、ラット、リャマ、ラクダ、またはウサギ)のCDRの残基(ドナー抗体)により置換されているヒトイムノグロブリン(レシピエント抗体)であってもよい。一部の例において、ヒトイムノグロブリンのFvフレームワーク残基は、対応する非ヒトの残基と置換されている。さらに、ヒト化抗体は、レシピエント抗体または輸入CDRもしくはフレームワーク配列のいずれにも存在しない残基を含有してもよい。

## 【0047】

ヒト軽鎖ポリペプチドは、通常、カッパ軽鎖及びラムダ軽鎖に分類される。さらにヒト重鎖ポリペプチドは、通常、ミュー、デルタ、ガンマ、アルファ、またはイプシロンと分類され、それぞれ、IgM、IgD、IgG、IgA、及びIgEとして抗体アイソタイプが規定される。軽鎖及び重鎖内で、可変領域と定常領域が、約12アミノ酸以上の「J」領域により連結され、当該重鎖はまた、約10アミノ酸以上の「D」領域を含有する。

## 【0048】

「治療すること」、「治療する」、または「治療」とは、疾患もしくは障害及び／またはその付随する症状を緩和または消失させることを意味する。本明細書において、疾患または障害を「緩和する」とは、当該疾患もしくは障害の症状の重症度及び／または発生頻度を低減させることを意味する。本明細書において、「治療すること」、「治療する」、または「治療」という言及は、治癒的、緩和的及び予防的処置への言及を含むことを理解されたい。

## 【0049】

「治療有効量」または「有効量」とは、所望される結果を得るために十分な投与量を意味する(たとえば、対照と比較し、疾患(たとえば、癌または任意の他の対象疾患)の症状の低減等の有益または所望される治療(予防を含む)結果をもたらすために十分な量)。「治療有効量」は、抗体または複合体、疾患及びその重症度、ならびに治療される患者の年齢、体重等により変化する。

## 【0050】

C末端伸長(「ペイロードアダプター」)を有する軽鎖ポリペプチド  
1つの態様において、本明細書は、抗体へのペイロード付加のためのペイロードアダプター(本明細書において、「C末端アミノ酸伸長」または「C末端伸長」とも呼称される)、ならびに当該ペイロードアダプターを含有する抗体を提示する。

## 【0051】

本発明のペイロードアダプターは、ペイロードの共有結合のための基質として利用されるタンパク質モジュールであり、各ペイロードアダプターは抗体のC末端伸長を構成し、それにより1以上のペイロードが抗体に連結される。ペイロードアダプターは、ペイロード付加のためのシステイン残基を少なくとも1つ含有する。

## 【0052】

本発明のペイロードアダプターは、抗体軽鎖のC末端伸長として発現されることができ

10

20

30

30

40

50

、及び適切な化学物質を使用して広範なペイロードに共有結合することができ、それによりペイロード及びペイロードアダプターを含有する抗体は安定性を示し、抗原に対するアフィニティを保持する。

#### 【0053】

1つの実施形態において、本発明のペイロードアダプターを含有する抗体は、その天然型抗体配列内にシステイン置換を含有しておらず、それらは別の方法で、軽鎖のC末端にポリペプチドを付加するための代償的ジスルフィド結合をもたらすために導入される。ゆえに、1つの実施形態において、本発明のペイロードアダプターを含有する抗体は、元の抗体中に存在するすべてのシステイン残基を含有する。1つの実施形態において、ペイロードアダプターは、分子内ジスルフィド結合を形成しない複数のシステイン残基を含有し、または他のペイロードアダプターとジスルフィド結合を形成しない複数のシステイン残基を含有する。

#### 【0054】

1つの実施形態において、ペイロードアダプターは、抗原に特異的に結合しない。1つの実施形態において、ペイロードアダプターは、本発明の抗体または抗体複合体に対するエピトープ結合活性に寄与しない。当該実施形態において、本発明の抗体及び抗体複合体による抗原結合は、ペイロードアダプター以外の要素により決定される。1つの実施形態において、ペイロードアダプターは、成長因子受容体（たとえばEGF受容体）のリガンド結合ドメインを含有しない。他の実施形態において、ペイロードアダプターは、成長因子受容体のリガンドを含有しない（たとえばEGF受容体のリガンドを含有しない）。

#### 【0055】

より具体的には、上述されるように、本発明により、1以上のシステイン残基を有するC末端伸長を有する軽鎖ポリペプチド、及び当該改変軽鎖ポリペプチドを少なくとも1つを有する抗体が開示される。C末端伸長を有する軽鎖ポリペプチドは、任意のタイプの軽鎖ポリペプチド（たとえば、ラムダ（ $\lambda$ ）またはカッパ（ $\kappa$ ）軽鎖ポリペプチド）のアミノ酸配列を含有してもよく、及び任意の対象（たとえば、げっ歯類、ヒト等の哺乳類等の任意の脊椎動物）起源の軽鎖ポリペプチドのアミノ酸配列を含有してもよい。

#### 【0056】

「C末端軽鎖ポリペプチド伸長」、「C末端軽鎖アミノ酸伸長」、「C末端伸長」、「ペイロードアダプター」という用語、及びそれらの均等物は、本明細書において、当該伸長が無い元の軽鎖ポリペプチドにおいて異なる様式でC末端残基を構成する軽鎖ポリペプチド残基に対しC末端に位置付けられたアミノ酸（たとえばシステイン）または2以上のアミノ酸の連続した配列を指すために用いられる。

#### 【0057】

ある態様において、元の軽鎖ポリペプチドは、軽鎖可変領域( $V_L$ )のみを含有し（たとえば、当該元の抗体は、ScFvであってもよい）、それにより当該伸長は、元の軽鎖ポリペプチドの $V_L$ のC末端を別の様式で構成する残基に対してC末端である（たとえば、当該残基から伸長する）。他の態様において、元の軽鎖ポリペプチドは、軽鎖可変領域( $V_L$ )及び軽鎖定常領域( $C_L$ )の一部を含有し、それにより当該伸長は、元の軽鎖ポリペプチドの部分 $C_L$ のC末端を別の様式で構成する残基に対しC末端である（たとえば、当該残基から伸長する）。

#### 【0058】

ある実施形態によると、元の軽鎖ポリペプチドは、全長軽鎖可変領域( $V_L$ )及び全長軽鎖定常領域( $C_L$ )を含有する全長軽鎖ポリペプチドであり、それにより、当該伸長は、元の軽鎖ポリペプチドで、全長 $C_L$ のC末端を別の様式で構成する残基に対し、C末端である（たとえば、当該残基から伸長する）。1つの実施形態に従うと、当該伸長のN末端部分は、元の全長軽鎖ポリペプチドに別の様式で存在する配列の少なくとも一部を含有し、それにより、元の軽鎖ポリペプチドのC末端の伸長は、「伸長」の一部として、「付加戻し「adding back」の親配列を含有する。

#### 【0059】

10

20

30

40

50

一部の実施形態に従うと、元の軽鎖ポリペプチドは、野生型の全長軽鎖ポリペプチドのC末端に通常存在する末端システインの欠失を含有し、それにより、当該軽鎖伸長は、当該C末端システインが欠失した位置に対してすぐN末端側の残基に対しC末端である（たとえば、当該残基から伸長する）。1つの実施形態において、元の軽鎖ポリペプチドは、野生型全長軽鎖ポリペプチドのC末端に通常存在する末端システインの置換を含有する。

#### 【0060】

ある態様において、元の抗体は、断片化重鎖ポリペプチド（たとえば、重鎖可変領域( $V_H$ )のみを含有する重鎖ポリペプチド、または重鎖可変領域( $V_H$ )と重鎖定常領域( $C_H$ )の一部を含有する重鎖ポリペプチド）を有する。これらの態様に従うと、C末端軽鎖ポリペプチド伸長は、重鎖ポリペプチド配列と（断片化によって）対を形成していない天然型（たとえば野生型）軽鎖ポリペプチド配列を含有してもよい。1つの実施形態に従うと、そのようなC末端軽鎖ポリペプチド伸長はさらに、1以上の非天然型アミノ酸（たとえば、元の軽鎖ポリペプチドには存在していない1以上のシステイン）を含有してもよく、ある態様においては、2以上のアミノ酸の非天然型配列であってもよい。

10

#### 【0061】

ある態様において、本発明は、システイン残基を含有するC末端アミノ酸伸長を含有する軽鎖ポリペプチドを含有する抗体を開示する。

#### 【0062】

一部の実施形態において、本発明により、システイン残基を含有するC末端アミノ酸伸長を含有する軽鎖ポリペプチドを含有する抗体が開示され、当該C末端アミノ酸伸長は、抗原に特異的に結合しない（たとえば、当該伸長は、抗体の抗原結合部分を含有しないか、または抗体断片の抗原結合部分を含有しない）。

20

#### 【0063】

ある態様において、本発明は、少なくとも1つのモノエピトープ性抗原結合二量体を含有する抗体を開示し、当該モノエピトープ性抗原結合二量体は、重鎖ポリペプチド、及びC末端アミノ酸伸長を含有する軽鎖ポリペプチドを含有し、当該伸長は、システイン残基を含有する。当該2つのモノエピトープ性二量体の各々は、同じエピトープに結合してもよい。他の態様において、当該2つのモノエピトープ性二量体の各々は、異なるエピトープに結合する。

#### 【0064】

30

本明細書において、「モノエピトープ性抗原結合ドメイン」は、重鎖ポリペプチドのCDRと軽鎖ポリペプチドのCDRの相互作用により形成される抗原結合ドメインを示す。「モノエピトープ性抗原結合ドメイン」は、たとえば、重鎖ポリペプチドと軽鎖ポリペプチドを含有する二量体により定義されてもよく、または一本鎖抗体(ScFv)の場合には、重鎖ポリペプチドと軽鎖ポリペプチドを含有するモノマー融合タンパク質により定義されてもよい。ゆえに、軽鎖C末端アミノ酸伸長を含有するモノエピトープ性抗原結合ドメインにおいて、当該軽鎖ポリペプチドのアミノ酸伸長は、抗原に特異的に結合しない。本発明の抗体は、同じ、または異なるモノエピトープ性抗原結合二量体を含有する抗体を含む。たとえば、ヘテロ二量体の二量体（すなわち、四量体）を含有する抗体は、以下を含有してもよい：1)重鎖ポリペプチドと軽鎖ポリペプチドを含有する第一のモノエピトープ性抗原結合ドメイン、及び重鎖ポリペプチドと軽鎖ポリペプチドを含有する第二のモノエピトープ性抗原結合ドメインであって、当該軽鎖ポリペプチドのうちの1つ、または両方が、C末端アミノ酸伸長を含有し、及び当該第一及び第二のモノエピトープ性抗原結合ドメインは、同じエピトープに結合する；または2)第一及び第二のモノエピトープ性抗原結合ドメインであって、当該ドメインの軽鎖ポリペプチドのうちの1つまたは両方が、C末端アミノ酸伸長を含有し、当該第一のモノエピトープ性抗原結合ドメインの抗原結合領域は、当該第二のモノエピトープ性抗原結合ドメインにより結合されるエピトープとは異なるエピトープに結合する。

40

#### 【0065】

C末端伸長は、任意の所望の長さであってもよい。ある実施形態によると、当該伸長は

50

、1～200アミノ酸、1～150アミノ酸、1～100アミノ酸、1～75アミノ酸、1～50アミノ酸、1～25アミノ酸、1～20アミノ酸、1～15アミノ酸、1～10アミノ酸、または1～5アミノ酸の長さであり、及び5～200アミノ酸、5～150アミノ酸、5～100アミノ酸、5～75アミノ酸、5～50アミノ酸、5～25アミノ酸、5～20アミノ酸、5～15アミノ酸、または5～10アミノ酸の長さであってもよい。ある態様において、当該伸長は、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、または30アミノ酸の長さである。

#### 【0066】

当該C末端伸長は、たとえば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または20システイン等の、任意の所望される数のシステインを含有してもよい。一部の実施形態においてC末端伸長は、少なくとも、2、3、4、5またはそれ以上のシステインを含有する。一部の実施形態において、C末端伸長は、2、3、4、5、6、7、8、9または10未満のシステインを含有する。ある態様において、当該伸長は、1～5のシステイン、6～10のシステイン、11～15のシステイン、または16～20のシステインを含有する。

#### 【0067】

ある実施形態によると、当該C末端伸長は、2以上の連続したシステインを含有する。たとえば、当該伸長は、2つの隣接したシステインを含有してもよく、当該2つの隣接したシステインは、当該2つの隣接したシステインに対してN末端及びC末端の非システイン含有スペーサー配列を有している。当該C末端伸長に連続したシステイン（たとえば、2つの隣接したシステイン）を有しているため、たとえば、結合または標識戦略に金属キレート化を含有する場合等、結合または標識戦略に「架橋」が関与する場合の用途が見いだされる（たとえば、あるジハロマレイミド化学結合等の場合）。ある態様において、本発明により、剤（たとえば、薬剤または標識剤）が複数の連続したシステイン（たとえば、2つの隣接したシステイン）に、直接または1以上のリンカーを介して付加されている複合体、及び当該複合体の作製方法が開示される。

#### 【0068】

1つの実施形態においては、当該C末端伸長は、元の軽鎖末端システインとともに使用された際に、上述の用途が見いだされる2つの連続したシステインをもたらすN末端システインを含有する。

#### 【0069】

ある態様において、本発明により、剤（たとえば薬剤または標識剤）が、直接、または1以上のリンカーを介してのいずれかで、複数の非連続的なシステインに付加されている複合体、及び当該複合体を作製する方法が開示される。

#### 【0070】

一部の実施形態において、当該C末端伸長は1以上のスペーサーにより分離されており、そのため、当該システインは当該C末端伸長の連続残基ではない。「スペーサー」とは、当該伸長中の2つのシステイン残基の間に配置された1以上の連続した非システインアミノ酸；当該軽鎖ポリペプチドのC末端残基を構成するもの、もしくは軽鎖可変領域と軽鎖定常領域の少なくとも一部を含有するその断片のC末端残基を構成するものと、当該C末端伸長の第一のシステイン残基の間に配置された1以上の連続した非システイン残基；及び/または、任意選択的に、当該伸長の最もC末端のシステインに対してC末端に配置された1以上の連続した非システインアミノ酸、を意味する。任意の数のスペーサーが、当該C末端伸長にあってもよい。ある実施形態によると、当該C末端伸長は、1～50個のスペーサー、1～40個のスペーサー、1～30個のスペーサー、1～20個のスペーサー、1～10個のスペーサー（たとえば2～10個のスペーサー）、または1、2、3、4、5、6、7、8、9もしくは10個のスペーサーを含有してもよい。

#### 【0071】

当該C末端伸長が2以上のスペーサーを含有する場合、当該スペーサーの各々は、同じ

10

20

30

40

50

アミノ酸配列を有してもよい。あるいは、当該C末端伸長が2以上のスペーサーを含有する場合、当該スペーサーのうちの少なくとも2つのアミノ酸配列が異なっていてもよい。当該伸長が複数のスペーサーを含有する場合、各スペーサーの間にシステインが存在してもよい。他の態様において、当該伸長が複数のスペーサーを含有する場合、当該スペーサーの内の少なくとも2つが連続していてもよい(たとえば、当該スペーサーは、1以上のシステイン残基により分離されていない)。

#### 【0072】

当該スペーサーは、20のシステインではない、遺伝的にコードされている天然型アミノ酸(アラニン(A)、アルギニン(R)、アスパラギン(N)、アスパラギン酸(D)、グルタミン酸(E)、グルタミン(Q)、グリシン(G)、ヒスチジン(H)、イソロイシン(I)、ロイシン(L)、リシン(K)、メチオニン(M)、フェニルアラニン(F)、プロリン(P)、セリン(S)、スレオニン(T)、トリプトファン(W)、チロシン(Y)、及び/またはバリン(V))、またはその変異型(たとえば、翻訳語修飾の結果として生じる変異型等)、天然型のコードされないアミノ酸、または非天然型アミノ酸のいずれかを含有してもよく、及び任意の所望される配列及び長さであってもよい。ある態様において、スペーサーは、1~30個のアミノ酸(たとえば、3~20個のアミノ酸、3~15個のアミノ酸、3~10個のアミノ酸、3~5個のアミノ酸)を含有してもよく、及び、たとえば4~17個のアミノ酸であってもよい。たとえば、当該スペーサーは、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または30個以上のアミノ酸を含有してもよく、及び一部の例においては、30以下、または25以下のアミノ酸を含有し、当該スペーサーがシステイン残基を含有しない場合には、任意の所望されるアミノ酸配列であってもよい。

#### 【0073】

ある態様において、当該スペーサーは、少なくとも1つのグリシン(G)残基と少なくとも1つのセリン(S)残基を含有する。たとえば、当該スペーサーは、1以上のグリシン残基と1以上のセリン残基を含有してもよい。

#### 【0074】

対象のスペーサーの例は、配列GGGS(配列番号1)を有するスペーサーである。他の態様において、当該スペーサーは、以下のアミノ酸配列の内のいずれかからなる、または含有してもよい: AKTTPKLEEGEFSear(配列番号2); AKTTPKLEEGEFSEarV(配列番号3); AKTTPKLGG(配列番号4); SAKTTPKLGG(配列番号5); AKTTPKLEEGEFSearV (SEQ ID NO: 6); SAKTTT(配列番号7); SAKTTPKLGG(配列番号8); RADAAP(配列番号9); RADAAPTVS(配列番号10); RADAAAAAGGPGS(配列番号11); RADAAAAA(G<sub>4</sub>S)<sub>4</sub>(配列番号12)、SAKTTT(配列番号13); SAKTTPKLGG(配列番号14); SAKTTPKLEEGEFSearV(配列番号15); ADAAPP(配列番号16); ADAAPTVSIFPP(配列番号17); TVAAP(配列番号18); TVAAPSVFIFPP(配列番号19); QPKAAP(配列番号20); QPKAAPSVTLFPP(配列番号21); AKTTPP(配列番号22); AKTTPPSVTPLAP(配列番号23); AKTTAP(配列番号24); AKTTAPSVPYPLAP(配列番号25); ASTKG(配列番号26); ASTKGPSVFPLAP(配列番号27); GGGGSGGGGS(配列番号28); GENKVKEYAPALMALS(配列番号29); GPAKELTPLKEAKVS(配列番号30); GHEAAAVMQVQYPAS(配列番号31); AA; GGGGS(配列番号128); GGGGSSGGGGSS;(配列番号131)、または1、2、3、4、もしくは5個のアミノ酸置換を含有するそれらの変異体。

#### 【0075】

ある態様において、当該軽鎖ポリペプチドのC末端伸長は、内因性ヒトアミノ酸配列ま

10

20

30

40

50

たは改変ヒトアミノ酸配列を有するアミノ酸配列を含有する。これらは、ヒト抗体ヒンジ領域配列、T細胞受容体配列、または対象の任意の他のヒトタンパク質配列を含有してもよい。用いられうる、さらなるアミノ酸配列としては、限定されないが、細胞外タンパク質アミノ酸配列ならびに細胞表面上に存在するタンパク質の細胞外ドメインの配列があげられる。1つの実施形態において、当該伸長は、1以上の天然型システイン残基を含有する内因性ヒトアミノ酸配列を含有する。そのような天然型ヒト配列が、配列改変無く、1以上のシステイン残基を含有する場合、当該システイン残基に対しN末端及びC末端の当該非システイン含有アミノ酸配列は、当該C末端伸長のスペーサー配列を構成する。1つの実施形態において、当該伸長は、挿入または置換により1以上のシステインが内因性ヒトアミノ酸配列に導入されている改変ヒトアミノ酸配列を含有する。また、そのような配列に関連し、天然型システイン残基が置換または欠失されてもよい。

10

## 【0076】

ある実施形態によると、当該C末端伸長が内因性ヒトアミノ酸配列または改変ヒトアミノ酸配列を含有する場合、患者に投与された際の当該抗体（またはその複合体）は、当該ヒトアミノ酸配列または改変ヒトアミノ酸配列を欠いた対応する伸長と比較し、免疫原性が低下している。

## 【0077】

好ましいスペーサーは、野生型配列（たとえば、野生型IgM、IgG、IgA、IgEもしくはIgD抗体分子のヒンジ領域、またはT細胞受容体の一部、またはその断片等）に対し、少なくとも85%、90%、95%、98%または100%同一な配列を有するアミノ酸配列を含有する。1つの態様において、「ヒンジ」領域とは、重鎖ポリペプチド（たとえば、IgG、IgAまたはIgD抗体の重鎖ポリペプチド）のC<sub>H</sub>1とC<sub>H</sub>2ドメインの間に位置する抗体のアミノ酸配列（たとえば、図1及び2の例に示されている）を指す。本発明の構築物のヒンジ領域は、長さ及びアミノ酸配列が変化してもよい。たとえば、ヒトIgG<sub>1</sub>、IgG<sub>2</sub>、及びIgG<sub>4</sub>のヒンジ領域は、12～15アミノ酸の長さであり、一方で、ヒトIgG<sub>3</sub>は62アミノ酸のヒンジ領域を有する。ヒトIgD抗体分子は、64アミノ酸のヒンジ領域を有する。ある実施形態によると、当該C末端伸長がヒンジ領域配列またはその配列変異体を含有する場合、患者に投与された際の当該抗体（またはその複合体）、当該ヒンジ領域配列を欠いた対応する伸長と比較し免疫原性が低下しており、及び当該伸長は、当該ヒンジ領域を欠いた伸長と比較し柔軟性が増加していくてもよい。

20

## 【0078】

そのすべて、または一部（たとえば、少なくとも2、3、4、5、6以上の連続残基）が本発明のC末端伸長に含有されうる、ヒンジ領域アミノ酸配列の非限定的な例としては、限定されないが、ESSCDVKLV E K S F E T（配列番号32）（T細胞受容体定常）；DCGFTS（配列番号33）（T細胞受容体定常）；DVITMDPKDNCSKDAN（配列番号34）（T細胞受容体定常）；DHVKPKETENTKQPSKSCHKPK（配列番号35）（T細胞受容体デルタ定常）；EPKSCDKTHTCP PPCP（配列番号36）（IgCHG1）；ERKCCV E C P P C P（配列番号37）（IgCHG2）；ELKTPLGD T T H T C P R C P（配列番号38）（IgCH3-H1）；EPKSCDT P P P C P R C P（配列番号39）（IgCH3-H2、IgCH3-H3、及びIgCH3-H4）；ESKYGP P C P S C P（配列番号40）（IgH4）；V P P P P P（配列番号41）（IgA2）及びESPKAQASSVPTAQPQAEGSLAKATTAPAT TRNTGRGGEEKKKEKEKEEQERE T K T P（配列番号42）があげられる。

40

## 【0079】

そのすべて、またはその一部（たとえば、少なくとも2、3、4、5、6以上の連続残基）が本発明のC末端伸長にスペーサーとして使用されうるヒンジ領域アミノ酸配列由來の非システイン含有アミノ酸配列の例としては、限定されないが、ESS（配列番号43）；DVKLV E K S F E T（配列番号44）；GFTS（配列番号45）；DVITM

50

D P K D N (配列番号46) ; S K D A N (配列番号47) ; D H V K P K E T E N T K Q P S K S (配列番号48) ; H K P K (配列番号49) ; E P K S (配列番号50) ; D K T H T (配列番号51) ; E R K (配列番号52) ; E L K T P L G D T T H T (配列番号53) ; D T P P P (配列番号54) ; V E (配列番号55) ; P R (配列番号56) ; P P (配列番号57) ; P S (配列番号58) ; E S K Y G P P (配列番号59) ; 及びD V K L V (配列番号91)があげられる。

#### 【0080】

本発明の軽鎖ポリペプチドのC末端伸長は、1以上のスペーサー（またはスペーサーは無し）及び1以上のシステイン残基の任意の所望される組合せを含有するように設計されてもよい。ゆえに、本発明のある態様において、1以上のシステインを有する軽鎖ポリペプチドのC末端に伸長が備えられ（たとえば、互いに分離されて、もしくは互いに分離されずに；元の軽鎖ポリペプチドのC末端から離れて、もしくは元の軽鎖ポリペプチドのC末端から離れずに；及び／または軽鎖伸長のC末端から離れて、もしくは軽鎖伸長のC末端から離れずに）、それにより、当該抗体の複合体化産物の当該システイン（複数含む）に連結される剤（たとえば、細胞毒性剤、標識剤等）の対応する数及び配置を制御することができる。  
10

#### 【0081】

ある実施形態によると、C末端伸長は、以下の式I（N末端からC末端）により表されるアミノ酸配列を含有する：

$$(X_a C_b)_c (X'_d C_e)_f \quad (\text{I})$$

ここで、

X及びX'は、1以上のアミノ酸のスペーサーを表し、ここで、各X及びX'のアミノ酸配列は、独立して、本明細書に開示されるスペーサーアミノ酸配列の例のいずれかを含む、対象の任意のアミノ酸配列から選択され、

Cは、システイン残基を表し、

a、b、c、d、e及びfは、0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、及び20から独立して選択される整数を表し、ここで、b及びeの総計は、少なくとも1であり、ならびにc及びfの総計は少なくとも1である。X及びX'は、同じであっても異なっていてもよい。cが1よりも大きい場合、(X<sub>a</sub>C<sub>b</sub>)<sub>c</sub>の各Xは、(X<sub>a</sub>C<sub>b</sub>)<sub>c</sub>の各反復単位内で、同じアミノ酸配列であっても異なるアミノ酸配列であってもよい。dが1よりも大きい場合、(X'<sub>d</sub>C<sub>e</sub>)<sub>f</sub>の各X'は、(X'<sub>d</sub>C<sub>e</sub>)<sub>f</sub>の各反復単位内で、同じアミノ酸配列であっても異なるアミノ酸配列であってもよい。  
20

#### 【0082】

本発明はまた、式IのC末端伸長をコードする核酸、ならびに式IのC末端伸長を含有する軽鎖ポリペプチドをコードする核酸を開示するものである。

#### 【0083】

ある実施形態において、C末端伸長は、N末端からC末端へ、上述の式Iにより表されてもよく、b及びeが、0、1及び2から独立して選択される整数である場合、b及びeの総計は、少なくとも1であり、ならびにa、c、d及びfが、0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19及び20から独立して選択される整数であり、c及びfの総計は、少なくとも1である。  
40

#### 【0084】

ある実施形態において、C末端伸長は、N末端からC末端へ、上述の式Iにより表されてもよく、b及びeが、0、1及び2から独立して選択される整数である場合、b及びeの総計は、少なくとも2であり、ならびにa、c、d及びfが、0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19及び20から独立して選択される整数であり、c及びfの総計は、少なくとも1である。

#### 【0085】

ある実施形態において、C末端伸長は、N末端からC末端へ、上述の式Iにより表され  
50

てもよく、 $b$  及び  $e$  が 0、1 及び 2 から独立して選択される整数である場合、 $b$  及び  $e$  の総計は、少なくとも 1 であり、 $a$  及び  $d$  が、0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、及び 10 から独立して選択される整数である場合、ならびに  $c$  及び  $f$  が、0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、及び 10 から独立して選択される整数であり、 $c$  及び  $f$  の総計は、少なくとも 1 である。

#### 【0086】

ある実施形態において、C 末端伸長は、N 末端から C 末端へ、上述の式 I により表されてもよく、 $b$  及び  $e$  が 0、1 及び 2 から独立して選択される整数である場合、 $b$  及び  $e$  の総計は、少なくとも 2 であり、 $a$  及び  $d$  が、0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、及び 10 から独立して選択される整数であり、ならびに  $c$  及び  $f$  が、0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、及び 10 から独立して選択される整数であり、 $c$  及び  $f$  の総計は、少なくとも 1 である。  
10

#### 【0087】

解説を目的とした式 I に関連した例として、X が配列 G G G S (配列番号 1) を有するスペーサーであり、 $a$ 、 $b$  及び  $c$  が各々 = 1 であり；ならびに  $f = 0$  である場合、C 末端伸長は、配列 G G G S C (配列番号 60) (本明細書において「C y s 1」とも呼称される) を有する。本実施形態に従う C 末端伸長を有する軽鎖ポリペプチドを有する抗体の例を、図 1 に概略的に示す。示されているように、抗体 100 は、軽鎖可変ドメイン ( $V_L$ ) 及び定常ドメイン ( $C_L$ ) を含有する 2 つの軽鎖ポリペプチド、ならびに当該 ( $C_L$ ) ドメインの各々の C 末端残基から伸長する配列 G G G S C を有する C 末端伸長 102 及び 104 を含有する。  
20

#### 【0088】

1 つの実施形態において、X が G G G S (配列番号 1) である場合、 $a$  は 1 であり、 $c$  は 1 であり、及び  $f$  は 0 である。

#### 【0089】

解説を目的とした式 I に関連した 1 つの例において、X が配列 G G G S (配列番号 1) を有するスペーサーであり、 $a$  及び  $c$  が各々 = 1 であり、 $b = 2$  であり、ならびに  $f = 0$  である場合、C 末端伸長は、配列 G G G S C C (配列番号 61) を有する。

#### 【0090】

解説を目的とした式 I に関連した 1 つの例において、X が配列 G G G S (配列番号 1) を有するスペーサーであり、 $a = 2$  であり、 $b = 1$  であり、 $c = 1$  であり、及び  $f = 0$  である場合、C 末端伸長は、配列 G G G S G G G S C (配列番号 62) を有する (各スペーサー配列が同一である場合)。  
30

#### 【0091】

解説を目的とした式 I に関連した 1 つの例において、X が配列 G G G S (配列番号 1) を有するスペーサーであり、 $a = 1$  であり、 $b = 1$  であり、 $c = 2$  であり、及び  $f = 0$  である場合、C 末端伸長は、配列 G G G S C G G G S C (配列番号 63) (本明細書において、「C y s 2」とも呼称される) を有する (各スペーサー配列が同一である場合)。

#### 【0092】

解説を目的とした式 I に関連した 1 つの例において、X が配列 G G G S (配列番号 1) を有するスペーサーであり、 $a = 1$  であり、 $b = 1$  であり、 $c = 4$  であり、及び  $f = 0$  である場合、当該伸長は、配列 G G G S C G G G S C G G G S C (配列番号 64) (本明細書において、「C y s 4」とも呼称される) を有する (各スペーサー配列が同一である場合)。  
40

#### 【0093】

解説を目的とした式 I に関連した 1 つの例において、X が配列 G G G S (配列番号 1) を有するスペーサーであり、 $a = 1$  であり、 $b = 1$  であり、 $c = 1$  であり、 $d = 3$  あり、 $e = 1$  及び  $f = 1$  である場合、当該伸長は、配列 G G G S C G G G S G G G S G G G S C (配列番号 65) を有する (各スペーサー配列が同一である場合)。

#### 【0094】

解説を目的とした式 I に関連した 1 つの例において、X が配列 G G G S (配列番号 1) を有するスペーサーであり、a = 2 であり、b = 1 であり、c = 1 であり、d = 1 であり、e = 1 及び f = 1 である場合、当該伸長は、配列 G G G S G G G S C G G G S C (配列番号 66) を有する (各スペーサー配列が同一である場合)。

## 【0095】

解説を目的とした式 I に関連した 1 つの例において、X が配列 G G G S (配列番号 1) を有するスペーサーであり、a = 1 であり、b = 1 であり、c = 1 であり、d = 2 であり、e = 1 及び f = 1 である場合、当該伸長は、配列 G G G S C G G G S G G G S C (配列番号 67) を有する (各スペーサー配列が同一である場合)。

## 【0096】

解説を目的とした式 I に関連した 1 つの例において、X が配列 G G G S (配列番号 1) を有するスペーサーであり、及び X' が A K T T P K L E E G E F S E A R (配列番号 2) である場合、a = 1 であり、b = 1 であり、c = 1 であり、d = 2 であり、e = 1 及び f = 1 である場合、当該伸長は、配列 G G G S C A K T T P K L E E G E F S E A R C (配列番号 89) を有する。

## 【0097】

解説を目的とした式 I に関連した 1 つの例において、一番目の ( $X_a C_b$ )<sub>c</sub> の出現に関連し、c = 2 であり、X が配列 G G G S (配列番号 1) であり、及び二番目の ( $X_a C_b$ )<sub>c</sub> の出現に関連し、X が A K T T P K L E E G E F S E A R (配列番号 2) であり、X' が A K T T P K L E E G E F S E A R (配列番号 2) である場合、a = 1 であり、b = 1 であり、c = 2 であり、d = 2 であり、e = 1 及び f = 1 である場合、当該伸長は、配列 G G G S C A K T T P K L E E G E F S E A R C A K T T P K L E E G E F S E A R C (配列番号 90) を有する。

## 【0098】

解説を目的とした式 I に関連した 1 つの例として、X が A K T T P K L E E G E F S E A R (配列番号 2) を有するスペーサーである場合、a、b、c は各々、= 1 であり；ならびに f = 0 である場合、当該 C 末端伸長は、配列 A K T T P K L E E G E F S E A R C (配列番号 68) を有する。

## 【0099】

解説を目的とした式 I に関連した 1 つの例において、X が A K T T P K L E E G E F S E A R (配列番号 2) であり、a = 2 であり、b = 1 であり、c = 1 であり、及び f = 0 である場合、当該 C 末端伸長は、配列 A K T T P K L E E G E F S E A R A K T T P K L E E G E F S E A R C (配列番号 69) を有する (各スペーサー配列が同一である場合)。

## 【0100】

解説を目的とした式 I に関連した 1 つの例において、X が A K T T P K L E E G E F S E A R (配列番号 2) であり、a = 1 であり、b = 1 であり、c = 2 であり、及び f = 0 である場合、当該 C 末端伸長は、配列 A K T T P K L E E G E F S E A R C A K T T P K L E E G E F S E A R C (配列番号 70) を有する (各スペーサー配列が同一である場合)。

## 【0101】

解説を目的とした式 I に関連した 1 つの例において、X が A K T T P K L E E G E F S E A R (配列番号 2) であり、a = 1 であり、b = 1 であり、c = 4 であり、及び f = 0 である場合、当該伸長は、配列 A K T T P K L E E G E F S E A R C A K T T P K L E E G E F S E A R C A K T T P K L E E G E F S E A R C A K T T P K L E E G E F S E A R C (配列番号 71) を有する (各スペーサー配列が同一である場合)。

## 【0102】

解説を目的とした式 I に関連した 1 つの例において、X が A K T T P K L E E G E F S E A R (配列番号 2) であり、a = 1 であり、b = 1 であり、c = 1 であり、d = 3 であり、e = 1 であり、及び f = 1 である場合、当該伸長は、配列 A K T T P K L E E G E F

10

20

30

40

50

S E A R C A K T T P K L E E G E F S E A R A K T T P K L E E G E F S E A R A K T  
T P K L E E G E F S E A R C (配列番号 72) を有する (各スペーサー配列が同一である場合)。

**【0103】**

解説を目的とした式 I に関連した 1 つの例において、X が A K T T P K L E E G E F S E A R (配列番号 2) であり、a = 2 であり、b = 1 であり、c = 1 であり、d = 1 であり、e = 1 であり、及び f = 1 である場合、当該伸長は、配列 A K T T P K L E E G E F S E A R A K T T P K L E E G E F S E A R C A K T T P K L E E G E F S E A R C (配列番号 73) を有する (各スペーサー配列が同一である場合)。

**【0104】**

解説を目的とした式 I に関連した 1 つの例において、X が A K T T P K L E E G E F S E A R (配列番号 2) であり、a = 1 であり、b = 1 であり、c = 1 であり、d = 2 であり、e = 1 であり、及び f = 1 である場合、当該伸長は、配列 A K T T P K L E E G E F S E A R C A K T T P K L E E G E F S E A R A K T T P K L E E G E F S E A R C (配列番号 74) を有する (各スペーサー配列が同一である場合)。

**【0105】**

他の例において、本発明の C 末端伸長は、以下の式 II により表されてもよい：

$$(X_a C_b)_c (X'_d C_e)_f (X''_g C_h)_i \quad (\text{II})$$

ここで、

X、X' 及び X'' は、1 以上のアミノ酸のスペーサーを表し、ここで、各 X、X' 及び X'' のアミノ酸配列は、独立して、本明細書に開示されるスペーサーアミノ酸配列の例のいずれかを含む、対象の任意のアミノ酸配列から選択され、

C は、システイン残基を表し：及び、

a、b、c、d、e、f、g、h 及び i は、0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、及び 20 から独立して選択される整数であり、ここで、b、e、及び h の総計は、少なくとも 1 であり、ならびに c、f 及び i の総計は少なくとも 1 である。X、X' 及び X'' は、同じであっても異なるあっていてもよい。c が 1 よりも大きい場合、(X\_a C\_b)\_c の各 X は、(X\_a C\_b)\_c の各反復単位内で、同じアミノ酸配列であっても異なるアミノ酸配列であってもよい。d または f が 1 よりも大きい場合、(X'\_d C\_e)\_f の各 X' は、(X'\_d C\_e)\_f の各反復単位内で、同じアミノ酸配列であっても異なるアミノ酸配列であってもよい。g または i が 1 よりも大きい場合、(X''\_g C\_h)\_i の各 X'' は、(X''\_g C\_h)\_i の各反復単位内で、同じアミノ酸配列であっても異なるアミノ酸配列であってもよい。

**【0106】**

本発明の C 末端伸長は、E P K S C D K T H T C (配列番号 92) (本明細書において、伸長 1 とも呼称される)；E P K S C D K T H T C P P C (配列番号 93) (本明細書において、伸長 2 とも呼称される)；E P K S C (配列番号 94) (本明細書において、伸長 3 とも呼称される)；E S K Y G P P C (配列番号 95) (本明細書において、伸長 4 とも呼称される)；E R K C C V E C P P C (配列番号 96) (本明細書において、伸長 5 とも呼称される)；E R K C (配列番号 97) (本明細書において、伸長 6 とも呼称される)；D V I T M D P K D N C (配列番号 98) (本明細書において、伸長 7 とも呼称される)；D H V K P K E T E N T K Q P S K S C H K P K (配列番号 99) (本明細書において、伸長 8 とも呼称される)；E S S C (配列番号 100) (本明細書において、伸長 9 とも呼称される)；E S S C D V K L V (配列番号 101) (本明細書において、伸長 10 とも呼称される)；D H V K P K E T E N T K Q P S K S C (配列番号 102) (本明細書において、伸長 11 とも呼称される)；D V I T M D P K D N C S K D A N (配列番号 103) (本明細書において、伸長 12 とも呼称される)；C A A、C C A A (配列番号 132)、A A C A A (配列番号 129)、及び G G G G S C A A (配列番号 130) から選択されるアミノ酸配列を含有してもよい (たとえば、からなるものであってもよい)。

10

20

30

40

50

## 【0107】

本発明により、本明細書に開示されるC末端伸長（たとえば、式IIのC末端伸長等）のいずれかをコードする核酸、及び本明細書に開示される軽鎖ポリペプチド（たとえば、式IIのC末端伸長を含有する軽鎖ポリペプチド等）のいずれかをコードする核酸もまた開示される。

## 【0108】

本発明により、本発明のC末端伸長を有する軽鎖ポリペプチドを少なくとも1つ有する抗体が開示される。一部の実施形態において、当該抗体は、本発明のC末端伸長を有する軽鎖ポリペプチドを2つ有する。一部の実施形態において、当該抗体は、当該抗体の軽鎖ポリペプチドのうちの少なくとも1つに存在するC末端伸長中の少なくとも1つのシステインに共有結合を介して付加された剤/ペイロード（例えば、薬剤）に結合されていてもよい。1つの実施形態において、当該ペイロードは、当該C末端伸長のシステインに直接付加されている。他の実施形態において、当該ペイロードは、リンカーを介して当該C末端伸長のシステインに付加されている。1つの実施形態において、当該ペイロードは、当該C末端アミノ酸伸長の外側のシステインではなく、当該C末端伸長のシステインに優先的に付加される。1つの実施形態において、当該ペイロードは、当該C末端伸長のシステインに排他的に付加される。

10

## 【0109】

核酸、ベクター、及び宿主細胞

20

本発明により、C末端アミノ酸伸長（本明細書において、簡便性を目的として「改変軽鎖ポリペプチド」と呼称される）を有する軽鎖ポリペプチドをコードする核酸、ならびに、当該核酸を含有するベクター及び宿主細胞が開示される。当該核酸によりコードされる当該改変軽鎖ポリペプチドは、上述の特性のいずれかを任意の組み合わせで含有してもよい。たとえば、当該複合体の抗体部分のC末端伸長は、当該伸長の長さ、当該伸長のアミノ酸組成、当該伸長中のスペーサーの数、及びそのアミノ酸配列に関し、上述のC末端伸長の特性のいずれかを含有してもよく、1以上のスペーサー及び1以上のシステイン残基の組み合わせに基づいた伸長構成のいずれかを含有してもよく、ならびに上述及び本明細書の他の部分に記述されるC末端伸長の任意の他の態様を含有してもよい。

## 【0110】

30

C末端伸長含有軽鎖ポリペプチドをコードする核酸（たとえばDNAまたはRNA）は、1以上の制御性因子（たとえばプロモーター及びエンハンサー等）に操作可能に連結されていてもよく、それにより宿主細胞（たとえば、当該コードされた改変軽鎖ポリペプチドを合成するよう遺伝的に改変された細胞）において当該核酸が発現されうる。

## 【0111】

たとえば、宿主細胞は、原核宿主細胞であり、プロモーターの例としては、限定されないが、バクテリオファージT7 RNAポリメラーゼプロモーター；trpプロモーター；lac operonプロモーター；ハイブリッドプロモーター（たとえば、lac/tacハイブリッドプロモーター、tac/trcハイブリッドプロモーター、trp/lacプロモーター、T7/lacプロモーター等）；trcプロモーター；lacプロモーター等；araBADプロモーター；in vivo制御プロモーター（たとえば、ssAGプロモーターまたは関連プロモーターのpagCプロモーター）；nirBプロモーター；sigma70プロモーター（たとえばコンセンサスシグマ70プロモーター；静止期プロモーター（たとえばdpsプロモーター、spvプロモーター等）；病原性アイランドSPI-2由来のプロモーター；actAプロモーター；rpsMプロモーター；tetプロモーター；SP6プロモーター等が挙げられる。たとえば大腸菌等の原核細胞における使用に適した強力なプロモーターの例としては、限定されないが、Trc、Tac、T5、T7、及びPLambdaが挙げられる。細菌性宿主細胞における使用に適したオペレーターの非限定的な例としては、ラクトースプロモーター-オペレーター（LacIリプレッサータンパク質はラクトースと接觸した際に構造を変化させ、それによりLacIリプレッサータンパク質がオペレーターに結合することが妨げられる）、トリプトファ

40

50

ンプロモーターオペレーター(トリプトファンと複合体化した際には、TrpRリプレッサータンパク質はオペレーターに結合する構造を有し、トリプトファンの非存在下では、TrpRリプレッサータンパク質はオペレーターに結合しない構造を有する)、及びtacプロモーターオペレーターが挙げられる。

#### 【0112】

一部の実施形態において、たとえば酵母細胞における発現に対しては、プロモーターは、たとえばADH1プロモーター、PGK1プロモーター、ENOプロモーター、PYK1プロモーター等の構成的プロモーター；またはたとえばGAL1プロモーター、GAL10プロモーター、ADH2プロモーター、PHO5プロモーター、CUP1プロモーター、GAL7プロモーター、MET25プロモーター、MET3プロモーター、CYC1プロモーター、HIS3プロモーター、ADH1プロモーター、PGKプロモーター、GAPDHプロモーター、ADC1プロモーター、TRP1プロモーター、URA3プロモーター、LEU2プロモーター、ENOプロモーター、TP1プロモーター、及びAOX1(たとえばPichiaにおける使用)等の制御性プロモーターであってもよい。  
10

#### 【0113】

改変軽鎖ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列は、発現ベクター及び/またはクローニングベクターに存在していてもよい。たとえば本発明の改変軽鎖ポリペプチドを有する抗体を作製するための等の、当該改変軽鎖ポリペプチドと、抗体の1以上の他のポリペプチド構成要素を発現することが望ましい場合、当該2以上のポリペプチドをコードする対応するヌクレオチド配列は、同じベクターまたは別のベクターにクローニングされてもよい。発現ベクターは、選択マーカー、複製起源、ならびにベクターの複製及び/または維持をもたらす他の特性を含有してもよい。  
20

#### 【0114】

通常、発現ベクターは、異種タンパク質をコードする核酸の挿入を行うため、プロモーター配列の近傍に配置された簡便な制限酵素部位を有している。発現ベクターの例としては、限定されないが、ウイルスベクター(たとえば、ワクシニアウイルス；ポリオウイルス；アデノウイルス；アデノ随伴ウイルス；SV40；単純ヘルペスウイルス；ヒト免疫不全ウイルス；レトロウイルスベクター(たとえば、Murine Leukemia Virus、脾壊死ウイルス、ならびにたとえばRous Sarcoma Virus、Harvey Sarcoma Virus、トリ白血病ウイルス、ヒト免疫不全ウイルス、骨髄増殖性肉腫ウイルス、及び乳がんウイルス等のレトロウイルス由来のベクター)等)が挙げられる。  
30

#### 【0115】

また、当該改変軽鎖ポリペプチドをコードする核酸のいずれかを含有する宿主細胞、または当該核酸のいずれかを含有するベクターが開示される。ある態様において、宿主細胞は、原核細胞性の宿主細胞または真核細胞性の宿主細胞である。宿主細胞は、本発明の核酸を用いて遺伝的に改変されている(たとえば、形質転換またはトランスフェクションされている)、単離遺伝子改変宿主細胞(たとえばin vitro細胞)であってもよい。一部の実施形態において、本発明の遺伝子改変宿主細胞は、本明細書に開示される特性的いずれかを有しうる抗体軽鎖ポリペプチドである、本発明の改変軽鎖ポリペプチドを產生することができる。  
40

#### 【0116】

宿主細胞の例としては、たとえば哺乳類細胞、昆虫宿主細胞、酵母細胞等の真核宿主細胞；たとえば細菌細胞等の原核細胞が挙げられる。当該宿主細胞への当該核酸の導入は、たとえば、リン酸カルシウム沈殿、DEAEデキストラン介在性トランスフェクション、リポソーム介在性トランスフェクション、エレクトロポレーション、または他の公知の方法により行われてもよい。

#### 【0117】

哺乳類宿主細胞の例としては、初代細胞及び不死化細胞株が挙げられる。適切な哺乳類宿主細胞の例としては、ヒト細胞株、非ヒト靈長類細胞株、げっ歯類(たとえば、マウス  
50

、ラット等)細胞株等が挙げられる。適切な哺乳類宿主細胞としては、限定されないが、HeLa細胞(たとえば、American Type Culture Collection(ATCC)No.CCL-2)、CHO細胞(たとえば、ATCC No.CRL9618、CCL61、CRL9096)、293細胞(たとえば、ATCC No.CRL-1573)、ペ口細胞、NIH 3T3細胞(たとえば、ATCC No.CRL-1658)、HuH-7細胞、BHK細胞(たとえば、ATCC No.CCL10)、PC12細胞(ATCC No.CRL1721)、COS細胞、COS-7細胞(ATCC No.CRL1651)、RAT1細胞、マウスL細胞(ATCC No.CCL1.3)、ヒト胎児腎臓(HEK)細胞(ATCC No.CRL1573)、HLHepG2細胞等が挙げられる。

10

#### 【0118】

酵母宿主細胞の例としては、限定されないが、*Pichia pastoris*、*Pichia finlandica*、*Pichia trehalophila*、*Pichia koclamiae*、*Pichia membranaefaciens*、*Pichia opuntiae*、*Pichia thermotolerans*、*Pichia salictaria*、*Pichia guercuum*、*Pichia pijperi*、*Pichia stipitis*、*Pichia methanolicola*、*Pichia* sp.、*Saccharomyces cerevisiae*、*Saccharomyces* sp.、*Hansenula polymorpha*、*Kluyveromyces* sp.、*Kluyveromyces lactis*、*Candida albicans*、*Aspergillus nidulans*、*Aspergillus niger*、*Aspergillus oryzae*、*Trichoderma reesei*、*Chrysosporium lucknowense*、*Fusarium* sp.、*Fusarium gramineum*、*Fusarium venenatum*、*Neurospora crassa*、*Chlamydomonas reinhardtii*等が挙げられる。

20

#### 【0119】

原核細胞の例としては、限定されないが、様々な実験用大腸菌株のいずれか、*Lactobacillus* sp.、*Salmonella* sp.、*Shigella* sp.等が挙げられる。本発明に用いることができる*Salmonella*株の例としては、限定されないが、*Salmonella typhi*及び*S. typhimurium*が挙げられる。適した*Shigella*株としては、限定されないが、*Shigella flexneri*、*Shigella sonnei*、及び*Shigella dysenteriae*が挙げられる。典型的には、実験用株は、非病原性の株である。他の適切な細菌の非限定的な例としては、限定されないが、*Bacillus subtilis*、*Pseudomonas pudita*、*Pseudomonas aeruginosa*、*Pseudomonas mevalonii*、*Rhodobacter sphaeroides*、*Rhodobacter capsulatus*、*Rhodospirillum rubrum*、*Rhodococcus* sp.等が挙げられる。

30

#### 【0120】

抗体軽鎖ポリペプチド及び抗体の作製方法

40

上述のように、本発明により、改変軽鎖ポリペプチド(すなわち、本発明のC末端伸長を有する軽鎖ポリペプチド)の作製方法、ならびに1つ以上の当該改変軽鎖ポリペプチドを含有する抗体の作製方法が開示される。

#### 【0121】

1つの実施形態によると、抗体の軽鎖ポリペプチドの作製方法が開示され、当該方法は、本明細書に開示されるC末端アミノ酸伸長を含有する軽鎖ポリペプチドをコードする核酸を宿主細胞中で発現させることを含む。当該軽鎖ポリペプチドは、任意の簡便な方法(たとえば、タンパク質合成のための標準的な合成方法、組み換えDNA法等)により作製されてもよい。C末端アミノ酸伸長を有する軽鎖ポリペプチドは、対象の重鎖ポリペプチ

50

ドの作製と組み合わせて作製されてもよく、または作製後に、重鎖ポリペプチドと組み合わされてもよい（たとえば、本発明の軽鎖ポリペプチドと重鎖ポリペプチドを別々に発現する組み換え細胞を融合することにより、組み合わされる）。

#### 【0122】

当該軽鎖ポリペプチドの作製に組み換え技術を用いることができる。たとえば、対象の軽鎖ポリペプチドをコードする核酸は、発現ベクターに挿入されてもよい。当該軽鎖ポリペプチドをコードする核酸セグメントは、当該軽鎖ポリペプチドを確実に発現する発現ベクター中の1以上の制御配列に操作可能に連結されてもよい。発現制御配列としては、限定されないが、プロモーター（たとえば天然型または異種のプロモーター）、シグナル配列、エンハンサー因子、及び転写終結配列が挙げられる。発現制御配列は、真核宿主細胞（たとえばCOS細胞またはCHO細胞）に形質転換またはトランスフェクションすることができるベクター中の真核細胞性プロモーターシステムであってもよい。ベクターが適切な宿主に組み込まれると、当該宿主は、当該ヌクレオチド配列の望ましいレベルの発現、ならびに当該軽鎖ポリペプチドの回収及び精製に適した条件下で維持される。10

#### 【0123】

遺伝子コードの縮重があるため、様々な核酸配列が、所望の軽鎖ポリペプチドをコードすることができる。当該軽鎖ポリペプチドをコードする核酸配列は、de novo固相DNA合成により、元の抗体（C末端アミノ酸伸長を欠いている）の軽鎖ポリペプチドをコードする核酸のポリメラーゼ鎖反応（PCR）突然変異誘導（たとえば重複PCR）により、作製されてもよい。C末端伸長を有する軽鎖ポリペプチドをコードする核酸を作製するための重複PCRに使用される方法の例は、本明細書の実施例に詳細に記述される。20

#### 【0124】

適した発現ベクターは通常、エピソームとして、または宿主染色体DNAの不可欠な一部としてのいずれかで、宿主生物体中で複製可能である。標準的には、発現ベクターは、所望のDNA配列で形質転換された細胞の選択ができるよう、選択マーカー（たとえばアンピシリン耐性、ハイグロマイシン耐性、テトラサイクリン耐性、カナマイシン耐性、またはネオマイシン耐性）を含有している。発現ベクターと宿主細胞の例は上述されている。たとえば、宿主細胞は原核細胞（たとえば大腸菌、桿菌（たとえばBacillus subtilis）、Salmonella、Serratia、Pseudomonas種等）、酵母細胞（たとえばSaccharomyces（たとえばS. cerevisiae）、Pichia等）及び哺乳類細胞（たとえばCHO細胞株、Cos細胞株、HeLa細胞、ミエローマ細胞株、形質転換B細胞、ハイブリドーマ等）であってもよい。30

#### 【0125】

軽鎖ポリペプチドが化学的に合成される場合、合成は、液相または固相を介して進展してもよい。固相ポリペプチド合成（SPPS）（当該配列のC末端アミノ酸が不溶性の支持体に付着され、次いで、当該配列の残りのアミノ酸が順次付加される）は、軽鎖ポリペプチドの化学合成の適切な方法の例である。たとえばFmoc及びBoc等の様々な形式のSPPSが、軽鎖ポリペプチドの合成に利用可能である。固相合成法は当分野で利用可能である。たとえば、ペプチド鎖が形成された機能性ユニットを用いて、小さな不溶性の多孔性ビーズを処置する。カップリング/脱保護のサイクルを繰り返した後、付着された固相の遊離N末端アミンが、1つのN保護アミノ酸ユニットにカップリングされる。次いで、このユニットを脱保護し、追加のアミノ酸が付着される新たなN末端アミンが露出される。ペプチドは固相上に固定されたまま、切り離される前にろ過プロセスを経る。40

#### 【0126】

（組み換えるに、または化学的に）合成された時点で、当該改変軽鎖ポリペプチドは、単独で、または抗体の一部としてのいずれかで、標準的な方法により精製されてもよい。当該改変軽鎖ポリペプチドは、単独で、または抗体の一部としてのいずれかで、実質的に純粋であってもよい（たとえば、少なくとも約80%～85%の純度、少なくとも約85%～90%の純度、少なくとも約90%～95%の純度、または98%～99%以上の純

50

度であり、たとえば当該軽鎖ポリペプチド以外の細胞残渣、微小分子等の混入物がない状態)。

**【0127】**

ある実施形態によると、当該軽鎖ポリペプチドは、*in vitro*翻訳により產生される。たとえば、Yin et al. (2012) A glycosylated antibodies and antibody fragments produced in a scalable *in vitro* transcription-translation system, Landes Bioscience, Volume 4, Issue 2を参照にされたい。

**【0128】**

当該抗体は、たとえばキメラ抗体、ヒト化抗体、完全ヒト抗体、二特異性抗体、脱免疫化抗体、及び／または*in vitro*で作製された抗体等の組み換え抗体であってよい。

**【0129】**

**複合体**

本発明は、C末端伸長を有する軽鎖ポリペプチドを少なくとも1つ有する抗体を開示するものであり、当該C末端伸長のうちの少なくとも1つのシステインは、剤(たとえば薬剤)に結合されている。

**【0130】**

本発明の複合体の抗体部分のC末端伸長を有する軽鎖ポリペプチドは、上述の任意の特性を任意の組み合わせで含有してもよい。たとえば、当該複合体の抗体部分のC末端伸長は、当該伸長の長さ、当該伸長のアミノ酸組成、当該伸長中のスペーサーの数、及びそのアミノ酸配列に関し、上述のC末端伸長の特性のいずれかを含有してもよく、1以上のスペーサー及び1以上のシステイン残基の組み合わせに基づいた伸長構成のいずれかを含有してもよく、ならびに上述及び本明細書の他の部分に記述されるC末端伸長の任意の他の態様を含有してもよい。

**【0131】**

従って、本発明の抗体複合体は、C末端伸長を有する軽鎖ポリペプチドを少なくとも1つ有し、当該C末端伸長の少なくとも1つのシステインは、剤に結合されている。一部の実施形態において、本発明の抗体複合体の軽鎖ポリペプチドの各々は、C末端伸長を有しており、当該変形軽鎖ポリペプチドのC末端伸長のシステイン残基の少なくとも1つは剤に結合されている。たとえば、第一の剤は、第一の変形軽鎖ポリペプチドのC末端伸長のシステイン残基に結合されていてもよく、及び第二の剤は、第二の軽鎖ポリペプチドのC末端伸長のシステイン残基に結合されていてもよい。1つの実施形態において、当該剤は、当該C末端アミノ酸伸長の外側のシステイン残基よりも、当該C末端伸長のシステイン残基に優先的に付加される。ある態様において、当該剤は、当該C末端伸長のシステイン残基に排他的に付加される。本発明の抗体複合体は、結合に利用可能な当該C末端伸長中のシステインの数に従い(たとえば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19またはそれ以上のシステイン)、当該変形軽鎖ポリペプチド(複数含む)のC末端伸長に結合される任意の数の剤を含有しうる。一部の実施形態において、当該抗体の変形軽鎖ポリペプチド(複数含む)のC末端伸長は、当該C末端伸長の少なくとも1、2、3、4、5以上への共有結合を介して剤(複数含む)に結合されている。一部の実施形態において、当該抗体の変形軽鎖ポリペプチド(複数含む)のC末端伸長は、当該C末端伸長の2、3、4、5、6、7、8、9または10個未満のシステインへの共有結合を介して剤(複数含む)に結合されている。ある態様において、当該伸長は、直接、または1以上のリンカーを介してのいずれかで、当該伸長中の隣接するシステイン残基の2つ以上に結合されている。たとえば、当該伸長は、当該伸長中の2つの隣接するシステイン残基に結合されている剤を含有してもよい。

**【0132】**

ある実施形態において、当該抗体の変形軽鎖ポリペプチド(複数含む)のC末端伸長に

10

20

30

40

50

結合されている剤の数は、薬剤と抗体の比率（DAR）により特徴づけられてもよい。一部の例において、複数の抗体複合体の分布は、当該分布における、抗体複合体の平均DARを測定することにより特徴づけられてもよく、当該平均DARは、分布における、当該抗体の改変軽鎖ポリペプチド（複数含む）のC末端伸長に結合された剤の平均数を示す。

「平均」とは、算術平均を意味する。ある場合において、平均DARは、疎水性相互作用クロマトグラフィー（HIC）により解析される。したがって、平均DARは、DAR解析により提示される、分布における抗体複合体の薬剤と抗体の平均比率の指標を示す。

#### 【0133】

一部の例において、本発明の抗体複合体のDARは、0～20の範囲であり、たとえば、1～17、または1～15、または1～12、または1～10、または1～9、または1～8、または1～7、または1～6、または1～5、または1～4、または1～3である。たとえば、DARが0の場合、抗体が複合体化されていないことを示し；DARが1の場合、1つの剤（たとえば薬剤）が当該抗体の改変軽鎖ポリペプチドのC末端伸長に結合されていることを示し；DARが2の場合、当該抗体の改変軽鎖ポリペプチド（複数含む）のC末端伸長の1以上に2つの剤が結合されていることを示し；DARが3の場合、当該抗体の改変軽鎖ポリペプチド（複数含む）のC末端の1以上に3つの剤が結合されていることを示し；DARが4の場合、当該抗体の改変軽鎖ポリペプチド（複数含む）のC末端の1以上に4つの剤が結合されていることを示す。一部の例において、本発明の抗体複合体のDARは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または20である。10  
20

#### 【0134】

一部の例において、本発明の抗体複合体の分布の平均DARは、0～20の範囲であり、たとえば、1～17、または1～15、または1～12、または1～10、または1～9、または1～8、または1～7、または1～6、または1～5、または1～4、または1～3である。たとえば、平均DARが0の場合、平均して、分布において抗体が複合体化されていないことを示し；平均DARが1の場合、平均して、分布において1つの剤（たとえば薬剤）が各抗体に結合されていることを示し；平均DARが2の場合、平均して、分布において2つの剤が各抗体に結合されていることを示し；平均DARが3の場合、平均して、分布において3つの剤が各抗体に結合されていることを示し；平均DARが4の場合、平均して、分布において4つの剤が各抗体に結合されていることを示す。一部の例において、本発明の抗体複合体の分布の平均DARは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、または20である。30

#### 【0135】

ある実施形態において、本発明の抗体複合体を含有する試料は、非複合体化抗体と複合体化（たとえば、一複合体化、二複合体化、三複合体化等）抗体の混合物を含有する。抗体複合体の各分布の平均DARは、たとえばHICにより分析されてもよい。たとえば、抗体複合体を含有する試料は、非複合体化抗体（すなわち、平均DAR=0を有する抗体複合体）の分布、一複合体化抗体（すなわち、平均DAR=1を有する抗体複合体）の分布、二複合体化抗体（すなわち、平均DAR=2を有する抗体複合体）の分布、三複合体化抗体（すなわち、平均DAR=3を有する抗体複合体）の分布等を含有してもよい。40

#### 【0136】

本発明の実施形態に従う抗体複合体の例は、図2に概略されている。示されているように、複合体200は、軽鎖可変（V<sub>L</sub>）と定常（C<sub>L</sub>）ドメインを含有する軽鎖ポリペプチドを2つ、及び各（C<sub>L</sub>）ドメインのC末端残基から伸長する配列G G G S Cを有するC末端伸長、を有する抗体が含まれる。複合体200はさらに、リンカーを介して当該伸長のシステイン残基に連結された剤202及び204を含有する。

#### 【0137】

リンカー

ある態様において、当該剤は、リンカーを介してシステイン残基に結合されている。本50

発明の複合体における用途が見いだされるリンカーとしては、マレイミド、またはマレイミドをベースとしたリンカー；バリン・シトルリンリンカー；ヒドラゾンリンカー；N-スクシンイミジル-4-(2-ピリジルジチオ)酪酸塩(S P D B)リンカー；スクシンイミジル-4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボン酸塩(S M C C)リンカー；ビニルスルホンをベースとしたリンカー；システインに適合された金属原子(複数含む)を含有するリンカー；たとえば限定されないがテトラエチレングリコール等のポリエチレングリコール(P E G)を含有するリンカー；プロパン酸を含有するリンカー；カブロレイン酸を含有するリンカー；Fleximer(登録商標)ポリマー(Mersana Therapeutics, Cambridge, MA)を含有するリンカー、またはFleximerポリマーに薬剤を付加するために用いられるリンカー(たとえば、USPN 8,524,214(参照によりその全体で本明細書に援用される)を参考のこと)；及びそれらの任意の組み合わせを含有するリンカーが挙げられる。

#### 【0138】

ある態様において、リンカーは、化学的に不安定なリンカーであり、たとえば中性pH(血流のpH7.3~7.5)で安定であるが、弱酸性のエンドソーム(pH5.0~6.5)及び標的細胞(たとえばがん細胞)のリソソーム(pH4.5~5.0)に内在化されると加水分解される、酸開裂可能なリンカーがある。化学的に不安定なリンカーとしては、限定されないが、ヒドラゾンをベースとしたリンカーが挙げられる。ある実施形態によると、当該リンカーは、酵素的に不安定なリンカーであり、たとえば、血流中では安定であるが、標的細胞内に内在化されると、酵素的に開裂される(たとえば標的細胞(たとえば癌細胞)のリソソーム中でリソソームプロテアーゼ(たとえばカテプシンまたはプラスミン等)により酵素的に開裂される)。酵素的に不安定なリンカーとしては、限定されないが、ペプチド結合を含有するリンカー(たとえばマレイミドカブロイル-バリン-シトルリン-p-アミノベンジル(MC-vc-PAB)リンカー等のバリン-シトルリンリンカー)が挙げられる。ある態様において、当該リンカーは、非開裂可能なリンカーであり、たとえば非開裂可能なチオエーテル結合を含有するリンカーである。化学的に不安定なリンカー、酵素的に不安定なリンカー、及び非開裂可能なリンカーは公知であり、たとえばDucry & Stump(2010)Biocconjugate Chem. 21:5-13に詳述されている。

#### 【0139】

ある実施形態によると、当該リンカーは、当該C末端アミノ酸伸長のシステイン残基(複数含む)の1以上の還元スルフヒドリル基(またはチオール、-SH)と反応することができるスルフヒドリル反応性化学基である(または、含有する)。当該C末端伸長のシステインへの剤の連結に用途が見いだされるスルフヒドリル基反応性化学基としては、限定されないが、マレイミド、ハロアセチル、ピリジルジスルフィド、アジリジン、アクリロイル、アリール化剤、ビニルスルホン、TNB-チオール、金属及びジスルフィド還元剤が挙げられる。当該基は、アルキル化(たとえばチオエーテル結合の形成により)、ジスルフィド交換(ジスルフィド結合の形成)等によりスルフヒドリルに結合されてもよい。

#### 【0140】

##### 剤

本発明の抗体複合体のペイロードとなる剤は、任意の適切な剤であってもよい。本発明の抗体複合体での使用に選択される剤は、当該複合体が用いられる応用法により変化しうる(たとえば、殺傷、細胞増殖阻害、ホルモン療法、標的画像化及び/または遺伝子治療等)。対象の剤としては、限定されないが、治療剤(たとえば、薬剤(たとえば、細胞毒性剤))、検出可能な剤(たとえば、in vivoイメージング剤)、及び/または対象の特定の抗体をベースにした応用法に有用な他の剤が挙げられる。

#### 【0141】

そのような剤の非限定的な例としては、毒素、毒素の断片、レクチン、アルキル化剤、酵素、抗生物質(たとえば抗菌物質、抗真菌剤、抗マイコプラズマ剤等)、抗ウイルス剤

10

20

30

40

50

、抗代謝剤、抗増殖剤、または抗新生物剤、DNA、放射線不透過性色素、放射性同位元素（たとえば、I<sup>123</sup>、I<sup>131</sup>ならびに放射性金属イオン）、金属イオン、蛍光性化合物、マーカー化合物、及び細胞膜透過性を変化させる化合物が挙げられる。ある態様において、当該剤は、特異的結合対（たとえば、アビジン／ストレプトアビジンと特異的な結合対を形成するビオチン等）の一つである（または、含む）。

#### 【0142】

ある実施形態によると、当該剤は、治療剤である。対象の治療剤としては、細胞／組織表面上の抗原への当該複合体の抗体部分の特異的結合を介して当該複合体が結合し、細胞／組織の機能に影響を与えることができる剤が挙げられる。たとえば、当該剤は、当該複合体が特異的に結合する、細胞／組織の機能を強化してもよい。あるいは、当該細胞／組織の機能が病的である場合には、当該細胞／組織の機能を低下させる剤が用いられてもよい。ある態様において、本発明の複合体は、細胞増殖を阻害することにより、及び／または当該細胞／組織を殺傷することにより、標的細胞／組織の機能を低下させる剤を含有する。そのような剤は変化してもよく、ならびに細胞増殖抑制剤及び細胞毒性剤を含有してもよい（たとえば、標的細胞内への内在化を伴っても、伴わなくても、標的細胞を殺傷することができる剤）。

#### 【0143】

ある態様において、治療剤は、エンジイン、レキシトロプシン（lexitropsin）、ズオカルマイシン、タキサン、ピューロマイシン、ドラスタチン、メイタンシノイド、及びビンカアルカリオイドから選択される細胞毒性剤である。一部の実施形態において、当該細胞毒性剤は、パクリタキセル、ドセタキセル、CC-1065、CPT-11（SN-38）、トポテカン、ドキソルビシン、モルホリノ・ドキソルビシン、リゾキシン、シアノモルホリノ・ドキソルビシン、ドラスタチン-10、エキノマイシン、コンブレタスタチン、カリケアミシン、メイタンシン、メイタンシンDM1、メイタンシンDM4、DM-1、オーリスタチン、または他のドラスタチン誘導体（たとえばオーリスタチンEまたはオーリスタチンF）、AEB（AEB-071）、AEVB（5-ベンゾイル吉草酸・A E エステル）、AEFP（抗体・エンドスタチン融合タンパク質）、MMAE（モノメチルオーリスタチンE）、MMAF（モノメチルオーリスタチンF）、ピロロベンゾジアゼピン（PBD）、エリュテロビン、ネトロプシン、またはそれらの任意の組み合わせである。

#### 【0144】

ある実施形態によると、当該剤は、ヘミアステリン及びヘミアステリンアナログ（たとえばHTI-286（たとえば、USPN7,579,323；WO2004/026293；及びUSPN8,129,407を参照のこと。それら公開文書のすべては、参照により本明細書に援用される）、アブリン、ブルシン、シクトキシン、ジフテリア毒素、バトラコトキシン、ボツリヌス毒素、志賀毒素、エンドトキシン、緑膿菌外毒素、緑膿菌エンドトキシン、破傷風毒素、百日咳毒素、炭疽菌毒素、コレラ毒素、ファルカリノール、フモニシンB1、フモニシンB2、アフラトキシン、マウロトキシン、アジトキシン、カリブドトキシン、マルガトキシン、スロトキシン、スキラトキシン、ヘフトキシン、カルシセプチン、タイカトキシン、カルシクルジン、ゲルダナマイシン、ゲロニン、ロタウストラリン、オクラトキシンA、パツリン、リシン、ストリキニーネ、トリコテセン、ゼアラレノン、及びテトラドトキシンから選択されるタンパク質毒素である。用いられ得る酵素的に活性な毒素及びその断片としては、ジフテリアA鎖、ジフテリア毒素の非結合活性断片、外毒素A鎖（緑膿菌由来）、リシンA鎖、アブリンA鎖、モデシンA鎖、アルファ-サルシン、シナアプラギリ（Aleurites fordii）タンパク質、ジアンチンタンパク質、ヨウシュヤマゴボウ（Phytolaca americana）タンパク質（PAPI、PAPII、及びPAP-S）、ツルレイシ（Momordica charantia）阻害物質、クルシン、クロチン、サポアオナリア・オフィシナリス（Sapaponaria officinalis）阻害物質、ゲロニン、ミトゲリン、lestrikotシン、フェノマイシン、エノマイシン、及びトリコテセン類が挙げられる

10

20

30

40

50

。

#### 【0145】

ある態様において、当該剤は、標識剤である。「標識剤」（または検出可能な標識）とは、抗体を検出可能に標識する剤を意味しており、それによって抗体を、対象の応用法（たとえば *in vitro* 及び／もしくは *in vivo* 研究、ならびに／または臨床応用）において検出することができる。対象の検出可能な標識としては、放射性同位元素、検出可能な産物を生成する酵素（たとえば西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ等）、蛍光性タンパク質、常磁性原子等が挙げられる。ある態様において、当該抗体は、検出可能な標識の特異的結合パートナーに結合されている（たとえば、検出が、アビジン／ストレプトアビジンを含有する検出用標識を介して発生するよう、ビオチンに結合している）。

#### 【0146】

ある実施形態によると、当該剤は、たとえば近赤外線（NIR）光学イメージング、単光子放出コンピューター断層（SPECT）/CT画像法、ポジトロン放出断層画像法（PET）、核磁気共鳴（NMR）分光法等の *in vivo* 画像解析法における用途が見いだされる標識剤である。そのような応用法における用途が見いだされる標識剤としては、限定されないが、蛍光性標識、放射性同位元素等が挙げられる。ある態様において、当該標識剤は、2以上の画像解析法を用いた *in vivo* 画像解析法が可能となるような複合型 *in vivo* 画像解析剤である（たとえば、Thorp-Greenwood and Coogan (2011) Dalton Trans. 40: 6129-6143 を参照のこと）。

#### 【0147】

ある態様において、当該標識剤は、近赤外光（NIR）画像解析法において用途が見いだされる *in vivo* 画像解析剤であり、当該剤は、Kodak X-SIGHT 色素、Pz 247、DyLight 750 及び 800 Fluors、Cy 5.5 及び 7 Fluors、Alexa Fluor 680 及び 750 Dyes、IRDye 680 及び 800 CW Fluors から選択される。ある実施形態によると、当該標識剤は、SPECT 画像解析法における用途が見いだされる *in vivo* 画像解析剤であり、当該剤は、<sup>99m</sup>Tc、<sup>111</sup>In、<sup>123</sup>In、<sup>201</sup>Tl、及び<sup>133</sup>Xe から選択される。ある態様において、当該標識剤は、ポジトロン放出断層（PET）画像解析法における用途が見いだされる *in vivo* 画像解析剤であり、当該剤は、<sup>11</sup>C、<sup>13</sup>N、<sup>15</sup>O、<sup>18</sup>F、<sup>64</sup>Cu、<sup>62</sup>Cu、<sup>124</sup>I、<sup>76</sup>Br、<sup>82</sup>Rb 及び<sup>68</sup>Ga から選択される。

#### 【0148】

##### 結合方法

本発明はまた、抗体複合体の作製方法を開示するものである。当該方法は、C末端アミノ酸伸長を含有する軽鎖ポリペプチドを含有する抗体に剤を結合することを含み、当該伸長はシステイン残基を含有し、当該剤は、当該C末端アミノ酸伸長のシステイン残基に、直接、または間接的（たとえばリンカーを介して）に結合される。1つの実施形態において、当該方法は、当該C末端伸長の外側のシステインではなく、当該C末端アミノ酸伸長のシステイン残基に優先的に（または「偏向的に」）剤が結合することを含む。ある態様において、当該結合は、たとえばマレイミド化学反応、ハロアセチル化学反応、ピリジルジスルフィド化学反応、または本明細書に記述される他の任意の適切な化学反応を用いて、当該システイン残基のスルフヒドリル基にリンカーを結合させることを含む。当該複合体を作製する方法はさらに、結合工程の前に、たとえば上述の適切な還元剤及び反応条件を用いて、システイン残基をスルフヒドリル基（すなわちチオール）に還元することを含む。適切な還元剤としては、限定されないが、DTPA、システアミン、TCEP（トリス（2-カルボキシエチル）ホスフィン塩酸塩）、それらの組み合わせ等が挙げられる。ある実施形態において、当該複合体を作製する方法は、C末端伸長を含有する軽鎖ポリペプチドを含有する抗体と還元剤を接触させることを含む。ある実施形態において、当該複合体を作製する方法は、C末端アミノ酸伸長を含有する軽鎖ポリペプチドを含有する抗体

10

20

30

40

50

と、第一の還元剤を接触させ、次いで、C末端アミノ酸伸長を含有する軽鎖ポリペプチドを含有する抗体と、第二の還元剤を接触させることを含む。本発明の別の実施形態では、当該軽鎖伸長内のシステインが合成産物としてすでに還元状態にあるため、還元工程を必要としない。ある実施形態において、還元抗体は、適切な酸化剤と接触させられてもよい。適切な酸化剤としては、限定されないが、デヒドロアスコルビン酸(DHAA)等が挙げられる。抗体に結合される剤は、任意の有用な剤であってもよい。ある態様において、当該剤は、治療剤または標識剤であり、当該剤は、本明細書の他の箇所に記述されている。

#### 【0149】

ある態様において、当該剤は、マレイミド化学反応を用いて当該C末端伸長のシステインに連結されている。マレイミド基は、当該反応混合物のpHがpH6.5~7.5の間にある場合にスルフヒドリル基と特異的に反応してもよく、それにより、安定なチオエーテル結合が形成される。たとえば、マレイミド改変剤(たとえば、薬剤)を、C末端アミノ酸伸長の還元システイン(たとえば、スルフヒドリル基またはチオール基)と反応させ、当該剤と抗体の間にチオエーテル結合を形成させてもよい。よりアルカリ性の条件下(pH>8.5)では、第一級アミンを、マレイミドとの反応に対し、チオールと競合させてもよく、また、当該マレイミド基の非反応性マレアミド酸への加水分解の速度を上げてもよい。マレイミドは、チロシン、ヒスチジン、またはメチオニンとは反応しない。マレイミドをベースとしたリンカーを用いた生体結合法は、たとえば、Hermanson, G.T., Bioconjugate Techniques, 2nd ed. San Diego, CA Academic Press 2008; Aslam & Dent, Bioconjugation: Protein Coupling Techniques for the Biomedical Sciences, London Macmillan Reference Ltd 1998; Kalia & Raines, Advances in Bioconjugation, Curr. Org. Chem. 14(2):138-147に記述されている。本発明の実施形態に従う、マレイミドをベースとしたリンカーを用いた適切な結合方法の例は、本明細書の実施例の項に詳細に記述されている。

#### 【0150】

ある実施形態によると、当該剤は、ハロアセチル化学反応を用いて当該C末端伸長のシステインに連結されている。ある態様において、ヨードアセチル基またはプロモアセチル基を含有するハロアセチルリンカーが用いられる。ある実施形態において、ハロアセチル基は、生理学的なpHでスルフヒドリル基と反応する。当該ヨードアセチル基の反応は、スルフヒドリル基由来の硫黄原子とヨウ素原子の求核置換により進行し、それにより、安定したチオエーテル結合が生じる。

#### 【0151】

ある態様において、当該剤は、ピリジルジスルフィド化学反応を用いて、当該C末端伸長のシステインに連結される。ある実施形態において、ピリジルジスルフィドは、広範なpH範囲(pH4~5が最適)で、スルフヒドリル基と反応し、ジスルフィド結合を形成する。当該反応の間、ジスルフィド交換が、当該抗体のスルフヒドリル基と2-ピリジルジチオール改変剤の2-ピリジルジチオール基の間に発生する。結果として、ピリジン-2-チオンが放出され、分光光度法により測定され(Amax=343nm)、当該反応の進行をモニターすることができる。

#### 【0152】

当該剤が(たとえばリンカーを介して)付加されるC末端アミノ酸伸長のシステイン中に還元スルフヒドリルを生成するために、当該システインは、還元スルフヒドリル基を生成するのに十分な条件下で、適切な還元剤と接触させてもよい。ある態様において、当該還元剤は、システアミン塩酸塩、2-メルカプトエタノール、ジチオスレイトール(DTT)、2-メルカプトエチルアミン、トリス(2-カルボキシル)ホスフィン(TCEP)、システインHC1、N-エチルマレイミド、ナシステリン(Nacystein)

10

20

30

40

50

、ドルナーゼアルファ、サイモシン 4、グアイフェネシン T C E P H C 1、及びそれらの任意の組み合わせから選択される。そのような還元剤の反応条件は当分野に公知であり、たとえば元の抗体中に存在しているシステイン残基（たとえば、軽鎖及び重鎖の C<sub>L</sub> と C<sub>H</sub> 1 の間のジスルフィド結合に関するシステイン残基、及び / または重鎖のヒンジ領域の間のジスルフィド結合に関するシステイン残基）に対し、当該 C 末端伸長中に存在するシステイン（複数含む）の優先的または「偏向的」な還元を促進するために、最適化されていてもよい。本発明の別の実施形態では、合成産物として当該軽鎖伸長内のシステインはすでに還元状態であるため、還元工程は必要としない。

#### 【 0 1 5 3 】

当該 C 末端アミノ酸伸長の外側の 1 以上のシステインよりも、当該 C 末端アミノ酸伸長のシステイン（複数含む）のシステインを優先的に還元する（または当該 C 末端アミノ酸伸長のシステイン（複数含む）を排他的に還元する）ことは、適切な還元条件を選択することにより行われる。ある態様において、適切な還元条件は、以下の 1 つ以上の適切な選択を含む：還元剤に、当該 C 末端アミノ酸伸長のシステインの還元を優先させる立体的かさ高さを有する、軽度な還元剤及び / もしくは還元剤；還元剤と基質の濃度；還元反応が行われる温度、還元反応混合物の pH；還元反応に用いられる緩衝剤；ならびに / または伸長 C 末端軽鎖ポリペプチドを発現する細胞が、たとえば、当該 C 末端伸長上に遊離チオールを得るための、及び / もしくは還元分子間ジスルフィドの作製を容易にするための条件下で培養されること。

#### 【 0 1 5 4 】

##### 医薬組成物

上記に要約されるように、本発明により、組成物が開示される。本発明の組成物は、上述のいずれかの抗体、複合体、核酸、ベクター及び / または宿主細胞を含有してもよい。本発明の態様には、医薬組成物が含まれる。ある実施形態において、当該医薬組成物は、本明細書のいずれかに記述される任意の抗体（たとえば、上述のシステイン残基を含有する C 末端アミノ酸伸長を含有する軽鎖ポリペプチドを含有する抗体）、または本明細書のいずれかに記述される任意の複合体（たとえば、上述のシステイン残基を含有する C 末端アミノ酸伸長を含有する軽鎖ポリペプチドを有する抗体構成要素を含有する複合体）、及び薬学的に受容可能な添加剤を含有する。当該医薬組成物中に存在する抗体または複合体は、本発明の抗体、または本発明の複合体に関し、任意の組み合わせで、上述の特性のいずれかを含有してもよい。たとえば、抗体の C 末端伸長、または複合体の抗体部分は、伸長の長さ、伸長を構成するアミノ酸、伸長中のスペーサーの数、及びそのアミノ酸配列、1 以上のスペーサーと 1 以上のシステインの組み合わせに基づいた伸長の構造、ならびに上述及び本明細書のいずれかに記述される C 末端伸長の任意の他の態様に関し、上述の C 末端伸長の特性のいずれかを含有してもよい。

#### 【 0 1 5 5 】

医薬組成物は通常、本発明の抗体または複合体の治療有効量を含有する。有効量は、1 回以上の投与で投与されてもよい。

#### 【 0 1 5 6 】

本発明の抗体または複合体は、所望される治療効果または診断的效果が得られる任意の簡便な手段を用いて患者に投与されてもよい。ゆえに、当該抗体または複合体は、治療用投与のための様々な剤型に組み込まれてもよい。より具体的には、当該抗体は、適切な、薬学的に受容可能な担体または希釈物質と組み合わせることにより、医薬組成物に処方されてもよく、及び固体、半固体、液体、または気体状の形態で製剤へと処方されてもよい（たとえば、錠剤、カプセル、粉末、顆粒、軟膏、溶液、注射物、吸入物、及びエアロゾル等）。

#### 【 0 1 5 7 】

患者への投与に適した（たとえば、ヒト投与に適した）本発明抗体または複合体の製剤は、通常、滅菌されており、及び、検出可能な発熱物質、または選択された投与経路により患者への投与が禁忌とされている他の混入物質がない状態であってもよい。

10

20

30

40

50

## 【0158】

医薬投与剤型において、抗体は、その薬学的に受容可能な塩の形態で投与されてもよく、または単独で用いられてもよく、もしくは他の薬学的に活性な化合物と適切に結合されて、ならびに組み合わせて用いられてもよい。以下の方法及び添加剤は、単に例示であり、限定ではない。

## 【0159】

経口用調整物に関しては、当該抗体または複合体は、単独、または錠剤、粉末、顆粒もしくはカプセルを作製するのに適した添加剤と組み合わせて用いられてもよく、たとえば、標準的な添加剤（たとえばラクトース、マンニトール、コーンスターク、またはポテトスターク）；結合剤（たとえば結晶セルロース、セルロース誘導体、アカシア、コーンスタークまたはゼラチン等）；崩壊剤（たとえばコーンスターク、ポテトスターク、またはカルボキシメチルセルロースナトリウム等）；潤滑剤（たとえば滑石、またはステアリン酸マグネシウム等）；及びもし所望される場合には、希釈剤、緩衝材、湿潤剤、保存剤、及び香味剤と組み合わされて用いられてもよい。10

## 【0160】

当該抗体または複合体は、水性溶媒もしくは非水性溶媒（たとえば植物油または他の類似した油、合成脂肪酸グリセリド、高次脂肪酸エステル、またはプロピレングリコール等）中への溶解、懸濁、または乳化により、及びもし所望の場合には、標準的な添加剤（たとえば可溶化剤、等張剤、懸濁剤、乳化剤、安定化剤、及び保存剤）とともに注射用調整物へと製剤化されてもよい。20

## 【0161】

本発明の医薬組成物は、所望される純度を有する抗体または複合体と、任意選択的な生理学的に受容可能な担体、添加剤、安定化剤、界面活性剤、緩衝剤、及び／または等張化剤を混合することにより調製されてもよい。受容可能な担体、添加剤、及び／または安定化剤は、用いられる投与量及び濃度で、受領者に対し非毒性であり、及び緩衝剤（たとえばリン酸、クエン酸、及び他の有機酸）；抗酸化剤（アスコルビン酸、グルタチオン、システイン、メチオニン及びクエン酸を含有する）；保存剤（たとえばエタノール、ベンジルアルコール、フェノール、m - クレゾール、p - クロロ - m - クレゾール、メチルパラベンもしくはプロピルパラベン、塩化ベンザルコニウム、またはそれらの組み合わせ）；アミノ酸（たとえば、アルギニン、グリシン、オルニチン、リシン、ヒスチジン、グルタミン酸、アスパラギン酸、イソロイシン、ロイシン、アラニン、フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、メチオニン、セリン、プロリン及びそれらの組み合わせ）；单糖、二糖、及び他の炭水化物；低分子量ポリペプチド（約10残基未満）；タンパク質（たとえばゼラチンまたは血清アルブミン）；キレート剤（たとえばEDTA）；糖類（たとえばトレハロース、スクロース、ラクトース、グルコース、マンノース、マルトース、ガラクトース、フルクトース、ソルボース、ラフィノース、グルコサミン、N - メチルグルコサミン、ガラクトサミン、及びノイバラミン酸）；及び／または非イオン性界面活性剤（たとえば、Tween、Brij Pluronics、Triton - X、またはポリエチレングリコール（PEG））を含有する。30

## 【0162】

当該医薬組成物は、液状、凍結乾燥状態、または凍結乾燥状態から再構成された液状であってもよく、当該凍結乾燥調製物は、投与前に滅菌溶液を用いて再構成されるものである。凍結乾燥組成物を再構成するための標準的な手順は、ある量の純水（通常、凍結乾燥の間に除去された体積と等量）を加え戻すことであるが、抗菌剤を含有する溶液を経口投与用医薬組成物の作製に用いてもよい。40

## 【0163】

本発明に従う医薬組成物中の提示的な抗体濃度または複合体濃度は、約1mg / mL～約200mg / mL、または約50mg / mL～約200mg / mL、または約150mg / mL～約200mg / mLの範囲であってもよい。

## 【0164】

50

20

30

40

50

当該抗体または複合体の水性剤型は、pH緩衝溶液（たとえば、約4.0～約7.0、または約5.0～約6.0もしくは約5.5の範囲）中で調製されてもよい。この範囲内のpHに適した緩衝液の例としては、リン酸緩衝液、ヒスチジン緩衝液、クエン酸緩衝液、スクシン酸緩衝液、酢酸緩衝液、及び他の有機酸緩衝液が挙げられる。緩衝液濃度は、たとえば緩衝剤及び製剤の所望される等張性に依存し、約1mM～約100mM、または約5mM～約50mMであってもよい。

#### 【0165】

当該製剤の等張性を調節するために、等張剤が抗体製剤または複合体製剤に含有されてもよい。例示的な等張剤としては、塩化ナトリウム、塩化カリウム、グリセリン、及びアミノ酸、糖類の任意の成分、並びにそれらの組み合わせが挙げられる。一部の実施形態において、水性製剤は、等張であるが、高張溶液、または低張溶液が適切であってもよい。「等張」という用語は、たとえば生理学的塩溶液または血清等の比較される数種の他の溶液と同じ等張性を有する溶液を意味する。等張剤は、約5mM～約350mMの量で（たとえば、100mM～350mMの量で）用いられてもよい。

10

#### 【0166】

また、製剤化された抗体もしくは複合体の凝集を低下させるため、及び／または当該製剤中の粒子形成を最小化するため、及び／または吸着を低下させるために、当該抗体または複合体製剤に界面活性剤を添加してもよい。例示的な界面活性剤としては、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル（Tween）、ポリオキシエチレンアルキルエーテル（Brrij）、アルキルフェニルポリオキシエチレンエーテル（Triton-X）、ポリオキシエチレン・ポリオキシプロピレンコポリマー（Poloxamer、Pluronics）、及び硫酸ドデシルナトリウム（SDS）が挙げられる。適切なポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステルの例は、ポリソルベート20（Tween20（商標）の商標で販売されている）及びポリソルベート80（Tween80（商標）の商標で販売されている）である。適切なポリエチレン・ポリプロピレンコポリマーの例は、Pluronic（登録商標）F68またはPoloxamer188（商標）の名称で販売されている製品である。適切なポリオキシエチレンアルキルエーテルの例は、Brrij（商標）の商標で販売されている製品である。界面活性剤の濃度の例は、約0.001～約1%w/vの範囲であってもよい。

20

#### 【0167】

30

また、凍結乾燥プロセスの間の不安定な状態に対し、活性成分（たとえば当該抗体または当該複合体）を保護する目的で、凍結保護材が添加されていてもよい。たとえば、公知の凍結保護材としては、糖類（グルコース及びスクロースを含む）；ポリオール（マンニトール、ソルビトール、及びグリセロールを含む）；及びアミノ酸（アラニン、グリシン及びグルタミン酸を含む）が挙げられる。凍結保護材は、約10mM～500nMの量で含有されてもよい。

#### 【0168】

40

ある態様において、当該製剤は、本発明の抗体または複合体、及び上述の剤（たとえば、界面活性剤、緩衝液、安定化剤、等張剤）を1種以上含有し、1種以上の保存剤（たとえば、エタノール、ベンジルアルコール、フェノール、m-クレゾール、p-クロロ-m-クレゾール、メチルパラベンまたはプロピルパラベン、塩化ベンザルコニウム、及びそれらの組み合わせ等）を実質的に含まない。他の実施形態において、保存剤が当該製剤中に（たとえば、約0.001～約2%（w/v）の範囲の濃度で）含まれている。

#### 【0169】

たとえば、当該製剤は、非経口投与に適した液体（たとえば、水性溶液またはエマルション）、またはその凍結乾燥製剤であってもよく、対象抗体または複合体を約1mg/mL～約200mg/mL；少なくとも1つの界面活性剤を約0.001%～約1%；緩衝剤を約1mM～約100mM；任意選択的に安定化剤を約10mM～500mM；及び等張剤を約5mM～約305mMを含有してもよく、ならびに約4.0～約7.0のpHを有している。

50

## 【0170】

本発明の抗体または複合体は、吸入を介した投与のために、エアロゾル製剤中で用いられてもよい。当該抗体は、たとえばジクロロジフルオロメタン、プロパン、窒素等の受容可能な加圧ガス中で製剤化されてもよい。

## 【0171】

経口投与用の単位投与剤型（たとえば、シロップ、エリキシル、及び懸濁液等）が提供されてもよく、ここで、各投与単位は、たとえば小さじ一杯、大さじ一杯、または錠剤であり、1以上の阻害物質を含有する組成物の所定量を含有する。同様に、注射用または静脈内投与用の単位投与剤型は、滅菌水、通常の生理食塩水、または他の薬学的に受容可能な担体の溶液として、組成物中に抗体または複合体を含有してもよい。

10

## 【0172】

本明細書において、「単位投与剤型」という用語は、ヒト及び動物対象に対する单一投薬量として適した、物理的に別個の単位を指し、各単位は、薬学的に受容可能な希釈物質、担体またはビヒクルとともに、所望の効果を得るために十分な量で算出された本発明化合物の所定量を含有する。対象抗体または複合体の仕様は、用いられる特定の抗体、得られる効果、及び宿主中の各抗体に関連した薬力学に依存しうる。

## 【0173】

ある態様において、医薬組成物（任意選択的に、単位投与剤型で提供される）は、約10mg/mL～約1000mg/mL、たとえば約25mg/mL～約500mg/mL、約50mg/mL～約250mg/mL、約75mg/mL～約200mg/mL、または約100mg/mL～約150mg/mL（たとえば約125mg/mL）の濃度の本発明抗体または複合体を含有する。

20

## 【0174】

一部の実施形態において、当該抗体または複合体は、放出制御製剤で製剤化される。徐放性製剤は、当分野公知の方法を用いて調製されうる。徐放性製剤の適切な例としては、当該抗体を含有する固体疎水性ポリマーの半透過性マトリクスを含有するものであり、当該マトリクスは、造形品の形態（たとえば、フィルムまたはマイクロカプセル等）である。徐放性マトリクスの例としては、ポリエステル、L-L-グルタミン酸とエチル-L-L-グルタミン酸のコポリマー、非分解性エチレンビニル酢酸、ハイドロゲル、ポリラクチド、分解性乳酸-グリコール酸コポリマー、及びポリ-D-( - )-3-ヒドロキシ酪酸が挙げられる。

30

## 【0175】

本発明の範囲内の放出制御は、多くの持続放出型の投与剤型のうちの任意の1つを意味すると捉えられる。以下の用語は、本発明の目的に対し、実質的に放出制御と同等であるとみなされ得る：連續放出、制御放出、遅延放出、蓄積（デポー）、漸次放出、長期間放出、プログラム化放出、延長放出、比例放出（proportionate release）、長期的放出、貯蔵（レポジトリ）、遅延（retard）、徐放、間隔放出、持続的放出（sustained release）、時限被膜、時限放出、遅延作用、延長作用、層状化時限作用、長期的作用、継続作用、反復作用、遅延作用、遅滞作用、持続作用、持続作用医薬品、及び持続的放出（extended release）。

40

## 【0176】

適切な投薬量は、様々な臨床因子に基づき、医師の参加により、または他の適格な医療従事者により決定されることができる。医療分野において公知であるが、任意の1人の患者に対する投薬量は、患者の大きさ、身体の表面積、年齢、投与される特定の抗体または複合体、患者の性別、時間及び投与経路、一般健康状態、及び同時に投与される他の薬剤を含む、多くの因子に依存する。本発明の抗体または複合体は、1回投与量当たり1ng/体重kg～25mg/体重kg（たとえば、0.1mg/体重kg～10mg/体重kg、たとえば、0.5mg/体重kg～8mg/体重kg、たとえば、1mg/体重kg～6mg/体重kg、たとえば、2mg/体重kg～5mg/体重kg）の量で投与されてもよい；しかしながら、特に前述の因子を考慮し、これらの例示範囲を下回る、または

50

上回る投与量も想定されうる。もしレジメンが連続点滴である場合、 $1 \mu\text{g} \sim 10 \text{mg}$  / 体重  $\text{kg}$  / 分の範囲であってもよい。

#### 【0177】

当業者であれば、投与量が、特定の抗体、症状の重症度、及び副作用に対する当該対象の感受性に応じて変化しうることを容易に認識しうるであろう。所与の化合物に対する好みの投与量は、様々な手段により、当業者に容易に決定されうる。

#### 【0178】

標準的な、及び薬学的に受容可能な投与経路としては、静脈内、動脈内、筋肉内、鼻腔内、気管内、皮下、皮内、局所投与、経鼻、経口、及び他の腸内投与経路及び非経口投与経路が挙げられる。<sup>10</sup> 投与経路は、もし所望であれば、組み合わされてもよく、または当該抗体もしくは複合体及び／または所望される効果に基づき調節されてもよい。当該医薬組成物は、単回投与または複数回投与で投与されてもよい。一部の実施形態において、当該組成物は静脈内投与される。一部の実施形態において、当該組成物は経口的に投与される。一部の実施形態において、当該組成物は、吸入経路を介して投与される。一部の実施形態において、当該組成物は、鼻腔内に投与される。一部の実施形態において、当該組成物は、局所投与される。一部の実施形態において、当該組成物は、頭蓋内に投与される。

#### 【0179】

##### 治療方法

本発明は、疾患または障害の治療方法を開示するものである。当該方法は、本明細書のいずれかに記述される抗体、複合体、または医薬組成物のいずれかの治療有効量を、その必要のある対象に投与することを含んでもよい。当該抗体または複合体は、単独で投与されてもよく（たとえば、単剤療法）、または1以上の追加の治療剤と組み合わされて投与されてもよい（たとえば、併用療法）。

#### 【0180】

一部の実施形態において、当該抗体または複合体の有効量は、単独（たとえば単剤療法）または1以上の追加の治療剤と組み合わされて（たとえば併用療法）、1以上の投与量で投与された際に、当該抗体または複合体を用いた治療を行わなかった個体における症状と比較し、少なくとも約5%、少なくとも約10%、少なくとも約15%、少なくとも約20%、少なくとも約25%、少なくとも約30%、少なくとも約40%、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、少なくとも約90%以上まで、個体における疾患または障害の症状を低下させるために有効な量である。

#### 【0181】

本発明の方法を用いて、対象の疾患または症状のいずれかを治療してもよい。ある態様において、当該方法を用いて、癌が治療される。たとえば、一部の実施形態において、本発明抗体または複合体は、当該抗体または複合体が有効量で投与された際に、宿主における癌細胞（複数含む）の増殖、転移及び／または浸潤を阻害する。「癌細胞」とは、たとえば、異常な細胞の成長、異常な細胞の増殖、密度依存性増殖阻害の消失、固定非依存性増殖潜在力、腫瘍増殖を促進する能力、及び／もしくは免疫不全の非ヒト動物モデルにおける発生、ならびに／または細胞変質の任意の適切な指標のうちの1以上により特徴づけられ得る腫瘍性細胞性の表現型を示す細胞を意味する。「癌細胞」は、本明細書において、「腫瘍細胞」、「悪性細胞」、または「癌性細胞」と相互交換可能に用いられてもよく、及び固形腫瘍、半固形腫瘍、原発腫瘍、転移腫瘍等の癌細胞を包含する。

#### 【0182】

ある態様において、当該方法が癌治療を目的とした場合、当該抗体または当該複合体の抗体成分は、癌細胞の表面上の抗原に特異的に結合する。「抗原」と及び「エピトープ」という用語は、当分野において公知であり、免疫システムの構成要素（たとえば抗体またはT細胞抗原受容体）により特異的に認識される高分子（たとえばポリペプチド）の一部を指す。本明細書において、「抗原」という用語は、抗原性エピトープ、たとえば抗原性エピトープである抗原の断片を包含する。また、ハプテンは、抗原の例である。エピトープ

10

20

30

40

50

は、溶液中の抗体（たとえば、他の分子から遊離している）により認識されてもよい。エピトープは、当該エピトープが、クラスIまたはクラスIIの主要組織適合性複合体分子に関連づけられている場合、T細胞抗原受容体により認識されてもよい。

#### 【0183】

がん治療に関連した対象抗原としては、腫瘍特異的抗原が挙げられ、たとえば、悪性細胞の表面上に存在し、非悪性細胞上には存在しない抗原がある。他の態様において、抗体に結合される抗原は、腫瘍関連抗原である。「腫瘍関連抗原」とは、悪性細胞上で発現され、正常組織の細胞上にはわずかしか発現されない抗原、正常細胞に対して悪性細胞上で、非常に高密度で発現される抗原、または発生段階で発現される抗原を意味する。

#### 【0184】

任意の腫瘍関連抗原または腫瘍特異的抗原が、本発明抗体または複合体の標的とされてもよい。ある態様において、本発明が、癌治療を目的としたものである場合、本発明抗体または本発明複合体の抗体成分に特異的に結合される抗原は、限定されないが、HER2、CD19、CD22、CD30、CD33、CD56、CD66/CEACAM5、CD70、CD74、CD79b、CD138、ネクチン-4、メソテリン、膜貫通型糖蛋白質NMB(GPNMB)、前立腺特異的膜抗原(PSMA)、SLC44A4、CA6、CA-IX、または対象の任意の他の腫瘍関連抗原もしくは腫瘍特異的抗原を含んでもよい。

#### 【0185】

抗体の特徴に関連し、「特異的に結合すること」または「特異的に結合する」とは、異なる抗原の均一な混合物中に存在する特定の抗原に選択的に結合する抗体の能力を指す。ある実施形態において、特異的結合相互作用は、試料または生物体(例えば、ヒト)において、一部の実施形態においては、約10～100倍以上(たとえば、約1000倍または10,000倍超)で、望ましい抗原と望ましくない抗原(または「標的」と「標的ではない」抗原)を識別する。ある実施形態において、抗体-抗原複合体中で特異的に結合される場合、抗体と抗原の間のアフィニティは、 $10^{-6}$ M未満、 $10^{-7}$ M未満、 $10^{-8}$ M未満、 $10^{-9}$ M未満、 $10^{-10}$ M未満、 $10^{-11}$ M未満、または約 $10^{-12}$ M未満のKD(解離定数)により特徴づけられる。

#### 【0186】

本発明方法を用いて治療されうる癌は、限定されないが、固形腫瘍、乳がん、前立腺がん、すい臓がん、大腸がん、腎細胞がん、ホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫、未分化大細胞リンパ腫、急性骨髓性白血病、多発性骨髄腫、及び抗体ベースの療法または抗体複合体ベースの療法を用いて治療されうる任意の他のタイプの癌が挙げられる。

#### 【0187】

##### キット

本発明はまた、キットを開示する。ある実施形態によると、当該キットは、本明細書のいずれかに記述される特性のいずれかを有する、本発明の抗体、複合体または医薬組成物のいずれかを含有しうる。あるいは、またはさらに、当該キットは、本発明抗体、またはその軽鎖ポリペプチド、または本発明の複合体のいずれかの作製に有用な任意の試薬を含有してもよい。たとえば、当該キットは、システイン含有C末端アミノ酸伸長を含有する抗体軽鎖ポリペプチドをコードする核酸を含有してもよい。そのようなキットは、たとえば、本発明抗体または複合体の作製に用途が見いだされるコンピテント細胞、または1以上の抗体軽鎖ポリペプチド及び/もしくは重鎖ポリペプチドをコードする核酸をすでに有している細胞、当該C末端軽鎖ポリペプチド伸長中のシステイン残基のスルフヒドリル基を還元するための還元剤、システイン残基の還元スルフヒドリル基に剤を結合させるためのリンカー、剤(リンカーに付加される、またはリンカーから分離される)、試薬、緩衝液、精製カラム等、またはその任意の組み合わせを含有してもよい。当該キットは、本発明方法(たとえば、疾患もしくは障害の治療方法、抗体軽鎖ポリペプチドの作製方法、及び/または抗体複合体の作製方法)の実施において、用途が見いだされる。

#### 【0188】

10

20

30

40

50

当該方法を実施するためのキットは、本明細書に開示される抗体または複合体を含有する医薬組成物を1つ以上含有してもよい。ゆえに、当該キットは、1以上の単位剤型として、単一の医薬組成物を含有してもよい。さらに他の実施形態において、当該キットは、2以上の別々の医薬組成物を含有してもよい。

#### 【0189】

当該キットの構成要素は、別々の容器に存在してもよく、または複数の構成要素が1つの容器に存在してもよい。ある実施形態において、凍結乾燥形態で当該構成要素が備えられることが簡便であり、それにより、すぐに使用でき、室温で簡便に保存することができる。

#### 【0190】

上述の構成要素に加え、本発明のキットはさらに、本発明抗体もしくは複合体を用いた疾患または障害の治療のための、または本発明抗体もしくは複合体を作製するための当該キットの構成要素の使用説明書を含有してもよい。当該説明書は通常、適切な記録媒体に記録されている。たとえば、当該説明書は、紙またはプラスチック等の基板上に印刷されていてもよい。当該説明書は、添付文書として当該キット中に存在してもよく、当該キットまたはその構成要素の容器のラベル中に存在してもよい（すなわち、パッケージまたはサブパッケージに関連づけられている）。他の実施形態において、当該説明書は、適切なコンピューター読み取りが可能な記憶媒体（たとえばCD-ROM、ディスクケット、ハードディスクドライブ(HDD)等）に存在する電子記憶データとして存在する。さらに他の実施形態において、実際の説明書はキット中には存在しないが、遠隔ソースから、たとえばインターネットを介して当該説明書を得るための手段が備えられている。本実施形態の例は、当該説明書を見ることができるウェブアドレス、及び／または当該説明書をダウンロードすることができるウェブアドレスを含むキットである。説明書と同様に、説明書を得るための手段は、適切な基板上に記載されている。

10

#### 【0191】

以下の実施例は、限定ではなく、解説の目的で提示されるものである。

#### 【実施例】

#### 【0192】

##### 実施例1

C末端軽鎖ポリペプチドシステイン含有伸長を有する抗体をコードする核酸のクローニング

30

ヒトIgG1C及びヒトIgGkCクローニングベクターを作製するために、ヒトIgGC及びIgkC領域をpTT5ベクターへとクローニングした（図1）。定常領域を伴う、インフレームでの可変領域のクローニングを容易にするために、制限酵素部位を定常領域の5'末端に導入した。重鎖定常領域配列を、GCC TCCからGCT AGCへと変え、元のアミノ酸配列を維持しながらNheI制限酵素部位を導入した。軽鎖ポリペプチド定常領域配列を、CGAACCTからCGTACCGへと変え、元のアミノ酸配列を維持しながらBsiWI制限酵素部位を作製した。当該変化は、Operon-Eurofinsから購入したミスマッチPCRプライマーを設計することにより導入した。pTT5ベクターはBsiWI部位を含有していなかったため、IgkC5'プライマーを、5'NheIオーバーハンギングを用いて設計し、当該ベクターへのクローニングを容易にした。3'プライマーは、ストップコドンのBamHI制限酵素部位3'を用いて設計した。

40

#### 【0193】

PCR反応のcDNA鑄型を作製するために、Qiagen（登録商標）RNeasy（登録商標）ミニプレップキットを用いてヒト末梢血からRNAを抽出し、cDNAは、Invitrogen（商標）から購入したオリゴdTプライマーとSuperscript（登録商標）III逆転写酵素を用いて合成した。

#### 【0194】

PCRの後、断片及びベクターを、関連制限酵素を用いて消化し、1%アガロースゲル

50

で分離した。消化断片は Q i a g e n ゲル抽出キットを用いてゲルから抽出し、T 4 D N A リガーゼ (New England Biolabs) を用いてベクターにライゲートした。コンピテント D H 5 大腸菌 (Invitrogen) を形質転換し、単一細胞コロニーを、アンピシリン選択 L B プレート上で一晩、37 度で増殖させた。プラスミドを単離するために、単一細胞コロニーを、液体 L B - アンピシリン培地に播種し、一晩、37 度で増殖させ、プラスミドを Q i a g e n (登録商標) Q I A p r e p (登録商標) スピンミニプレップキットを用いて単離した。クローンは、ミニプレップ D N A 消化によりスクリーニングし、B i o m a t t e r s から購入した G e n e i o u s 配列アライメント、アセンブリ、及び解析のソフトウェアを用いた配列解析により確認した。クローニングに用いたプライマーの配列を表 1 に示す。

10

【0195】

【表 1】

表 1 IgGC 及び IgKC クローニングプライマー

|                   |         |   |
|-------------------|---------|---|
| NheI のための hIgGC   | 配列番号 75 | ATTA GCTAGCACCAAGGGCCC ATCGGTCTTC         |
| hIgGC_rev_BamHI   | 配列番号 76 | GATATGGATCCTCATTTACCCGGAGACAGGGAA         |
| hKC_for_NheI_BsiW | 配列番号 77 | TATGCTAGCGTCGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATC |
| hKC_rev_BamHI     | 配列番号 78 | GATGGATCCCTAACACTCTCCCCTGTTGAAGC          |

20

【0196】

E R B B 特異的抗体 4 D 5 ヒト化変異体 8 を作製するために、ハーセプチン V 遺伝子を、I D T (登録商標) (Integrated DNA Technologies) からの g B l o c k s (登録商標) 遺伝子断片として合成した。合成された配列を表 2 に示す。

【0197】

【表2】

表2 ハーセプチンV配列

|                       |        |   |    |
|-----------------------|--------|---|----|
| ハーセプチンV H<br>アミノ酸配列   | 配列番号79 | MEFGLSWVFLVAILKGVQCEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCA<br>ASGFNIKDTYIHWRQAPGKGLEWARIYPTNGYTRYADSVK<br>GRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAM<br>DYWGQGTLTVSSASTKGPSV  |    |
| ハーセプチンV H<br>ヌクレオチド配列 | 配列番号80 | AGTCAGTCGGAATTGCCACCATGGAGTTGGGCTGAGCTGG<br>GTTTCTTGTGCTATTTAAAGGTGTCCAGTGTGAGGTG<br>CAGCTGGTGGAGAGCGGCGGCCTGGTGCAGCCGGCGC<br>AGCCTGAGACTGAGCTGCCGCCAGCGGCTTCAACATCAAG<br>GACACCTACATCCACTGGGTGAGACAGGCCCCCTGGCAAGGGC<br>CTGGAGTGGGTGGCCAGAACCTACCCCACCAACGGCTACACC<br>AGATACGCCAGCGTGAAGGGCAGATTACCATCAGCGCC<br>GACACCAGCAAGAACACCGCCCTACCTGCAGATGAACAGCCTG<br>AGAGCCGAGGAACACGCCGTGACTACTGCAGCAGATGGGGC<br>GGCAGCGCTTCTACGCCATGGACTACTGGGCCAGGGCAC<br>CTGGTACCGTGAGCAGCGTAGCACCAAGGGCCATCGGTC<br>TT | 10 |
| ハーセプチンV K<br>アミノ酸配列   | 配列番号81 | MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARCDIQMTQSPSSLASVGDRVT<br>ITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFYLSGVPSRF<br>SGSRSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQHYTPPTFGQGTV<br>EIKRTVAAPSV   | 20 |
| ハーセプチンV K<br>ヌクレオチド配列 | 配列番号82 | AGTCAGTCGGAATTGCTACCATGGACATGAGGGTCCCCGCT<br>CAGCTCTGGGCTCTGCTACTCTGGCTCCGAGGTGCCAGA<br>TGTGACATCCAGATGACCCAGAGCCCCAGCAGCCTGAGCGCC<br>AGCGTGGCGACAGAGTGAACATCACCTGCAGAGCCAGCCAG<br>GACGTGAACACCGCCGTGGCTGGTACCAAGCAGAACGCCGGC<br>AAGGCTCCAAAGCTGCTGATCTACAGCGCCAGCTTCTGTAC<br>AGCGGCGTGCCAGCAGATTACGGGGCAGCAGAACGCCGGCACC<br>GACTTCACCCCTGACCATCAGCAGCCTGCAGCCGGAGGACTTC<br>GCCACATACTACTGCCAGCAGCACTACACCACCCCTCCCACC<br>TTCGGCCAGGGCACCAAGGTGGAGATCAAGCGTACGGTGGCT<br>GCACCATCTGTCT                 | 30 |

## 【0198】

当該断片は、上述されたように、重鎖ポリペプチドに対しては E c o R I と N h e I 消化を用いて、軽鎖ポリペプチドに対しては E c o R I と B s i W I 消化を用いて、上述された定常領域 p T T 5 ベクターへとクローニングされた。

## 【0199】

軽鎖ポリペプチドに ( G G G S C ) × 伸長を付加するために ( × は、付加されたリピートの数である)、3'末端プライマーを設計し、所望の配列を Eurofins MWG Operon に注文した(表3に示す)。P C R 反応の鑄型として上述のハーセプチンV K 構築物を用いて、標準的なクローニング法が行われた。4システム構築物を作製するために、2工程のオーバーラッピング法が用いられ、プライマー-I g k \_ r e v \_ 3 \_ c y s は最初の P C R に用いられ、次いで、プライマー-I g k \_ r e v \_ 4 \_ c y s \_ B a m と、鑄型として最初の P C R から得られた P C R 産物を用いて増幅が行われた。すべての反応において用いられた 5' プライマーは、p T T 5 \_ f o r (表3) であった。P C R 断片を消化し、クローニングし、上述のように解析した。

## 【0200】

40

50

## 【表3】

表3 軽鎖ポリペプチドC末端にシステインを付加するために用いられたクローニングプライマー

|                   |        |   |
|-------------------|--------|---|
| IgK_rev_1_cys_Bam | 配列番号83 | ACG TGG ATC CTC AAC AGC TTC CCC CTC CAC ACT<br>CTC CCC TGT TGA AGC  |
| IgK_rev_2_cys_Bam | 配列番号84 | ACG TGG ATC CTC AAC AGC AGC TTC CCC CTC CGC AGC<br>TTC CTC CTC CAC ACT CTC CCC TGT TGA AGC                            |
| IgK_rev_3_cys_Bam | 配列番号85 | ACG TGG ATC CTC AAC AGC AGC TTC CCC CTC CGC AGC<br>TTC CTC CTC CGC AAG ATC CTC CTC CTC CAC ACT CTC<br>CCC TGT TGA AGC |
| IgK_rev_3_cys     | 配列番号86 | ACA GCT TCC CCC TCC GCA GCT TCC TCC TCC GCA<br>AGA TCC TCC TCC ACA CTC TCC CCT GTT GAA GC                             |
| IgK_rev_4_cys_Bam | 配列番号87 | ACG TGG ATC CTC AGC AGC TTC CTC CTC CAC AGC<br>TTC CCC CTC CGC AGC T  |
| pTT5_for          | 配列番号88 | TGC GCT AAG ATT GTC AGT TTC CA  |

10

## 【0201】

## 実施例2 - 抗体作製及び精製

20

上述の実施例1で作製されたプラスミドのQiagenマキシプレップを行い、トランスフェクション用のプラスミドを単離した。HEK293細胞に、ハーセプチン重鎖及びハーセプチン軽鎖cys構築物を用いて、293フェクチン(Invitrogen)を用いて共トランスフェクトした。細胞をFreestyle 293発現培地(Gibco)(0.1%Pluronic F68(Gibco)溶液を補充)中で5日間、増殖させた。トランスフェクションの24時間後、細胞に0.5%トリプトンを補充した。上清を回収し、プロテインAセファロースバッチ重力プロトコール(GEHealthcare)を用いて分泌抗体を精製し、次いで、Amicon(登録商標)Ultra 15フィルター(30kDa MWカットオフ)(Millipore)を用いて、PBS pH7.4に緩衝液交換を行った。

30

## 【0202】

## 実施例3 - ハーセプチン VLCysXジスルフィド結合の還元

PBSに溶解したハーセプチン及びハーセプチンVLCysX(X=1、2または4)の試料(1~5mg)を、100mMリン酸、50mMNaCl、2mMDTPA、pH6.1に前調整したZeba(商標)スピナカラム(Pierce、カタログ#87767)にアプライし、メーカーの説明書に従い緩衝液交換を行った。タンパク質濃度を確立するための標準物としてハーセプチン、及び遊離チオール基の無い場合を確立するための標準物としてシステインを使用したEllman's試薬を用いて、ビシンコニン酸アッセイ(Pierce、#23225)により溶出物を解析した。

40

## 【0203】

ハーセプチンまたはハーセプチンVLCysX(5~30μM)(100mMリン酸、50mMNaCl、2mMDTPA、pH6.1に溶解)は、同じ緩衝液に溶解した1.0Mストックからのシステアミン塩酸塩(5~10mM)を添加し、室温または37のいずれかで40~180分間インキュベーションを行うことにより還元した。室温にまで冷却した後、100mMリン酸、50mMNaCl、2mMDTPA、pH6.1で前調整したZeba(商標)スピナカラム(40kDa MWCO)を通すことにより、反応混合物からシステアミンを除去した。余剰システアミンが除去されたことを確認するために、システイン連続希釈のアッセイにより作製された標準曲線を使用したEllman's試薬を用いて解析した。また、このアッセイにより、タンパク質当たりの平均チオール含量の測定値がいくつか得られた。

50

## 【0204】

## 実施例4 - ハーセプチン VL Cy s Xの細胞毒性剤への結合

上述の実施例3の溶出物を氷上で冷却した後、マレイミド毒素 (toxin 1、または toxin 2) が、10 mM DMSOストック溶液（通常、チオール当たり2.0 eq あり、等量が還元ハーセプチン対照に加えられている（ハーセプチン toxin 2））から添加された。精製及び緩衝液交換（20 mM クエン酸ナトリウム、pH 5.5）の前に、氷上で30～70分間、結合反応を進ませた。精製された複合体を滅菌ろ過（Cistar（登録商標）Spin-X（登録商標）0.22 μm遠心フィルター、#8161）を行い、BCA試薬を用いて総タンパク質含量の解析を行った。

## 【0205】

10

本明細書において、「Toxin 1」は、MC-vc-PABC-毒素であり、当該毒素は、(S,E)-N-(4-(アミノメチル)ベンジルスルホニル)-2,5-ジメチル-4-((S)-N,3,3-トリメチル-2-((S)-3-メチル-2-(メチルアミノ)-3-フェニルブタンアミド)ブタンアミド)ヘキサ-2-エナミドである。

## 【0206】

本明細書において、「Toxin 2」は、MC-vc-毒素であり、当該毒素は、(S,E)-N-(4-アミノベンジルスルホニル)-2,5-ジメチル-4-((S)-N,3,3-トリメチル-2-((S)-3-メチル-2-(メチルアミノ)-3-フェニルブタンアミド)ブタンアミド)ヘキサ-2-エナミドである。

## 【0207】

20

本明細書において、「Toxin 3」は、MT-vc-毒素であり、当該毒素は、(S,E)-N-(4-アミノフェニルスルホニル)-2,5-ジメチル-4-((S)-N,3,3-トリメチル-2-((S)-3-メチル-2-(メチルアミノ)-3-フェニルブタンアミド)ブタンアミド)ヘキサ-2-エナミドである。

## 【0208】

本明細書において、「Toxin 4」は、MP(T-vc-毒素)<sub>2</sub>であり、当該毒素は、(S,E)-N-(4-アミノフェニルスルホニル)-2,5-ジメチル-4-((S)-N,3,3-トリメチル-2-((S)-3-メチル-2-(メチルアミノ)-3-フェニルブタンアミド)ブタンアミド)ヘキサ-2-エナミドである。

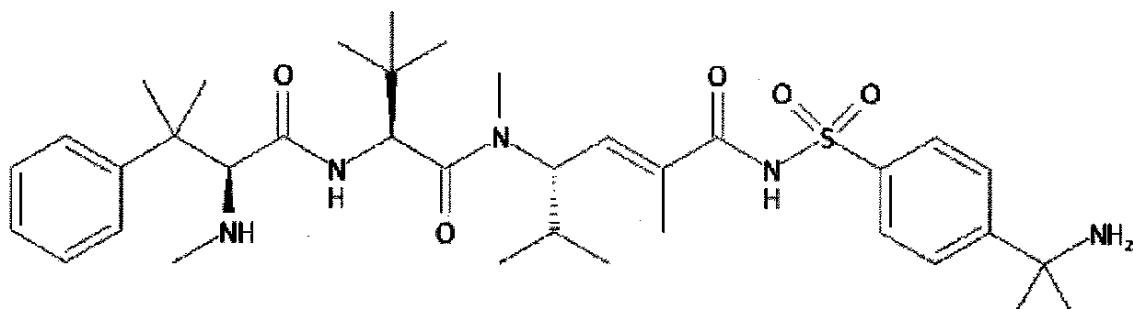
## 【0209】

30

本明細書において、「Toxin 5」は、MT-vc-PABC-毒素であり、当該毒素は、(S,E)-N-(4-(アミノメチル)ベンジルスルホニル)-2,5-ジメチル-4-((S)-N,3,3-トリメチル-2-((S)-3-メチル-2-(メチルアミノ)-3-フェニルブタンアミド)ブタンアミド)ヘキサ-2-エナミドである。

## 【0210】

## 【化1】



## 【0211】

本明細書において、「Toxin 6」は、MT-vc-毒素であり、当該毒素は、以下

50

である：

【0212】

実施例5 - 癌細胞の活性に対する、ハーセプチンVLCysXの効果の検証

上述の実施例4で作製された抗体薬剤複合体を、Her2陽性ヒト乳がん細胞株HCC1954に対し、様々な濃度で検証を行った。化合物添加の前日、HCC1954細胞(100 μL)を、不透明壁で、透明な底の96ウェル組織培養処置マイクロタイタープレートに、完全増殖培地を用いて、2500細胞/10 μL培地の密度で添加した。HCC1954細胞は、一晩、37/5%CO<sub>2</sub>でインキュベートし、マイクロタイターブレート表面に細胞を付着させた。抗体薬剤複合体は、所望される最終最大濃度の5倍で完全増殖培地中に希釈され、次いで、化合物は、同じ培地、8工程で1:3に用量設定された。化合物がない対照(増殖培地のみ)は、6連で、各マイクロタイターブレートに含まれた。調製された化合物希釈を3連でHCC1954細胞に添加した(25 μL/ウェル)。細胞及び化合物希釈は、3~5晩、37/5%CO<sub>2</sub>でインキュベートした。インキュベーション後、CellTiter-Glo(登録商標)試薬を用いて、各アッセイウェルに調整済みのCellTiter-Glo(登録商標)を30 μL添加することにより、細胞活性を測定した。マイクロプレートルミノメーターを用いて発光を測定する前に、最短で20分間、混合物をインキュベートした(500msの積分時間)。集められた相対発光単位(RLU)は、上述の増殖培地単独対照を用いて、細胞毒性%に転換された(細胞毒性% = 1 - [ウェルRLU / 平均培地単独対照RLU])。Prism Graph Padソフトウェアで使用可能な非線形回帰法を用いて、データを曲線に適合させた。本実験から得られたデータを示すグラフは図3に示す。Her-VLCys2-toxin2、Her-VLCys1-toxin1、及びハーセプチン-toxin2のEC50値は、表4に示す。

【0213】

【表4】

表4-Her-VLCys2-toxin、Her-VLCys1-toxin、及びハーセプチン-toxinのEC50値

|                    | EC50 (nM) |
|--------------------|-----------|
| Her-VLCys2-toxin 2 | 0.04      |
| Her-VLCys1-toxin 1 | 0.12      |
| ハーセプチン-toxin 2     | 22.68     |

【0214】

実施例6 - C末端軽鎖ポリペプチドシスティン含有伸長を含有する、追加の抗体をコードする核酸のクローニング

追加の軽鎖伸長を作製するために、IDT(登録商標)の合成gBlocks(登録商標)遺伝子断片を、所望の配列で注文し、Gibsonアセンブリクローニングキット(New England Biolabs)を用いて、ハーセプチンVKヘインフレームでクローニングした。すべてのクローンは、配列を確認され、実施例1に記述されたように解析された。

【0215】

軽鎖アミノ酸配列、及び当該配列をコードする核酸配列を、以下の表5に示す。

【0216】

【表5-1】

表5-追加の抗体軽鎖のアミノ酸配列、及び当該アミノ酸配列をコードする核酸配列

| 名称及び配列番号                     | 概要   | 配列 (AA)  |    |
|------------------------------|--|--|----|
| ハーセプチン-Igk-Ig_伸長1<br>配列番号104 | ハーセプチン VL及びhIgk定常領域 (Km3アロタイプ) + EPKSCDKTHTC tail (ヒト Ig G 1 ヒンジ由来の配列)     | RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSG<br>TASVVCCLNNFYPREAKVQ<br>WKVDNALQSGNSQESVTEQ<br>DSKDSTYSLSSTLTLSKADY<br>EKKVYACEVTHQGLSSPVT<br>KSFnRGECEPKSCDKTHTC        | 10 |
| ハーセプチン-Igk-Ig_伸長2<br>配列番号105 | ハーセプチン VL及びhIgk 定常領域 (Km3アロタイプ) + EPKSCDKTHTCPPC tail (ヒト Ig G 1 ヒンジ由来の配列) | RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSG<br>TASVVCCLNNFYPREAKVQ<br>WKVDNALQSGNSQESVTEQ<br>DSKDSTYSLSSTLTLSKADY<br>EKKVYACEVTHQGLSSPVT<br>KSFnRGECEPKSCDKTHTCP<br>PC |    |
| ハーセプチン-Igk-Ig_伸長3<br>配列番号106 | ハーセプチン VL及びhIgk定常領域 (Km3アロタイプ) + EPKSC tail (ヒト Ig G 1 ヒンジ由来の配列)           | RTVAAPSVFIFPPSDEQFKSG<br>TASVVCCLNNFYPREAKVQ<br>WKVDNALQSGNSQESVTEQ<br>DSKDSTYSLSSTLTLSKADY<br>EKKVYACEVTHQGLSSPVT<br>KSFnRGECEPKSC              | 20 |
| ハーセプチン-Igk-Ig_伸長4<br>配列番号107 | ハーセプチンVL及びhIgk定常領域 (Km3アロタイプ) + ESKYGPPC tail (ヒト Ig G 4 ヒンジ由来の配列)         | RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS<br>VVCLLNNFYPREAKVQ<br>WKVDNALQSGNSQESVTEQ<br>DSKDSTYSLSSTLTLSKADY<br>EKKVYACEVTHQGLSSPVT<br>KSFnRGECESKYGPPC           |    |
| ハーセプチン-Igk-Ig_伸長5<br>配列番号108 | ハーセプチンVL及びhIgk定常領域 (Km3アロタイプ) + ERKCCVECPPC tail (ヒト Ig G 2 ヒンジ由来の配列)      | RTVAAPSVFIFPPSDEQEKGSTAS<br>VVCLLNNFYPREAKVQ<br>WKVDNALQSGNSQESVTEQ<br>DSKDSTYSLSSTLTLSKADY<br>EKKVYACEVTHQGLSSPVT<br>KSFnRGECERKCCVECPPC        | 30 |
| ハーセプチン-Igk-Ig_伸長6<br>配列番号109 | ハーセプチンVL及びhIgk定常領域 (Km3アロタイプ) + ERKC tail (ヒト Ig G 2 ヒンジ由来の配列)             | RTVAAPSVFIFPPSDEQEKGSTAS<br>VVCLLNNFYPREAKVQ<br>WKVDNALQSGNSQESVTEQ<br>DSKDSTYSLSSTLTLSKADY<br>EKKVYACEVTHQGLSSPVT<br>KSFnRGECERK                | 40 |

【表 5 - 2】

| 名称及び配列番号                          | 概要  | 配列 (AA)  |    |
|-----------------------------------|---|--|----|
| ハーセプチン-Igk-Igk<br>伸長7<br>配列番号110  | ハーセプチン VL及びhIgk定常領域 (Km3アロタイプ) + DVITMDPKDNC tail (ヒト TCR g ヒンジ由来の配列)           | RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS<br>VVCLLNNFYPREAKVQ<br>WKVDNALQSGNSQESVTEQ<br>DSKDSTYSLSSTLTLSKADY<br>EKKVYACEVTHQGLSSPVT<br>KSFRGECDVITMDPKDNC               | 10 |
| ハーセプチン-Igk-Ig<br>伸長8<br>配列番号111   | ハーセプチンVL及びhIgk定常領域 (Km3アロタイプ) + DHVKPKETENTKQPSKSCHKPK tail (ヒト TCR d ヒンジ由来の配列) | RTVAAPSVFIFPPSDEQEKGTA<br>VVCLLNNFYPREAKVQ<br>WKVDNALQSGNSQESVTEQ<br>DSKDSTYSLSSTLTLSKADY<br>EKKVYACEVTHQGLSSPVT<br>KSFRGECDHVVKPKETENTK<br>QPSKSCHKPK |    |
| ハーセプチン-Igk-Ig<br>伸長9<br>配列番号112   | ハーセプチンVL及びhIgk定常領域 (Km3アロタイプ) + ESSC tail (ヒト TCR a ヒンジ由来の配列)                   | RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS<br>VVCLLNNFYPREAKVQ<br>WKVDNALQSGNSQESVTEQ<br>DSKDSTYSLSSTLTLSKADY<br>EKKVYACEVTHQGLSSPVT<br>KSFRGECESSC                      | 20 |
| ハーセプチン-Igk-Ig<br>伸長 10<br>配列番号113 | ハーセプチンVL及びhIgk定常領域 (Km3アロタイプ) + ESSCDVKLV tail (ヒト TCR a ヒンジ由来の配列)              | RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS<br>VVCLLNNFYPREAKVQ<br>WKVDNALQSGNSQESVTEQ<br>DSKDSTYSLSSTLTLSKADY<br>EKKVYACEVTHQGLSSPVT<br>KSFRGECESSCDVKLV                 |    |
| ハーセプチン-Igk-Ig<br>伸長 11<br>配列番号114 | ハーセプチンVL及びhIgk定常領域 (Km3アロタイプ) + DHVKPKETENTKQPSKSC tail (ヒト TCR d ヒンジ由来の配列)     | RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS<br>VVCLLNNFYPREAKVQ<br>WKVDNALQSGNSQESVTEQ<br>DSKDSTYSLSSTLTLSKADY<br>EKKVYACEVTHQGLSSPVT<br>KSFRGECDHVVKPKETENTK<br>QPSKSC   | 30 |
| ハーセプチン-Igk-Ig<br>伸長 12<br>配列番号115 | ハーセプチンVL及びhIgk定常領域 (Km3アロタイプ) + DVITMDPKDNC SKDAN tail (ヒト TCR g ヒンジ由来の配列)      | RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS<br>VVCLLNNFYPREAKVQ<br>WKVDNALQSGNSQESVTEQ<br>DSKDSTYSLSSTLTLSKADY<br>EKKVYACEVTHQGLSSPVT<br>KSFRGECDVITMDPKDNC<br>SKDAN      | 40 |

【0217】

【表 6 - 1】

| 名称                           | 概要   | 配列 (NT)   |
|------------------------------|--|---|
| ハーセプチン-Igk-Ig_伸長1<br>配列番号116 | ハーセプチン VL及びhIgk 定常領域 (Km3アロタイプ) + EPKSCDKTHTC tail (ヒト Ig G1 ヒンジ由来の配列) | GGCCAGGGCACCAAGGTGG<br>AGATCAAGCGTACGGTGGC<br>TGCACCATCTGTCTTCATCT<br>TCCCGCCATCTGATGAGCA<br>GTTGAAATCTGGAACTGCC<br>TCTGTTGTGTGCCTGCTGAA<br>TAACTTCTATCCCAGAGAG<br>GCCAAAGTACAGTGGAAAGG<br>TGGATAACGCCCTCCAATC<br>GGGTAACTCCCAGGAGAGT<br>GTCACAGAGCAGGACAGCA<br>AGGACAGCACCTACAGCCT<br>CAGCAGCACCCCTGACGCTG<br>AGCAAAGCAGACTACGAG<br>AAACACAAAGTCTACGCC<br>GCGAAGTCACCCATCAGGG<br>CCTGAGCTCGCCCCGTACA<br>AAGAGCTTCAACAGGGGAG<br>AGTGTGAGCCTAACGCTG<br>TGACAAAGACTCACACGTGT<br>TGAGGATCCCCGACCTCG<br>ACCTCTGGCT          |
| ハーセプチン-Igk-Ig_伸長2<br>配列番号117 | ハーセプチンVL及びhIgk定常領域 (Km3アロタイプ) +EPKSCDKTHTCPPC tail (ヒト Ig G1 ヒンジ由来の配列) | GGCCAGGGCACCAAGGTGG<br>AGATCAAGCGTACGGTGGC<br>TGCACCATCTGTCTTCATCT<br>TCCCGCCATCTGATGAGCA<br>GTTGAAATCTGGAACTGCC<br>TCTGTTGTGTGCCTGCTGAA<br>TAACTTCTATCCCAGAGAG<br>GCCAAAGTACAGTGGAAAGG<br>TGGATAACGCCCTCCAATC<br>GGGTAACTCCCAGGAGAGT<br>GTCACAGAGCAGGACAGCA<br>AGGACAGCACCTACAGCCT<br>CAGCAGCACCCCTGACGCTG<br>AGCAAAGCAGACTACGAG<br>AAACACAAAGTCTACGCC<br>GCGAAGTCACCCATCAGGG<br>CCTGAGCTCGCCCCGTACA<br>AAGAGCTTCAACAGGGGAG<br>AGTGTGAGCCTAACGCTG<br>CGACAAAGACCCACACCTGT<br>CCACCTTGTGAGGATCCC<br>CCGACCTCGACCTCTGGCT |

【表 6 - 2】

| 名称                           | 概要  | 配列 (NT)   |
|------------------------------|---|---|
| ハーセプチン-Igk-Ig_伸長3<br>配列番号118 | ハーセプチンVL及びhIgk定常領域 (Km3アロタイプ) + EPKSC tail (ヒト Ig G 1 ヒンジ由来の配列)     | GGCCAGGGCACCAAGGTGG<br>AGATCAAGCGTACGGTGGC<br>TGCACCATCTGTCTTCATCT<br>TCCCGCCATCTGATGAGCA<br>GTTGAAATCTGGAACTGCC<br>TCTGTTGTGTGCCTGCTGAA<br>TAACTTCTATCCCAGAGAG<br>GCCAAAGTACAGTGGAAAGG<br>TGGATAACGCCCTCCAATC<br>GGGTAACTCCCAGGAGAGT<br>GTCACAGAGCAGGACAGCA<br>AGGACAGCACCTACAGCCT<br>CAGCAGCACCTGACGCTG<br>AGCAAAGCAGACTACGAG<br>AAACACAAAGTCTACGCCT<br>GCGAAGTCACCCATCAGGG<br>CCTGAGCTCGCCCGTCACA<br>AAGAGCTTCAACAGGGGAG<br>AGTGTGAACCAAAGTCCTG<br>TTGAGGATCCCCGACCTC<br>GACCTCTGGCT               |
| ハーセプチン-Igk-Ig_伸長4<br>配列番号119 | ハーセプチンVL及びhIgk定常領域 (Km3アロタイプ) + ESKYGP PPC tail (ヒト Ig G 4 ヒンジ由来配列) | GGCCAGGGCACCAAGGTGG<br>AGATCAAGCGTACGGTGGC<br>TGCACCATCTGTCTTCATCT<br>TCCCGCCATCTGATGAGCA<br>GTTGAAATCTGGAACTGCC<br>TCTGTTGTGTGCCTGCTGAA<br>TAACTTCTATCCCAGAGAG<br>GCCAAAGTACAGTGGAAAGG<br>TGGATAACGCCCTCCAATC<br>GGGTAACTCCCAGGAGAGT<br>GTCACAGAGCAGGACAGCA<br>AGGACAGCACCTACAGCCT<br>CAGCAGCACCTGACGCTG<br>AGCAAAGCAGACTACGAG<br>AAACACAAAGTCTACGCCT<br>GCGAAGTCACCCATCAGGG<br>CCTGAGCTCGCCCGTCACA<br>AAGAGCTTCAACAGGGGAG<br>AGTGTGAGTCTAAATATGG<br>ACCCCCGTGCTGAGGATCC<br>CCCGACCTCGACCTCTGGC<br>T |

【表 6 - 3】

| 名称                              | 概要   | 配列 (NT)   |
|---------------------------------|--|---|
| ハーセプチン-Igk-Ig<br>伸長5<br>配列番号120 | ハーセプチンVL及び hIgk 定常領域 (Km3アロタ<br>イブ) + ERKC tail (ヒト Ig G2 ヒンジ<br>由来配列) | GGCCAGGGCACCAAGGTGG<br>AGATCAAGCGTACGGTGGC<br>TGCACCCTGTCTTCATCT<br>TCCCGCCATCTGATGAGCA<br>GTTGAAATCTGGAACGTGCC<br>TCTGTTGTGTGCCTGCTGAA<br>TAACTTCTATCCCAGAGAG<br>GCCAAAGTACAGTGGAAAGG<br>TGGATAACGCCCTCCAATC<br>GGGTAACTCCCAGGAGAGT<br>GTCACAGAGCAGGACAGCA<br>AGGACAGCACCTACAGCCT<br>CAGCAGCACCTGACGCTG<br>AGCAAAGCAGACTACGAG<br>AACACAAAGTACGCCT<br>GCGAAGTCACCCATCAGGG<br>CCTGAGCTCGCCCGTCACA<br>AAGAGCTTCAACAGGGGAG<br>AGTGTGAGAGAAATGTTG<br>CGTAGAGTGTCCCTCCCTGC<br>TGAGGATCCCCGACCTCG<br>ACCTCTGGCT |
| ハーセプチン-Igk-Ig<br>伸長6<br>配列番号121 | ハーセプチンVL及び hIgk 定常領域 (Km3アロタ<br>イブ) + ERKC tail (ヒト Ig G2 ヒンジ由来<br>配列) | GGCCAGGGCACCAAGGTGG<br>AGATCAAGCGTACGGTGGC<br>TGCACCCTGTCTTCATCT<br>TCCCGCCATCTGATGAGCA<br>GTTGAAATCTGGAACGTGCC<br>TCTGTTGTGTGCCTGCTGAA<br>TAACTTCTATCCCAGAGAG<br>GCCAAAGTACAGTGGAAAGG<br>TGGATAACGCCCTCCAATC<br>GGGTAACTCCCAGGAGAGT<br>GTCACAGAGCAGGACAGCA<br>AGGACAGCACCTACAGCCT<br>CAGCAGCACCTGACGCTG<br>AGCAAAGCAGACTACGAG<br>AACACAAAGTACGCCT<br>GCGAAGTCACCCATCAGGG<br>CCTGAGCTCGCCCGTCACA<br>AAGAGCTTCAACAGGGGAG<br>AGTGTGAGCGGAAATGCTG<br>AGGATCCCCGACCTCGAC<br>CTCTGGCT                          |
|                                 |  | 10<br>20<br>30<br>40  |

【表 6 - 4】

| 名称                              | 概要   | 配列 (NT)   |
|---------------------------------|--|---|
| ハーセプチン-Igk-Ig<br>伸長7<br>配列番号122 | ハーセプチンVL及び hIgk 定常領域 (Km3アロタ<br>イブ)+DYITMDPKDNC tail (ヒト T C R g ヒンジ<br>由来配列)          | GCCAGGGCACCAAGGTGG<br>AGATCAAGCGTACGGTGGC<br>TGCACCATCTGTCCTCATCT<br>TCCCGCCATCTGATGAGCA<br>GTTGAAATCTGGAACTGCC<br>TCTGTTGTGCTGCTGAA<br>TAACTTCTATCCCAGAGAG<br>GCCAAAGTACAGTGGAAAGG<br>TGGATAACGCCCTCCAATC<br>GGGTAACTCCCAGGAGAGT<br>GTCACAGAGCAGGACAGCA<br>AGGACAGCACCTACAGCCT<br>CAGCAGCACCTGACGCTG<br>AGCAAAGCAGACTACGAG<br>AACACAAAGTCTACGCCT<br>GCGAAGTCACCCATCAGGG<br>CCTGAGCTCGCCCGTCACA<br>AAGAGCTTCAACAGGGGAG<br>AGTGTGACGTTATAACCAT<br>GGACCCGAAAGACAATTGC<br>TGAGGATCCCCGACCTCG<br>ACCTCTGGCT  |
| ハーセプチン-Igk-Ig<br>伸長8<br>配列番号123 | ハーセプチンVL及びhIgk 定常領域 (Km3アロタ<br>イブ)+DHVKPKETENTKQPSKSCHKPK tail (ヒト T C<br>R d ヒンジ由来配列) | GCCAGGGCACCAAGGTGG<br>AGATCAAGCGTACGGTGGC<br>TGCACCATCTGTCCTCATCT<br>TCCCGCCATCTGATGAGCA<br>GTTGAAATCTGGAACTGCC<br>TCTGTTGTGCTGCTGAA<br>TAACTTCTATCCCAGAGAG<br>GCCAAAGTACAGTGGAAAGG<br>TGGATAACGCCCTCCAATC<br>GGGTAACTCCCAGGAGAGT<br>GTCACAGAGCAGGACAGCA<br>AGGACAGCACCTACAGCCT<br>CAGCAGCACCTGACGCTG<br>AGCAAAGCAGACTACGAG<br>AACACAAAGTCTACGCCT<br>GCGAAGTCACCCATCAGGG<br>CCTGAGCTCGCCCGTCACA<br>AAGAGCTTCAACAGGGGAG<br>AGTGTGATCACGTGAAGCC<br>CAAGGAGACGGAGAAC<br>CAAACAAACCTCCAATCA<br>TGTCAACAAACAAAATGAG<br>GATCCCCCGACCTCGACCT<br>CTGGCT |

10

20

30

40

【表 6 - 5】

| 名称                                | 概要  | 配列 (NT)   |
|-----------------------------------|---|---|
| ハーセプチン-Igk-Ig<br>伸長9<br>配列番号124   | ハーセプチンVL及びhIgk 定常領域 (Km3アロタ<br>イブ)+ESSCテール(ヒトTCFaヒンジ由来配<br>列)         | GGCCAGGGCACCAAGGTGG<br>AGATCAAGCGTACGGTGGC<br>TGCACCATCTGCTTCATCT<br>TCCCGCCATCTGATGAGCA<br>GTTGAAATCTGGAACTGCC<br>TCTGTTGTGTGCCCTGCTGAA<br>TAACTTCTATCCCAGAGAG<br>GCCAAAGTACAGTGGAAAGG<br>TGGATAACGCCCTCCAATC<br>GGGTAACTCCCAGGAGAGT<br>GTCACAGAGCAGGACAGCA<br>AGGACAGCACCTACAGCCT<br>CAGCAGCACCTGACGCTG<br>AGCAAAGCAGACTACGAG<br>AAACACAAAGTCTACGCCT<br>GCGAAGTCACCCATCAGGG<br>CCTGAGCTCGCCCGTCACA<br>AAGAGCTTCAACAGGGGAG<br>AGTGTGAAAGCAGCTGTTG<br>AGGATCCCCGACCTCGAC<br>CTCTGGCT                    |
| ハーセプチン-Igk-Ig<br>伸長 10<br>配列番号125 | ハーセプチンVL及びhIgk 定常領域 (Km3アロタ<br>イブ)+ESSCDVKLV tail (ヒトTCRaヒンジ由<br>来配列) | GGCCAGGGCACCAAGGTGG<br>AGATCAAGCGTACGGTGGC<br>TGCACCATCTGCTTCATCT<br>TCCCGCCATCTGATGAGCA<br>GTTGAAATCTGGAACTGCC<br>TCTGTTGTGTGCCCTGCTGAA<br>TAACTTCTATCCCAGAGAG<br>GCCAAAGTACAGTGGAAAGG<br>TGGATAACGCCCTCCAATC<br>GGGTAACTCCCAGGAGAGT<br>GTCACAGAGCAGGACAGCA<br>AGGACAGCACCTACAGCCT<br>CAGCAGCACCTGACGCTG<br>AGCAAAGCAGACTACGAG<br>AAACACAAAGTCTACGCCT<br>GCGAAGTCACCCATCAGGG<br>CCTGAGCTCGCCCGTCACA<br>AAGAGCTTCAACAGGGGAG<br>AGTGTGAGAGCAGCTGCGA<br>TGTGAAATTGGCTGAGGA<br>TCCCCCGACCTCGACCTCT<br>GGCT |
|                                   |   | 10<br>20<br>30<br>40  |

【表 6 - 6】

| 名称                                | 概要  | 配列 (NT)   |
|-----------------------------------|---|---|
| ハーセプチン-Igk-Ig<br>伸長 11<br>配列番号126 | ハーセプチンVL及びhIgk 定常領域 (Km3アロタ<br>イブ)+DHYKPKE TENTKQPSKSC tail (ヒト T C R d<br>ヒンジ由来配列) | GGCCAGGGCACCAAGGTGG<br>AGATCAAGCGTACGGTGGC<br>TGCACCATCTGTCTTCATCT<br>TCCCGCCATCTGATGAGCA<br>GTTGAAATCTGGAACTGCC<br>TCTGTTGTGTGCCCTGCTGAA<br>TAACTTCTATCCCAGAGAG<br>GCCAAAGTACAGTGGAAAGG<br>TGGATAACGCCCTCCAATC<br>GGGTAACTCCCAGGAGAGT<br>GTCACAGAGCAGGGACAGCA<br>AGGACAGCACCTACAGCCT<br>CAGCAGCACCCGTACGCTG<br>AGCAAAGCAGACTACGAG<br>AAACACAAAGTCTACGCCT<br>GCGAAGTCACCCATCAGGG<br>CCTGAGCTCGCCCGTCACA<br>AAGAGCTTCAACAGGGGAG<br>AGTGTGATCATGTGAAGCC<br>TAAAGAAAACGGAGAAC<br>AAAACAGCCCAGTAAGAGC<br>TGTGAGGATCCCCGACC<br>TCGACCTCTGGCT |
| ハーセプチン-Igk-Ig<br>伸長 12<br>配列番号127 | ハーセプチンVL及びhIgk 定常領域 (Km3アロタ<br>イブ)+DVITMDPKDNCSKDAN tail (ヒト T C R g ヒ<br>ンジ由来配列)   | GGCCAGGGCACCAAGGTGG<br>AGATCAAGCGTACGGTGGC<br>TGCACCATCTGTCTTCATCT<br>TCCCGCCATCTGATGAGCA<br>GTTGAAATCTGGAACTGCC<br>TCTGTTGTGTGCCCTGCTGAA<br>TAACTTCTATCCCAGAGAG<br>GCCAAAGTACAGTGGAAAGG<br>TGGATAACGCCCTCCAATC<br>GGGTAACTCCCAGGAGAGT<br>GTCACAGAGCAGGGACAGCA<br>AGGACAGCACCTACAGCCT<br>CAGCAGCACCCGTACGCTG<br>AGCAAAGCAGACTACGAG<br>AAACACAAAGTCTACGCCT<br>GCGAAGTCACCCATCAGGG<br>CCTGAGCTCGCCCGTCACA<br>AAGAGCTTCAACAGGGGAG<br>AGTGTGATGTGATTACTAT<br>GGACCCAAAGGATAATTGC<br>AGTAAGGACGCTAATTGAG<br>GATCCCCCGACCTCGACCT<br>CTGGCT    |
|                                   |   | 10<br>20<br>30<br>40  |

## 【0218】

## 実施例 7 - 抗体作製及び精製

実施例 6 で作製されたクローニングの Q i a g e n マキシプレッピングを行い、トランスフェクションの準備が整ったプラスミドを単離した。293 フェクチン ( I n v i t r o g e n ) を用いて、H E K 2 9 3 細胞に、ハーセプチン重鎖とハーセプチン軽鎖 c y s 構築物

を共トランスフェクトした。細胞を Freestyle 293 発現培地 ( Gibco ) ( 0.1% Pluronic F68 ( Gibco ) 溶液を補充) 中で 5 日間、増殖させた。トランスフェクションの 24 時間後、細胞に 0.5% トリプトンを補充した。上清を回収し、AKTA express 装置及び HiTrap Mab Select Sure カラム ( カタログ # 11-0034-93 ) を用いて上清から分泌抗体を精製し、次いで、30 kDa MWカットオフの Amicon ( 登録商標 ) Ultra 15 フィルター ( Millipore ) を用いて、PBS pH 7.4 に緩衝液交換を行った。

#### 【 0219 】

##### 実施例 8 - 二重還元及び複合体化

ハーセプチン VL Spacer X ( 30 μM、PBS ) を、1.25 mM ジエチレントリアミンペニタ酢酸 ( DTPA ) ( 2.5 mM、pH 6.7 のストック溶液からの PBS 溶液 ) を添加し、次いで、システアミン塩酸塩 ( 最終濃度 1 mM ) を 1.0 M ストックから添加することにより、還元した。試料を、37 度で 120 分間、インキュベートした。室温にまで冷却した後、PBS + 1 mM DTPA pH 7.3 で前調整した Zeba ( 商標 ) スピンカラム ( 40 KDa MWCO ) を通すことにより、反応混合物からシステアミンを除去した。

#### 【 0220 】

溶出物を冷却した後、マレイミド毒素 ( toxin1、toxin3、または toxin4 ) が、10 mM DMSO ストック溶液 ( 通常、抗体濃度に基づき、5.0 eq があり、等量が還元ハーセプチン対照に加えられている ) から添加された。氷上で 30 ~ 70 分間、複合体化反応を進ませ、その後、PBS で前調整した Zeba ( 商標 ) スpinカラム ( 40 KDa MWCO ) を通した。

#### 【 0221 】

高い薬剤担持量を得るために、開始物質として複合体化された物質を用いて、上述の還元及び複合体化の手順を繰り返した。

#### 【 0222 】

##### 実施例 9 - 還元及び再酸化による、複合体化のための軽鎖伸長抗体の作製

軽鎖が伸長された全長モノクローナル抗体は、PBS 及び 1 mM DTPA 中で、2 時間、37 度、約 12 倍の TCEP ( トリス ( 2 - カルボキシエチル ) ホスフィン塩酸塩 ) を用いて還元された ( 最終抗体濃度は 2.5 mg / mL ) 。還元された軽鎖伸長抗体を、Zeba ( 商標 ) Spin Desalting Column、40 K MWCO にロードし、PBS を用いて溶出した。溶出された還元抗体を、10 等量の 10 mM デヒドロアスコルビン酸 ( DHAA ) を用いて、室温で 30 分間、PBS 中で処理した。

#### 【 0223 】

##### 実施例 10 - 軽鎖伸長抗体の複合体化

実施例 9 の再酸化された抗体を、抗体に対し 3.5 モル等量で組合せ、混合し、室温で約 1 時間反応させ、複合体化を行い、軽鎖伸長抗体 薬剤複合体 ( ADC ) ( Tsp2-Toxin3、Tsp3-Toxin3、Tsp4-Toxin3、Tsp5-Toxin3、Tsp6-Toxin3、Tsp9-Toxin3、Tsp10-Toxin3、Tsp10-Toxin4、Tsp10-Toxin1、Tsp11-Toxin3、TVLCys1-Toxin3 ( DAR 1.06 ) 、Bsp10-Toxin3、Bsp10-Toxin4、Bsp10-Toxin1、Bsp10-Toxin6、及び Bsp10-MCvc-PABC-MMAE を含む ) を形成させた。複合体混合物は、Zeba ( 商標 ) Spin Desalting Column、40 K MWCO にロードし、PBS で溶出した。

#### 【 0224 】

##### 実施例 11 - 抗体結合アッセイ

HER2 発現 MD A - MB - 231 細胞をトリプシン処理し、計数し、及び試料当たり 50,000 個の細胞を、非複合体化 MAb または複合体化 ADC とともに 24 時間、4 度、総量 50 μl でインキュベートした。10% ウシ胎児血清を補充した Leibovitz 50

t z ' s L 1 5 培地において、2 0 0 0 0 、4 0 0 0 、8 0 0 、1 6 0 、3 2 、6 . 4 、1 . 2 8 及び0 . 2 5 6 n g / m l で抗体をアプライした。インキュベーション後、細胞を氷冷したP B S + 1 % F B S 中で2回洗浄し、A l e x a 6 4 7 標識ヤギ抗ヒトI g G F c ( 2 u g / m L ) 二次抗体 + 2 . 5 u g / m L 7 - アミノアクチノマイシンDとともにインキュベートした。細胞を30分間インキュベートし、2回洗浄し、5 0  $\mu$  l

P B S + 1 % F B S 中に再懸濁し、及びフローサイトメトリーにより解析した。非複合化抗体に対する結合の結果を図4(パネルA及びB)に示し、A D Cに対する結合の結果を図5(パネルA及びB)に示す。「T S P 2」は、配列番号1 0 5 の軽鎖ポリペプチドを有する抗体である。「T S P 3」は、配列番号1 0 6 の軽鎖ポリペプチドを有する抗体である。「T S P 4」は、配列番号1 0 7 の軽鎖ポリペプチドを有する抗体である。「T S P 5」は、配列番号1 0 8 の軽鎖ポリペプチドを有する抗体である。「T S P 6」は、配列番号1 0 9 の軽鎖ポリペプチドを有する抗体である。「T S P 9」は、配列番号1 1 2 の軽鎖ポリペプチドを有する抗体である。「T S P 1 0」は、配列番号1 1 3 の軽鎖ポリペプチドを有する抗体である。「T S P 1 1」は、配列番号1 1 4 の軽鎖ポリペプチドを有する抗体である。V L c y s 1は、C末端軽鎖伸長G G G S C(配列番号6 0)を有するトラスツズマブである。  
10

#### 【0 2 2 5】

##### 実施例1 2 - 示差走査熱量測定法(D S C)

示差走査熱量測定法(D S C)実験を、試料：伸長1 0 を有するトラスツズマブ(T S P 1 0)、及びトラスツズマブ(T)(P B S溶液、p H 7 . 4)に対して行った。D S Cセルに試料をロードする前に、試料は、室温で平衡化され、緩衝液で希釈され、及び攪拌しながら8分間、真空中で脱気された。試料は、V P C a p i l l a r y - D S C、M i c r o C a lを用いて、6 0 /時のスキャン速度で、1 0 から1 0 0 までスキャンされた。対照細胞はP B S緩衝液を含有した。結果を図6に示す。

#### 【0 2 2 6】

##### 実施例1 3 - A l e x a 4 8 8 複合化

5 - マレイミド A l e x a 4 8 8を、上述の還元/複合化方法を用いてM A bに結合させた。抗体は、1 0 0  $\mu$  g / m lのP B S溶液から1 : 1 5 ~ 1 : 4 0 希釈された試料を用いて、各レーンに2 0  $\mu$  lロードされ、S D S - P A G Eにより解析された。ゲルは、A l e x a 4 8 8の蛍光を測定するT y p h o o n T r i o(商標)撮像装置(G E H e a l t h c a r e L i f e S c i e n c e)を用いて画像化された。結果を図7に示す。  
30

#### 【0 2 2 7】

##### 実施例1 4 - I n v i v o 実験のプロトコール

7 ~ 8週齢のメスのN O D / S C I D ガンマ(N S G)マウス(J a c k s o n)に、マトリゲルと1 : 1で混合された5 \* 1 0 6 N C I - N 8 7腫瘍細胞(A T C C C a t # C R L - 5 8 2 2)(総量は1 0 0  $\mu$  l)を接種した。腫瘍は、毎月曜日、水曜日、及び金曜日に測定された。腫瘍が1 5 0 ~ 2 0 0 mm<sup>3</sup>のサイズに到達した時点で、動物を以下の表6の処置群に割り当て、群間の平均腫瘍サイズの釣り合いをとった。「T」は、トラスツズマブの略語である。  
40

#### 【0 2 2 8】

## 【表7】

表6—in vivo実験の群

| 群番号 | 群の名称          | 投与量<br>(mg/kg) | DAR  |
|-----|---------------|----------------|------|
| 1   | ビヒクル          | N/A            | N/A  |
| 2   | TSP6-Toxin 3  | 12             | 1.8  |
| 3   | TSP4-Toxin 3  | 12             | 2.06 |
| 4   | TSP10-Toxin 4 | 12             | 1.66 |
| 5   | TSP10-Toxin 1 | 12             | 2.04 |
| 6   | TSP10-Toxin 3 | 12             | 2.12 |
| 7   | TSP10         | 12             | N/A  |

10

## 【0229】

動物は、表6に示される濃度で、各試験品を用いて単回静脈内注射により処置され、60日目まで、または腫瘍サイズが800mm<sup>3</sup>に到達するまで、毎月曜日、水曜日、及び金曜日に腫瘍計測が続けられた。すべての動物は、Injection Recordに示される用量を投与された。Post Injection Clinical Observation Record (PICOR) 形式を用いて、注射後の急性毒性をモニターした。体重の有意な低下はいずれの群においても観察されず、及び注射後の急性毒性反応もPICORファイルに記載されなかった。in vivo実験の結果は、図8に示す。

20

## 【0230】

実施例15-疎水性相互作用クロマトグラフィー(HIC)による、抗体薬剤複合体の解析

抗体薬剤複合体のHIC解析を、TSKgel Butyl-NPRカラム(2.5uM、4.6mm × 3.5cm)を用いて、280nmで、DADを備えたHP1100 Series HPLCで行った。当該方法は、95%から5%の線形勾配の移動相Aで、12分にわたり、1mL/分で泳動し、3分間、再平衡化し、95%Aに戻した(A:1.5M硫酸アンモニウム及び25mM第一リン酸ナトリウム、pH4.4; B:25%IPAの25mMリン酸ナトリウム溶液、pH4.73)。Chemistationソフトウェアを、データ回収、解析及びピーク面積定量に用いた。結果を図20~41に示す。

30

## 【0231】

実施例16-ネイティブサイズ排除クロマトグラフィーによる、抗体及び抗体薬剤複合体の解析

組み換え抗体及び抗体複合体の非変性SEC解析を、Acuity UPLC BEH 200 SECカラム(1.7uM、4.6mm × 150cm)を用いて、280nmで、DADを備えたHP1100 Series HPLCで行った。解析は、25mMリン酸ナトリウム及び150mM塩化ナトリウム緩衝液(pH6.8)を用いて、0.2mL/分で20分にわたり、均一濃度溶離を用いて行われた。Chemistationソフトウェアをデータ回収、解析、及びピーク面積定量に用いた。

40

## 【0232】

TSp10、TSp10-Toxin3、TSp10-Toxin1、TSp10-Toxin4、TSp6-Toxin3、TSp4-Toxin3のPBS溶液(1mg/mL、pH7)の個々の分注物を調製した。非変性SEC-UV解析(前述)は、37でのインキュベーションの前、ゼロ時点で、10μLの注入体積で行われた。各試料の分注物は、インキュベーションの191時間後、及びインキュベーションの330時間後に

50

、非変性 SEC - UV により解析された。各種の単量体ピーク面積の割合は、各ゼロ時点での測定値に対して調節された。

#### 【0233】

トラスツズマブ対照に関しては、タンパク質試料の 99.36% が単量体の状態であり、凝集体が別に 1つ、0.63% で存在していた。T - VLCys1 に関しては、タンパク質試料の 98.39% が単量体の状態であり、他に凝集体は、1.16%、0.266% 及び 0.175% で存在していた。T - SP2 に関しては、タンパク質試料の 96.5% が単量体の状態であり、別に 2つの凝集体が 0.3%、1.5% 及び 1.8% 存在していた。T - SP3 に関しては、タンパク質試料の 98.5% が単量体の状態であり、別に 2つの凝集体が 1.17% 及び 0.35% 存在していた。T - SP4 に関しては、タンパク質試料の 98% が単量体の状態であり、他に別の凝集体が 1.4%、0.39% 及び 0.22% 存在していた。T - SP5 に関しては、タンパク質試料の 94% が単量体の状態であり、別に 2つの凝集体が 2.1% 及び 3.2% 存在していた。T - SP6 に関しては、タンパク質試料の 89% が単量体の状態であり、他に別の凝集体が 1.5%、及び 8.8% 存在していた。T - SP7 に関しては、タンパク質試料の 95.95% が単量体の状態であり、他に別の凝集体が 3%、0.51% 及び 0.50% 存在していた。T - SP9 に関しては、タンパク質試料の 94.5% が単量体の状態であり、他に別の凝集体が 0.6%、3.8% 及び 1% 存在していた。T - SP10 に関しては、タンパク質試料の 97.3% が単量体の状態であり、他に別の凝集体が 2.2%、0.27% 及び 0.22% 存在していた。T - SP11 に関しては、タンパク質試料の 77.7% が単量体の状態であり、他に別の凝集体が 6.3%、8.6%、2.7% 及び 4.5% 存在していた。T - SP12 に関しては、タンパク質試料の 87.5% が単量体の状態であり、他に別の凝集体が 2.2%、1.6%、8.6% 及び 4.5% 存在していた。10  
20

#### 【0234】

実施例 17 - サイズ排除クロマトグラフィーによる抗体及び抗体薬剤複合体の解析 完全質量

組み換え抗体及び抗体薬剤複合体の完全質量解析のために、変性 SEC 高分解能質量分析法 (HRMS) を、Acquity UPLC BEH 200 SEC カラム (1.7 μM、4.6 mm × 150 cm) を用いて、280 nm で、PDA 検出器を備えた Waters Acuity H Class UPLC で行った。高分解能質量分析検出は、MicroMass Q-TOF Premier を用いて行われた (スキャン範囲は、250 ~ 4900 m/z)。解析は、0.1% TFA 及び 0.1% FA を用いて、70 / 30 H2O / ACN で、11 分にわたり、0.25 ml / 分で均一濃度溶離により行われた。データ回収及び解析は、MaxEnt 1 でデコンヴォルーションされたスペクトルで、MassLynx 4.1 を用いて行われた。30

#### 【0235】

配列番号 60 の伸長を有する抗体 (T - VLCys1) の結果を図 9 のパネル A - C に示す。配列番号 63 の伸長を有する抗体 (T - VLCys2) の結果を図 10 のパネル A - C に示す。配列番号 64 の伸長を有する抗体 (T - VLCys4) の結果を図 11 のパネル A 及び B に示す。配列番号 105 の軽鎖を有する抗体の結果を図 12 のパネル A 及び B に示す。配列番号 106 の軽鎖を有する抗体の結果を図 13 のパネル A ~ C に示す。配列番号 107 の軽鎖を有する抗体の結果を図 14 のパネル A ~ C に示す。配列番号 108 の軽鎖を有する抗体の結果を図 15 のパネル A 及び B に示す。配列番号 109 の軽鎖を有する抗体の結果を図 16 のパネル A ~ C に示す。配列番号 110 の軽鎖を有する抗体の結果を図 17 のパネル A ~ C に示す。配列番号 113 の軽鎖を有する抗体の結果を図 18 のパネル A ~ C に示す。配列番号 114 の軽鎖を有する抗体の結果を図 19 のパネル A ~ C に示す。40

#### 【0236】

実施例 18 - *in vitro* 細胞増殖アッセイ

*in vitro* 細胞増殖アッセイは、上述の実施例 5 に記述される方法と類似した方50

法を用いて行われ、様々なトラスツズマブ（「T」）ベースのADC及び対照を用いて、HER2発現HCC1954細胞、HER2発現N87細胞、及びHER2抗原陰性Jurkat細胞を処置した。「遊離Toxin1」は、上述のToxin3の遊離形態（すなわち、抗体に結合されていない）である。結果は図42～53に示し、以下の表7及び8に要約する。

【0237】

【表8】

表7—in vitro細胞増殖アッセイの結果（HCC1954細胞  
及びJurkat細胞）

10

| 細胞株     | 試料             | DAR | EC50 (nM) |
|---------|----------------|-----|-----------|
| HCC1954 | Tsp2-Toxin3    | 1.9 | 0.029     |
|         | Tsp3-Toxin3    | 1.9 | 0.051     |
|         | Tsp4-Toxin3    | 2.1 | 0.044     |
|         | Tsp5-Toxin3    | 1.5 | 0.110     |
|         | Tsp6-Toxin3    | 1.8 | 0.061     |
|         | Tsp9-Toxin3    | 1.3 | 0.187     |
|         | Tsp10-Toxin3   | 2.1 | 0.067     |
|         | Tsp11-Toxin3   | 2.7 | 0.087     |
|         | TVLCys1-Toxin3 | 1.1 | 0.118     |
|         | Tsp10          |     |           |
|         | トラスツズマブ        |     |           |
| Jurkat  | 遊離Toxin1       |     | 0.2989    |
|         | Tsp2-Toxin3    | 1.9 |           |
|         | Tsp3-Toxin3    | 1.9 |           |
|         | Tsp4-Toxin3    | 2.1 |           |
|         | Tsp5-Toxin3    | 1.5 |           |
|         | Tsp6-Toxin3    | 1.8 |           |
|         | Tsp9-Toxin3    | 1.3 |           |
|         | Tsp10-Toxin3   | 2.1 |           |
|         | Tsp11-Toxin3   | 2.7 |           |
|         | TVLCys1-Toxin3 | 1.1 |           |
|         | Tsp10          |     |           |
| Jurkat  | トラスツズマブ        |     |           |
|         | 遊離Toxin1       |     | 0.1787    |

20

30

【0238】

## 【表9】

表8—in vitro細胞増殖アッセイの結果（N87細胞）

| 細胞株 | 試料             | DAR | EC50 (nM) |
|-----|----------------|-----|-----------|
| N87 | Tsp2-Toxin3    | 1.9 | 0.031     |
|     | Tsp3-Toxin3    | 1.9 | 0.017     |
|     | Tsp4-Toxin3    | 2.1 | 0.016     |
|     | Tsp5-Toxin3    | 1.5 | 0.040     |
|     | Tsp6-Toxin3    | 1.8 | 0.035     |
|     | Tsp9-Toxin3    | 1.3 | 0.078     |
|     | Tsp10-Toxin3   | 2.1 | 0.018     |
|     | Tsp11-Toxin3   | 2.7 | 0.023     |
|     | TVLCys1-Toxin3 | 1.1 | 0.048     |
|     | Tsp10-Toxin1   | 1.9 | 0.068     |
|     | Tsp10-Toxin4   | 1.9 | 0.1032    |

10

## 【0239】

また、in vitro細胞増殖アッセイが、様々なブレンツキシマブ（「B」）ベースのADC及び対照を用いてCD30抗原陽性Karpas299細胞を処置することにより行われた。結果を図54～58に示し、以下の表9に要約する。

20

## 【0240】

## 【表10】

表9—in vitro細胞増殖アッセイの結果（Karpas299細胞）

| 細胞株           | 試料                  | DAR | EC50 (nM) |
|---------------|---------------------|-----|-----------|
| Karpas<br>299 | Bsp10               | N/A |           |
|               | Bsp10-Toxin5        | 2.2 | 0.009     |
|               | Bsp10-Toxin6        | 1.9 | 0.041     |
|               | Bsp10-Toxin3        | 2.0 | 0.012     |
|               | Bsp10-Toxin4        | 2.0 | 0.007     |
|               | Bsp10-MCvcPABC-MMAE | 2.1 | 0.024     |
|               | B-MCvcPABC-MMAE     | 3.5 | 0.008     |
|               | B(ブレンツキシマブ)         | N/A |           |

30

## 【0241】

実施例19-トラスツズマブC末端軽鎖伸長変異体の変性PAGE

40

トラスツズマブ軽鎖伸長変異体は、固相化プロテインAで精製され、非還元変性または還元(+DTT)変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動(PAGE)に供された。結果を図59～62に示す。

## 【0242】

実施例20-複合体の安定性

ADCの安定性は、熱安定性試験を用いて評価された。Tsp10、Tsp10-Toxin3、Tsp10-Toxin1、Tsp10-Toxin4、Tsp6-Toxin3、Tsp9-Toxin3のPBS溶液(1mg/mL、pH7)の個々の分注物を調製した。非変性SEC-UV解析(前述)は、37℃でのインキュベーションの前、ゼロ時点で、10μLの注入体積で行われた。各試料の分注物は、インキュベーションの1

50

91時間後、及びインキュベーションの330時間後に、非変性S E C - U Vにより解析された。各種の単量体ピーケ面積の割合は、各ゼロ時点での測定値に対して調節された。結果を図63、パネルA及びBに示す。

#### 【0243】

前述の発明は理解の明確性を目的とし、解説及び実施例のために一部詳細に記述されているが、当業者であれば、本発明の教示を考慮し、添付のクレームの主旨または範囲から逸脱することなく、ある変更及び改変が加えられうることが容易に理解されるであろう。

#### 【0244】

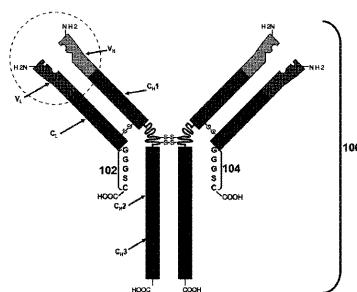
従って、上記は、単に本発明の主旨を解説するものである。当業者であれば、本明細書に明示的に記述または示されていなくとも、様々な変更を考案することが可能であり、本発明の主旨を具現化し、その目的及び範囲内に含まれることが明白であろう。さらに、本明細書に列記されるすべての実施例及び条件付きの文言は、主として、読み手による本発明主旨、及び発明者らにより当分野の発展に寄与される概念の理解を補助することを意図しており、当該具体的な列記される実施例及び条件に限定されないとみなされる。さらに、本発明の主旨、態様及び実施形態ならびにそれらの具体的な実施例を列記する本明細書のすべての記述は、その構造的均等及び機能的均等の両方を包含することが意図される。さらに、当該均等は、現在公知の均等及び将来的に開発される均等（すなわち、構造にかかわらず、同じ機能を果たす、すべての開発された要素）の両方を包含することが意図される。本発明の範囲は、ゆえに、本明細書に示され、記述される例示的な実施形態に限定されることは意図されない。本発明の主旨及び範囲は、添付のクレームにより具体化されている。

10

20

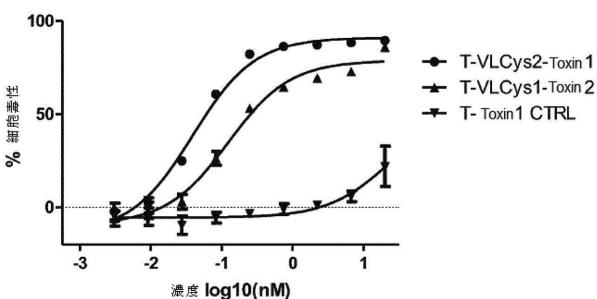
【図1】

FIG. 1



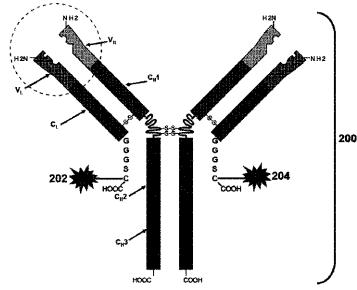
【図3】

図3

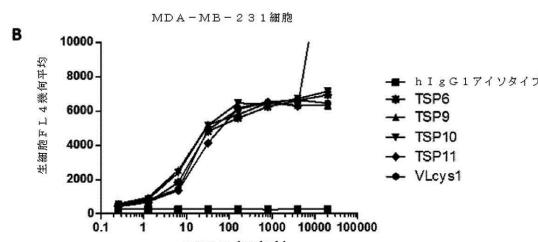
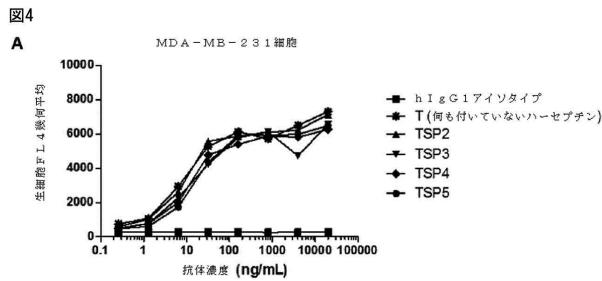


【図2】

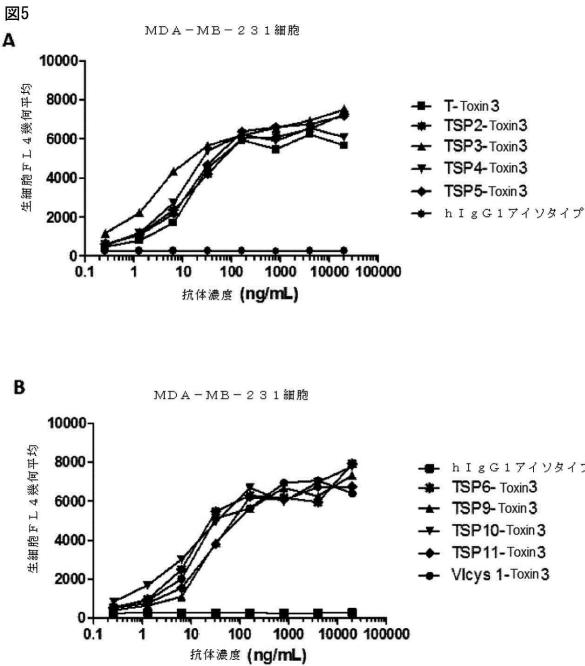
FIG. 2



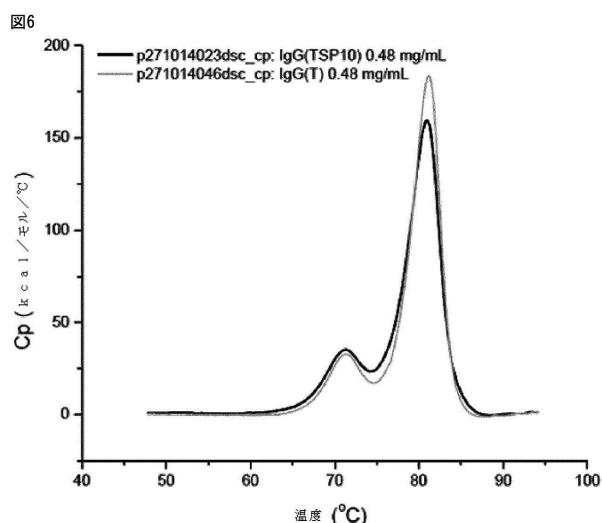
【図4】



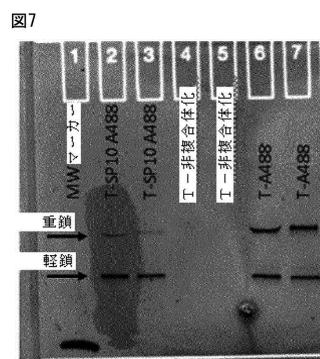
【図5】



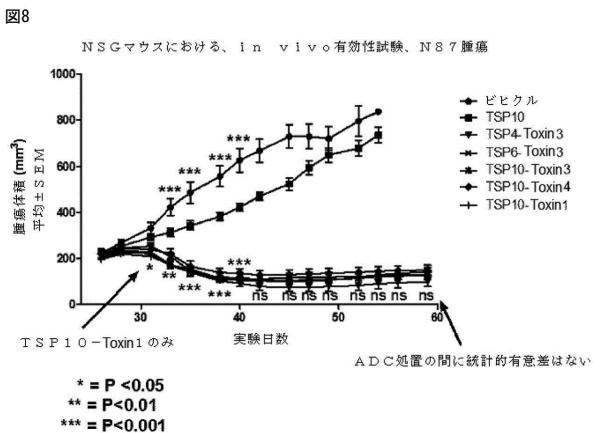
【図6】



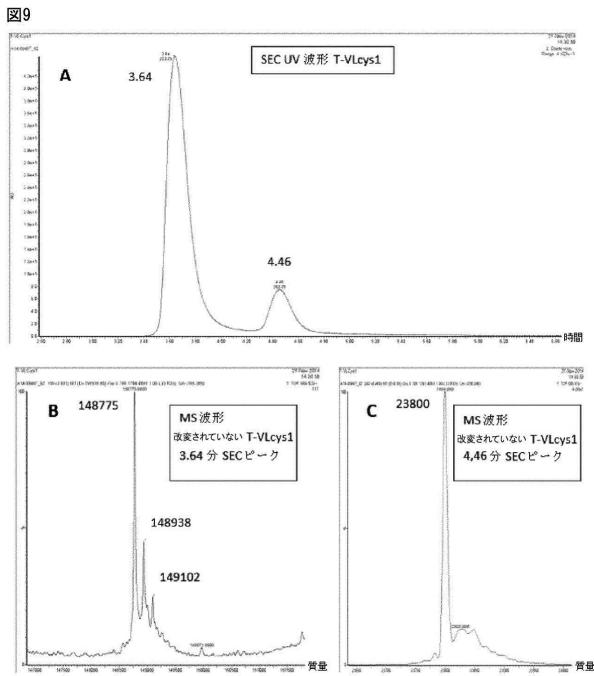
【図7】



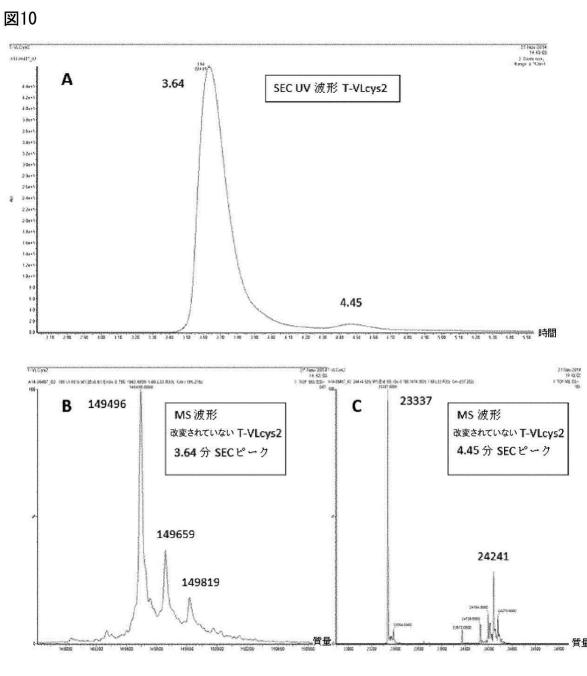
【図8】



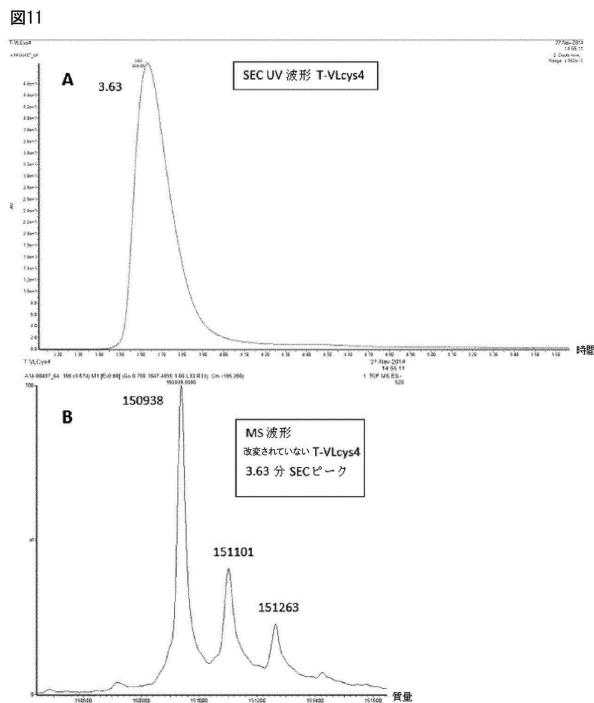
【図9】



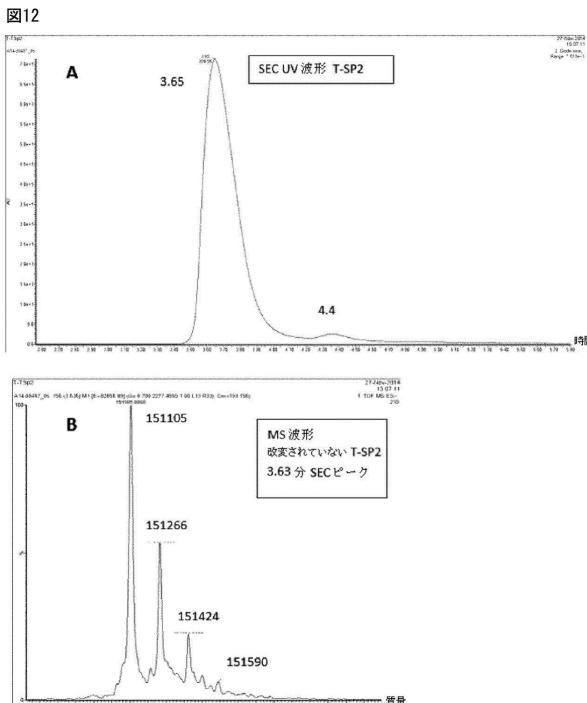
【図10】



【図11】

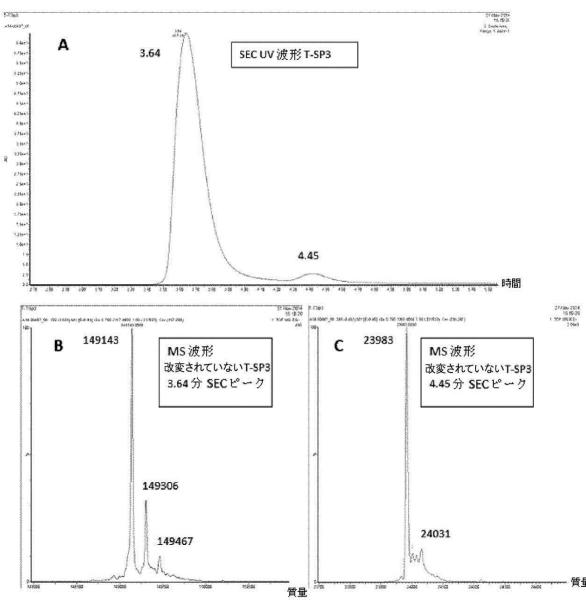


【図12】

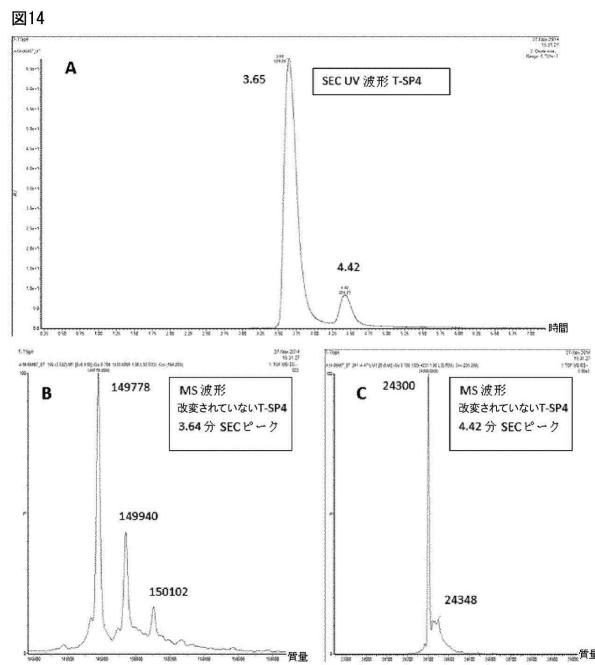


【図13】

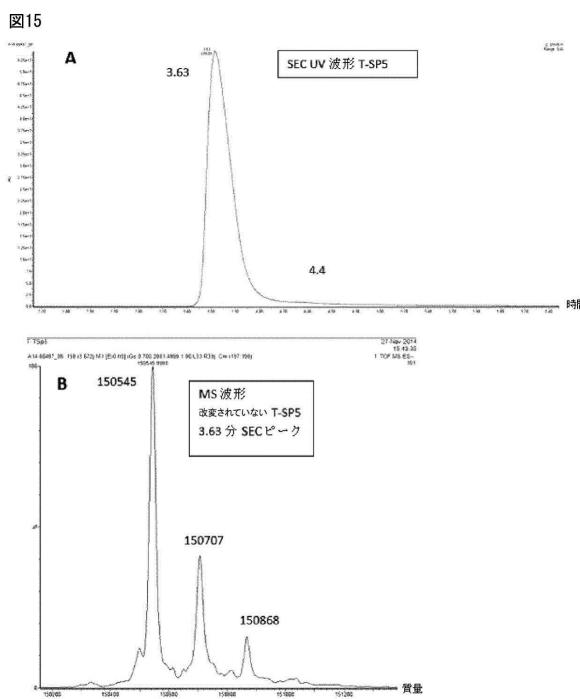
図13



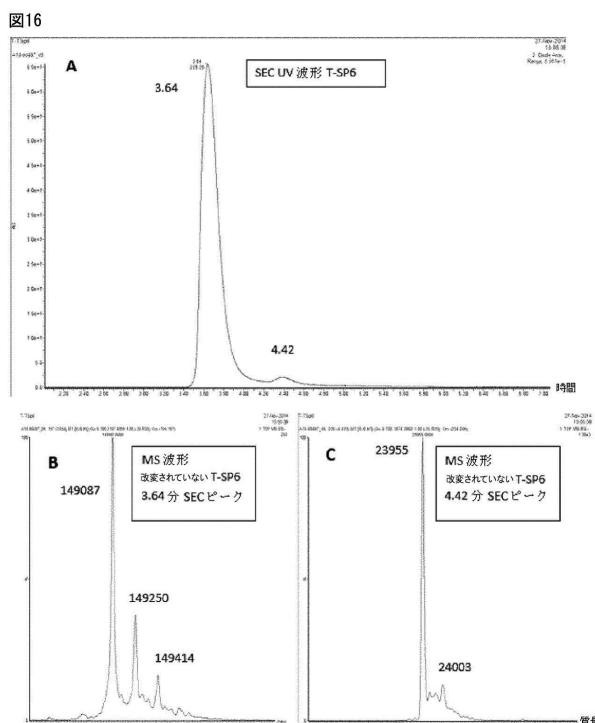
【図14】



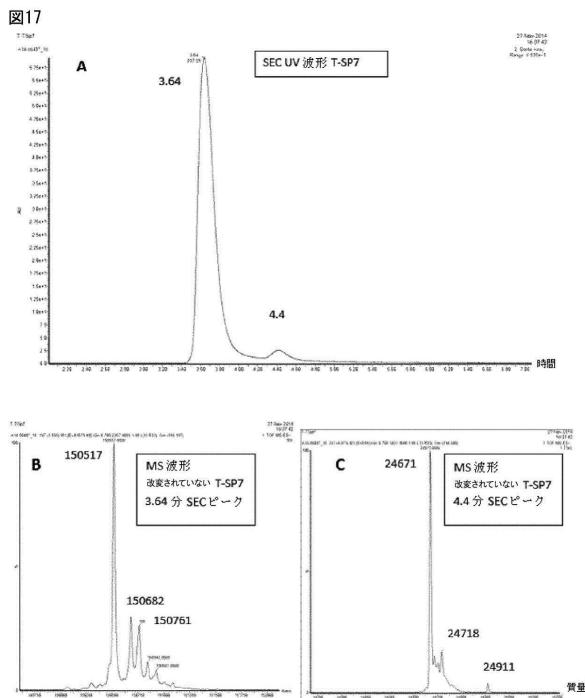
【図15】



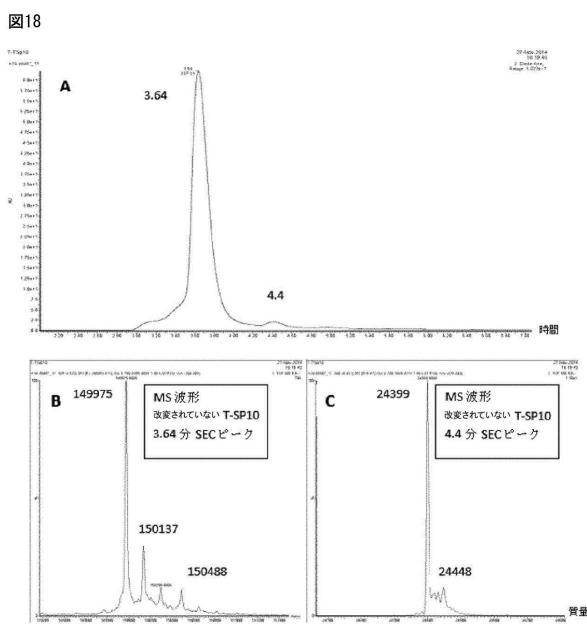
【図16】



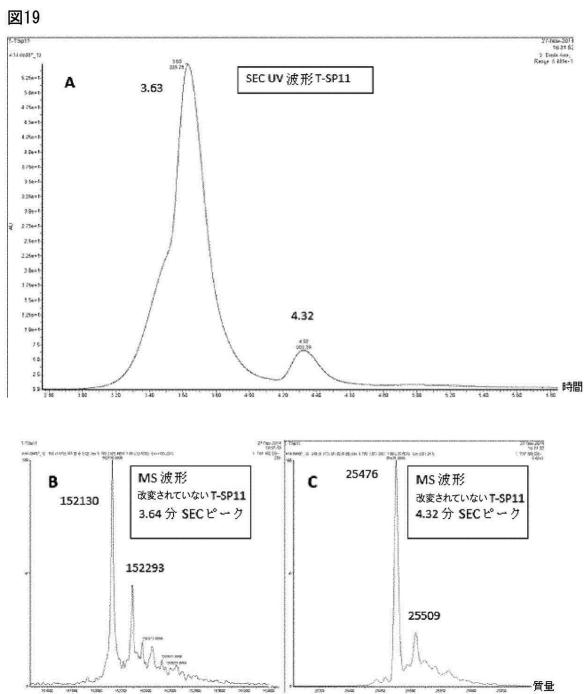
【図17】



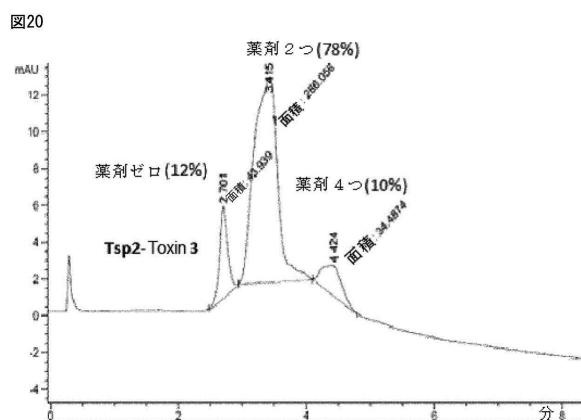
【図18】



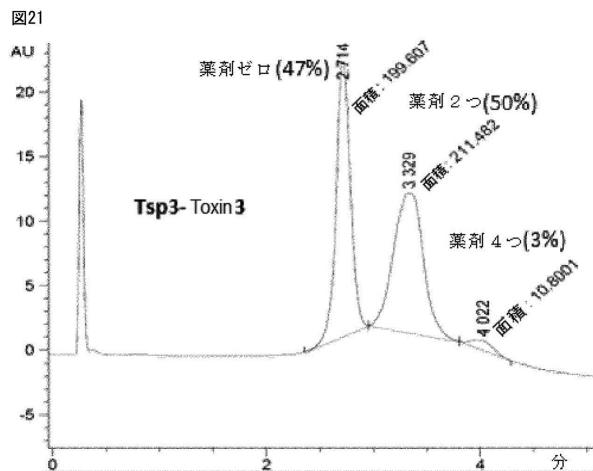
【図19】



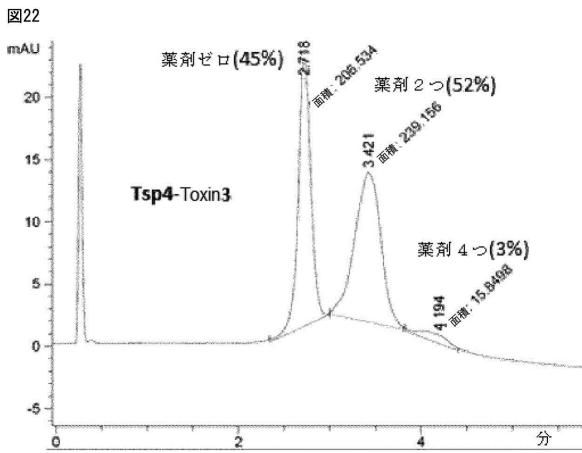
【図20】



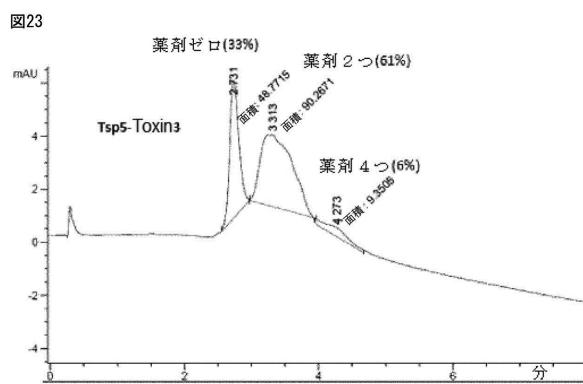
【図21】



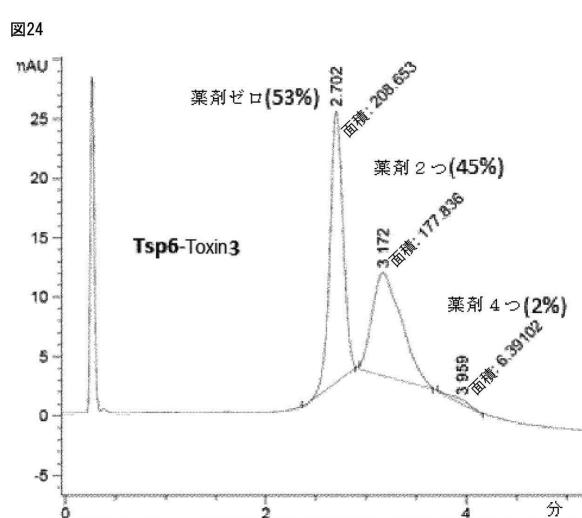
【図22】



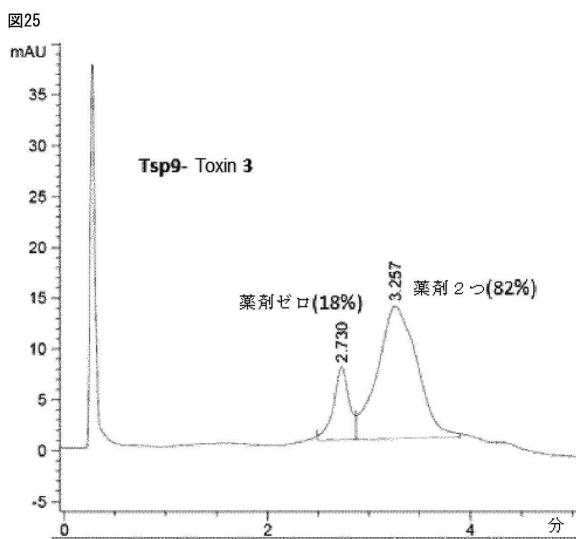
【図23】



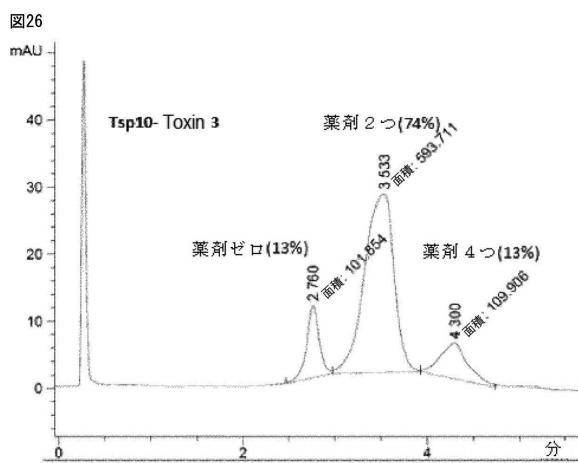
【図24】



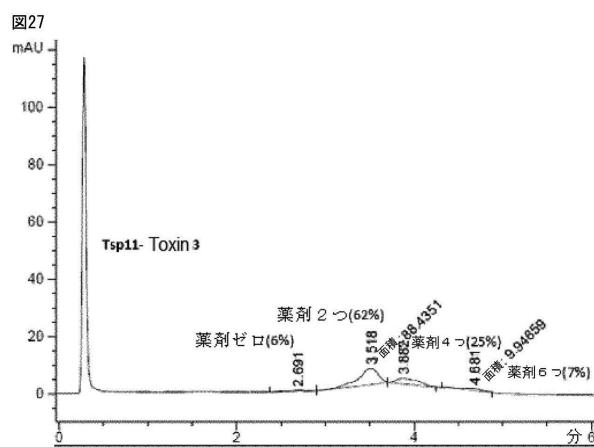
【図25】



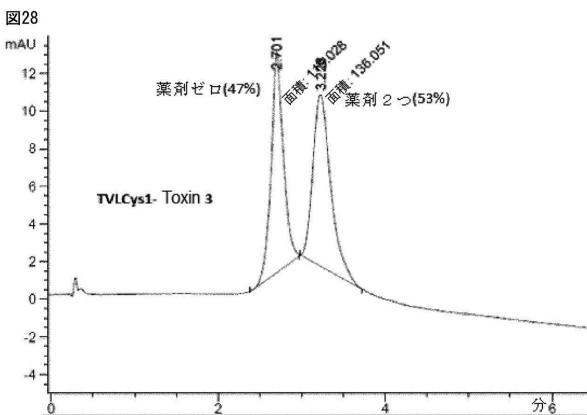
【図26】



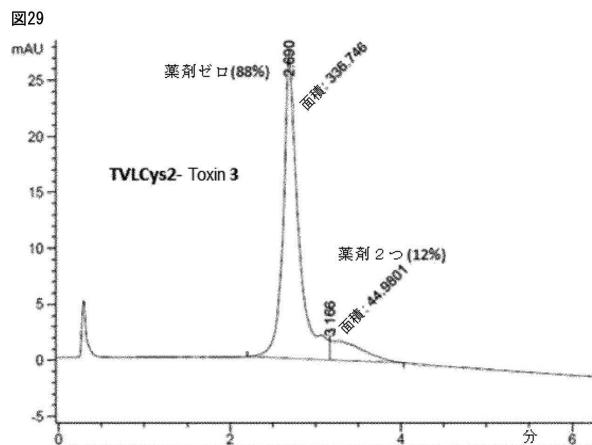
【図27】



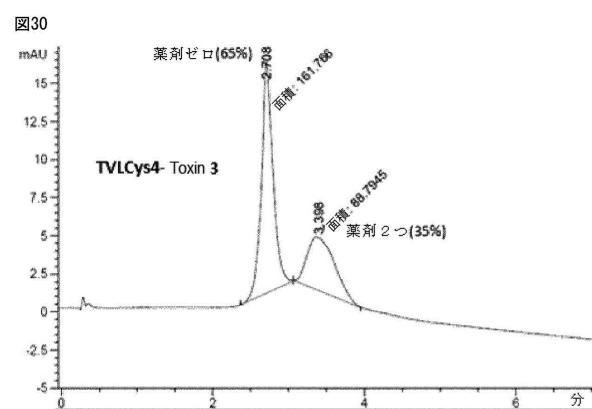
【図28】



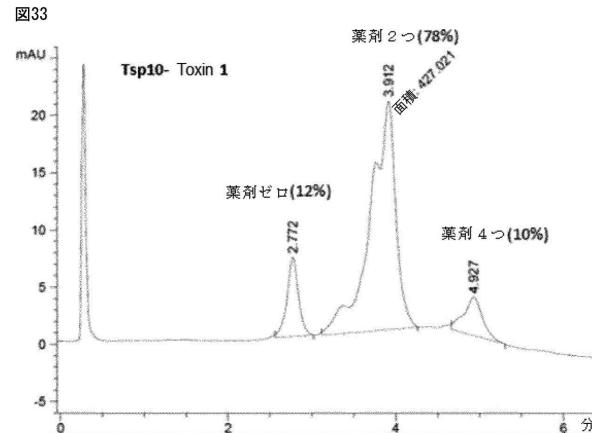
【図29】



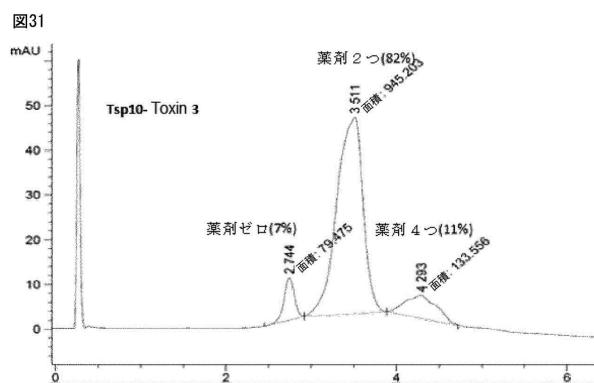
【図30】



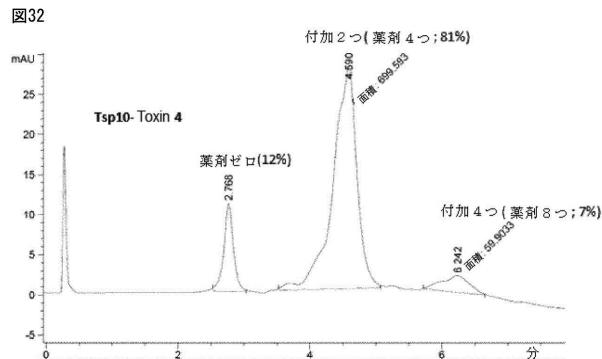
【図33】



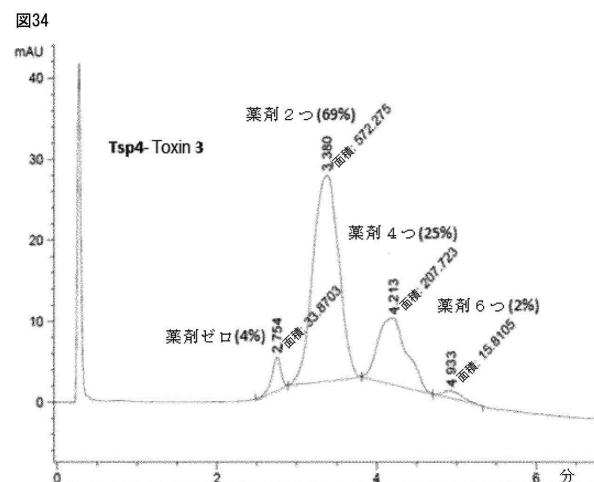
【図31】



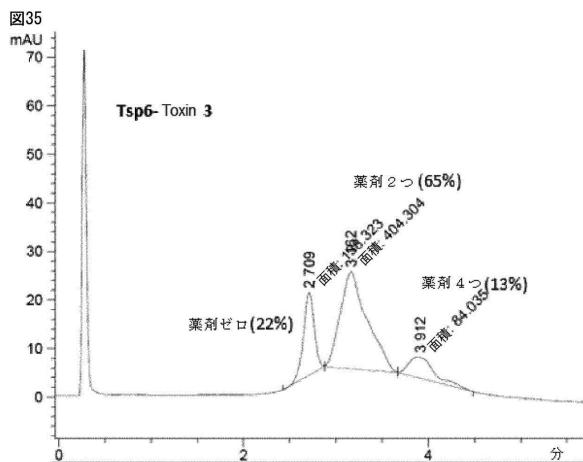
【図32】



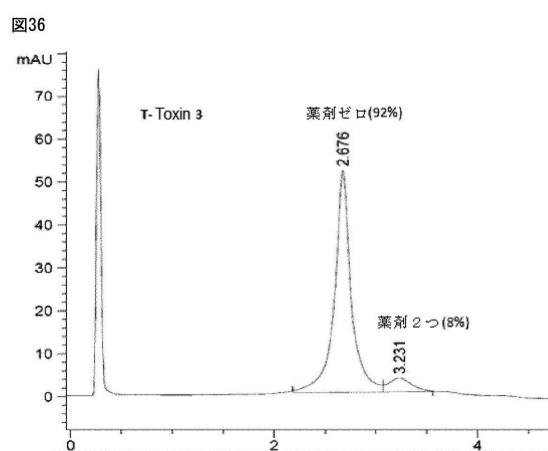
【図34】



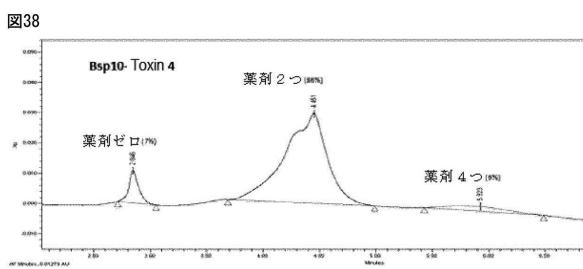
【図35】



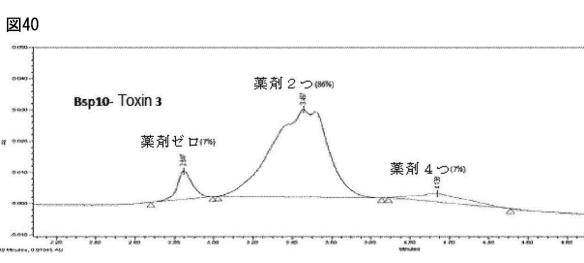
【図36】



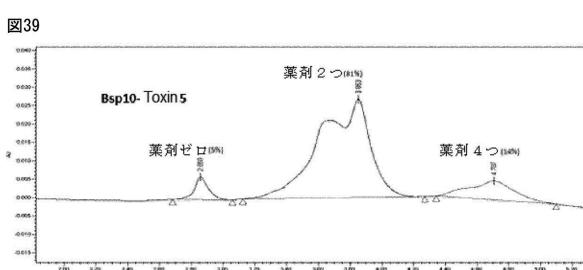
【図38】



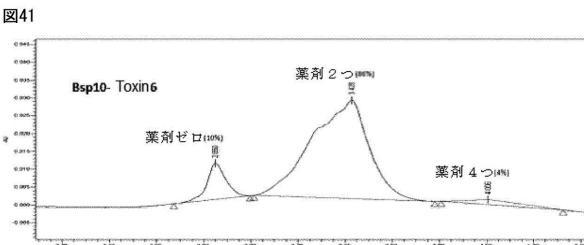
【図40】



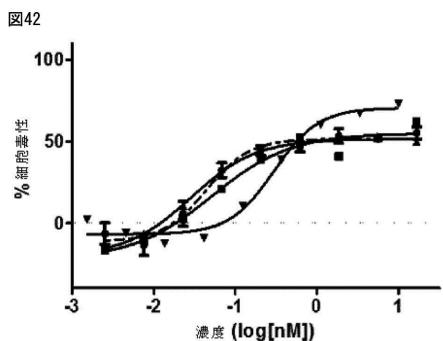
【図39】



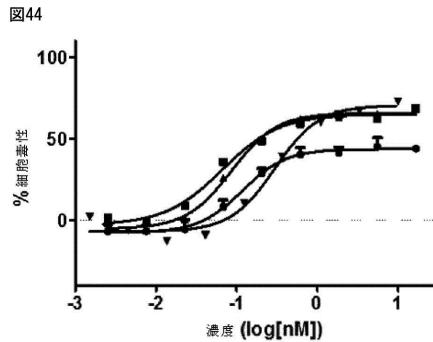
【図41】



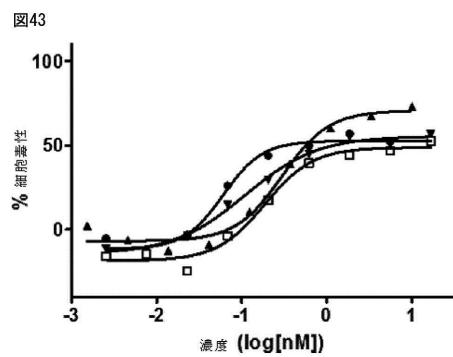
【図42】



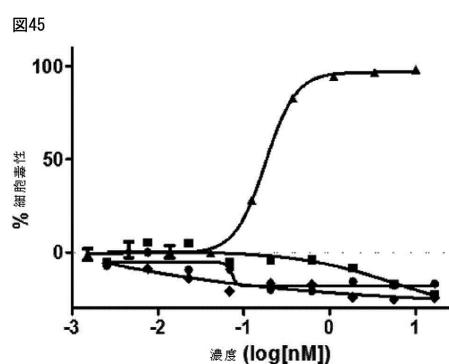
【図44】



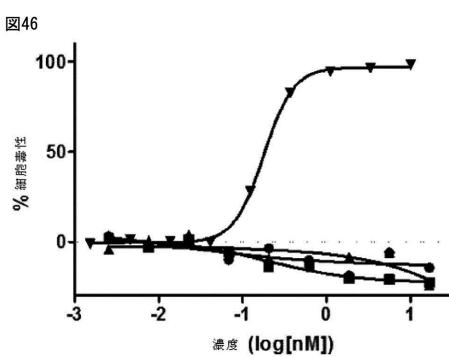
【図43】



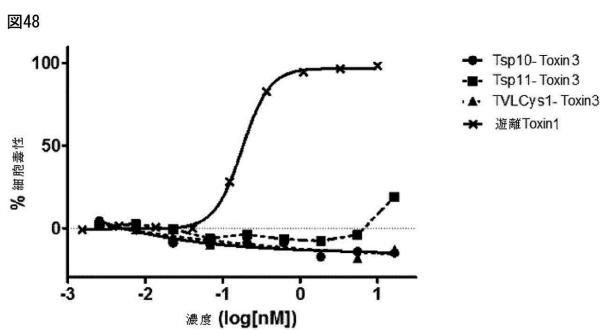
【図45】



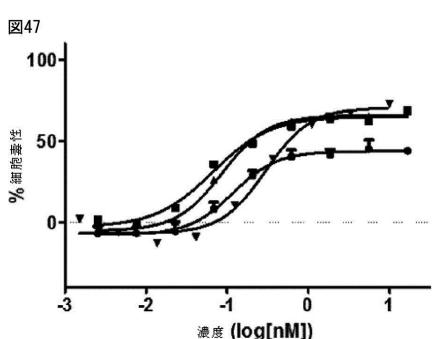
【図46】



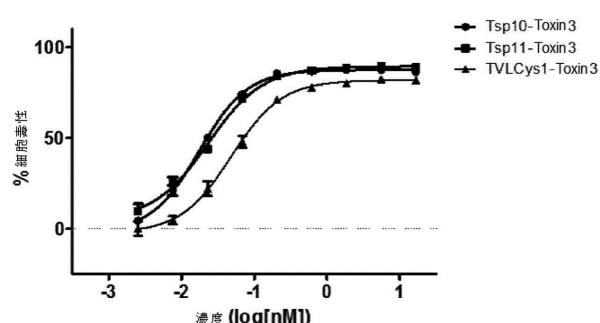
【図48】



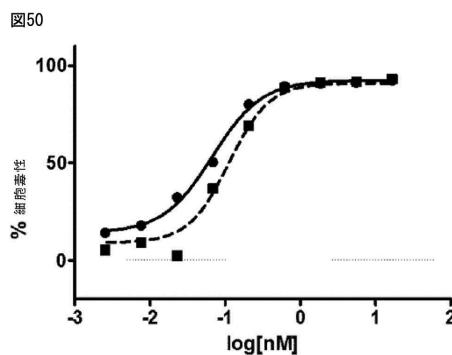
【図47】



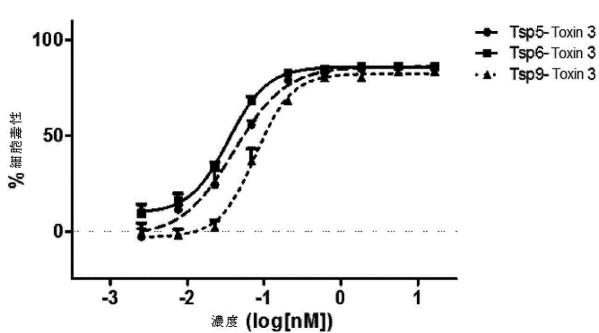
【図49】



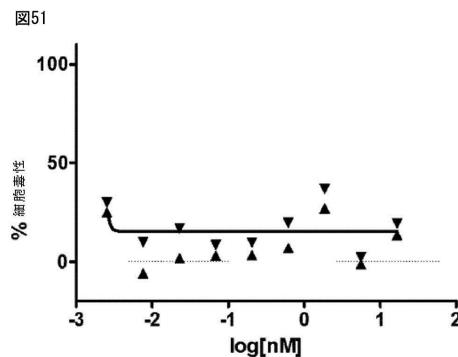
【図50】



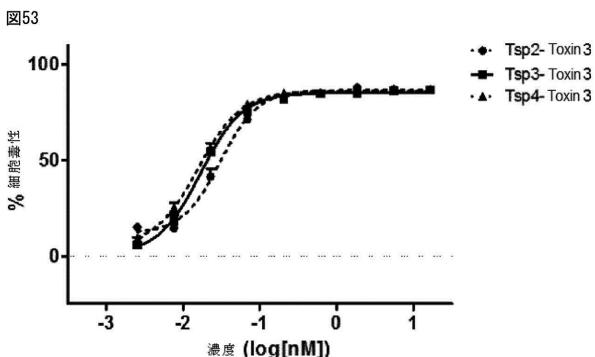
【図52】



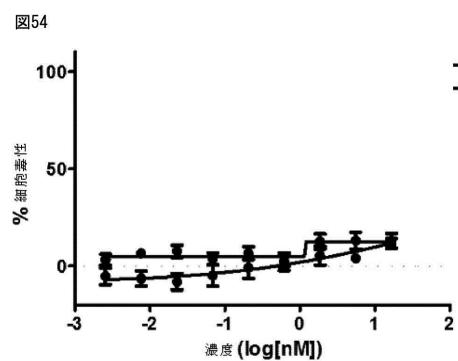
【図51】



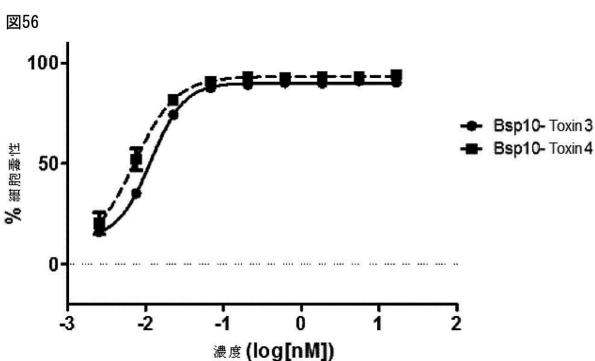
【図53】



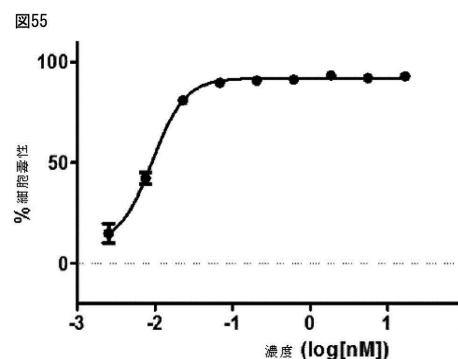
【図54】



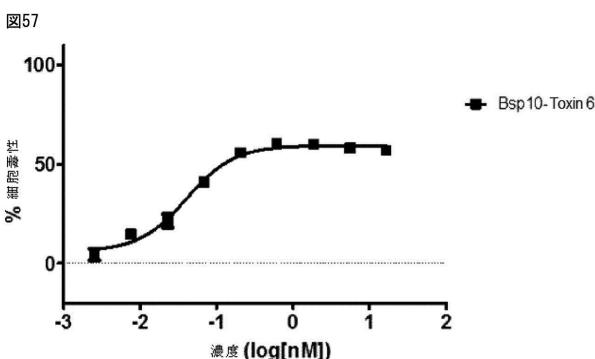
【図56】



【図55】

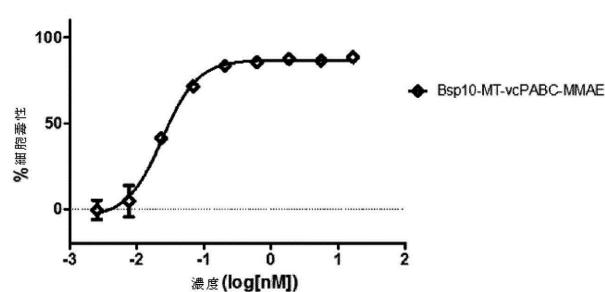


【図57】



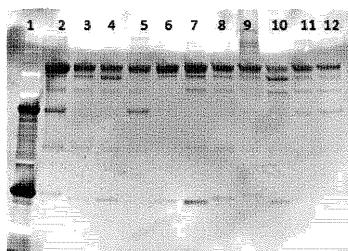
【図 5 8】

図58



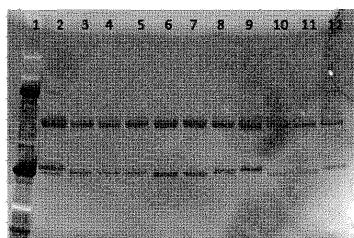
【図 5 9】

FIG. 59



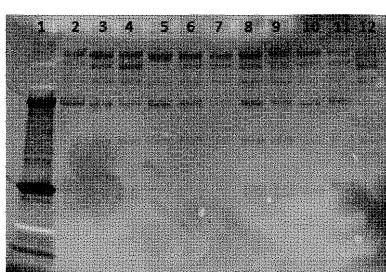
【図 6 0】

FIG. 60



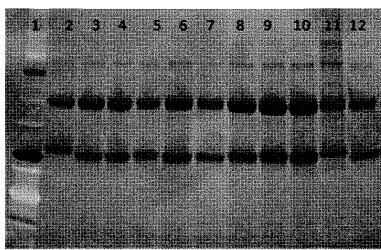
【図 6 1】

FIG. 61



【図 6 2】

FIG. 62

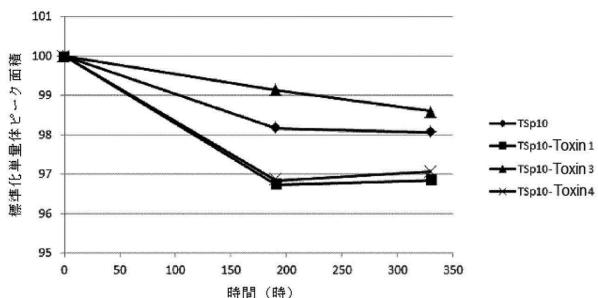


【図 6 3】

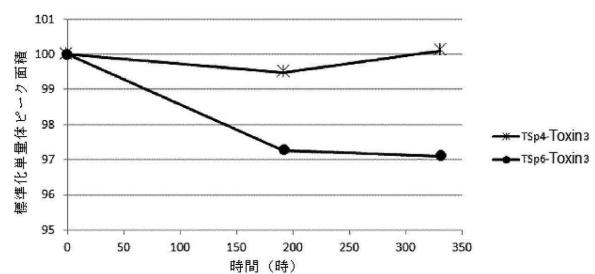
図63

**A**

37°C、PBSでのTースペーサー複合体の安定性

**B**

37°C、PBSでのTースペーサー複合体の安定性



【配列表】

0006585600000001.app

## フロントページの続き

| (51)Int.Cl. |        | F I       |         |        |
|-------------|--------|-----------|---------|--------|
| C 1 2 N     | 15/13  | (2006.01) | C 1 2 N | 15/13  |
| C 1 2 N     | 15/63  | (2006.01) | C 1 2 N | 15/63  |
| C 1 2 N     | 1/15   | (2006.01) | C 1 2 N | 1/15   |
| C 1 2 N     | 1/19   | (2006.01) | C 1 2 N | 1/19   |
| C 1 2 N     | 1/21   | (2006.01) | C 1 2 N | 1/21   |
| C 1 2 N     | 5/10   | (2006.01) | C 1 2 N | 5/10   |
| C 1 2 P     | 21/08  | (2006.01) | C 1 2 P | 21/08  |
| 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 |
| A 6 1 K     | 49/00  | (2006.01) | A 6 1 K | 47/68  |
| A 6 1 K     | 51/10  | (2006.01) | A 6 1 K | 49/00  |
| C 0 7 K     | 7/00   | (2006.01) | A 6 1 K | 51/10  |
| A 6 1 P     | 35/00  | (2006.01) | C 0 7 K | 7/00   |
| A 6 1 P     | 43/00  | (2006.01) | A 6 1 P | 35/00  |
|             |        |           | A 6 1 P | 43/00  |
|             |        |           |         | 1 0 5  |

(74)代理人 100117019

弁理士 渡辺 陽一

(74)代理人 100150810

弁理士 武居 良太郎

(74)代理人 100134784

弁理士 中村 和美

(72)発明者 ジョン バブコック

カナダ国, ブリティッシュコロンビア ブイ 6 アール 2 アール 2 , バンクーバー, ウエスト ト  
ウエルズ アベニュー 4480

(72)発明者 ジェイムズ アール. リッチ

カナダ国, ブリティッシュコロンビア ブイ 5 ティー 2 アール 7 , バンクーバー, フィフティー  
ンス アベニュー イースト 786

(72)発明者 ヤン ペテル ベルグキピスト

カナダ国, ブリティッシュコロンビア ブイ 6 ジェイ 3 エム 6 , バンクーバー, サイプレス ス  
トリート 315 - 2255

(72)発明者 スチュアート ダニエル バーンシャー

カナダ国, ブリティッシュコロンビア ブイ 6 ゼット 2 ティー 9 , バンクーバー, ドレイク ス  
トリート 3イー - 199

審査官 野村 英雄

(56)参考文献 特表2012-521197 (JP, A)

米国特許出願公開第2012/0020966 (US, A1)

米国特許出願公開第2009/0148905 (US, A1)

国際公開第2013/070565 (WO, A1)

米国特許出願公開第2009/0068202 (US, A1)

米国特許出願公開第2012/0308584 (US, A1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

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

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

P u b M e d