

(19)日本国特許庁(JP)

## (12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7404252号

(P7404252)

(45)発行日 令和5年12月25日(2023.12.25)

(24)登録日 令和5年12月15日(2023.12.15)

(51)国際特許分類

F I

A 6 1 K 47/60 (2017.01)

A 6 1 K 47/60

A 6 1 K 47/54 (2017.01)

A 6 1 K 47/54

C 0 7 K 5/083(2006.01)

C 0 7 K 5/083

C 0 7 D 207/448 (2006.01)

C 0 7 D 207/448

A 6 1 K 39/395 (2006.01)

A 6 1 K 39/395

M

請求項の数 15 (全213頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2020-544093(P2020-544093)

(86)(22)出願日 平成30年11月7日(2018.11.7)

(65)公表番号 特表2021-502406(P2021-502406  
A)

(43)公表日 令和3年1月28日(2021.1.28)

(86)国際出願番号 PCT/CN2018/114266

(87)国際公開番号 WO2019/091384

(87)国際公開日 令和1年5月16日(2019.5.16)

審査請求日 令和3年10月26日(2021.10.26)

(31)優先権主張番号 62/583,410

(32)優先日 平成29年11月8日(2017.11.8)

(33)優先権主張国・地域又は機関  
米国(US)

(73)特許権者 517060177

ヤフェイ シャンハイ バイオロジー メ  
ディスン サイエンス アンド テクノロ  
ジー カンパニー リミテッド中華人民共和国 シャンハイ 2 0 1 2 0  
3 プドン ディストリクト ザンジャン  
ハイ-テク パーク カイルン ロード  
ナンバー 7 8 0

(74)代理人 100109634

弁理士 舩谷 威志

(74)代理人 100129263

弁理士 中尾 洋之

(72)発明者 リュー, ユアン

中華人民共和国 上海 2 0 1 2 0 3, プ  
ドン ディストリクト, ザンジャン ハイ  
最終頁に続く

(54)【発明の名称】 生体分子のコンジュゲートおよびその使用

## (57)【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

以下の構造：

R 1 - R 2 - R 3 - R 4 - S - c y s - R 5

を有し、式中、

R 5 は、1つまたは複数のシステイン残基が変異により導入された生体分子を表し；

c y s は、R 5 に含まれるシステイン残基（複数可）を表し；

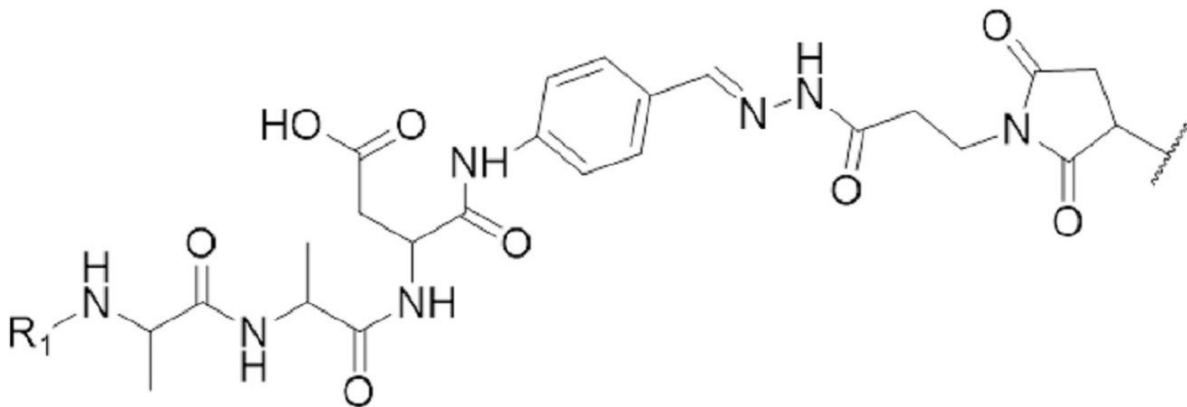
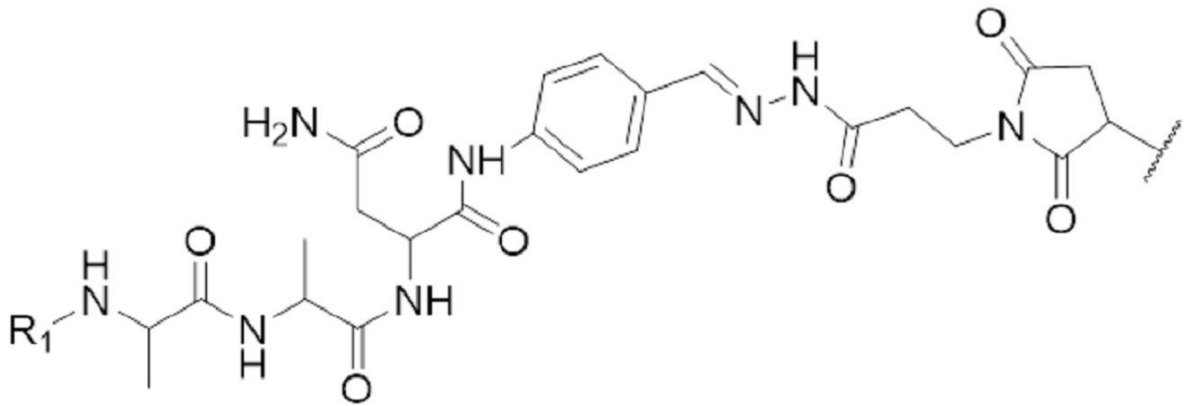
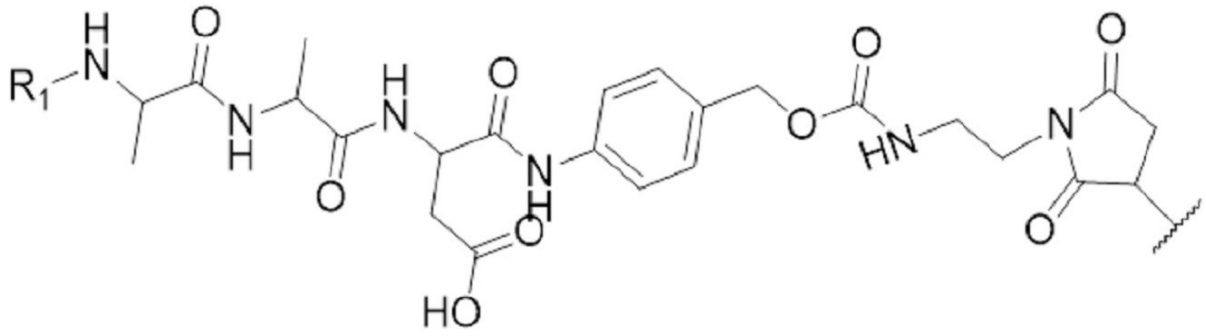
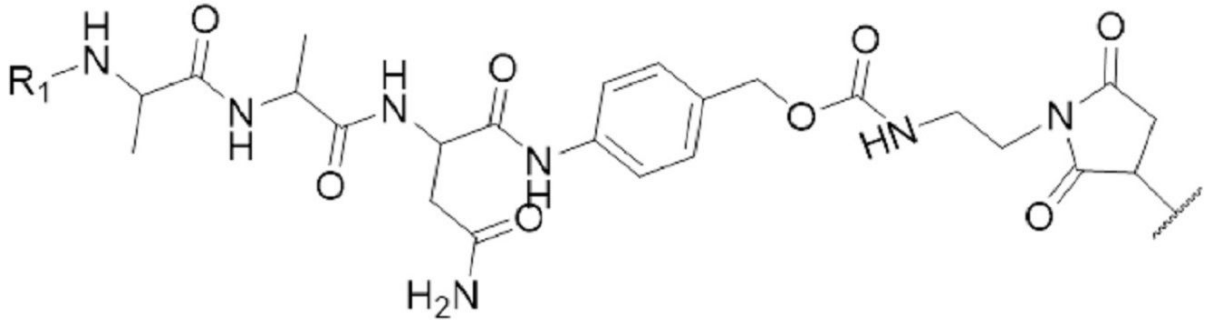
S は、前記システイン残基（複数可）の硫黄原子（複数可）を表し；

R 4 は、R 5 に含まれるシステイン残基の硫黄原子を介してR 5 と共有結合している基であり；

前記 R 1 - R 2 - R 3 - R 4 は、以下の構造：

10

20



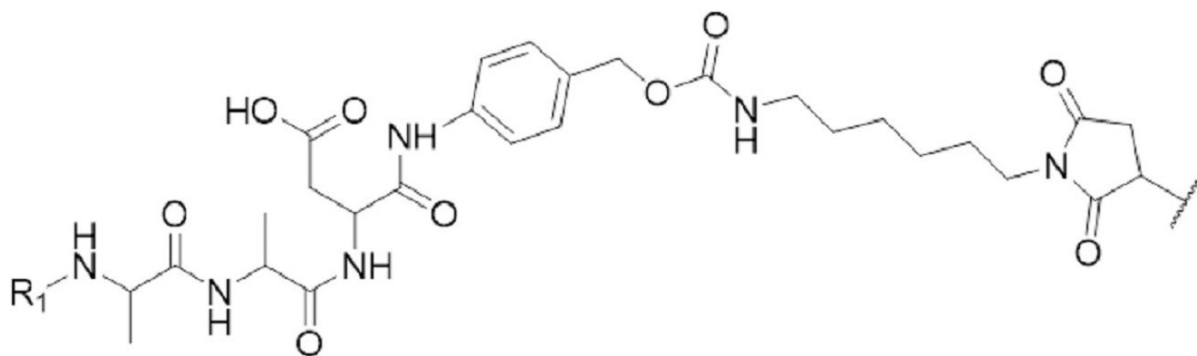
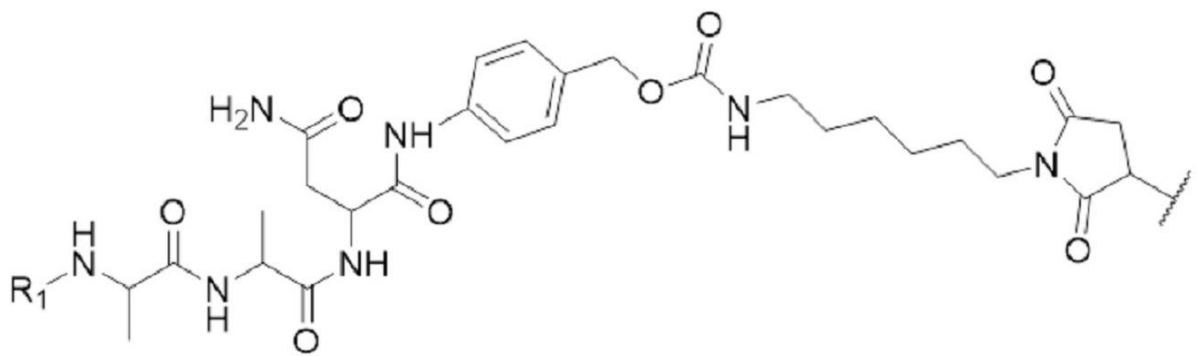
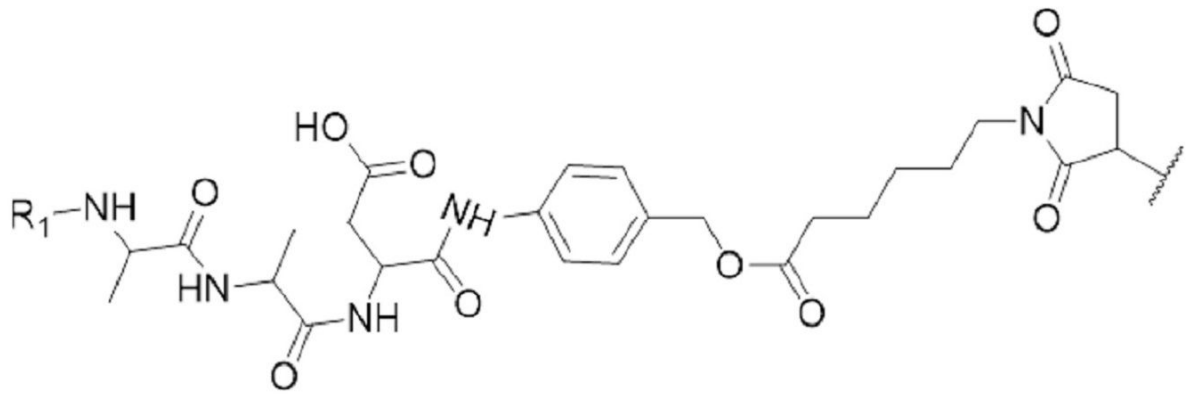
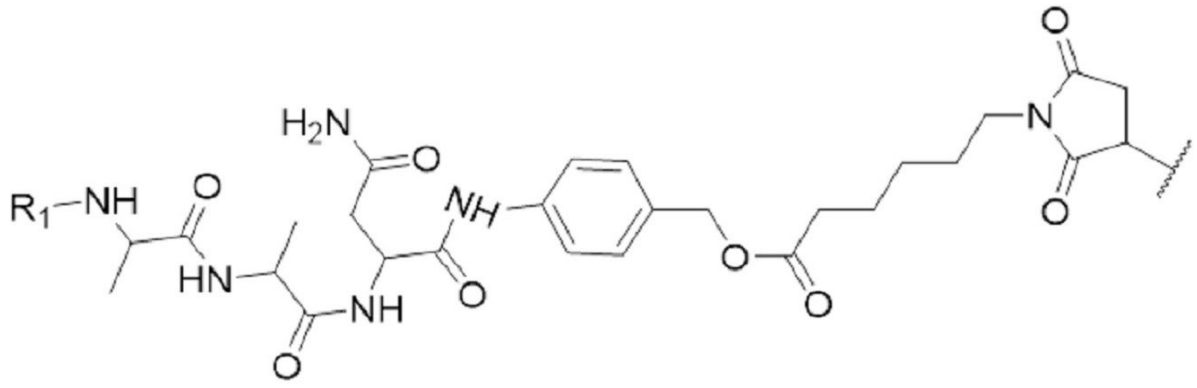
10

20

30

40

50



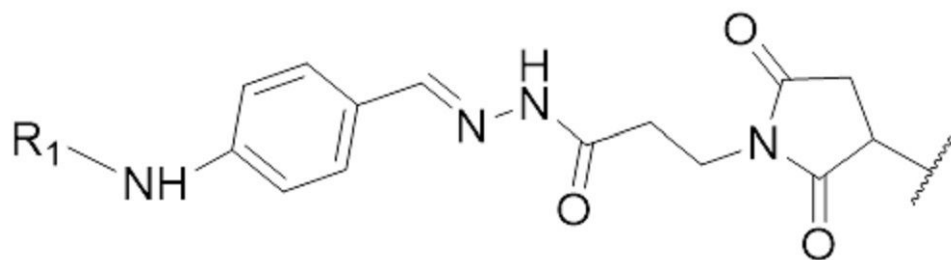
10

20

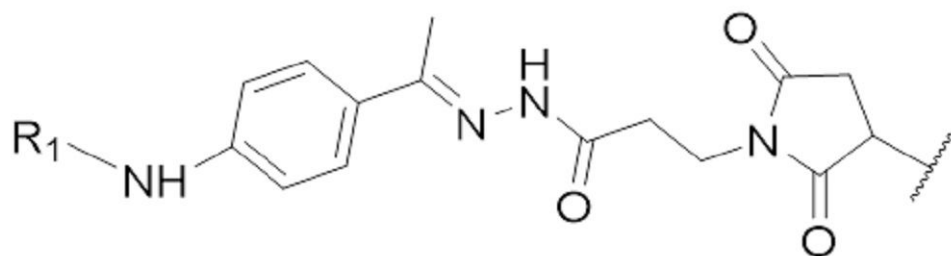
30

40

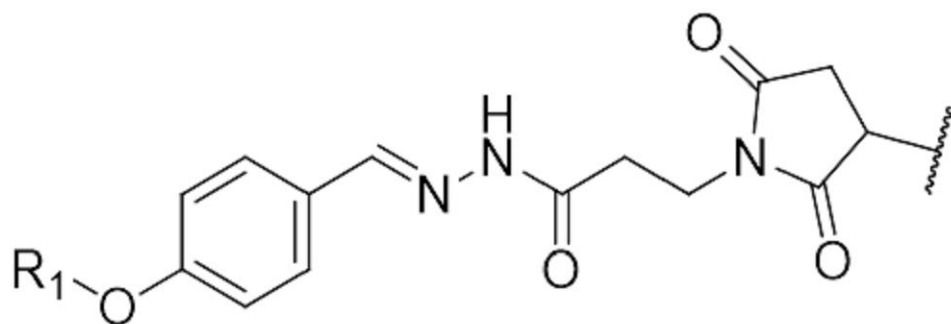
50



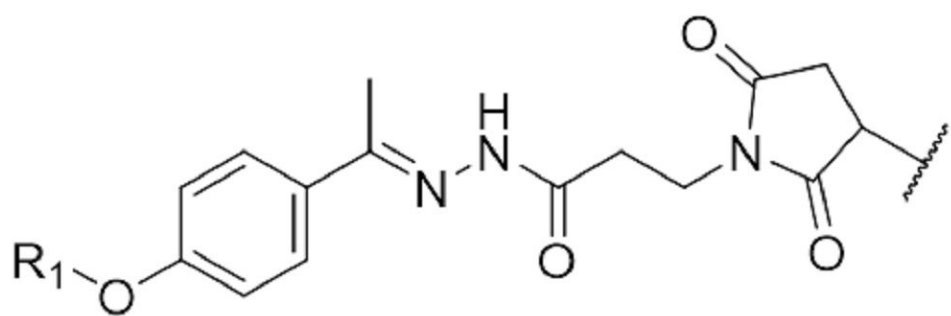
10



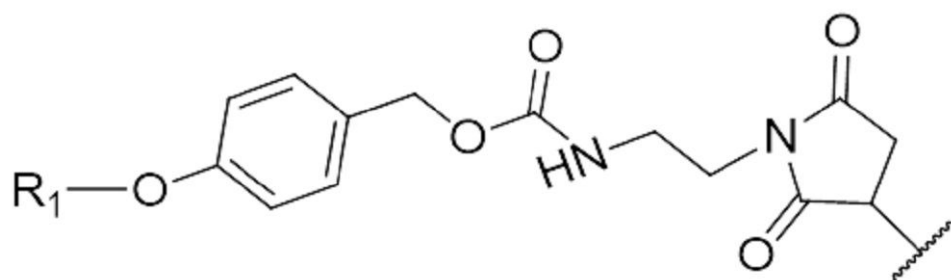
20



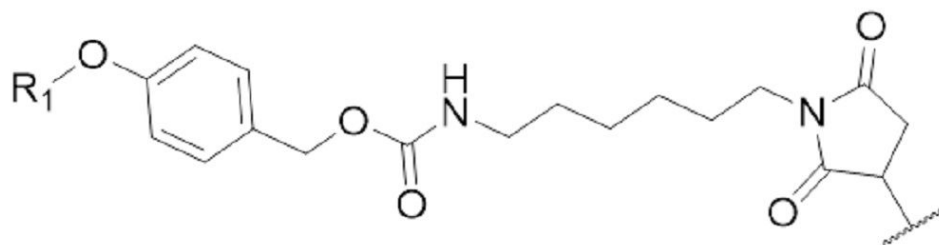
30



40



50

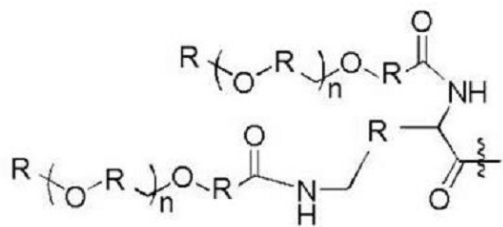


のいずれかによって表され、

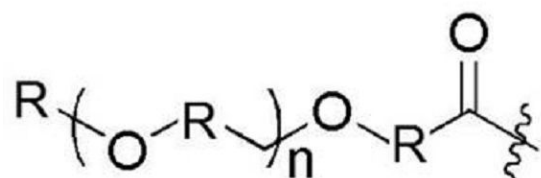
式中、R<sub>1</sub>は、下記(1)または(2)にあるように規定される、  
生体分子のコンジュゲート。

10

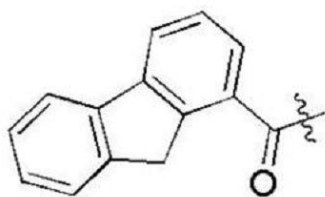
(1) R<sub>1</sub>は、ポリエチレングリコール - C<sub>1</sub> - 5アルキルカルボニル、



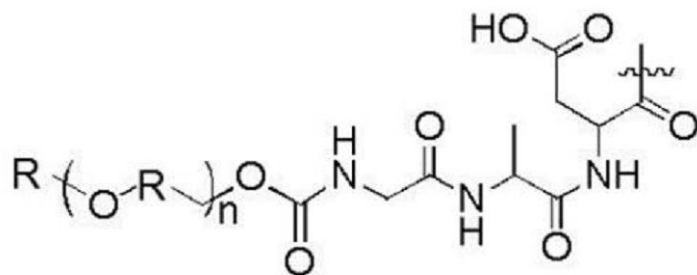
20



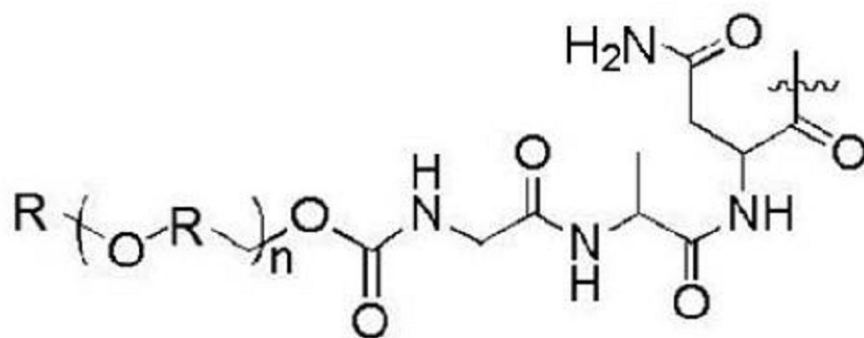
30



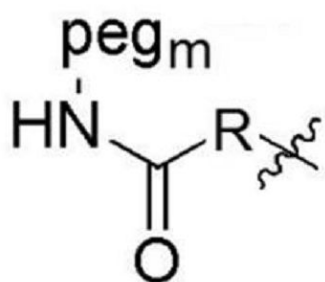
40



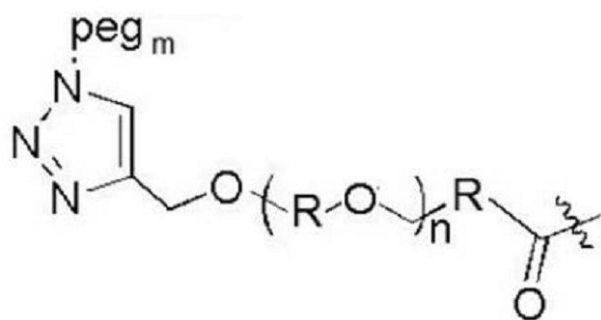
50



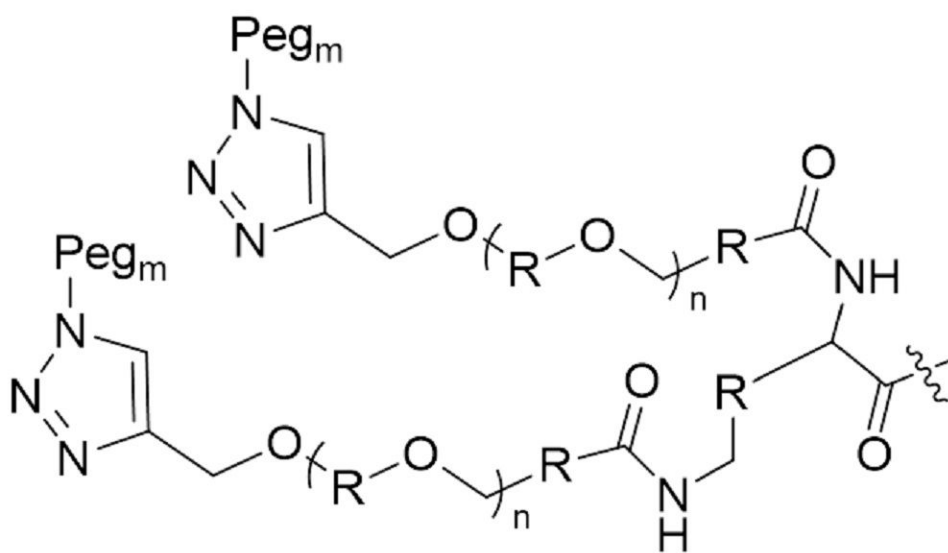
10



20



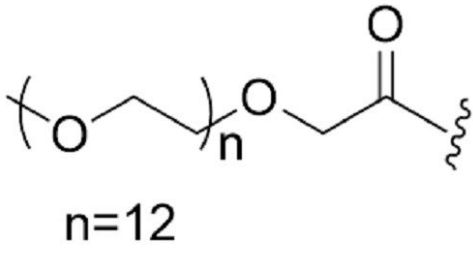
30



40

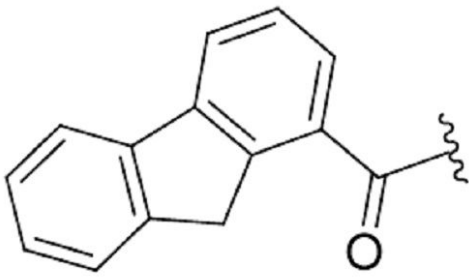
50





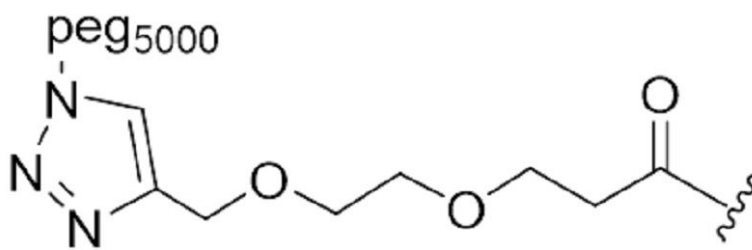
R1-2

10



20

R1-3

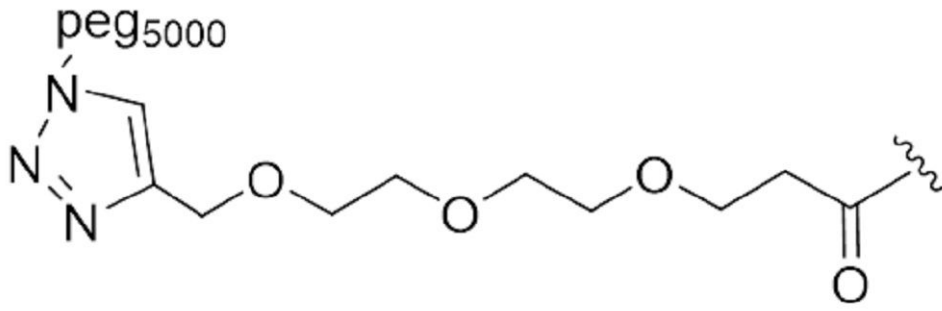


30

R1-4

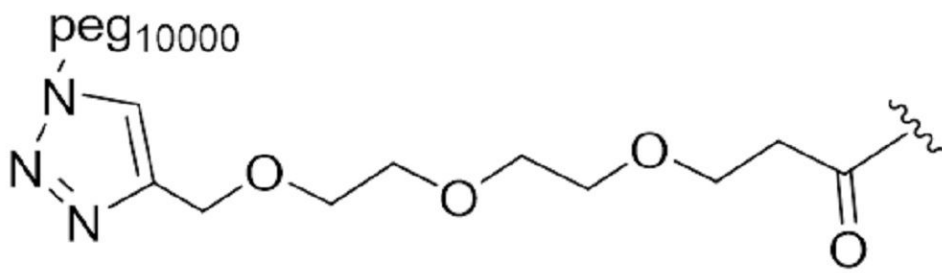
40

50



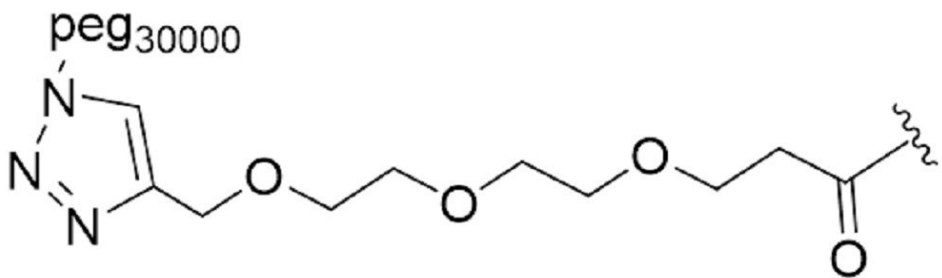
R1-5

10



R1-6

20

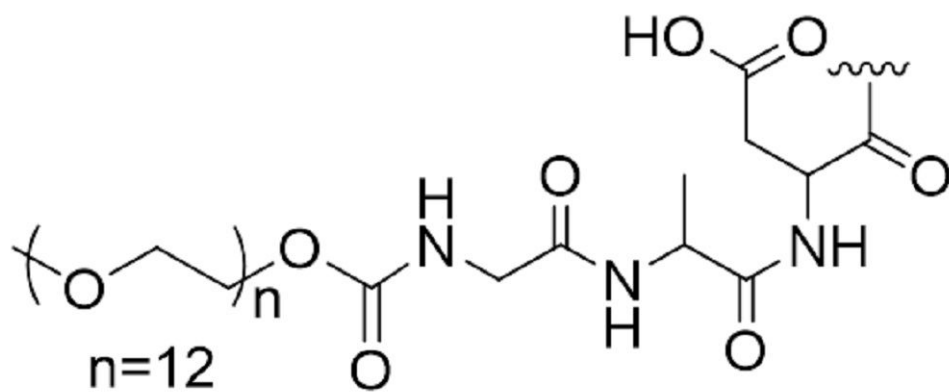


R1-7

30

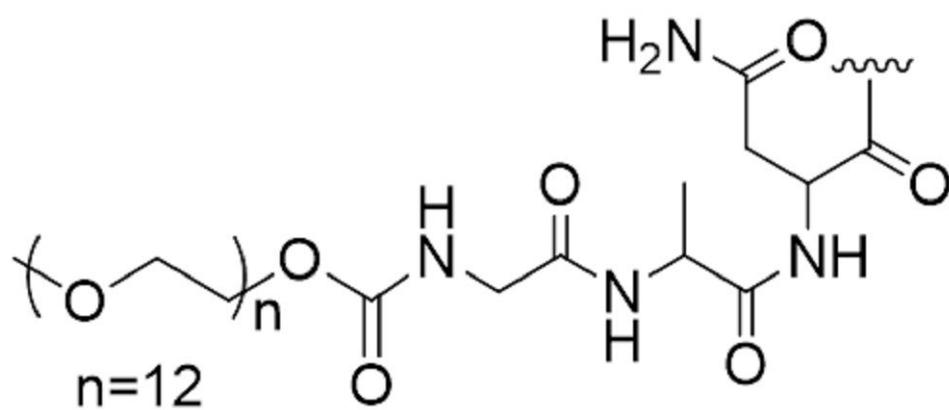
40

50



10

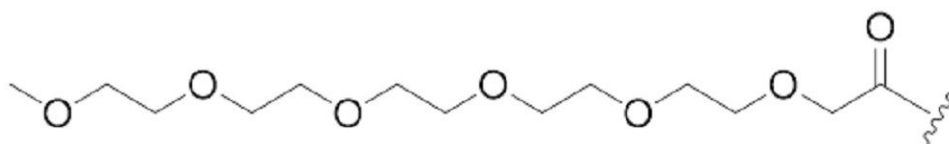
R1-8



20

30

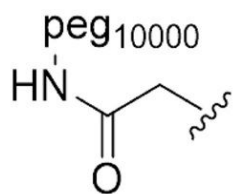
R1-9



40

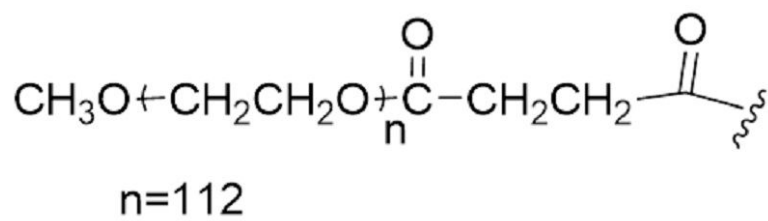
R1-10

50



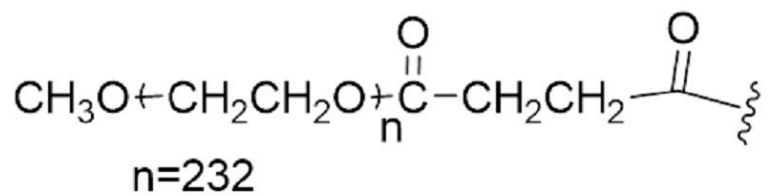
R1-11

10



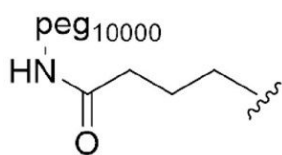
R1-12

20



R1-13

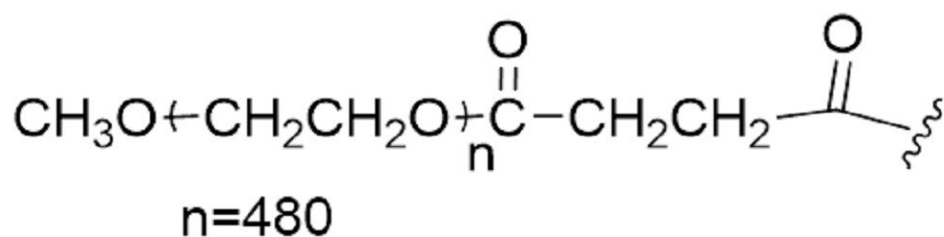
30



R1-14

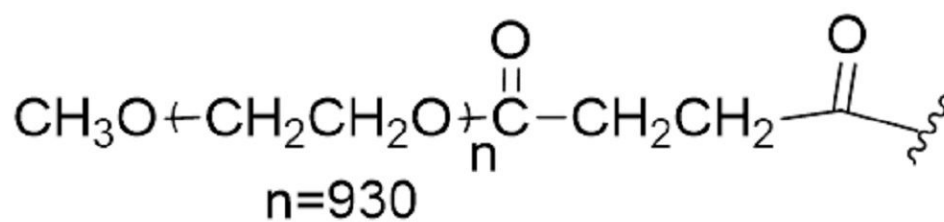
40

50



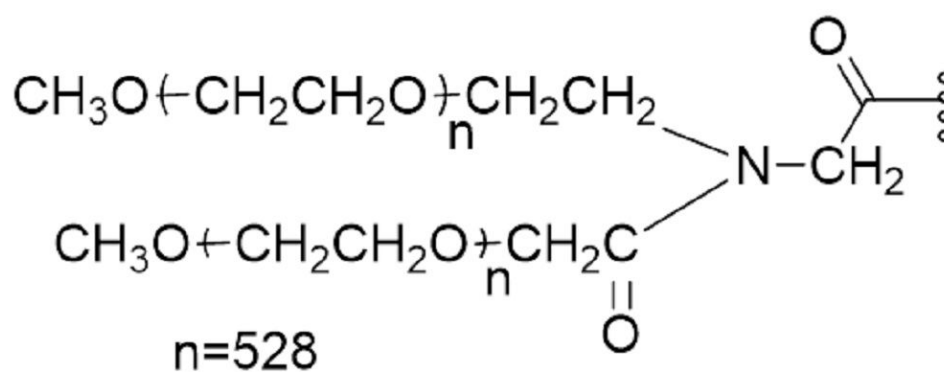
10

R1-15



20

R1-16

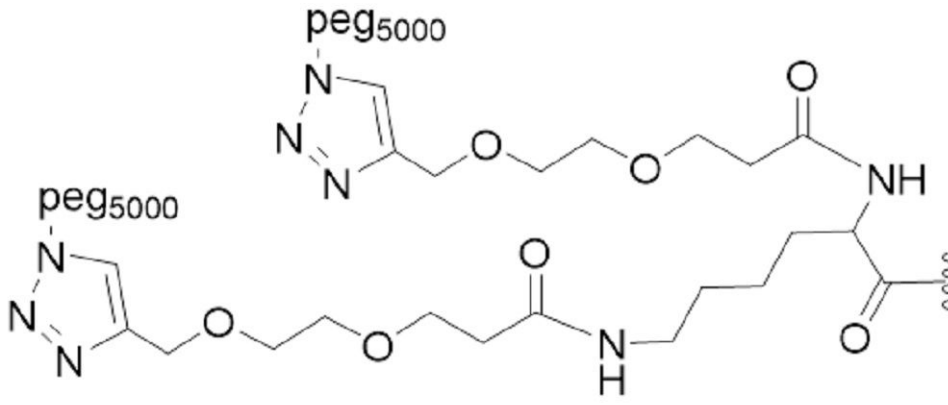


30

R1-17

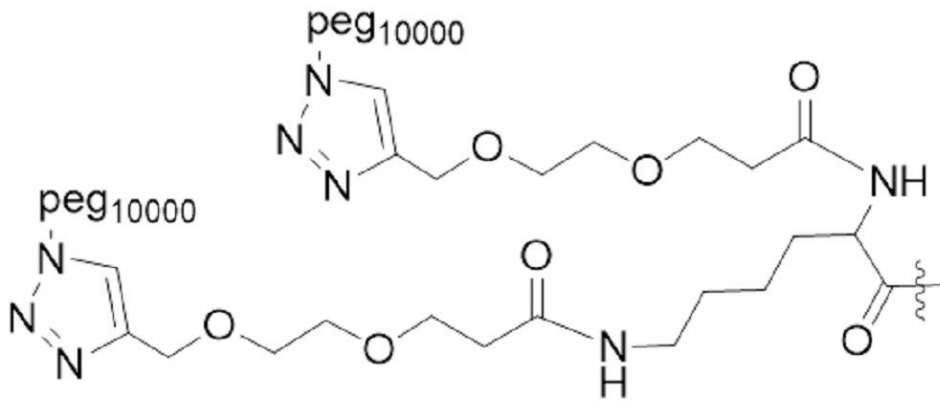
40

50



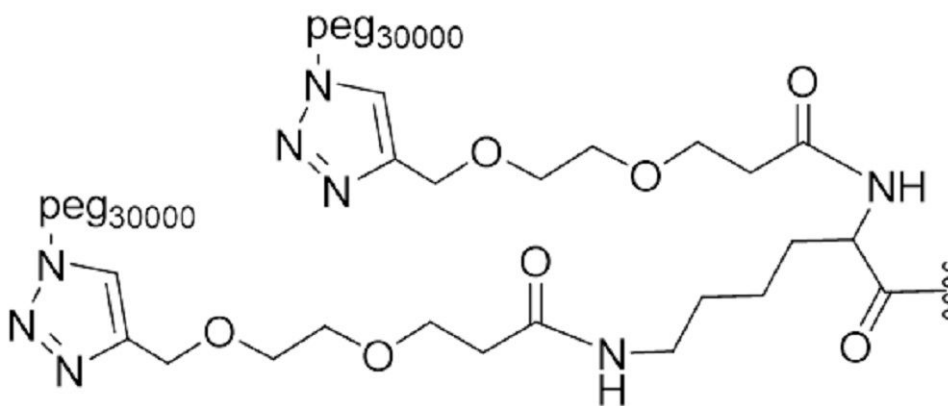
R1-18

10



R1-19

20

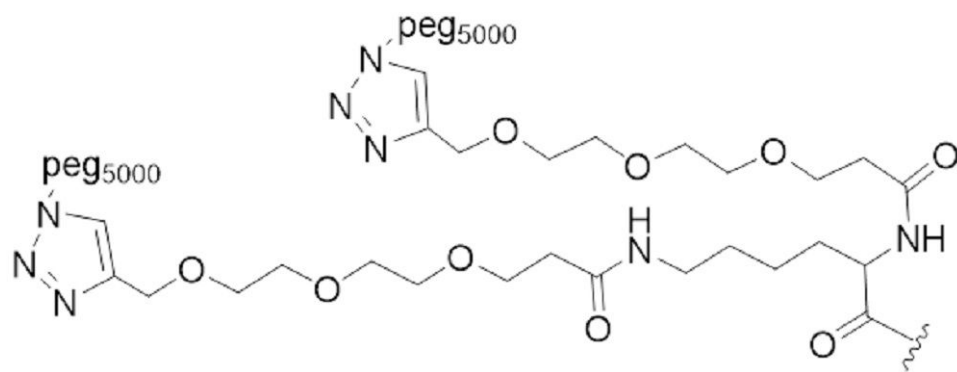


R1-20

30

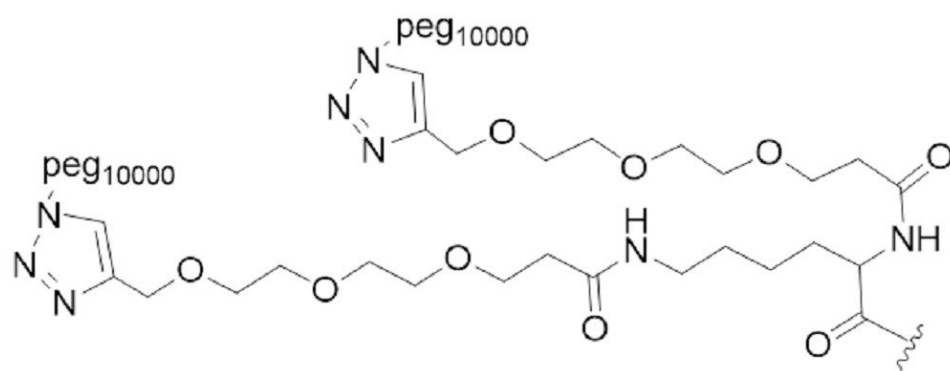
40

50



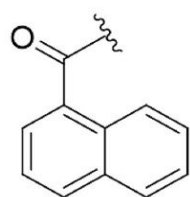
R1-21

10



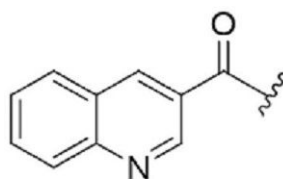
R1-22

20



R1-23

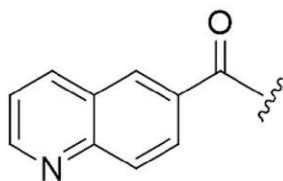
30



R1-24

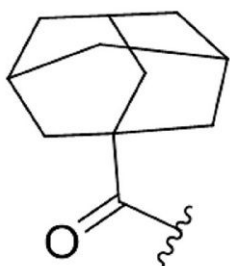
40

50



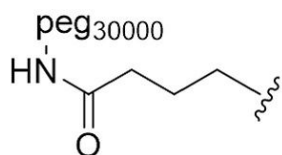
R1-25

10



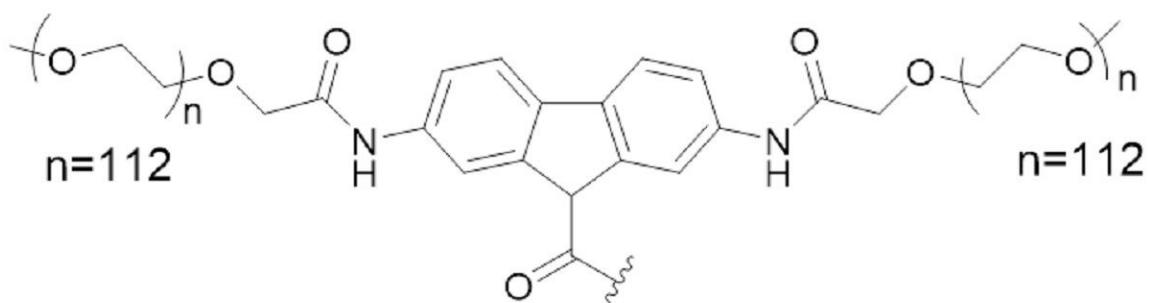
20

R1-26



30

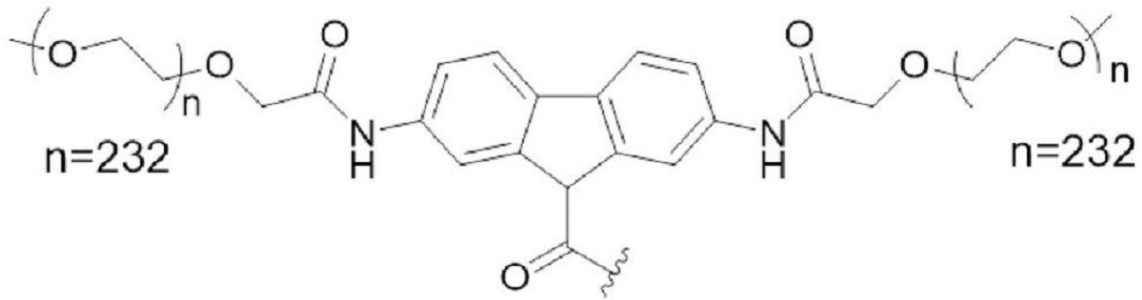
R1-27



40

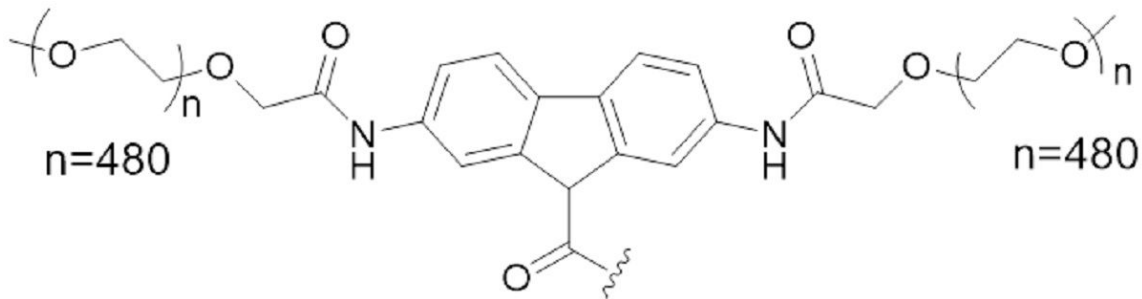
R1-28

50



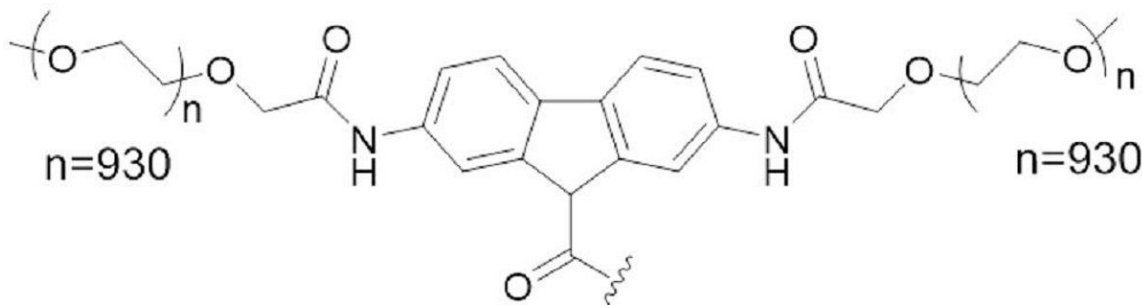
R1-29

10



R1-30

20



R1-31

30

からなる群から選択される。

【請求項2】

以下の構造：

R 1 - R 2 - R 3 - R 4 - S - c y s - R 5

40

を有し、式中、

R 5 は、1つまたは複数のシステイン残基が変異により導入された生体分子を表し；

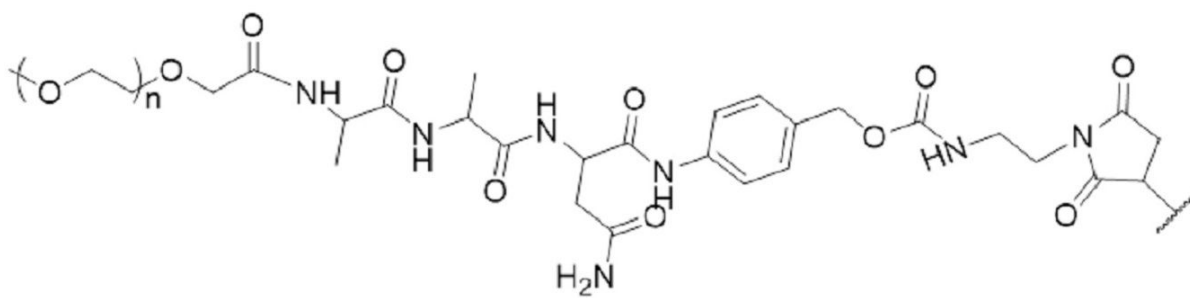
c y s は、R 5 に含まれるシステイン残基（複数可）を表し；

S は、前記システイン残基（複数可）の硫黄原子（複数可）を表し；

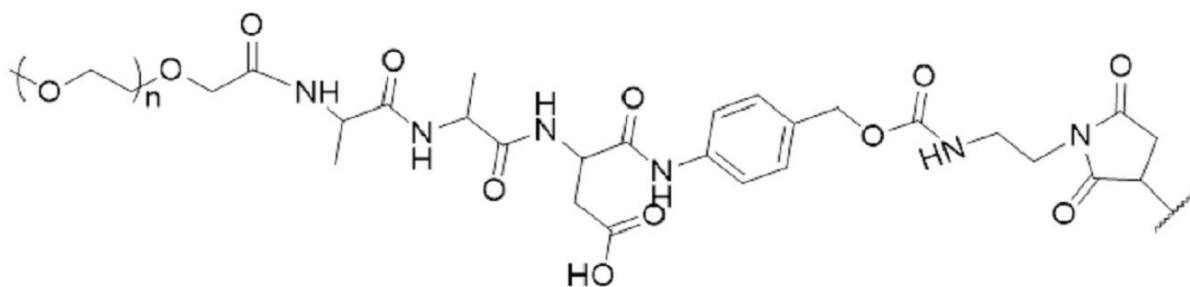
R 4 は、R 5 に含まれるシステイン残基の硫黄原子を介してR 5 と共有結合している基であり；

前記R 1 - R 2 - R 3 - R 4 は、以下の構造：

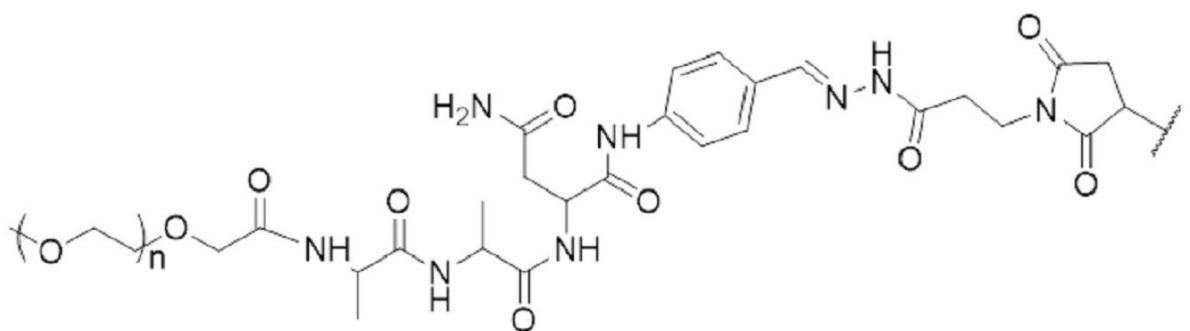
50



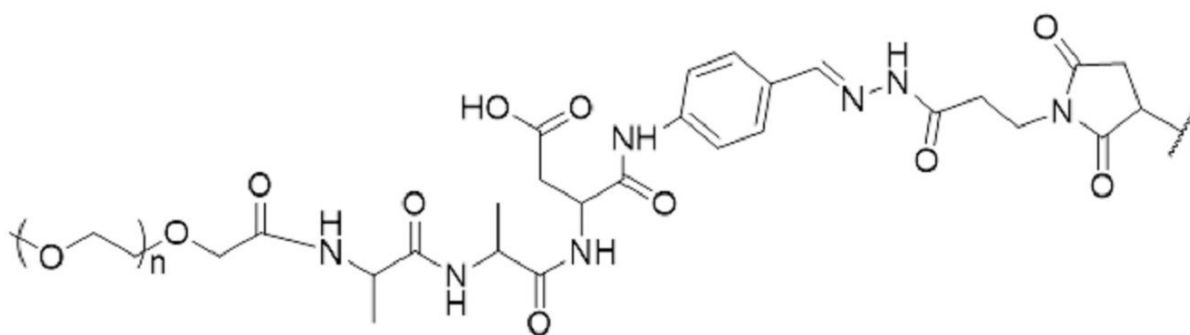
10



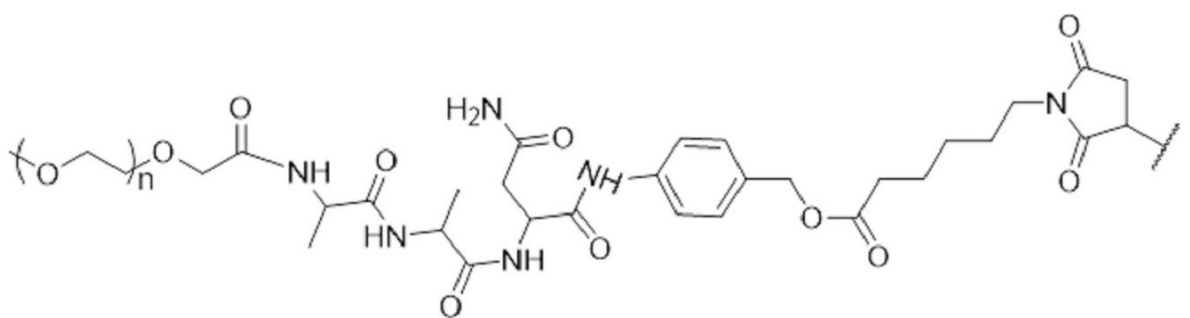
20



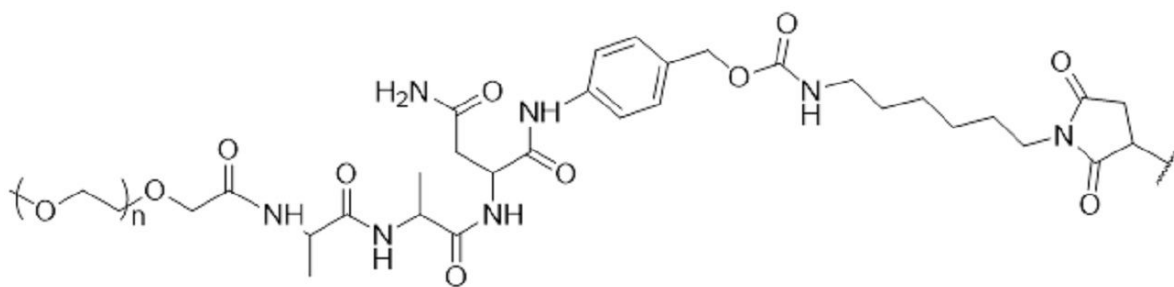
30



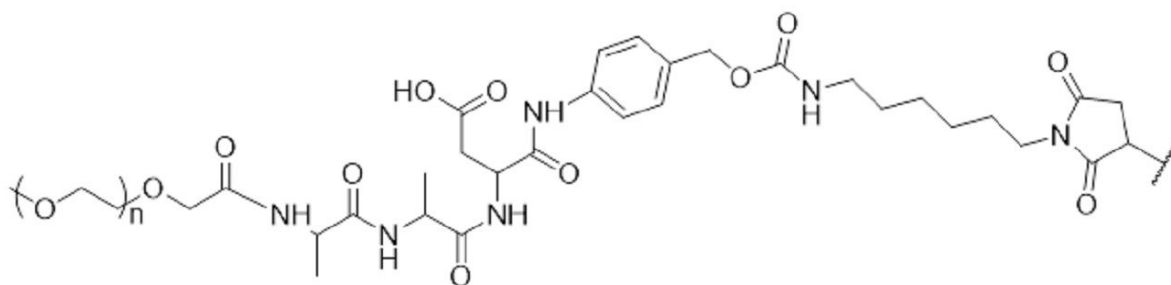
40



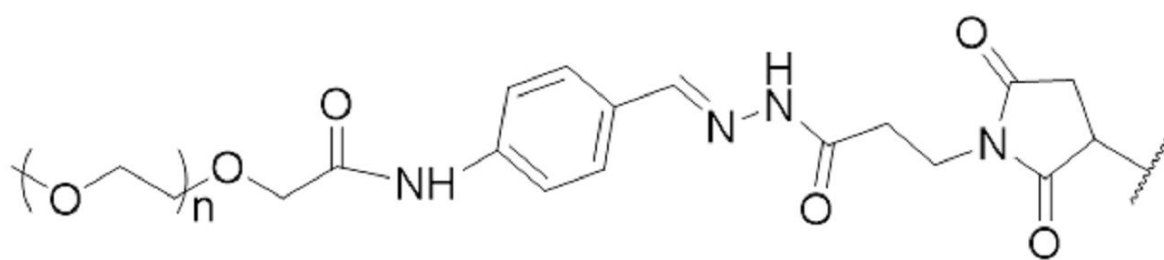
50



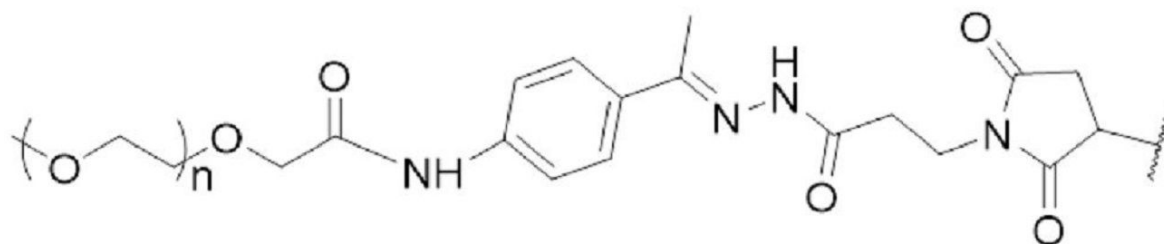
10



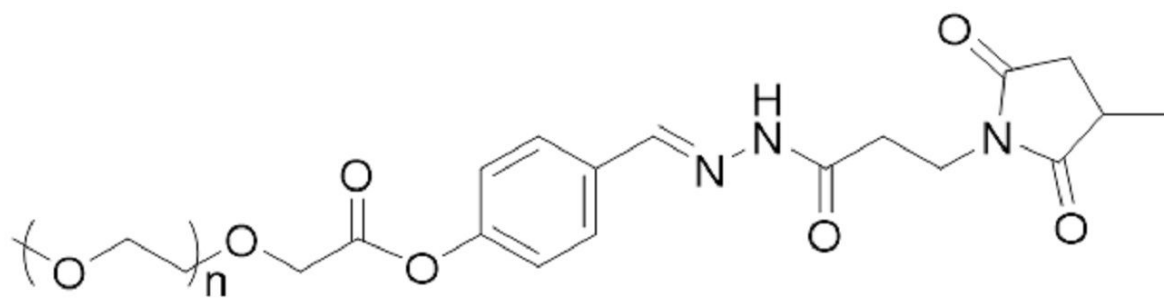
20



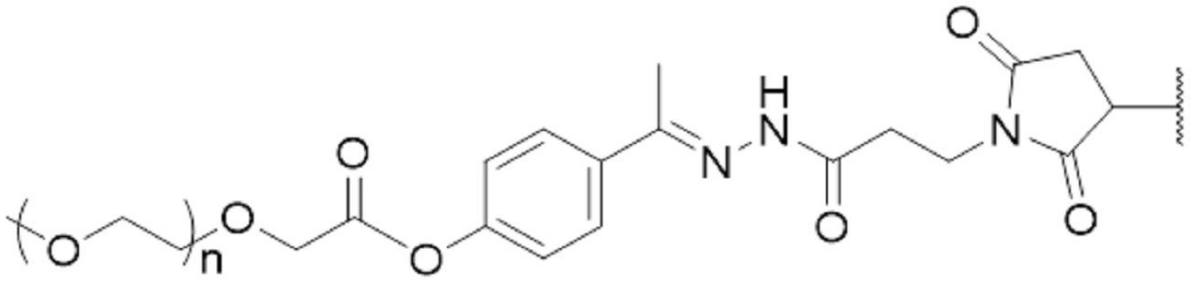
30



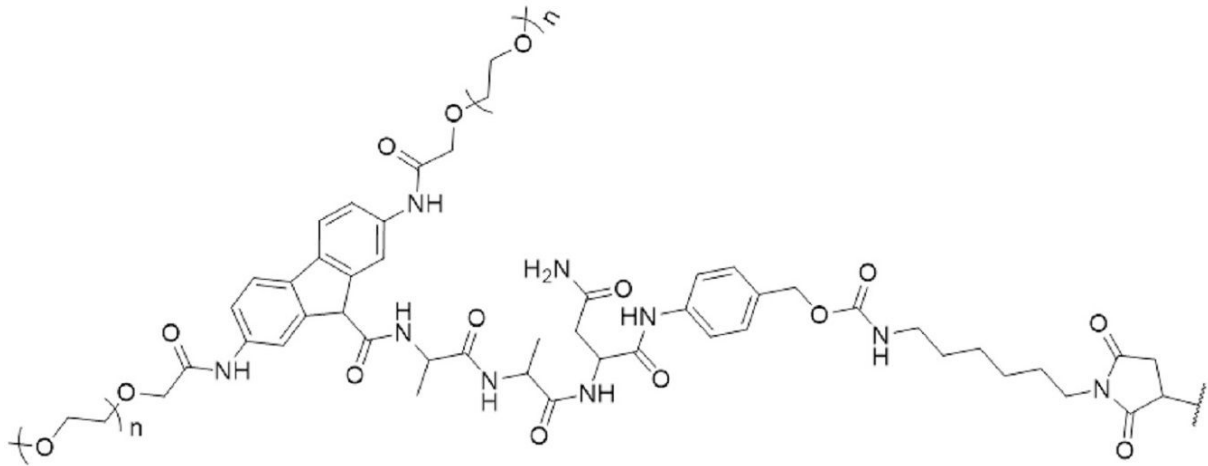
40



50



10



20

のいずれかによって表され、

$n$ は、1から30000の範囲の整数、例えば1～3000、1～500、1～300、1～20、または5～12の範囲の整数などである、  
生体分子のコンジュゲート。

【請求項3】

以下の構造：

R 1 - R 2 - R 3 - R 4 - S - c y s - R 5

を有し、式中、

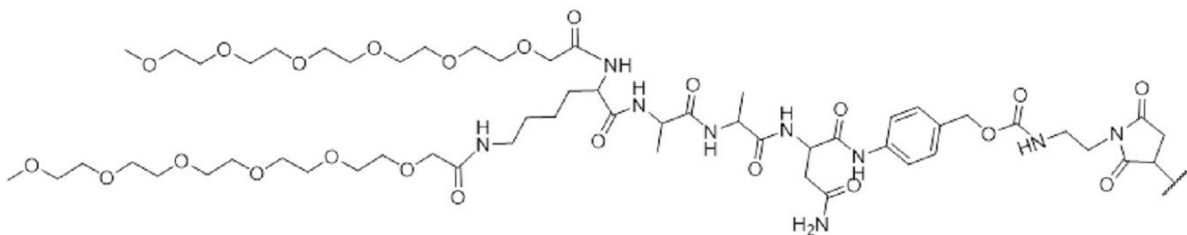
R 5 は、1つまたは複数のシステイン残基が変異により導入された生体分子を表し；

c y s は、R 5 に含まれるシステイン残基（複数可）を表し；

S は、前記システイン残基（複数可）の硫黄原子（複数可）を表し；

R 4 は、R 5 に含まれるシステイン残基の硫黄原子を介してR 5 と共有結合している基であり；

前記 R 1 - R 2 - R 3 - R 4 は：

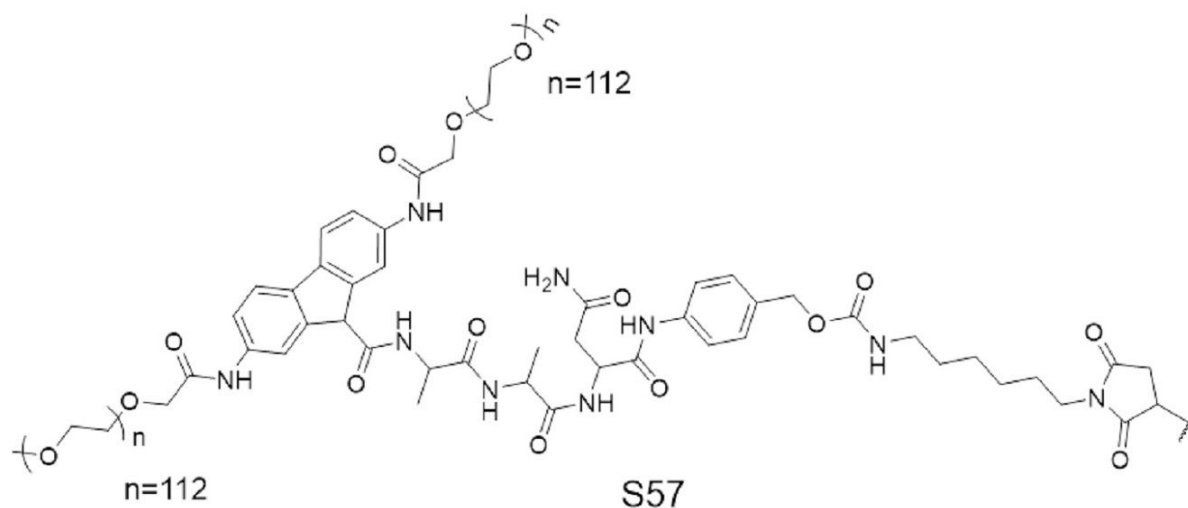
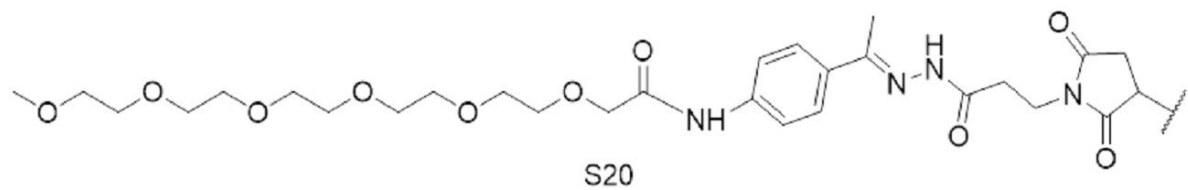
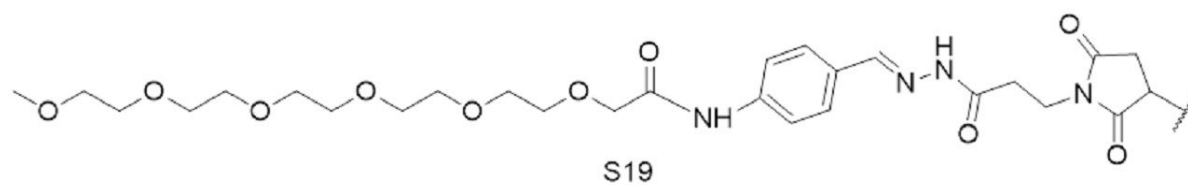
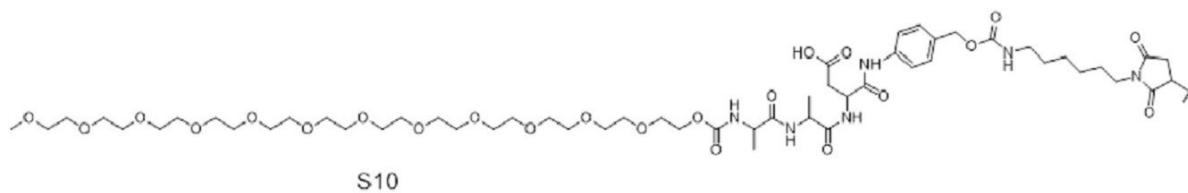
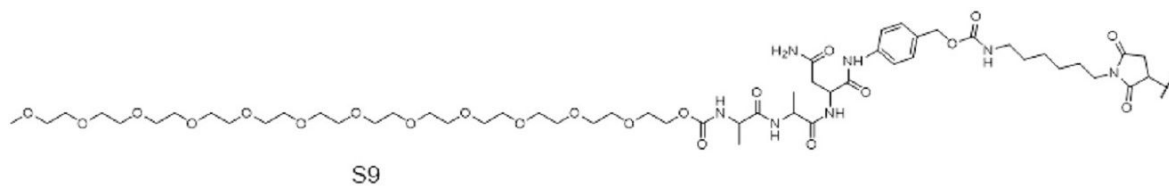
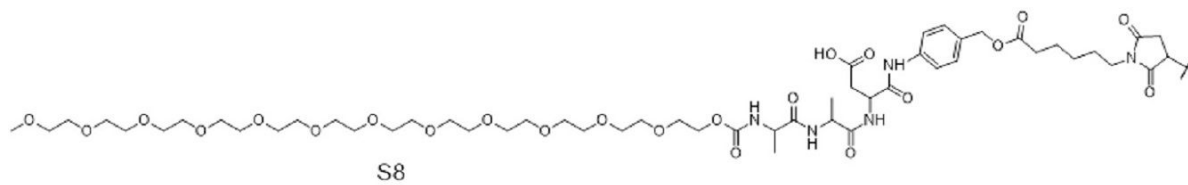


S1

40

50





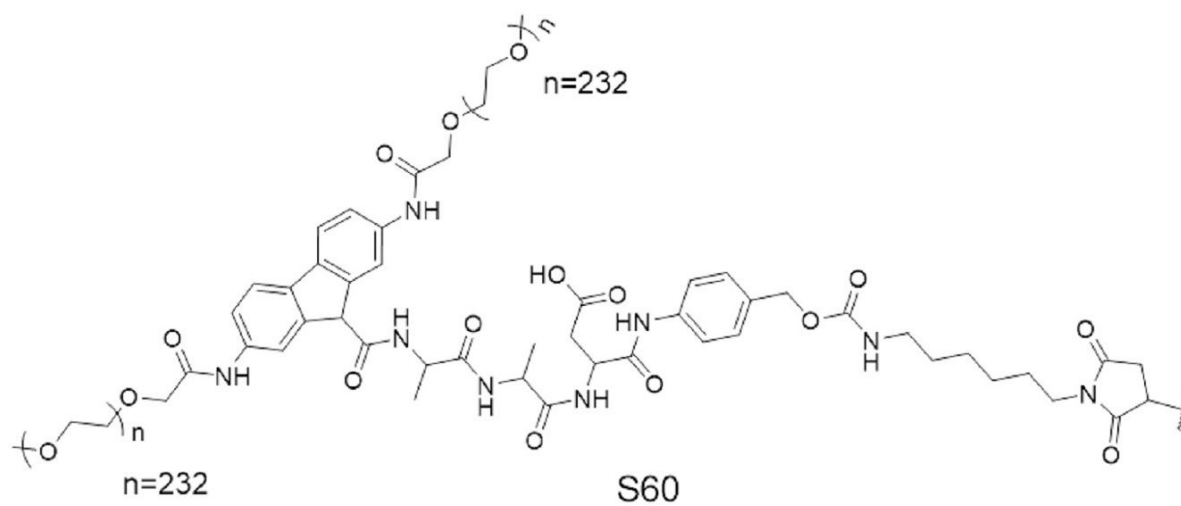
10

20

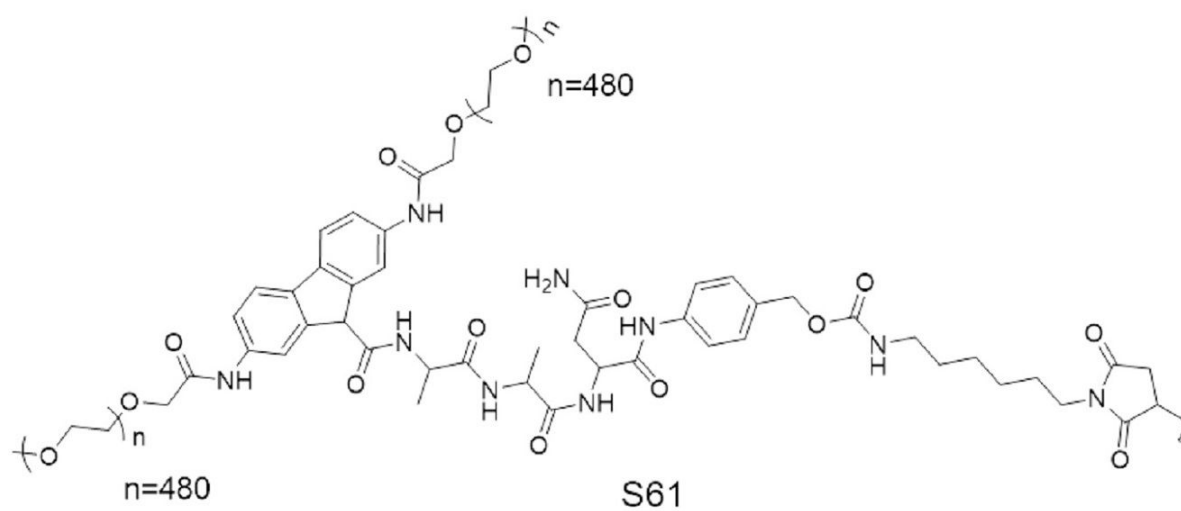
30

40

50

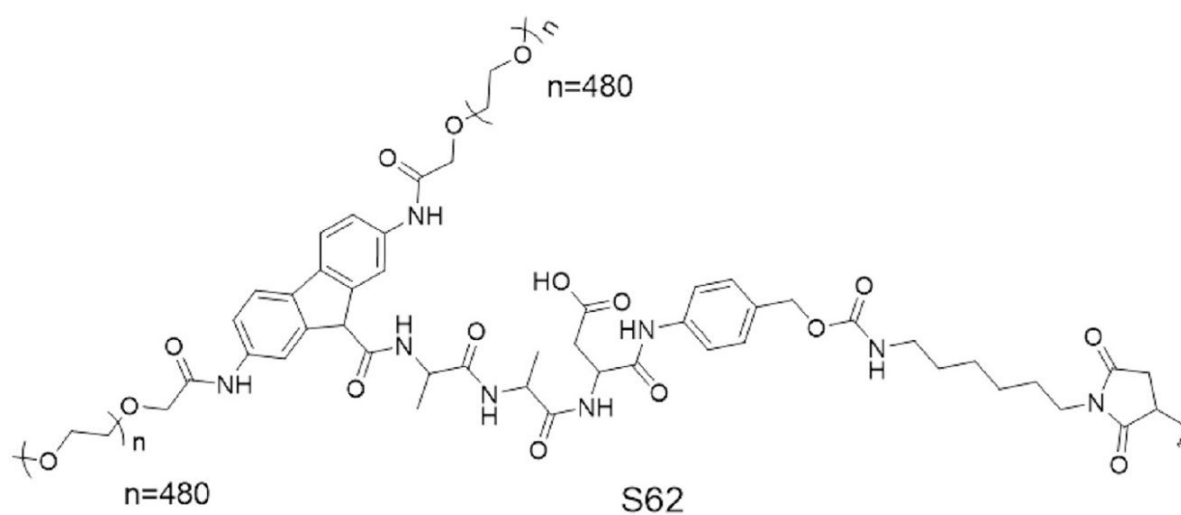


10



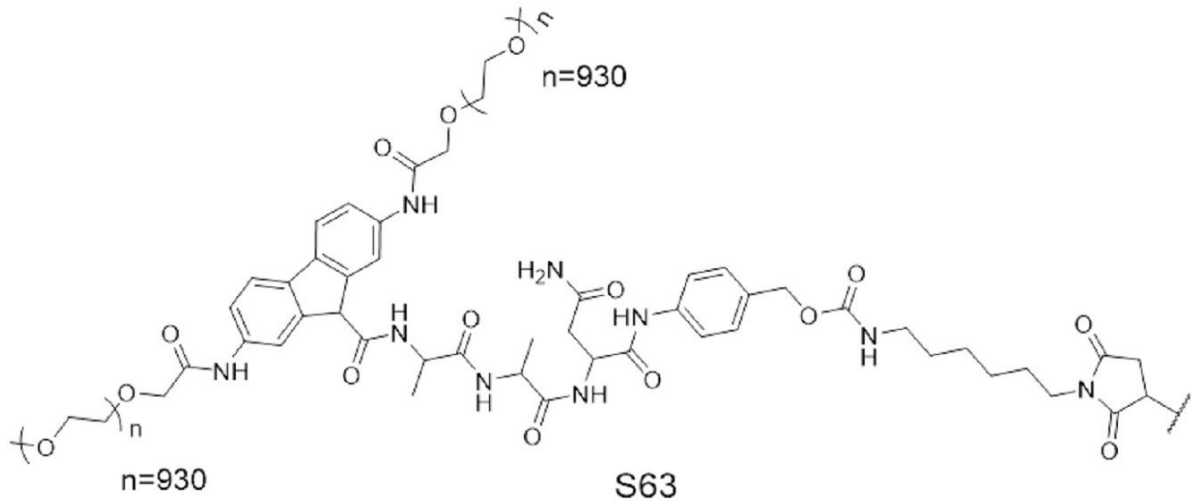
20

30

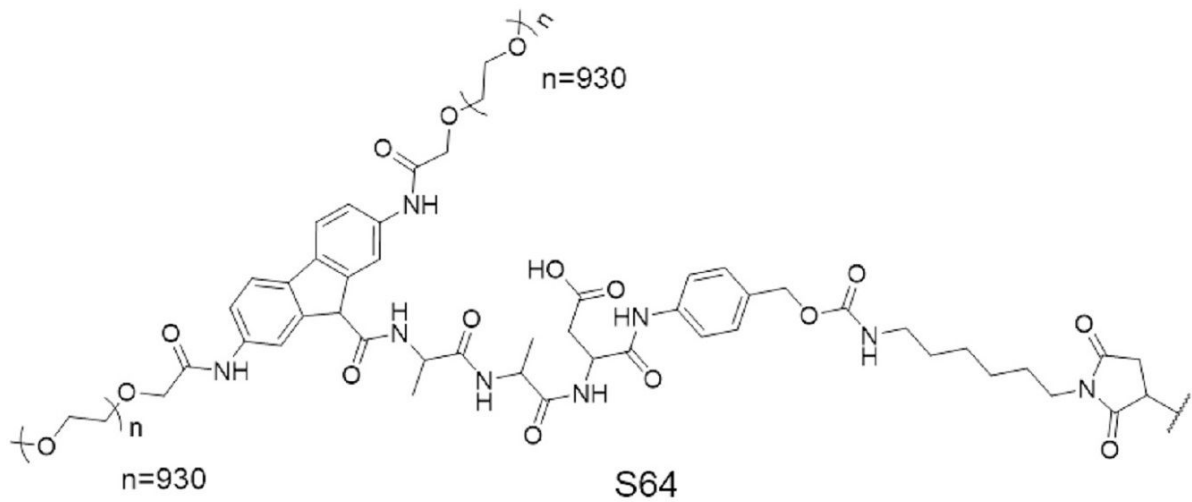


40

50



10



20

30

からなる群から選択される、生体分子のコンジュゲート。

【請求項 4】

R 5 は、そのアミノ酸のうち 1 つまたは複数がシステインに変異されているタンパク質であり、R 5 は、前記システインのチオール基を介して R 4 に連結し；

好ましくは、R 5 は、そのアミノ酸のうち 1 つまたは複数がシステインに変異されている抗体である、

請求項 1 に記載の生体分子のコンジュゲート。

【請求項 5】

R 5 は、抗体であり、前記変異は、抗体分子の可変領域の非相補性決定領域にあり；好ましくは、前記生体分子のコンジュゲートは、最終的にコンジュゲーションを介して 200 超に増えた分子量を得た、請求項 1 に記載の生体分子のコンジュゲート。

40

【請求項 6】

R 5 は、そのタンパク質配列のそのアミノ酸のうち 1 つまたは複数がシステインに変異されているサイトカインを表す、請求項 4 に記載の生体分子のコンジュゲート。

【請求項 7】

R 5 は、抗体分子の可変領域の相補性決定領域に 1 つまたは複数の変異を有する抗体を表し、好ましくは、R 5 は、前記相補性決定領域の G、A、S、T、L、I、F、E、K、D、および Y からなる群から選択されるアミノ酸残基のうち 1 つまたは複数がシステインに変異された抗体を表す、請求項 4 に記載の生体分子のコンジュゲート。

【請求項 8】

50

R 5 は、抗体分子の可変領域の非相補性決定領域に 1 つまたは複数の変異を有する抗体を表し、好ましくは、R 5 は、前記非相補性決定領域の G、A、S、T、L、I、F、E、K、D、および Y からなる群から選択されるアミノ酸残基のうち 1 つまたは複数がシステインに変異された抗体を表す、請求項 4 に記載の生体分子のコンジュゲート。

【請求項 9】

前記生体分子は、G、A、S、T、L、I、F、E、K、D、および Y からなる群から選択されるアミノ酸残基のうち 1 つまたは複数がシステインに変異されたサイトカインである、請求項 6 に記載の生体分子のコンジュゲート。

【請求項 10】

R 5 は、抗体の可変領域の非相補性決定領域に 1 つまたは複数の変異を有する抗体、好ましくは、VH の非相補性決定領域の Gln 3、Ser 7、Ser 26、Glu 46、Thr 68、Asp 72、および VL の非相補性決定領域の Thr 5、Tyr 49、Arg 61、Ser 63、Ser 65、Ser 67、Thr 72、Thr 74、Ser 76、Asp 82 のうち 1 つまたは複数がシステインに変異された抗体を表す、請求項 4 に記載の生体分子のコンジュゲート。

【請求項 11】

変異前に、

R 5 が、IL - 2、IL - 7、IL - 10、IL - 11、IL - 12、IL - 15、IL - 21、IFN - 、IFN - 、IFN - 、G - CSF、GM - CSF、TNF - 、TRAP、および TRAIL からなる群から選択される生体分子に相当するか；

R 5 が、抗 Her 2 抗体、抗 EGFR 抗体、抗 VEGFR 抗体、抗 CD 20 抗体、抗 CD 33 抗体、抗 PD - L 1 抗体、抗 PD - 1 抗体、抗 CTLA - 4 抗体、抗 TNF 抗体、抗 CD 28 抗体、抗 4 - 1 BB 抗体、抗 OX 40 抗体、抗 GITR 抗体、抗 CD 27 抗体、抗 b - CD 40 抗体、もしくは抗 ICOS 抗体、抗 CD 25 抗体、抗 CD 30 抗体、抗 CD 3 抗体、抗 CD 22 抗体、抗 CCR 4 抗体、抗 CD 38 抗体、抗 CD 52 抗体、抗補体 C 5 抗体、抗 RSV - F タンパク質、抗 GD 2 抗体、抗 GITR 抗体、抗糖タンパク質受容体 *lib / Il11a* 抗体、抗 IL 2 R 抗体、抗 LAG 3 抗体、抗インテグリン 4 抗体、抗 *lgE* 抗体、抗 PDGFR  $\alpha$  抗体、抗 RANKL 抗体、抗 SLAMF 7 抗体、抗 LTI G I T 抗体、抗 TIM - 3 抗体、抗 VEGFR 2 抗体、抗 VISTA 抗体からなる群から選択される抗体もしくはその機能性断片に相当するか；または

R 5 が、ウトミルマブ、ウレルマブ、ADG 106、ポテリジオ（商標）（モガムリズマブ）、ベキサール（商標）（トシツモマブ）、ゼヴァリン（商標）（イブリツモマブ・チウキセタン）、リツキサン（商標）（リツキシマブ）、アーゼラ（商標）（オフアツムマブ）、ガザイバ（商標）（オビヌツズマブ）、ベスポンサ（商標）（イノツズマブ・オゾガマイシン）、ゼナパックス（商標）（ダクリズマブ）、バリルマブ、セラリズマブ、アドセトリス（商標）（ブレンツキシマブ・ベドチン）、マイロターゲット（商標）（ゲムツズマブ）、ダラザレックス（商標）（ダラツムマブ）、CDX - 1140、SEA - CD 40、RO7009789、JNJ - 64457107、APX - 005M、Chi L ob 7 / 4、キャンパス（商標）（アレムツズマブ）、ラブティバ（商標）（エファリズマブ）、ソリリス（商標）（エクリズマブ）、ヤーボイ（商標）（イピリムマブ）、トレメリムマブ、アーピタックス（商標）（セツキシマブ）、ベクティピックス（商標）（パニツムマブ）、ポートルーザ（商標）（ネシツムマブ）、TheraCIM（商標）（ニモツズマブ）、シナジス（商標）（パリビズマブ）、ユニツキシシン（商標）（ジヌツキシマブ）、TRX - 518、MK - 4166、MK - 1248、GWN - 323、INCA GN 0186、BMS - 986156、AMG - 228、レオプロ（商標）（アブキシマブ）、ハーセブチン（商標）（トラスツズマブ）、パージェタ（商標）（ベルツズマブ）、カドサイラ（商標）（Ado - トラスツズマブ・エムタンシン）、GSK - 3359609、JTX - 2011、シムレクト（商標）（パシリキシマブ）、タイサブリ（商標）（ナタリズマブ）、BMS - 986016、REGN3767、LAG 525、ゾレア（商標）（オマリズマブ）、タボリマブ、PF - 04518600、BMS - 9861

10

20

30

40

50

78、MOXR-0916、GSK-3174998、INCAGN01949、IBI-101、キイトルーダ(商標)(ペムプロリズマブ)、オブジーボ(商標)(ニボルマブ)、ラルトルボ(商標)(オララツマブ)、テセントリク(商標)(アテゾリズマブ)、BMS-936559、パベンチオ(商標)(アベルマブ)、イミフィンジ(商標)(デュルバルマブ)、プロリア(商標)(デノスマブ)、エムプリシティ(商標)(エロツズマブ)、MTIG7192A、TSR-022、MBG-453、レミケード(商標)(インフリキシマブ)、ヒュミラ(商標)(アダリムマブ)、アバスチン(商標)(ペバシズマブ)、ルセンチス(商標)(ラニビズマブ)、サイラムザ(商標)(ラムシルマブ)、およびJNJ-61610588からなる群から選択される抗体もしくはその機能性断片に相当する、

10

請求項4に記載の生体分子のコンジュゲート。

【請求項12】

IL2の変異位置が、Lys32、Lys35、Thr37、Met39、Thr41、Lys43、Tyr45、Lys48、Lys49、Lys64、Leu72、Ala73、Ser75、Lys76、Leu94、Thr101、Thr102、Tyr107、Ala108、Thr111、Ala112、Leu12、His16、Leu19、Met23、Gly27、Ser75、Arg81、Leu85、Ser87、およびAsn88からなる群から選択されるか；または

IL10の変異位置が、Thr6、Ser8、Ser11、Thr13、Gly17、Arg24、Ser31、Arg32、Lys34、Thr35、Lys40、Leu46、Lys49、Ser51、Lys57、Gly58、Ser66、Tyr72、Lys88、His90、Ser93、Lys99、Thr100、Arg104、Lys117、Ser118、Lys119、Lys125、Lys130、Lys134、Gly135、Tyr137、Tyr149、Thr155、Lys157、およびArg159からなる群から選択されるか；または

20

抗PD-1抗体ペムプロリズマブの重鎖の変異位置が、Ser7、Gly8、Gly15、Ala16、Ser17、Ala24、Ser25、Gly26、Tyr27、Thr28、Thr30、Asn31、Tyr32、Tyr33、Tyr35、Ala40、Gly42、Gly44、Leu45、Gly49、Gly50、Ile51、Asn52、Ser54、Asn55、Gly56、Gly57、Thr58、Asn59、Lys63、Lys65、Thr69、Leu70、Thr71、Thr72、Asp73、Ser74、Ser75、Thr76、Thr77、Thr78、Ala79、Leu83、Ser85、Leu86、Thr91、Ala92、Arg99、Asp100、Tyr101、Arg102、Asp104、Gly106、Gly111、Gly113、Thr114、115Thr、117Thr、Ser119、Ser120、Ala121、Ser122、Thr123、Lys124、Gly125、およびSer127からなる群から選択され；軽鎖の変異位置が、Ile2、Thr5、Ser7、Ala9、Thr10、Leu11、Ser12、Leu13、Ser14、Gly16、Ala19、Thr20、Ala25、Ser26、Lys27、Gly28、Ser30、Thr31、Ser32、Gly33、Tyr34、Ser35、Tyr36、Leu37、Gly45、Ala47、Leu50、Leu51、Ile52、Tyr53、Leu54、Ala55、Ser56、Tyr57、Leu58、Ser60、Gly61、Ala64、Ser67、Gly68、Ser69、Gly70、Ser71、Gly72、Thr73、Ala76、Thr78、Ser80、Ser81、Ser95、Arg96、Asp97、Leu98、Leu100、Thr101、Phe102、Gly104、Ile110、Lys111、およびK130からなる群から選択されるか； ; または

30

40

抗PD-1抗体ニボルマブの重鎖の変異位置が、Gln3、Ser7、Gly8、Gly9、Gly10、Gly15、Ser17、Lys23、Ala24、Ser25、Gly26、Ile27、Asn31、Thr28、Ser30、Ser32、Gly33

50

、Ala40、Gly42、Gly44、Leu45、Ala49、Ile51、Tyr53、Asp54、Gly55、Ser56、Lys57、Tyr59、Tyr60、Ala61、Asp62、Ser63、Lys65、Gly66、Thr69、Ile70、Ser71、Arg72、Asp73、Asn74、Ser75、Lys76、Asn77、Thr78、Leu79、Leu81、Ser85、Leu86、Ala88、Thr91、Ala92、Thr98、Asn99、Asp100、Asp101、Tyr102、Gly104、Gly106、Thr107、Leu108、Thr110、Ser112、Ser113、Ala114、Ser115、Thr116、Lys117、Gly118、およびSer120からなる群から選択され；軽鎖の変異位置が、Ile2、Leu4、Thr5、Ser7、Ala9、Thr10、Leu11、Ser12、Leu13、Ser14、Gly16、Ala19、Thr20、Leu21、Ala25、Ser26、Ser28、Ser30、Ser31、Tyr32、Leu33、Ala34、Tyr36、Gly41、Ala43、Leu46、Leu47、Ile48、Tyr49、Asp50、Ala51、Ser52、Asn53、Arg54、Ala55、Thr56、Gly57、Ile58、Ala60、Arg61、Ser63、Gly64、Ser65、Gly66、Ser67、Gly68、Thr69、Thr72、Leu73、Thr74、Ile75、Ser76、Ser77、Leu78、Ala84、Ser91、Ser92、Asn93、Arg96、Thr97、Phe98、Gly99、Gly101、Thr102、Ile106、Lys107、Thr109、Ala111、Ala112、Ser114、Ile117、およびSer121からなる群から選択されるか；

10

20

抗CTLA-4抗体イピリムマブの重鎖の変異位置が、Gln3、Arg19、Leu20、Ser25、Gly26、Phe27、Thr28、Phe29、Ser30、Ser31、Tyr32、Thr33、Met34、His35、Gly44、Phe50、Ile51、Ser52、Tyr53、Asp54、Gly55、Asn56、Asn57、Lys58、Tyr59、Tyr60、Thr69、Ser71、Arg72、Asp73、Asn74、Ser75、Lys76、Asn77、Thr99、Gly100、Trp101、Leu102、Gly103、およびPro104からなる群から選択され；軽鎖の変異位置が、Gln6、Arg24、Ala25、Ser26、Gln27、Ser28、Val29、Gly30、Ser31、Ser32、Tyr33、Ile49、Tyr50、Gly51、Ala52、Phe53、Ser54、Arg55、Ala56、Phe53、Ser54、Arg55、Ala56、Thr57、Gly58、Ile59、Pro60、Asp61、Arg62、Ser68、Gly69、Thr70、Gln90、Gln91、Tyr92、Gly93、Ser94、Ser95、Pro96、およびTrp97からなる群から選択されるか；

30

抗TNF 抗体重鎖の変異位置が、Ser7、Gly8、Gly9、Gly10、Leu11、Gly15、Ser17、Leu18、Leu20、Ala24、Ser25、Gly26、Thr28、Asp30、Asp31、Tyr32、Ala33、Ala40、Gly42、Gly44、Leu45、Ser49、Ala50、Ile51、Thr52、Asn54、Ser55、Gly56、Ile58、Asp59、Tyr60、Ala61、Asp62、Ser63、Glu65、Gly66、Phe68、Thr69、Ile70、Ser71、Asp73、Asn74、Ala75、Lys76、Ser78、Leu79、Tyr80、Leu81、Ser85、Leu86、Ala88、Thr91、Ala92、Lys98、Ser100、Tyr101、Leu102、Ser103、Thr104、Ala105、Ser106、Ser107、Leu108、Asp109、Tyr110、Gly112、Gly114、Thr115、Leu116、Thr118、Ser120、Ser121、Ala122、Ser123、およびThr124からなる群から選択され；軽鎖の変異位置が、Asp1、Thr5、Ser7、Ser9、Ser10、Leu11、Ser12、Ala13、Ser14、Gly16、Thr20、Ile21、Ala25、Ser26、Gln27、Gly28、

40

50

I l e 2 9、A r g 3 0、A s n 3 1、T y r 3 2、L e u 3 3、A l a 3 4、T y r 3 6、L y s 3 9、G l y 4 1、L y s 4 2、A l a 4 3、L e u 4 8、L e u 4 7、I l e 4 8、T y r 4 9、A l a 5 0、A l a 5 1、S e r 5 2、T h r 5 3、L e u 5 4、G l n 5 5、S e r 5 6、G l y 5 7、S e r 6 0、S e r 6 3、G l y 6 4、S e r 6 5、G l y 6 6、S e r 6 7、G l y 6 8、T h r 6 9、A s p 7 0、T h r 7 2、L e u 7 3、T h r 7 4、I l e 7 5、S e r 7 6、S e r 7 7、L e u 7 8、A l a 8 4、T h r 8 5、T y r 9 1、A s n 9 2、A r g 9 3、A l a 9 4、T y r 9 6、T h r 9 7、P h e 9 8、G l y 9 9、G l y 1 0 1、T h r 1 0 2、I l e 1 0 6、L y s 1 0 7、T h r 1 0 9、および A l a 1 1 1 からなる群から選択されるか；

抗 C D 2 8 抗体の重鎖の変異位置が、S e r 7、G l y 8、G l y 1 5、A l a 1 6、S e r 1 7、S e r 2 1、A l a 2 4、S e r 2 5、G l y 2 6、T y r 2 7、T h r 2 8、T h r 3 0、S e r 3 1、T y r 3 2、A l a 4 0、G l y 4 2、G l y 4 4、G l y 4 9、T y r 5 2、G l y 5 4、T h r 5 8、A l a 6 8、T h r 6 9、T h r 7 1、T h r 7 4、S e r 7 5、S e r 7 7、T h r 7 8、A l a 7 9、S e r 8 4、L e u 8 6、S e r 8 8、T h r 9 1、A l a 9 2、T h r 9 7、S e r 9 9、T y r 1 0 1、G l y 1 0 2、L e u 1 0 3、G l y 1 1 3、T h r 1 1 4、T h r 1 1 5、T h r 1 1 7、S e r 1 1 9、S e r 1 2 0、A l a 1 2 1、S e r 1 2 2、および T h r 1 2 3 からなる群から選択され；軽鎖の変異位置が、T h r 5、S e r 7、S e r 9、S e r 1 0、S e r 1 1、S e r 1 2、A l a 1 3、S e r 1 4、G l y 1 6、T h r 2 0、T h r 2 2、A l a 2 5、S e r 2 6、S e r 2 7、I l e 2 9、T y r 3 0、A l a 4 3、L e u 4 6、L e u 4 7、T y r 4 9、L y s 5 0、A l a 5 1、S e r 5 2、L e u 5 4、T h r 5 6、G l y 5 7、S e r 6 0、S e r 6 3、G l y 6 4、S e r 6 5、G l y 6 6、S e r 6 7、G l y 6 8、T h r 6 9、A s p 7 0、T h r 7 2、T h r 7 4、S e r 7 6、S e r 7 7、A l a 8 4、T h r 8 5、G l y 9 1、T h r 9 3、T y r 9 4、T y r 9 6、T h r 9 7、P h e 9 8、G l y 9 9、G l y 1 0 0、G l y 1 0 1、T h r 1 0 2、T h r 1 0 9、および A l a 1 1 1 からなる群から選択されるか；

抗 4 - 1 B B 抗体の重鎖の変異位置が、T h r 3 1、T y r 3 2、S e r 3 5、L y s 5 0、T y r 5 2、A s p 5 5、S e r 5 6、T y r 5 7、T h r 5 8、A s n 5 9、T y r 6 0、S e r 6 1、G l n 6 5、G l y 6 6、G l y 9 9、T y r 1 0 0、G l y 1 0 1、A s p 1 0 4、および T y r 1 0 5 からなる群から選択され；軽鎖の変異位置が、S e r 2 3、G l y 2 4、A s p 2 5、A s n 2 6、G l y 2 8、A s p 2 9、G l n 3 0、T y r 3 1、G l n 4 9、A s p 5 0、L y s 5 1、A s n 5 2、A r g 5 3、S e r 5 5、G l y 5 6、T h r 8 9、T y r 9 0、T h r 9 1、G l y 9 2、G l y 9 4、および S e r 9 5 からなる群から選択されるか；または

抗 H e r 2 抗体の重鎖の変異位置が、A r g 1 9、L y s 3 0、A s p 3 1、T y r 3 3、A r g 5 0、T y r 6 2、A s n 5 5、T y r 5 7、A r g 5 9、T y r 6 0、A s p 6 2、L y s 6 5、A s p 1 0 2、および T y r 1 0 5 からなる群から選択され；軽鎖の変異位置が、A s p 1、G l n 3、G l n 2 7、A s p 2 8、A s n 3 0、T y r 4 9、T y r 5 5、A r g 6 6、A s p 7 0、および T y r 9 2 からなる群から選択されるか、

抗 P D - L 1 抗体アテゾリズマブの重鎖の変異位置が、G l n 3、A s p 3 1、T y r 5 4、T y r 5 9、T y r 6 0、A s p 6 2、L y s 6 5、A s p 7 3、L y s 7 6、A s n 7 7、および A r g 9 9 からなる群から選択され；軽鎖の変異位置が、A r g 2 4、G l n 2 7、A s p 2 8、T y r 4 9、T y r 5 5、A s p 7 0、G l n 8 9、G l n 9 0、T y r 9 1、および T y r 9 3 からなる群から選択される、  
請求項 1 1 に記載の生体分子のコンジュゲート。

【請求項 1 3】

R 5 は、システイン変異されている 1 つまたは複数のアミノ酸残基を含有する融合タンパク質であり；

好ましくは、前記融合タンパク質は、抗体の抗原結合性ドメインと、任意選択的にサイトカインとを含有し；好ましくは、前記融合タンパク質は、H E R 2、C D 1 9、E G F

10

20

30

40

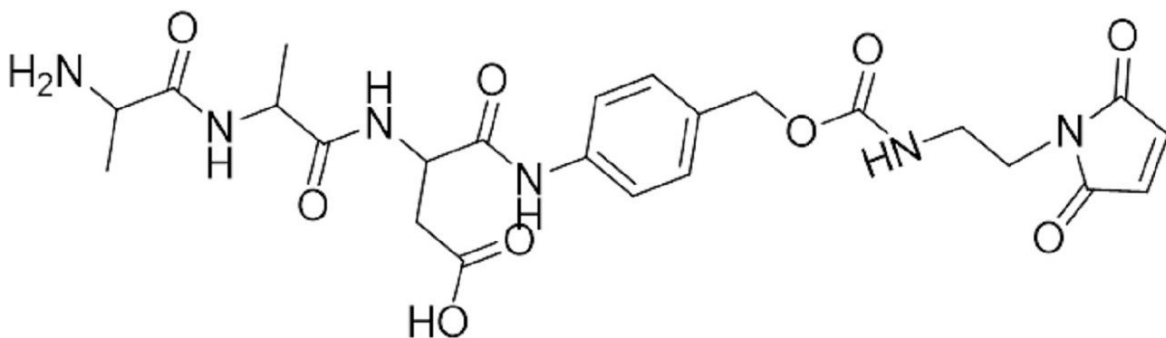
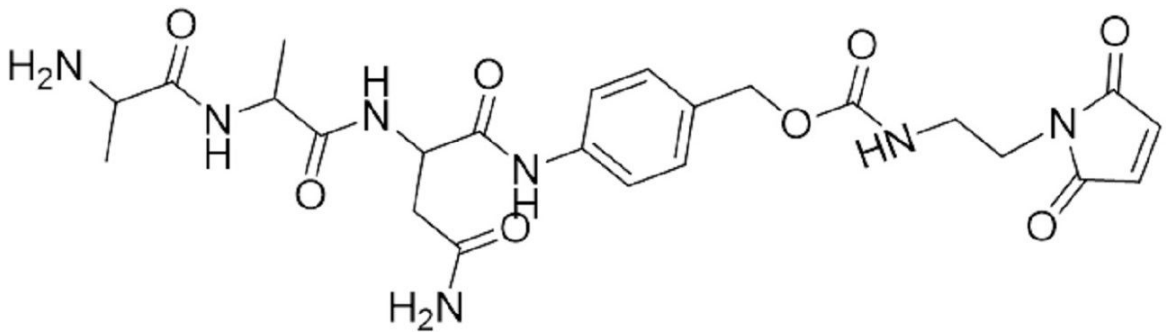
50

R、CD22、CD3、TROP2、糖タンパク質NMB、グアニル酸シクラーゼC、CEA、CD79b、PSMA、ENPP3、メソテリン、CD138、NaPi2b、CD56、CD74、FOLR1、DLL3、CEACAM5、CD142、SLAMF7、CD25、SLTRK6、CD37、CD70、AGS-22、C4.4A、FGFR2、Ly6E、MUC16、BCMA、pカドヘリン、エフリン-A、LAMP1、MUC1、CD19、PDL1、HER2、NY-ESO-1、BCMA、WT1、MUC1、CD20、CD23、ROR1、CD123、CD33、CD44v6、CD174、CD30、CD133、cMet、EGFR、FAP、EphA2、GD2、GPC3、IL-13Ra2、LewisY、メソテリン、SS1、CEA、CD171、EGFR、EGFRvIII、VEGFR2、NY-ESO-1、MUC-1、およびMAGE-A3からなる群から選択される抗原に対する抗原結合性ドメインを含有する二重特異性抗体であり；好ましくは、前記二重特異性抗体は、単鎖の二重特異性抗体であり；

好ましくは、前記融合タンパク質は、抗体の抗原結合性ドメインと、IL-2、IL-7、IL-10、IL-11、IL-12、IL-15、IL-21、IFN- $\alpha$ 、IFN- $\beta$ 、IFN- $\gamma$ 、G-CSF、GM-CSF、TNF- $\alpha$ 、TRAP、およびTRAILからなる群から選択されるサイトカインとを含有し；好ましくは、前記融合タンパク質は、抗PD-1抗体とIL2との融合タンパク質である、

請求項1に記載の生体分子のコンジュゲート。

【請求項14】



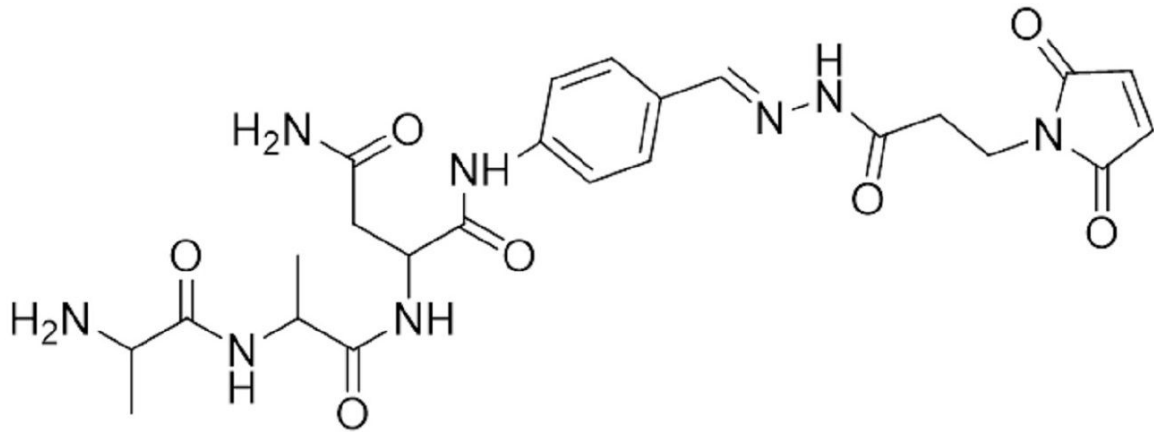
10

20

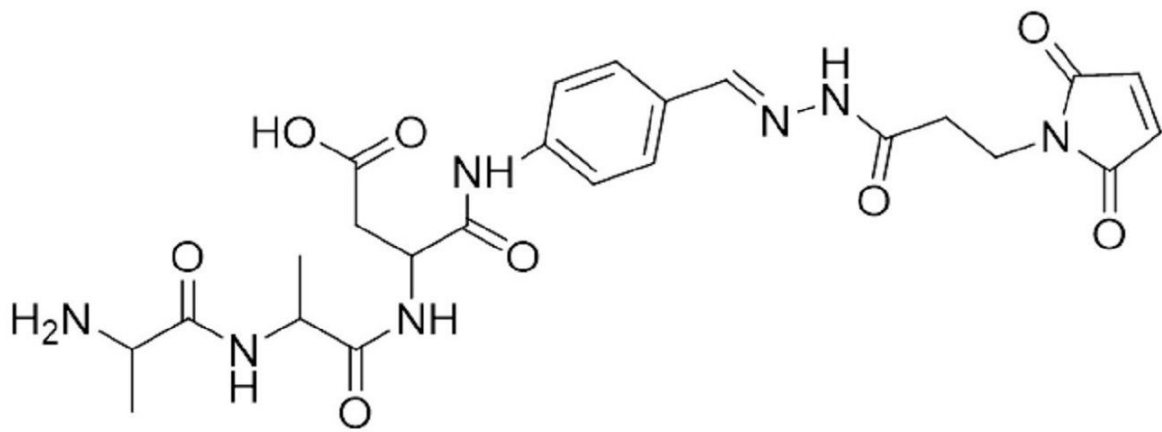
30

40

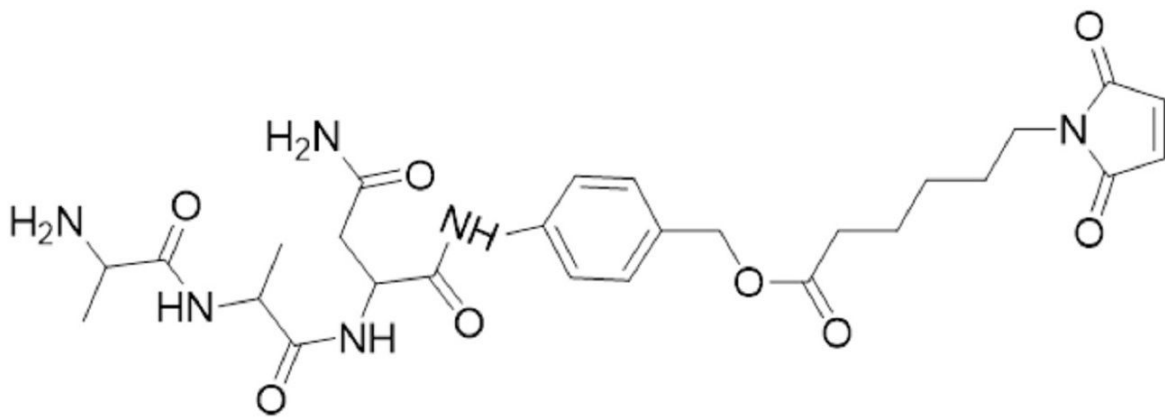
50



10



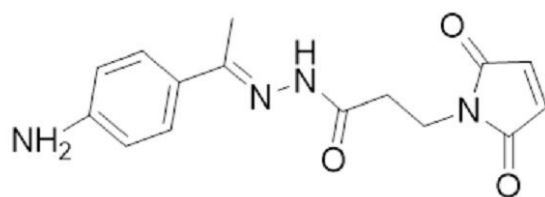
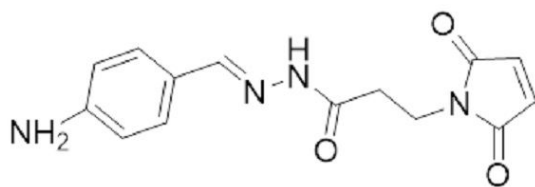
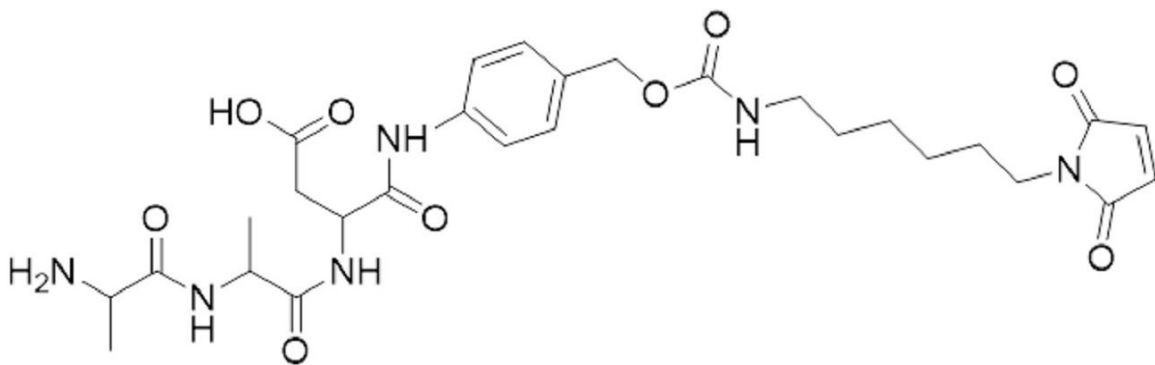
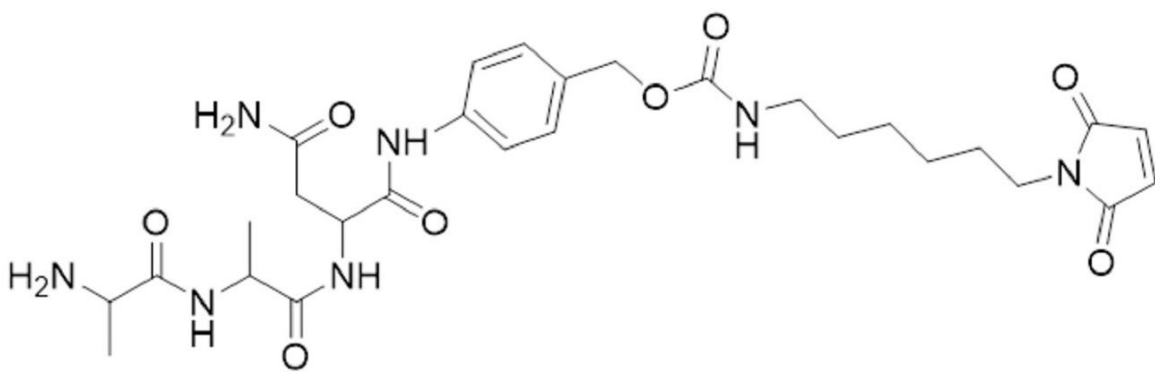
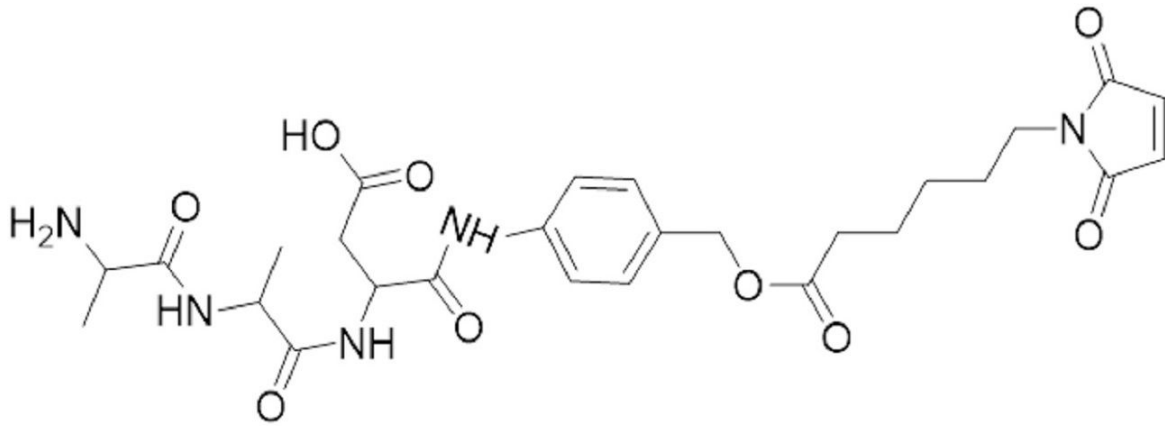
20

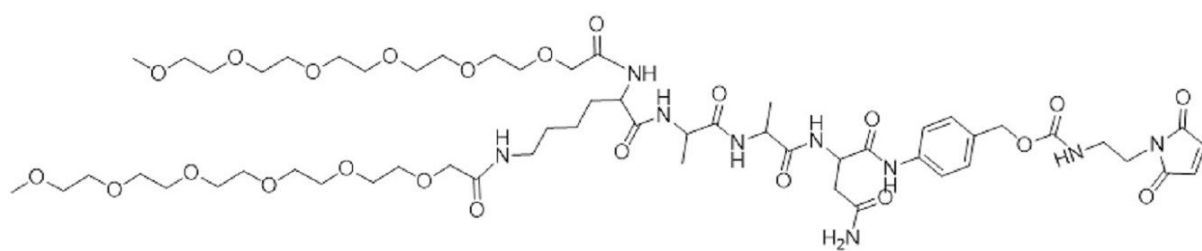
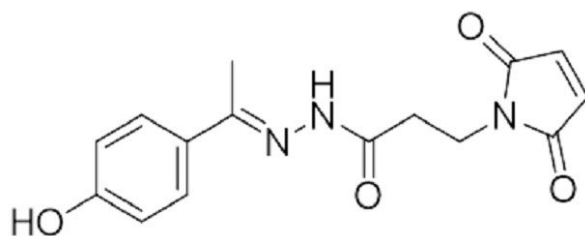
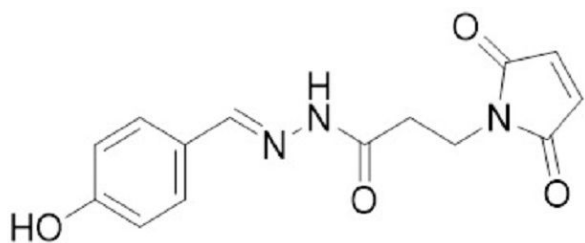


30

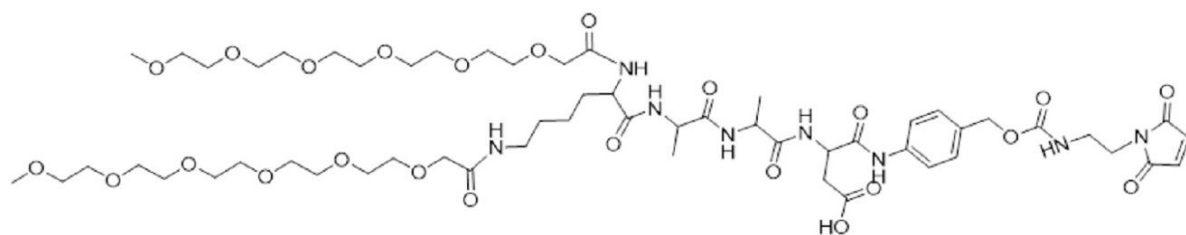
40

50

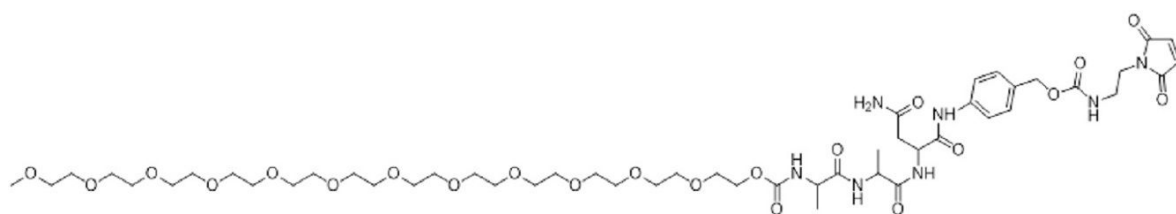




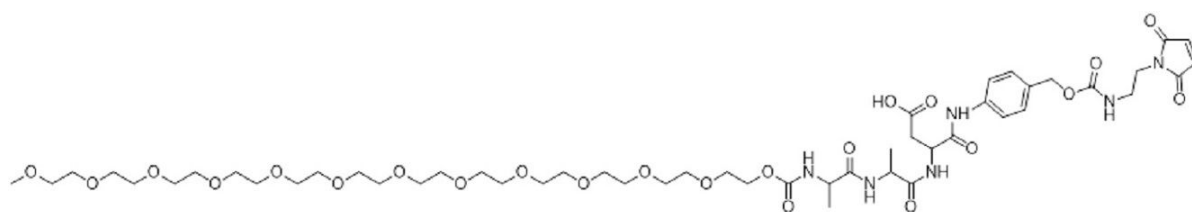
S1



S2



S3



S4

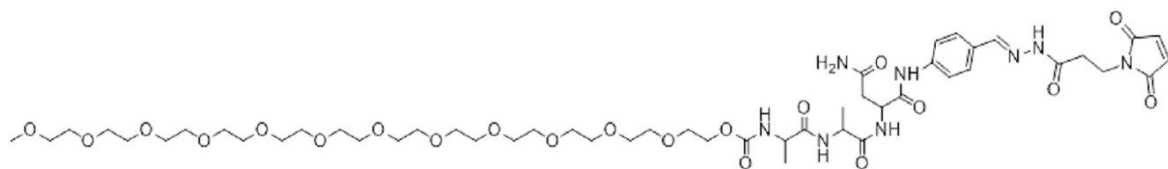
10

20

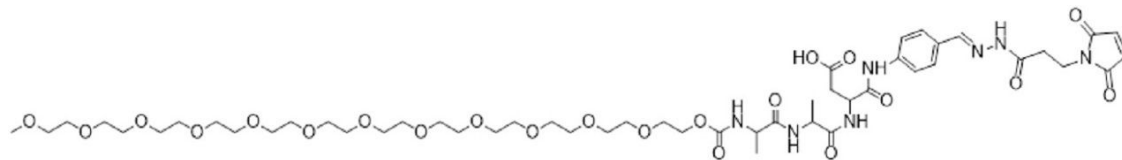
30

40

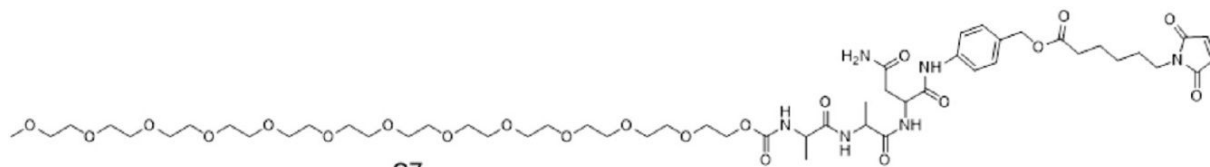
50



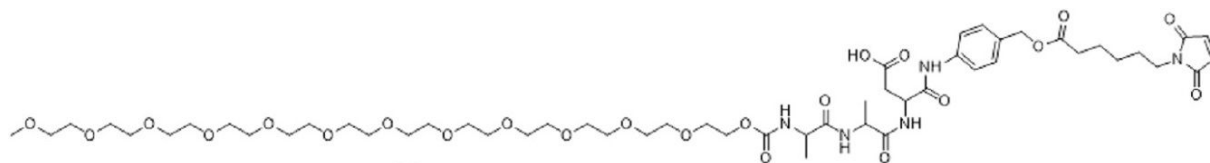
S5



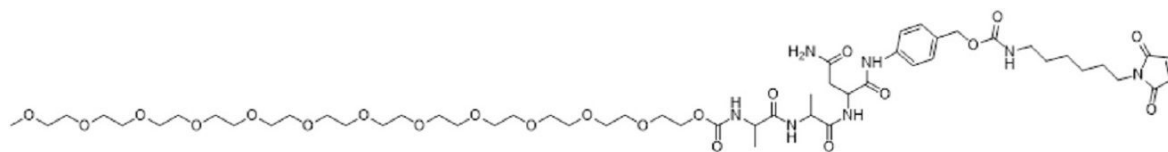
S6



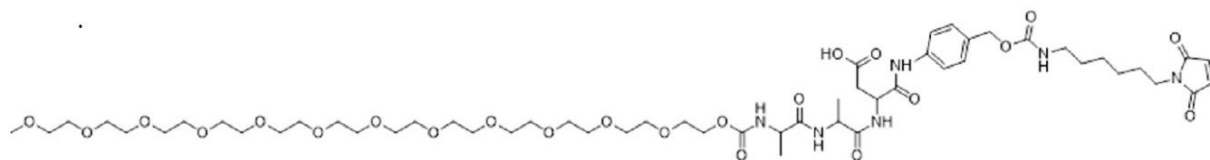
S7



S8



S9



S10

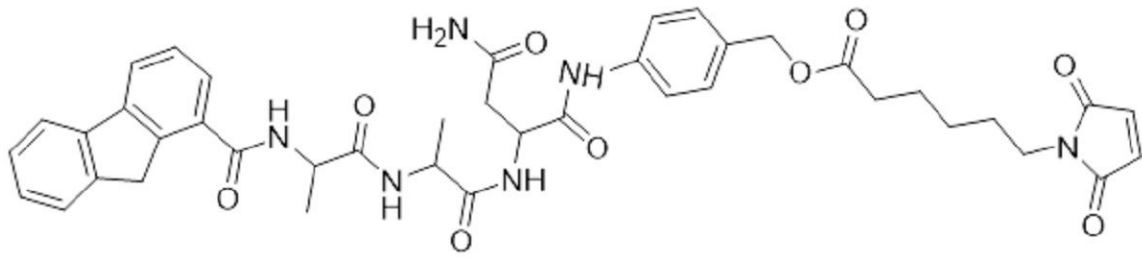
10

20

30

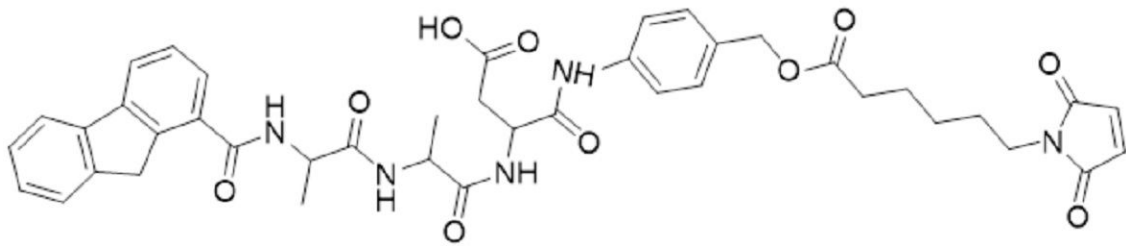
40

50



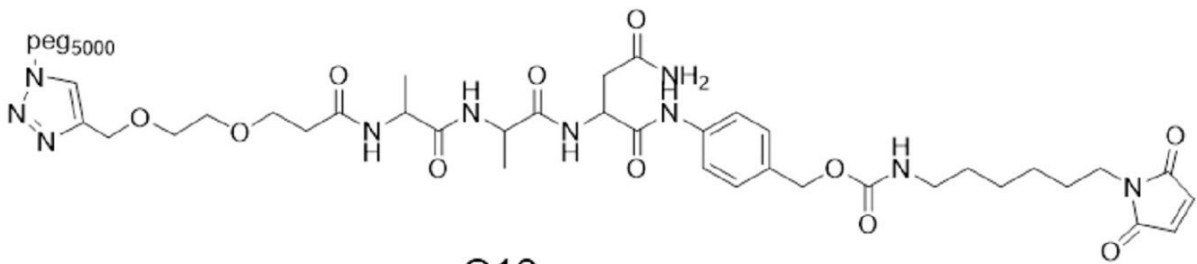
S11

10



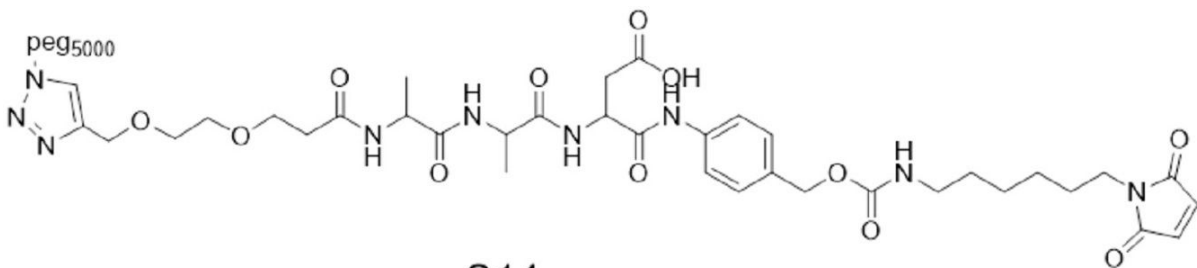
S12

20



S13

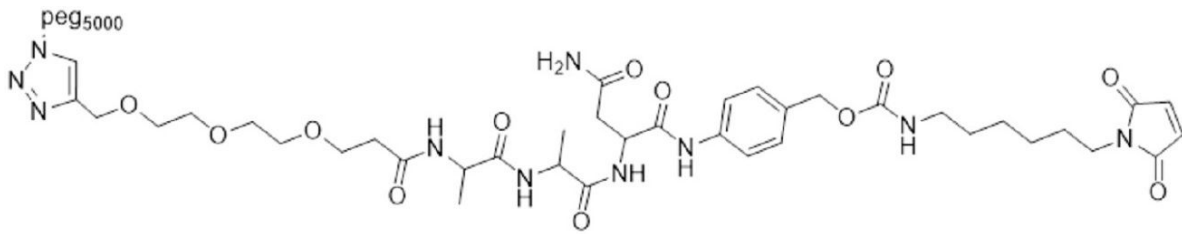
30



S14

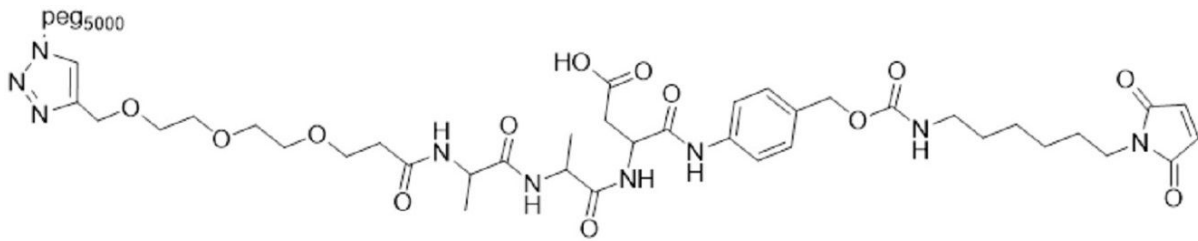
40

50



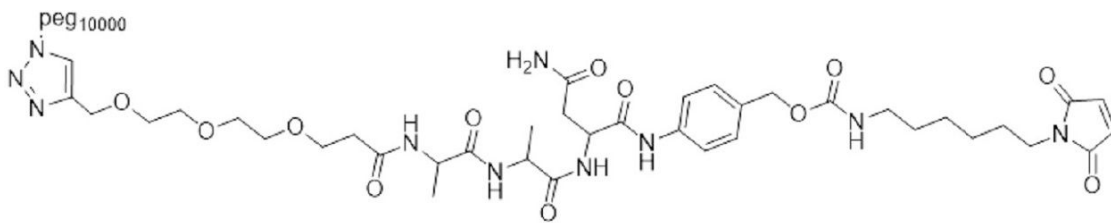
S15

10



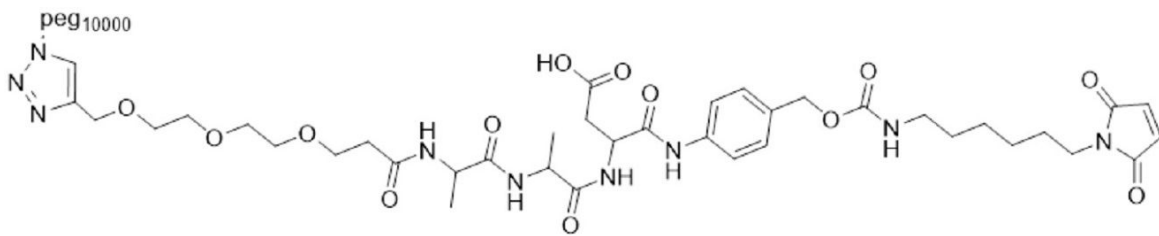
S16

20



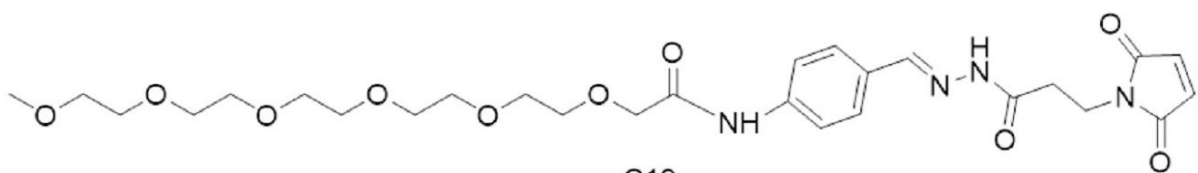
S17

30



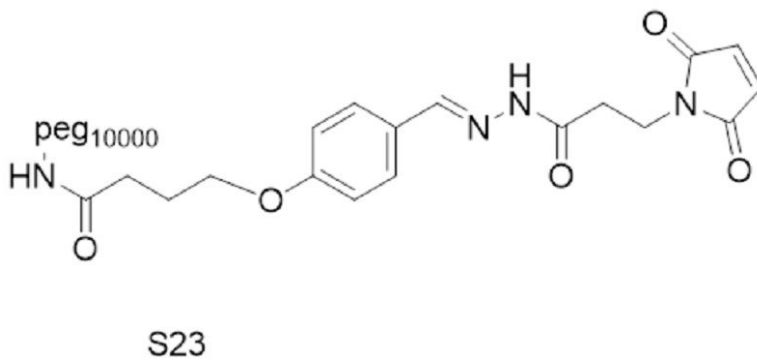
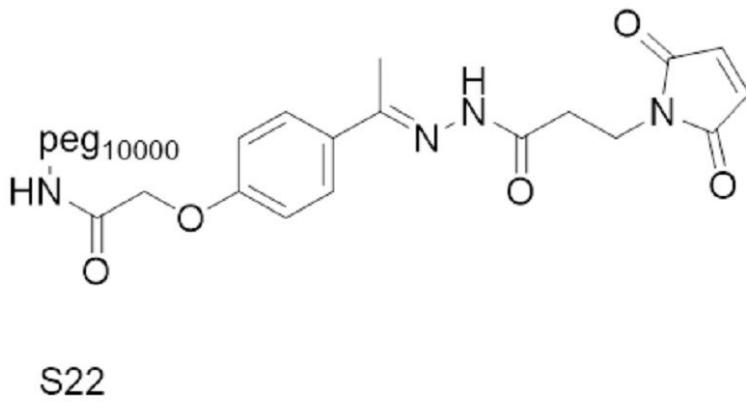
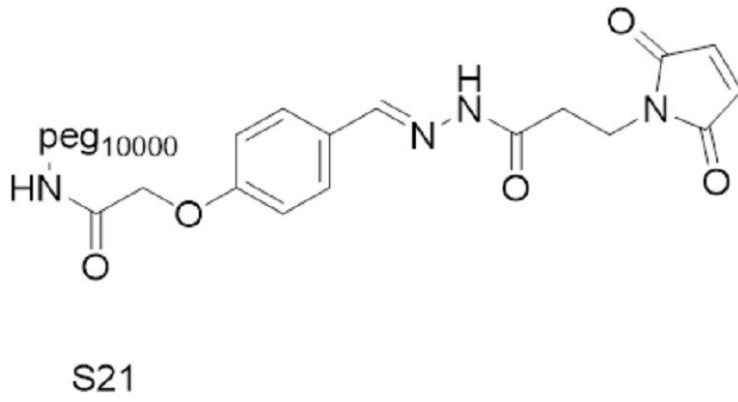
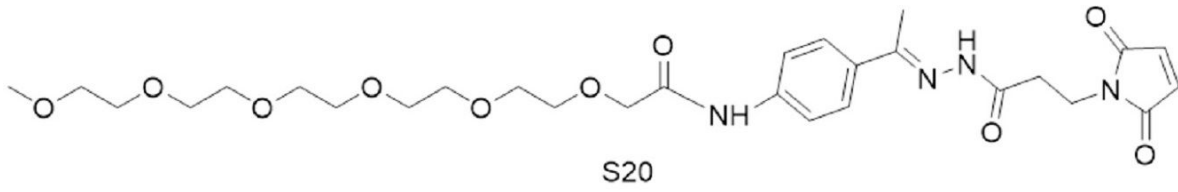
S18

40



S19

50



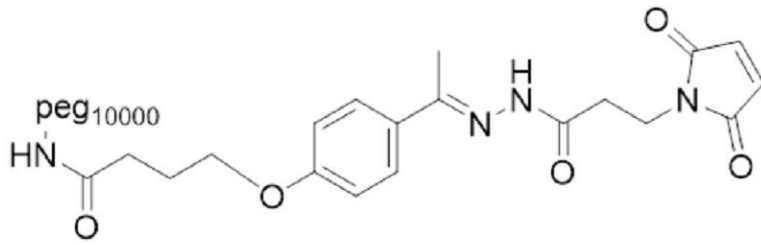
10

20

30

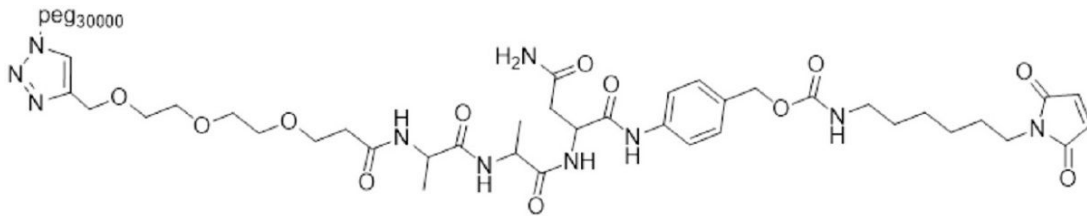
40

50



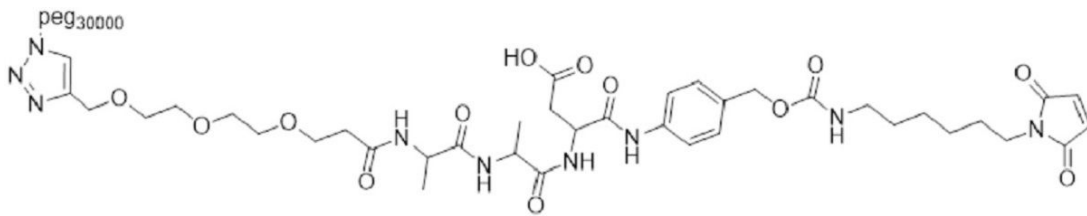
S24

10



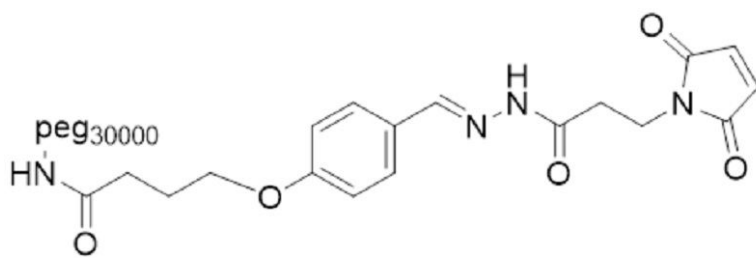
S25

20



S26

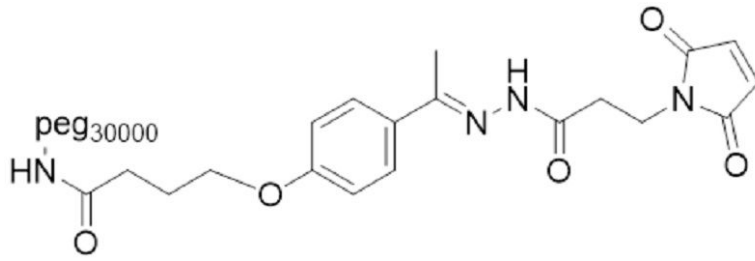
30



S27

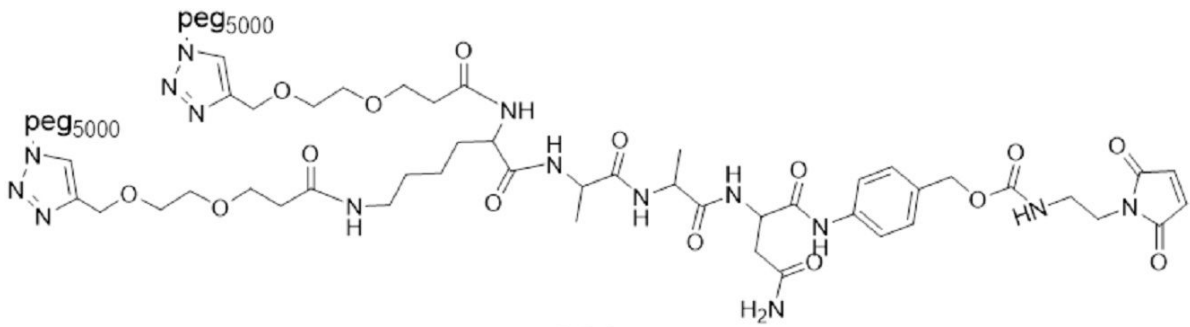
40

50



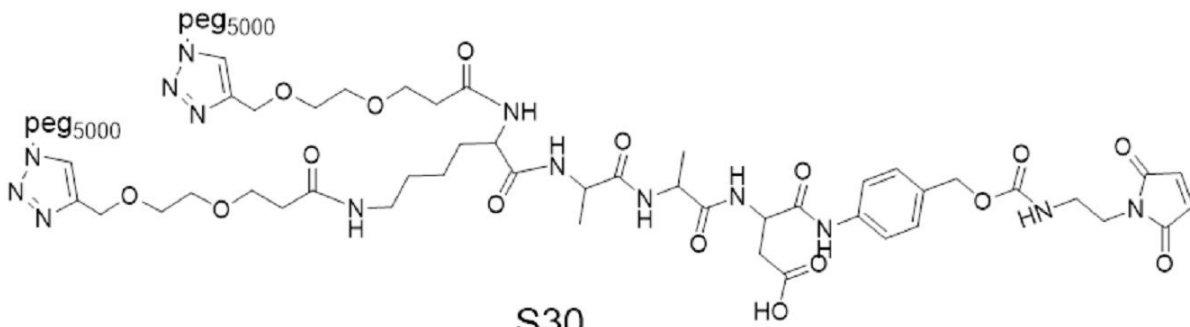
S28

10



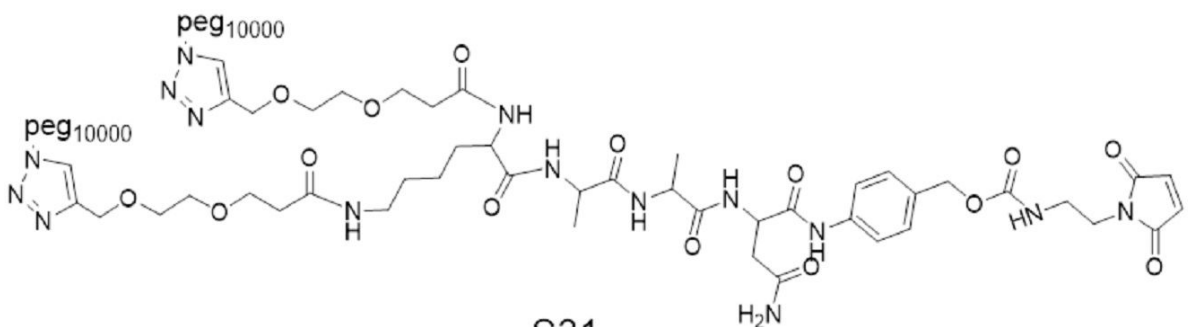
S29

20



S30

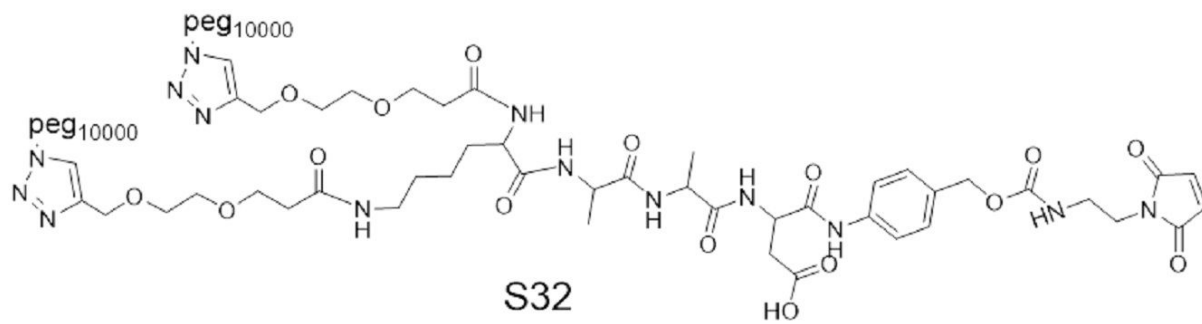
30



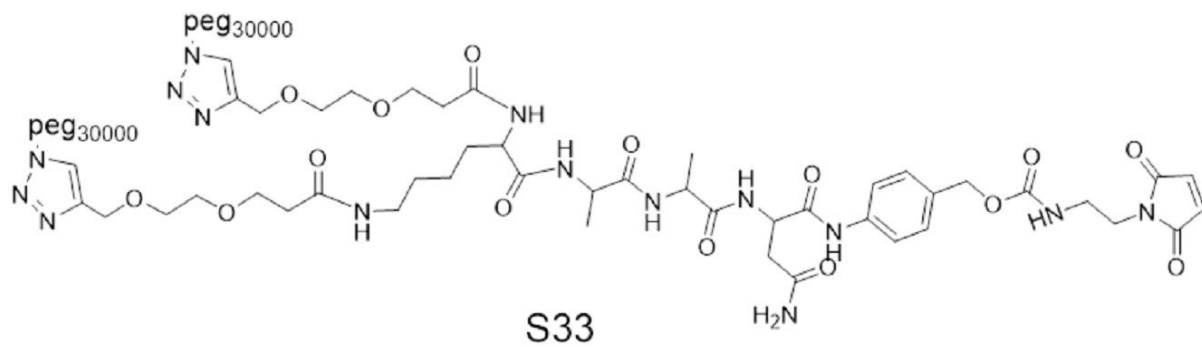
S31

40

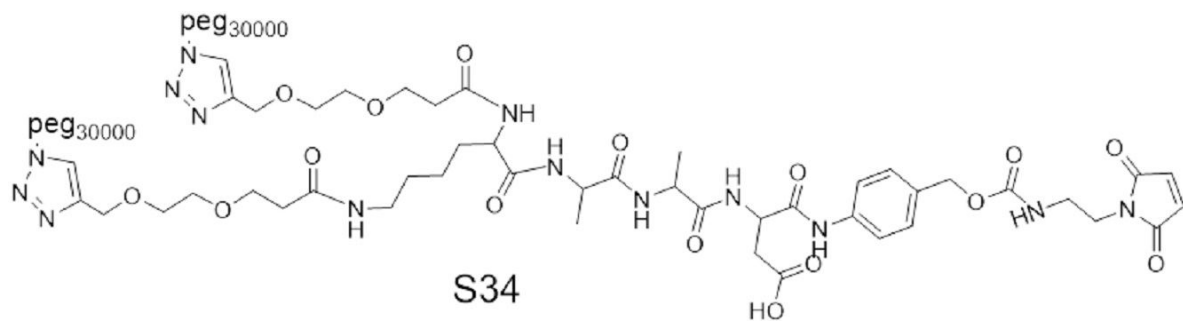
50



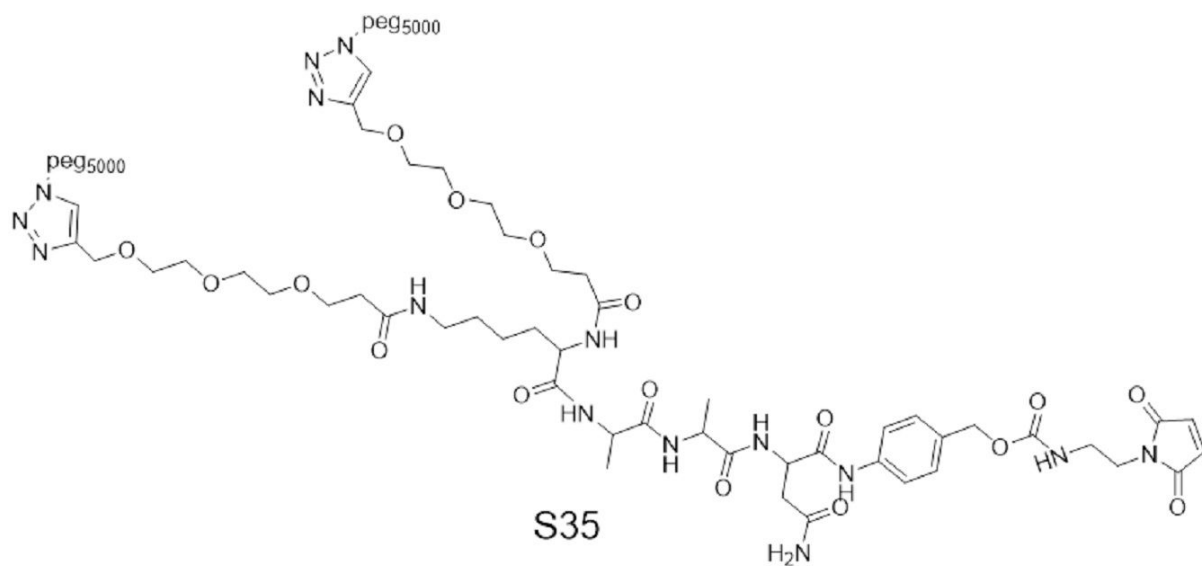
10



20



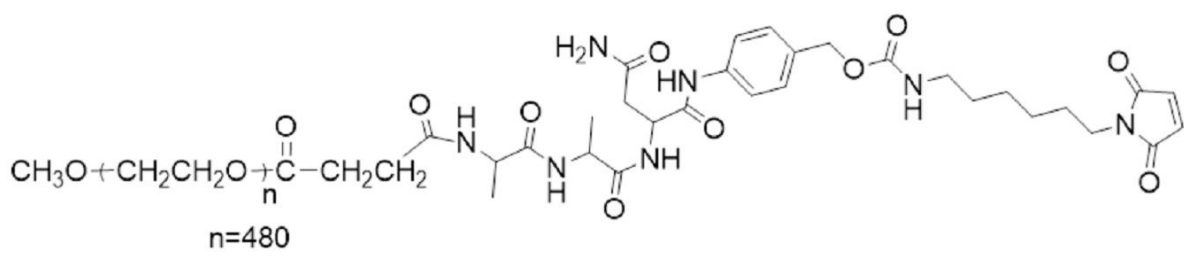
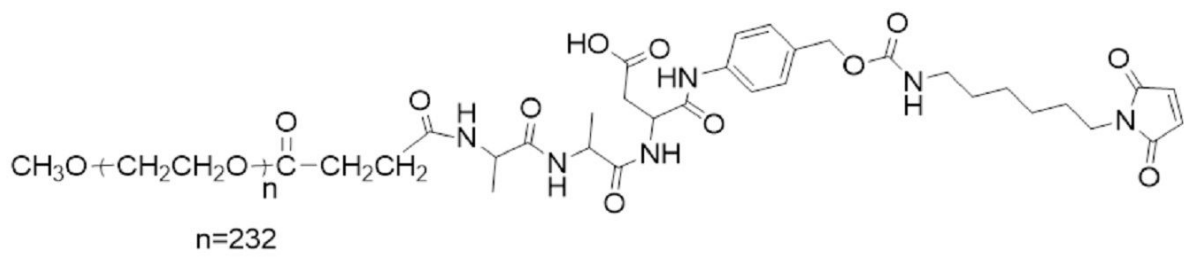
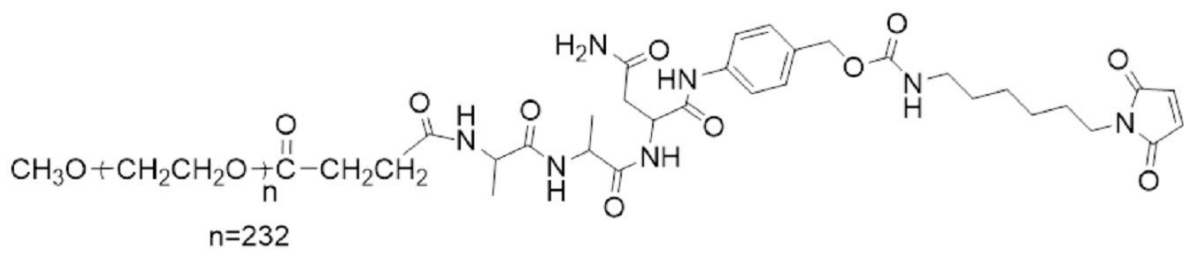
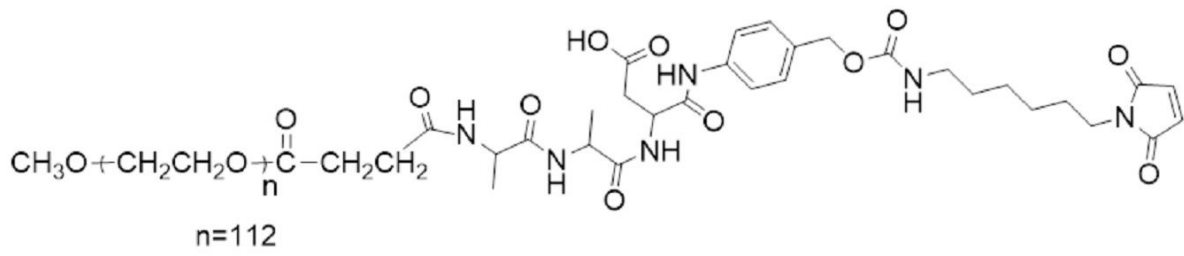
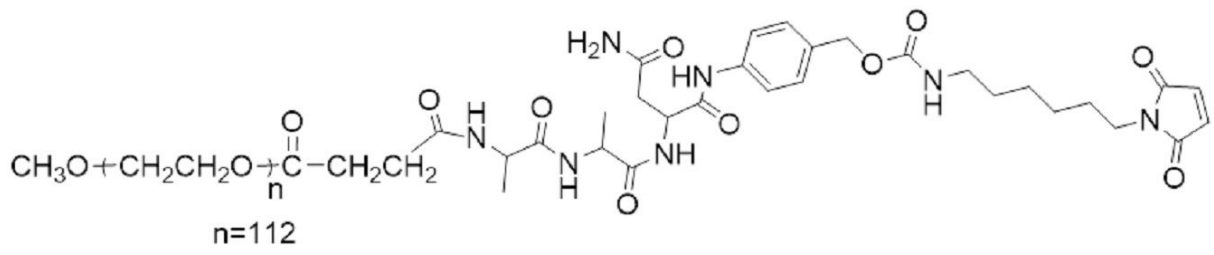
30



40

50





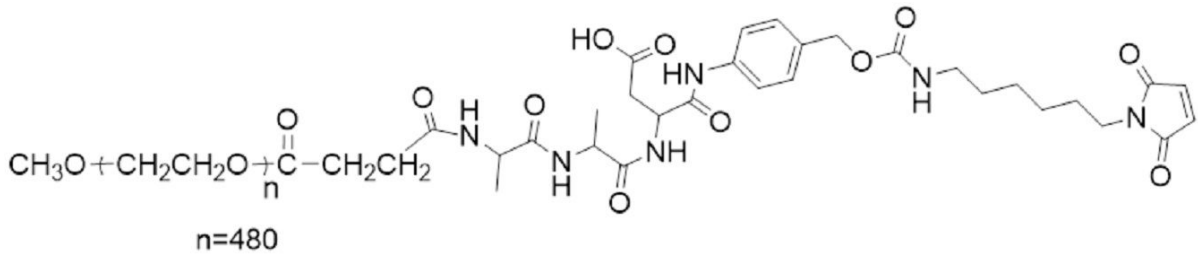
10

20

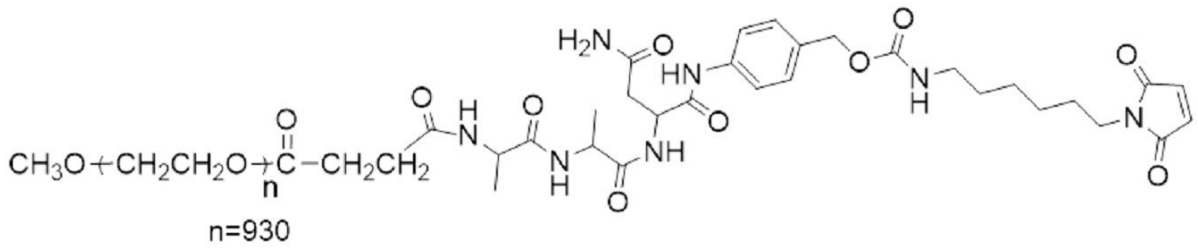
30

40

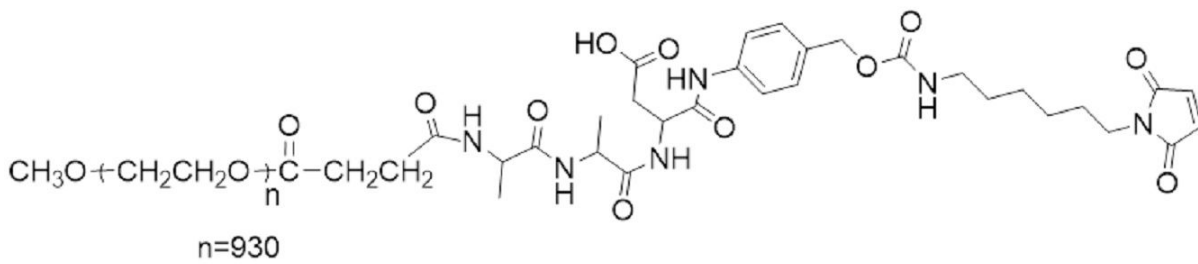
50



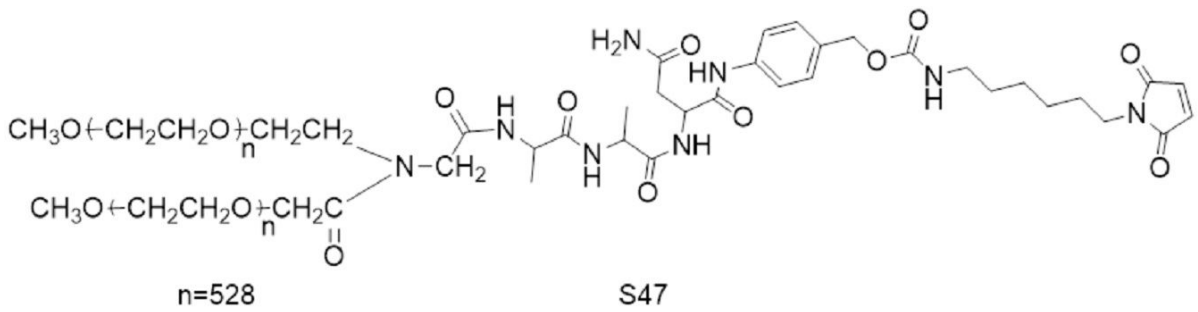
10



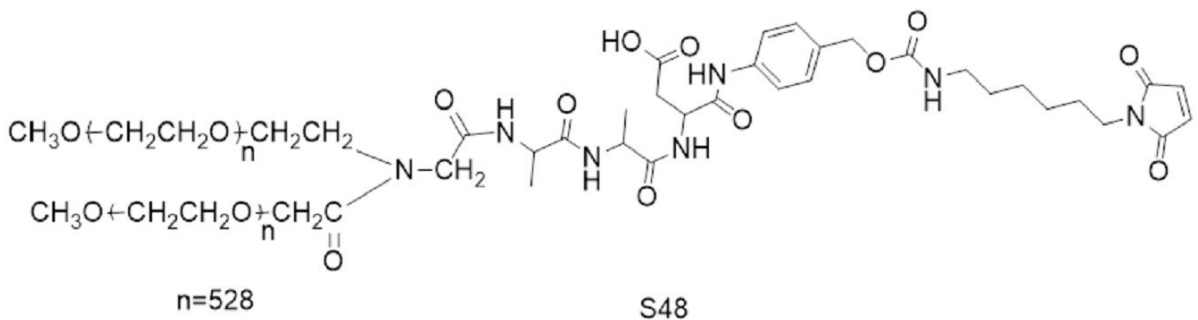
20



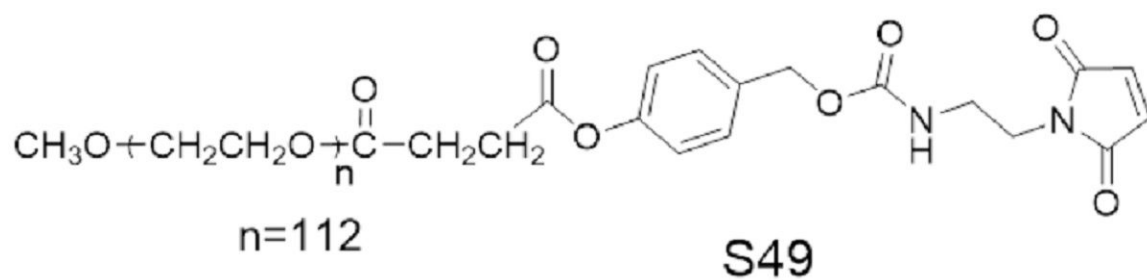
30



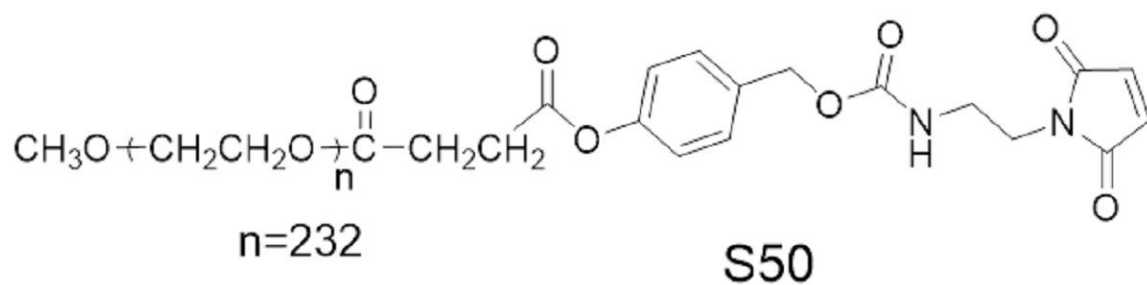
40



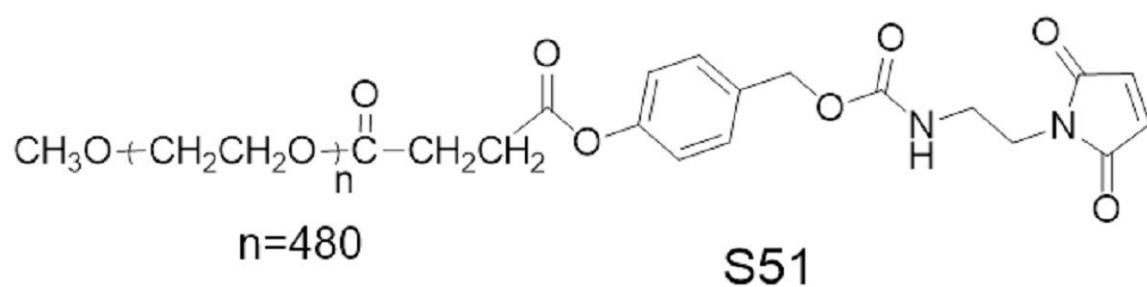
50



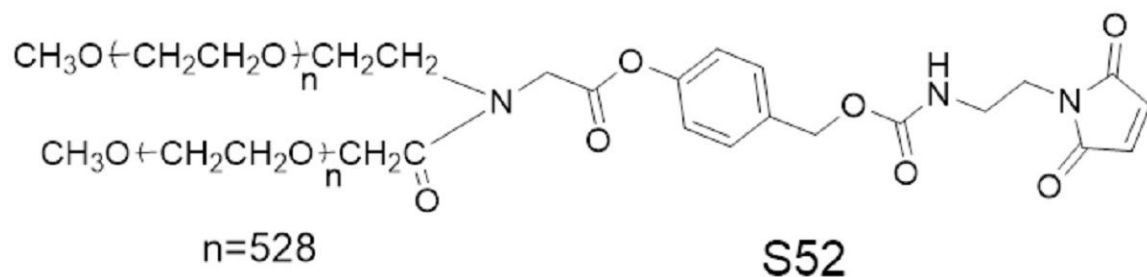
10



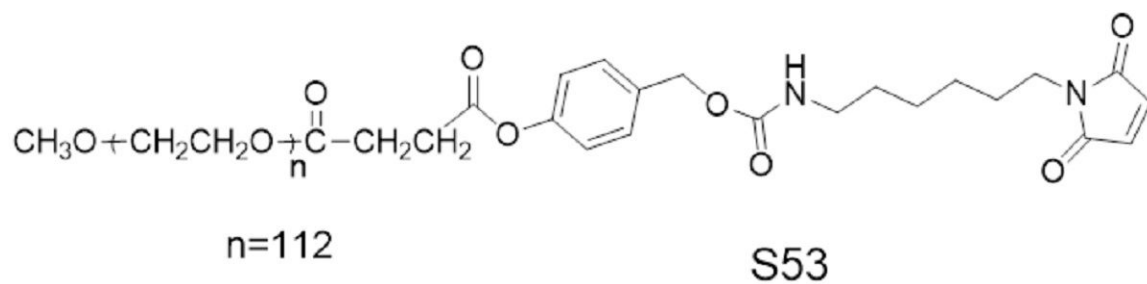
20



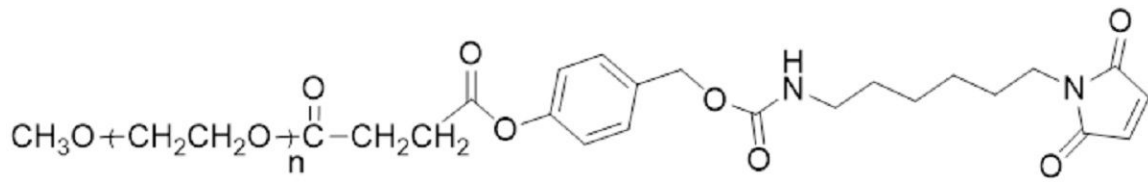
30



40



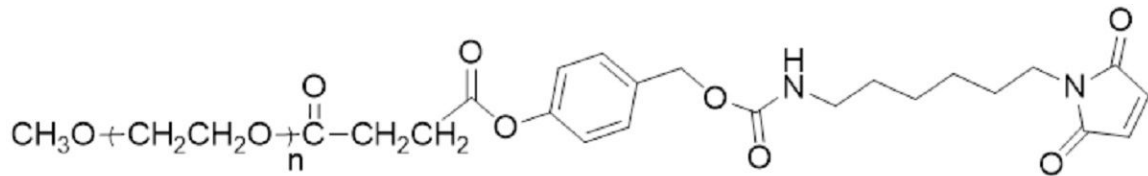
50



n=232

S54

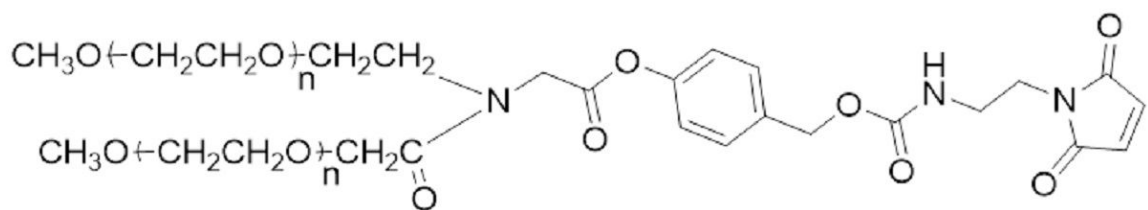
10



n=480

S55

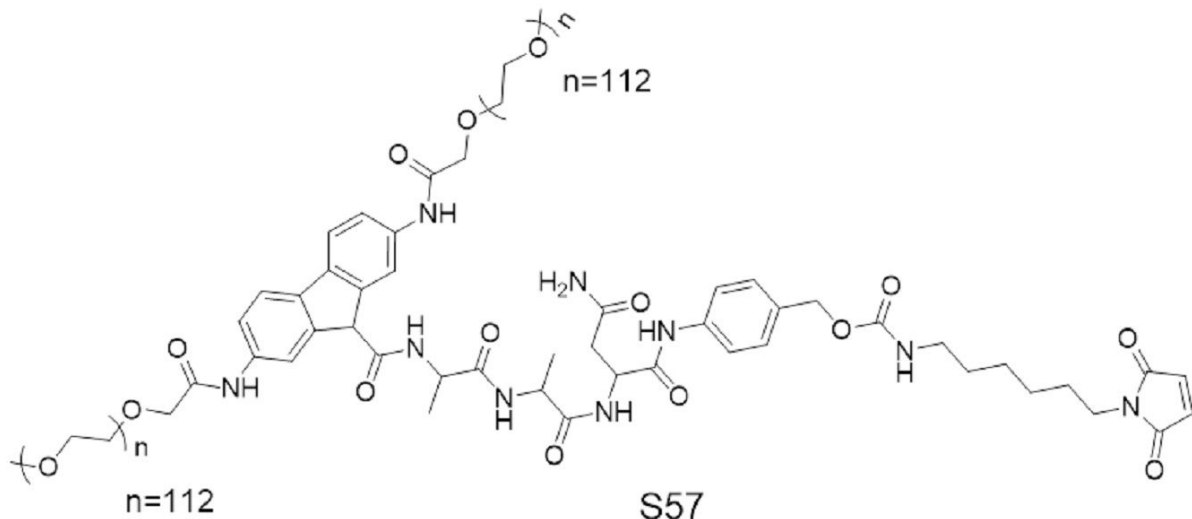
20



n=528

S56

30

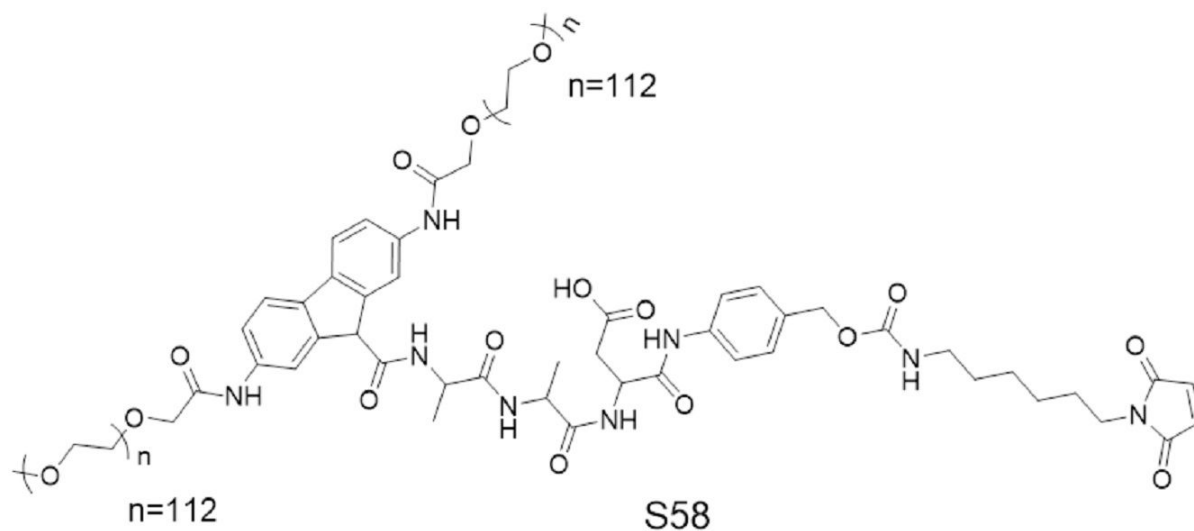


n=112

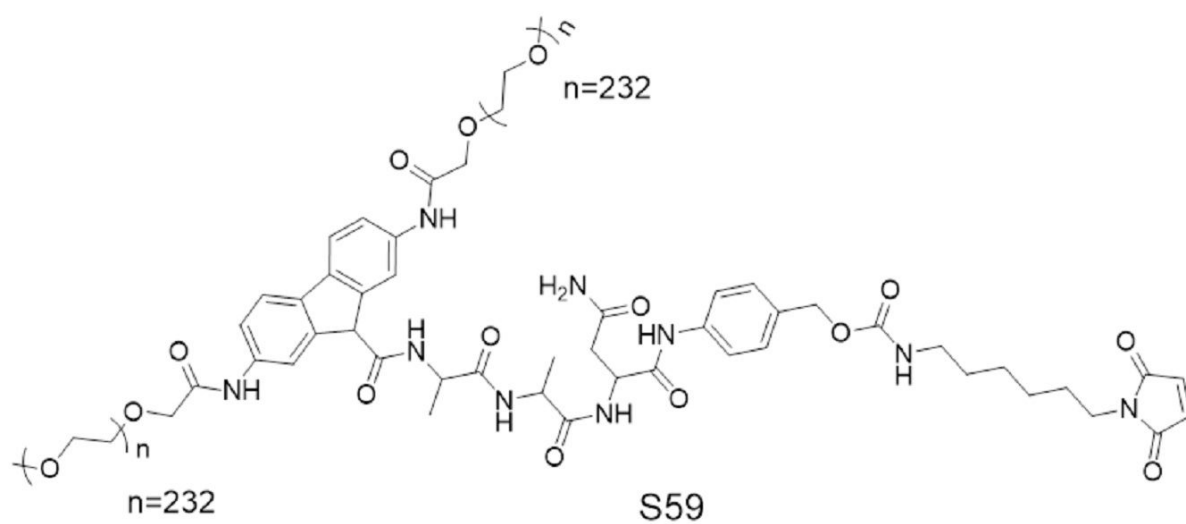
S57

40

50

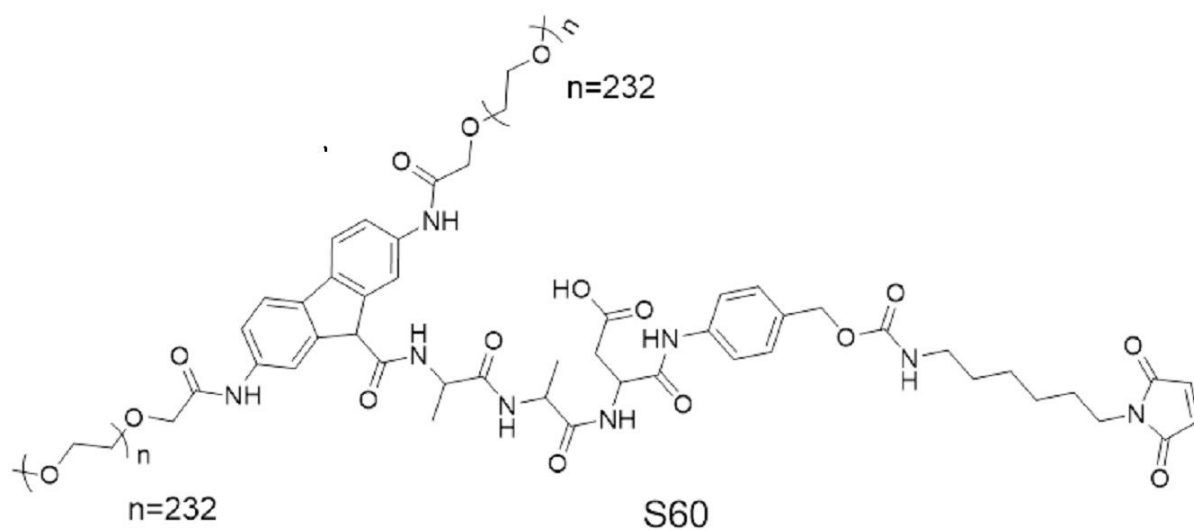


10



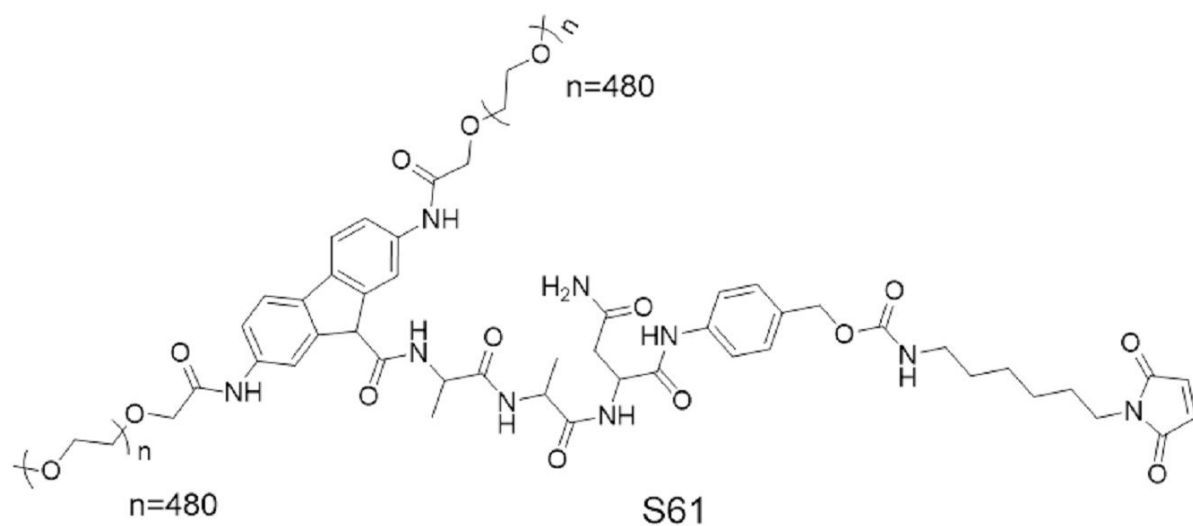
20

30

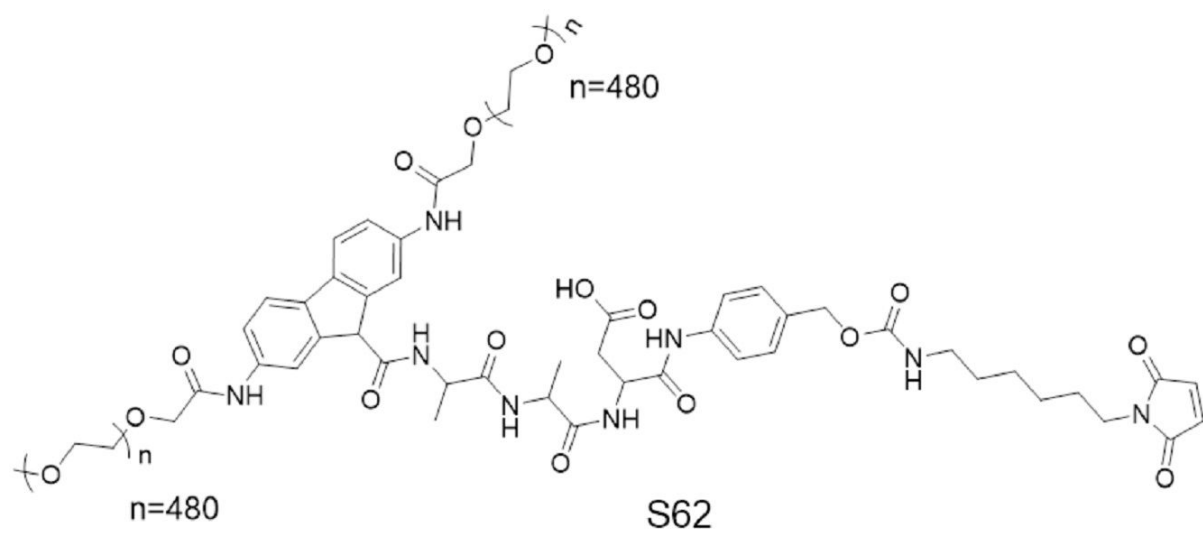


40

50

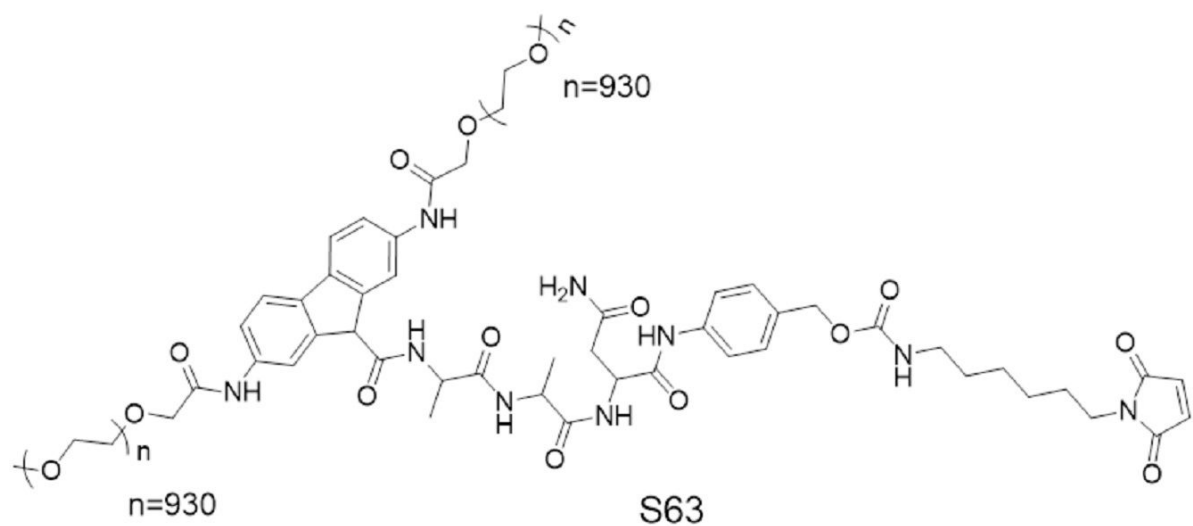


10



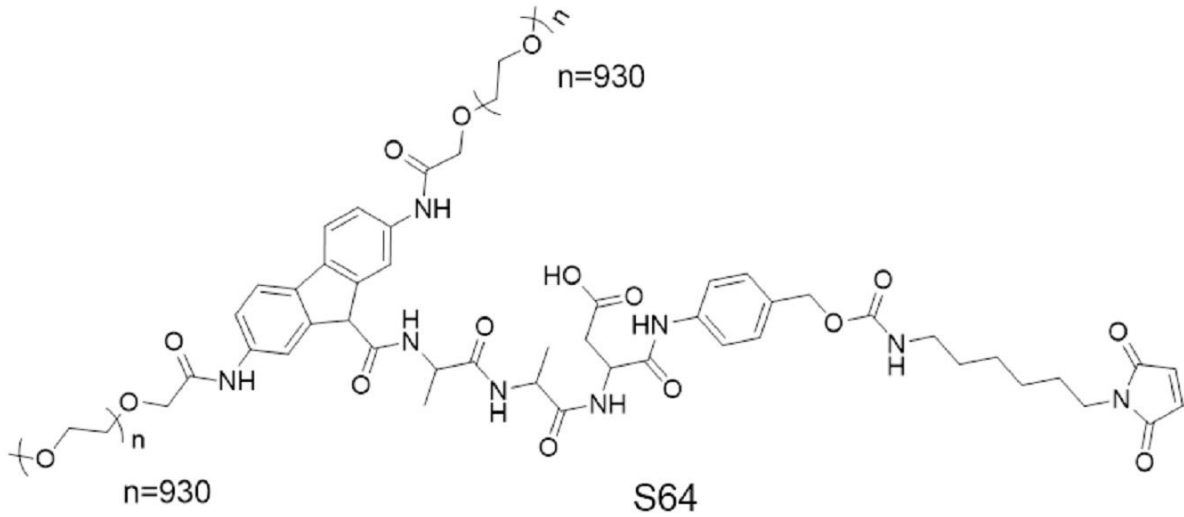
20

30



40

50

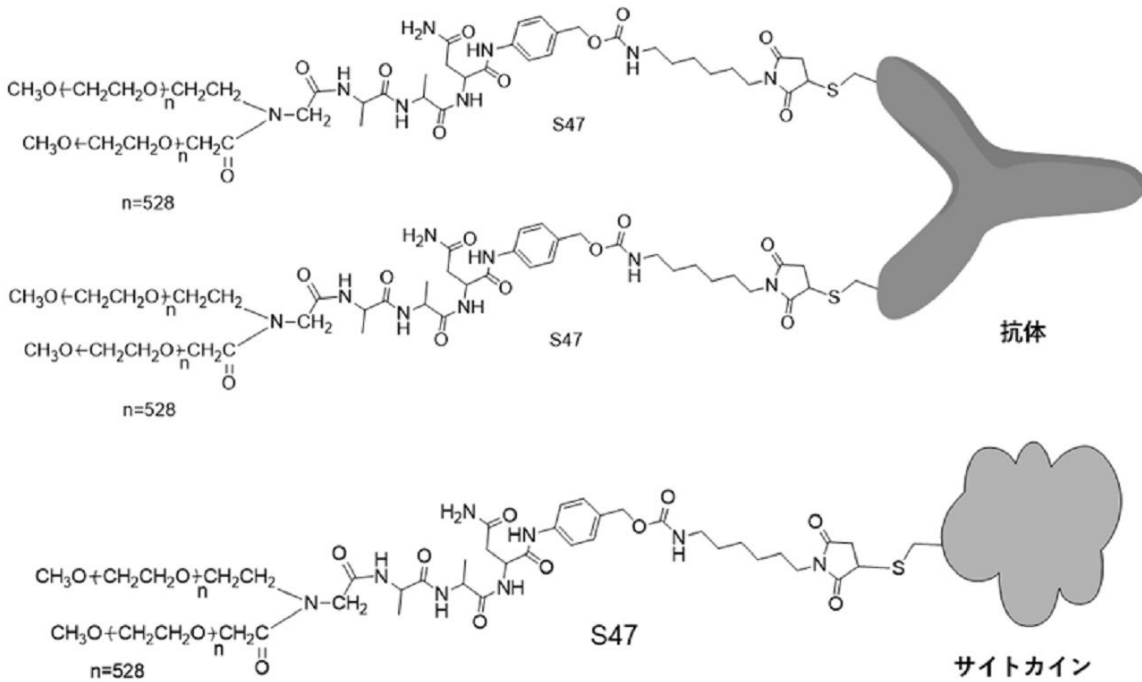


10

からなる群から選択される化合物。

【請求項 15】

以下の構造：

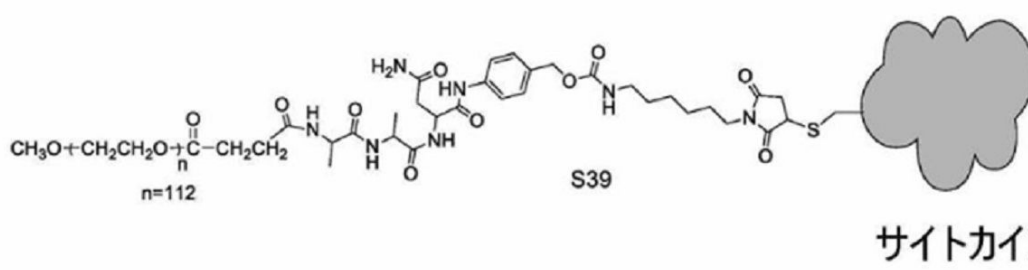
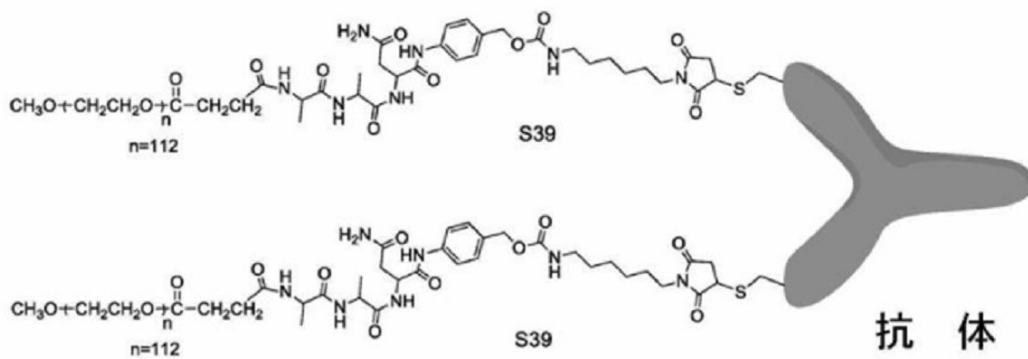
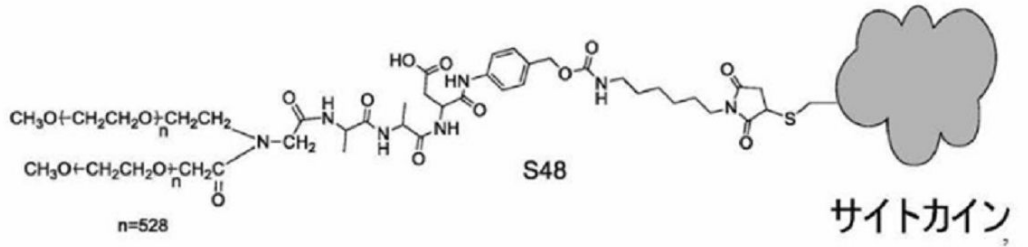
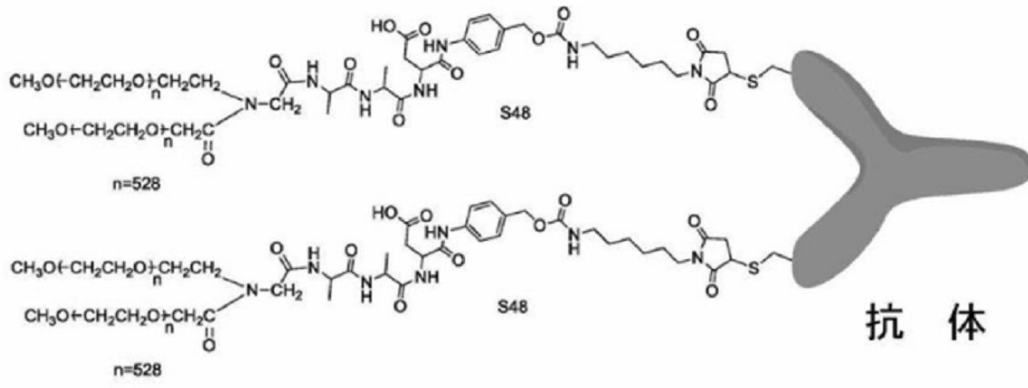


20

30

40

50



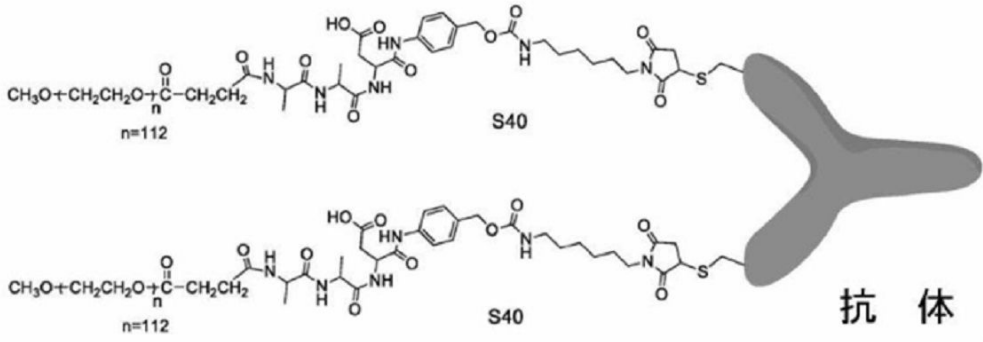
10

20

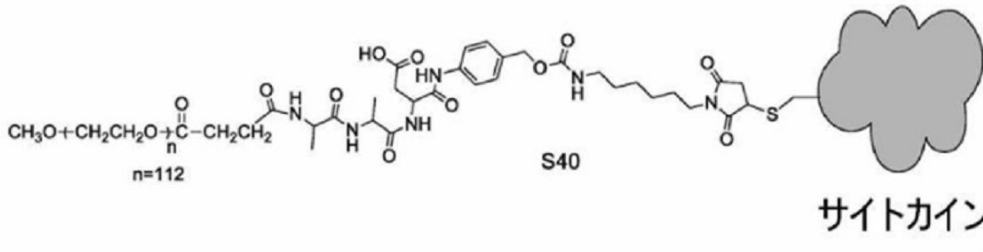
30

40

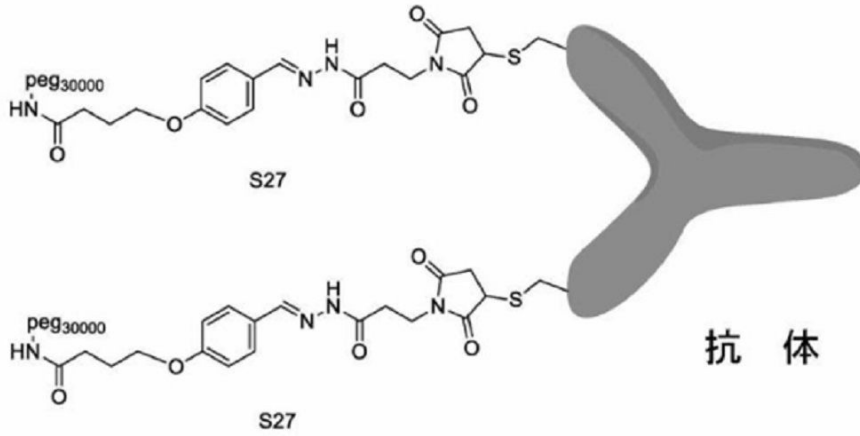
50



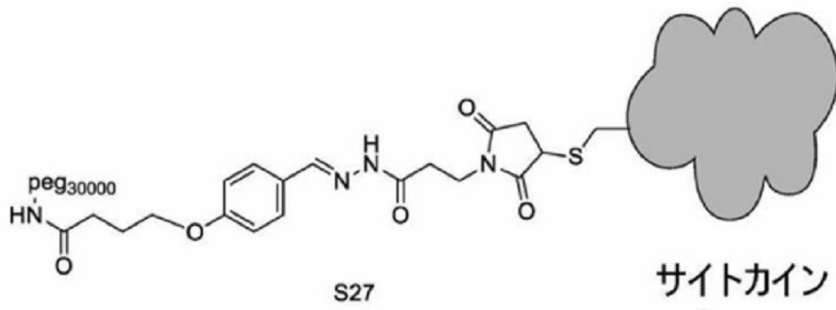
10



20



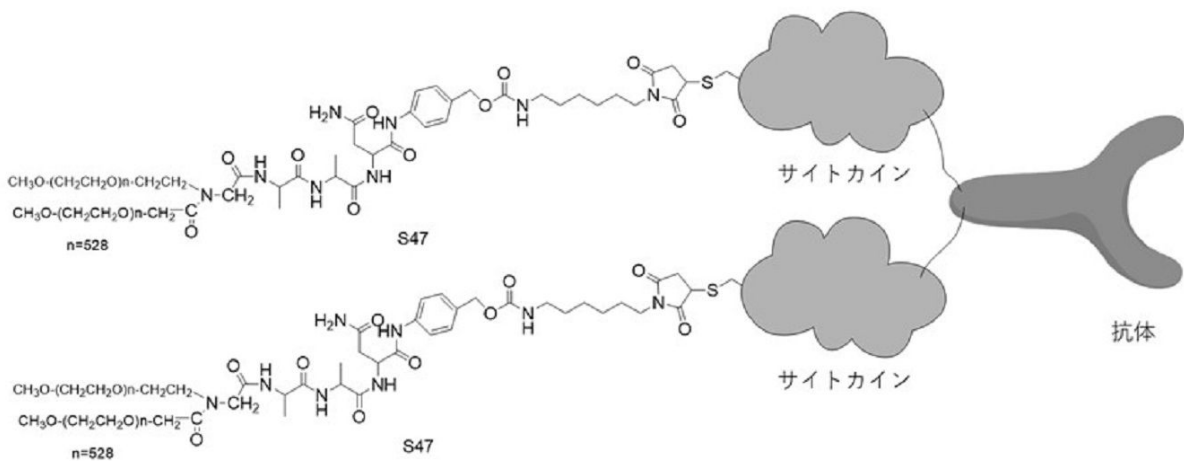
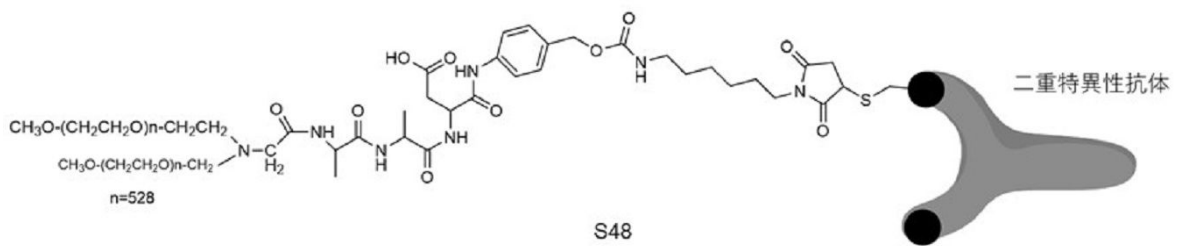
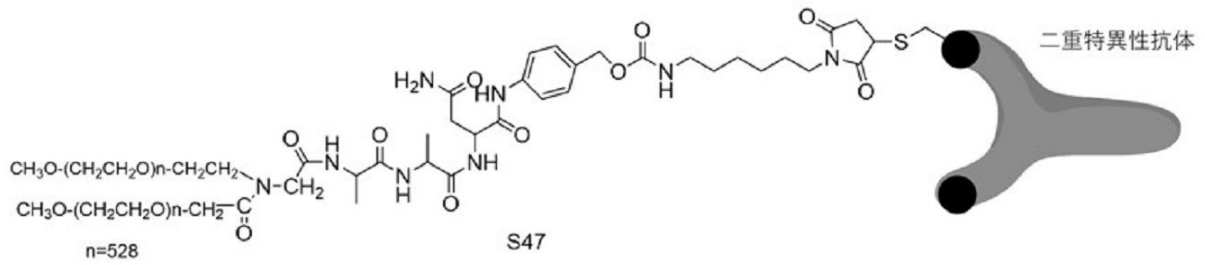
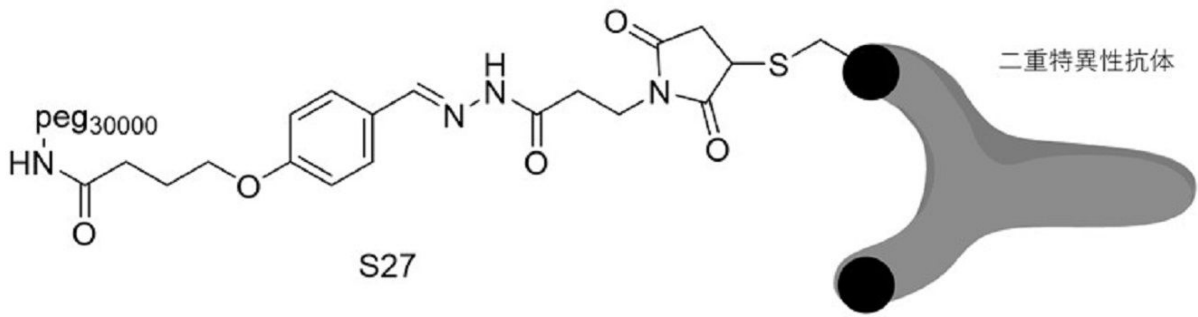
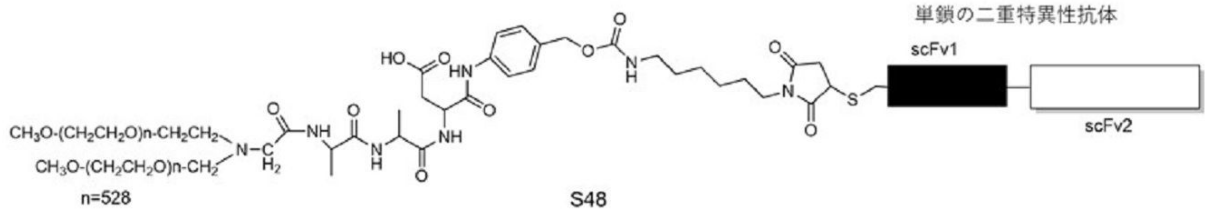
30



40

50





10

20

30

40

50

のいずれかによって表され、

式中、サイトカインおよび抗体は、配列番号 1 ~ 83 のいずれかからなる群から選択される、

生体分子のコンジュゲート。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、生体分子のコンジュゲートおよびその使用に関する。

【背景技術】

【0002】

天然のシステインに連結することによって抗体に作用剤をコンジュゲートすることは、抗体の使用をさらに進めるべく使用されている。毒素および薬剤などの分子は、抗体にコンジュゲートされて抗体-薬剤コンジュゲート(ADC)を生成している。プロボディ(probody)を生成するための切断-マスキング用ペプチド配列と抗体との融合体は、腫瘍の局所的な活性化のために使用されている。しかし、このペプチドは、抗体の末端に限定され、活性化配列は、マスキングペプチド由来の低い活性化率と高い免疫原性とを有するペプチドにより限定される。

【0003】

現行上市されている巨大分子薬剤の一般的な副作用は、免疫毒性である。免疫毒性には、免疫抑制、免疫原性の生成、過感受性、自己反応性、および有害な免疫刺激が含まれる。これらの副作用は、主に外体性の巨大分子によって引き起こされる。体内に進入した後、異質の巨大分子は、その免疫原性のために患者に免疫応答を惹起するものとなる。正常組織では、免疫とは刺激されるものであり、自己免疫応答は、抗体やサイトカインなどの巨大分子薬剤が抗原または受容体に結合した後に生じるものとなる。この時、それは患者にとって非常に危険である。例えば、非小細胞肺癌を現用のPD-1抗体であるキイトルーダおよびオプジーボにより治療する間、重篤な肺炎が起こる可能性があり、それは患者の死に繋がることさえありうる。同様の作用は、CTLA4抗体(ヤーボイ)41BB、IL-2、IL-10などの臨床使用においても報告された。非小細胞肺癌に対するオプジーボとヤーボイとの併用療法では、患者の55%が3~4という高グレードのAEを示し、患者の36%が薬剤毒性のために薬剤治療を停止しなければならなかった。それゆえ、新しい機能を有し高度な能力のある生体分子コンジュゲートがこの分野に求められており、そのようなコンジュゲートは、血中および正常組織中での薬剤活性を遮断することによって全体的な毒性と免疫毒性とを減少させ、病態の微小環境で活性薬剤を強化し、DMPKおよび血清の半減期を調整し、抗体のFabの免疫原性を減少させ、活性生体分子の結合親和性を調整し、有効性を増強するためのものである。

【発明の概要】

【0004】

本開示は、以下の構造：

R1 - R2 - R3 - R4 - S - cys - R5

を有する生体分子のコンジュゲートを提供し、式中、

R5は、1つまたは複数のシステイン残基が変異により導入された生体分子を表し；

cysは、R5に含まれるシステイン残基(複数可)を表し；

Sは、前記システイン残基(複数可)の硫黄原子(複数可)を表し；

R1は、R5がその抗原、リガンド、または受容体に結合するのを防止する基であり；

R2は、不在であるか、またはR2は、1つもしくは複数のタンパク質分解酵素により活性化することのできる切断可能なリンカーアーム、もしくは病態の微小環境において酸性で活性化することのできる化学結合であり；

R3は、不在であるか、またはR3は、R2が切断された後に自動的に脱落することのできるリンカーアーム、もしくは病態の微小環境において酸性で活性化することのできる化学結合であり；但し、R2が不在であるとき、R3は、病態の微小環境において酸性で

10

20

30

40

50

活性化することのできる前記化学結合であり；

R 4 は、R 5 に含まれる前記システイン残基（複数可）の硫黄原子（複数可）を介して共有結合により R 5 に連結された基であり、部分 R 1 - R 2 - R 3 が切断された後に R 5 の抗原、リガンド、または受容体への結合能を回復、維持、または促進する基である。

【 0 0 0 5 】

上記の式では、R 1 - R 2 が、R 3 - R 4 - S - c y s - R 5 から、タンパク質分解酵素によってまたは病態の微小環境の酸条件下で切断されると、R 3 - R 4 - S - c y s - R 5 が放出される。すると、R 3 が自動的に脱落して R 4 - S - c y s - R 5 が放出された後に、R 4 - S - c y s - R 5 の持つ R 5 の抗原、リガンド、または受容体への結合能が回復、維持、または改善されるものとなる。

10

【 0 0 0 6 】

本開示の 1 つまたは複数の実施形態では、生体分子コンジュゲートの R 1、R 2、R 3、R 4、および R 5 は、本開示の他の部分にあるように記載される。

【 0 0 0 7 】

本開示はまた、以下の構造：

R 4 - S - c y s - R 5

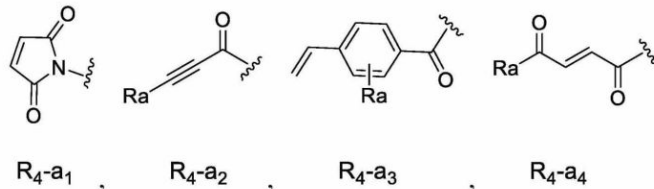
化合物を提供し、式中、

【 0 0 0 8 】

R 4 は、- R 4 - a - R 4 - b - R 4 - c - によって表され、R 4 は、- R 4 - a - R 4 - b - R 4 - c - によって表され、R 4 - a は：

20

【 0 0 0 9 】

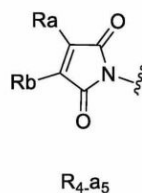


【 0 0 1 0 】

および

30

【 0 0 1 1 】



【 0 0 1 2 】

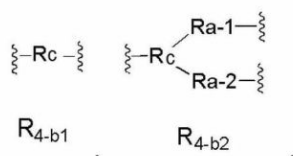
からなる群から選択され、式中、R a および R b は、それぞれ独立して、H および C<sub>1</sub> - 6 アルキルまたは C<sub>1</sub> - 6 アルコキシルからなる群から選択され；

40

【 0 0 1 3 】

R 4 - b は：

【 0 0 1 4 】

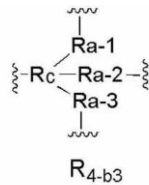


50

【 0 0 1 5 】

および

【 0 0 1 6 】



10

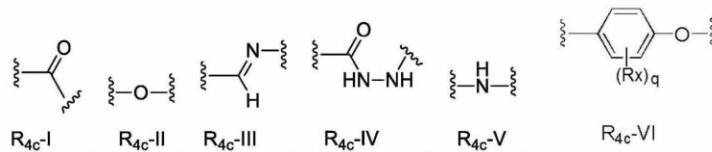
【 0 0 1 7 】

からなる群から選択され、式中、式 R 4 - b 1 では、R c は、不在であるか、または C<sub>1</sub> - 1<sub>2</sub> アルキル、C<sub>1</sub> - 1<sub>2</sub> アルコキシ - C<sub>1</sub> - 1<sub>2</sub> アルキル、C<sub>1</sub> - 1<sub>2</sub> アルキル - C<sub>3</sub> - 8 シクロアルキル、(C<sub>1</sub> - 4 アルキル - O)<sub>p</sub> - C<sub>1</sub> - 1<sub>2</sub> アルキル、C<sub>1</sub> - 1<sub>2</sub> アルキルカルボニルアミノ - (C<sub>1</sub> - 4 アルキル - O)<sub>p</sub> - C<sub>1</sub> - 1<sub>2</sub> アルキル、フェニル - C<sub>1</sub> - 1<sub>2</sub> アルキル、C<sub>3</sub> - 8 シクロアルキル、C<sub>1</sub> - 1<sub>2</sub> アルキル - C<sub>3</sub> - 8 シクロアルキル - C<sub>1</sub> - 1<sub>2</sub> アルキル、および C<sub>1</sub> - 1<sub>2</sub> アルキル - フェニル - C<sub>1</sub> - 1<sub>2</sub> アルキルからなる群から選択され；式 R 4 - b 2 では、R c は、アミノ基の N 原子で置換された R a - 1 および R a - 2 を有する C<sub>1</sub> - 1<sub>2</sub> アルキルアミノであり、式 4 - b 3 では、R c は、R a - 1、R a - 2、および R 2 - 3 により置換されているアルキルの終端に最後の C 原子を有する C<sub>1</sub> - 1<sub>2</sub> アルキルであり、式中、R a - 1、R a - 2、および R a - 3 は、それぞれ独立して、C<sub>1</sub> - 1<sub>2</sub> アルキル、C<sub>1</sub> - 1<sub>2</sub> アルキル - OH、および C<sub>1</sub> - 1<sub>2</sub> アルキル - NR' ' R' ' ' からなる群から選択され、式中、R' ' および R' ' ' は、それぞれ独立して、H および C<sub>1</sub> - 1<sub>2</sub> アルキルからなる群から選択され；式 R 4 - b 2 および R 4 - b 3 では、R 4 - b は、R a - 1、R a - 2、および R a - 3 のうち少なくとも 1 つを介して R 4 - c に連結し；

【 0 0 1 8 】

R 4 - c は、

【 0 0 1 9 】

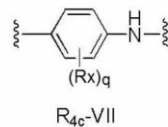


30

【 0 0 2 0 】

および

【 0 0 2 1 】



40

【 0 0 2 2 】

からなる群から選択され、式中、R x は、H、ハロ、および C<sub>1</sub> - 4 アルキルからなる群から選択され；p は、1 から 10 の範囲の整数、例えば 1 から 5 の整数などであり；q は、1 から 4 の整数、例えば 1 から 2 の整数などであり；但し、R 4 - a が式 R 4 - a 2、R 4 - a 3、および R 4 - a 4 からなる群から選択されるとき、R 4 - c が不在であり；

上式で、R 3 は、R 4 の R 4 - c を介して R 4 に連結し、R 4 - a の各式に示された波線は、R 4 - a が R 4 - b に連結する位置を標示する。

【 0 0 2 3 】

50

また、提供されるのは、R 1 - R 2 - R 3 - R 4 によって表される化合物であり、式中、R 1、R 2、R 3、およびR 4 は、本開示の任意の実施形態にあるように規定される。

【0024】

本開示は、本明細書に記載される生体分子のコンジュゲートまたはR 4 - S - c y s - R 5 化合物の、抗腫瘍薬剤の製造における使用を提供する。

【0025】

本開示は、本明細書に記載される生体分子のコンジュゲートを含む医薬組成物を提供する。

【0026】

本開示は、治療有効量の本明細書に記載される生体分子のコンジュゲートまたはR 4 - S - c y s - R 5 化合物を、それを必要とする対象に提供することを含む、腫瘍を治療または予防するための方法を提供する。

10

【0027】

本開示はまた、化合物S 1 ~ S 6 4 および本開示の他の部分に記載される化合物、ならびに本明細書に記載される変異を含有する抗体およびサイトカインを含む、化合物を提供する。

【図面の簡単な説明】

【0028】

【図1】抗体の軽鎖のアミノ酸配列のアラインメントを示す図である。

【図2】抗PD 1 抗体の軽鎖の点変異についてのC o - I Pスクリーニングを示す図である。

20

【図3】抗体の構造を示す図である。

【図4】可変領域のループ4 の配列が保存されていることを示す図である。

【図5】2つの抗体の可変領域が同じ生殖系列の抗体の可変領域のフレームワークに由来する可能性があることを示す図である。

【図6】いくつかの抗体の重鎖のアミノ酸配列のアラインメントを示す図である。

【図7】いくつかの抗体の軽鎖のアミノ酸配列のアラインメントを示す図である。

【図8】PD 1 A b - C 2 8 のコンジュゲーションを示す図である。

【図9】活性化前後のPD 1 A b - C 2 8 コンジュゲートのPD 1 との結合を示す図である。

30

【図10】活性化可能な結合アームを含有し病態の微小環境で活性化される、生体分子のコンジュゲートの概要図である。

【図11】IFN - ガンマの分泌を示す図である。

【図12】生存曲線である。

【図13】死亡曲線である。

【図14】T細胞の増殖を示す図である。

【図15】抗PD 1 抗体のコンジュゲートが、MC 3 8 結腸がん罹患したマウスにおいて、腫瘍の成長を阻害することを示す図である。

【図16】IL 2 - C 4 1 変異体のコンジュゲーションを示す図である。

【図17】活性化前後のIL 2 - C 4 1 コンジュゲートのIL 2 受容体アルファとの結合を示す図である。

40

【図18】IL 2 変異体コンジュゲーション (IL 2 - T h r 4 1 C y s、すなわち、IL 2 - C 4 1) がT細胞の増殖に及ぼす効果を示す図である。

【図19】IL 2 コンジュゲートがCD 4 / CD 8 の増殖に及ぼす効果を示す図である。

【図20】IL 2 のコンジュゲートがB 1 6 F 1 0 腫瘍の成長を阻害することを示す図である。

【図21】抗PD - 1 抗体との組合せのIL 2 のコンジュゲートが、MC 3 8 腫瘍の成長を阻害することを示す図である。

【図22】変異体IL 2、IL 2 T M E A k i n e、およびin v i t r o の酵素切断後の回復型活性IL 2 のS D S - P A G E の結果を示す図である。

50

【図23】*in vitro*の酵素切断前後のIL2 TME A k i n eとIL2 R またはR との結合活性を標示するELISAの結果を示す図である。

【図24】ウェスタンブロットおよび対応の結果によって検出されたIL2 - T41C - S47の量を示す図である。

【図25】IL2 TME A k i n eが、IL2に比べて血漿中で半減期が長く曝露が高いことを標示する、*in vivo*の薬物動態試験を示す図である。

【図26】肺(湿重量)の測量値と、ヘマトキシリンおよびエオシンにより染色された切片とを示す図であり、IL2 TME A k i n eが肺に野生型IL2よりも低い毒性を誘導することを標示する。

【図27】IL2 - T41C / S87C - S47 and IL2 - R38D / E61R / S87C - S47が肺にほぼ毒性を誘導しないことを標示する、肺の測量値の図である。

【図28】治療後の腫瘍体積を示す図である。

【図29】腫瘍における活性IL2の曝露が高いことを示す図であり、このことは、肺および心臓において抗腫瘍効果の有効性が高く活性IL2の曝露が低いことに一致し、これは肺水腫の毒性が低いことに一致する。

【図30】5つ位置全てが高い効率でS13リンカーにコンジュゲートされたことを示す、還元SDS - PAGEゲルの結果を示す図である。

【図31】8つの選択された抗体配列を示す図である。

【図32】抗体の選択された変異部位に各種R4基を部位特異的にコンジュゲートすることによって、R4基をスクリーニング用に選択的に換えることができたことを示す図である。

【図33】異なる部位へのコンジュゲーションが、異なる程度で結合活性の回復を示すことを示す図である。

【図34】ヒトCTLA - 4タンパク質との結合活性が有意に減少したTME A b o d yが、受容体遮断活性の劇的な減少をも示すことを示す図である。

【図35】CTLA - 4に対する結合活性の減少したTME A b o d yが、T細胞の活性化の機能的な有効性の障害を示し、プロテアーゼにより媒介される活性化がTME A b o d yの活性を復活できることを示す図である。

【図36】イピリムマブTME A b o d yが、WTイピリムマブと同様の有効性で、腫瘍においてTreg集団を有意に下方制御することを示す図である。

【図37】TME A b o d yが、マウス血清中において、37 で96時間後に有意に分解することなく、高い安定性を示すことを示す図である。

【図38】CTLA - 4 TME A b o d yが、S47官能基によるコンジュゲーションによって、WT - イピリムマブおよびCTLA - 4プロボディに比較して、半減期および曝露の増加を示すことを示す図である。

【図39】イピリムマブTME A b o d yが、WTイピリムマブと同等の有効性で腫瘍サイズを制御するのに対して、対照のヒトIgGは、何ら有効性を示せないことを示す図である。

【図40】TME A b o d yが、WTイピリムマブと同等かまたはそれより低い抗体価で、極めて低い免疫応答を動物に引き起こすことを示す図である。

【図41】併用療法コンジュゲートにおいて抗CTLA4 TME A b o d yのコンジュゲートにより免疫系を保護することによって、一次抗体に比較して自己免疫を低減できたことを示す図である。

【図42】R4 - 7のコンジュゲーションの後、または40kDコンジュゲート型TME A b o d yのプロテアーゼによる切断の後に、Niv - se001が、WTニボルマブの432%という活性の増加を示すことを示す図である。

【図43】R4 - 7によるコンジュゲーションの後、または40kDの官能基にコンジュゲートされたNiv - se005のプロテアーゼによる切断の後に、Niv - se005の結合活性が、WTニボルマブと同等のレベル(WTの125%)に復活することを示す図である。

10

20

30

40

50

【図44】ペムプロリズマブ T M E A b o d y およびニボルマブ T M E A b o d y が、W T のペムプロリズマブ抗体またはニボルマブ抗体と同等の有効性で腫瘍サイズを制御するのに対して、対照のヒト I g G が何ら有効性を示せなかったことを示す図である。

【図45】併用療法における抗 C T L A 4 T M E A b o d y または抗 P D 1 T M E A b o d y が、一次抗体に比較して自己免疫を低減できたことを示す図である。

【図46】治療後の腫瘍体積を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0029】

#### 実施形態

本開示の範囲内で、上記に述べられた技術的特徴のそれぞれ、および以降に本明細書に述べられる技術的特徴のそれぞれ、例えば実施例などは、互いに組み合わせられて好適な技術的解決策を構成することができることを理解するべきである。さらに、本開示は、記載される具体的な実施形態に限定されず、それゆえにももちろん変わることがある。また、別段に規定のない限り、本明細書に使用される全ての技術用語および科学用語は、本発明の属する技術分野の当業者によって一般に理解されているものと同じ意味を有することを理解されたい。本明細書に記載されるものに同様または等しい任意の方法および材料も、本発明の実践または試験に使用することができるとはいえ、好適な方法および材料がこれより記載される。本明細書に述べられた全ての刊行物は、その刊行物が関連して引用される方法および/または材料を開示および記載するために、本明細書に参照により組み込まれる。

【0030】

本明細書および添付の特許請求の範囲に使用される際に、単数形「a」、「an」、「and」、および「the」は、別段にコンテキストが明確に記述しない限り、複数の指示を含むことに留意しなければならない。それゆえ、例えば、「an 抗体」への言及は複数の抗体を含み、「the 抗体」への言及は1つまたは複数の抗体および当業者に公知のそれらの等価物などを含む。特許請求の範囲はどの任意選択的な要素も除外するように起草されうることにさらに留意されたい。そのため、本陳述は、特許請求の範囲の要素の記載または「負の」限定の使用に関連する、「のみ(solely)」、「のみ(only)」など排他的な用語の使用のための先行的根拠として、役割を果たすことが意図されている。

【0031】

本開示の目的の1つは、改変型生体分子を提供することであり、この分子は、病態の微小環境でのみ、例えば腫瘍の微小環境または炎症性環境などでのみ活性化されて、そのリガンドとの同じまたは向上さえした結合能を有する生体分子(R5)を病態の微小環境に放出し、それによって、生体分子の標的向性および有効性を向上させ、薬剤耐性を克服し、毒性を低減する。

【0032】

本開示では、改変型生体分子はコンジュゲートであり、それは生体分子と、共有結合により生体分子に連結される機能性部分とを含む。本開示での使用に適した生体分子は、目的の生物学的な機能または活性を有する生体分子であることがあり、そのようなものとしては、以下に限定されないが、様々な機能性タンパク質が挙げられる。目的の生物学的な機能または活性としては、以下に限定されないが、酵素学および免疫学における機能または活性が挙げられる。そのため、本開示での使用に適した生体分子としては、以下に限定されないが、抗体またはその機能性断片、酵素、融合タンパク質(タンパク質-抗体融合体など)、抗体薬剤コンジュゲート、サイトカイン、および任意の他の遺伝子工学的に作出された生体分子が挙げられる。

【0033】

本明細書に使用される際に、用語「抗体」は、所望の生物活性(Miller et al (2003) Jour. of Immunology 170:4854-4861)を呈示する限り、最も広い意味に用いられ、具体的にはモノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、二量体、多量体、多重特異性抗体

10

20

30

40

50

(例えば二重特異性抗体)、および抗体断片をカバーする。文脈中および図中では、抗体は、「Ab」と略記される。

【0034】

基本的な抗体の構造単位は、ポリペプチド鎖の2つの同一の対から構成される四量体を含むことが知られており、各対は、1つの軽鎖と1つの重鎖とを有する。各鎖のN末端部分は、抗原認識に主に関与する約100個から110個以上のアミノ酸の可変領域を含む。各鎖のC末端部分は、エフェクター機能に主に関与する定常領域を画定する。重鎖(VH)の可変領域および軽鎖(VL)の可変領域は、それぞれ3つの相補性決定領域(CDR)を含有し、そのようなものとしては、HCDR1、HCDR2、HCDR3、およびLCDR1、LCDR2、およびLCDR3が挙げられる。これらの6つのCDRは、抗体の抗原結合部位を形成する。可変領域の残りのアミノ酸は、比較的保存されており、フレームワーク領域(FR)とよばれる。VHおよびVLは、それぞれ4つのフレームワーク領域を含有し、それらはそれぞれ、FR1、FR2、FR3、およびFR4とよばれる。

10

【0035】

抗体は、マウス型、ヒト型、ヒト化、キメラであるか、または他の種に由来しうる。本明細書に開示されるイムノグロブリンは、任意のタイプ(例えばIgG、IgE、IgM、IgD、およびIgA)、クラス(例えばIgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、およびIgA2)、またはイムノグロブリン分子のサブクラスとすることができる。イムノグロブリンは、任意の種を由来とすることができる。しかし、一態様では、イムノグロブリンは、ヒト、マウス、またはウサギの起源である。

20

【0036】

抗体断片は、完全長抗体の一部、一般的にはその抗原結合性領域または可変領域を含む。好ましくは、抗体の断片は、機能性断片であり、すなわち、無傷の抗体の抗原結合能を保持する。抗体断片または機能性断片の例としては、Fab断片、Fab'断片、F(ab')<sub>2</sub>断片、およびFv断片; ダイアボディ; 線状抗体; ならびに単鎖抗体分子(scFv)などが挙げられる。

【0037】

本明細書で使用される融合タンパク質は、抗体の抗原結合性ドメインと、任意選択的にサイトカインとを含有してよい。本融合タンパク質に含有される抗体の抗原結合性ドメインは、HER2、CD19、EGFR、CD22、CD3、TROP2、糖タンパク質NMB、グアニル酸シクラーゼC、CEA、CD79b、PSMA、ENPP3、メソテリン、CD138、Napi2b、CD56、CD74、FOLR1、DLL3、CEACAM5、CD142、SLAMF7、CD25、SLTRK6、CD37、CD70、AGS-22、C4.4A、FGFR2、Ly6E、MUC16、BCMA、pカドヘリン、エフリン-A、LAMP1、MUC1、CD19、PDL1、HER2、NY-ESO-1、BCMA、WT1、MUC1、CD20、CD23、ROR1、CD123、CD33、CD44v6、CD174、CD30、CD133、cMet、EGFR、FAP、EphA2、GD2、GPC3、IL-13Ra2、LewisY、メソテリン、SS1、CEA、CD171、EGFR、EGFRvIII、VEGFR2、NY-ESO-1、MUC-1、およびMAGE-A3からなる群から選択される抗原に対する抗原結合性ドメインとしてもよいし、本明細書に記載される任意の抗体の抗原結合性ドメインとしてもよい。一部の実施形態では、融合タンパク質は、二重特異性抗体であり、これは、HER2、CD19、EGFR、CD22、CD3、TROP2、糖タンパク質NMB、グアニル酸シクラーゼC、CEA、CD79b、PSMA、ENPP3、メソテリン、CD138、Napi2b、CD56、CD74、FOLR1、DLL3、CEACAM5、CD142、SLAMF7、CD25、SLTRK6、CD37、CD70、AGS-22、C4.4A、FGFR2、Ly6E、MUC16、BCMA、pカドヘリン、エフリン-A、LAMP1、MUC1、CD19、PDL1、HER2、NY-ESO-1、BCMA、WT1、MUC1、CD20、CD23、ROR1、CD123、CD33、CD44v6、CD174、CD30、CD133、cMet、EGFR、FAP、Eph

30

40

50

A2、GD2、GPC3、IL-13Ra2、Lewis Y、メソテリン、SS1、CEA、CD171、EGFR、EGFRvIII、VEGFR2、NY-ESO-1、MUC-1、およびMAGE-A3からなる群から選択される抗原に対する抗原結合性ドメインを含有するか、または、本明細書に記載される任意の抗体に由来する抗原結合性ドメインを含有する。好ましくは、二重特異性抗体は、単鎖の二重特異性抗体であり、それは、同じまたは異なる抗体に由来する2つのscFvを含有する。

#### 【0038】

一部の実施形態では、融合タンパク質は、抗体-サイトカイン融合タンパク質であり、これは、抗体またはその機能性断片と、IL-2、IL-7、IL-10、IL-11、IL-12、IL-15、IL-21、IFN- $\alpha$ 、IFN- $\beta$ 、IFN- $\gamma$ 、G-CSF、GM-CSF、TNF- $\alpha$ 、TRAP、およびTRAILからなる群から選択されるサイトカインとを含有する。そのような融合タンパク質の例は、抗PD-1抗体または抗CD3抗体またはその抗原結合性ドメインIL2との融合タンパク質である。

10

#### 【0039】

本明細書に使用される抗体は、当技術分野に公知の任意の抗体またはその機能性断片としてよい。例えば、本明細書に使用される抗体は、抗Her2抗体、抗EGFR抗体、抗VEGFR抗体、抗CD20抗体、抗CD33抗体、抗PD-L1抗体、抗PD-1抗体、抗CTLA-4抗体、抗TNF $\alpha$ 抗体、抗CD28抗体、抗4-1BB抗体、抗OX40抗体、抗GITR抗体、抗CD27抗体、抗b-CD40抗体、もしくは抗ICOS抗体、抗CD25抗体、抗CD30抗体、抗CD3抗体、抗CD22抗体、抗CCR4抗体、抗CD38抗体、抗CD52抗体、抗補体C5抗体、抗RSV-Fタンパク質、抗GD2抗体、抗GITR抗体、抗糖タンパク質受容体Ligand/IL1a抗体、抗ICOS抗体、抗IL2R抗体、抗LAG3抗体、抗インテグリン $\alpha 4$ 抗体、抗Ligand抗体、抗PDGFRA抗体、抗RANKL抗体、抗SLAMF7抗体、抗LITGIT抗体、抗TIM-3抗体、抗VEGFR2抗体、抗VISTA抗体からなる群から選択される抗体またはその機能性断片としてよい。

20

#### 【0040】

好適な実施形態では、本明細書に使用される抗体は、ウトミルマブ、ウレルマブ、ADG106、ポテリジオ(商標)(モガムリズムマブ)、ポテリジオ(商標)(モガムリズムマブ)、ベキサール(商標)(トシツモマブ)、ゼヴァリン(商標)(イブリツモマブ・チウキセタン)、リツキサン(商標)(リツキシマブ)、アーゼラ(商標)(オフアツムマブ)、ガザイバ(商標)(オビヌツズマブ)、ベスポンサ(商標)(イノツズマブ・オゾガマイシン)、ゼナボックス(商標)(ダクリズマブ)、バリルマブ、セラリズムマブ、アドセトリス(商標)(ブレンツキシマブ・ベドチン)、マイロターゲット(商標)(ゲムツズマブ)、ダラザレックス(商標)(ダラツムマブ)、CDX-1140、SEA-CD40、RO7009789、JNJ-64457107、APX-005M、Chilob7/4、キャンパス(商標)(アレムツズマブ)、ラブティバ(商標)(エファリズムマブ)、ソリリス(商標)(エクリズマブ)、ヤーボイ(商標)(イピリムマブ)、トレメリムマブ、アービタックス(商標)(セツキシマブ)、ベクティビックス(商標)(パニツムマブ)、ポートルーザ(商標)(ネシツムマブ)、TheraCIM(商標)(ニモツズマブ)、シナジス(商標)(パリビズマブ)、ユニツキシシン(商標)(ジヌツキシマブ)、TRX-518、MK-4166、MK-1248、GWN-323、INCAGN0186、BMS-986156、AMG-228、レオプロ(商標)(アブキシマブ)、ハーセプチン(商標)(トラスツズマブ)、パージェタ(商標)(ペルツズマブ)、カドサイラ(商標)(Ado-トラスツズマブ・エムタンシン)、GSK-3359609、JTX-2011、シムレクト(商標)(バシリキシマブ)、タイサブリ(商標)(ナタリズムマブ)、BMS-986016、REGN3767、LAG525、ゾレア(商標)(オマリズマブ)、タボリマブ、PF-04518600、BMS-986178、MOXR-0916、GSK-3174998、INCAGN01949、IBI-101、キイトルーダ(商標)(ペムプロリズムマブ)、オブジーボ(商標)(ニボルマブ)、

30

40

50

ラルトルボ（商標）（オララツマブ）、テセントリク（商標）（アテゾリズマブ）、BMS-936559、バベンチオ（商標）（アベルマブ）、イミフィンジ（商標）（デュルバルマブ）、プロリア（商標）（デノスマブ）、エムプリシティ（商標）（エロツズマブ）、MTIG7192A、TSR-022、MBG-453、レミケード（商標）（インフリキシマブ）、ヒュミラ（商標）（アダリムマブ）、アバスチン（商標）（ベバシズマブ）、ルセンチス（商標）（ラニビズマブ）、サイラムザ（商標）（ラムシルマブ）、およびJNJ-61610588からなる群から選択される抗体またはその機能性断片としてよい。

#### 【0041】

本開示では、サイトカインは、当技術分野に一般に用いられる意味と構造とを有することがある。それは、一般的に、広範な生物活性を有する小タンパク質の1種を指し、このタンパク質は、単球、マクロファージ、T細胞、B細胞、NK細胞などの免疫細胞、または内皮細胞、上皮細胞、線維芽細胞などの非免疫細胞を刺激することによって、合成および分泌される。サイトカインは、細胞の成長、分化、および作用、ならびに対応の受容体との結合を通じた免疫応答を調節することがある。適したサイトカインとしては、インターロイキン、インターフェロン、腫瘍壊死因子スーパーファミリー、コロニー刺激因子、走化性因子、成長因子などが挙げられる。

10

#### 【0042】

例示的なサイトカインとしては、以下に限定されないが、IL-2、IL-7、IL-10、IL-11、IL-12、IL-15、IL-21、IFN- $\alpha$ 、IFN- $\beta$ 、IFN- $\gamma$ 、G-CSF、GM-CSF、TNF- $\alpha$ 、TRAP、およびTRAILが挙げられる。

20

#### 【0043】

本開示では、生体分子のアミノ酸配列の適した位置（複数可）の1つまたは複数（5個未満または3個未満）のアミノ酸が、システインに変異され、生体分子は、本開示の機能性部分（R1-R2-R3-R4）に、システインのチオール基を介して共有結合により連結される。例えば、関心のある生体分子の関心のある1個または2個のアミノ酸が、機能性部分とのコンジュゲーションのためにシステインに変異される。抗体については、変異位置は、可変領域の相補性決定領域または非相補性決定領域に存在することがある。好ましくは、変異は、置換による変異である。さらに好ましくは、変異は、抗体の軽鎖の可変領域に発生する。一般的に、変異体は、調製することができ、次いで、対応の抗原に対するその結合活性を試験される。変異体が、野生型抗体に比較して、結合活性の70%以上、好ましくは80%以上、さらに好ましくは90%以上を保持するならば、その変異位置のアミノ酸残基が、機能性部分に共有結合的に連結するためにシステインに変異されてよいものと考えられる。あるいは、ある特定の実施形態では、変異体をR4に連結することによって作製されたコンジュゲートが、結合活性の80%以上、好ましくは90%以上、さらに好ましくは95%以上を保持するならば、その変異位置のアミノ酸残基が、機能性部分を共有結合的に連結するためにシステインに変異されてもよいものと考えられる。

30

#### 【0044】

概して、抗体の軽鎖の可変領域のCDRのG、A、S、T、L、I、F、E、K、D、およびYなどのうち1つまたは複数、さらに好ましくはG、A、S、T、L、I、K、およびYのうち1つまたは複数、さらに好ましくはG、A、T、L、およびSのうち1つまたは複数、システインに変異されてもよい。一部の実施形態では、抗体の重鎖の可変領域のCDRのG、A、S、T、L、I、F、E、K、D、およびYなどのうち1つまたは複数、さらに好ましくはG、A、S、T、L、I、K、およびYのうち1つまたは複数、さらに好ましくはG、A、T、L、Y、およびSのうち1つまたは複数、システインに変異されてもよい。変異が抗体の軽鎖の非CDRに起こる場合、軽鎖または重鎖の可変領域の非CDRのG、A、S、T、L、I、F、E、K、D、およびYなどのうち1つまたは複数、好ましくはG、A、S、T、K、I、Y、およびL、さらに好ましくはG、A、T、Y、およびSのうち1つまたは複数、システインに変異されてもよい。一部の実施

40

50

形態では、軽鎖または重鎖の可変領域の非相補性決定領域（FR1、FR2、またはFR3など）のS、T、L、I、F、E、K、D、N、Q、R、およびY残基などのうち1つまたは複数、システインに変異されてもよい。一部の実施形態では、置換変異が、以下の保存部位のうち1つまたは複数に導入されてもよい：VHの非相補性決定領域（FR1、FR2、またはFR3）のGln3、Ser7、Ser26、Glu46、Thr68、およびAsp72、ならびにVLの非相補性決定領域（FR1、FR2 or FR3）のThr5、Tyr49、Arg61、Ser63、Ser65、Ser67、Thr72、Thr74、Ser76、およびAsp82。

【0045】

例えば、一部の本開示の実施形態では、抗PD-1抗体（ペムプロリズマブなど）の重鎖の変異位置は、Ser7、Gly8、Gly15、Ala16、Ser17、Ala24、Ser25、Gly26、Tyr27、Thr28、Thr30、Asn31、Tyr32、Tyr33、Tyr35、Ala40、Gly42、Gly44、Leu45、Gly49、Gly50、Ile51、Asn52、Ser54、Asn55、Gly56、Gly57、Thr58、Asn59、Lys63、Lys65、Thr69、Leu70、Thr71、Thr72、Asp73、Ser74、Ser75、Thr76、Thr77、Thr78、Ala79、Leu83、Ser85、Leu86、Thr91、Ala92、Arg99、Asp100、Tyr101、Arg102、Asp104、Gly106、Gly111、Gly113、Thr114、115Thr、117Thr、Ser119、Ser120、Ala121、Ser122、Thr123、Lys124、Gly125、およびSer127からなる群から選択されてもよく；軽鎖の変異位置は、Ile2、Thr5、Ser7、Ala9、Thr10、Leu11、Ser12、Leu13、Ser14、Gly16、Ala19、Thr20、Ala25、Ser26、Lys27、Gly28、Ser30、Thr31、Ser32、Gly33、Tyr34、Ser35、Tyr36、Leu37、Gly45、Ala47、Leu50、Leu51、Ile52、Tyr53、Leu54、Ala55、Ser56、Tyr57、Leu58、Ser60、Gly61、Ala64、Ser67、Gly68、Ser69、Gly70、Ser71、Gly72、Thr73、Ala76、Thr78、Ser80、Ser81、Ser95、Arg96、Asp97、Leu98、Leu100、Thr101、Phe102、Gly104、Ile110、Lys111、およびK130からなる群から選択されてもよい。

【0046】

あるいは、抗PD-1抗体（ニボルマブなど）の重鎖の変異位置は、Gln3、Ser7、Gly8、Gly9、Gly10、Gly15、Ser17、Lys23、Ala24、Ser25、Gly26、Ile27、Asn31、Thr28、Ser30、Ser32、Gly33、Ala40、Gly42、Gly44、Leu45、Ala49、Ile51、Tyr53、Asp54、Gly55、Ser56、Lys57、Tyr59、Tyr60、Ala61、Asp62、Ser63、Lys65、Gly66、Thr69、Ile70、Ser71、Arg72、Asp73、Asn74、Ser75、Lys76、Asn77、Thr78、Leu79、Leu81、Ser85、Leu86、Ala88、Thr91、Ala92、Thr98、Asn99、Asp100、Asp101、Tyr102、Gly104、Gly106、Thr107、Leu108、Thr110、Ser112、Ser113、Ala114、Ser115、Thr116、Lys117、Gly118、およびSer120からなる群から選択されてもよく；軽鎖の変異位置は、Ile2、Leu4、Thr5、Ser7、Ala9、Thr10、Leu11、Ser12、Leu13、Ser14、Gly16、Ala19、Thr20、Leu21、Ala25、Ser26、Ser28、Ser30、Ser31、Tyr32、Leu33、Ala34、Tyr36、Gly41、Ala43、Leu46、Leu47、Ile48、Tyr49、Asp50、Ala51、Ser52、Asn53、Arg54、Ala55、Thr56、Gly57、Ile58、Ala60、

10

20

30

40

50

Arg 61、Ser 63、Gly 64、Ser 65、Gly 66、Ser 67、Gly 68、Thr 69、Thr 72、Leu 73、Thr 74、Ile 75、Ser 76、Ser 77、Leu 78、Ala 84、Ser 91、Ser 92、Asn 93、Arg 96、Thr 97、Phe 98、Gly 99、Gly 101、Thr 102、Ile 106、Lys 107、Thr 109、Ala 111、Ala 112、Ser 114、Ile 117、およびSer 121からなる群から選択されてもよい。

【0047】

抗CTLA-4抗体の重鎖の変異位置は、Ser 7、Gly 8、Gly 9、Gly 10、Gly 15、Ser 17、Leu 18、Leu 20、Ala 24、Ser 25、Gly 26、Phe 27、Thr 28、Phe 29、Ser 30、Ser 31、Tyr 32、Thr 33、Ala 40、Gly 42、Lys 43、Gly 44、Leu 45、Glu 46、Thr 49、Phe 50、Ile 51、Ser 52、Tyr 53、Asp 54、Gly 55、Lys 58、Tyr 59、Tyr 60、Ala 61、Asp 62、Ser 63、Lys 65、Gly 66、Thr 69、Ile 70、Ser 71、Ser 75、Lys 76、Thr 78、Leu 79、Leu 81、Ser 85、Leu 86、Ala 88、Gly 89、Asp 90、Thr 91、Ala 92、Tyr 94、Tyr 95、Ala 97、Phe 98、Thr 99、Gly 100、Leu 102、Gly 103、Asp 106、Tyr 107、Gly 109、Gly 111、Thr 112、Leu 113、Thr 115、Ser 117、Ser 118、Ala 119、Ser 120、Thr 121、およびLys 122からなる群から選択されてもよく；軽鎖の変異位置は、Ile 2、Leu 4、Thr 5、Ser 7、Gly 9、Thr 10、Leu 11、Ser 12、Leu 13、Ser 14、Gly 16、Ala 19、Thr 20、Leu 21、Ala 25、Ser 26、Ser 28、Gly 30、Ser 31、Ser 32、Tyr 33、Leu 34、Ala 35、Tyr 37、Lys 40、Gly 42、Ala 44、Leu 47、Leu 48、Ile 49、Tyr 50、Gly 51、Ala 52、Phe 53、Ser 54、Ala 56、Thr 57、Gly 58、Ile 59、Ser 64、Gly 65、Ser 66、Gly 67、Ser 68、Gly 69、Thr 70、Asp 71、Thr 73、Leu 74、Thr 75、Ile 76、Ser 77、Leu 79、Ala 85、Tyr 92、Gly 93、Ser 94、Ser 95、Thr 98、Phe 99、Gly 100、Gly 102、Thr 103、Lys 104、Ile 107、Lys 108、Thr 110、Ala 112、Ala 113、Ser 115、Ser 128、Gly 129、およびThr 130からなる群から選択されてもよい。

【0048】

抗CTLA-4抗体イピリムマブの重鎖の変異位置は、Gln 3、Arg 19、Leu 20、Ser 25、Gly 26、Phe 27、Thr 28、Phe 29、Ser 30、Ser 31、Tyr 32、Thr 33、Met 34、His 35、Gly 44、Phe 50、Ile 51、Ser 52、Tyr 53、Asp 54、Gly 55、Asn 56、Asn 57、Lys 58、Tyr 59、Tyr 60、Thr 69、Ser 71、Arg 72、Asp 73、Asn 74、Ser 75、Lys 76、Asn 77、Thr 99、Gly 100、Trp 101、Leu 102、Gly 103およびPro 104からなる群から選択されてもよく；軽鎖の変異位置は、Gln 6、Arg 24、Ala 25、Ser 26、Gln 27、Ser 28、Val 29、Gly 30、Ser 31、Ser 32、Tyr 33、Ile 49、Tyr 50、Gly 51、Ala 52、Phe 53、Ser 54、Arg 55、Ala 56、Phe 53、Ser 54、Arg 55、Ala 56、Thr 57、Gly 58、Ile 59、Pro 60、Asp 61、Arg 62、Ser 68、Gly 69、Thr 70、Gln 90、Gln 91、Tyr 92、Gly 93、Ser 94、Ser 95、Pro 96 and Trp 97からなる群から選択されてもよい。

【0049】

抗TNF 抗体の重鎖の変異位置は、Ser 7、Gly 8、Gly 9、Gly 10、Leu 11、Gly 15、Ser 17、Leu 18、Leu 20、Ala 24、Ser 25

10

20

30

40

50

、 Gly 26、 Thr 28、 Asp 30、 Asp 31、 Tyr 32、 Ala 33、 Ala 40、 Gly 42、 Gly 44、 Leu 45、 Ser 49、 Ala 50、 Ile 51、 Thr 52、 Asn 54、 Ser 55、 Gly 56、 Ile 58、 Asp 59、 Tyr 60、 Ala 61、 Asp 62、 Ser 63、 Glu 65、 Gly 66、 Phe 68、 Thr 69、 Ile 70、 Ser 71、 Asp 73、 Asn 74、 Ala 75、 Lys 76、 Ser 78、 Leu 79、 Tyr 80、 Leu 81、 Ser 85、 Leu 86、 Ala 88、 Thr 91、 Ala 92、 Lys 98、 Ser 100、 Tyr 101、 Leu 102、 Ser 103、 Thr 104、 Ala 105、 Ser 106、 Ser 107、 Leu 108、 Asp 109、 Tyr 110、 Gly 112、 Gly 114、 Thr 115、 Leu 116、 Thr 118、 Ser 120、 Ser 121、 Ala 122、 Ser 123、 および Thr 124 からなる群から選択されてもよく；軽鎖の変異位置は、 Asp 1、 Thr 5、 Ser 7、 Ser 9、 Ser 10、 Leu 11、 Ser 12、 Ala 13、 Ser 14、 Gly 16、 Thr 20、 Ile 21、 Ala 25、 Ser 26、 Gln 27、 Gly 28、 Ile 29、 Arg 30、 Asn 31、 Tyr 32、 Leu 33、 Ala 34、 Tyr 36、 Lys 39、 Gly 41、 Lys 42、 Ala 43、 Leu 48、 Leu 47、 Ile 48、 Tyr 49、 Ala 50、 Ala 51、 Ser 52、 Thr 53、 Leu 54、 Gln 55、 Ser 56、 Gly 57、 Ser 60、 Ser 63、 Gly 64、 Ser 65、 Gly 66、 Ser 67、 Gly 68、 Thr 69、 Asp 70、 Thr 72、 Leu 73、 Thr 74、 Ile 75、 Ser 76、 Ser 77、 Leu 78、 Ala 84、 Thr 85、 Tyr 91、 Asn 92、 Arg 93、 Ala 94、 Tyr 96、 Thr 97、 Phe 98、 Gly 99、 Gly 101、 Thr 102、 Ile 106、 Lys 107、 Thr 109、 および Ala 111 からなる群から選択されてもよい。

10

20

【0050】

抗CD28抗体の重鎖の変異位置は、 Ser 7、 Gly 8、 Gly 15、 Ala 16、 Ser 17、 Ser 21、 Ala 24、 Ser 25、 Gly 26、 Tyr 27、 Thr 28、 Thr 30、 Ser 31、 Tyr 32、 Ala 40、 Gly 42、 Gly 44、 Gly 49、 Tyr 52、 Gly 54、 Thr 58、 Ala 68、 Thr 69、 Thr 71、 Thr 74、 Ser 75、 Ser 77、 Thr 78、 Ala 79、 Ser 84、 Leu 86、 Ser 88、 Thr 91、 Ala 92、 Thr 97、 Ser 99、 Tyr 101、 Gly 102、 Leu 103、 Gly 113、 Thr 114、 Thr 115、 Thr 117、 Ser 119、 Ser 120、 Ala 121、 Ser 122、 および Thr 123 からなる群から選択されてもよく；軽鎖の変異位置は、 Thr 5、 Ser 7、 Ser 9、 Ser 10、 Ser 11、 Ser 12、 Ala 13、 Ser 14、 Gly 16、 Thr 20、 Thr 22、 Ala 25、 Ser 26、 Ser 27、 Ile 29、 Tyr 30、 Ala 43、 Leu 46、 Leu 47、 Tyr 49、 Lys 50、 Ala 51、 Ser 52、 Leu 54、 Thr 56、 Gly 57、 Ser 60、 Ser 63、 Gly 64、 Ser 65、 Gly 66、 Ser 67、 Gly 68、 Thr 69、 Asp 70、 Thr 72、 Thr 74、 Ser 76、 Ser 77、 Ala 84、 Thr 85、 Gly 91、 Thr 93、 Tyr 94、 Tyr 96、 Thr 97、 Phe 98、 Gly 99、 Gly 100、 Gly 101、 Thr 102、 Thr 109 and Ala 111 からなる群から選択されてもよい。

30

40

【0051】

抗4-1BB抗体の重鎖の変異位置は、 Thr 31、 Tyr 32、 Ser 35、 Lys 50、 Tyr 52、 Asp 55、 Ser 56、 Tyr 57、 Thr 58、 Asn 59、 Tyr 60、 Ser 61、 Gln 65、 Gly 66、 Gly 99、 Tyr 100、 Gly 101、 Asp 104、 および Tyr 105 からなる群から選択されてもよく；軽鎖の変異位置は、 Ser 23、 Gly 24、 Asp 25、 Asn 26、 Gly 28、 Asp 29、 Gln 30、 Tyr 31、 Gln 49、 Asp 50、 Lys 51、 Asn 52、 Arg 53、 Ser 55、 Gly 56、 Thr 89、 Tyr 90、 Thr 91、 Gly 92、 Gly 94 and Ser 95 からなる群から選択されてもよい。

【0052】

50

抗Her2抗体(トラスツズマブなど)の重鎖の変異位置は、: Arg19、Lys30、Asp31、Tyr33、Arg50、Tyr62、Asn55、Tyr57、Arg59、Tyr60、Asp62、Lys65、Asp102 and Tyr105からなる群から選択されてもよく; 軽鎖の変異位置は、Asp1、Gln3、Gln27、Asp28、Asn30、Tyr49、Tyr55、Arg66、Asp70、およびTyr92からなる群から選択されてもよい。

【0053】

抗PD-L1抗体(アテゾリズマブなど)の重鎖の変異位置は、Gln3、Asp31、Tyr54、Tyr59、Tyr60、Asp62、Lys65、Asp73、Lys76、Asn77、およびArg99からなる群から選択され; 軽鎖の変異位置は、Arg24、Gln27、Asp28、Tyr49、Tyr55、Asp70、Gln89、Gln90、Tyr91、およびTyr93からなる群から選択される。

10

【0054】

一部の好適な実施形態では、様々な抗体の変異位置は、好ましくは表5から表19に挙げられた位置から選択され、それらの位置は、変異された後に結合活性の70%以上、好ましくは80%以上、さらに好ましくは90%以上を保持するか、またはR4とコンジュゲートされた後に結合活性の80%以上、好ましくは90%以上を保持する。これらの変異位置としては、CDRおよび非CDRに含まれるものが挙げられる。例えば、抗PD-1抗体1の軽鎖の好適な変異位置としては、Ala25、Ser26、Gly28、Ser30、Thr31、Ser32、Gly33、Ser35、Tyr36、Leu37、Leu54、Ala55、Ser56、Tyr57、Ser60、Gly61、Ser95、Thr101、およびGly104を挙げることができ; さらに好ましくは、変異位置としては、Ser26、Gly28、Ser30、Ser32、Gly33、Ser35、Ala55、Ser56、Ser60、Gly61、およびSer95が挙げられる。抗PD-1抗体2の軽鎖の好適な変異位置としては、Ala25、Ser26、Ser28、Ser30、Ser31、Ala34、Ala51、Ser52、Ser54、Ala55、Thr56、Gly57、Ile58、Ala60、Ser91、Ser92、Thr97、およびGly99を挙げる事ができ; さらに好ましくは、変異位置としては、Ser26、Ser28、Ser30、Ser31、Ala34、Ser52、Ser54、Thr56、Gly57、Ser91、Ser92、Thr97、およびGly99が挙げられる。抗CTLA-4抗体の軽鎖の好適な変異位置としては、Ala25、Ser26、Ser28、Gly30、Ser31、Ser32、Leu34、Ala35、Gly51、Ala52、Ser54、Ala56、Thr57、Gly58、Gly93、Ser94、Ser95、Thr98、およびGly100を挙げる事ができ; さらに好ましくは、変異位置としては、Ala25、Ser26、Ser28、Gly30、Ser31、Ser32、Gly51、Ser54、Thr57、Gly58、Gly93、Ser94、Ser95、およびGly100が挙げられる。抗CD28抗体の軽鎖の好適な変異位置としては、Ser26、Ile29、Tyr30、Lys50、Ala51、Ser52、Gly91、Thr93、Tyr94、Tyr96、Thr97、およびGly99を挙げる事ができ; さらに好ましくは、変異位置としては、Tyr30、Ala51、Tyr96、Thr97、およびGly99が挙げられる。抗TNF抗体の軽鎖の好適な変異位置としては、Ala25、Ser26、Gly28、Ile29、Tyr32、Leu33、Ala34、Ala50、Ala51、Ser52、Thr53、Leu54、Ser56、Gly57、Tyr91、Ala94、およびThr97を挙げる事ができ; さらに好ましくは、変異位置としては、Ser26、Gly28、Ala51、Ser56、Gly57、Tyr91、およびAla94が挙げられる。

20

30

40

【0055】

抗PD-1抗体1の重鎖の好適な変異位置としては、Thr30、Tyr32、Tyr35、Gly50、Ile51、Ser54、Gly56、Gly57、Thr58、L

50

y s 6 3、T y r 1 0 1、およびG l y 1 0 6を挙げることができ；さらに好ましくは、  
 変異位置としては、T h r 3 0、G l y 5 0、S e r 5 4、G l y 5 6、G l y 5 7、T  
 h r 5 8、L y s 6 3、およびG l y 1 0 6が挙げられる。抗P D - 1抗体2の重鎖の好  
 適な変異位置としては、S e r 3 0、S e r 3 2、G l y 3 3、I l e 5 1、T y r 5 3  
 、A s p 5 4、G l y 5 5、S e r 5 6、L y s 5 7、A l a 6 1、S e r 6 3、L y s  
 6 5、G l y 6 6、A s p 1 0 1、G l y 1 0 4、G l y 1 0 6、T h r 1 0 7、および  
 L e u 1 0 8を挙げる事ができ；さらに好ましくは、変異位置としては、S e r 3 0、  
 S e r 3 2、G l y 3 3、T y r 5 3、G l y 5 5、S e r 5 6、S e r 6 3、L y s 6  
 5、G l y 6 6、G l y 1 0 4、G l y 1 0 6、およびT h r 1 0 7が挙げられる。抗C  
 T L A - 4抗体の重鎖の好適な変異位置としては、S e r 3 0、S e r 3 1、T y r 3 2  
 、T h r 3 3、I l e 5 1、A s p 5 4、G l y 5 5、L y s 5 8、T y r 5 9、T y r  
 6 0、A l a 6 1、A s p 6 2、S e r 6 3、L y s 6 5、G l y 6 6、G l y 1 0 0、  
 L e u 1 0 2、G l y 1 0 3、A s p 1 0 6、およびT y r 1 0 7を挙げる事ができ；  
 さらに好ましくは、変異位置としては、S e r 3 0、S e r 3 1、T h r 3 3、G l y 5  
 5、T y r 6 0、A l a 6 1、S e r 6 3、L y s 6 5、G l y 6 6、G l y 1 0 0、お  
 よびG l y 1 0 3が挙げられる。抗C D 2 8抗体の重鎖の好適な変異位置としては、S e  
 r 2 5、G l y 2 6、T y r 2 7、T h r 2 8、T h r 3 0、S e r 3 1、T y r 3 2、  
 T y r 3 3、T y r 5 2、G l y 5 4、T h r 5 8、S e r 9 9、T y r 1 0 1、G l y  
 1 0 2、およびL e u 1 0 3を挙げる事ができ；さらに好ましくは、変異位置としては、  
 G l y 2 6、T y r 2 7、T h r 2 8、T h r 3 0、S e r 3 1、T y r 5 2、G l y  
 5 4、およびL e u 1 0 3が挙げられる。抗T N F 抗体の重鎖の好適な変異位置として  
 は、T y r 3 2、A l a 3 3、I l e 5 1、T h r 5 2、S e r 5 5、G l y 5 6、I l  
 e 5 8、T y r 6 0、A l a 6 1、S e r 6 3、G l y 6 6、S e r 1 0 0、T y r 1 0  
 1、L e u 1 0 2、S e r 1 0 3、T h r 1 0 4、A l a 1 0 5、S e r 1 0 6、S e r  
 1 0 7、L e u 1 0 8、およびT y r 1 1 0を挙げる事ができ；さらに好ましくは、変  
 異位置としては、A l a 3 3、I l e 5 1、A l a 6 1、S e r 6 3、G l y 6 6、S e  
 r 1 0 0、T h r 1 0 4、およびS e r 1 0 6が挙げられる。

【0056】

同様に、変異が軽鎖の可変領域の非C D R、すなわちフレームワーク領域に発生する際  
 に、様々な抗体の変異位置は、好ましくは、表7および表8に挙げられるものから選択さ  
 れてもよく、それらの位置は、変異された後に結合活性の80%以上、好ましくは90%  
 以上を保持する。例えば、本明細書に開示されるように抗P D - 1抗体1の軽鎖につい  
 ては、フレームワーク領域内の好適な変異位置としては、T h r 5、S e r 7、A l a 9、  
 T h r 1 0、L e u 1 1、S e r 1 2、L e u 1 3、S e r 1 4、G l y 1 6、A l a 1  
 9、T h r 2 0、G l y 4 5、A l a 4 7、L e u 5 0、L e u 5 1、I l e 5 2、A l  
 a 6 4、S e r 6 7、G l y 6 8、S e r 6 9、G l y 7 0、S e r 7 1、G l y 7 2、  
 T h r 7 3、A l a 7 6、T h r 7 8、S e r 8 0、S e r 8 1、I l e 1 1 0、および  
 L y s 1 1 1が挙げられ；さらに好ましくは、変異位置としては、T h r 5、S e r 7、  
 A l a 9、L e u 1 1、L e u 1 3、S e r 1 4、A l a 4 7、L e u 5 0、A l a 6 4  
 、G l y 6 8、S e r 6 9、S e r 7 1、G l y 7 2、T h r 7 3、S e r 8 0、および  
 I l e 1 1 0が挙げられる。本明細書に開示されるような抗P D - 1抗体2の重鎖につい  
 ては、フレームワーク領域の好適な変異位置としては、S e r 7、G l y 8、G l y 9、  
 G l y 1 0、G l y 1 5、S e r 1 7、A l a 2 4、S e r 2 5、G l y 2 6、T h r 2  
 8、S e r 3 0、A l a 4 0、G l y 4 2、G l y 4 4、T h r 6 8、S e r 7 1、S e  
 r 7 5、T h r 7 8、T h r 8 5、A l a 8 8、T h r 9 1、A l a 9 2、T h r 9 8、  
 T h r 1 1 0、S e r 1 1 2、S e r 1 1 3、A l a 1 1 4、S e r 1 1 5、T h r 1 1  
 6、L y s 1 1 7、G l y 1 1 8、およびS e r 1 2 0が挙げられ；さらに好ましくは、  
 変異位置としては、S e r 7、G l y 8、G l y 9、A l a 2 4、S e r 2 5、G l y 2  
 6、G l y 4 4、T h r 6 8、S e r 7 5、T h r 7 8、T h r 8 5、T h r 1 1 0、S  
 e r 1 1 2、S e r 1 1 3、S e r 1 1 5、T h r 1 1 6、L y s 1 1 7、G l y 1 1 8

10

20

30

40

50

、およびSer120が挙げられる。

【0057】

他の機能性タンパク質、例えばサイトカインなどに関して、その変異体が、野生型タンパク質の結合活性（例えばその本来のリガンドの結合能）の70%以上、好ましくは80%以上、さらに好ましくは90%以上を保持する場合に、その位置のアミノ酸残基は、機能性部分に連結するためのシステインに変異されてもよいものと考えられる。例えば、IL2の変異位置は、アルファ受容体を遮断するように、Lys32、Lys35、Thr37、Met39、Thr41、Lys43、Lys48、Lys49、Lys64、Leu72、Ala73、Ser75、Lys76、Leu94、Thr101、Thr102、Tyr107、Ala108、Thr111、およびAla112からなる群から選択されうるか；または、ベータ受容体を遮断するように、Leu12、His16、Leu19、Met23、Gly27、Ser75、Arg81、Leu85、Ser87、Leu94、Gly98、Ser99、Thr101、およびThr133からなる群から選択されるか；または、ガンマ受容体を遮断するように、Leu36、Ala50、Thr51、Thr123、Ser126、Ser127、およびSer130からなる群から選択される。一部の実施形態では、IL2の変異位置は、IL2のアルファ受容体を遮断するように、Lys32、Lys35、Thr37、Thr41、Lys43、Lys48、Lys49、Ala50、Leu72、Ala73、Ser75、Lys76、Leu94、Thr101、Thr102、Ala108、Thr111、およびAla112からなる群から選択されうるか；または、IL2のベータ受容体を遮断するよう

10

20

【0058】

サイトカイン、例えばIL2、IL10、およびIL15などのAla、Gly、Ser、Thr、Leu、Lys、Tyr、Phe、Asp、Glu、およびIleのうち1つまたは複数は、システインに変異されていてもよい。好ましくは、サイトカインのアミノ酸配列のThr、Leu、Ala、Gly and Serのうちいずれかが、システインに変異されている。

30

【0059】

一部の実施形態では、ヒトIL10の変異位置は、Thr6、Ser8、Ser11、Thr13、Gly17、Arg24、Ser31、Arg32、Lys34、Thr35、Lys40、Leu46、Lys49、Ser51、Lys57、Gly58、Ser66、Tyr72、Lys88、His90、Ser93、Lys99、Thr100、Arg104、Lys117、Ser118、Lys119、Lys125、Lys130、Lys134、Gly135、Tyr137、Tyr149、Thr155、Lys157、およびArg159からなる群から選択されてもよい。

【0060】

本開示の融合タンパク質については、1つまたは複数のシステインが、融合タンパク質の任意のタンパク質内に導入されてもよい。例えば、二重特異性抗体については、この変異（複数可）は、どちらかもしくは両方のscFvのCDRまたは非CDRの中に、またはどちらかもしくは両方の抗原結合性ドメインの中に、導入されてもよい。抗体とサイトカインとの融合タンパク質については、抗体とサイトカインとのどちらかまたは両方が、この変異（複数可）を含有していてもよい。

40

【0061】

例示的な配列は配列番号13～83に参照されることがある。

【0062】

生体分子の変異、トランスフェクション、発現、および精製は、当技術分野に公知の方

50

法によって実施されてもよい。例えば、変異位置を有する生体分子の核酸が直接的に合成されてもよく、次いで、酵素消化によって得られた異なる断片の核酸分子が、発現ベクター内に連結されてもよく、そして、発現ベクターは、細菌または真核生物の宿主細胞に形質転換される。システイン変異を含有する生体分子は、宿主細胞における組換えを通じて取得されてもよい。

【 0 0 6 3 】

本開示での使用に適した細菌または真核生物の宿主細胞は、当技術分野で一般に使用される宿主細胞としてもよく、そのようなものとしては、以下に限定されないが、細菌、酵母、および哺乳動物細胞が挙げられる。有用な真核生物の宿主細胞としては、CHO細胞、HEK293T細胞、またはピキア・パストリスが挙げられる。

10

【 0 0 6 4 】

本開示での使用に適した発現ベクターは、当技術分野に公知のウイルスベースの発現ベクターであり、そのようなものとしては、以下に限定されないが、バキュロウイルス、サルウイルス(SV40)、レトロウイルス、ワクシニアベースのウイルスベクターが挙げられる。適した調節因子および選択マーカ含有する発現ベクターが、変異体を安定的に発現する哺乳動物細胞株を調製するために使用されてもよい。例えば、GS真核動物発現系(Lonza)、DHF R真核動物発現系(インビトロジェン)、およびピキア・パストリス発現系(インビトロジェン)が、発現および調製に使用されてもよい。

【 0 0 6 5 】

本開示の生体分子は、当技術分野に公知の単離方法によって精製されてもよい。これらの方法としては、以下に限定されないが、DEAEイオン交換、ゲル濾過、およびハイドロキシアパタイトクロマトグラフィーが挙げられる。例えば、プロテインGカラムが、細胞培養物の上清中または細胞質の抽出物中の生体分子を単離するために使用されてもよい。一部の実施形態では、生体分子は、「工学的改変」に供されて、生体分子を親和性マトリックスに捕捉することを可能にするアミノ酸配列を含有するものとされることがある。例えば、ポリペプチドを精製し易くするために、タグが使用されてもよい。タグとしては、以下に限定されないが、c-myc、ヘマゴニウム(hemagonium)、ポリHis(例えば6His)、またはFlag(商標)(Kodak)が挙げられる。そのような種類のタグは、ポリペプチド内の任意の位置に挿入されてもよく、そのようなものとしては、カルボキシ末端、またはアミノ末端が挙げられる。本開示の生体分子はまた、イムノアフィニティクロマトグラフィーによって精製されてもよい。

20

30

【 0 0 6 6 】

本開示での使用に適した機能性部分は、式R1-R2-R3-R4によって表されることがある。この機能性部分では、R1、R2、R3、およびR4は、任意の適した連結様式を介して合わせて連結されており、そのような連結様式としては、以下に限定されないが、アミド結合、エステル結合、カルバメート結合、ウレア結合、またはヒドラゾン結合が挙げられる。本開示では、アミド結合は、「-CO-NH-」によって表されることがあり、エステル結合は、「-C(O)-O-」によって表されることがあり、カルバメート結合は、「-NH-C(O)-O-」によって表されることがあり、ウレア結合は、「-NH-CO-NH-」によって表されることがあり、ヒドラゾン結合は、「-CH=N-NH-」によって表されることがある。

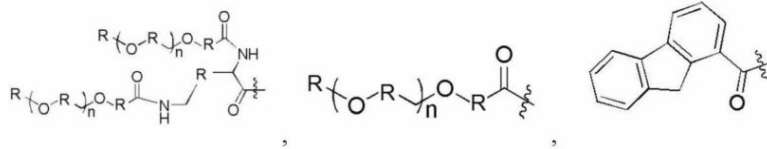
40

【 0 0 6 7 】

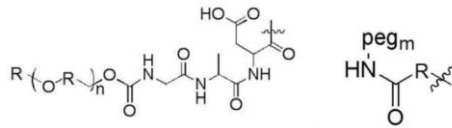
R1は、生体分子R5のための保護基である。それは、生体分子が他の分子によって干渉されるのを防止するために、生体分子がそのリガンドまたは受容体に結合することを防止する任意の群から選択されてもよく、例えば、生体分子が腫瘍または炎症性の微小環境などの病態の微小環境に到達する前にそのリガンドまたは受容体に結合するのを防止するものがある。適したR1は、ポリエチレングリコール-C<sub>1-5</sub>アルキルカルボニル、ナフチルカルボニル、キノリルカルボニル、フルオレニルカルボニル、アダマンチルカルボニル、

【 0 0 6 8 】

50



【 0 0 6 9 】

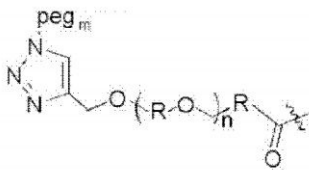


10

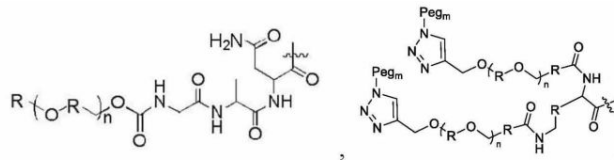
【 0 0 7 0 】

または

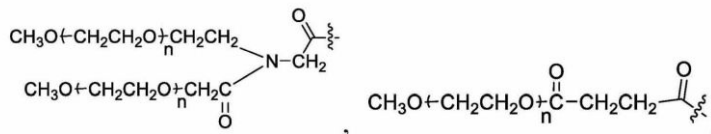
【 0 0 7 1 】



20



【 0 0 7 2 】

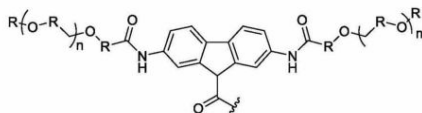


30

【 0 0 7 3 】

および

【 0 0 7 4 】



40

【 0 0 7 5 】

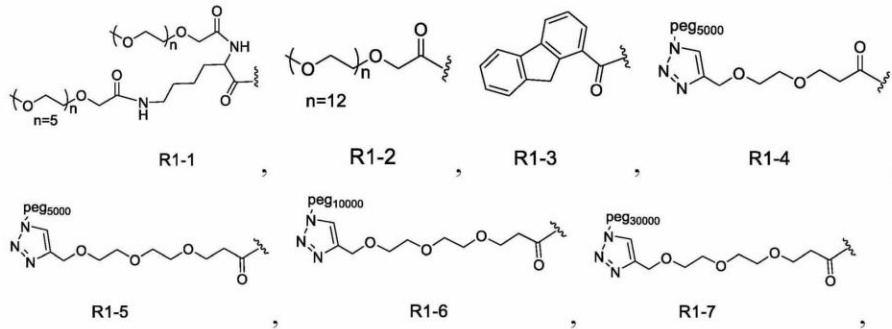
からなる群から選択されてもよく、式中、各 R は、独立して C<sub>1</sub> - 4 アルキルであり；各 n は、独立して 1 から 3 0 0 0 の範囲の整数、例えば 1 から 1 5 0 0 0、1 から 5 0 0 0、1 から 2 0 0 0、1 から 3 0 0、1 から 1 5 0、1 から 5 0、1 から 2 0、または 3 から 1 2 の範囲の整数であり；ポリエチレングリコールまたは peg<sub>m</sub> は、4 4 から 1 3 2 0 0 0 の範囲の分子量、例えば 1 0 0 0 から 5 0 0 0 0 または 1 0 0 0 0 から 3 0 0 0 0 の範囲のものなどを有するポリエチレングリコールを表し、；m は、ポリエチレングリコールの分子量を表し；波線は、R<sub>2</sub> に連結している R<sub>1</sub> の位置を標示する。

50

【 0 0 7 6 】

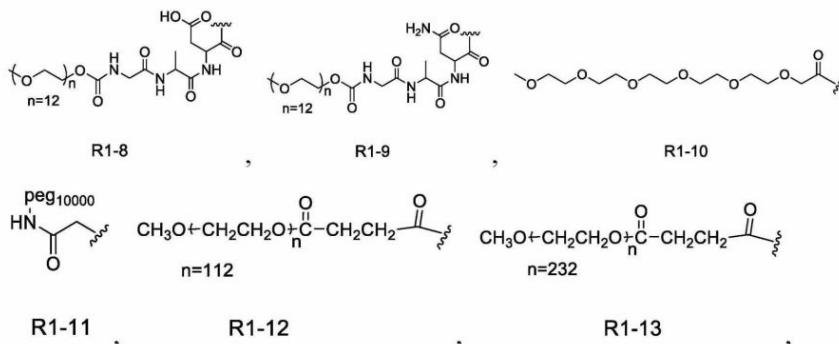
一部の実施形態では、R 1 は、以下からなる群から選択される。

【 0 0 7 7 】

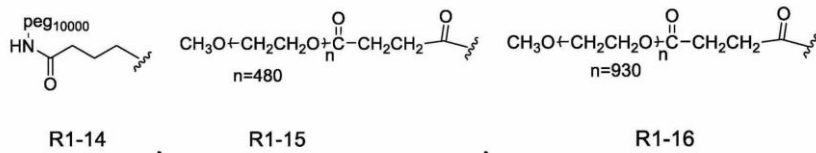


10

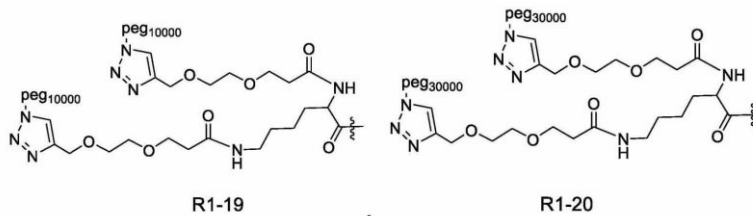
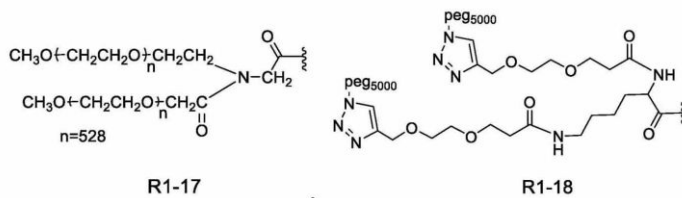
【 0 0 7 8 】



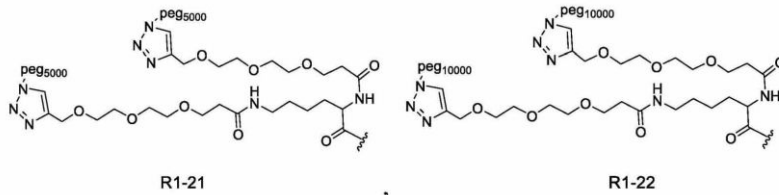
20



30

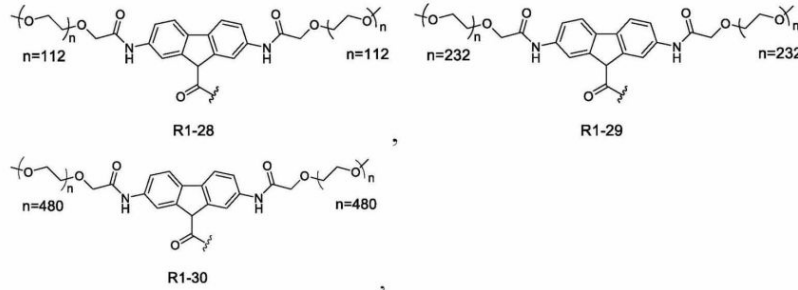
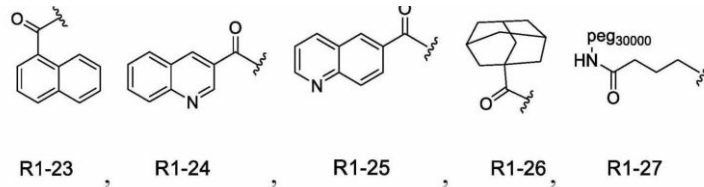


40



50

## 【 0 0 7 9 】



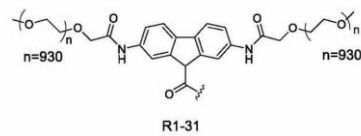
10

## 【 0 0 8 0 】

および

20

## 【 0 0 8 1 】



## 【 0 0 8 2 】

一般的に、変異位置が生体分子の機能性ドメインに、例えば抗体のCDRに存在する場合、R1の分子量に特定の限定はなく、R1は比較的低い分子量を有することがある。変異位置が生体分子の機能性ドメインの外側に、例えば抗体の非CDRに存在する場合、R1は、好ましくは、R1-R2-R3-R4の分子量を200超、好ましくは500超、さらに好ましくは1000超とするように選択され、それゆえに生体分子のコンジュゲートの分子量が、5000超、好ましくは8000超、さらに好ましくは10000超となり、それによって病態の微小環境に達する前に生体分子がそのリガンドまたは受容体に結合することが、より良好に防止される。

30

## 【 0 0 8 3 】

本開示では、R2は、切断可能なリンカーアームである。それは、タンパク質分解酵素、プロテアーゼ、もしくはペプチダーゼにより活性化することのできるペプチド、または病態の微小環境において酸性で活性化することのできる化学結合であることがある。本開示では、タンパク質分解酵素、プロテアーゼ、またはペプチダーゼは、病態の微小環境に存在する様々なタンパク質分解酵素、プロテアーゼ、またはペプチダーゼであることがある。例えば、プロテアーゼは、システインプロテアーゼ、アスパラギン酸プロテアーゼ、グルタミン酸プロテアーゼ、スレオニンプロテアーゼ、ゼラチナーゼ、メタロプロテイナーゼ、またはアスパラギンペプチドリアーゼであることがある。一部の実施形態では、R2は、レグミン、カテプシンB、カテプシンC、カテプシンD、カテプシンE、カテプシンK、カテプシンL、カリクレイン、hK1、hK10、hK15、プラスミン、コラゲナーゼ、IV型コラゲナーゼ、アストロメリシン、第Xa因子、キモトリプシン様プロテアーゼ、トリプシン様プロテアーゼ、エラスターゼ様プロテアーゼ、サブチリシン様プロテアーゼ、アクチニダイン、プロメライン、カルパイン、カスパーゼ、カスパーゼ-3、Mir1-CP、パパイン、HIV-1プロテアーゼ、HSVプロテアーゼ、CMVプ

40

50

ロテアーゼ、キモスム (chymosm)、ペプスム (pepsm)、マトリプターゼ、レグマイ  
 イン、プラスメプスム (plasmepsm)、ネペンテシン、メタロエクソペプチダーゼ、メタロ  
 エンドペプチダーゼ、マトリックスメタロプロテアーゼ (MMP)、MMP 1、MMP 2  
 、MMP 3、MMP 8、MMP 9、MMP 10、MMP 11、MMP 12、MMP 13、  
 MMP 14、ADAM 10、ADAM 12、ウロキナーゼ型プラスミノゲン活性化因子  
 (uPA)、ネンテロキナーゼ (nenterokinase)、前立腺特異的抗原 (PSA, hK3  
 )、インターロイキン - 113 転換酵素、トロンピン、FAP (FAP - a)、メプリン  
 、グランザイム、ジペプチジルペプチダーゼ、およびジペプチジルペプチダーゼ IV (D  
 PPIV / CD 26) のうち少なくとも 1 つによって切断されることがある。好適な実施  
 形態では、本開示は、具体的には、腫瘍の微小環境において腫瘍細胞により多く発現およ  
 び分泌される、レグマインに関する。また、腫瘍関連マクロファージ (M2 型) は、レグ  
 マインの発現により単球および炎症性マクロファージ (M1 型) とは異なる。本開示では  
 、上記ペプチドは、タンパク質分解酵素の基質である。それは、タンパク質分解酵素によ  
 って認識し切断することができる。

#### 【0084】

本開示の R2 は、- R2 a -、- R2 b -、- R2 a - N -、- R2 a - D -、- R2  
 a - AAN -、- R2 a - AAD -、または - R2 a - R2 b - によって表されることが  
 あり；式中、R2 a は、1 つまたは複数のタンパク質分解酵素によりアミド結合で切断す  
 ることのできるペプチドであり；R2 b は、R3 と共にカルバメートを形成する側鎖にそ  
 の窒素を有するペプチドの 1 種であって、このカルバメートは、1 つまたは複数のタン  
 パク質分解酵素により切断することができ；A は、アラニンであり；N は、R3 と共にカル  
 バメートを形成する側鎖にその窒素を有するアスパラギンであって、このカルバメートは  
 、レグマインにより切断することができ；D は、R3 と共にカルバメートを形成する側鎖  
 にその窒素を有するアスパラギン酸であって、このカルバメートは、グランザイム B によ  
 り切断することができる。R2 a と R2 b とは、アミド結合を形成することによって連結  
 することができる。レグマインとグランザイム B が R2 と R3 との間の結合 (カルバメ  
 ートなど) を切断した後、R3 は、速やかに自己放出を経ることができ。次いで、R4 部  
 分が保持されることがある。他の酵素が R2 のアミド結合で切断することがあるが、それ  
 によっていくつかのアミノ酸残基がリンカーに留まり、それゆえに R3 の自己放出が起  
 こらないものとなる。そのような R2 の例としては、以下に限定されないが、LTPRLG  
 PAAN (配列番号 84)、GPAAN (配列番号 85)、および LSGRSDN (配列  
 番号 86) が挙げられる。

#### 【0085】

一部の実施形態では、タンパク質分解酵素により活性化することのできる適したペプチ  
 ドは、トリペプチドであることがある。当技術分野に公知の病態の微小環境においてタン  
 パク質分解酵素によって認識し切断する (活性化する) ことのできる任意の基質ペプチド  
 は、本明細書に開示されるような R2 として使用されることがある。そのようなペプチド  
 は、本開示に参照によりその実体が組み込まれる WO 2016 / 026458 に開示され  
 る構造を有することがある。一部の実施形態では、本開示での使用に適したトリペプチド  
 構造において、R1 に連結されたアミノ酸残基は、Ala、Thr、Val、および Ile  
 からなる群から選択されてもよく、中位のアミノ酸残基は、Ala、Thr、Val、  
 および Asn からなる群から選択されてよく、R3 に連結されたアミノ酸残基は、Asn  
 および Asp からなる群から選択されてよい。概して、R2 は、そのアミノ酸残基のアミ  
 ノ基を介してアミド結合、エステル結合、カルバメート結合、ウレア結合、またはヒドラ  
 ゾン結合の連結様式で R1 に連結し、そのアミノ酸残基のカルボキシ基を介してアミド結  
 合、エステル結合、カルバメート結合、ウレア結合、またはヒドラゾン結合の連結様式で  
 R3 に連結する。一部の本開示の好適な実施形態では、トリペプチドは、Ala - Ala  
 - Asn および Ala - Ala - Asp からなる群から選択される。Ala - Ala - Asn  
 は、レグマインによって認識され切断されてもよく、Ala - Ala - Asp は、グ  
 ランザイムによって認識され切断されてもよい。

10

20

30

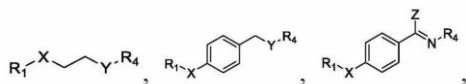
40

50

## 【 0 0 8 6 】

一部の実施形態では、R 2 は、病態の微小環境において酸性で活性化することのできる化学結合であることがある。そのような結合としては、以下に限定されないが、アミド結合、エステル結合、カルバメート結合、ウレア結合、またはヒドラゾン結合が挙げられる。R 2 が化学結合である際に、本明細書に開示される機能性部分は、式 R 1 - R 2 - R 3 - R 4 によって表されることあり、式中、R 1 は、病態の微小環境において酸性で活性化することのできる化学結合によって R 3 に連結する。例えば、一部の実施形態では、R 1 - R 2 - R 3 - R 4 の構造は、以下のように表されることがある。

## 【 0 0 8 7 】

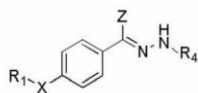


10

## 【 0 0 8 8 】

または

## 【 0 0 8 9 】



20

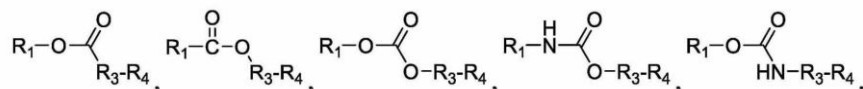
## 【 0 0 9 0 】

式中、XおよびYは、それぞれ独立してNR'またはOであり、Zは、HまたはC<sub>1-10</sub>アルキルであり、好ましくはC<sub>1-4</sub>アルキルであり、R'は、HまたはC<sub>1-4</sub>アルキルであり；R 3 は、R 1 およびR 4 に、XおよびYをそれぞれ介してアミド結合、エステル結合、カルバメート結合、ウレア結合、またはヒドラゾン結合の連結様式で連結する。

## 【 0 0 9 1 】

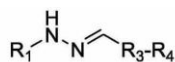
一部の実施形態では、R 1 - R 2 - R 3 - R 4 の構造は、以下のように表されることがある。

## 【 0 0 9 2 】



30

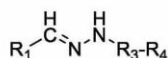
## 【 0 0 9 3 】



## 【 0 0 9 4 】

および

## 【 0 0 9 5 】



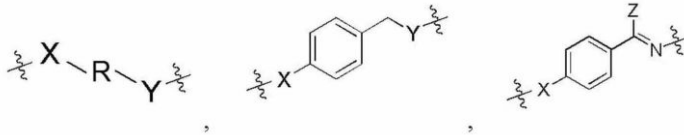
40

## 【 0 0 9 6 】

本開示では、R 3 は、R 2 の切断の後に自動的に脱落してR 4 - S - c y s - R 5 を放出することができる、自動的に切断可能なリンカーアームとしてもよい。例えば、そのようなリンカーアームとしては、以下に限定されないが、

## 【 0 0 9 7 】

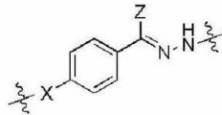
50



【 0 0 9 8 】

および

【 0 0 9 9 】



【 0 1 0 0 】

が挙げられる。式中、XおよびYは、それぞれ独立してNR'またはOであり、Zは、HまたはC<sub>1</sub>-10アルキル、好ましくはC<sub>1</sub>-4アルキルであり；Rは、C<sub>1</sub>-4アルキルであり；and R'は、HまたはC<sub>1</sub>-4アルキルであり；R<sub>4</sub>は、上記式のYまたはNを介して例えばアミド結合、エステル結合、カルバメート結合、ウレア結合、およびヒドラゾン結合などの様式で、R<sub>3</sub>に連結する。一部の実施形態では、R<sub>3</sub>は、-NH-フェニル-CH<sub>2</sub>O-、-NH-フェニル-CH=N-、-NH-フェニル-C(CH<sub>3</sub>)=N-、-O-フェニル-CH=N-、および-O-フェニル-C(CH<sub>3</sub>)=N-からなる群から選択される。

【 0 1 0 1 】

一部の実施形態では、R<sub>3</sub>は、病態の微小環境において酸性で活性化することのできる化学結合である。化学結合は、アミド結合、エステル結合、カルバメート結合、ウレア結合、およびヒドラゾン結合からなる群から選択されることがある。

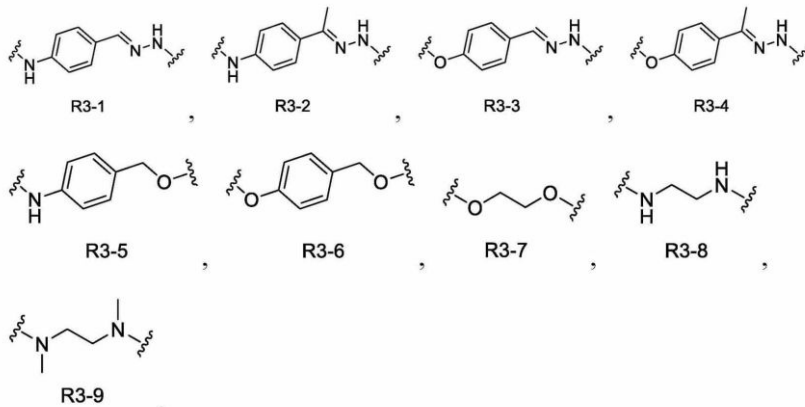
【 0 1 0 2 】

R<sub>3</sub>が酸性で活性化することのできる化学結合である際に、R<sub>1</sub>-R<sub>3</sub>-R<sub>4</sub>-S-cyc-R<sub>5</sub>が酸性により活性化することができるのみとなるように、R<sub>2</sub>は不在であることがある。一方、R<sub>2</sub>が不在である際に、R<sub>3</sub>は、酸性で活性化することのできる化学結合でなければならない。

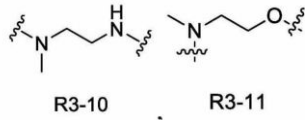
【 0 1 0 3 】

一部の実施形態では、R<sub>3</sub>は、以下の構造のうちのいずれかによって表される。

【 0 1 0 4 】



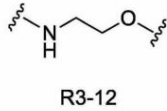
【 0 1 0 5 】



【 0 1 0 6 】

および

【 0 1 0 7 】



10

【 0 1 0 8 】

上記の式 R 3 - 1 から R 3 - 1 2 では、R 2 または R 2 が不在であれば R 1 は、アミド結合、エステル結合、カルバメート結合、ウレア結合、およびヒドラゾン結合を形成する限り、上式のどちらかの端に連結することがある。

【 0 1 0 9 】

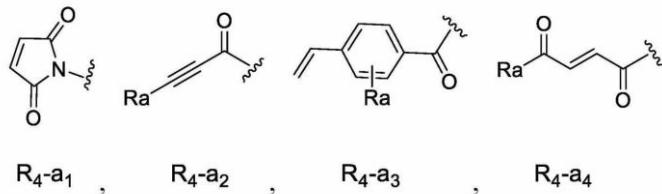
本開示では、R 4 は、R 2 および R 3 の切断後に、生体分子の持つ抗原、リガンド、または受容体へのその結合能を回復、維持、低減、または促進することのできる結合基である。一部の実施形態では、結果として得られた R 4 - s - C y s - R 5 は、R 2 および R 3 の切断後に、本来の R 5 の持つその抗原、リガンド、または受容体への親和性の > 6 0 % を呈する。

20

【 0 1 1 0 】

適した R 4 は、- R 4 - a - R 4 - b - R 4 - c - によって表されることがあり、R 4 - a は、

【 0 1 1 1 】

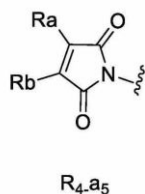


30

【 0 1 1 2 】

および

【 0 1 1 3 】



40

【 0 1 1 4 】

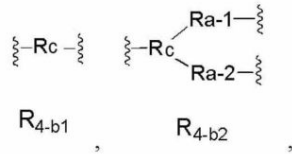
からなる群から選択され、式中、R a および R b は、それぞれ独立して、H および C<sub>1</sub> - 6 アルキルまたは C<sub>1</sub> - 6 アルコキシルからなる群から選択され；

【 0 1 1 5 】

R 4 - b は、

50

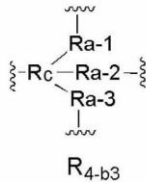
【 0 1 1 6 】



【 0 1 1 7 】

および

【 0 1 1 8 】



10

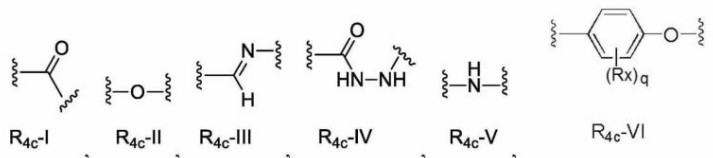
【 0 1 1 9 】

からなる群から選択され、式中、式 R 4 - b 1 では、R c は、不在であるか、または C 1 - 1 2 アルキル、C 1 - 1 2 アルコキシ - C 1 - 1 2 アルキル、C 1 - 1 2 アルキル - C 3 - 8 シクロアルキル、( C 1 - 4 アルキル - O ) p - C 1 - 1 2 アルキル、C 1 - 1 2 アルキルカルボニルアミノ - ( C 1 - 4 アルキル - O ) p - C 1 - 1 2 アルキル、フェニル - C 1 - 1 2 アルキル、C 3 - 8 シクロアルキル、C 1 - 1 2 アルキル - C 3 - 8 シクロアルキル - C 1 - 1 2 アルキル、および C 1 - 1 2 アルキル - フェニル - C 1 - 1 2 アルキルからなる群から選択され；式 R 4 - b 2 では、R c は、アミノ基の N 原子で置換された R a - 1 および R a - 2 を有する C 1 - 1 2 アルキルアミノであり、式 4 - b 3 では、R c は、R a - 1、R a - 2、および R 2 - 3 により置換されているアルキルの終端に最後の C 原子を有する C 1 - 1 2 アルキルであり、式中、R a - 1、R a - 2、および R a - 3 は、それぞれ独立して、C 1 - 1 2 アルキル、C 1 - 1 2 アルキル - OH、および C 1 - 1 2 アルキル - N R ' ' R ' ' からなる群から選択され、式中、R ' ' および R ' ' ' は、それぞれ独立して、H および C 3 0 1 2 アルキルからなる群から選択され；式 R 4 - b 2 および R 4 - b 3 では、R 4 - b は、R a - 1、R a - 2、および R a - 3 のうち少なくとも一つを介して R 4 - c に連結し；

【 0 1 2 0 】

R 4 - c は、

【 0 1 2 1 】

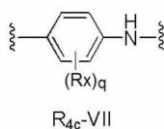


40

【 0 1 2 2 】

および

【 0 1 2 3 】



50

## 【 0 1 2 4 】

からなる群から選択され、式中、 $R_x$ は、H、ハロ、および $C_{1-4}$ アルキルからなる群から選択され； $p$ は、1から10の範囲の整数、例えば1から5の整数などであり； $q$ は、1から4の整数、例えば1から2の整数などであり；但し、 $R_{4-a}$ が式 $R_{4-a2}$ 、 $R_{4-a3}$ 、および $R_{4-a4}$ からなる群から選択されるとき、 $R_{4-c}$ が不在であり；

## 【 0 1 2 5 】

上式で、 $R_3$ は、 $R_4$ に $R_4$ の $R_{4-c}$ を介して連結し、 $R_{4-a}$ の各式に示された波線は、 $R_{4-a}$ が $R_{4-b}$ に連結する位置を標示する。好ましくは、式 $R_{4c-III}$ 、 $R_{4c-IV}$ 、 $R_{4c-VI}$ 、および $R_{4c-VII}$ では、 $R_3$ は、これらの基の炭素原子に連結する。

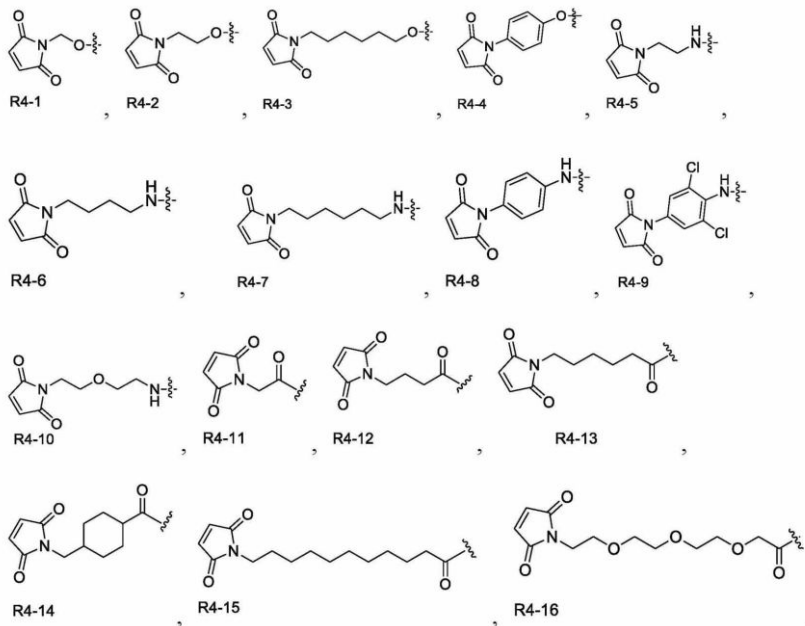
## 【 0 1 2 6 】

概して、 $R_4$ は、マレイミド ( $R_{4-a1}$ )、アセチレン ( $R_{4-a2}$ )、ビニル ( $R_{4-a3}$ )、一置換ブテン二酸 ( $R_{4-a4}$ )、または二置換マレイミド ( $R_{4-a4}$ ) を介して、 $R_5$ のシステインのS原子に連結する。

## 【 0 1 2 7 】

一部の実施形態では、 $R_4$ は、

## 【 0 1 2 8 】



## 【 0 1 2 9 】

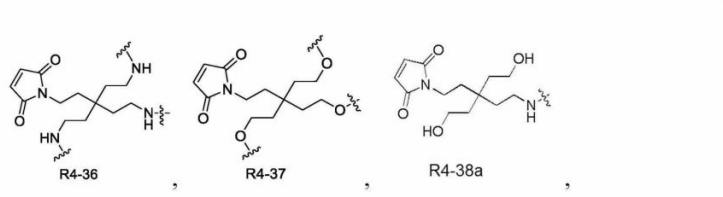
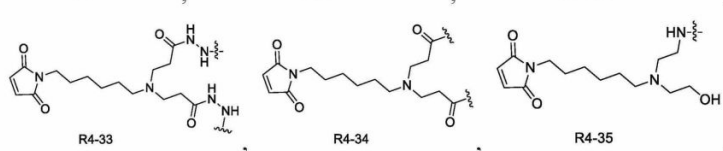
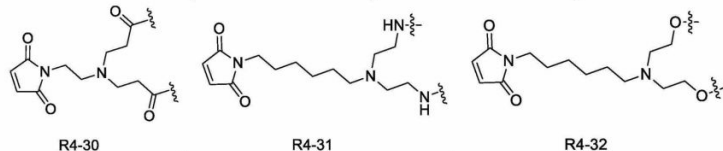
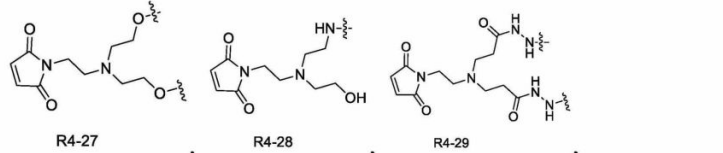
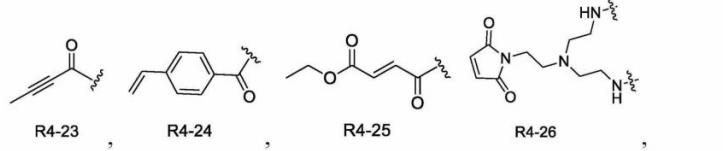
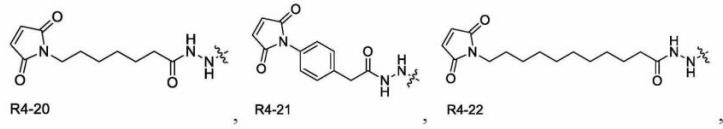
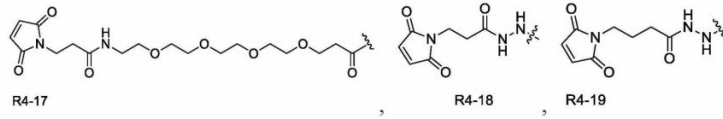
10

20

30

40

50



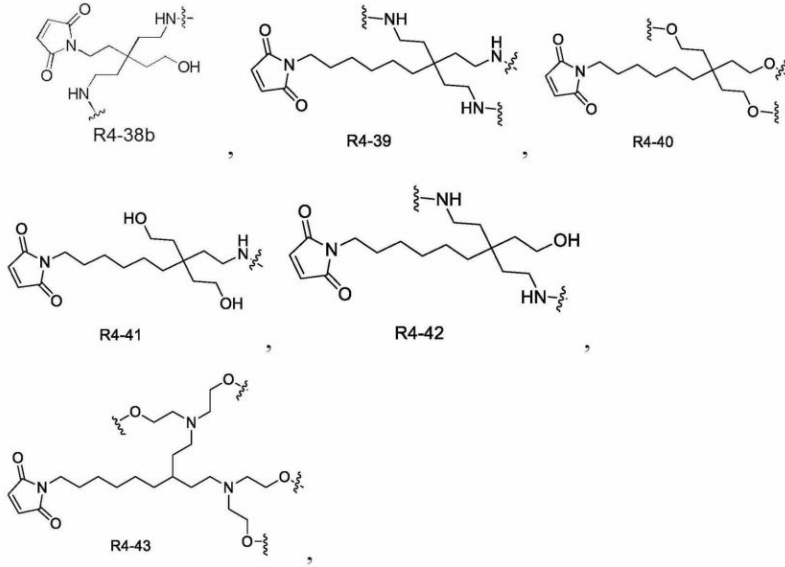
10

20

30

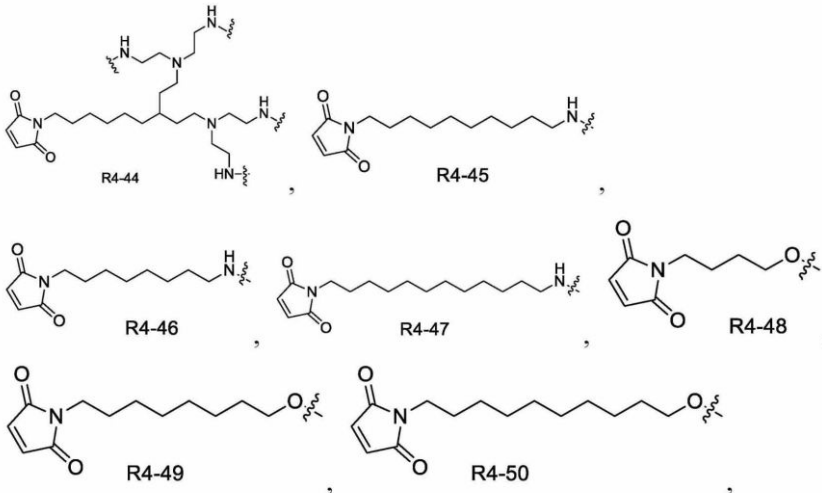
40

50



10

【 0 1 3 0 】

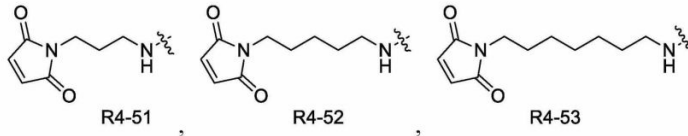


20

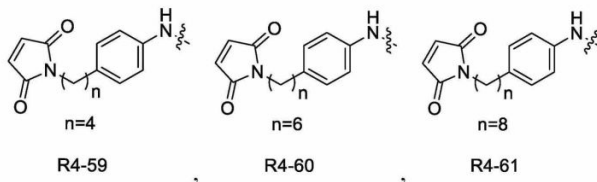
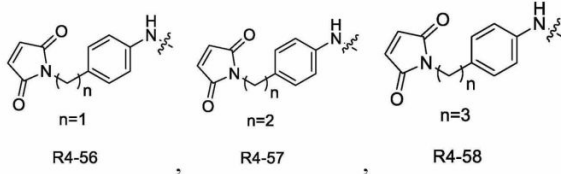
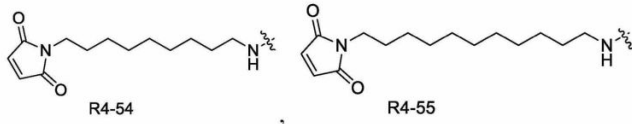
30

40

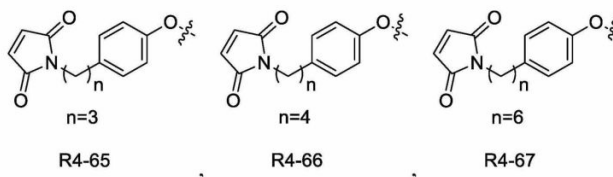
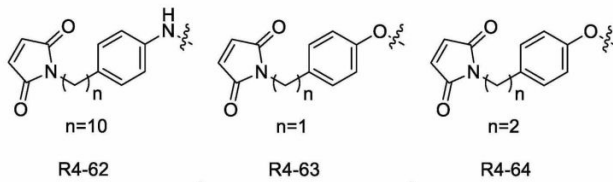
50



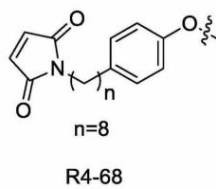
10



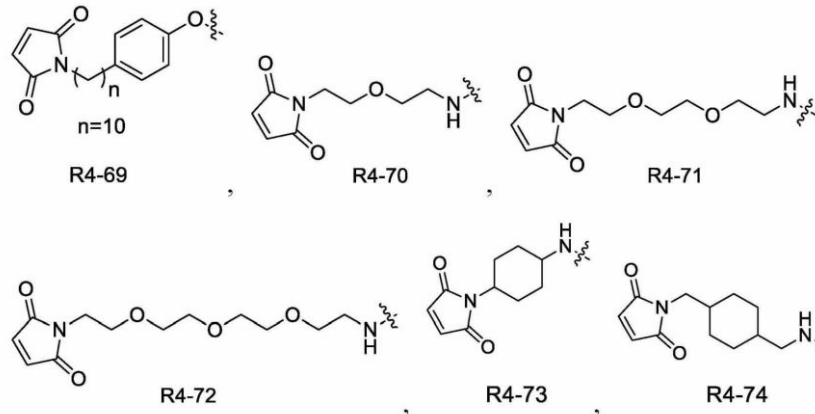
20



30

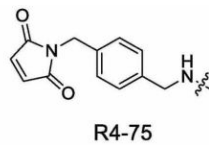


40



10

【 0 1 3 2 】

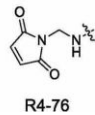


20

【 0 1 3 3 】

および

【 0 1 3 4 】



【 0 1 3 5 】

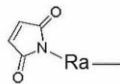
からなる群から選択され、式中、波線は、R 3 に連結している R 4 の位置を標示する。

30

【 0 1 3 6 】

一部の実施形態では、R 4 は

【 0 1 3 7 】



【 0 1 3 8 】

によって表され、式中、

40

R a は、C<sub>1</sub>-12 アルキル、C<sub>1</sub>-12 アルコキシ、C<sub>1</sub>-12 アルキルカルボニル、任意選択的に1つまたは2つのハロゲンによって置換されたフェノキシまたはフェニルアミノ、C<sub>1</sub>-12 アルキルアミノ、C<sub>1</sub>-12 アルコキシ-C<sub>1</sub>-12 アルキルアミノ、C<sub>1</sub>-12 アルキルカルボニルオキシ、C<sub>1</sub>-12 アルキル-C<sub>3</sub>-8 シクロアルキルカルボニルオキシ、(C<sub>1</sub>-4 アルキル-O)<sub>p</sub>-C<sub>1</sub>-12 アルキルカルボニルオキシ、C<sub>1</sub>-12 アルキルカルボニルアミノ-(C<sub>1</sub>-4 アルキル-O)<sub>p</sub>-C<sub>1</sub>-12 アルキルカルボニルオキシ、C<sub>1</sub>-12 アルキルカルボニルアミノ、およびフェニル-C<sub>1</sub>-12 アルキルカルボニルアミノからなる群から選択され；

p は、1 から 10 の範囲の整数、例えば 1 から 5 の範囲の整数などであり；

R 3 は、R 4 の R a を介して R 4 に、および R 4 のマレイミド基を介して R 5 のチオー

50

ル基に連結され、

【0139】

本開示のコンジュゲートでは、R4は、R5に含有されるシステインのSを介して共有結合的にR5に連結する。R1-R2は、タンパク質分解酵素によって、または病態の微小環境の酸性条件下で、R3-R4-S-cys-R5から切断され、R3-R4-S-cys-R5が放出される。次いで、R3は、自動的に脱落し、R4-S-cys-R5が放出される。R4-S-cys-R5は、R5の持つそのリガンドまたは受容体への結合能を回復または促進することができる。

【0140】

本開示では、標示された各式に使用される波線（複数可）は、波線（複数可）を含有する基と他の基との連結位置を標示し、抗体のアミノ酸残基について記述されたアミノ酸の位置番号の全ては、カバット付番規則に基づくことを理解するべきである。

【0141】

R5は、上に記載されるように、1つまたは複数のアミノ酸残基がシステインに変異された生体分子を表す。R5は、実際には、導入されたシステインのチオール基の水素原子を含まない、生体分子の部分である。チオール基の水素原子が不在であることにより、R5を、本開示のR4に連結するための基と捉えることが可能になる。

【0142】

本開示のコンジュゲートは、DTT、TCEP、または他の還元剤によって変異体生体分子を還元すること；Cu<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、デヒドロアスコルビン酸、または他の酸化剤によって酸化すること；および次いで、酸化された生体分子（R5）を液相または固相の条件下でR1-R2-R3-R4にコンジュゲートすることを含む方法によって調製されてもよい。最終生成物は、液相に収集されてもよい。

【0143】

そのため、コンジュゲートに加えて、本開示はまた、機能性部分、すなわち、R1-R2-R3-R4；R2-R3-R4；R3-R4-S-cys-R5；R4-S-cys-R5；および変異型生体分子を含み；式中、R1、R2、R3、R3、R5、およびそれらの連結様式、および変異型生体分子は、本開示の任意の部分または任意の実施形態にあるように定義される。一部の実施形態では、機能的部分は、S1-S64によって示される。本開示では、-S-cys-はR4が変異によりR5に導入されたシステインのチオール基を介して共有結合的にR5に連結することを標示する。R3-R4-S-cys-R5は、タンパク質分解酵素によるかまたは病態の微小環境の酸性条件下で、R1-R2の切断によって作製されるコンジュゲートである。概して、R2からのR3の分離の後、以前にR2に連結されていたR3の基は、ヒドロキシ基（-OH）またはアミノ基（-NH<sub>2</sub>）を形成する。R4-S-cys-R5は、R3の自動的な脱落の後に形成されたコンジュゲートである。概して、R3の自動的な脱落の後に、以前にR3に連結されていたR4基は、ヒドロキシ基（-OH）またはアミノ基（-NH<sub>2</sub>）を形成する。

【0144】

本明細書に記載されるようなコンジュゲート、機能性部分、R2-R3-R4、R3-R4-S-cys-R5、およびR4-S-cys-R5は、当技術分野に公知の方法によって合成されてもよい。例えば、それらは、本願の実施例1に記載された方法に従って調製されてもよい。

【0145】

本開示はまた、本明細書に記載されるようなコンジュゲートを含む医薬組成物を含む。この医薬組成物はさらに、医薬的に許容可能な担体を含むことがある。担体は、任意の医薬的に許容可能な担体または賦形剤としてよく、それらは剤形および投与方法に従って変わることがある。医薬的に許容可能な担体は、一般的に安全で非毒性であり、製薬産業で医薬組成物を製剤化する際に使用される任意の公知の物質を含むことがあり、そのようなものとしては、フィラー、希釈剤、凝固剤、接着剤、滑沢剤、流動化剤、安定剤、着色料、湿潤剤、崩壊剤などが挙げられる。適した医薬的に許容可能な担体としては、糖類、例

10

20

30

40

50

例えば、ラクトースまたはスクロース、マンニトールまたはソルビトールなど；セルロース製剤および/もしくはリン酸カルシウム、例えば、リン酸三カルシウムもしくはリン酸水素カルシウムなど；トウモロコシデンプン、コムギデンプン、コメデンプン、ジャガイモデンプンを含むデンプン、ゼラチン、トラガカントゴム、メチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウム、および/もしくはポリビニルピロリドン；シリカ、タルク、ステアリン酸もしくはその塩、例えば、ステアリン酸マグネシウムもしくはステアリン酸カルシウムなど；ならびに/またはポリエチレングリコールなどが挙げられる。医薬的に許容可能な担体を選択する際に、主な考慮されることは医薬組成物の投与方法である。これは当技術分野に周知である。

#### 【0146】

医薬組成物は、治療有効量または予防有効量のコンジュゲートを含むことがある。「有効量」は、成分の量が所望の反応を生じるには十分であることを示す。具体的な有効量は、様々な要因に依存するものとなり、そのような要因としては、治療される具体的な疾患、患者の身体的状態、例えば、体重、年齢、および性別など、治療の持続期間、併せて投与されている療法（もしあれば）、および使用された具体的な製剤が挙げられる。一般に、本明細書に記載される「有効量」とは、従来 of 生体分子の量である。しかし、一部の実施形態では、本医薬組成物に含有されるコンジュゲートの治療有効量または予防有効量は、従来 of 生体分子の量よりも低い可能性があるが、より良好な治療効果または予防効果を生じる可能性があり、それはなぜなら、生体分子が、病態の微小環境へ達する前にそのリガンドまたは受容体へ結合することのないように、保護基によって保護されているためである。

#### 【0147】

本開示の医薬組成物は、様々な適した剤形に製剤化されてもよく、そのようなものとしては、以下に限定されないが、錠剤、カプセル、注射剤などが挙げられ、期待される目的を達成するための任意の適した経路を介して投与することができる。例えば、それは、非経口的に、皮下に、静脈内に、筋肉に、腹腔内に、経皮的に、経口的に、髄腔内に、頭蓋内に、経鼻的に、または外部に投与することができる。薬剤の用量は、患者の年齢、健康状態、および体重、並行して行われる治療、および治療の頻度などに依存することがある。本開示の医薬組成物は、それを必要とする任意の対象、例えば哺乳動物、特にヒトに投与されることがある。

#### 【0148】

腫瘍患者では、腫瘍細胞または腫瘍抗原を担持する抗原提示細胞（APC）は、宿主によるT細胞の結合を介した腫瘍の免疫学的な殺傷を、部分的にまたは全体的に阻害する。しかし、本開示のコンジュゲートは、タンパク質分解酵素、特にレグマインまたはグランザイムによって、または病態の微小環境の酸性条件下で、活性化されて放出される。例えば、生体分子がIL2である本開示のコンジュゲートは、抗CD28抗体または抗PD-1抗体などは、T細胞の増殖を選択的に刺激するか、または抗腫瘍サイトカインを分泌するためのその機能を増強することができる。そのため、本開示のコンジュゲートは、個体の免疫関門を有効に突破し、病態の微小環境に達し、次いで、病態の微小環境で活性化されて放出されることが可能である。結果として、それは、腫瘍または炎症の微小環境において、選択的にT細胞の増殖または殺傷作用などを促進し、それによって低い自己免疫と高い有効性を実現する。

#### 【0149】

そのため、本開示に開示されるコンジュゲート、R4-S-cys-R5、または変異型生体分子のそれぞれは、腫瘍または炎症を治療するために使用されることがあり、腫瘍または炎症を治療するための医薬を調製するための活性成分として使用することができる。本明細書に記載される腫瘍または炎症は、本明細書に記載されるような生体分子によって治療されることが公知である任意の腫瘍または炎症とすることができ、そのようなものとしては、以下に限定されないが、膀胱、脳、乳房、子宮頸部、結腸・直腸、食道、腎臓、肝臓、肺、上咽頭、膵臓、前立腺、皮膚、胃、子宮、卵巣、精巣、および血液などにお

10

20

30

40

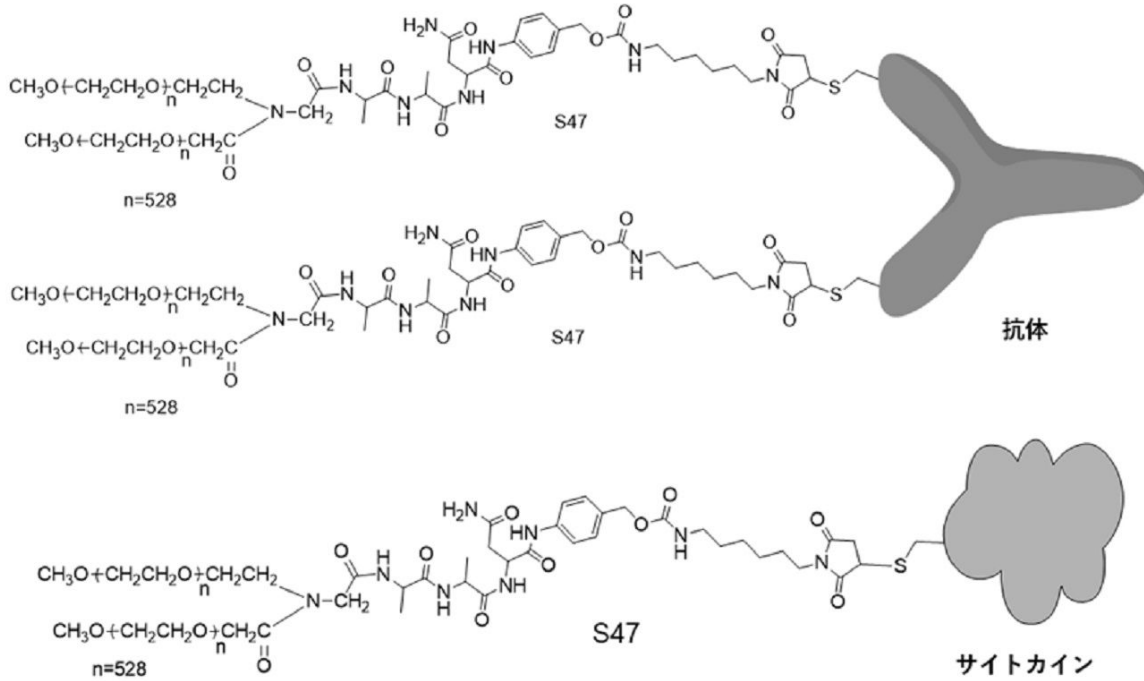
50

けるがんが挙げられる。特に、上記がんとしては、膀胱がん、脳がん、乳房がん、子宮頸がん、結腸直腸がん、食道がん、腎がん、肝臓がん、肺がん、上咽頭がん、膵がん、前立腺がん、皮膚がん、胃がん、子宮がん、卵巣がん、精巣がん、および血液がんが挙げられる。

【 0 1 5 0 】

さらに含まれるのは、腫瘍または炎症を治療または予防するための方法であって、治療有効量または予防有効量の本明細書に記載されるコンジュゲートまたはその医薬組成物を、それを必要とする対象に投与することを含む方法である。この方法は、任意の公知の放射線療法または免疫療法との併用で使用されることがある。

本開示の生体分子のコンジュゲートは、以下の構造：



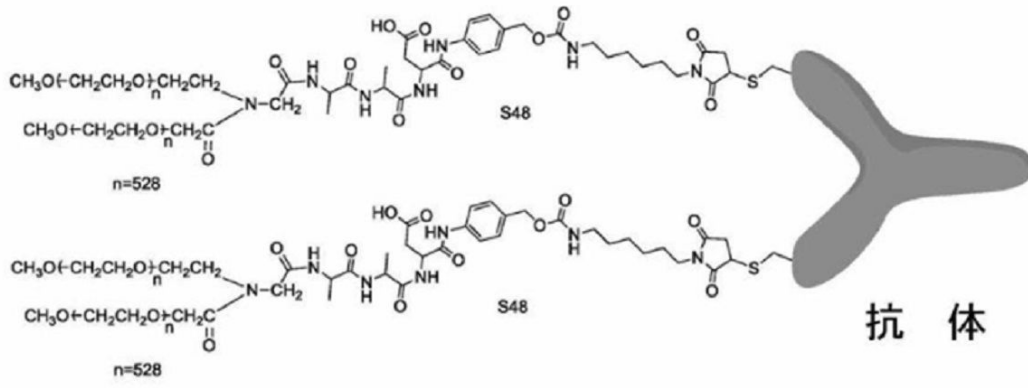
10

20

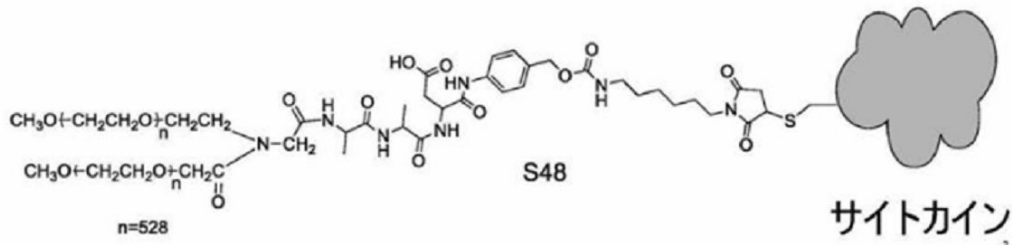
30

40

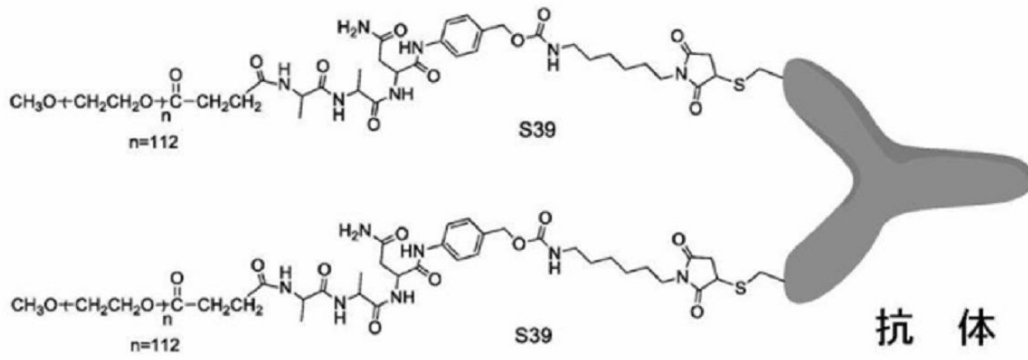
50



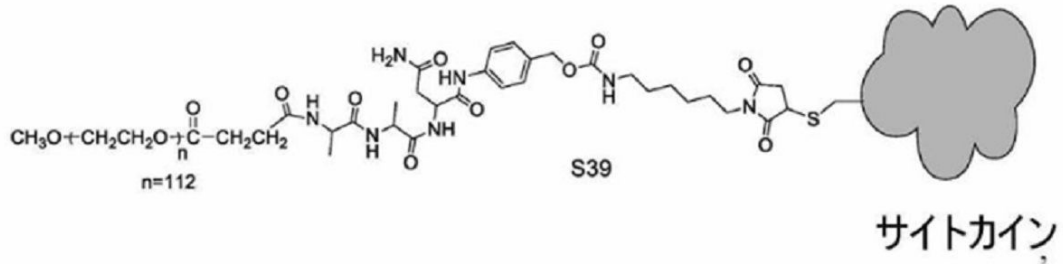
10



20

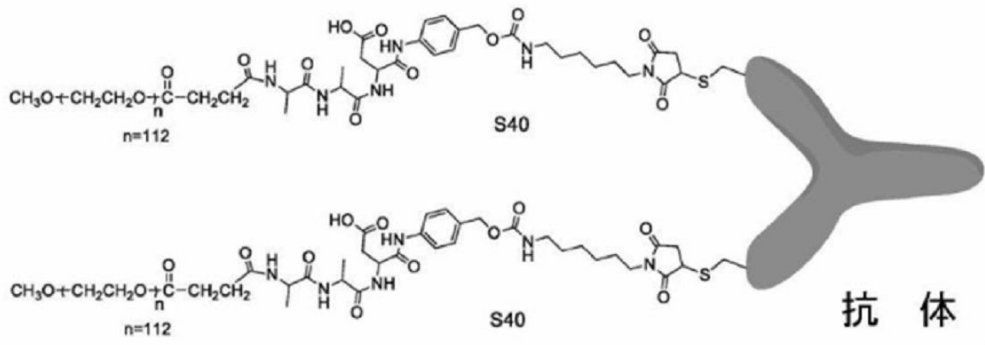


30

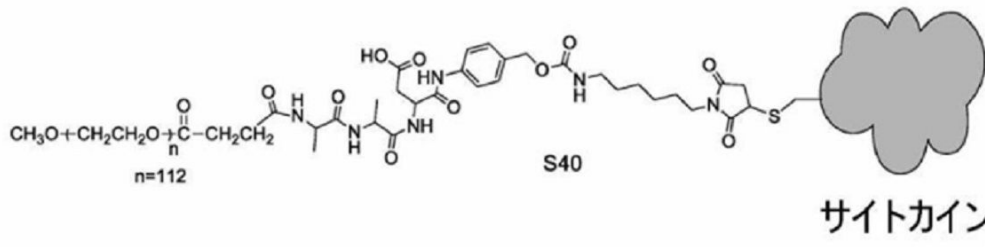


40

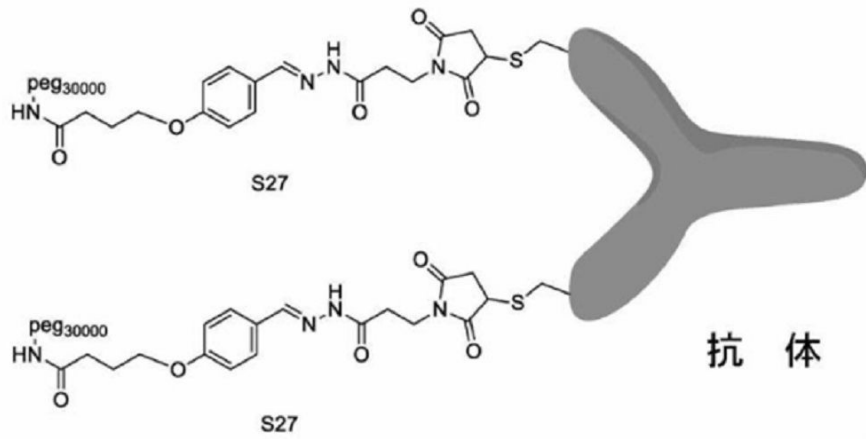
50



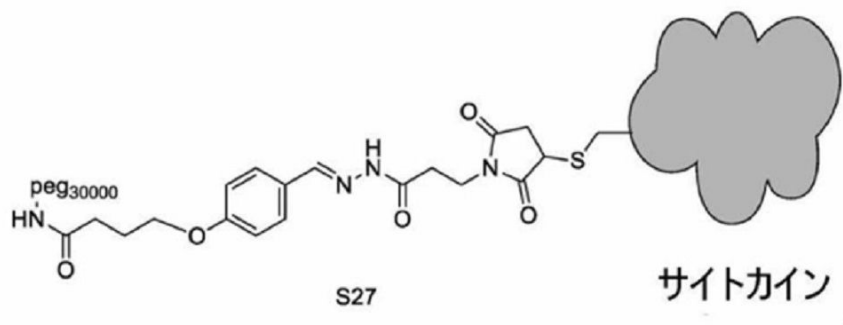
10



20

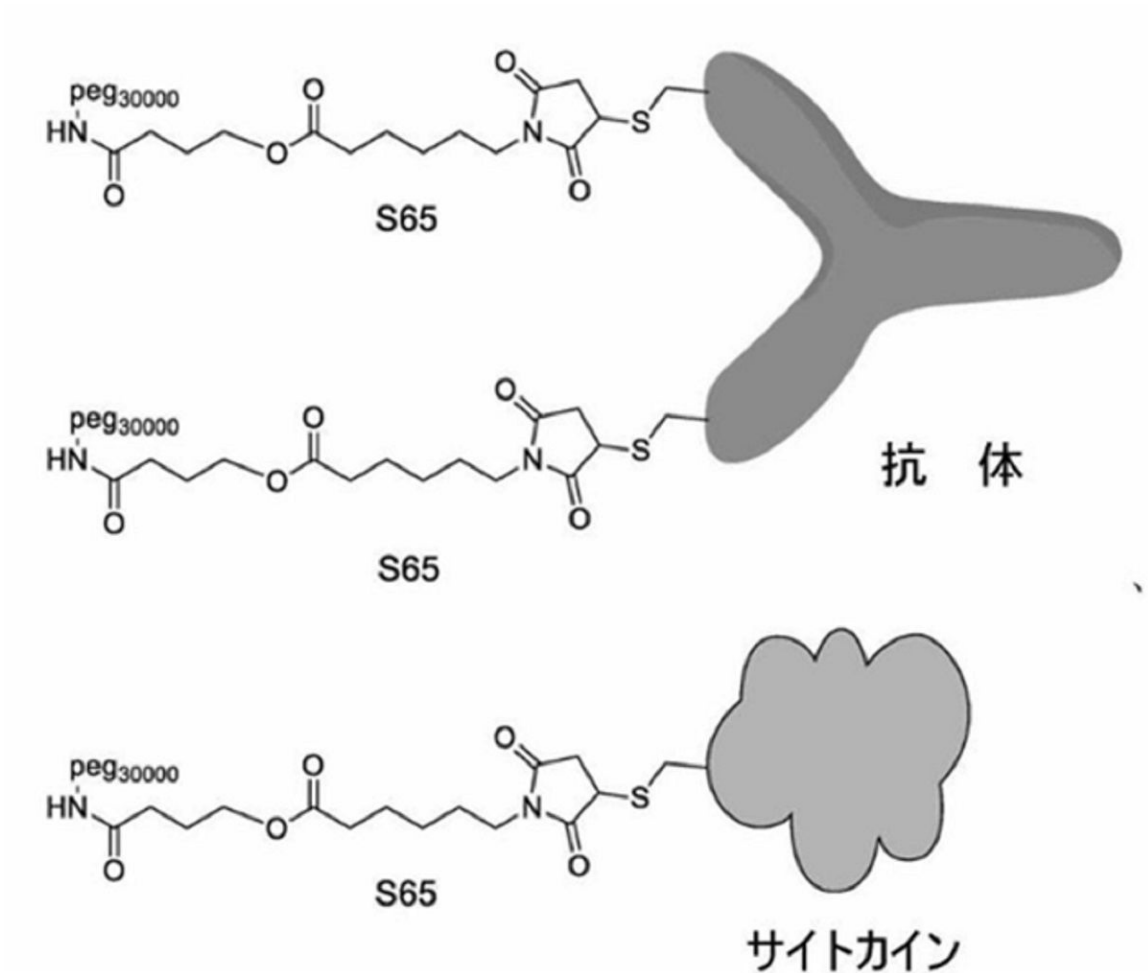


30



40

50

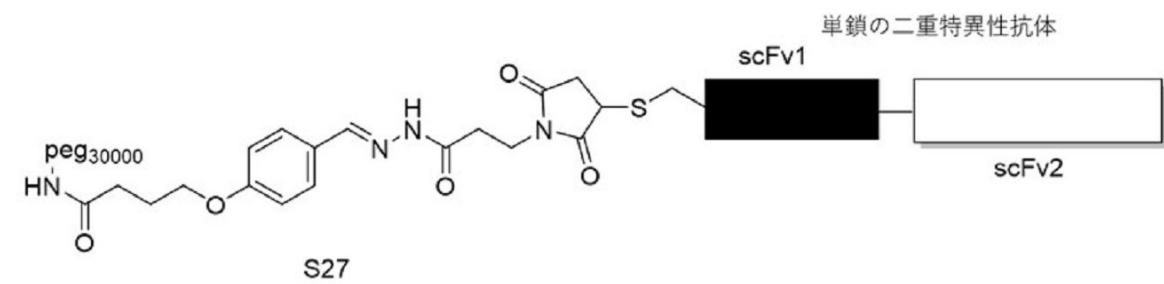


10

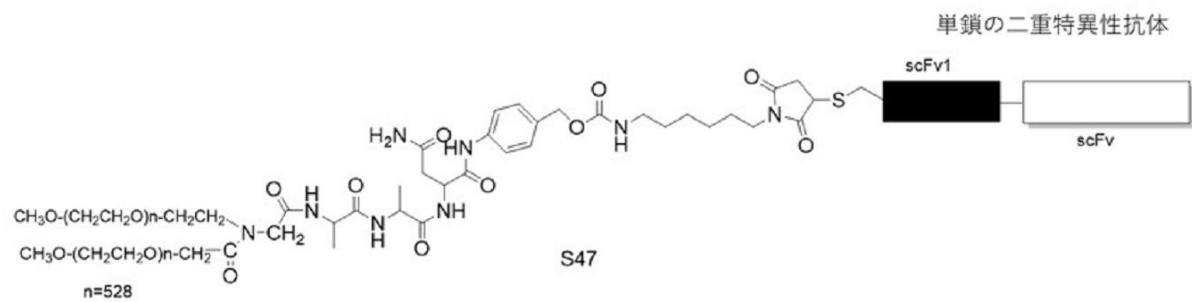
20

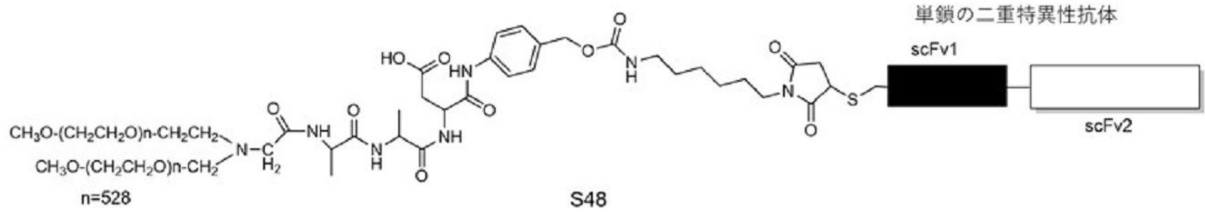
30

40

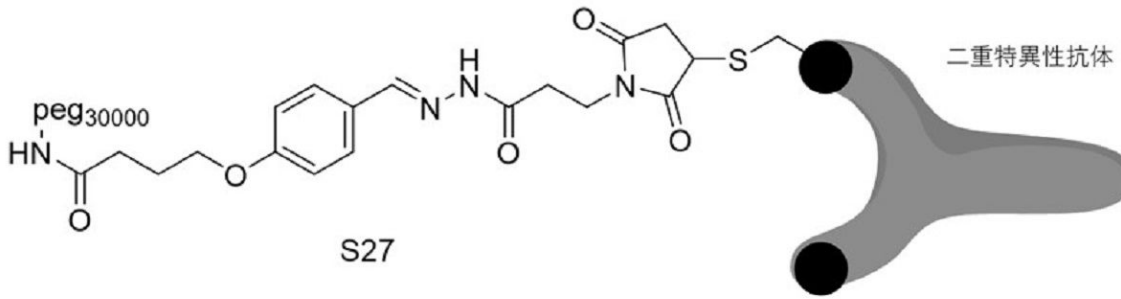


50

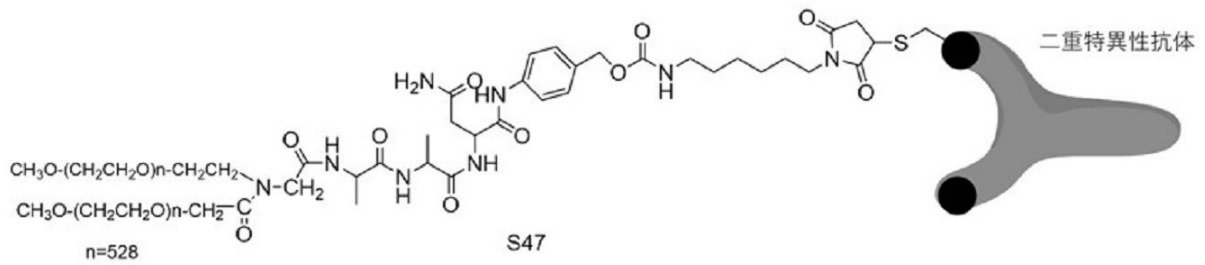




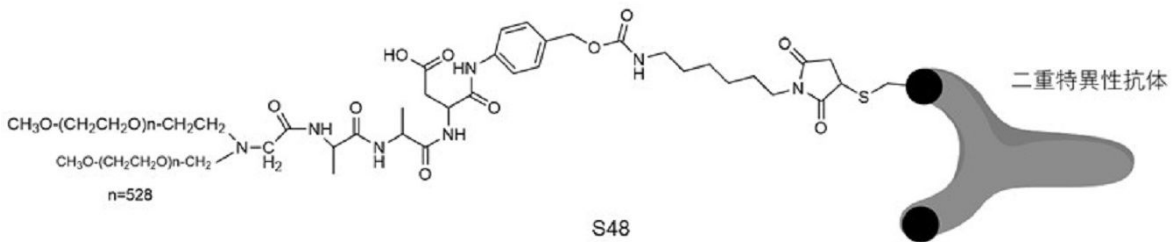
10



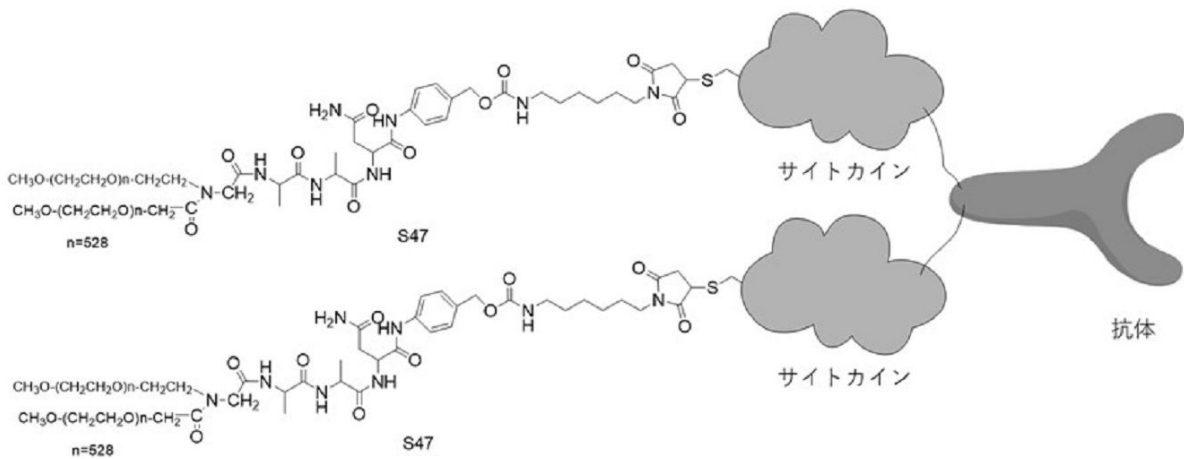
20



30



40



50

のいずれかによって表され、式中、サイトカインおよび抗体は、配列番号 1 ~ 83 のいずれかからなる群から選択される、生体分子のコンジュゲートであってもよい。

【0151】

本開示に使用される用語「含むこと (comprising)」および「含むこと (including)」または同様の発現は、「からなること (consisting of)」なども意味することが理解されるべきである。全ての重量パーセンテージまたは体積パーセンテージの和は、100%に等しいものとすべきである。別段に特定の無い限り、実施例に使用される様々な試薬および製品は商用製品である。別段に特定の無い限り、実施例に述べられる方法は、従来手法に従って実施された。以下の例は、本開示の範囲を限定することを意図されていない。

10

【0152】

配列の情報を下記にまとめる。

【0153】

20

30

40

50

配列情報	説明	配列情報	説明
1	抗 PD-1 抗体の重鎖	45	変異を含むインターロイキン 2
2	抗 PD-1 抗体の軽鎖	46	変異を含むインターロイキン 2
3	抗 PD-1 抗体の重鎖	47	変異を含むインターロイキン 2
4	抗 PD-1 抗体の軽鎖	48	変異を含むインターロイキン 2
5	抗 CTLA-4 抗体の重鎖	49	変異を含むインターロイキン 2
6	抗 CTLA-4 抗体の軽鎖	50	変異を含むインターロイキン 2
7	抗 TNF $\alpha$ 抗体の重鎖	51	変異を含むインターロイキン 2
8	抗 TNF $\alpha$ 抗体の軽鎖	52	変異を含むインターロイキン 2
9	抗 CD28 抗体の重鎖	53	変異を含むインターロイキン 2
10	抗 CD28 抗体の軽鎖	54	変異を含むインターロイキン 10
11	野生型 IL2 のアミノ酸配列	55	変異を含むインターロイキン 10
12	野生型 IL2 のアミノ酸配列	56	変異を含むインターロイキン 10
13	イビリムマブ重鎖	57	変異を含むインターロイキン 10
14	イビリムマブ軽鎖	58	変異を含むインターロイキン 10
15	ペムプロリズマブ重鎖	59	変異を含むインターロイキン 10
16	ペムプロリズマブ軽鎖	60	抗ヒト VEGF 抗体重鎖
17	ニボルマブ重鎖	61	抗ヒト VEGF 抗体軽鎖
18	ニボルマブ軽鎖	62	抗ヒト CD20 抗体重鎖
19	抗ヒト PD-1 抗体 (WO2017/124050A1) 重鎖	63	抗ヒト CD20 抗体軽鎖
20	抗ヒト PD-1 抗体 (WO2017/124050A1) 軽鎖	64	アテゾリズマブの VH
21	抗マウス PD-1 抗体 J43v2 重鎖	65	アテゾリズマブの VL
22	抗マウス PD-1 抗体 J43v2 軽鎖	66	変異を含むセツキシマブの VH
23	抗マウス CTLA-49D9 抗体重鎖	67	変異を含むセツキシマブの VL
24	抗マウス CTLA-49D9 抗体軽鎖	68	変異を含むラムシルマブの VH
25	抗ヒト 4-1BB 抗体重鎖	69	変異を含むラムシルマブの VL
26	抗ヒト 4-1BB 抗体軽鎖	70	変異を含む抗 Her2 抗体の scFv と CD3 との融合タンパク質
27	トラスツマブ重鎖	71	変異を含む抗 Her2 抗体の VH
28	トラスツマブ軽鎖	72	変異を含む抗 Her2 抗体の VL
29	アダリムマブ重鎖	73	抗 Her2 抗体 scFv と抗 CD3 抗体 scFv との融合タンパク質
30	アダリムマブ軽鎖	74	抗 Her2 抗体 scFv と抗 CD3 抗体 scFv との融合タンパク質
31	アテゾリズマブ重鎖	75	抗 CD3 抗体
32	アテゾリズマブ軽鎖	76	セツキシマブの VH
33	抗ヒト CD28 抗体重鎖	77	セツキシマブの VL
34	抗ヒト CD28 抗体軽鎖	78	ラムシルマブの VH

10

20

30

40

50

35	Ipi-se008 軽鎖	79	ラムシルマブの VL
36	Ipi-se010 軽鎖	80	抗 Her2 抗体の VH
37	Ipi-se009 軽鎖	81	Her2 抗体の VL
38	Pem-se010 軽鎖	82	変異を含む抗 Her2 抗体 scFv と抗 CD3 抗体 scFv との融合タンパク質
39	Pem-se009 軽鎖	83	変異を含む抗 Her2 抗体 scFv と抗 CD3 抗体 scFv との融合タンパク質
40	Pem-se007 軽鎖	84	R2 の配列
41	Niv-se001 重鎖可変ドメイン	85	R2 の配列
42	Niv-se005 軽鎖	86	R2 の配列
43	Niv-se007 軽鎖	87	フォワードプライマー
44	変異を含むインターロイキン 2	88	リバースプライマー

10

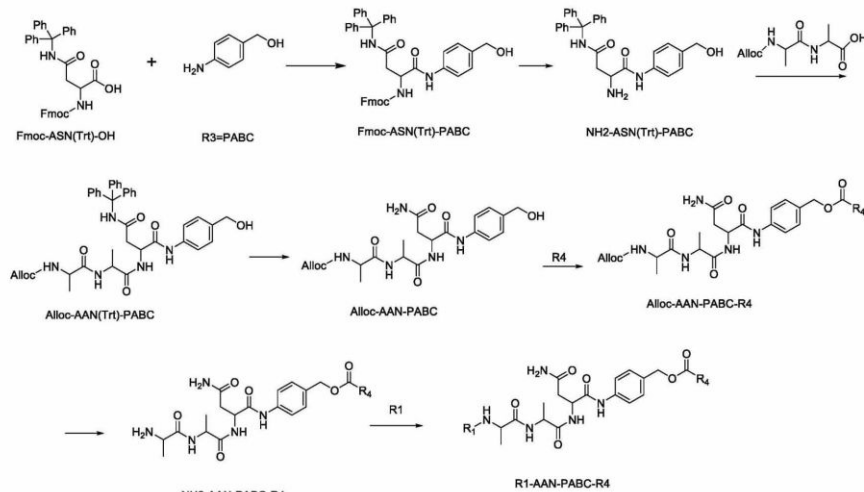
## 【 0 1 5 4 】

実施例 1 : 活性化可能な結合アームの化学構造の合成

R 2 がアミノ酸配列 A 1 a - A 1 a - A s n を有し、R 3 が P A B C ( R 3 - 5 ) である際の、合成スキームを下記に示す。

20

## 【 0 1 5 5 】



30

## 【 0 1 5 6 】

R 1 および R 4 が異なる置換基である際に、表 1 に示される以下の化合物を得た。

## 【 0 1 5 7 】

40

50

【表 1】

表 1

R1	R4	化合物
 R1-1	 R4-5	 S1
 R1-2	 R4-5	 S1
 R1-2	 R4-13	 S1
 R1-2	 R4-7	 S1
 R1-3	 R4-7	 S11
 R1-4	 R4-7	 S13
 R1-5	 R4-7	 S15
 R1-6	 R4-7	 S17
 R1-7	 R4-7	 S25
 R1-18	 R4-5	 S29
 R1-19	 R4-5	 S31

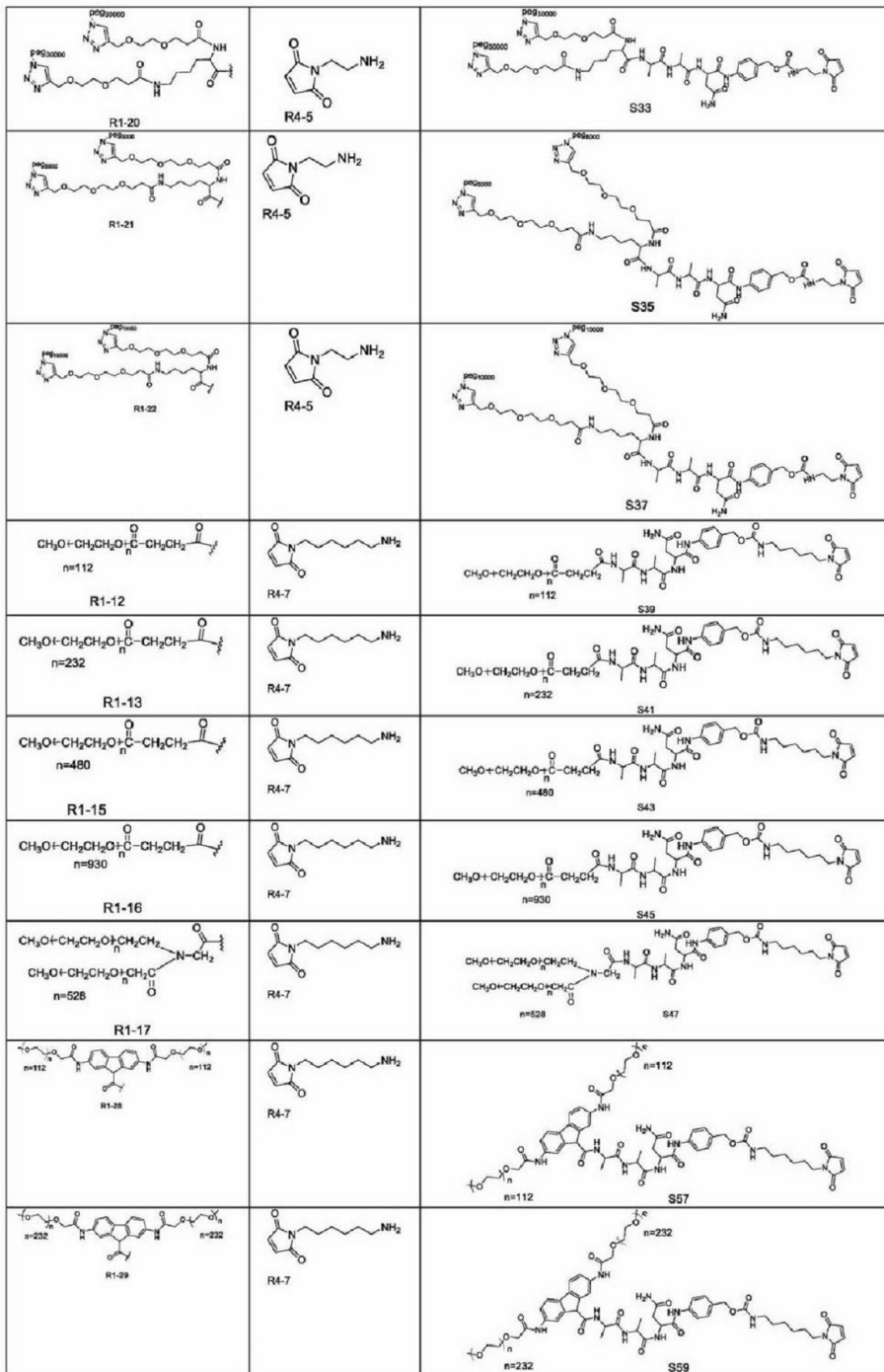
10

20

30

40

50



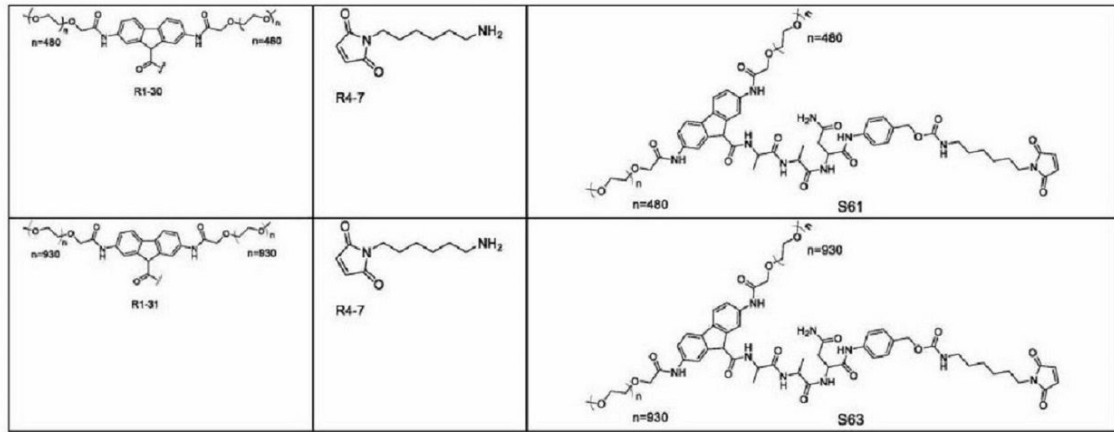
10

20

30

40

50

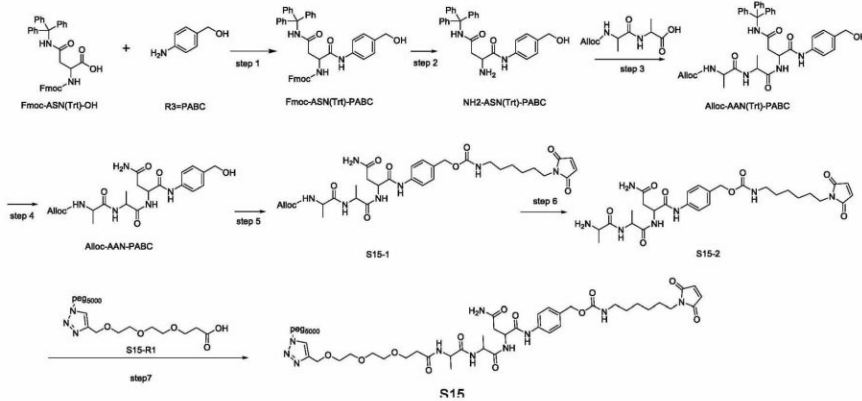


10

【 0 1 5 8 】

S 1 5 により例示される際の、具体的な合成プロセスを下記に示した。

【 0 1 5 9 】



20

30

【 0 1 6 0 】

1) Fmoc-Asn(Trt)-OH (20 g, 0.03 mol)、2-(7-アザベンゾトリアゾール)-N,N,N',N'-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスフェート(HATU) (15 g, 0.04 mol)、およびDMF (200 mL)を、三口フラスコに添加し、30分間攪拌した。p-アミノベンジルアルコール (4.1 g, 0.03 mol) およびN,N-ジイソプロピルエチルアミン (8.7 g, 0.06 mol) を0 でそれぞれ添加し、次いで、室温で3時間攪拌した。DMFの殆どを回転蒸発により除去した。残渣を酢酸酢酸 (200 mL) に溶解し、飽和塩化アンモニウム溶液と次いで飽和塩化ナトリウム溶液とを用いて洗浄し、無水硫酸ナトリウムにて乾燥した後、濾過した。溶媒を蒸発により除去した。粗生成物を叩いて、白色の固体のFmoc-Asn(Trt)-PABC (21.3 g; 収率: 90%) を得た。

40

【 0 1 6 1 】

2) Fmoc-Asn(Trt)-PABC (16.0 g, 22 mmol) をN,N-ジメチルホルムアミド (80 mL) に溶解した。ピペリジン (30 mL) を添加し、次いで、室温で2時間攪拌した。溶媒を減圧下で蒸発により除去した。残基を真空オープンにて高真空下でさらに乾燥させて少量のピペリジンを除去し、9.8 gの淡黄色の固体のNH<sub>2</sub>-Asn(Trt)-PABCを生じ、これは精製せずに次の工程に使用することができた。

【 0 1 6 2 】

3) Alloc-Ala-Ala-OH (5.0 g, 20.4 mmol)、ベンゾトリ

50

アゾール - N, N, N', N' - テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスフェート (HBTU) (11.6 g, 30.6 mmol)、および DMF (50 mL) を、三口フラスコに添加し、氷浴中で 30 分間攪拌した。NH<sub>2</sub> - Asn(Trt) - PABC (9.8 g, 20.4 mmol) および N, N - ジイソプロピルエチルアミン (7.89 g, 61.2 mmol) を 0 でそれぞれ添加し、次いで、室温で一晩攪拌した。溶媒を減圧下で蒸発により除去した。残渣を酢酸酢酸 (200 mL) に溶解し、飽和塩化アンモニウム溶液と次いで飽和塩化ナトリウム溶液とを用いて洗浄し、無水硫酸ナトリウムにて乾燥した後、濾過した。溶媒を蒸発により除去した。結果として得られた粗生成物を再結晶化に供し、白色の固体の All oc - AAN(Trt) - PABC (13.0 g; 収率: 90%) を得た。

10

## 【0163】

4) All oc - AAN(Trt) - PABC (10.0 g, 14.2 mmol) をジクロロメタン (100 mL) に溶解した。トリフルオロ酸 (20 mL) を添加して、次いで、室温で 4 時間攪拌した。水による洗浄および分画の後、有機相を無水硫酸ナトリウムにて乾燥した。溶媒を減圧下で蒸発により除去し、残りのトリフルオロ酸を高真空下で蒸発により除去した。粗生成物をカラムクロマトグラフィーによって単離し、All oc - AAN - PABC (5.9 g; 収率: 89%) を得た。

## 【0164】

5) ジクロロメタン (10 mL) に溶解した All oc - AAN - PABC (467 mg, 1.01 mmol) を、三口フラスコに添加した。ジクロロメタン中 4 - ニトロフェニルクロロホルメート (406 mg, 2.02 mmol) およびジクロロメタン中ピリジン (160 mg, 2.03 mmol) を、氷浴中、窒素ガス保護下でフラスコ内にそれぞれ滴下し、次いで、室温で一晩攪拌した。1 - (6 - アミノヘキシル) - 1H - ピロロ - 2, 5 - ジオン (235 mg, 1.2 mmol) を上記溶液中にバッチで添加し、室温で 4 時間反応させた。反応溶液を回転蒸発により乾燥した。結果として得られた粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィーによって精製し、白色の固体の S15 - 1 (540 mg; 収率: 80%) を得た。

20

## 【0165】

6) DMF (10 mL)、S15 - 1 (208 mg, 0.31 mmol)、酢酸 (274 mg, 4.65 mmol)、トリフェニルホスフィンパラジウム (72 mg, 0.062 mmol)、および水素化トリブチルスズ (1.17 g, 4.03 mmol) を、連続的に一口フラスコ内に添加した。フラスコ内の空気を窒素ガスに置換した後、S15 - 1 が完全に反応するまで混合物を室温で攪拌した。反応が完了した後、DMF を減圧下で蒸発により除去した。粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィーによって単離および精製し、S15 - 2 (白色の固体、116 mg、収率: 62%) を得た。

30

## 【0166】

7) S15 - R1 (940 mg, 0.18 mmol)、ベンゾトリアゾール - N, N, N', N' - テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスフェート (HBTU) (95 mg, 0.25 mmol)、および DMF (10 mL) を、三口フラスコに添加し、次いで、氷浴中で 30 分間攪拌した。次いで、化合物 S15 - 2 (110 mg, 0.18 mmol) および N, N - ジイソプロピルエチルアミン (70 mg, 0.54 mmol) を 0 でそれぞれ添加し、次いで、室温で一晩攪拌した。溶媒を減圧下で蒸発により除去した。粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィーによって単離および精製し、化合物 S15 である白色の固体 (418 mg; 収率: 40%) を得た。

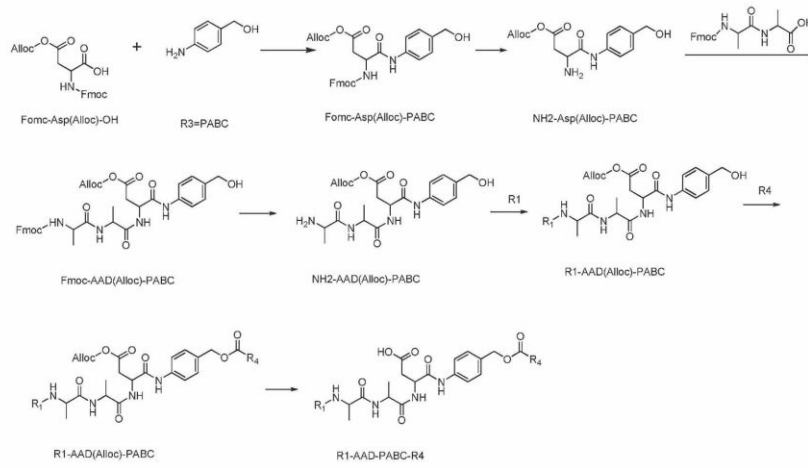
40

## 【0167】

R2 がアミノ酸配列 Ala - Ala - Asp を有し、R3 が PABC である際の、合成スキームを下記に示す。

## 【0168】

50



10

【 0 1 6 9 】

R 1 および R 4 が異なる置換基である際に、表 2 に示される以下の化合物を得た。

【 0 1 7 0 】

20

30

40

50

【表 2】

表 2

R1	R4	化合物
 R1-1	 R4-5	 S2
 R1-2	 R4-5	 S4
 R1-2	 R4-13	 S8
 R1-2	 R4-7	 S10
 R1-3	 R4-7	 S12
 R1-4	 R4-7	 S14
 R1-5	 R4-7	 S16
 R1-6	 R4-7	 S18
 R1-7	 R4-7	 S26
 R1-18	 R4-5	 S30
 R1-19	 R4-5	 S32

10

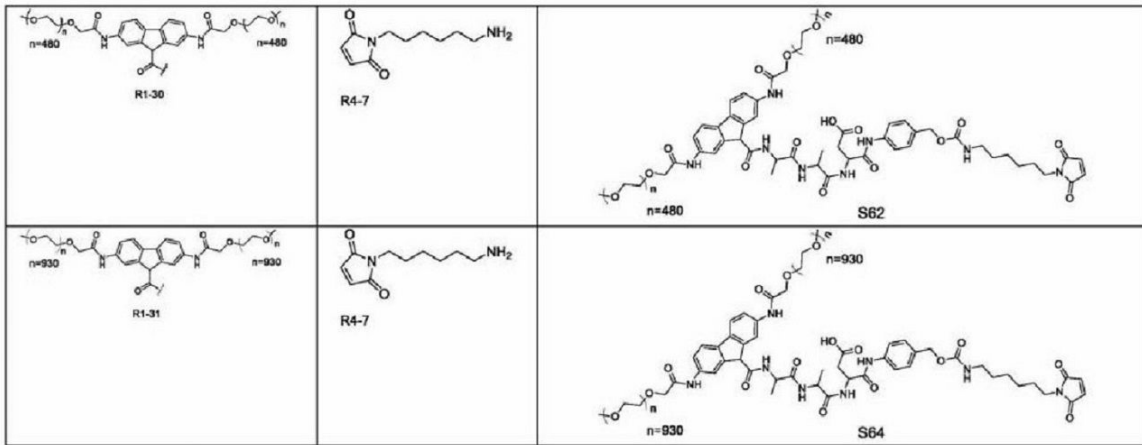
20

30

40

50



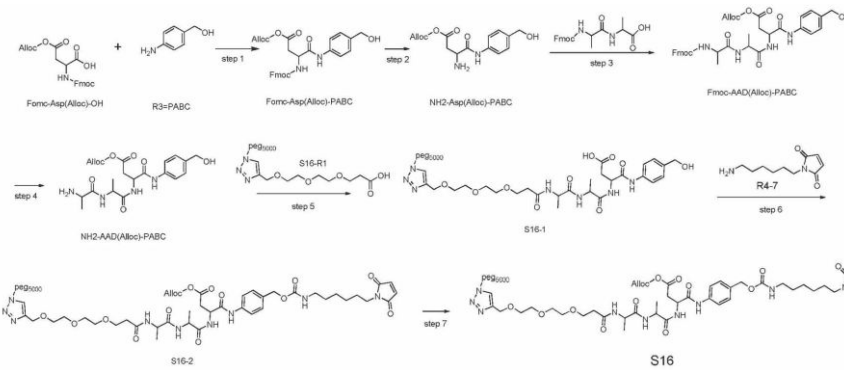


10

【 0 1 7 1 】

S 1 6 によって例示される際の、具体的な合成プロセスを下記に示した。

【 0 1 7 2 】



20

【 0 1 7 3 】

1) Fmoc - Asp (Alloc) - OH (13.2 g、0.03 mol)、2 - (7 - アザベンゾトリアゾール) - N, N, N', N' - テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスフェート (HATU) (15 g、0.04 mol)、および DMF (200 mL) を三口フラスコに添加し、30 分間攪拌した。p - アミノベンジルアルコール (4.1 g、0.03 mol) および N, N - ジイソプロピルエチルアミン (8.7 g、0.06 mol) を 0 でそれぞれ添加し、次いで、室温で 3 時間攪拌した。DMF を回転蒸発により除去した。残渣をカラムクロマトグラフィーによって精製し、白色の固体の Fmoc - Asp (Alloc) - PABC (14.7 g; 収率: 89%) を得た。

30

【 0 1 7 4 】

2) Fmoc - Asp (Alloc) - PABC (14.0 g、25 mmol) を N, N - ジメチルホルムアミド (80 mL) に溶解した。ピペリジン (30 mL) を添加し、次いで、室温で 2 時間攪拌した。溶媒を減圧下で蒸発により除去した。残渣を真空オープンにて高真空下でさらに乾燥させて、精製せずに次の工程に使用できる 8.0 g の淡黄色の固体の NH<sub>2</sub> - Asp (Alloc) - PABC を得た。

40

【 0 1 7 5 】

3) Fmoc - Ala - Ala - OH (7.8 g、20.4 mmol)、ベンゾトリアゾール - N, N, N', N' - テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスフェート (HBTU) (11.6 g、30.6 mmol)、および DMF (50 mL) を、三口フラスコ内に添加し、氷浴で 30 分間攪拌した。NH<sub>2</sub> - Asp (Alloc) - PABC (6.6 g、20.4 mmol) および N, N - ジイソプロピルエチルアミン (7.89 g、

50

61.2 mmol) を 0 でそれぞれ添加して、次いで、室温で一晩攪拌した。溶媒を減圧下で蒸発により除去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーによって精製し、白色の固体の Fmoc - AAD (Alloc) - PABC (12.6 g ; 収率 : 90 %) を得た。

## 【0176】

4) Fmoc - AAD (Alloc) - PABC (12 g、17.5 mmol) をジクロロメタン (80 mL) に溶解した。ピペリジン (30 mL) を添加して、次いで、室温で2時間攪拌した。溶媒を減圧下で蒸発により除去した。残渣を真空オーブンにて高真空でさらに乾燥させて、7.0 g 淡黄色の固体を得、これを次の工程に直接的に使用した。

## 【0177】

5) 中間体 S16 - R1 (522 mg、0.1 mmol)、2 - (7 - アザベンゾトリアゾール) - N, N, N', N' - テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスフェート (46 mg、0.12 mmol)、および DMF (20 mL) を、三口フラスコ内に添加し、30分間攪拌した。NH<sub>2</sub> - AAD (Alloc) - PABC (46 mg、0.1 mmol) および N, N - ジイソプロピルエチルアミン (38.7 mg、0.3 mmol) を 0 でそれぞれ添加し、次いで、室温で3時間攪拌した。DMF を回転蒸発により除去した。残渣をカラムクロマトグラフィーによって精製し、S16 - 1 (白色の固体、251 mg、収率 : 45 %) を得た。

## 【0178】

6) S16 - 1 (240 mg、0.046 mmol) を溶解され in ジクロロメタン (10 mL) を、三口フラスコ内に添加した。ジクロロメタン中 4 - ニトロフェニルクロロホルメート (18 mg、0.093 mmol) およびジクロロメタン中ピリジン (7.3 mg、0.093 mmol) を、氷浴中、窒素ガス保護下でフラスコ内にそれぞれ滴下し、次いで、室温で一晩攪拌した。R4 - 7 (11 mg、0.055 mmol) を上記溶液中に添加し、室温で4時間反応させた。反応溶液を回転蒸発により乾燥した。結果として得られた粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィーによって精製し、白色の固体 S16 - 2 (96 mg ; 収率 : 38 %) を得た。

## 【0179】

7) DMF (10 mL)、化合物 S16 - 2 (96 mg、0.016 mmol)、酢酸 (127 mg、2.15 mmol)、トリフェニルホスフィンパラジウム (33 mg、0.029 mmol)、および水素化トリブチルスズ (0.54 g、1.86 mmol) を、一口フラスコ内に連続的に添加した。フラスコ内の空気を窒素ガスにより置換した後、化合物 S16 - 2 が完全に反応するまで混合物を室温で攪拌した。反応が完了した後、DMF を減圧下で蒸発により除去した。粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィーによって単離および精製し、化合物 S16 である白色の固体 (54 mg ; 収率 : 62 %) を得た。

## 【0180】

酸性で活性化可能な基を含有していた際の、合成スキームを以下に示した。

## 【0181】



## 【0182】

S20 によって例示される際の、具体的な合成プロセスを下記に示した。

## 【0183】

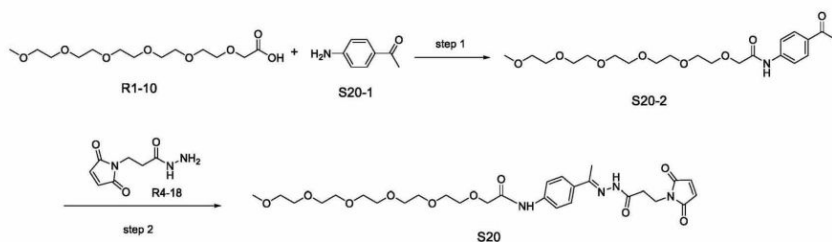
10

20

30

40

50



## 【0184】

10

1) R1-10 (3.1 g、0.01 mol)、2-(7-アザベンゾトリアゾール)-N,N,N',N'-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスフェート (HATU) (4.56 g、0.012 mol)、および DMF (20 mL) を、三ツ口フラスコ内に添加し、30 分間攪拌した。S20-1 (1.35 g、0.01 mol) および N,N-ジイソプロピルエチルアミン (3.87 g、0.03 mol) を、0 でそれぞれ添加し、次いで、室温で3時間攪拌した。DMFを回転蒸発により除去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーによって精製し、淡黄色の油状物質 S20-2 (2.5 g; 収率: 59%) を得た。

## 【0185】

20

2) S20-2 (98 mg、0.23 mmol) および R4-18 (42 mg、0.23 mmol) を秤量し、50 mL 三ツ口フラスコ内に連続的に添加した。ジクロロメタン (5 mL) を添加して S20-2 および R4-18 を溶解した後、4A モレキュラーシーブス (81 mg) を添加した。フラスコ内の空気を窒素ガスに置換した後、混合物を室温で一晩反応させた。反応溶液を回転蒸発により乾燥した。粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィーによって精製し、化合物 S20 である白色の固体 (81 mg; 収率: 60%) を得た。

## 【0186】

R1、R3、および R4 が異なる置換基であった際に、以下の表3の化合物を得た。

## 【0187】

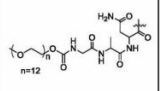



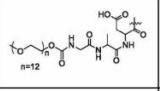


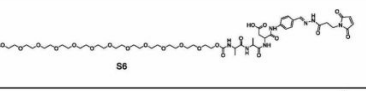
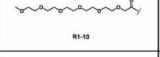


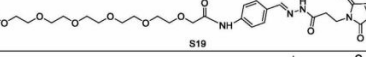
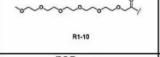


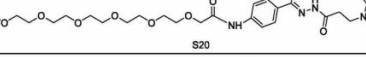
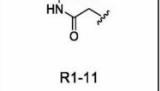


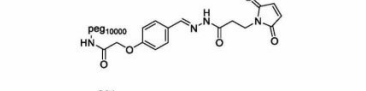
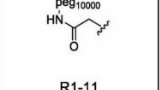


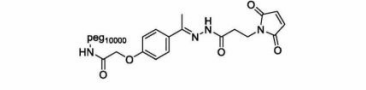
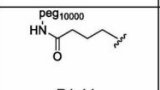


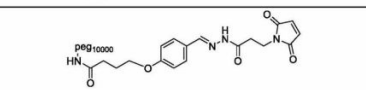
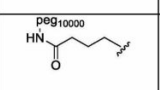


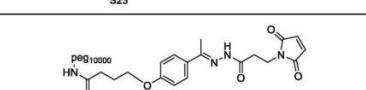
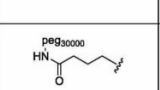


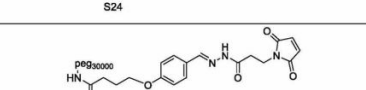
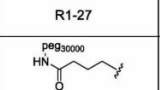


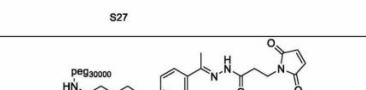
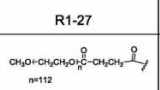


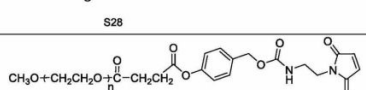
30

40

50

【表 3】

表 3

R1	R3	R4	化合物
			
			
			
			
			
			
			
			
			
			
			

10

20

30

40

50



## 【表 4】

表 4

番号	MS による検出	分子量	特性	収量
S1	1258	1258.37	白色固体	71mg
S2	1258	1258.37	白色固体	49mg
S3	1132	1132.21	白色固体	236mg
S4	1133	1133.20	白色固体	93mg
S5	1129	1129.21	白色固体	37mg
S6	1130	1130.20	白色固体	46mg
S7	1159	1159.28	白色固体	158mg
S8	1160	1160.26	白色固体	102mg
S9	1188	1188.32	白色固体	34mg
S10	1189	1189.30	白色固体	28mg
S11	765	764.82	白色固体	18mg
S12	766	765.81	白色固体	31mg
S13	5756	5755.81	白色固体	364mg
S14	5757	5756.80	白色固体	270mg
S15	5800	5799.87	白色固体	418mg
S16	5801	5800.85	白色固体	54mg
S17	10800	10799.87	白色固体	189mg
S18	10801	10800.85	白色固体	167mg
S19	579	578.61	白色固体	102mg
S20	593	592.64	白色固体	81mg
S21	10326	10326.32	白色固体	106mg
S22	10340	10340.35	白色固体	97mg
S23	10354	10354.38	白色固体	139mg
S24	10368	10368.40	白色固体	76mg
S25	30800	30799.87	白色固体	143mg
S26	30801	30800.85	白色固体	125mg
S27	30354	30354.38	白色固体	136mg
S28	30368	30368.40	白色固体	121mg
S29	10982	10982.37	白色固体	223mg
S30	10983	10982.46	白色固体	184mg
S31	20982	20982.28	白色固体	274mg
S32	20983	20982.32	白色固体	231mg
S33	60982	60982.19	白色固体	362mg

10

20

30

40

50

S34	60983	60983.26	白色固体	284mg
S35	11070	11070.34	白色固体	164mg
S36	11071	11071.41	白色固体	182mg
S37	21070	21070.18	白色固体	155mg
S38	21071	21071.27	白色固体	169mg
S39	5655	5655.37	白色固体	156mg
S40	5656	5656.22	白色固体	231mg
S41	10947	10947.42	白色固体	143mg
S42	10948	10948.36	白色固体	157mg
S43	21883	21883.84	白色固体	241mg
S44	21884	21884.72	白色固体	185mg
S45	41728	41728.86	白色固体	174mg
S46	41729	41729.73	白色固体	169mg
S47	47358	47358.46	白色固体	248mg
S48	47359	47359.39	白色固体	312mg
S49	5353	5343.61	白色固体	254mg
S50	10635	10635.68	白色固体	216mg
S51	21572	21572.47	白色固体	198mg
S52	47047	47047.18	白色固体	183mg
S53	5400	5399.76	白色固体	175mg
S54	10692	10691.74	白色固体	168mg
S55	21628	21628.51	白色固体	156mg
S56	47103	47103.24	白色固体	141mg
S57	10835	10835.22	白色固体	139mg
S58	10836	10836.09	白色固体	145mg
S59	21407	21407.28	白色固体	182mg
S60	21408	21408.17	白色固体	163mg
S61	43256	43256.02	白色固体	196mg
S62	43257	43257.10	白色固体	175mg
S63	81901	81901.07	白色固体	154mg
S64	81902	81902.14	白色固体	139mg

10

20

30

40

## 【 0 1 9 0 】

実施例 2 : 抗体の可変領域の C D R 内の変異後の結合活性の解析および R 4 についてのスクリーニング

抗 P D - 1 抗体 1 のアミノ酸配列は、W O 2 0 0 8 1 5 7 1 2 A 1 に開示されており、その D N A 配列を、宿主における発現用に最適化して合成した ( ジーンウィズ社、蘇州、中国 ) 。抗 P D - 1 抗体 2 のアミノ酸配列は、W O 2 0 0 6 1 2 1 1 6 8 A 2 に開示されており、その D N A 配列を、宿主における発現用に最適化して合成した ( ジーンウィズ社、蘇州、中国 ) 。抗 C T L A - 4 抗体のアミノ酸配列は、米国特許出願公開第 2 0 1 5 0 2 8 3 2 3 4 号に開示されており、その D N A 配列を最適化して合成した ( ジーンウィズ

50

社、蘇州、中国)。抗TNF抗体のアミノ酸配列は、米国特許出願公開第009534046号に開示されており、そのDNA配列を、宿主における発現用に最適化して合成した(ジーンウィズ社、蘇州、中国)。抗CD28抗体のアミノ酸配列は、米国特許出願公開第007939638号に開示されており、そのDNA配列を、宿主における発現用に最適化して合成した(ジーンウィズ社、蘇州、中国)。合成されたDNAを消化し、改変型pTT5ベクター(バイオベクター)に連結して、pTT5-anti-PD-1-1、pTT5-anti-PD-1-2、pTT5-anti-CTLA-4、pTT5-anti-TNF、およびpTT5-anti-CD28を作製した。pTT5-anti-PD-1-1、pTT5-anti-CTLA-4、pTT5-anti-TNF、およびpTT5-anti-CD28を鋳型として使用し、コドンを変異位置でシステインのものに置き換えるようにプライマーを設計し、変異された断片を改変型pTT5ベクター内へとPCRおよび消化および構築することによって、システイン変異を導入した。

10

#### 【0191】

発現宿主をHEK293T細胞(ライフテクノロジーズ)とした。トランスフェクション前に、HEK293T細胞を、10%FBS(ギブコ)を含有する完全培地中、37および5%CO<sub>2</sub>で培養した。トランスフェクションの前日に、細胞を適切な密度で15cm培養ディッシュ上に接種し、培養培地を低IgG含有FBS(ギブコ)に交換した。トランスフェクションの6時間後、または2日目に、培養培地をFreeStyle293(ギブコ)に交換した。

20

#### 【0192】

トランスフェクションの当日、細胞がある特定の集密度に到達した際に、リポフェクタミン2000(ライフテクノロジーズ)およびPEI(シグマ)を使用して、標的タンパク質を発現するプラスミドを293T細胞にコトランスフェクトした。抗体発現プラスミドは、抗体の重鎖および軽鎖を含んでいた。トランスフェクション後の4日目および6日目に、培養上清をそれぞれ回収した。タンパク質または抗体の発現および活性を検出し、タンパク質または抗体を精製した。

#### 【0193】

抗体(Ab)の重鎖および軽鎖内の可変領域の超可変領域は、抗体の抗原(Ag)結合部位を構成する。抗原結合性部位が抗原エピトープの構造に相補的であることから、超可変領域は、抗体の相補性決定領域(CDR)ともよばれる。抗PD-1抗体1、抗PD-1抗体2、およびCTLA4抗体の軽鎖の可変領域の配列をアラインメントし、それらのCDRを図1に示した。

30

#### 【0194】

本開示では、その当初の抗体に比較した際の点変異を有する各変異体の活性を、ELISAによって検出した。具体的には、96ウェルプレートに、抗体の抗原によって一晚被覆し、次いで、1%BSAブロッキング剤(サーモフィッシャー)の共存下37で2時間ブロッキングし、PBSTにより3回洗浄した。対応の抗体または対応の変異体を添加し、37で1時間結合させて、次いで、PBSTにより3回洗浄した。HRP酵素-コンジュゲート抗ヒトIgGを添加し、37で1時間結合させて、次いで、PBSTにより3回洗浄した。TMB基質(Solarbio社)を使用して、450nmでの吸収を検出した。変異体が結合強度に及ぼす効果を、OD変異後/OD野生型によって計算した。

40

#### 【0195】

表5および表6に示されるような異なる位置に変異を有する3つの抗体の変異体の結合活性を、上記の方法に従って試験した。表5および表6では、Aは結合活性90~110%を表し、Bは結合活性70~90%を表し、下向き矢印の記号は70%未満の結合活性を標示する。

#### 【0196】

50

## 【表 5】

表 5 : 抗体の軽鎖の可変領域の C D R 中の変異位置が結合活性に及ぼす効果

CDR	位置	PD-1 抗体 1	PD-1 との結合	抗 PD-1 抗体 2	PD-1 との結合	抗 CTLA-4 抗体	CTLA-4 との結合
CDR1	25	A	B	A	B	A	A
CDR1	26	S	A	S	A	S	A
CDR1	27	K	↓				
CDR1	28	G	A	S	A	S	A
CDR1	29						
CDR1	30	S	A	S	A	G	A
CDR1	31	T	B	S	A	S	A
CDR1	32	S	A	Y	↓	S	A
CDR1	33	G	A	L	↓	Y	↓
CDR1	34	Y	↓	A	A	L	B
CDR1	35	S	A			A	B
CDR1	36	Y	↓	Y	↓		
CDR1	37	L	B			Y	↓
CDR2	51			A	B	G	A
CDR2	52			S	A	A	↓
CDR2	53	Y	↓				
CDR2	54	L	B	S	A	S	A
CDR2	55	A	B	A	B		
CDR2	56	S	A	T	A	A	B
CDR2	57			G	A	T	A
CDR2	58			I	B	G	A
CDR2	60	S	A	A	B		
CDR2	61	G	A				
CDR3	91			S	A		
CDR3	92			S	A	Y	↓
CDR3	93					G	A
CDR3	94					S	A
CDR3	95	S	A			S	A
CDR3	96		↓				
CDR3	97	D	↓	T	A		
CDR3	98	L	↓	F	↓	T	B

CDR3	99		↓	G	A	F	↓
CDR3	100	L	↓			G	A
CDR3	101	T	B	G	↓		
CDR3	102	F	↓				

10

20

30

40

50

【 0 1 9 7 】

【 表 6 】

表 6 : 抗体の重鎖の可変領域の C D R 中の変異位置が結合活性に及ぼす効果

CDR	位置	PD-1 抗体 1	PD-1 との結合	抗 PD-1 抗体 2	PD-1 との結合	抗 CTLA-4 抗体	CTLA-4 との結合
CDR1	30	T	A	S	A	S	A
CDR1	31					S	A
CDR1	32	Y	↓	S	A	Y	B
CDR1	33	Y	↓	G	A	T	A
CDR1	35	Y	B				
CDR2	50	G	A				
CDR2	51	I	B	I	B	I	B
CDR2	53			Y	↓	Y	↓
CDR2	54	S	A	D	B	D	B
CDR2	55			G	A	G	A
CDR2	56	G	A	S	A	S	A
CDR2	57	G	A	K	↓		
CDR2	58	T	A			K	↓
CDR2	59			Y	↓	Y	↓
CDR2	60			Y	↓	Y	↓
CDR2	61			A	B	A	A
CDR2	62			D	↓	D	B
CDR2	63	K	B	S	A	S	A
CDR2	65	K	↓	K	↓	K	↓
CDR2	66			G	A	G	A
CDR3	100	D	↓	D	↓		
CDR3	101	Y	↓	D	B	G	A
CDR3	102			Y	↓	L	A
CDR3	104			G	A	T	A
CDR3	105					L	B
CDR3	106	G	A	G	A	D	↓
CDR3	107			T	A	Y	B

10

20

30

40

【 0 1 9 8 】

結果では、異なる抗体の可変領域において、G、S、およびTの一部分をCに変異することにより、野生型抗体に比べて少ない効果が結合活性に及ぼされることが示され、それは元の結合活性の90%以上であった。A、IおよびTの一部分をCに変異することにより、野生型抗体の結合活性の70~90%という結合活性が生じた。

【 0 1 9 9 】

抗PD1抗体1の軽鎖の点変異についてのCo-IPスクリーニングから得られた結果を図2に示すが、ここでは、パネルaは、WBによって検出された、野生型抗体の変異が

50

発現に及ぼす効果を示し、パネル b は、WB によって検出された、変異型抗体の PD1 との結合を示す。

【0200】

R4 との結合後の CDR に変異を有する抗体の変異体の結合活性の解析

表 7 ~ 16 に示されるように、軽鎖または重鎖の CDR に変異を有する抗体を、コンジュゲーション用の小分子のライブラリー中の R<sub>4</sub> にコンジュゲートし、それらの結合活性を、野生型抗体と比較して (抗体とのコンジュゲートの結合活性 / 野生型抗体の結合活性 \* 100%)、分子間力を付与し結合活性を増強するものとなるコンジュゲーションの方式を得た。

【0201】

【表 7】

10

表 7 : R4-1 または R4-5 とのコンジュゲート後の、軽鎖の CDR に変異を有する抗 PD-1 抗体 1 の変異体の結合作用

CDR	位置	抗 PD-1 抗体 1	R4-1 とのコンジュゲーション	R4-5 とのコンジュゲーション
CDR 1	26	S	93.2%	
CDR 1	30	S	86.9%	
CDR 1	31	T	84.4%	
CDR 1	28	G	104.6%	107.6%
CDR 1	35	S	88.3%	
CDR 1	36	Y	85.4%	
CDR 1	55	A	92.1%	
CDR 2	57	Y	87.7%	
CDR 2	60	S	89.4%	
CDR 3	104	G	83.6%	

20

【0202】

【表 8】

30

表 8 : R4 とのコンジュゲート後の、重鎖の CDR に変異を有する抗 PD-1 抗体 1 の変異体の結合作用

CDR	位置	抗 PD-1 抗体 1	R4-1 とのコンジュゲーション	R4-4 とのコンジュゲーション	R4-7 とのコンジュゲーション
CDR 1	30	T	91.2%		
CDR 1	32	Y		89.5%	
CDR 2	50	G	84.4%		
CDR 2	54	S	103.6%		
CDR 2	58	T	93.9%		
CDR 2	63	K			95.2%
CDR 3	101	Y		86.1%	
CDR 3	106	G	95.1%		

40

【0203】

表 7 および表 8 によれば、抗 PD-1 抗体 1 の CDR の A、G、S、Y、T、または K

50

を C に変異させて R 4 に結合した後、変異体は、結合効率 > 80 % を保持することができた。

【 0 2 0 4 】

【 表 9 】

表 9 : R 4 - 1 または R 4 - 5 とのコンジュゲート後の、軽鎖の CDR に変異を有する抗 PD-1 抗体 2 の変異体の結合作用

CDR	位置	抗 PD-1 抗体 2	R4-1 とのコンジュゲーション	R4-5 とのコンジュゲーション
CDR 1	25	A	26.5%	87.2%
CDR 1	26	S	86.8%	
CDR 1	28	S	88.9%	
CDR 1	30	S	34.4%	
CDR 1	31	S	95.7%	
CDR 1	32	Y	25.6%	
CDR 1	33	L	1.6%	
CDR 1	34	A	1.7%	83.9%
CDR 2	51	A	95.6%	
CDR 2	52	S	34.6%	
CDR 2	55	A	99.5%	
CDR 2	56	T		89.4%
CDR 3	57	G	89.8%	
CDR 3	91	S	93.5%	
CDR 3	92	S	45.5%	
CDR 3	97	T	93.7%	

【 0 2 0 5 】

## 【表 10】

表 10 : R4 とのコンジュゲート後の、重鎖の CDR に変異を有する抗 PD-1 抗体 2 の変異体の結合作用

CDR	位置	抗 PD-1 抗体 2	R4-1 とのコンジュゲーション	R4-3 とのコンジュゲーション	R4-4 とのコンジュゲーション	R4-7 とのコンジュゲーション
CDR 1	30	S	107.2%			
CDR 1	32	S	86.8%			
CDR 1	33	G	88.9%			
CDR 2	53	Y			91.6%	
CDR 2	55	G	95.7%			
CDR 2	56	S	105.6%			
CDR 2	57	K				89.7%
CDR 2	61	A	87.0%		83.9%	
CDR 2	63	S	95.6%			
CDR 2	65	K				92.1%
CDR 2	66	G	99.5%			
CDR 3	104	G	89.4%			
CDR 3	106	G	91.8%			
CDR 3	107	T	95.7%			
CDR 3	108	L		86.4%		

## 【0206】

表 9 および表 10 によれば、抗 PD-1 抗体 2 の CDR の G、S、A、Y、K、L、または T を C に変異させて R4 に結合した後、変異体は、結合効率 > 80% を保持することができた。

## 【0207】

10

20

30

40

50

## 【表 1 1】

表 1 1 : R 4 - 1 とのコンジュゲート後の、軽鎖の C D R に変異を有する抗 C T L A - 4 抗体の変異体の結合作用

CDR	位置	抗 CTLA-4 抗体	R4-1 とのコンジュゲーション
CDR 1	25	A	95.40%
CDR 1	26	S	91.00%
CDR 1	28	S	82.00%
CDR 1	30	G	95.30%
CDR 1	31	S	80.90%
CDR 1	32	S	99.00%
CDR 1	34	L	94.90%
CDR 1	35	A	91.50%
CDR 2	51	G	97.00%
CDR 2	52	A	92%
CDR 2	54	S	97.70%
CDR 2	56	A	102.30%
CDR 2	57	T	92.50%
CDR 2	58	G	88.10%
CDR 3	93	G	99.10%
CDR 3	94	S	92.40%
CDR 3	95	S	95.40%
CDR 3	98	T	91.00%

## 【 0 2 0 8 】

10

20

30

40

50

## 【表 1 2】

表 1 2 : R 4 とのコンジュゲート後の、重鎖の C D R に変異を有する抗 C T L A - 4 抗体の変異体の結合作用

CDR	位置	抗 CTLA-4 抗体	R4-1 とのコンジュゲーション	R4-3 とのコンジュゲーション	R4-4 とのコンジュゲーション	R4-7 とのコンジュゲーション
CDR 1	30	S	93.4%			
CDR 1	31	S	109.5%			
CDR 1	33	T	102.3%			
CDR 2	55	G	95.2%			
CDR 2	58	K				87.6%
CDR 2	59	Y			89.1%	
CDR 2	60	Y			91.8%	
CDR 2	65	K				96.2%
CDR 2	66	G	92.7%			
CDR 3	100	G	98.3%			
CDR 3	102	L		83.9%		
CDR 3	103	G	93.8%			
CDR 3	106	D		87.6%		

10

20

## 【 0 2 0 9】

表 1 1 および表 1 2 によれば、抗 C T L A - 4 抗体の C D R の A、G、S、L、T、K、Y、または D を C に変異させて R 4 に結合した後、変異体は、結合効率 > 8 0 % を保持することができた。

## 【 0 2 1 0】

30

40

50

## 【表 1 3】

表 1 3 : R 4 とのコンジュゲート後の、軽鎖の CDR に変異を有する抗 CD 2 8 抗体の変異体の結合作用

CDR	位置	抗 CD28 抗体	R4-1 とのコンジュゲーション	R4-3 とのコンジュゲーション	R4-4 とのコンジュゲーション	R4-7 とのコンジュゲーション
CDR 1	26	S	87.0%			
CDR 1	29	I		88.5%		
CDR 1	30	Y	19.5%		93.6%	
CDR 2	50	K	26.6%			88.9%
CDR 2	51	A	97.7%			
CDR 2	52	S	84.0%			
CDR 3	91	G	88.3%			
CDR 3	93	T	87.0%			
CDR 3	94	Y	20.1%		83.7%	
CDR3	96	Y	14.9%		91.4%	
CDR 3	97	T	95.5%			
CDR 3	99	G	96.6%			

10

20

## 【 0 2 1 1】

## 【表 1 4】

表 1 4 : R 4 とのコンジュゲート後の、重鎖の CDR に変異を有する抗 CD 2 8 抗体の変異体の結合作用

CDR	位置	抗 CD28 抗体	R4-1 とのコンジュゲーション	R4-3 とのコンジュゲーション	R4-4 とのコンジュゲーション
CDR 1	25	S	87.0%		
CDR 1	26	G	89.5%		
CDR 1	27	Y			94.2%
CDR1	28	T	108.6%		
CDR1	30	T	87.3%		
CDR1	31	S	97.5%		
CDR1	32	Y			81.8%
CDR 2	52	Y			91.6%
CDR 2	54	G	97.9%		
CDR 2	58	T	89.3%		
CDR 3	99	S	87.6%		
CDR 3	101	Y			89.3%
CDR 3	102	G	80.1%		
CDR3	103	L	14.9%	94.6%	

30

40

## 【 0 2 1 2】

50

表 1 3 および表 1 4 によれば、抗 C D 2 8 抗体の C D R の G、S、A、I、L、K、Y、または T を C に変異させて R 4 に結合した後、変異体は、結合効率 > 8 0 % を保持することができた。

【 0 2 1 3 】

【 表 1 5 】

表 1 5 : R 4 とのコンジュゲート後の、軽鎖の C D R に変異を有する抗 T N F α 抗体の変異体の結合作用

CDR	位置	抗 TNFα 抗体	R4-1 とのコンジュゲーション	R4-3 とのコンジュゲーション	R4-4 とのコンジュゲーション
CDR 1	25	A	88.6%		
CDR 1	26	S	97.1%		
CDR 1	28	G	92.3%		
CDR 1	29	I		87.8%	
CDR 1	32	Y			89.1%
CDR 1	33	L		89.4%	
CDR 1	34	A	85.7%		
CDR 2	50	A	85.5%		
CDR 2	51	A	95.1%		
CDR 2	52	S	86.8%		
CDR 2	53	T	89.4%		
CDR 2	54	L		82.2%	
CDR 2	56	S	95.4%		
CDR 2	57	G	95.5%		
CDR 3	91	Y	34.5%		90.1%
CDR 3	94	A	97.5%		
CDR 3	97	T	82.5%		

【 0 2 1 4 】

10

20

30

40

50

## 【表 1 6】

表 1 6 : R 4 とのコンジュゲート後の、重鎖の C D R に変異を有する抗 T N F  $\alpha$  抗体の変異体の結合作用

CDR	位置	抗 TNF $\alpha$ 抗体	R4-1 とのコンジュゲーション	R4-3 とのコンジュゲーション	R4-4 とのコンジュゲーション
CDR 1	32	Y			88.6%
CDR 1	33	A	95.1%		
CDR 2	51	I		102.6%	
CDR 2	52	T	82.8%		
CDR 2	55	S	86.9%		
CDR 2	56	G	88.7%		
CDR 2	58	I		86.7%	
CDR 2	60	Y			85.2%
CDR 2	61	A	95.7%		
CDR 2	63	S	96.8%		
CDR 2	66	G	99.4%		
CDR 3	100	S	92.2%		
CDR 3	101	Y			85.4%
CDR 3	102	L		85.5%	
CDR 3	103	S	84.5%		
CDR 3	104	T	97.3%		
CDR 3	105	A	86.5%		
CDR 3	106	S	98.3%		
CDR 3	107	S	87.4%		
CDR 3	108	L		81.4%	
CDR 3	110	Y			82.5%

## 【 0 2 1 5】

表 1 3 および表 1 4 によれば、抗 T N F 抗体の C D R の A、G、S、L、I、Y、または T を C に変異させて R 4 に結合した後、変異体は、結合効率 > 8 0 % を保持することができた。

## 【 0 2 1 6】

実施例 3 : 可変領域の非 C D R 内の相同性の高い配列に変異を有する変異体の結合活性に関する解析と R 1 についてのスクリーニング

抗体は、2 本の同一の軽鎖 ( L C ) と 2 本の同一の重鎖 ( H C ) とを含む 4 本のペプチド鎖からなる。これらの鎖は、ジスルフィド結合 ( 複数可 ) および非共有結合によって単量体を形成する。2 タイプの軽鎖、すなわち  $\mu$  および  $\delta$  と、5 タイプの重鎖、すなわち  $\gamma$ 、 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\epsilon$  および  $\tau$  がある。抗体は、全体としては、定常領域と可変領域とに分けられる。可変領域は、Y 形状構造の 2 本のアームの末端に位置する。ヒト化抗体またはヒト抗体は、ある特定の一般性を有するが、すなわち、それらは全て、Y 形状構造の 2 本のアームの末端において重鎖または軽鎖に 4 つのループを含有する ( 図 3 )。3 つのループは、可変性が高く、抗原との結合性に直接的に予期する。これらのループ内にある領域は C D R と称され、C D R 1、C D R 2、および C D R 3 はそれぞれ、これらの 3 つのループに存在する。他のループも同じ側に存在し、そこでは、抗体は、四次元空間から抗原に結合する。いくつかのループは、保存された構造を有するだけでなく、保存された配列も有

10

20

30

40

50

する。

【 0 2 1 7 】

8つの上市抗体（図4の最初から最後まで抗体に示される、それぞれテセントリク（アテゾリズマブ）、ヤーボイ（イピリムマブ）、ヒュミラ（アダリムマブ）、キイトルーダ（ペムプロリズマブ）、オブジーボ（ニボルマブ）、アービタックス（セツキシマブ）、リツキサン（リツキシマブ）、およびパージェタ（ペルツズマブ））由来の軽鎖をアラインメントし、結果を図4に示した。各軽鎖の可変領域の4番目のループ（G S G S G S T）は保存されていた。

【 0 2 1 8 】

抗PD-1抗体の軽鎖のCDRの同じ側には4つのループがあり、そのうち3つのループが、CDR1、CDR2、およびCDR3を含むCDRであった。残りのループは、FDAに認可された多数の薬剤に比べて保存された構造および配列を有していた。このループの配列は、R F S G S G S G Tであり、64～72位に位置していた（図4）。抗PD-1抗体1のループ4内の各アミノ酸残基を、Cysに変異させて、S9またはS13にコンジュゲートした。異なる長さのR1-R4へのコンジュゲーションが変異体のPD-1との結合活性に及ぼす効果を、ELISAによって検出した。結果を表17に示した。コンジュゲートアームの立体構造または長さを変化させることによって、変異体の活性の70%以上を阻害しうることを見出すことができた。

10

【 0 2 1 9 】

【表17】

20

表17：軽鎖の可変領域のループ4に変異を有する抗PD-1抗体1のコンジュゲートの結合活性

	位置	残基	結合活性	S9とのコンジュゲーション	S13とのコンジュゲーション
ループ4	67	S	87.8%	27.2%	17.8%
ループ4	68	G	93.5%	89.9%	13.2%
ループ4	69	S	96.1%	90.6%	16.2%
ループ4	70	G	89.3%	65.2%	17.9%
ループ4	71	S	99.5%	89.0%	16.0%
ループ4	72	G	98.3%	92.9%	10.9%
ループ4	73	T	93.5%	90.2%	10.6%

30

【 0 2 2 0 】

抗体を、イムノグロブリンスーパーファミリーの遺伝子のin vivoでの組換えによって作製した。異なる抗原に対する抗体のいくつかのフレームワーク領域は、同じ生殖細胞系列抗体の遺伝子またはアミノ酸配列を由来とすることがある。例えば、Her2抗体であるハーセプチン（トラストズマブ）の重鎖は、抗PD-1抗体であるテセントリク（アテゾリズマブ）のものとは3つのCDRが異なる。それらは同じ非CDRフレームワーク配列を有し、これらのフレームワーク配列は同じ生殖細胞系列抗体を由来とする（図5）。ハーセプチンとテセントリクの重鎖と同様に、PD-1抗体であるオブジーボ（ニボルマブ）とキイトルーダ（ペムプロリズマブ）の軽鎖は、可変領域の3つのCDRが異なる。それらの非CDRフレームワーク領域は、同じ生殖細胞系列抗体を由来とする（図5）。

40

【 0 2 2 1 】

同様の状況は、数多くの抗体に見出された。FDAによって認可された再成形された抗体（CDR移植抗体ともよばれる）の例として、抗原とのその特異性を保持し異種性を低減するために、マウス由来抗体のCDRが直接的にヒト由来抗体のCDRに置き換えられた。ヒト化技術および遺伝子工学技術が成熟し、のちに開発されたヒト化された抗体は、

50

主にヒト化抗体またはヒト抗体であった。しかし、そうであっても、数多くの上市抗体の重鎖は、依然として非常に高度な類似性を示している。例えば、図6は、7つの上市抗体 [ 図6の最初から最後の抗体に示される、アバスチン(ベバシズマブ)、ハーセプチン(トラスツズマブ)、テセントリク(アテゾリズマブ)、ヒュミラ(アダリムマブ)、ヤーボイ(イピリムマブ)、オブジーボ(ニボルマブ)、およびパージェタ(ベルツズマブ) ] の重鎖の類似性について比較した結果を示すが、類似性は85%以上である。それらは、互いに主にCDRが異なっており、可変領域のそれらのフレームワーク領域は、類似配列を有する。そうであっても、テセントリク(アテゾリズマブ)およびハーセプチン(トラスツズマブ)のフレームワーク構造は一致する(図5)。免疫チェックポイント抗体であるオブジーボ、キイトルーダ、およびヤーボイ(図7にそれぞれ示される最初から最後の抗体)の軽鎖可変領域を比較したところ、それらの相同性が92%であることを見出すことができた。主な違いはCDRであり、それらのフレームワーク領域の配列は互いに近いものであった(図7)。

10

**【0222】**

保存されたフレームワーク領域を有する抗体について、重鎖および軽鎖の可変領域のフレームワーク領域(非CDR)に変異を有するそれらの変異体ならびにそれらのコンジュゲートの活性を試験した。表18および表19に示された各アミノ酸位置をシステインに変異し、結果として得られた各変異体をS9またはS13にコンジュゲートした。異なる長さを有するR1-R4側鎖とのコンジュゲーションがPD-1とのその結合活性に及ぼす効果を、ELISAによって試験した。結果を表18および表19に示した。図8は、PD1 Ab - C28 (PD1 - Ab - Gly28Cys)とS13とのコンジュゲーションを示し、図9は、S13とのコンジュゲート前後の抗PD1 - Ab - C28とPD1との結合を示す。

20

**【0223】**

30

40

50

## 【表 1 8】

表 1 8 : 軽鎖可変領域のフレームワーク領域に変異を有する抗PD-1抗体1の変異体  
およびそれらのコンジュゲートの結合活性

位 置	アミノ酸残 基	変異後の結合活 性	S9 とのコンジュゲーション	S13 とのコンジュゲーション
5	T	95.3%	67.4%	26.30%
7	S	98.2%	59.5%	34.20%
9	A	96.5%	78.4%	44.60%
10	T	84.3%	65.7%	37.40%
11	L	96.3%	32.50%	
12	S	85.5%	13.50%	
13	L	97.5%	80.2%	42.30%
14	S	97.8%	19.7%	
16	G	89.4%	75.3%	21.70%
19	A	86.4%	49.9%	25.00%
20	T	89.7%	69.7%	32.10%
25	A	83.3%	70.3%	37.20%
41	G	88.5%	17.4%	
43	A	99.3%	82.1%	30.80%
46	L	95.9%	80.2%	37.50%
47	L	81.1%	68.9%	22.90%
48	I	89.5%	23.8%	
51	A	92.1%	82.1%	31.2%
55	A	87.3%	72.3%	29.4%
69	T	83.4%	67.9%	20.5%
76	S	90.2%	68.7%	21.9%
77	S	83.8%	69.3%	32.1%
106	I	98.3%	76.7%	26.8%
107	K	87.1%	70.1%	35.6%

10

20

30

40

## 【 0 2 2 4】

50

## 【表 19】

表 19 : 重鎖可変領域のフレームワーク領域に変異を有する抗PD-1抗体1の変異体およびそれらのコンジュゲートの結合活性

位置	アミノ酸残基	変異の結合活性	S9とのコンジュゲーション	S13とのコンジュゲーション
7	S	95.3%	65.9%	26.3%
8	G	93.2%	78.3%	34.2%
9	G	97.8%	87.4%	24.6%
10	G	84.3%	69.3%	37.4%
15	G	85.6%	32.50%	21.5%
17	S	85.0%	75.3%	42.4%
24	A	99.6%	45.6%	32.3%
25	S	99.8%	48.7%	27.0%
26	G	95.4%	31.8%	11.7%
28	T	86.4%	29.9%	15.0%
30	S	89.7%	31.8%	15.3%
40	A	85.3%	50.3%	37.2%
42	G	83.4%	63.6%	29.8%
44	G	99.3%	78.3%	30.8%
69	T	95.9%	78.6%	37.5%
71	S	81.4%	56.9%	22.9%
75	S	96.3%	38.7%	14.6%
78	T	92.2%	86.3%	42.4%
85	S	98.8%	69.4%	32.3%
88	A	84.3%	46.8%	27.0%
91	T	86%	48.9%	21.7%
92	A	85.0%	64.6%	15.0%
98	T	89.6%	59.9%	32.1%
110	T	92.1%	78.4%	37.2%
112	S	95.4%	68.6%	29.8%
113	S	96.0%	70.5%	30.8%
114	A	89.7%	66.9%	37.5%
115	S	95.3%	70.4%	22.9%
116	T	93.4%	69.5%	14.6%
118	G	99.3%	72.5%	31.3%
120	S	95.9%	68.4%	36.8%

## 【0225】

抗体可変領域の非CDR領域に変異を有する変異体の結合活性の分析では、変異を非CDR内に導入した際に、および変異体を小さなコンジュゲート分子S9にコンジュゲートした際に、結合活性に有意な効果がなかったことが示された。しかし、変異体をS13にコンジュゲートした際に、結合活性が低減された。これらより、非CDR内のアミノ酸残基をシステインに変異できること、次いで、大きな分子量を有するかまたは変異体の結合活性を遮断するための特異的な官能基を担持するR1 - R2 - R3 - R4に、変異体をコンジュゲートできることを示す。この方法を用いて、変異体の活性を阻害することができた。

10

20

30

40

50

## 【 0 2 2 6 】

軽鎖に2つ以上の変異を有する抗PD1抗体を調製し、S13とコンジュゲートした。1つの変異を有しPD1抗原との95%以上の結合活性を有する上述の抗PD1抗体の変異部位から、変異部位を選択した。活性化後の上記コンジュゲートの活性を検証し、結果を表20に示した。

## 【 0 2 2 7 】

## 【表20】

10

表20：活性化前後の2つ以上の変異を有する抗PD1抗体1のコンジュゲートのPD1との結合活性

R1- R2- R3- R4	R5	活性化前の結合効率	酵素または酸による活性化後の結合効率
S13	PD1 Ab-Ser7/Ser71	18.1%	109.5%
S13	PD1 Ab-Ser12/Gly72	19.6%	95.3%
S13	PD1 Ab-Ser14/Thr73	10.2%	99.8%
S13	PD1 Ab-Ser7/Ser14/Thr73	11.9%	95.1%

20

## 【 0 2 2 8 】

上記の結果は、2つ以上の変異を有する抗PD1抗体のコンジュゲートが活性化後にPD1との結合活性の95%以上を保持することができたことを実証している。

## 【 0 2 2 9 】

実施例4：生体分子R5についてのスクリーニング、R1、R2-R3-R4とのコンジュゲーション、およびコンジュゲーション後の活性化

病態の微小環境でタンパク質分解酵素により活性化される間、活性化されたリンカーアームが生体分子に結合する部位およびその立体配座は、活性化効率に異なる効果をもたらす。立体障害および構造-活性相関は、活性化による切断の効果を決定する。酵素または病態環境中の酸による活性化に及ぼされる、病態環境における実施例3のコンジュゲートの生体分子の立体配座の効果を検討するために、以下の*in vitro*活性化の検討を実施した。

30

## 【 0 2 3 0 】

活性化試験では、活性化に用いる10マイクログラムのタンパク質分解酵素を、1mg/mLのPeg1000-R2-R3-R4-S-Cys-R5コンジュゲートに添加して、37で1時間反応した。活性化後に生じた小化合物Peg1000の濃度を、HPLCによって検出し、対照群に対する活性化または切断の効率(%)を計算した。各コンジュゲートの切断効率を以下の表21に示す。

40

## 【 0 2 3 1 】

50

## 【表 2 1】

表 2 1

変異体	R1	R2	R3	R4	切断効率
PD-1-Ab-Gly28Cys	Peg1000	-Ala-Ala-Asn-			対照、100%
PD-1-Ab-Gly28Cys	Peg1000	-Ala-Ala-Asn-	R3-1	R4-3	99.5
PD-1-Ab-Gly28Cys	Peg1000	-Ala-Ala-Asn-	R3-2	R4-3	99.8
PD-1-Ab-Gly28Cys	Peg1000	-Ala-Ala-Asn-	R3-3	R4-3	98.6

10

## 【 0 2 3 2 】

表 2 2 および表 2 3 に示されるように、自動的に脱落したアーム R 3 は、その小さな分子量と直鎖構造のために、レグマインの活性化に効果を実質的に及ぼさず、R 3 - 2 は最も低い効果を生じた。

20

## 【 0 2 3 3 】

## 【表 2 2】

表 2 2 : 抗 PD - 1 抗体 1

R2	R3	R4	R5	切断効率
-Ala-Ala-Asn-	R3-2			対照、100%
-Ala-Ala-Asn-	R3-2	パクリタキセル (2-OH)		42.5
-Ala-Ala-Asn-	R3-2	R4-5	PD-1-Ab1-Gly28Cys	88.4
-Ala-Ala-Asn-	R3-2	R4-6	PD-1-Ab1-Gly28Cys	93.5
-Ala-Ala-Asn-	R3-2	R4-7	PD-1-Ab1-Gly28Cys	99.8
-Ala-Ala-Asn-	R3-2	R4-8	PD-1-Ab1-Gly28Cys	63.5
-Ala-Ala-Asn-	R3-2	R4-9	PD-1-Ab1-Gly28Cys	62.4
-Ala-Ala-Asn-	R3-2	R4-1	PD-1-Ab1-Gly28Cys	83.8
-Ala-Ala-Asn-	R3-2	R4-3	PD-1-Ab1-Gly28Cys	94.5
-Ala-Ala-Asn-	R3-2	R4-1	PD-1-Ab1-Gly28Cys	86.7
-Ala-Ala-Asn-	R3-2	R4-3	PD-1-Ab1-Gly28Cys	97.5

30

40

## 【 0 2 3 4 】

50

## 【表 2 3】

表 2 3 : 抗 CTLA-4 抗体

酸による活性化	R3	R4	R5	切断効率
アミド結合連結	R3-2			対照、100%
アミド結合連結	R3-2	R4-2	CTLA-4-Ser26Cys	99.8
アミド結合連結	R3-2	R4-15	CTLA-4-Ser26Cys	99.5
アミド結合連結	R3-2	R4-16	CTLA-4-Ser26Cys	91.7
アミド結合連結	R3-2	R4-17	CTLA-4-Ser26Cys	94.3
アミド結合連結	R3-2	R4-18	CTLA-4-Ser26Cys	93.4
エステル結合	R3-2			対照、100%
エステル結合	R3-2	R4-4	CTLA-4-Ser26Cys	92.8
エステル結合	R3-2	R4-19	CTLA-4-Ser26Cys	97.4
エステル結合	R3-2	R4-20	CTLA-4-Ser26Cys	93.8
エステル結合	R3-2	R4-21	CTLA-4-Ser28Cys	95.4

## 【0 2 3 5】

表 2 2 および表 2 3 では、生体分子にコンジュゲートしていない分子によって生じた活性化効率を、陽性対照として使用したのに対して、複素環化合物パクリタキセルの 2 位のヒドロキシにコンジュゲートされた分子によって生じた活性化効率を、陰性対照として使用した。R 4 の長さおよび側鎖基は、抗体の変域内または非変域内の変異部位にコンジュゲートした際に、コンジュゲート全体の切断効率に影響を及ぼした。生じる R 4 の鎖構造が長いほど、切断効率が增强された。検出されたように、Ala - Ala - Asn または Ala - Ala - Asp にコンジュゲートし、次いで抗体に結合した後に、本開示の R 4 - 1 から R 4 - 2 5 は全て、> 6 0 % の活性化効率を、および酸感受性の活性化では > 9 0 % の活性化効率を、変異体が保持することを可能にした。

## 【0 2 3 6】

R 1 選択の効果および結合能の回復の試験

PBS (pH 7.2) を用いて、リガンド分子 PD 1、TNF、CTLA-4、CD 28 を 1 μg/mL にそれぞれ希釈した。次いで、各希釈溶液を用いて、96 ウェルプレート (ヌンク) に一晩固定した。1 × ブロッキング BSA (サーモフィッシャー) を用いて、プレートを 2 時間ブロッキングした。抗 PD-1 抗体、抗 TNF 抗体、抗 CTLA-4 抗体、および抗 CD 28 抗体の対応のコンジュゲートをそれぞれ等濃度で添加して、37 °C で 1 時間結合させた。プレートを PBST で 3 回洗浄した。HRP 酵素-コンジュゲート抗体を二次抗体として 37 °C で 1 時間反応させて、次いで、PBST で 3 回洗浄した。HRP 酵素により認識される TMB 基質 (Solarbio 社) を用いて、暗所中、37 °C で 15 分間反応した。1/2 体積の停止溶液を使用して、反応を停止させた。吸光強度 (OD 450) を読み取った。相対結合効率を、活性化前後のコンジュゲートの結合効率と野生型抗体の結合効率とのパーセンテージ比により計算した。結果を表 2 4 ~ 表 2 6 に示した。

## 【0 2 3 7】

10

20

30

40

50

## 【表 2 4】

表 2 4 : R 1 とのコンジュゲート後およびコンジュゲートアームの活性化後の抗 P D  
- 1 抗体の結合活性の変化

R1	R2	R3	R4	R5	活性化前の結合 効率	酵素または酸による活性 化後の結合効率
	-Ala-Ala-Asn-	R3-2	R4-3	PD-1-Ab1-Gly28Cys	67.4%	143.5%
S1 由来 R1	-Ala-Ala-Asn-	R3-2	R4-3	PD-1-Ab1-Gly28Cys	24.4%	145.3%
S3 由来 R1	-Ala-Ala-Asn-	R3-2	R4-3	PD-1-Ab1-Gly28Cys	22.5%	143.4%
S11 由来 R1	-Ala-Ala-Asn-	R3-2	R4-3	PD-1-Ab1-Gly28Cys	15.6%	137.4%
S17 由来 R1	-Ala-Ala-Asn-	R3-2	R4-3	PD-1-Ab1-Gly28Cys	3.2%	156.3%

10

## 【 0 2 3 8】

この結果は、R 1 にコンジュゲートすることによって、抗 P D - 1 抗体の活性が阻害されるが抗体の活性化に影響を及ぼさないことを示している。R 1 のないコンジュゲートの活性化前のその抗原との結合効率は、野生型抗体の抗原との結合の 6 7 . 4 % であった。しかし、活性化後、コンジュゲートの結合効率は、野生型抗体の結合の 1 4 3 % に向上した。R 1 を同じ R 2 - R 3 - R 4 および変異型抗体に結合した後、それは、結果として得られたコンジュゲートがその抗原に結合するのを防止した。そして、この結合の防止は、R 1 の分子量の増加に伴って増加した。S 1 7 は、コンジュゲートがその抗原に結合するのを完全に防止することができた。しかし、結合活性は、レグミンによる切断後に回復した。

20

## 【 0 2 3 9】

## 【表 2 5】

表 2 5 : R 1 とのコンジュゲート後およびコンジュゲートアームの活性化後の抗 T N  
F  $\alpha$  抗体の結合活性の変化

R1	R2	R3	R4	R5	活性化前の結合 効率	酵素または酸による活性 化後の結合効率
	-Ala-Ala-Asp-	R3-2	R4-2	TNF $\alpha$ -Ab-Ala50Cys	57.9%	125.6%
S2 由来 R1	-Ala-Ala-Asp-	R3-2	R4-2	TNF $\alpha$ -Ab-Ala50Cys	28.3%	128.9%
S4 由来 R1	-Ala-Ala-Asp-	R3-2	R4-2	TNF $\alpha$ -Ab-Ala50Cys	21.9%	127.5%
S12 由来 R1	-Ala-Ala-Asp-	R3-2	R4-2	TNF $\alpha$ -Ab-Ala50Cys	11.6%	127.4%
S18 由来 R1	-Ala-Ala-Asp-	R3-2	R4-2	TNF $\alpha$ -Ab-Ala50Cys	0.9%	125.3%

40

## 【 0 2 4 0】

この結果は、R 1 にコンジュゲートすることによって、抗 T N F 抗体の活性が阻害されるが抗体の活性化に影響を及ぼさないことを示している。R 1 のないコンジュゲートの活性化前のその抗原との結合効率は、野生型抗体の抗原との結合の 5 7 . 9 % であった。しかし、活性化後、コンジュゲートの結合効率は、野生型抗体の結合の 1 2 5 . 6 3 % に向上した。R 1 を同じ R 2 - R 3 - R 4 および変異型抗体に結合した後、それは、結果として得られたコンジュゲートがその抗原に結合するのを防止した。そして、この結合の防止は、R 1 の分子量の増加に伴って増加した。S 1 8 は、コンジュゲートがその抗原に結合するのを完全に防止することができた。しかし、結合活性は、レグミンによる切断後

50

に回復した。  
【 0 2 4 1 】  
【 表 2 6 】

表 2 6 : コンジュゲートとのコンジュゲート後およびコンジュゲートアームの活性化後の抗 C T L A - 4 抗体および抗 C D 2 8 抗体の結合活性の変化

コンジュゲーションアーム	R5	活性化前の結合効率	酵素または酸による活性化後の結合効率
S7	CD28-Gly44Cys	22.5%	143.4%
S8	CD28-Ala40Cys	15.6%	137.4%
S9	CD28-Thr97Cys	3.2%	156.3%
S10	CTLA-4-Ser26Cys	67.4%	143.5%
S13	CTLA-4-Ser28Cys	24.4%	145.3%
S14	CTLA-4-Tyr92Cys	22.5%	143.4%
S15	CTLA-4-Leu34Cys	15.6%	137.4%
S16	CTLA-4-Gly51Cys	3.2%	156.3%

10

20

【 0 2 4 2 】

この結果は、R 1 にコンジュゲートすることによって、抗 C D 2 8 抗体および抗 C T L A - 4 抗体の活性が阻害されるが、抗体の活性化に影響を及ぼさないことを示している。

【 0 2 4 3 】

実施例 4 から、コンジュゲートの活性化効率と回復後の抗原へのその結合能が、抗体の変異位置によってある程度影響されたことを見出すことができた。しかし、R 4 を使用すると、酵素的な切断による予想された活性化効率を生じることができず。生体分子とそのリガンドとの間の結合については、活性化による切断後に生じた R 4 の露出基は、抗体変異体の結合能を調節することができた。異なる露出基は、異なる変異位置に異なる効果を及ぼした。R 1 および D 4 についてスクリーニングすることによって、R 1 の妨害機能が、コンジュゲートのその抗原との結合能の完全な欠失をもたらすことを見出すことができた。しかし、この結合能は、酵素による標的切断後に回復または増強さえされた。このようなコンジュゲート型抗体は、病態の微小環境において標的酵素が高発現または分泌されている領域でのみ活性化されて抗体またはタンパク質を放出する。そのため、このような微小環境活性化型抗体は、図 1 0 に示されるような新しい標的活性化型抗体である。

30

【 0 2 4 4 】

実施例 5 : 抗体が免疫指標に促進または阻害

1 . 抗 P D - 1 抗体は T 細胞が I F N -  $\gamma$  を分泌することを促進した

ヒト全血 ( 上海瑞金病院 ) を希釈し、等量の P B S に均一に混合した。希釈溶液を、リンパ球分離溶液含む別の遠沈管へ、遠沈管の壁伝いにゆっくりと移して、希釈溶液がリンパ球分離溶液の上に分離層を形成するようにした。界面を明瞭に保った。管を 2 0 0 0 r p m で 2 0 分間遠心分離した。遠心分離後、遠沈管を取り出した。管内の溶液は層を形成していた。単核細胞層を 5 0 m L 遠沈管に抜き取った。5 倍容量の P B S を添加して均一に混合し、混合物を 2 0 0 0 r p m で 1 0 分間遠心分離した。上清を廃棄し、沈殿を P B S に再懸濁した。次いで、結果として得られた混合物を、1 5 0 0 r p m で 1 0 分間遠心分離し、結果として得られたヒト末梢血単核細胞 ( P B M C ) を、5 % 加熱非働化ヒト血清を含有する R P M I 1 6 4 0 完全培地に再懸濁した。ヒト P B M C を 9 6 ウェルプレートにウェル当たり 1 ~ 2  $\times 10^5$  細胞個の濃度で播種した。細胞を 0 . 1  $\mu$  g / m L S E B により 3 日間刺激した。非接着細胞 ( 主に単核細胞 ) を採集して、新しい 9 6 ウェルプレートに均一に播種した。変異のない各種濃度の抗 P D - 1 抗体または P D - 1 - A b

40

50

- C y s 2 8 - S - S 1 3 コンジュゲートを添加し、37℃、5% CO<sub>2</sub>で4日間培養した。上清を採集し、細胞毒性因子 I F N -  $\gamma$  の濃度を E L I S A キットによって検出した。結果は、図 1 1 に示されるように、活性化された抗 P D - 1 抗体が、I F N -  $\gamma$  を分泌する活性を僅差でまたは顕著にさえ向上して呈することを示していた。

#### 【 0 2 4 5 】

この結果は、抗 P D - 1 抗体コンジュゲートの *i n v i t r o*での活性化後に、抗 P D - 1 抗体の T 細胞への刺激が回復できただけでなく、切断後に生じた残りの基が抗体 1 つまたは複数の新しい官能基を導入できたことを示している。結果として、活性化後に、P D - 1 - A b - C y s 2 8 - S - S 1 3 は、そのような活性化 T 細胞の活性を増強した。このようなコンジュゲート型抗体は、病態の微小環境において標的酵素が高発現または分泌されている領域でのみ活性化されて抗体またはタンパク質を放出する。そのため、このような微小環境活性化型抗体は、新しい標的活性化型抗体である。

10

#### 【 0 2 4 6 】

2 . 抗 P D - 1 抗体および抗 C D 2 8 抗体のコンジュゲートは、身体の自己免疫を低減する

当技術分野に周知されているように、抗 P D - 1 抗体は腫瘍の治療に有効な薬剤であるにも関わらず、現在の臨床研究で、抗 P D - 1 抗体が 2 つの主要な課題を呈することが見出された。一方の課題は、患者が抗体の投与後に高熱と偽増悪という副作用を呈するものとなることであるが、その機構は不明である。我々は、非疾患環境での曝露時間または活性薬剤の用量を低減するように、抗体をコンジュゲートによって阻害または遮断し、局所環境に達した後に放出すれば、これらの副作用が改善される可能性があるものと推定した。この理由から、I 型糖尿病に罹患した ( N O D ) マウスを用いて実験を実施した。この種類のマウスの糖尿病は自己免疫疾患であり、その場合、自己活性化された T リンパ球細胞が膵島細胞を破壊し、その結果、インスリンの分泌が不十分となる。まず、10 週齢の雌 N O D ( 北京維通利華実験動物技術有限公司 ) に、対照 I g G、低容量 ( 1 m p k )、培地 ( 5 m p k )、または高用量 ( 1 5 m p k ) の抗体または抗体のコンジュゲートをそれぞれ、0 日目に注射した。尿中グルコースおよび 2 つの血糖レベルを含む糖尿病の指標を、尿グルコースの新しい指標が観察されなくなるまで、12 日間にわたって毎日観察した。

20

#### 【 0 2 4 7 】

P D - 1 - A b - C y s 2 8 - S - S 1 3 コンジュゲートによる自己免疫からの保護を図 1 2 に示し、C D 2 8 - A b - C y s - S - S 1 3 コンジュゲートによる自己免疫からの保護を図 1 3 に示した。

30

#### 【 0 2 4 8 】

結果は、抗 P D - 1 抗体のコンジュゲートによる免疫系の保護が、抗 P D - 1 抗体に比べて約 1.5 倍増加し、抗 C D 2 8 抗体のコンジュゲートによる免疫系の保護が、抗 C D 2 8 抗体に比べて約 1.0 倍増加したことを示している。そのため、連結部分を用いてタンパク質または抗体の活性を妨害または低減した場合、ヒドロラーゼおよび疾患の微小環境外の生理的環境に起因して、抗 P D - 1 抗体および抗 C D 2 8 抗体を活性化し難かったことから、コンジュゲートされたタンパク質または抗体の正常組織の関連リガンドとの結合が低減されたことが分かった。結果として、コンジュゲートは、一次抗体に比べて自己免疫を低減することができた。

40

#### 【 0 2 4 9 】

3 . 抗 C D 2 8 抗体のコンジュゲートは、C D 4 細胞または C D 8 細胞を特異的に活性化する

C D 8 + T 細胞および C D 4 + T 細胞を、ヒト末梢血単核細胞から、C D 8 または C D 4 の磁気ビーズ ( D y n a b e a d s ) を用いて、キットの仕様書に示された特定のステップに従って単離し、計数し、C F S E 仕様書に従って染色した。細胞を 96 ウェルプレートにウェル当たり 1 ~ 2 × 10<sup>5</sup> 細胞個の濃度で播種した。適切な量の対照抗 C D 3 / 抗 C D 2 8 抗体、0.3  $\mu$ g / m l の抗 C D 2 8 抗体または抗 C D 2 8 抗体のコンジュゲ

50

ートをそれぞれ添加した。

【0250】

結果を図14に示す。この結果によれば、元の抗CD28抗体に比較すると、重鎖コンジュゲートCD28 - Ab - Gly44Cys (CD28 - Ab - Cys44 - S - S13)は、CD4 T細胞を選択的に活性化することができ、軽鎖コンジュゲートCD28 - Ab - Ser52Cys (CD28 - Ab - Cys52 - S - S13)は、CD8 T細胞を選択的に活性化することができた。この結果が示しているのは、連結部分を使用してタンパク質または抗体の活性を妨害または低減すると、ヒドロラーゼが疾患の微小環境では低いレベルで発現し、ヒドロラーゼが抗体またはタンパク質にコンジュゲートされた連結部分を活性化しにくいために、抗体またはタンパク質が標的組織に達する前では、連結部分にコンジュゲートされた抗体の正常組織における関連抗原との結合が低減されていることを示している。連結部分とコンジュゲートされた抗体が、炎症性の微小環境などの疾患の微小環境に達すると、コンジュゲートされた連結部分は、Tregの表面に発現しているレグマインによって活性化され、それによって、Tregの増殖が刺激され、炎症性の反応が阻害される。腫瘍領域では、コンジュゲートされた連結部分は、CD8細胞の表面に発現しているグランザイムBによって活性化され、それによって、CD8細胞の増殖が刺激され、腫瘍の進展が阻害される。設計されたコンジュゲートは、微小環境でヒドロラーゼによって調節され、抗体の活性は、コンジュゲートされた連結部分が加水分解された後にのみ放出される。結果として、連結部分にコンジュゲートされた抗体を、微小環境で高く濃縮することができた。最終的には、全体の効果、すなわち、副作用の低減と有効性の向上とを達成することができた。

10

20

【0251】

実施例6：微小環境で活性化された抗PD-1抗体は、MC38腫瘍を治癒させることができた

ヒトPD-1融合タンパク質を形質転換されたトランスジェニックC57BL/6マウス(上海南方模式生物研究中心)に、MC38細胞をマウス当たり濃度 $2 \times 10^6$ 細胞で皮下接種した。1週間後、MC38腫瘍を移植されたマウスを無作為に4群に分けた。週2回、2週間にわたって、第1群には10mg/kg抗PD-1抗体キイトルーダを注射し、第2群には2mg/kg抗PD-1抗体キイトルーダを注射し、第3群には1mg/kgPD-1 - Ab - G28C - S13コンジュゲートを注射し、第4群には溶媒対照を注射した。マウス内の腫瘍を週3回記録した。結果を図15に示した。

30

【0252】

ヒトPD-1融合タンパク質を形質転換されたマウスはトランスジェニックマウスである。その内在性のPDCD1遺伝子は、ヒトPDCD1に置き換えられ、それによってヒトPDCD1タンパク質が発現される。そのようなマウスは、ヒト抗PD-1抗体にตอบสนองし、下流免疫を刺激することができる。結果は、10mg/kgの抗PD-1抗体がMC38腫瘍の成長を効果的に阻害することができたことを示しており、1頭のマウスが治癒し、5匹のマウスが80%以上という顕著な阻害活性を示した。1mg/kgのPD-1 - Ab - G47C - S13コンジュゲートは、10mg/kgの抗PD-1抗体キイトルーダよりも良好な阻害効果を生じた。この結果は、抗PD-1抗体のコンジュゲートが、実施例5に証明されたように、エフェクターT細胞の活性と腫瘍微小環境における抗体の濃縮とを増強することができたことを実証している。このように、コンジュゲートは元の抗体よりも向上した有効性を呈する。

40

【0253】

実施例7a：微小環境で活性化されるIL2タンパク質

IL2のアミノ酸配列は、天然のヒトIL2タンパク質である。そのDNA配列を、宿主における発現用に最適化して合成した(ジーンウィズ社、蘇州、中国)。合成されたDNAを消化して改変型pTT5ベクター(バイオベクター)にライゲーションし、pTT5 - IL2を作製した。pTT5 - IL2を鋳型として使用し、変異位置でコドンを選択的に置き換えるようにプライマーを設計し、変異された断片を改変型pTT5

50

ベクター内へとPCR、消化、および構築することによって、変異型ベクターを構築した。IL2遺伝子の合成、変異、およびトランスフェクションを、実施例2に記載された方法にしたがって実施した。リガンドIL2RaまたはIL2Rbとのその結合活性を、変異位置にしたがってIPおよびELISAにより解析した。

【0254】

微小環境における巨大分子の活性化を立証することは、抗体に限定されないが、様々なタンパク質に適用可能であり、サイトカインIL2を本明細書に一例として使用した。その変異位置、活性、リンカーアーム、ならびに活性化後の活性および機能をスクリーニングした。結果を以下の表27～表29に示す。

【0255】

10

20

30

40

50

## 【表 2 7】

表 2 7 : 変異型 I L 2 の活性よびリンカーアームについてのスクリーニング

アミノ酸	位置	阻害性リガンド のタイプ	変異後の IL2Ra と の結合活性	変異後の IL2Rb と の結合活性	S3 とのコン ジュゲーション	S13 とのコン ジュゲーション
Lys	32	α	86.5%	100%	26.1%	
Lys	35	α	87.1%	100%		32.4%
Thr	37	α	98.1%	100%		
Thr	41	α	99.2%	100%	18.7%	
Lys	43	α	89.9%	100%		31.3%
Lys	48	α	88.4%	100%		
Lys	49	α	79.8%	100%		39.4%
Leu	72	α	98.8%	100%		25.5%
Ala	73	α	84.3%	100%	27.9%	
Ser	75	α	86.2%	100%		
Lys	76	α	85.0%	100%		32.2%
Leu	94	α	99.6%	100%		27.2%
Thr	101	α	99.8%	100%		32.0%
Thr	102	α	95.3%	100%		29.6%
Ala	108	α	93.9%	100%		16.9%
Thr	111	α	94.9%	100%		35.3%
Ala	112	α	97.3%	100%		41.9%
Leu	19	β	100%	97.5%	39.5%	
Gly	27	β	100%	42.3%		
Ser	75	β	100%	93.3%		31.1%
Leu	80	β	100%	27.0%		
Ser	87	β	100%	31.6%		
Leu	94	β	100%	47.6%		
Gly	98	β	100%	79.5%		16.9%
Ser	99	β	100%	99.2%		18.9%
Thr	101	β	100%	21.7%		
Thr	133	β	100%	96.9%		27.8%
Thr	51	γ	100%	100%	89.70%	91.60%

10

20

30

40

## 【 0 2 5 6】

この結果から、天然の I L 2 に比べてその対応の受容体との 8 0 % 以上の結合活性を保持していた変異体について、リンカーアームの長さを調節することによって、それらの受容体結合活性を阻害または妨害できることを見出すことができた。例えば、L y s 3 2、T h r 4 1、A l a 7 3、または L e u 1 9 を C y s に変異した後に、結果として得られた各変異体を S 3 にコンジュゲートすることによって、それらの対応の受容体との結合活性の 6 0 % を阻害することがあるのに対し ; L y s 3 5、L y s 4 3、L e u 7 2、L y s 7 6、L e u 9 4、T h r 1 0 1、T h r 1 0 2、A l a 1 0 8、T h r 1 1 1、A l a 1 1 2、G l y 9 8、S e r 9 9、T h r 1 3 3 など C y s に変異した後に、結果とし

50

て得られた各変異体を S 1 3 にコンジュゲートすることによって、それらの対応の受容体との結合活性の 6 0 % 以上を阻害することがある。

【 0 2 5 7 】

【 表 2 8 】

表 2 8 : コンジュゲートされた I L 2 の切断効率

R2	R3	R4	R5	切断効率
-Ala-Ala-Asp-	R3-2			対照、100%
-Ala-Ala-Asp-	R3-2	パクリタキセル (2-OH)		45.5%
-Ala-Ala-Asp-	R3-2	R4-10	IL2-Thr37	86.5%
-Ala-Ala-Asp-	R3-2	R4-11	IL2-Thr37	92.7%
-Ala-Ala-Asp-	R3-2	R4-12	IL2-Thr37	96.7%
-Ala-Ala-Asp-	R3-2	R4-13	IL2-Thr37	73.9%
-Ala-Ala-Asp-	R3-2	R4-14	IL2-Thr37	62.4%
-Ala-Ala-Asp-	R3-2	R4-1	IL2-Thr37	73.8%
-Ala-Ala-Asn-	R3-2	R4-3	IL2-Thr37	84.7%
-Ala-Ala-Asp-	R3-2	R4-1	IL2-Thr41	86.7%
-Ala-Ala-Asp-	R3-2	R4-3	IL2-Thr41	95.5%

【 0 2 5 8 】

結果は、自動的に脱落するアーム R 3 が小さな分子鎖状構造を有するために、レグマインによる活性化が影響を受けないことを示している。

【 0 2 5 9 】

【 表 2 9 】

表 2 9 : I L 2 を R 1 にコンジュゲートした後および連結アームを活性化した後のその受容体との結合効率の変化

R1	R5	活性化前の結合効率	酵素または酸による活性化後の結合効率
S3	IL2-Thr37	28.1%	143.5%
S5	IL2-Ser87	31.6%	145.3%
S6	IL2-Thr-41	99.2%	124.8%
S13	IL2-Leu-19	97.5%	118.7%

【 0 2 6 0 】

このように、コンジュゲートの活性化効率および活性化後の受容体とのその結合能は、タンパク質の変異位置によってある程度影響を受けることが分かった。しかし、R 4 を使用すると、標的酵素切断により活性化効率を生じることができた。生体分子とそのリガンドとの間の結合について、活性化による切断後に生じた R 4 の露出基は、変異型抗体の結合能を調節することができた。異なる露出基は、異なる効果を異なる変異位置に及ぼした。R 1 および D 4 についてスクリーニングすることによって、R 1 の妨害機能により、コンジュゲートのその抗原との結合能が完全に失われることを見出すことができた。しかし、この結合能は、標的酵素による切断後に回復または増強さえされた。このようなコンジュゲート型タンパク質は、病態の微小環境中の標的酵素を高発現または分泌する領域でのみ、その活性を活性化または放出される。ゆえに、このようなタンパク質は、新しい標的

活性化タンパク質である。

【0261】

2つ以上の変異を有するIL2変異体を調製し、S13にコンジュゲートした。1つの変異を有し受容体との95%以上の結合活性を有する上述のIL2変異体の変異部位から、変異部位を選択した。活性化後のそのようなコンジュゲートの活性を検証し、結果を表30に示した。

【0262】

【表30】

表30：2つ以上の変異を含むIL2変異体のコンジュゲートのその受容体活性化前後の結合活性

R1-R2-R3-R4	R5	活性化前の結合効率	酵素または酸による活性化後の結合効率
S13	IL2-Thr37/Leu19	12.1%	113.5%
S13	IL2-Ser37/Thr41	11.6%	98.3%
S13	IL2-Thr41/Ser87	19.2%	102.8%
S13	IL2-Leu19/Ser87	17.5%	96.7%
S13	IL2-Leu19/Ser37/Ser87	10.9%	95.9%

【0263】

上記の結果は、2つ以上の変異を含むIL2変異体のコンジュゲートが、活性化後に対応の受容体との95%以上の結合活性を保持することができたことを実証している。

【0264】

IL2タンパク質のコンジュゲートは、特異的にCD4細胞またはCD8細胞を活性化する。

CD8+T細胞とCD4+T細胞とを、キットの仕様書に示された具体的なステップに従って、ヒト末梢血単核細胞からCD8またはCD4の磁気ビーズ(Dynabeads)により単離し、計数し、CFSEの仕様書にしたがって染色した。細胞を96ウェルプレートにウェル当たり1~2x10<sup>5</sup>細胞個の濃度で播種した。適切な量の対照抗CD3抗体、0.05ug/mlのIL2タンパク質またはS16にコンジュゲートされたコンジュゲートIL2-T41C-S16コンジュゲートをそれぞれ添加した。図16は、S16とのIL2-T41C(IL2-Thr41Cys)のコンジュゲーションを示す。図17は、コンジュゲーション前後のIL2受容体アルファとの結合を示す。図18は、活性化前後でIL2-C41-S16コンジュゲーションがT細胞の増殖に及ぼす効果を示す。

【0265】

天然のIL2は、CD8およびCD4に対し類似した刺激を呈する。しかし、微小環境で活性化される機能性部分にコンジュゲートした後、IL2-Thr37CysおよびIL2-Thr41Cysは、CD8 T細胞の増殖を特異的に活性化し、CD4細胞の増殖を低減することができた。CD8細胞とCD4細胞との細胞数の比は、元の1:1から410:1および157:1にそれぞれ増加した。IL2-Leu19CysおよびIL2-Ser87Cysは、CD4 T細胞の増殖を特異的に活性化することができ、CD4/CD8の細胞比は、435:1および126:1にそれぞれ増加した。結果を図19に示す。この結果は、IL2を機能性部分にコンジュゲートしてその各受容体との結合活性を制御し、特異的な微小環境でそれを活性化することを可能にすることによって、CD8またはCD4を選択的に活性化できたことを実証している。

10

20

30

40

50

## 【0266】

IL2タンパク質のコンジュゲートは、メラノーマB16F10および結腸がんMC38の成長を効果的に阻害する。

マウス当たり $0.5 \times 10^6$ 個のB16F10細胞を、C57BL/6マウスに皮下接種した。1週間後、腫瘍体積が $100 \text{ mm}^3$ に達した際に、メラノーマを移植したマウスを無作為に4群に分けて群当たりマウス6頭とした。第1群には、毎週、 $2.5 \text{ mg/kg}$ のIL2-T37C-S14タンパク質コンジュゲートを注射した。第2群には、毎週、 $0.5 \text{ mg/kg}$ のIL2-Thr37Cysタンパク質コンジュゲートを注射した。第3群には、週2回、 $3 \text{ mg/kg}$ のアルデスロイキン（対照）を注射した。第4群には、週2回、溶媒（対照）を注射した。全群に、3週間にわたって継続的に投与した。マウスの腫瘍を週2回測定し、マウスを週2回秤量した。

10

## 【0267】

ヒトPD-1融合タンパク質に形質転換されたトランスジェニックC57BL/6マウスに、MC38細胞をマウス当たり $0.5 \times 10^6$ 細胞個の濃度で皮下接種した。1週間後、MC38腫瘍を移植したマウスを無作為に4群に分けた。第1群には、 $2 \text{ mg/kg}$ のIL2-T37C-S14タンパク質コンジュゲートを注射した。第2群には、週2回、 $0.5 \text{ mg/kg}$ のIL2-Thr37Cysコンジュゲートと毎回 $100 \mu\text{g}$ の抗PD-1抗体とを注射した。第3群には、週2回、 $3 \text{ mg/kg}$ のアルデスロイキン（対照）を注射した。第4群には、週2回、溶媒（対照）を注射した。全群に、3週間にわたって継続的に投与した。マウスの腫瘍を週2回測定し、マウスを週2回秤量した。

20

## 【0268】

結果を図20および図21に示すが、これらは、IL2-Thr37Cysコンジュゲートが、既存のIL2製品であるアルデスロイキンに比べて、使用用量を低減して使用できただけでなく、B16F10腫瘍を治療する効果を顕著に増強できたことを実証している。そして、抗PD-1抗体との併用治療群では、治癒しているMC38マウスがあった。

## 【0269】

上記の結果から、機能性部分を用いてタンパク質または抗体の活性を妨害または低減した場合、ヒドロラーゼおよび疾患の微小環境外の生理的環境によって、タンパク質にコンジュゲートされた機能性部分を活性化し難いことから、正常組織におけるタンパク質のその受容体またはリガンドとの結合を、標的組織に達する前に低減できたことを見出すことができた。しかし、疾患の微小環境では、IL2-Thr37CysおよびIL2-Thr41Cysなどは、疾患の微小環境のヒドロラーゼによる影響を受け、グランザイムBを高発現するCD8細胞の表面で活性化され、それによって、CD8細胞の表面で受容体に結合し、CD8細胞を活性化した。結果として、機能性部分を有するタンパク質コンジュゲートは、標的とされた有効性を増強するとともに、免疫毒性を低減することができた。

30

## 【0270】

同じ理由により、IL2-Leu19CysおよびIL2-Ser87Cysを、レグマインを高発現するTreg細胞の表面で活性化し、活性化されたIL2をTreg細胞の表面の受容体に結合させてTreg細胞の増殖を活性化させることが可能となった。

## 【0271】

実施例7b：腫瘍微小環境により活性化されるIL2サイトカイン（IL2TMEAKine）

## 1. 変異体IL2サイトカインの発現および精製

改変型pTT5ベクター（バイオベクター）にライゲーションされた変異体IL2のDNA配列は、293T細胞での発現のために最適化し合成（ジーンウィズ社、蘇州、中国）したものである。変異体IL2のDNAのトランスフェクションを実施した。4～7日間のインキュベーションの後、変異体IL2を含有する上清を採集した。

## 【0272】

真核生物による発現では、変異体IL2遺伝子を含む発現ベクターpPICZ Aを最適化し調製（ジーンウィズ社、蘇州、中国）した。野生型IL2のアミノ酸配列を下記

50

に記載した。

A P A S S T K K T Q L Q L E H L L L D L Q M I L N G I N N Y K N P K L T R M L T  
F K F Y M P K K A T E L K H L Q C L E E E L K P L E E V L N L A Q S K N F H L R  
P R D L I S N I N V I V L E L K G S E T T F M C E Y A D E T A T I V E F L N R W  
I T F S Q S I I S T L T ( 配列番号 1 1 ) 。

【 0 2 7 3 】

発現ベクター p P I C Z A を、プラスミド精製のために大腸菌 ( D H 5 ) に形質  
転換した。次いで、p P I C Z A を、エレクトロポレーションによって G S 1 1 5 に  
形質転換した。1 0 0、3 0 0、5 0 0、1 0 0 0、1 5 0 0、2 0 0 0 u g / m L のゼ  
オシン ( 商標 ) 含有 Y P D プレート上で成長させた後に成長していたコロニーを得ること  
によって、形質転換されたコロニーを選択した。形質転換体を最終的に選択した後、組換  
え G S 1 1 5 株を、バッフルフラスコにて激しい攪拌により、B M G Y 培地中 3 0 で成  
長させて O D 6 0 0 値 2 ~ 6 とした。次いで、細胞を遠心分離によりペレットとし、B M  
M Y に再懸濁して O D 6 0 0 値 1 とし、異種タンパク質発現を誘導するために 0 . 5 % メ  
タノールを毎日添加した。4 日間の誘導後、分泌された変異体 I L 2 タンパク質を含有す  
る上清を、遠心分離により採集した。上清中の総タンパク質を、1 0 k D a 分子量カット  
オフ膜を用いて限外濾過により濃縮した。濃縮されたタンパク質を、緩衝液 A ( 5 0 m M  
H A c / N a A c , p H 4 . 5 ) により 2 4 時間超にわたって透析し、次いで、緩衝液 A  
により平衡化された陽イオン交換カラムにロードした。変異体 I L 2 を、勾配濃度の N a  
C l によりカラムから溶出し、溶出物を採集し濃縮した。濃縮された試料を、S e p h a  
c r y l S - 1 0 0 H R ゲル濾過カラムにて、2 0 m M T r i s - H C l、2 0 m M  
N a C l、p H 7 . 4 を溶出緩衝液として用いてさらに精製した。

10

20

【 0 2 7 4 】

原核生物による発現では、変異体 I L 2 遺伝子を含有する発現ベクター p E T 2 2 b ( + ) を、最適化し調製 ( ジーンウィズ社、蘇州、中国 ) した。野生型 I L 2 のアミノ酸配列は、配列番号 1 2 に記載されている。陽性クローンを大腸菌細胞 ( B L 2 1 D E 3 ) にて選択し形質転換した。イソプロピルチオガラクトシド ( I P T G ) を用いた標的タンパク質の誘導のための標準的な手順は、以下の通りとした。誘導された大腸菌細胞を遠心分離し、5 m M E D T A および 1 m M P M S F を含有する 1 0 0 m M T r i s - H C l 緩衝液 ( p H 8 . 0 ) に細胞ペレットを再懸濁した。細胞を超音波処理により溶解し、遠心分離して I L 2 タンパク質封入体 ( I B ) を単離した。次いで、I B ペレットを、5 m M E D T A および 2 % デオキシコール酸塩を含有する 1 0 0 m M T r i s - H C l 緩衝液 ( p H 8 . 0 )、ならびに蒸留水でそれぞれ洗浄した。I B を 6 M 塩化グアニジウム ( G u H C l ) 溶液 ( 0 . 1 M T r i s 緩衝液、p H 8 . 0 中に調製 ) に可溶化し、穏やかなボルテックスにより室温で 3 0 分間インキュベートした後、遠心分離した。上清をリフォールディング緩衝液 ( 1 0 m M 還元および 1 m M 酸化グルタチオンを比 1 0 : 1 で含有する 0 . 1 M T r i s 緩衝液、p H 8 . 0 ) により希釈し、タンパク質濃度および G u H C l をそれぞれ 0 . 1 m g / m L および 2 M で得るようにした。続いて、I L 2 をゆっくりリフォールディングさせるために、溶液を室温で 1 6 時間保った。不溶性タンパク質を遠心分離によって除去した。上清を濃縮し、2 M G u H C l を含有する 0 . 1 M T r i s 緩衝液により平衡化されたゲル濾過カラム S e p h a c r y l S - 1 0 0 H R にロードした。

30

40

【 0 2 7 5 】

形質転換体によって生産される野生型 I L 2 のアミノ酸配列を下記に示す。

P T S S T K K T Q L Q L E H L L L D L Q M I L N G I N N Y K N P K L T R M L T F  
K F Y M P K K A T E L K H L Q C L E E E L K P L E E V L N L A Q S K N F H L R P  
R D L I S N I N V I V L E L K G S E T T F M C E Y A D E T A T I V E F L N R W I  
T F S Q S I I S T L T ( 配列番号 1 2 ) 。

【 0 2 7 6 】

2 . 変異後の I L 2 R または I L 2 R との結合活性についての変異体のスクリーニ

50

ング

様々な I L 2 変異体を、293 T 細胞によって発現し、培地中に分泌させた。I L 2 変異体を含有する上清を、第 1 節に記載されたように遠心分離を介して取得した。次いで、1 u g の H i s タグ付 I L 2 R または I L 2 R を、上述の 1 m L の上清に添加し、穏やかに振盪しながら 4 で 1 時間インキュベートした。50 u L の予洗浄済み N i - N T A レジンを、上清と I L 2 R または I L 2 R との混合溶液に移し、穏やかに振盪しながら 4 で 1 時間インキュベートした。混合物を、遠心分離に供し、上清を廃棄した。結果として得られたペレットを、25 m M イミダゾールを含有する 500 u L の P B S で 3 回洗浄した。I L 2 変異体と I L 2 R / R との量を、I L 2 抗体および抗 H i s タグモノクローナル抗体を用いたウェスタンブロッティングにより可視化した。

10

【0277】

### 3. 変異体 I L 2 への S 4 7 のコンジュゲーション

変異体 I L 2 タンパク質を、上記第 1 節に記載されたように生成して精製した。精製された変異体 I L 2 を、5 m M E D T A を含有する 50 m M リン酸緩衝液 (p H 7 . 4 ) 中、濃度 0 . 3 m g / m L でインキュベートした。T C E P 溶液を変異体 I L 2 にモル比 100 : 1 で添加し、結果として得られた混合物を、穏やかに振盪しながら 4 で 4 時間インキュベートした。次いで、混合物を、150 m M N a C l を含有する 50 m M リン酸緩衝液 (p H 7 . 4 ) により、4 で 2 時間透析した。その後、S 4 7 を直ちに混合物にモル比 20 : 1 で添加し、結果として得られた混合物を、穏やかに振盪しながら 25 で 16 時間インキュベートした。反応を停止し、残存する S 4 7 を除去した。酵素切断の前に、I L 2 - S 4 7 ( I L 2 T M E A k i n e 、腫瘍の微小環境により活性化される I L 2 サイトカイン) のコンジュゲートに使用された緩衝液を、酵素に使用された緩衝液に、透析を介して変換した。次いで、酵素を I L 2 T M E A k i n e 溶液に添加し、混合物を 37 で 16 時間インキュベートした。図 22 は、i n v i t r o での酵素切断後の変異体 I L 2 、I L 2 T M E A k i n e 、および回復活性 I L 2 についてのコロイダルブルー染色による、S D S - P A G E の結果を示す。

20

【0278】

4. I L 2 R または I L 2 R との結合を遮断し、i n v i t r o での酵素切断後に結合活性を回復する I L 2 T M E A k i n e のスクリーニング

1 u g の I L 2 R - F c / I L 2 R - F c 溶液を含有する 60 u L の P B S 緩衝液を、ウェルに分注した。シールテープをプレートの上部に貼り、次いで、プレートを 4 で一晩インキュベートした。インキュベーション後、テープを取り外して、各ウェルを吸引した。P B S T で 3 回洗浄した後、2 % B S A を含有する 200 u L の P B S 緩衝液を各ウェルに分注することによってプレートをブロッキングし、次いで、プレートを室温で 2 時間インキュベートした。プレートを 3 回洗浄し、60 u L の系列希釈された試料を適切なウェルに添加した。プレートを室温で 1 . 5 時間インキュベートした。P B S で 3 回洗浄した後、60 u L の 1 u g / m L I L 2 ビオチン化抗体溶液を各ウェルに分注し、結果として得られた混合物を室温で 1 時間インキュベートした。プレートを 3 回洗浄し、次いで、60 u L のストレプトアビジン溶液を各ウェルに分注した。次いで、プレートを室温で 30 分間インキュベートした。3 回洗浄した後、100 u L の H R P 基質溶液を各ウェルに分注し、プレートを 37 で 15 分間インキュベートした。発色を展開させた後、50 u L の停止溶液を各ウェルに分注し、各ウェルの吸光度を直ちに波長 450 n m で測定した。E L I S A の結果を図 23 に示すが、ここでは、i n v i t r o での酵素切断前後の I L 2 T M E A k i n e の I L 2 R または R との結合活性が示されている。野生型 I L 2 と I L 2 R および I L 2 R との結合活性に比べて、I L 2 T M E A k i n e は、I L 2 R にははるかに低い結合親和性で結合するが、I L 2 R にはほぼ同じ結合親和性で結合する。酵素による活性化後、I L 2 T M E A k i n e の I L 2 R との結合親和性は、野生型 I L 2 の I L 2 R とのものに等しい。

30

40

【0279】

### 5. 様々な I L 2 変異部位の概要

50

IL2受容体は、細胞表面で会合して以下のヘテロマーを形成する：中位親和性の受容体：IL2に対するIL2R $\alpha$ （ $K_d = 1 \text{ nM}$ ）および低親和性の受容体：IL2に対するIL2R $\beta$ （ $K_d = 10 \text{ nM}$ ）。低親和性の結合（ $K_d = 10 \text{ nM}$ ）ゆえに、結合親和性を回復するためのR4基に連結するのに用いる位置をスクリーニングするのは、抗体のCDR領域よりも容易である。我々は、R4-S-IL2とIL2R $\alpha$ との間の結合親和性を増加させようとは思わなかったため、天然の結合親和性を回復することのできる、特別なR4を有するコンジュゲートIL2を選択した。場合によっては、結合親和性を増強することのできるR4基がいくつかあるが、我々はそれらを薬剤候補として選択しなかった。我々は、R-1、R4-7、R4-5、R4-8、およびR4-12を、我々のCMC開発における大規模合成用にした。S47はレグミンにより切断される。切断後、そのR4-7化学基は残される。薬剤候補を選択するために、我々はまた、スクリーニング発現と、IL2R $\alpha$ およびIL2R $\beta$ を結合するドメイン内のIL2の全アミノ酸とのS47のコンジュゲーション反応を実施した。我々は、将来性のある薬剤候補を取得したので、結果を以下の表31～表33に示す。

【0280】

10

20

30

40

50

## 【表 3 1】

表 3 1 : 変異型 I L 2 の活性およびリンカーアームについてのスクリーニング

位置	アミノ酸	阻害性リガンドの タイプ	R4	結合回復 (>60%)	S47 とのコンジュゲーション後のリガンド との結合の減少倍率 (>3 倍)
32	K	$\alpha$	R4-7	100.2%	3 倍
35	K	$\alpha$	R4-7	85.4%	89 倍
37	T	$\alpha$	R4-7	98.9%	51 倍
38	R	$\alpha$	R4- 18	81.2%	145 倍
41	T	$\alpha$	R4-7	99.2%	135 倍
42	F	$\alpha$	R4-8	82.3%	120 倍
43	K	$\alpha$	R4-7	89.3%	110 倍
43	K	$\alpha$	R4- 18	109.7%	
44	F	$\alpha$	R4-8	96.7%	60 倍
45	Y	$\alpha$	R4-7	96.8%	125 倍
45	Y	$\alpha$	R4-8	143.6%	
48	K	$\alpha$	R4-7	100.2%	12 倍
49	K	$\alpha$	R4- 18	100.7%	
60	E	$\alpha$	R4- 12	97.1%	5 倍
61	E	$\alpha$	R4- 12	83.4%	134 倍
62	E	$\alpha$	R4- 12	86.6%	120 倍
63	L	$\alpha$	R4-5	99.3%	13 倍
64	K	$\alpha$	R4-7	97.1%	
67	E	$\alpha$	R4- 12	99.6%	9 倍
68	E	$\alpha$	R4- 12	95.4%	89 倍
71	N	$\alpha$	R4- 18	98.6%	5 倍
72	L	$\alpha$	R4-5	90.1%	110 倍

10

20

30

40

50

74	Q	$\alpha$	R4-19	100.0%	3 倍
75	S	$\alpha$	R4-7	100.0%	4 倍
76	K	$\alpha$	R4-7	100.0%	3 倍
101	T	$\alpha$	R4-7	100.0%	5 倍
102	T	$\alpha$	R4-7	100.0%	4 倍
102	T	$\alpha$	R4-3	122.5%	
107	Y	$\alpha$	R4-4	97.7%	78 倍
108	A	$\alpha$	R4-5	100.0%	10 倍
111	T	$\alpha$	R4-7	98.9%	20 倍
112	A	$\alpha$	R4-5	100.0%	5 倍
5	S	$\beta$	R4-7	99.8%	3 倍
5	S	$\beta$	R4-2	109.5%	
8	K	$\beta$	R4-7	66.7%	6 倍
9	K	$\beta$	R4-6	97.0%	9 倍
9	K	$\beta$	R4-7	124.6%	
12	L	$\beta$	R4-5	93.4%	13 倍
13	Q	$\beta$	R4-19	85.1%	28 倍
15	E	$\beta$	R4-12	81.4%	25 倍
19	L	$\beta$	R4-5	92.3%	27 倍
20	D	$\beta$	R4-11	87.3%	31 倍
27	G	$\beta$	R4-1	100.0%	3 倍
76	K	$\beta$	R4-6	100.0%	3 倍
76	K	$\beta$	R4-7	130.4%	
80	L	$\beta$	R4-2	100.0%	5 倍
81	R	$\beta$	R4-18	95.2%	12 倍
84	D	$\beta$	R4-11	80.1%	36 倍
85	L	$\beta$	R4-7	98.4%	9 倍
85	L	$\beta$	R4-5	113.6%	
87	S	$\beta$	R4-7	99.5%	30 倍

10

20

30

40

50

88	N	$\beta$	R4-18	82.3%	46 倍
91	V	$\beta$	R4-5	94.5%	25 倍
92	I	$\beta$	R4-5	89.3%	19 倍
94	L	$\beta$	R4-5	99.5%	30 倍
95	E	$\beta$	R4-12	60.1%	8 倍
98	G	$\beta$	R4-1	98.6%	4 倍
99	S	$\beta$	R4-7	100.0%	3 倍
101	T	$\beta$	R4-7	100.0%	3 倍
133	T	$\beta$	R4-7	100.0%	3 倍

【 0 2 8 1 】

【 表 3 2 】

表 3 2 : 2 つ以上の変異部位を有する I L 2 変異体のコンジュゲートの活性化前後のその受容体との結合活性

TMEAkine	変異位置 (R $\alpha$ 結合)	変異位置 (R $\beta$ 結合)	S47 とのコンジュ ゲーション後の $\alpha$ リガンドとの結合 の減少倍率	S47 とのコンジュ ゲーション後の $\beta$ リガンドとの結合 の減少倍率	結合回復 (>60% )
IL2-Thr37/Thr3	IL2-Thr37, IL2-Thr3		51 倍	データなし	98.9%
IL2-Thr3/Thr41	IL2-Thr3,IL2- Thr41		135 倍	データなし	101.8%
IL2-Thr-41/Ser87	IL2-Thr-41	IL2-Ser87	135 倍	30 倍	96.8%
IL2-Thr37/Ser87	IL2-Thr37	IL2-Ser87	51 倍	30 倍	98.4%
IL2-Thr3/Ser87	IL2-Thr3	IL2-Ser87	N.D.	30 倍	99.3%

【 0 2 8 2 】

この結果は、2 つ以上の変異部位を有する I L 2 変異体のコンジュゲートが、活性化前後で 9 5 % 以上の対応の受容体との結合活性を保持できたことを実証している。

【 0 2 8 3 】

スクリーニング発現、結合活性、コンジュゲーション、切断、回復、および機能性アッセイの後、我々は、表 3 3 に示されるように、1 つまたは複数の安定な変異を R との結合ドメイン上に、1 つのコンジュゲーションを R との結合ドメイン上に有する、薬剤候補を取得した。具体的には、R に結合するドメイン上の安定な変異部位は、A r g 3 8 および G l u 6 1 であり、そこでは、A r g 3 8 を A s p に変異し、G l u 6 1 を A r g に変異し、それらは I L 2 と I L 2 R との結合活性に影響を及ぼした。そのため、これらのコンジュゲーションは、腫瘍の微小環境で切断された後、R との結合ドメイン上で、安定な変異体を放出する。

【 0 2 8 4 】

## 【表 3 3】

表 3 3 : 1 つまたは複数の安定な変異と 1 つのコンジュゲーションとを有する候補の活性化前後のその受容体との結合活性

TMEAkine	R $\alpha$ の結合を遮断するための安定な変異	S47 とのコンジュゲーションのための変異位置 (R $\beta$ 結合)	S47 とのコンジュゲーション後の $\alpha$ リガンドとの結合の減少倍率	S47 とのコンジュゲーション後の $\beta$ リガンドとの結合の減少倍率	$\beta$ リガンドの結合回復 (>60%)
IL2-Arg38/Ser87	Arg38Asp	Ser87	200 倍	32 倍	99.5%
IL2-Glu61/Ser87	Glu61Arg	Ser87	110 倍	30 倍	99.5%
IL2-Arg38/Glu61/Ser87	Arg38 Asp /Glu61Arg	Ser87	>200 倍	32 倍	96.4%

10

## 【 0 2 8 5】

## 【表 3 4】

20

表 3 4 : 2 つの安定な変異と 1 つのコンジュゲーションとを有する候補の活性化前後のその受容体との結合活性

R $\alpha$ の結合を調整するための変異	R4-7 とのコンジュゲーションのための R $\beta$ の結合の変異体	R $\alpha$ との結合の減少倍率	R $\beta$ との結合回復
Arg38Asp/Glu61Arg		>200 倍	
	Lys9		124.6%
	Lys76		130.4%
Arg38Asp/Glu61Arg	Lys9,Lys76	>200 倍	165.7%

30

## 【 0 2 8 6】

この結果は、R 4 のコンジュゲーションのライブラリースクリーニングおよび変異を用いると、R との結合が 2 0 0 倍に減少し R との結合が 1 . 3 5 倍に増加した新しい化学修飾 I L 2 を得たことを実証している。

## 【 0 2 8 7】

## 6 . ヒト血清中での安定性

40

I L 2 - T 4 1 C - S 4 7 溶液とヒト血清とを比 1 : 1 9 ( v / v ) で混合し、混合物を 3 7 で 0 時間、8 時間、2 4 時間、および 4 8 時間、それぞれインキュベートした。次いで、I L 2 - T 4 1 C - S 4 7 の量をウェスタンブロットによって検出し、対応の結果を図 2 4 に示した。I L 2 - T 4 1 C - S 4 7 は、4 8 時間後にヒト血清中で安定であり、このことは、i n v i t r o でのヒト血清中で、I L 2 - T 4 1 C - S 4 7 が I L 2 よりもはるかに安定であった可能性があることを示している。I L 2 変異体の他のコンジュゲートのヒト血清中での安定性を表 3 5 に示した。

## 【 0 2 8 8】

50

## 【表 3 5】

表 3 5 : ヒト血清中での I L 2 変異体の他のコンジュゲートの安定性

R1-R2-R3-R4	R5	ヒト血清中での安定性
S47	IL2-Thr37	100%
S47	IL2-Thr41	99.8%
S47	IL2-Ser87	99.2%
S47	IL2-Thr41/Ser87	99.5%
S47	IL2-Ser37/Ser87	99.5%

10

## 【0 2 8 9】

## 7 . マウスにおける薬物動態

マウスは、単回の I L 2 - T 4 1 C - S 4 7 ( 0 . 8 m g / k g ) の静脈内注射を受け、サンプリング時間当たりマウス n = 3 頭となるものとした。およそ 2 0 0 u L の血液を K 2 E D T A 被覆チューブに採集した。遠心分離後に血漿を分離し、分析まで - 8 0 で凍結した。次いで、定量 E L I S A を用いて I L 2 - T 4 1 C - S 4 7 濃度を測定した。結果を図 2 5 に示した。i n v i v o での薬物動態試験は、I L 2 T M E A k i n e が I L 2 に比べて半減期が長く血漿中曝露が高いことを示していた。

20

## 【0 2 9 0】

## 8 . 毒性

C 5 7 B L / 6 マウスは、5 日間にわたって P B S もしくは 2 5 u g の I L 2 の腹腔内注射を毎日、または等モルの I L 2 - T 4 1 C - S 4 7 の腹腔内注射を 5 用量について 5 日毎に、それぞれ受けるものとした。マウスを 殺し、肺を 1 0 % ホルマリン溶液により固定し、パラフィン包埋された切片をヘマトキシリンおよびエオシンにより染色した。その結果を図 2 6 に示す。肺の測量 ( 湿重量 ) ならびにヘマトキシリンおよびエオシンにより染色された切片は、I L 2 T M E A k i n e が野生型 I L 2 よりも低い毒性を肺に誘導することを示している。

30

## 【0 2 9 1】

C 5 7 B L / 6 マウスは、P B S 、 2 5 u g の I L 2 - T 4 1 C / S 8 7 C - S 4 7 、および等モルの I L 2 - R 3 8 D / E 6 1 R / S 8 7 C - S 4 7 の腹腔内注射を、5 用量について 5 日毎にそれぞれ受けるものとした。マウスを 殺し、肺を 1 0 % ホルマリン溶液により固定し、パラフィン包埋された切片をヘマトキシリンおよびエオシンにより染色した。その結果を図 2 7 に示す。肺の測量は、I L 2 - T 4 1 C / S 8 7 C - S 4 7 および I L 2 - R 3 8 D / E 6 1 R / S 8 7 C - S 4 7 が毒性を肺にほぼ誘導しないことを示している。

## 【0 2 9 2】

9 . B A L B / C マウスモデルにおいて I L 2 - T 4 1 C - S 4 7 および I L 2 - T 4 1 C - S 4 7 の抗 P D - 1 抗体との併用が C T 2 6 腫瘍モデルに及ぼす有効性の試験

40

試験目的 : C T 2 6 腫瘍モデルの治療のための B A L B / C マウスにおける I L 2 - T 4 1 C - S 4 7 および I L 2 - T 4 1 C - S 4 7 の抗 P D - 1 抗体との併用の抗腫瘍の有効性を検討する。

## 【0 2 9 3】

試験薬剤 : I L 2 - T 4 1 C - S 4 7 、抗 P D - 1 抗体、および I L 2 の注射剤であり、試験時に P B S によって対応の濃度に希釈。

## 【0 2 9 4】

方法および結果 :

1 . 動物 : 5 週齢の B A L B / C マウス、全て雌。

50

【 0 2 9 5 】

2 . 腫瘍モデルの作製

1 ) C T 2 6 細胞をアメリカ培養細胞系統保存機関 ( A T C C ) から購入し、 A T C C により提供された仕様書に従って識別した。細胞を、 1 0 % ウシ胎児血清を含有する R P M I 1 6 4 0 培養溶液中、 3 7 % 、 5 % C O 2 で培養した。細胞を 3 日毎に継代し、 9 継代以内の細胞を使用した。

【 0 2 9 6 】

2 ) 腫瘍モデルの作製。 C T 2 6 細胞を B A L B / C マウスの背中に皮下注射した。腫瘍が約 1 0 0 ~ 2 0 0 m m 3 に成長した後、マウスを無作為に群分けし、薬剤治療を開始した。マウスを 3 1 日目で麻酔後に殺した。

10

【 0 2 9 7 】

3 ) 治療過程

各群に 6 頭の動物を含む 5 つの群があった。含めたのは、 0 日目、 5 日目、および 1 1 日目に治療された対照群、ならびに 3 つの単剤群 ( 抗 P D - 1 抗体により 2 日目、 4 日目、 7 日目、 9 日目、 1 3 日目、および 1 5 日目に、または I L 2 により 0 日目、 5 日目、 1 1 日目に、または I L 2 - T 4 1 C - S 4 7 により 0 日目、 5 日目、および 1 1 日目に治療 ) 、ならびに I L 2 - T 4 1 C - S 4 7 治療 ( 0 日目、 5 日目、および 1 1 日目に投与 ) が開始された後に抗 P D - 1 抗体治療 ( 2 日目、 4 日目、 7 日目、 9 日目、 1 3 日目、および 1 5 日目に投与 ) を行った併用免疫療法群であった。

【 0 2 9 8 】

4 ) 群分けおよび試験結果を表 3 6 に示す。

20

【 0 2 9 9 】

【表 3 6 】

表 3 6 : B A L B / C マウスモデルにおいて I L 2 - T 4 1 C - S 4 7 および I L 2 - T 4 1 C - S 4 7 の抗 P D - 1 抗体との併用が C T 2 6 腫瘍モデルに及ぼす効果

群	完全な退縮
対照群	0
抗 PD-1 抗体	16.79%
IL2	16.79%
IL2-T41C-S47	33%
抗 PD-1 抗体との併用での IL2-T41C-S47	100%

30

【 0 3 0 0 】

腫瘍体積を週に 2 ~ 3 回モニタリングし、図 2 8 に提示した。

【 0 3 0 1 】

5 ) 結果および考察。表 3 6 に示されるように、 B A L B / C マウスの C T 2 6 腫瘍に及ぼされる退縮が、 I L 2 - T 4 1 C - S 4 7 の抗 P D - 1 抗体との併用での注射後に大きく向上し、このことは、 I L 2 - T 4 1 C - S 4 7 の抗 P D - 1 抗体との併用が、優れた抗腫瘍有効性を C T 2 6 腫瘍モデルに呈することを示している。

40

【 0 3 0 2 】

1 0 . 腫瘍、肺、および心臓における I L 2 - T 4 1 C - S 4 7 由来の活性 I L 2 の体内分布

B A L B / C マウスに対し、 C T 2 6 細胞を右側腹部に皮下移植した。移植後 7 日目に、腫瘍が 2 0 0 m m 3 と測定された際に、動物に I L 2 - T 4 1 C - S 4 7 ( 2 m g / k g × 1 ) を投与した。 2 4 時間、 4 8 時間、 9 6 時間、および 1 9 2 時間後、腫瘍、肺、および心臓を採取して ( 観察時間当たり n = 2 ) 、プロテアーゼ阻害剤および 0 . 2 5 %

50

酢酸を含有する氷冷PBS中でホモジナイズし、遠心分離して上清を得た。IL2-T41C-S47レベルを定量するためにELISAを実施し、その際には、PEG抗体を捕捉抗体として使用し、IL2ビオチン化抗体を検出抗体として使用した。IL2-T41C-S47および活性IL2レベルを定量するためにELISAを実施し、その際には、IL2モノクローナル抗体を捕捉抗体として使用し、IL2ビオチン化抗体を検出抗体として使用した。結果を図29に示したが、ここでは、腫瘍における活性IL2の曝露が高いことが標示されており、このことは、肺および心臓において抗腫瘍効果の有効性が高く活性IL2の曝露が低いことに一致し、これは肺水腫の毒性が低いことに一致する。

【0303】

実施例8：高い活性化効率を得るための化学修飾リンカーの選択

R2-R3は、天然のペプチド配列リンカーに比べて高い活性化効率を示す、化学修飾リンカーである。R1が5kDaのPEGでありR4がR4-2および対照リンカー（表に示されるC1-C4）である各種R2-R3リンカーの活性化を、活性化アッセイで評価した。R1-R2-R3-R4コンジュゲートを溶解し、10回希釈して終濃度0.1mM/mLとした。37で、試験化合物を100μgの酸性化ヒト乳房がん（MDA-MB435）腫瘍組織ホモジネート（pH6.0）に濃度1mg/mLで添加した。腫瘍組織ホモジネート中の酵素は、R1を放出することができた。放出されたR1をHPLCにより検出し、それによって、リンカーの活性化効率を比較した。結果を表37～表39に示した。

【0304】

【表37】

表37：各種リンカーの活性化効率（%）

R2-R3	活性化効率（%）
C1: AANL	68.4
C2: AANP	45.9
C3: SDNP	22.7
C4: SANP	32.6
C5: SDNH	23.9
AAN-R3-5	99.6
AAN-R3-6	97.5
AAN-R3-7	73.3
AAN-R3-8	93.3
AAN-R3-9	63.3
AAN-R3-10	55.1
AAN-R3-11	76.3
AAN-R3-12	64.5
AAN-R3-1	99.7
AAN-R3-2	99.5
AAN-R3-3	99.1
AAN-R3-4	98.9

【0305】

## 【表 3 8】

表 3 8 : 各種リンカーの活性化効率 (%)

R2-R3	活性化効率 (%)
C1: AADL	41.7
C2: AADP	37.8
C3: SDDP	46.8
C4: SADP	31.3
C5: SDNH	10.7
AAD-R3-5	92.3
AAD-R3-6	90.5
AAD-R3-7	84.6
AAD-R3-8	86.7
AAD-R3-9	73.4
AAD-R3-10	53.6
AAD-R3-11	49.6
AAD-R3-12	57.7
AAD-R3-1	93.7
AAD-R3-2	96.5
AAD-R3-3	90.1
AAD-R3-4	97.9

10

20

## 【0 3 0 6】

## 【表 3 9】

表 3 9 : 各種リンカーの活性化効率 (%)

R2-R3 (R2 は不在)	活性化効率 (%、pH6.0)
R3-1	43.3
R3-2	65.1
R3-3	46.3
R3-4	60.1
R3-5	8.8
R3-6	79.5

30

40

## 【0 3 0 7】

MDA - MB 4 3 5 腫瘍組織は、高い活性のレグマイン、グランザイム B、および MMP 2 または他のプロテアーゼを呈する。アッセイでは、AAN - R3 - 5、AAN - R3 - 6、AAD - R3 - 5、AAD - R3 - 6、AAD - 3 - 7、および AAD - R3 - 8 は、比較的高い活性化効率 (> 80%) を有することが証明された。R2 が不在である際に、R3 - 5 は、pH 6.0 で安定であり、R3 - 2、R3 - 4、および R3 - 6 は、酸性 (pH 6.0) により活性化される、比較的高い活性化効率 (> 60%) を有するリンカーである。

50

## 【0308】

実施例9：異なる腫瘍の微小環境における標的化された活性化を行うための異なる活性化可能なリンカーの活性化効率

R1を5kDaのPEGとし、かつR4をR4-2とした6つのR1-R2-R3-R4コンジュゲートを、各種ヒト腫瘍組織で検出した。R1-R2-R3-R4コンジュゲートをそれぞれ溶解し、10回希釈して終濃度0.1mM/mLとした。37で、試験化合物を100μgの各種酸性化ヒト腫瘍組織ホモジネート(pH6.0)に濃度1mg/mLで添加した。腫瘍組織ホモジネート中の酵素は、R1を放出することができた。放出されたR1をHPLCにより検出し、それによって、リンカーの活性化効率を比較した。結果を表40に示した。

## 【0309】

## 【表40】

表40：異なる腫瘍組織由来のホモジネート中でのR3-3、R3-5、R3-6、AAN-R3-5、AAN-R3-6、およびAAD-R3-5の活性化効率(%)

腫瘍組織	腫瘍を産生する細胞	活性化効率(%)					
		R3-2	R3-4	R3-6	AAN-R3-5	AAN-R3-6	AAD-R3-5
ヒト線維肉腫	HT-1080	63.7	64.7	78.9	87.2	84.5	89.5
ヒト乳がん	MDA-MB231	66.3	53.7	89.6	97.8	84.7	92.6
ヒト卵巣がん	SK-OV-3	56.6	35.7	78.4	99.4	85.8	95.8
ヒト結腸がん	HT-29	63.8	56.7	58.8	93.6	83.7	91.5
ヒト慢性白血病	K562	64.8	53.8	58.3	88.2	84.6	84.8
ヒト膵臓がん	Panc-1	46.8	73.8	74.8	96.1	94.8	79.8
ヒト非小細胞肺癌	A549	57.8	62.7	74.7	86.2	85.8	96.4
ヒト前立腺がん	PC-3	37.8	64.8	89.6	96.5	94.7	89.6
ヒト肝臓がん	Hepg2	46.8	64.5	45.8	87.0	83.6	85.7
ヒト腎がん	OS-RC-2	35.7	54.6	75.7	95.7	90.4	88.4
ヒト心臓		8.6	3.7	7.4	0.1	0.1	6.8
ヒト肺		6.7	6.5	4.9	0.1	0.1	1.8

## 【0310】

実施例10：化学修飾リンカーは、腫瘍組織プロテアーゼにより活性化された際に、各種生体分子に対し立体障害を示さない

R4-1は、例示されたR4基のうち最も短い化学基である。各種生体分子を、R1-R2-R3-R4にコンジュゲートし、ここでは、R1を5kDaのPEGとし、R2-R3を以下の表に示されるものとし、R4をR4-1とした。コンジュゲートを溶解し、10回希釈して終濃度0.1mM/mLとした。37で、コンジュゲートをそれぞれ、100μgの各種酸性化ヒト腫瘍組織ホモジネート(pH6.0)に濃度1mg/mLで添加するか、またはレグマイン溶液(0.1μg/mL)もしくはグランザイムB溶液(0.1μg/mL)に添加した。腫瘍組織ホモジネート中の酵素は、R1を放出することができた。放出されたR1をHPLCにより検出し、それによって、リンカーの活性化効率を比較した。結果を表41に示した。

## 【0311】

10

20

30

40

50

## 【表 4 1】

表 4 1 : 各種抗体のリンカーの活性化効率 (%)

生体分子	活性化効率 (%)				レグマイン	グランザイム B
	AAN-R3-5	AAN-R3-6	AAD-R3-5	R3-6	AAN-R3-5	AAD-R3-5
ヒト IL2 (配列情報 11)	95.6	94.4	93.4	67.8	99.5	102.8
PD-1 (配列情報 19)	91.4	88.6	82.8	76.4	101.6	94.7
ニボルマブ (配列情報 18)	82.4	92.9	94.6	63.6	103.6	99.5
ペムプロリズマブ (配列情報 15)	87.7	76.3	73.2	67.2	100.6	97.7
Ipl (CTLA-4Ab) (配列情報 13)	97.8	93.8	94.5	66.1	99.4	102.7
抗ヒト 4-1BB (配列情報 25)	89.5	92.4	84.4	66.2	96.8	104.4
アダリムマブ (配列情報 29)	100.3	101.4	79.3	76.5	99.1	93.7
Niv-se001 (配列情報 41)	88.7	87.6	76.5	77.0	103.7	95.7

## 【 0 3 1 2 】

この結果は、R 2 の切断部位が生体分子 ( R 5 ) から遠いことを実証している。最も短い R 4 - 1 を用いてさえ、R 2 の切断は生体分子による影響を及ぼされず、活性化効率は影響を及ぼされなかった。

## 【 0 3 1 3 】

実施例 1 1 : ヒト血清における化学修飾リンカーの安定性

化学修飾リンカー R 2 - R 3 の安定性を、ヒト血清中で試験した。R 1 を 5 k D a の P E G ( P E G 5 0 0 ) とし、R 2 - R 3 を以下の表に示されたものとし、R 4 を R 4 - 1 とした、R 1 - R 2 - R 3 - R 4 コンジュゲートを調製した。このコンジュゲートを溶解し、10回希釈して終濃度 0 . 1 m M / m L とした。コンジュゲートを濃度 1 m g / m L で、100 μ g のヒト血清に、37 で 4 8 時間、それぞれ添加した。無傷のコンジュゲートは、E L I S A アッセイによって検出することができる。残存するコンジュゲートの濃度を比較することによって、安定性を計算することができた。結果を表 4 2 および表 4 3 に示した。

## 【 0 3 1 4 】

10

20

30

40

50

## 【表 4 2】

表 4 2 : 各種リンカーの安定性 (対照%)

R2-R3	安定性 (対照の%)
C1: AANL	97.4
C2: AANP	55.9
C3: SDNP	72.7
C4: SANP	62.6
C5: SDNH	73.9
AAN-R3-5	99.9
AAN-R3-6	99.5
AAN-R3-7	99.3
AAN-R3-8	98.3
AAN-R3-9	97.2
AAN-R3-10	98.7
AAN-R3-11	96.3
AAN-R3-12	97.5
AAN-R3-1	89.7
AAN-R3-2	89.5
AAN-R3-3	79.1
AAN-R3-4	88.9

10

20

## 【 0 3 1 5】

## 【表 4 3】

30

表 4 3 : 各種リンカーの安定性 (対照%)

R2-R3 (R2 は不在)	安定性 (%)
R3-1	88.8
R3-2	83.7
R3-3	94.6
R3-4	91.8
R3-5	85.8
R3-6	86.4

40

## 【 0 3 1 6】

実施例 1 2 : 抗体 / S 1 3 リンカーの増加に伴うコンジュゲーション効率の増加

小規模のコンジュゲーションのために、各種バリエーションについて 5 ~ 10 mg の Ig G を、限外濾過チューブ (メルクミリポア) により、2 mM EDTA を含有する 50 mM Tris - HCl、pH 7.5 へと、遠心分離の繰り返しによって緩衝液交換した。次いで、抗体を、DTT によりモル比 1 : 20 ~ 1 : 200 にて、室温で 4 ~ 16 時間、穏やかに還元した。次いで、還元された抗体を、50 mM Tris - HCl、150 mM NaCl、pH 7.5 内に透析し、Cu<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> or デヒドロアスコルビン酸 (DHAA, Sigma) によりモル比 1 : 50 ~ 1 : 200 にて、室温で 1 ~ 3 時間、再酸化した。

50

次いで、フリーのスルフヒドリルを有する再酸化された抗体を、S13化学リンカーにより比1:10、1:20、1:50、または1:100にて、室温で4時間、コンジュゲートした。コンジュゲーション効率を還元SDS-PAGEによって示した。表44に示されるように、異なるコンジュゲーション効率を得た。

【0317】

【表44】

表44：抗体（イピリムマブ、配列番号13）／S13リンカーの比の増加に伴うコンジュゲーション効率の増加

抗体/S13 リンカーのモル比	コンジュゲーション効率
1:10	60%
1:20	72%
1:50	89%
1:100	95%

【0318】

CTLA4 - 抗体の異なる位置におけるCys変異によるCTLA4 - 抗体（イピリムマブ、配列番号14）：S13リンカー = 1:100条件のコンジュゲーション反応の際の、変異体部位を表45に示した。CTLA4 - 抗体：S13 = 1:100の条件では、図30の還元SDS-PAGEゲルに示されるように、5つ位置全てが高い効率でS13リンカーにコンジュゲートされる。

【0319】

【表45】

表45：分子比1:100のコンジュゲーションに用いた各種変異部位

変異ID	コンジュゲーション効率 (%)
1# (FR1, L22S)	96
2# (FR2, L49Y)	99
3# (FR2, L72T)	95
4# (CDR1, L24R)	97
5# (CDR3, L13G)	99

【0320】

実施例13：ヒトCTLA - 抗体の可変領域のフレームワーク（非CDR）のコンジュゲーション効率および親和性の変化

我々は、CTLA - 4抗体のフレームワーク領域（FR）内で各非システインアミノ酸をシステインに変異して、実験に用いるシステイン変異体を作成した。いくつかの変異部位は、ほぼ100%のコンジュゲーション効率を示した。各種変異体についてのコンジュゲーション効率は、CTLA4 - 抗体：S13 = 1:100の条件では高く、これを表46および表47にまとめた。いくつかの変異は、非常に低いコンジュゲーションを示し、このことは、Cysが抗体の内部に埋もれている可能性が有ることを示す。

【0321】

10

20

30

40

50

## 【表 4 6】

表 4 6 : イビリムマブ軽鎖フレームワーク領域についてのコンジュゲーション効率

領域 (カバット)	カバット番号	イビリムマブ VL	S13 のコンジュゲーション効率 (%)
FR1	L1	E	35
	L2	I	58
	L3	V	99
	L4	L	29
	L5	T	96
	L6	Q	95
	L7	S	87
	L8	P	98
	L9	G	96
	L10	T	95
	L11	L	62
	L12	S	88
	L13	L	16
	L14	S	88
	L15	P	95
	L16	G	64
	L17	E	69
	L18	R	72
	L19	A	10
	L20	T	28
	L21	L	13
	L22	S	96
	L23	C	n/d
FR2	L35	W	13
	L36	Y	88
	L37	Q	16
	L38	Q	86
	L39	K	89
	L40	P	19
	L41	G	92
	L42	Q	85
	L43	A	46

10

20

30

40

50

	L44	P	63
	L45	R	25
	L46	L	16
	L47	L	18
	L48	I	85
	L49	Y	99
FR3	L57	G	86
	L58	I	95
	L59	P	94
	L60	D	96
	L61	R	86
	L62	F	75
	L63	S	95
	L64	G	95
	L65	S	94
	L66	G	68
	L67	S	88
	L68	G	88
	L69	T	87
	L70	D	94
	L71	F	28
	L72	T	95
	L73	L	26
	L74	T	95
	L75	I	16
	L76	S	94
	L77	R	96
	L78	L	13
	L79	E	88
	L80	P	96
	L81	E	85
	L82	D	13
	L83	F	18
	L84	A	10
	L85	V	85

10

20

30

40

50

	L86	Y	12
	L87	Y	19
	L88	C	n/d
FR4	L98	F	87
	L99	G	88
	L100	Q	19
	L101	G	86
	L102	T	12
	L103	K	95
	L104	V	8
	L105	E	95
	L106	I	75
	L107	K	92

10

【 0 3 2 2 】

20

30

40

50

## 【表 4 7】

表 4 7 : イビリムマップ重鎖フレームワーク領域についてのコンジュゲーション効率

領域 (カバット)	カバット 番号	イビリムマップ VH	S13 のコンジュゲーション効率 (%)
FR1	H1	Q	68
	H2	V	95
	H3	Q	86
	H4	L	86
	H5	V	88
	H6	E	18
	H7	S	68
	H8	G	89
	H9	G	85
	H10	G	84
	H11	V	68
	H12	V	18
	H13	Q	86
	H14	P	85
	H15	G	85
	H16	R	86
	H17	S	78
	H18	L	18
	H19	R	78
	H20	L	8
	H21	S	79
	H22	C	n/d
	H23	A	89
	H24	A	12
	H25	S	86
	H26	G	89
	H27	F	88
	H28	T	n/d
	H29	F	89
	H30	S	89
FR2	H36	W	13
	H37	V	18

10

20

30

40

50

	H38	R	19
	H39	Q	89
	H40	A	82
	H41	P	98
	H42	G	96
	H43	K	12
	H44	G	96
	H45	L	93
	H46	E	88
	H47	W	18
	H48	V	15
	H49	T	23
FR3	H66	R	26
	H67	F	29
	H68	T	95
	H69	I	18
	H70	S	86
	H71	R	28
	H72	D	83
	H73	N	82
	H74	S	85
	H75	K	92
	H76	N	98
	H77	T	25
	H78	L	26
	H79	Y	95
H80	L	15	
H81	Q	95	
H82	M	17	
FR4	H103	W	68
	H104	G	29
	H105	Q	92
	H106	G	29
	H107	T	28
	H108	L	95

10

20

30

40

	H109	V	88
	H110	T	87
	H111	V	27
	H112	S	90
	H113	S	85

50

## 【0323】

S13の高いコンジュゲーション効率(>80%)を有する変異体部位を、R4-7にコンジュゲートし、EC50比(WT抗体のEC50:変異体抗体-R4-7のEC50\*100%)として、ELISAベースアッセイで相対結合活性について試験した。具体的には、96ウェルELISAプレート(ヌンク)を1ug/mLのHis-CTLA-4タンパク質(シノバイオロジカル)で一晩被覆し、次いで、1%BSAブロッカー(サーモフィッシャー)により37で2時間ブロックして、PBSTにより3回洗浄した。R4-7コンジュゲーションを有する対応する抗体または対応する変異体を添加して、37で1時間結合させて、次いで、PBSTで3回洗浄した。HRP酵素-コンジュゲート抗ヒトIgGを添加し、37で1時間結合させ、次いで、PBSTで3回洗浄した。TMB基質(Solarbio社)を用いて、吸光度を450nmで検出した。データ解析をGraphPadソフトウェアにより実施し、各抗体またはコンジュゲートについてEC50を計算した。

10

## 【0324】

FR領域中のR4-7-s-cys-CTLA-4とCTLA-4のWT抗体の結合親和性を比較した後、表48および表49に示されるように、殆どの位置が結合親和性を維持する上で良好な効果を達成した(A群、WT抗体に比べて>60%)のに対し、いくつかの位置は低い結合親和性を呈した(B群、WT抗体に比べて<60%)ことを我々は見出した。

## 【0325】

20

30

40

50

【表 4 8】

表 4 8 : R 4 - 7 とのコンジュゲーション後の軽鎖フレームワーク変異体の結合活性

	カバット番号	イビリムマブ VL	S13 のコンジュゲーション効率 (%)	R4-7 とのコンジュゲーション後の結合活性
	領域 (カバット)	L3	V	99
L5		T	96	A
L6		Q	95	A
L7		S	87	A
L8		P	98	B
L9		G	96	A
L10		T	95	A
L12		S	88	A
L14		S	88	A
L15		P	95	B
L16		G	64	A
L22		S	96	A
L36		Y	88	A
L38		Q	86	A
L39		K	89	A
L41		G	92	A
L42		Q	85	A
L48		I	85	B
L49		Y	99	A
FR3	L57	G	86	B
	L58	I	95	A
	L59	P	94	B
	L60	D	96	A
	L61	R	86	A
	L63	S	95	A
	L64	G	95	A
	L65	S	94	A
	L67	S	88	A
	L68	G	88	B
	L69	T	87	B
	L70	D	94	B
	L72	T	95	A

10

20

30

40

50

	L74	T	95	A
	L76	S	94	A
	L77	R	96	A
	L79	E	88	A
	L80	P	96	B
	L81	E	85	A
	L85	V	85	A
FR4	L98	F	87	A
	L99	G	88	A
	L101	G	86	A
	L103	K	95	A
	L105	E	95	A
	L107	K	92	A

10

【 0 3 2 6 】

20

30

40

50

## 【表 4 9】

表 4 9 : R 4 - 7 とのコンジュゲーション後の重鎖フレームワーク変異体の結合活性

カバット 番号	イビリムマブ VH	S13 のコンジュゲーション効率 (%)	R4-7
H2	V	95	A
H3	Q	86	A
H4	L	86	A
H5	V	88	A
H8	G	89	A
H9	G	85	A
H10	G	84	A
H13	Q	86	A
H14	P	85	B
H15	G	85	A
H16	R	86	A
H23	A	89	A
H25	S	86	A
H26	G	89	A
H27	F	88	A
H29	F	89	A
H30	S	89	B
H39	Q	89	A
H40	A	82	A
H41	P	98	B
H42	G	96	A
H44	G	96	A
H45	L	93	A
H46	E	88	A
H68	T	95	A
H70	S	86	A
H72	D	83	B
H73	N	82	B
H74	S	85	B
H75	K	92	A
H76	N	98	A
H79	Y	95	A

領域 (カバット)

10

20

30

40

50

H81	Q	95	A
H105	Q	92	A
H108	L	95	A
H109	V	88	A
H110	T	87	A
H112	S	90	A
H113	S	85	A

10

## 【0327】

結合活性 < 60% (上記の表のクラスB) を有するこれらの部位について、我々は、それらを異なる化学リンカーにコンジュゲートして、結合活性をレスキューした。表50に示されるように、それらのうちのいくつかについては、R4の特定の化学修飾を用いて、結合活性を復活させることができる。これらの結果は、これらの部位の側鎖が抗体/抗原相互作用に寄与する可能性があり、特定の化学リンカーが軽鎖構造を模倣し、天然のWTアミノ酸のような抗原に対する分子相互作用をもたらすことができることを示している。

20

## 【0328】

## 【表50】

表50：R4-7にコンジュゲートした際に低い活性で部位の活性を復活するR4のスクリーニング

カバット 番号	元のアミノ酸	R4-7	R4 スクリーニング						
			R4-1	R4-3	R4-4	R4-5	R4-8	R4-11	R4-27
L8	P	B	B	B	B	B	B	A	B
L15	P	B	B	B	B	B	B	B	B
L48	I	B	B	B	B	A	B	B	B
L57	G	B	A	B	B	B	B	B	B
L59	P	B	B	B	B	B	B	B	B
L68	G	B	A	B	B	B	B	B	B
L69	T	B	A	A	B	B	B	B	B
L70	D	B	B	B	B	B	B	A	B
L80	P	B	B	B	B	B	B	B	B
H14	P	B	B	B	B	B	B	B	B
H30	S	B	A	A	B	B	B	B	B
H41	P	B	B	B	B	B	B	B	B
H72	D	B	B	B	B	B	B	A	B
H73	N	B	B	B	B	B	B	A	B
H74	S	B	A	B	B	B	B	B	B

30

40

## 【0329】

S13 (5 kDの官能基) またはS47 (40 kDの官能基) の化学リンカーにコンジュゲートされた際の選択された部位の遮断効果

50

我々は、R 4 - 7 または他の R 4 リンカーにコンジュゲートした後に活性を復活させることができた上記の部位を、腫瘍の微小環境で活性化される抗体 ( T M E A b o d y ) のスクリーニングに用いる候補部位として選択したが、それはなぜなら、プロテアーゼ切断後、このコンジュゲート抗体が、抗体変異体 - s - R 4 形態と同一の構造に留まるものとなるためである。S 1 3 ( 5 k D の官能基 ) にコンジュゲートされた後の遮断効果を、まず、実施例 1 のような E L I S A アッセイにより評価した。表 5 1 に示されるように、S 1 3 リンカーとのコンジュゲーション後、それらのいくつかは、抗原タンパク質に対する結合活性の顕著な遮断効果を示した。我々はまた、表 5 1 に示されるように、< 3 0 % 活性を有するこれらの部位をクラス A として、他の部位を B クラスとして分類した。

【 0 3 3 0 】

10

20

30

40

50

## 【表 5 1】

表 5 1 : S 1 3 ( 5 k D ) リンカーにコンジュゲートされた際の選択された部位の遮断効率

カバット 番号	元のアミノ酸	S13 のコンジュゲーション効率 (%)	S13 (5kD) 遮断後の結合活性
L3	V	99	A
L5	T	96	B
L6	Q	95	B
L7	S	87	B
L9	G	96	B
L10	T	95	B
L12	S	88	B
L14	S	88	B
L22	S	96	A
L36	Y	88	A
L38	Q	86	B
L39	K	89	B
L41	G	92	B
L42	Q	85	B
L49	Y	99	A
L58	I	95	A
L60	D	96	A
L61	R	86	B
L63	S	95	B
L64	G	95	B
L65	S	94	A
L67	S	88	A
L69	T	87	A
L70	D	94	A
L72	T	95	B
L74	T	95	B
L76	S	94	B
L77	R	96	B
L79	E	88	B
L81	E	85	B
L85	V	85	B

10

20

30

40

50

L98	F	87	B
L99	G	88	B
L101	G	86	B
L103	K	95	B
L105	E	95	B
L107	K	92	B
H2	V	95	A
H3	Q	86	A
H4	L	86	A
H5	V	88	A
H8	G	89	B
H9	G	85	B
H10	G	84	B
H13	Q	86	B
H14	P	85	B
H15	G	85	B
H16	R	86	B
H23	A	89	A
H25	S	86	A
H26	G	89	A
H27	F	88	A
H29	F	89	A
H30	S	89	A
H39	Q	89	B
H40	A	82	B
H42	G	96	B
H44	G	96	B
H45	L	93	B
H46	E	88	B
H68	T	95	A
H70	S	86	A
H72	D	83	A
H73	N	82	A
H74	S	85	A
H75	K	92	A

10

20

30

40

50

H76	N	98	A
H79	Y	95	A
H81	Q	95	B
H105	Q	92	B
H108	L	95	B
H109	V	88	B
H110	T	87	B
H112	S	90	B
H113	S	85	B

10

## 【 0 3 3 1 】

我々はさらに、より分子量の高い官能基を用いて遮断効率を向上できるか否かを検討した。S 4 7 ( 4 0 k D の官能基を含む ) および S 6 4 ( 8 0 k D の官能基を含む ) をコンジュゲーションのために使用し、遮断効率を上記の方法により結合 E L I S A アッセイにて測定した。結果を表 5 2 にまとめたが、ここでは、分子量の増加によって、結合活性の遮断効率を顕著に向上できることが示されている。全ての部位は、S 6 4 ( 8 0 k D ) 官能基にコンジュゲートされた際に < 3 0 % の活性を示した。

20

## 【 0 3 3 2 】

30

40

50

## 【表 5 2】

表 5 2 : S 1 3 ( 5 k D ) リンカー、 S 3 7 ( 2 0 k D ) リンカー、 S 4 7 ( 4 0 k D ) リンカー、または S 6 4 ( 8 0 k D ) リンカーにコンジュゲートされた際の選択された部位の遮断効率

カバット番号	元のアミノ酸	S13 のコンジュゲーション効率 (%)	S13 (5kD) 遮断後の結合活性	S37 (20kD) 遮断後の結合活性	S47 (40kD) 遮断後の結合活性	S64 (80kD) 遮断後の結合活性
L3	V	99	A	A	A	A
L5	T	96	B	A	A	A
L6	Q	95	B	A	A	A
L7	S	87	B	A	A	A
L9	G	96	B	B	A	A
L10	T	95	B	B	B	A
L12	S	88	B	A	A	A
L14	S	88	B	A	A	A
L22	S	96	A	A	A	A
L36	Y	88	A	A	A	A
L38	Q	86	B	A	A	A
L39	K	89	B	B	A	A
L41	G	92	B	B	B	A
L42	Q	85	B	A	A	A
L49	Y	99	A	A	A	A
L58	I	95	A	A	A	A
L60	D	96	A	A	A	A
L61	R	86	B	A	A	A
L63	S	95	B	B	B	A
L64	G	95	B	B	B	A
L65	S	94	A	A	A	A
L67	S	88	A	A	A	A
L69	T	87	A	A	A	A
L70	D	94	A	A	A	A
L72	T	95	B	A	A	A
L74	T	95	B	A	A	A
L76	S	94	B	B	A	A
L77	R	96	B	B	B	A

10

20

30

40

50

L79	E	88	B	B	B	A
L81	E	85	B	B	B	A
L85	V	85	B	B	B	A
L98	F	87	B	B	B	A
L99	G	88	B	B	A	A
L101	G	86	B	B	A	A
L103	K	95	B	A	A	A
L105	E	95	B	A	A	A
L107	K	92	B	A	A	A
H2	V	95	A	A	A	A
H3	Q	86	A	A	A	A
H4	L	86	A	A	A	A
H5	V	88	A	A	A	A
H8	G	89	B	A	A	A
H9	G	85	B	A	A	A
H10	G	84	B	A	A	A
H13	Q	86	B	B	B	A
H14	P	85	B	B	B	A
H15	G	85	B	A	A	A
H16	R	86	B	A	A	A
H23	A	89	A	A	A	A
H25	S	86	A	A	A	A
H26	G	89	A	A	A	A
H27	F	88	A	A	A	A
H29	F	89	A	A	A	A
H30	S	89	A	A	A	A
H39	Q	89	B	A	A	A
H40	A	82	B	A	A	A
H42	G	96	B	B	A	A
H44	G	96	B	B	B	A
H45	L	93	B	A	A	A
H46	E	88	B	A	A	A
H68	T	95	A	A	A	A
H70	S	86	A	A	A	A
H72	D	83	A	A	A	A

10

20

30

40

50

H73	N	82	A	A	A	A
H74	S	85	A	A	A	A
H75	K	92	A	A	A	A
H76	N	98	A	A	A	A
H79	Y	95	A	A	A	A
H81	Q	95	B	A	A	A
H105	Q	92	B	A	A	A
H108	L	95	B	B	A	A
H109	V	88	B	B	A	A
H110	T	87	B	B	B	A
H112	S	90	B	B	B	A
H113	S	85	B	B	B	A

10

## 【0333】

ヒトCTLA-4抗体およびPD-1抗体の変領域のフレームワーク（非CDR）におけるR4ライブラリーによるR4修飾抗体の結合親和性の向上

20

フレームワーク（非CDR）領域は、保存された配列であり、CDR領域に連結して異なる抗体を形成するのに用いられている。表5-1および表5-2に示されるように、いくつかのアミノ酸の側鎖が変わると結合が低減し（クラスB）、このことは、アミノ酸の側鎖が相互作用または空間をもたらして、CDRと共に抗原結合性の一助となりうることを示す。通常は、フレームワークと抗原との相互作用は、CDR領域と抗原とのものよりも弱い。PD-1抗体（ニボルマブ）の選択された変異位置に異なるR4をコンジュゲートすることによって、我々は、野生型抗体に比べて、より高い親和性を得るかまたは化学修飾抗体の親和性を維持する機会がある。

## 【0334】

30

## 【表53】

表53：PD-1抗体（ニボルマブ）についての保存されたFR部位におけるR4コンジュゲートされた変異型生体分子のライブラリーの結合活性（WT抗体の%）

PD-1	R4-1	R4-2	R4-3	R4-4	R4-5	R4-6	R4-7	R4-8	R4-9
Gly41	62.6	45.6	1.6	33.6	24.6	34.4	32.7	31.7	58.7
Glu46	26.4	48.9	67.8	45.1	49.6	29.7	86.4	78.4	10.4
Tyr49	67.8	48.6	33.4	14.5	18.4	105.4	97.4	62.4	59.8
Arg61	67.4	108.4	48.6	78.4	64.1	89.1	91.5	57.9	48.5
Ser63	89.5	98.4	108.9	84.5	89.4	85.5	84.5	88.9	116.9
Thr72	48.9	47.6	115.9	67.4	48.5	75.8	68.7	12.4	34.9

40

## 【0335】

この結果は、異なる抗体のFR領域において、各種R4を保存された部位にコンジュゲートすることによって、結合活性を調整できることを示す。代表としてGly41では、R4-1とのコンジュゲーションによって、それは結合親和性の62.6%を回復する機会がある。保存されたVHのGln3、Ser7、Ser26、Glu46、Thr68

50

、 A s p 7 2、およびフレームワークの T h r 5、 T y r 4 9、 A r g 6 1、 S e r 6 3、 S e r 6 5、 S e r 6 7、 T h r 7 2、 T h r 7 4、 S e r 7 6、 A s p 8 2では、より高い親和性の結合コンジュゲーションをスクリーニングにより選出することができた。フレームワーク配列 ( F R 1、 F R 2、および F R 3 ) は、全ての種類のヒト抗体で保存されており、 F R 領域のこれらの保存された部位に各種 R 4 をコンジュゲートすることによって、任意の抗体が、結合親和性を維持するかまたは増加させる機会がある。

#### 【 0 3 3 6 】

ヒト生殖系列抗体可変領域のフレームワーク ( 非 C D R ) 中の相同性の高い配列における変異体の結合活性の解析

ヒト抗体は、2本の同一の軽鎖 ( L C ) と2本の同一の重鎖 ( H C ) とを含む4本のペプチド鎖からなる。これらの鎖は、ジスルフィド結合 ( 複数可 ) および非共有結合によって単量体を形成する。2タイプの軽鎖、すなわち  $\mu$ 、  $\delta$ 、  $\epsilon$ 、および  $\kappa$  と、5タイプの重鎖、すなわち  $\mu$ 、  $\delta$ 、  $\epsilon$ 、  $\kappa$ 、および  $\lambda$  がある。抗体は、全体としては、定常領域と可変領域とに分けられる。可変領域は、Y形状構造の2本のアームの末端に位置する。ヒト抗体またはヒト抗体は、ある特定の一般性を有するが、すなわち、それらは全て、Y形状構造の2本のアームの末端において重鎖または軽鎖に4つのループを含有する。3つのループは、可変性が高く、抗原との結合性に直接的に予期する。これらのループ内にある領域は C D R と称され、 C D R 1、 C D R 2、および C D R 3 はそれぞれ、これらの3つのループに存在する。

#### 【 0 3 3 7 】

抗体は、 *in vivo* で、イムノグロブリンスーパーファミリーの遺伝子の組換えによって産生される。各種抗原に対する抗体のいくつかのフレームワーク領域は、同じ生殖系列抗体の遺伝子配列またはアミノ酸配列を由来とすることがある。 C D R 間にはフレームワーク配列 ( F R 1、 F R 2、および F R 3 ) があり、それらは全ての種類のヒト抗体で保存されている。可変領域について、全ての種類のヒト抗体は、リーダー配列の場合には、開始コドンから可変領域遺伝子エクソンの前の最後のヌクレオチドまでの全体を、 V H、 V K、および V L の場合には、 V 遺伝子エクソンの始め ( F R 1 の 1 位残基 ) からヘプタマー組換えシグナル配列より前の最後のヌクレオチド / アミノ酸までの全体を示される。8つの選択された抗体配列を図 3 1 に示す。

#### 【 0 3 3 8 】

我々は、他の抗体の重鎖および軽鎖の D N A 配列を、発現のために、同じ保存された位置に対応させて変異させた。 F R 領域中の他の部位および W T 抗体の結合親和性と比較した。5つの抗体配列において、 V H 中の保存された部位 G 1 n 3、 S e r 7、 S e r 2 6、 G 1 u 4 6、 T h r 6 8、および A s p 7 2、ならびに V L 中の保存された部位 T h r 5、 T y r 4 9、 A r g 6 1、 S e r 6 3、 S e r 6 5、 S e r 6 7、 T h r 7 2、 T h r 7 4、 S e r 7 6、および A s p 8 2 ( アミノ酸の位置はカバット付番則に従って付番 ) を選択して R 4 - 7 にコンジュゲートした。

#### 【 0 3 3 9 】

10

20

30

40

50

## 【表 5 4】

表 5 4 : 保存された F R 部位における R 4 コンジュゲートされた変異型生体分子のライブラリーの結合活性 (W T 抗体の%)

部位	41BB	Ada	PD-1-k	Ip1	Trast
Gln3	68.3	78.4	73.8	98.3	94.5
Ser7	94.5	87.4	105.6	110.4	110.6
Ser26	87.1	68.4	97.1	74.8	104.6
Glu46	97.4	78.4	69.4	67.8	78.4
Thr68	68.7	97.8	74.7	79.8	87.7
Thr5	86.4	97.4	84.1	67.4	69.7
Gly41	24.8	16.4	8.9	8.4	8.9
Tyr49	79.7	97.8	99.7	112.4	107.8
Arg61	87.9	78.9	67.8	79.8	94.1
Ser63	89.7	69.5	69.1	78.9	97.4
Ser65	69.4	78.9	70.8	69.7	97.8
Ser67	79.7	68.7	69.2	79.0	64.9
Thr72	68.5	66.4	72.8	70.9	79.8
Thr74	107.5	97.4	89.4	99.8	95.8
Ser76	69.4	78.9	69.1	78.4	78.4
Asp82	98.5	74.8	68.7	79.4	67.8

10

20

## 【 0 3 4 0】

30

この結果は、異なる抗体の F R 領域において、V H の G l n 3、S e r 7、S e r 2 6、G l u 4 6、T h r 6 8、または A s p 7 2、および V L の T h r 5、T y r 4 9、A r g 6 1、S e r 6 3、S e r 6 5、S e r 6 7、T h r 7 2、T h r 7 4、S e r 7 6、または A s p 8 2 という保存された部位に R 4 - 6 をコンジュゲートすることによって、野生型抗体または他の位置に比べて結合活性を維持することができ、それは元の結合活性の 6 0 % 以上であったことを示している。陰性対照の代表としての G l y 4 1 では、全ての抗体で結合親和性を失った (W T 抗体の < 6 0 % )。

## 【 0 3 4 1】

## 実施例 1 4

C T L A - 4 は、腫瘍の微小環境の T 細胞表面上にある。我々は、抗体の C D R 領域内の各アミノ酸を変異させ、結合親和性を維持または増加するために異なる R 4 基によってスクリーニングした。場合によっては、結合親和性を増強することのできた R 4 基がいくつかあったが、我々はそれらを開発における薬剤候補として選択しなかった。我々は、R - 1、R 4 - 7、R 4 - 5、R 4 - 8、および R 4 - 1 2 を、薬剤開発における大規模合成と安定性のために採択した。R 4 を含むコンジュゲート型 C T L A - 4 抗体は、R 4 の化学修飾成熟のライブラリースクリーニングによりいくつかの位置で結合活性 > 6 0 % を回復することができる。

40

## 【 0 3 4 2】

50

## 【表 5 5】

表 5 5 : 各種 R 4 分子とコンジュゲートされた後の、CDR 領域に変異を有する抗 C T  
L A - 4 抗体の変異体の結合作用

領域 (カバット)	カバット 番号	元のアミノ酸	R4	結合活性
CDRL1	L24	R	R4-26	89%
	L25	A	R4-1	95%
	L26	S	R4-1	91%
	L27	Q	R4-11	88%
	L28	V	R4-7	78%
	L29	G	R4-1	95%
	L30	S	R4-1	81%
	L30	S	R4-2	104%
	L30	S	R4-3	96%
	L31	S	R4-1	99%
	L32	Y	R4-7	98%
	L32	Y	R4-8	107%
	L33	L	R4-1	95%
	L34	A	R4-1	92%
CDRL2	L50	G	R4-1	97%
	L50	G	R4-3	107%
	L51	A	R4-1	92%
	L52	F	R4-1	72%
	L53	S	R4-1	98%
	L54	R	R4-26	163%
	L55	A	R4-1	102%
	L55	A	R4-3	106%
	L56	T	R4-1	93%
CDRL3	L89	Q	R4-7	96%
	L90	Q	R4-7	75%
	L91	Y	R4-5	95%
	L91	Y	R4-7	105%
	L92	G	R4-1	99%
	L92	G	R4-3	104%
	L93	S	R4-1	92%

10

20

30

40

50

	L94	S	R4-1	95%
	L94	S	R4-11	142%
	L95	P	R4-1	62%
	L96	W	R4-4	72%
	L97	T	R4-1	91%
CDRH1	H31	S	R4-1	110%
	H32	Y	R4-7	92%
	H32	Y	R4-18	208%
	H33	T	R4-1	102%
	H34	M	R4-1	65%
	H35	H	R4-5	72%
CDRH2	H50	F	R4-4	73%
	H51	I	R4-4	72%
	H52	S	R4-1	95%
	H52	S	R4-3	107%
	H52A	Y	R4-7	93%
	H53	D	R4-11	91%
	H54	G	R4-1	95%
	H55	N	R4-11	96%
	H56	N	R4-11	91%
	H57	K	R4-7	88%
	H58	Y	R4-7	89%
	H59	Y	R4-4	92%
	H59	Y	R4-10	105%
	H60	A	R4-4	65%
	H61	D	R4-11	92%
	H62	S	R4-3	91%
	H63	V	R4-1	68%
	H64	K	R4-7	96%
	H64	K	R4-18	137%
	H65	G	R4-1	93%
CDRH3	H95	T	R4-3	92%
	H95	T	R4-1	152%
	H96	G	R4-1	65%
	H96	G	R4-2	85%

10

20

30

40

50

	H97	W	R4-8	92%
	H98	L	R4-3	84%
	H99	G	R4-1	94%
	H100	P	R4-1	69%
	H100A	F	R4-4	84%
	H101	D	R4-3	88%
	H102	Y	R4-7	95%
	H102	Y	R4-5	242%

10

## 【0343】

結果によれば、抗CTLA-4抗体のCDR内のG、A、S、L、T、I、F、E、K、D、N、Q、R、またはYをCに変異させて各種R4に結合させた後に、変異体は、結合効率>60%を保持することができた。

## 【0344】

場合によっては、結合親和性を増強することができたR4基がいくつかあった。我々は、60~100%の間の結合親和性のR4-s-R5を、薬剤開発における薬剤候補として選択した。我々は、R-1、R4-7、R4-5、R4-8、およびR4-12を、薬剤開発における大規模合成と安定性のために採択した。S47がレグマインにより切断されると、切断後、R4-7化学基が保持される。CDRのアミノ酸へのS47のコンジュゲーション後、これらのコンジュゲートは全て、親和性の減少を伴ってCTLA-4の結合を遮断することができる(WT CTLA-4の<30%の活性)。そのため、CDR領域の位置または変異体は、腫瘍の微小環境により活性化される抗体のための一次薬剤候補とすることができる。

20

## 【0345】

30

40

50

## 【表 5 6】

表 5 6 : S 4 7 ( 4 0 k D ) リンカーにコンジュゲートされた C D R 領域の遮断効率

領域 (カバット)	カバット番号	元のアミノ酸	R4	結合活性	S47 (40kD) の遮断後の活性
CDRL1	L24	R	R4-26	89%	28%
	L25	A	R4-1	95%	29%
	L26	S	R4-1	91%	18%
	L27	Q	R4-11	88%	8%
	L27A	S	R4-1	82%	24%
	L28	V	R4-7	78%	25%
	L29	G	R4-1	95%	19%
	L30	S	R4-1	81%	19%
	L31	S	R4-1	99%	12%
	L32	Y	R4-7	95%	13%
	L33	L	R4-1	95%	6%
	L34	A	R4-1	92%	11%
	CDRL2	L50	G	R4-1	97%
L51		A	R4-1	92%	25%
L52		F	R4-1	72%	16%
L53		S	R4-1	98%	5%
L54		R	R4-26	113%	17%
L55		A	R4-1	102%	20%
L56		T	R4-1	93%	5%
CDRL3	L89	Q	R4-7	96%	15%
	L90	Q	R4-7	75%	7%
	L91	Y	R4-7	95%	8%
	L92	G	R4-1	99%	16%
	L93	S	R4-1	92%	9%
	L94	S	R4-1	95%	12%
	L95	P	R4-1	62%	13%
	L96	W	R4-4	72%	12%
L97	T	R4-1	91%	16%	
CDRH1	H31	S	R4-1	110%	25%
	H32	Y	R4-7	92%	23%

10

20

30

40

50

	H33	T	R4-1	102%	26%
	H34	M	R4-1	65%	29%
	H35	H	R4-5	72%	28%
CDRH2	H50	F	R4-4	73%	25%
	H51	I	R4-4	72%	27%
	H52	S	R4-1	95%	5%
	H52A	Y	R4-7	93%	18%
	H53	D	R4-11	91%	11%
	H54	G	R4-1	95%	15%
	H55	N	R4-11	96%	22%
	H56	N	R4-11	91%	8%
	H57	K	R4-7	88%	11%
	H58	Y	R4-7	89%	7%
	H59	Y	R4-4	92%	15%
	H60	A	R4-4	65%	22%
	H61	D	R4-11	92%	19%
	H62	S	R4-3	91%	23%
	H63	V	R4-1	68%	22%
	H64	K	R4-7	96%	26%
	H65	G	R4-1	93%	28%
CDRH3	H95	T	R4-3	92%	18%
	H96	G	R4-1	65%	11%
	H97	W	R4-8	92%	9%
	H98	L	R4-3	84%	6%
	H99	G	R4-1	94%	12%
	H100	P	R4-1	69%	3%
	H100A	F	R4-4	84%	16%
	H101	D	R4-3	88%	23%
H102	Y	R4-7	95%	16%	

10

20

30

40

## 【 0 3 4 6 】

結果によれば、抗 CTLA - 4 抗体の CDR 上の天然のアミノ酸をシステインに変異させて各種 R 4 に化学的にコンジュゲートした ( R 4 ライブラリースクリーニング ) 後、変異体は、 > 6 0 % の結合効率を保持することができた。 CDR のアミノ酸との S 4 7 コンジュゲーション反応、これらの位置は全て、親和性の減少を伴って CTLA - 4 の結合を遮断することができる ( WT CTLA - 4 の < 3 0 % の活性 ) 。そのため、全ての S 4 7 コンジュゲートは、腫瘍の微小環境により活性化される抗体のための一次薬剤候補とすることができる。

## 【 0 3 4 7 】

50

抗体の親和性を向上させるために、親和性成熟の間にCDRループ上のアミノ酸を変異させた。実際は、適したR4にコンジュゲートすることによって、抗体親和性の最適化も達成することができる（本明細書では抗体の化学成熟と称される）。図32に示されるように、抗体の選択された変異部位に異なるR4基を部位特異的にコンジュゲートすることによって、我々は、R4基をスクリーニング用に選択的に換えることができた。（1）天然のアミノ酸は、リガンドとのH結合または電荷相互作用を有さない。化学成熟は、新しい相互作用を誘発することができる。（2）天然のアミノ酸は、距離のためにリガンドとの弱いH結合または電荷相互作用を有する。化学成熟は、距離を（R4-bによって）調整して、最も良い距離をスクリーニングすることができる。（3）天然のアミノ酸は、H結合または電荷相互作用を有する。化学成熟は、相互作用基を変えて、最も良いR4-c基をスクリーニングすることができる。（4）化学成熟はまた、NH<sub>2</sub><sup>+</sup>またはO<sup>-</sup>を増加させることによって、電荷を増加させることができる。その結果、新しい親和性成熟の1種として、H結合または電荷相互作用の相互作用を増加させる可能性がある。

10

【0348】

我々は、同じCTLA-4抗体で1つまたは2つの変異を有する3つの変異体にR4をコンジュゲートすることによって、抗体の化学成熟を実施した。その結果を表57に示した。

【0349】

【表57】

20

表57：3つの変異体とコンジュゲーションしているR4の結合活性

	変異体 1	変異体 2	結合活性
R4-18	H32		208%
R4-18		H64	137%
R4-18	H32	H64	356%

30

【0350】

適したR4基にコンジュゲートすることによる抗体のCDRループ内の化学成熟によって、抗体親和性の最適化も達成することができる。

【0351】

実施例15

構築されたCTLA-4 TMEAbodyの結合ELISA特性解析

薬剤開発において、我々は、さらに進んだ開発のために、遮断効率および復活した活性の良好な部位を収集した。S47とのコンジュゲーション後、ヒト抗体は、腫瘍の微小環境により活性化される抗体となり、TMEAbodyと称される。

【0352】

40

腫瘍の微小環境でのヒトCTLA-4タンパク質に対する結合におけるTMEAbodyの回復能力を評価するために、コンジュゲート型TMEAbodyをレグマインにより*in vitro*で消化し、消化産物を、ヒトCTLA-4との回復した結合活性を評価するために用いた。構築されたTMEAbodyのヒトCTLA-4との結合特性の特徴を明らかにするために、0.5 μg/mLのCTLA-4 Fc融合タンパク質（R&Dシステムズ）を、Maxisorp ELISAプレート（ヌンク）上に、4で一晚インキュベートすることによって被覆した。次いで、プレートをPBSTで3回洗浄し、2%BSAによって室温で2時間ブロッキングした。PBSTで3洗浄した後、プレートを、系列濃度のコンジュゲート型TMEAbody、コンジュゲーション前のTMEAbody（システイン変異体）、および対照の野生型（WT）イピリムマブ抗体と共に、室温

50

で1時間インキュベートした。次いで、プレートをP B S Tにより3回洗浄し、1 : 5 0 0 0希釈のHRPコンジュゲート型ヤギ抗ヒトI g G F a b断片(シグマ)により、室温で1時間インキュベートした。P B S Tにより3回洗浄した後、テトラメチルベンジジン(TMB、Solarbio)およびELISA停止緩衝液(Solarbio)を用いて、プレートを展開した。次いで、450nmでの吸光度をELISAプレートリーダー(Biotek)により測定した。次いで、GraphPad Prism 5ソフトウェアによりデータを解析した。

## 【0353】

表58に示されるように、化学リンカーと各種変異体部位とのコンジュゲーションにより、異なる程度の遮断効率を生じることができる。遮断効率は、結合曲線のEC<sub>50</sub>値の倍変化により計算することができる。10倍を超える遮断効率と復活能(WTの<2倍のEC<sub>50</sub>値)を有するコンジュゲート型TMEAbodyは、さらに進んだ開発のための良い候補であるものと考えられた。

## 【0354】

## 【表58】

表58：プロテアーゼ切断後の遮断効率および復活した活性によって選択されたイピリムマブTMEAbodyの候補

選択された変異のID	重鎖または軽鎖	変異部位	位置	カバット番号	R4	S47のコンジュゲーション効率	S47とのコンジュゲーション後の遮断効率	プロテアーゼ切断後の復活した活性
Ipi-se001	HC	Y	53	H52A	R4-7	95%	20倍	復活
Ipi-se002	HC	D	54	H53	R4-11	95%	9倍	復活
Ipi-se003	HC	Y	59	H58	R4-4	94%	15倍	復活
Ipi-se004	HC	D	73	H72	R4-11	94%	6倍	復活
Ipi-se005	HC	K	76	H75	R4-7	94%	8倍	復活
Ipi-se006	HC	P	104	H100	R4-1	96%	30倍	復活
Ipi-se007	LC	Q	27	L27	R4-11	95%	13倍	復活
Ipi-se009	LC	S	54	L53	R4-1	95%	22倍	復活
Ipi-se053	LC	Y	50	L49	R4-7	98%	163倍	復活
Ipi-se066	LC	S	68	L67	R4-7	97%	3倍	復活

## 【0355】

同じELISA法を上記に記載されたように実施した。図33に示されるように、異なる部位へのコンジュゲーションは、異なる程度で結合活性の回復を示した。いくつかの変

異体部位は、消化後にWTイピリムマブと同等の結合活性を示した (< 2 倍の EC50 変化、またはすなわち、WTの > 50 %の活性)。

【0356】

TMEAbodyの抗原結合性を遮断した結果、イピリムマブの受容体遮断活性の減少を生じた

次いで、CTLA-4タンパク質とのTMEAbodyの結合の減少によって、B7-1 CTLA-4相互作用に対するイピリムマブの遮断の有効性も減少するものとなることを証明するために、受容体遮断活性(RBA)アッセイを利用した。0.5 μg/mLのヒトCTLA-4Fc融合タンパク質(R&Dシステムズ)をMaxisorp ELISAプレート(ヌンク)上に吸収させて、次いで、プレートを2%BSAによりブロッキングした。0.02 μg/mLのビオチン化ヒトB7-1またはB7-2タンパク質と各種濃度のTMEAbodyまたはWTのイピリムマブとを、プレートをを用いて完全にインキュベートし、次いで、標準ELISAの手順のようなストレプトアビジン-HRP(サーモフィッシャーサイエンティフィック)とのインキュベーションとそれに続くTMB反応とを用いて、受容体遮断活性を測定した。

10

【0357】

図34に示されるように、ヒトCTLA-4タンパク質との結合活性が有意に減少したTMEAbodyは、受容体遮断活性の劇的な減少をも示した。IC50の倍変化を、受容体遮断活性の減少を評価するための定量パラメーターとして使用することができた。

【0358】

RBAアッセイに関する他の候補のデータを表59にまとめた。

20

【0359】

【表59】

表59：イピリムマブTMEAbody候補のRBAアッセイデータの概要

選択された変異のID	遮断効率 (RBA)	プロテアーゼ切断後の復活した RBA 活性
Ipi-se001	15 倍	復活
Ipi-se002	5 倍	復活
Ipi-se003	8 倍	復活
Ipi-se004	7 倍	復活
Ipi-se005	10 倍	復活
Ipi-se006	25 倍	2.5 倍減少
Ipi-se007	16 倍	復活
Ipi-se053	20 倍	復活
Ipi-se009	18 倍	復活
Ipi-se066	9 倍	3.5 倍減少

30

【0360】

SEB誘導型T細胞活性化アッセイにおいて、TMEAbodyの抗原結合性を遮断した結果、機能性の有効性の減少を生じた。

【0361】

次に、TMEAbodyに観察された抗原結合活性および受容体遮断活性の減少が、イピリムマブの機能性の有効性の減少に寄与できるか否かを評価するために、ブドウ球菌腸毒素(SEB)誘導型T細胞活性化アッセイを実施した。SEBは、Tリンパ球を強力に活性化してサイトカインの分泌を誘導することができるスーパー抗原である。健常ドナー由来の全PBMC細胞(All cells)を、ウェル当たり1E5細胞個として、10%FBS(ギブコ)、100ng/mLのSEB(Toxin Technology)

40

50

、および各種濃度の T M E A b o d y、W T のイピリムマブ、またはそのアイソタイプ対照ヒト I g G をそれぞれ含む 1 6 4 0 培地 (ギブコ) 中で培養した。活性化の 9 6 時間後、上清を遠心分離により収集して、E L I S A 法を用いる I L 2 検出キット ( R & D システムズ ) により I L 2 の放出を測定した。

【 0 3 6 2 】

図 3 5 に示されるように、C T L A - 4 に対する結合活性の減少した T M E A b o d y は、T 細胞の活性化の機能的な有効性の障害を示し、プロテアーゼにより媒介される活性化が T M E A b o d y の活性を復活できる。

【 0 3 6 3 】

このアッセイを、他の T M E A b o d y についても単一濃度 ( 1 0 u g / m L ) で行い、遮断効率を計算した ( ( W T - T M E A b o d y ) / ( W T - h I g G ) \* 1 0 0 % ) 。結果を表 6 0 に示す。

10

【 0 3 6 4 】

【表 6 0 】

表 6 0 : T M E A b o d y 遮断効率 S E B 誘導型 T 細胞活性化

選択された変異の ID	遮断効率 (SEB)	プロテアーゼ切断後の復活した RBA 活性
Ipi-se001	63%	復活
Ipi-se002	45%	復活
Ipi-se003	40%	復活
Ipi-se004	43%	復活
Ipi-se005	64%	復活
Ipi-se006	90%	3 倍減少
Ipi-se007	68%	復活
Ipi-se053	70%	復活
Ipi-se009	72%	復活
Ipi-se066	56%	4 倍減少

20

30

【 0 3 6 5 】

イピリムマブ T M E A b o d y は、腫瘍において T r e g を制御したが、末梢では制御しなかった

T M E A b o d y が腫瘍の微小環境で特異的に活性化されたが末梢リンパ器官では活性化されなかったか否かを見極めるために、メカニズム試験を実施した。イピリムマブ療法について提唱されているメカニズムの 1 つは、イピリムマブが抗体依存性細胞媒介性細胞毒性 ( A D C C ) 効果を介して T r e g 細胞の集団を下方制御し、それゆえに腫瘍に対する免疫応答を活性化することができるというものである。C D 4 マーカー、C D 2 5 マーカー、および F o x p 3 マーカーをそれぞれ用いたフローサイトメトリーにより、T r e g 集団を解析した。図 3 6 に示されるように、イピリムマブ T M E A b o d y は、W T イピリムマブと同様の有効性で、腫瘍において T r e g 集団を有意に下方制御した。しかしながら、脾臓または末梢血では、イピリムマブ T M E A b o d y は、T r e g 集団の調節を非常に低く示したかまたは全く示さなかった。これらの結果は、イピリムマブ T M E A b o d y が、特異的な活性を腫瘍の微小環境で示したが、末梢リンパ器官または末梢血では示さなかったことを実証していた。

40

【 0 3 6 6 】

T M E A b o d y はヒト血漿中で安定である

血清中での T M E A b o d y の安定性を評価するために、1 u g の C T L A - 4 T E M A b o d y ( S 1 3 のコンジュゲーションを有する I p i 0 5 3 ) を 2 0 u L のマウス

50

血清に入れ、37 で2時間、4時間、24時間、48時間、および96時間、それぞれ保った。次いで、試料を抗ヒトFabHRP抗体（シグマ）によるウェスタンブロット用に調製した。ゲル強度をImageJソフトウェアにより分析し、相対強度をGraphPadにより解析した。以下の図37に示されるように、TMEAbodyは、マウス血清中において、37 で96時間後に有意に分解することなく、高い安定性を示した。

#### 【0367】

CTLA-4 TMEAbodyは、S47官能基とのコンジュゲーションにより、WT-イピリムマブおよびCTLA-4プロボディに比べて半減期および曝露の増加を示した

TMEAbodyの薬物動態特性を調節する際の化学コンジュゲーションの潜在的な効果を評価するために、単回IV用量の1mg/kgのWTイピリムマブまたはイピリムマブTMEAbodyを、Balb/cマウスに注射した。0.5時間後、2時間後、4時間後、8時間後、1日後、2日後、5日後、10日後、15日後、20日後、総抗体および活性抗体の濃度の決定のELISA試験に用いるために血漿を収集した。総抗体濃度の決定には、抗ヒトFc抗体（インビトロジェン）をELISAプレート（ヌンク）上に被覆し、注射された抗体を抗ヒトFabHRP二次抗体（インビトロジェン）によって検出した。活性抗体濃度の決定では、ヒトCTLA-4タンパク質（シノバイオリジカル）をELISAプレート上に被覆した。次いで、活性抗体を抗ヒトFcHRP二次抗体（インビトロジェン）によって検出した。標準曲線をWTイピリムマブまたはイピリムマブTMEAbodyの系列希釈物によって描き、4パラメーターフィッティングを介して標準結合曲線を確立した。総抗体または活性抗体の濃度を、標準曲線へのY値の外挿を介して計算した。図38(a)に示されるように、TMEAbodyの半減期は、40kd官能基とのコンジュゲーション後に、WTイピリムマブ抗体またはイピリムマブプロボディ（マスキングペプチドとしてMY11を、切断部分として2011を用いたWO2018/085555A1）に比べて増加した。さらに、CTLA-4 TMEAbodyは、図38(b)に示されるように、血漿中で時間と共にイピリムマブプロボディよりも少ない活性化を示した。

#### 【0368】

マウス腫瘍モデルにおけるTMEAbodyのin vivo特性解析

さらに動物モデルで腫瘍を治療する際のTMEAbodyのin vivo有効性の特徴を明らかにするために、イピリムマブTMEAbody、ならびにWTイピリムマブおよび対照ヒトIgGを、ヒトCTLA-4ノックインC57BL/6マウスのMC38結腸腺癌腫瘍モデルに投与した。ヒトCTLA-4ノックインC57BL/6マウスに、2E6MC38細胞を腹腔左下四分円部に皮下注射した。7日間の腫瘍成長後、動物を、類似の平均腫瘍体積を有する群に分けた。動物に、標示された単回用量の対照ヒトIgG、WTイピリムマブ、または等モルのTMEAbody（抗体の濃度、n=6）をそれぞれ投与し、各動物について腫瘍体積をモニタリングした。図39に示されるように、イピリムマブTMEAbodyが、WTイピリムマブと同等の有効性で腫瘍サイズを制御するのに対し、対照のヒトIgGは、何ら有効性を示せなかった。腫瘍体積阻害率を表61にまとめた。この結果は、イピリムマブTMEAbodyを腫瘍の微小環境内で活性化し、抗腫瘍免疫応答を惹起できたことを意味する。

#### 【0369】

10

20

30

40

50

## 【表 6 1】

表 6 1 : 投与の 17 日後の腫瘍成長阻害率

変異 ID	用量	治癒率	死亡
ヒト IgG	5mg/kg	0	2
WT (Ipi)	5mg/kg	0	0
WT (Ipi)	20mg/kg	33.3	1
S47- Ipi-se053	5mg/kg	16.6%	0
S47- Ipi-se053	20mg/kg	83.3%	0
S47- Ipi-se066	5mg/kg	33.3%	0
S47- Ipi-se066	20mg/kg	83.3%	0

## 【 0 3 7 0】

表 6 1 に示されるように、S 4 7 - I p i 0 5 3 および S 4 7 - I p i 0 6 6 による腫瘍成長への阻害および治癒率は、同じモル濃度を用いて W T ( I p i ) により治療された群に比べて大きく向上した。

## 【 0 3 7 1】

C T L A - 4 T M E A b o d y は動物で低い免疫原性を示した

T M E A b o d y の免疫原性を評価するために、3 つの群の B a l b / c マウス ( 各 n = 5 ) を、完全フロイントアジュバント ( C F A ) を含む 5 0 μ g のイピリムマブ T M E A b o d y 、 W T イピリムマブ、またはイピリムマブプロボディ ( マスキングペプチドとして M Y 1 1 を、切断部分として 2 0 1 1 を用いた W O 2 0 1 8 / 0 8 5 5 5 5 A 1 ) により免疫した。一次免疫の 1 4 日後、動物を、不完全フロイントアジュバント ( I F A ) を含む 2 5 μ g のイピリムマブ T M E A b o d y 、 W T イピリムマブ、またはイピリムマブプロボディにより追加免疫した。追加免疫の 7 日後、血清を取得し、イピリムマブ T M E A b o d y 、 W T イピリムマブ、またはイピリムマブプロボディに対する抗体価について、それぞれ試験した。1 % ヒト血清を血清希釈緩衝液中に使用して、ヒト I g G の定常領域に対するどの抗体も遮断するものとした。図 4 0 に示されるように、T M E A b o d y が、W T イピリムマブと同等かまたはそれより低い抗体価で、極めて低い免疫応答を動物に引き起こした。しかしながら、イピリムマブプロボディは、免疫原性の劇的な増加を引き起こし、それは軽鎖の N 末端に含まれる外来配列に起因する可能性があった。

## 【 0 3 7 2】

C T L A - 4 T M E A b o d y は i n v i v o で低い毒性を示す

抗 P D - 1 と抗 C T L A - 4 の抗体の併用がメラノーマの治療に有効 ( O R R ) であるにも関わらず、現在の臨床研究で、併用が 5 5 % のグレード 3 ~ 4 の T R A E を呈し、患者の 3 0 % がその療法を中断せねばならないことが見出されたことが、当技術分野に周知である。我々は、非疾患環境での曝露時間または活性薬剤の用量を低減するように、抗体をコンジュゲートによって阻害または遮断し、局所環境に達した後に放出すれば、これらの T R A E が改善される可能性があるものと推定した。この理由から、I 型糖尿病に罹患した ( N O D ) マウスを用いて実験を実施した。この種類のマウスの糖尿病は自己免疫疾患であり、その場合、自己活性化された T リンパ球細胞が膵島細胞を破壊し、その結果、インスリンの分泌が不十分となる。まず、1 0 週齢の雌 N O D ( 北京維通利華実験動物技術有限公司 ) に、対照 I g G 、高用量 ( 1 5 m p k ) の抗 P D - 1 および抗 C T L A - 4 の抗体、または 1 5 m p k 用量の抗 P D - 1 および抗 C T L A - 4 の T M E A b o d y ( S 4 7 - I p i 0 5 3 ) をそれぞれ、0 日目に注射した。尿中グルコースおよび 2 つの血糖レベルを含む糖尿病の指標を、尿グルコースの新しい指標が観察されなくなるまで、1 2 日間にわたって毎日観察した。

## 【0373】

コンジュゲートによる自己免疫からの保護を図41に示した。結果は、併用療法コンジュゲートにおいて抗CTLA4 TMEAbodyのコンジュゲートにより免疫系を保護することによって、一次抗体に比較して自己免疫を低減できたことを示した。

## 【0374】

実施例16：PD-1 TMEAbody（ペムプロリズマブ）の生成および特性解析

上記のイピリムマブTMEAbodyスクリーニングの実施例に示されたように、抗PD-1抗体（ペムプロリズマブ）の複数の部位を、部位特異的コンジュゲーションのためにシステインに変異させた。抗PD-1抗体（ペムプロリズマブ）の重鎖の変異位置は、（カバット付番則または他の抗体付番則を用いずにN末端からC末端まで連続的に付番して）Ser7、Gly8、Gly15、Ala16、Ser17、Ala24、Ser25、Gly26、Tyr27、Thr28、Thr30、Asn31、Tyr32、Tyr33、Tyr35、Ala40、Gly42、Gly44、Leu45、Gly49、Gly50、Ile51、Asn52、Ser54、Asn55、Gly56、Gly57、Thr58、Asn59、Lys63、Lys65、Thr69、Leu70、Thr71、Thr72、Asp73、Ser74、Ser75、Thr76、Thr77、Thr78、Ala79、Leu83、Ser85、Leu86、Thr91、Ala92、Arg99、Asp100、Tyr101、Arg102、Asp104、Gly106、Gly111、Gly113、Thr114、115Thr、117Thr、Ser119、Ser120、Ala121、Ser122、Thr123、Lys124、Gly125、およびSer127からなる群から選択され；軽鎖の変異位置は、Ile2、Thr5、Ser7、Ala9、Thr10、Leu11、Ser12、Leu13、Ser14、Gly16、Ala19、Thr20、Ala25、Ser26、Lys27、Gly28、Ser30、Thr31、Ser32、Gly33、Tyr34、Ser35、Tyr36、Leu37、Gly45、Ala47、Leu50、Leu51、Ile52、Tyr53、Leu54、Ala55、Ser56、Tyr57、Leu58、Ser60、Gly61、Ala64、Ser67、Gly68、Ser69、Gly70、Ser71、Gly72、Thr73、Ala76、Thr78、Ser80、Ser81、Ser95、Arg96、Asp97、Leu98、Leu100、Thr101、Phe102、Gly104、Ile110、Lys111、およびK130からなる群から選択される。ヒトFcタグ付PD-1タンパク質（シノバイオロジカル）によるELISA特性解析を実施して、遮断効率および回復効率の良い候補部位を特定した。表62に示されるように、遮断効率>5倍（すなわち活性<20%）と酵素消化後に復活された活性（EC50変化<2倍、またはすなわち活性>50%）とを有する部位を、さらに別の展開のために選択した。

## 【0375】

10

20

30

40

50

## 【表 6 2】

表 6 2 : 遮断および回復の効率に基づく選択された抗 PD-1 TME A b o d y (ペムプロリズマブ) 候補

選択された変異の ID	重鎖または軽鎖	変異部位	R4	コンジュゲーション効率	S47 の遮断効率	R4 のコンジュゲーション後に復活した活性
Pem-se001	HC	Tyr27	R4-7	89%	5 倍	復活
Pem-se002	HC	Tyr32	R4-7	91%	6 倍	復活
Pem-se003	HC	Asn55	R4-11	92%	5 倍	復活
Pem-se004	HC	Lys65	R4-7	88%	7 倍	復活
Pem-se005	HC	Arg102	R4-26	87%	6 倍	復活
Pem-se006	LC	Lys27	R4-7	91%	6 倍	復活
Pem-se007	LC	Gly28	R4-1	94%	8 倍	復活
Pem-se008	LC	Tyr34	R4-7	90%	10 倍	復活
Pem-se009	LC	Tyr36	R4-7	93%	18 倍	復活
Pem-se010	LC	Tyr57	R4-7	95%	25 倍	復活
Pem-se011	LC	Arg96	R4-26	90%	7 倍	復活

10

20

## 【 0 3 7 6】

実施例 17 : 抗 PD-1 TME A b o d y (ペムプロリズマブ) の機能性特性解析  
 ヒト PBMC (A l l c e l l s) をウェル当たり  $1 \times 10^5$  細胞個の濃度で 96 ウェルプレートに播種した。細胞を  $0.1 \mu\text{g}/\text{mL}$  SEB により 3 日間刺激した。異なる濃度の WT 抗 PD-1 抗体、TME A b o d y、または活性化された TME A b o d y を添加し、 $37^\circ\text{C}$ 、 $5\% \text{CO}_2$  で 4 時間培養した。上清を採集し、細胞毒性因子 IFN- $\gamma$  の濃度を ELISA キット (R & D) によって検出した。機能性の遮断効率および回復率を表 6 3 にまとめた。

30

## 【 0 3 7 7】

40

50

## 【表 6 3】

表 6 3 : 抗 PD-1 TME A b o d y (ペムプロリズマブ) 候補の機能性特性解析

選択された変異の ID	重鎖または軽鎖	変異部位	IFN- $\gamma$ アッセイにおける S47 の遮断効率	R4 のコンジュゲーション後に復活した活性
Pem-se001	HC	Tyr27	3 倍	復活
Pem-se002	HC	Tyr32	4 倍	復活
Pem-se003	HC	Asn55	6 倍	復活
Pem-se004	HC	Lys65	7 倍	復活
Pem-se005	HC	Arg102	5 倍	復活
Pem-se006	LC	Lys27	7 倍	復活
Pem-se007	LC	Gly28	10 倍	復活
Pem-se008	LC	Tyr34	9 倍	復活
Pem-se009	LC	Tyr36	19 倍	復活
Pem-se010	LC	Tyr57	24 倍	復活
Pem-se011	LC	Arg96	10 倍	復活

10

20

## 【 0 3 7 8】

実施例 18 : PD - 1 TME A b o d y (ニボルマブ) の生成および特性解析

上記のイピリムマブおよびペムプロリズマブの TME A b o d y のスクリーニングの実施例に示されるように、抗 PD - 1 抗体 (ニボルマブ) の複数の部位を、部位特異的コンジュゲーションのためにシステインに変異させた。抗 PD - 1 抗体 (ニボルマブ) の重鎖の変異位置は、G l n 3、S e r 7、G l y 8、G l y 9、G l y 10、G l y 15、S e r 17、L y s 23、A l a 24、S e r 25、G l y 26、I l e 27、A s n 31、T h r 28、S e r 30、S e r 32、G l y 33、A l a 40、G l y 42、G l y 44、L e u 45、A l a 49、I l e 51、T y r 53、A s p 54、G l y 55、S e r 56、L y s 57、T y r 59、T y r 60、A l a 61、A s p 62、S e r 63、L y s 65、G l y 66、T h r 69、I l e 70、S e r 71、A r g 72、A s p 73、A s n 74、S e r 75、L y s 76、A s n 77、T h r 78、L e u 79、L e u 81、S e r 85、L e u 86、A l a 88、T h r 91、A l a 92、T h r 98、A s n 99、A s p 100、A s p 101、T y r 102、G l y 104、G l y 106、T h r 107、L e u 108、T h r 110、S e r 112、S e r 113、A l a 114、S e r 115、T h r 116、L y s 117、G l y 118、および S e r 120 からなる群から選択され；軽鎖の変異位置は、I l e 2、L e u 4、T h r 5、S e r 7、A l a 9、T h r 10、L e u 11、S e r 12、L e u 13、S e r 14、G l y 16、A l a 19、T h r 20、L e u 21、A l a 25、S e r 26、S e r 28、S e r 30、S e r 31、T y r 32、L e u 33、A l a 34、T y r 36、G l y 41、A l a 43、L e u 46、L e u 47、I l e 48、T y r 49、A s p 50、A l a 51、S e r 52、A s n 53、A r g 54、A l a 55、T h r 56、G l y 57、I l e 58、A l a 60、A r g 61、S e r 63、G l y 64、S e r 65、G l y 66、S e r 67、G l y 68、T h r 69、T h r 72、L e u 73、T h r 74、I l e 75、S e r 76、S e r 77、L e u 78、A l a 84、S e r 91、S e r 92、A s n 93、A r g 96、T h r 97、P h e 98、G l y 99、G l y 101、T h r 102、I l e 106、L y s 107、T h r 109、A l a 111、A l a 112、S e r 114、I l e 117 and S e r 121 からなる群から選択される。遮断効率 > 5 倍と酵素消化後に復活された活性 (E C 50 変化 < 2 倍) とを有する部位を、表 6 4 に示す

30

40

50

ようにさらに別の展開のために選択した。

【 0 3 7 9 】

【 表 6 4 】

表 6 4 : 遮断および回復の効率に基づく選択された抗 PD-1 TME A b o d y (ニボルマブ) 候補

選択された 変異の ID	重鎖ま たは軽 鎖	変異部 位	R4	コンジュゲ ーション効 率	S47 の遮断効率	R4 のコンジュゲーシ ョン後に復活した活性
Niv-se001	HC	Lys23	R4-7	95%	15 倍	増加、WT の 432%
Niv-se002	HC	Tyr53	R4-7	89%	5 倍	復活
Niv-se003	HC	Lys57	R4-7	88%	6 倍	復活
Niv-se004	LC	Tyr32	R4-7	92%	8 倍	復活
Niv-se005	LC	Tyr49	R4-7	94%	85 倍	増加、WT の 125%
Niv-se006	LC	Arg54	R4-26	93%	7 倍	復活
Niv-se007	LC	Ser91	R4-1	95%	25 倍	復活
Niv-se008	LC	Arg96	R4-26	93%	23 倍	復活

10

20

【 0 3 8 0 】

図 4 2 に示されるように、N i v - s e 0 0 1 は、R 4 - 7 のコンジュゲーションの後、または 4 0 k D コンジュゲート型 T M E A b o d y のプロテアーゼによる切断の後に、W T ニボルマブの 4 3 2 % という活性の増加を示した。これは、R 4 - 7 が本来のリジン残基よりも増加した結合活性をもたらしたことに起因する可能性がある。

【 0 3 8 1 】

N i v - s e 0 0 5 は、T r y 4 9 がシステインに変異されると、結合活性の喪失を示した。しかし、図 4 3 に示されるように、R 4 - 7 によるコンジュゲーションの後、または 4 0 k D の官能基にコンジュゲートされた N i v - s e 0 0 5 のプロテアーゼによる切断の後に、結合活性は、W T ニボルマブと同等のレベル ( W T の 1 2 5 % ) に復活する。

30

【 0 3 8 2 】

実施例 1 9 : 抗 PD - 1 T M E A b o d y (ニボルマブ) の機能性特性解析

ヒト P B M C ( A l l c e l l s ) をウェル当たり  $1 \times 10^5$  細胞個の濃度で 9 6 ウェルプレートに播種した。細胞を  $0.1 \mu\text{g}/\text{mL}$  S E B により 3 日間刺激した。異なる濃度の抗 PD - 1 抗体 (ニボルマブ)、T M E A b o d y (ニボルマブ)、または活性化された T M E A b o d y (ニボルマブ) を添加し、3 7 、 5 % C O <sub>2</sub> で 4 時間培養した。上清を採集し、細胞毒性因子 I F N - の濃度を E L I S A キット ( R & D ) によって検出した。機能性の遮断効率および回復率を表 6 5 にまとめた。

【 0 3 8 3 】

40

50

【表 6 5】

表 6 5 : 抗 PD-1 TME A b o d y (ニボルマブ) 候補の機能性特性解析

選択された変異の ID	重鎖または軽鎖	変異部位	IFN- $\gamma$ アッセイにおける S47 の遮断効率	R4 のコンジュゲーション後に復活した活性
Niv-se001	HC	Lys23	18 倍	増加、WT の 332%
Niv-se002	HC	Tyr53	3 倍	復活
Niv-se003	HC	Lys57	7 倍	復活
Niv-se004	LC	Tyr32	8 倍	復活
Niv-se005	LC	Tyr49	25 倍	復活、WT の 122%
Niv-se006	LC	Arg54	9 倍	復活
Niv-se007	LC	Ser91	24 倍	復活
Niv-se008	LC	Arg96	21 倍	復活

10

【 0 3 8 4】

実施例 2 0 : マウス腫瘍の治療における抗 PD - 1 T M E A b o d y (ペムプロリズマブおよびニボルマブ) の i n v i v o 特性解析

20

動物モデルで腫瘍を治療する際の抗 PD - 1 T M E A b o d y の i n v i v o 有効性の特徴をさらに明らかにするために、抗 PD - 1 T M E A b o d y (ペムプロリズマブをベースとした P e m - s e 0 1 0 T M E A b o d y およびニボルマブをベースとした N i v - s e 0 0 7 T M E A b o d y)、ならびに W T P D - 1 抗体 s (ペムプロリズマブおよびニボルマブ) および対照ヒト I g G を、ヒト P D - 1 ノックイン C 5 7 B L / 6 マウスにおける M C 3 8 結腸腺癌腫瘍モデルに投与した。ヒト P D - 1 ノックイン C 5 7 B L / 6 マウスに、2 E 6 M C 3 8 細胞を腹腔左下四分円部に皮下注射した。7 日間の腫瘍成長後、動物を、類似の平均腫瘍体積を有する群に分けた。動物に 1 0 m g / k g の単回用量の P D - 1 T M E A b o d y ( P E G リンカーを含まない抗体の濃度)、W T P D - 1 抗体、または対照ヒト I g G を投与し、各動物について腫瘍体積をモニタリングした。

30

【 0 3 8 5】

図 4 4 に示されるように、ペムプロリズマブ T M E A b o d y およびニボルマブ T M E A b o d y が、W T のペムプロリズマブ抗体またはニボルマブ抗体と同等の有効性で腫瘍サイズを制御するのに対して、対照のヒト I g G は何ら有効性を示せなかった。興味深いことに、N i v - s e 0 0 1 T M E A b o d y は、腫瘍の治療において、おそらくはプロテアーゼ切断後に結合活性が増強されたために、W T ニボルマブよりも向上した有効性を示した。この結果は、これらの抗 PD - 1 T M E A b o d y が腫瘍微小環境で活性化し、抗腫瘍免疫応答を引き起こすことができたことを意味する。

40

【 0 3 8 6】

実施例 2 1 : マウス腫瘍モデルにおける有効性試験のためのマウス抗 PD - 1 抗体 ( J 4 3 v 2 ) の生成

ハムスター抗マウス P D - 1 抗体配列は、米国特許出願公開公報第 2 0 1 7 0 0 4 4 2 5 9 号 A 1 に開示されていた。マウス内での免疫原性を低減するために、この抗体のこの重鎖を、マウス I g G 2 a にリフォーマットした。上記のスクリーニング方法のように、遮断効率の高い T M E A b o d y のスクリーニングのために、複数の部位を設計した。最終的に、L C 上の S e r 9 5 を、その高効率の遮断 (マウス P D - 1 タンパク質を用いた E L I S A アッセイで 3 5 倍) ゆえに T M E A b o d y の生成のために選択した。S N 3 8 マウス腫瘍モデルに、W T J 4 3 v 2 抗体または J 4 3 v 2 T M E A b o d y の 1 0

50

mg/kgの単回用量投与を行った(各群n=8)。投与後17日目に、J43v2 TMEAbodyは、75%の腫瘍阻害を示し、WT J43v2抗体(83%)と同等の阻害有効性であった。この結果は、PD-1抗体を活性化することができ、その抗腫瘍活性in vivoで発揮したことを示す。

#### 【0387】

実施例22：マウス腫瘍モデルにおける有効性試験のための抗マウスCTLA-4抗体(9D9)の生成

さらに別の機能性試験および毒性試験に用いるマウスCTLA-4サロゲートTMEAbodyを生成するために、我々は、抗マウスCTLA-4抗体とその変異体パリアント(9D9クローン、mIgG2bアイソタイプ、WO2007/123737A2に示される配列)を作製して精製した。上記のスクリーニング方法のように、遮断効率の高いTMEAbodyのスクリーニングのために、複数の部位を設計した。最終的に、LC上のTyr54を、その高効率の遮断(マウスCTLA-4タンパク質を用いたELISAアッセイで26倍)ゆえにTMEAbodyの生成のために選択した。CT26マウス腫瘍モデルに、WT 9D9抗体または9D9 TMEAbodyの10mg/kgの単回用量投与を行った(各群n=8)。投与後17日目に、9D9 TMEAbodyは、69%の腫瘍阻害を示し、WT 9D9抗体(74%)と同等の阻害有効性であった。この結果は、9D9 TMEAbodyを活性化することができ、その抗腫瘍活性in vivoで発揮したことを示す。

#### 【0388】

実施例23：マウス型のPD-1 TMEAbodyおよびCTLA-4 TMEAbodyは、WT抗体よりも減少した毒性を示した

抗PD-1と抗CTLA-4の抗体の併用がメラノーマの治療に有効(ORR)であるにも関わらず、現在の臨床研究で、併用が55%のグレード3~4のTRAEを呈し、患者の30%がその療法を中断せねばならないことが見出されたことが、当技術分野に周知である。我々は、非疾患環境での曝露時間または活性薬剤の用量を低減するように、抗体をコンジュゲートによって阻害または遮断し、腫瘍の局所環境に達した後に放出すれば、これらのTRAEが改善される可能性があるものと推定した。この理由から、I型糖尿病に罹患した(NOD)マウスを用いて実験を実施した。この種類のマウスの糖尿病は自己免疫疾患であり、その場合、自己活性化されたTリンパ球細胞が膵島細胞を破壊し、その結果、インスリンの分泌が不十分となる。まず、0日目に、10週齢の雌NOD(北京維通利華実験動物技術有限公司)に、対照IgG、高用量(15mpk)の抗マウスPD-1抗体(J43v2)および抗マウスCTLA-4抗体(9D9)を注射するか、またはこれら2つの抗体のうち一方もしくは両方をそのTMEAbody体に置き換えた。尿中グルコースおよび2つの血糖レベルを含む糖尿病の指標を、尿グルコースの新しい指標が観察されなくなるまで、12日間にわたって毎日観察した。

#### 【0389】

コンジュゲートによる自己免疫からの保護を図45に示した。結果は、併用療法における抗CTLA4 TMEAbodyまたは抗PD1 TMEAbodyが、一次抗体に比較して自己免疫を低減できたことを示した。さらに、これらの2つのTMEAbodyを併用した結果、対照群と同等のレベルで非常に低い毒性を生じた。

#### 【0390】

実施例24：抗PD-1 TMEAbody(特許WO2017/124050A1)の生成および特性解析

上記の方法の通りに、抗PD-1抗体配列を特許出願WO2017/124050A1からダウンロードし、部位のスクリーニングを実施して、遮断効率の良いTMEAbodyを特定した。抗PD-1抗体の重鎖の変異位置は、Ser28、Ser31、Tyr33、Asn36、Gly50、Tyr51、Ser53、Tyr54、Asp55、Ser57、Lys58、Asn59、Tyr60、Asn61、Lys65、Asn66、Thr69、Thr74、Gly100、Asp105、Tyr106からなる群から選

択され；軽鎖の変異位置は、L y s 2 4、G l n 2 7、S e r 2 8、A s p 3 1、A s p 3 2、A s n 3 3、A s n 3 4、G l n 3 5、L y s 3 6、A s n 3 7、T y r 3 8、S e r 5 8、A r g 6 0、G l u 6 1、S e r 6 2、G l y 6 3、G l y 7 0、S e r 7 3、T h r 7 5、G l n 9 5、G l n 9 6、T y r 9 8、T h r 1 0 0、T y r 1 0 2 からなる群から選択される。結合E L I S Aを、F c タグ付ヒトP D - 1 タンパク質（シノバイオロジカル）を用いて実施し、遮断効率（E C 5 0 変化 > 5 倍）および回復（E C 5 0 変化 < 2 倍）の良い選択された部位を表 6 6 にまとめた。

【 0 3 9 1 】

【 表 6 6 】

10

表 6 6 : 遮断および回復の効率に基づく選択された抗 P D - 1 T M E A b o d y ( W O 2 0 1 7 / 1 2 4 0 5 0 A 1 ) 候補

選択された変異の ID	重鎖または軽鎖	変異部位	R4	コンジュゲーション効率	S47 の遮断効率	R4 のコンジュゲーション後に復活した活性
PD1-se001	HC	Tyr33	R4-7	99%	198 倍	復活
PD1-se002	HC	Ser53	R4-1	95%	9 倍	復活
PD1-se003	HC	Tyr60	R4-7	88%	6 倍	復活
PD1-se004	LC	Tyr38	R4-7	94%	15 倍	復活
PD1-se005	LC	Ser58	R4-1	93%	16 倍	復活
PD1-se006	LC	Thr100	R4-3	91%	6 倍	復活

20

30

【 0 3 9 2 】

実施例 2 5 : 抗 4 - 1 B B T M E A b o d y の生成および特性解析

4 - 1 B B 抗体配列を米国特許出願公開公報第 2 0 1 8 / 0 1 9 4 8 5 1 A 1 ( クローン M O R 7 4 8 0 . 1 ) からダウンロードした。抗 4 - 1 B B 抗体の重鎖の変異位置は、T h r 3 1、T y r 3 2、S e r 3 5、L y s 5 0、T y r 5 2、A s p 5 5、S e r 5 6、T y r 5 7、T h r 5 8、A s n 5 9、T y r 6 0、S e r 6 1、G l n 6 5、G l y 6 6、G l y 9 9、T y r 1 0 0、G l y 1 0 1、A s p 1 0 4、T y r 1 0 5 からなる群から選択され；軽鎖の変異位置は、S e r 2 3、G l y 2 4、A s p 2 5、A s n 2 6、G l y 2 8、A s p 2 9、G l n 3 0、T y r 3 1、G l n 4 9、A s p 5 0、L y s 5 1、A s n 5 2、A r g 5 3、S e r 5 5、G l y 5 6、T h r 8 9、T y r 9 0、T h r 9 1、G l y 9 2、G l y 9 4、S e r 9 5 からなる群から選択される。ヒト 4 - 1 B B タンパク質を E L I S A 特性解析に使用して、遮断効率が良い（E C 5 0 変化 > 5 倍）ならびにプロテアーゼ消化後の回復が良い（E C 5 0 変化 < 2 倍）変異体部位を特定した。選択された部位を表 6 7 および表 6 8 にまとめた。

40

【 0 3 9 3 】

50

## 【表 6 7】

表 6 7 : 遮断および回復の効率に基づく選択された抗 4-1BB TMEAbody 候補

選択された変異の ID	重鎖または軽鎖	変異部位	R4	コンジュゲーション効率	S47 の遮断効率	R4 のコンジュゲーション後に復活した活性
4-1BB-se001	HC	Tyr32	R4-7	95%	23 倍	復活
4-1BB-se002	HC	Lys50	R4-7	93%	16 倍	復活
4-1BB-se003	HC	Tyr105	R4-7	94%	9 倍	復活
4-1BB-se004	LC	Tyr31	R4-7	94%	18 倍	復活
4-1BB-se005	LC	Lys51	R4-7	96%	6 倍	復活
4-1BB-se006	LC	Tyr90	R4-7	95%	7 倍	復活
4-1BB-se007	LC	Thr91	R4-1	91%	11 倍	復活

10

## 【0394】

## 【表 6 8】

表 6 8 : 遮断および回復の効率に基づく選択された抗 4-1BB TMEAbody 候補

選択された変異の ID	重鎖または軽鎖	変異部位	R4	S27 の遮断効率	S48 の遮断効率	グランザイム B による S48 の復活した活性	pH6.0 による S27 の復活した活性
4-1BB-se001	HC	Tyr32	R4-7	23 倍	20 倍	復活	復活
4-1BB-se002	HC	Lys50	R4-7	16 倍	12 倍	復活	復活
4-1BB-se003	HC	Tyr105	R4-7	9 倍	7 倍	復活	復活
4-1BB-se004	LC	Tyr31	R4-7	18 倍	18 倍	復活	復活
4-1BB-se005	LC	Lys51	R4-7	6 倍	5 倍	復活	復活
4-1BB-se006	LC	Tyr90	R4-7	7 倍	6 倍	復活	復活
4-1BB-se007	LC	Thr91	R4-1	11 倍	10 倍	復活	復活

30

40

## 【0395】

実施例 26 : 抗 Her2 TMEAbody (トラスツズマブ) の生成および特性解析  
トラスツズマブの重鎖配列および軽鎖配列を、Drug Bank (<https://www.drugbank.ca/drugs/DB00072>) からダウンロードし、部位スクリーニングを実施して、遮断効率の良い抗 Her2 TMEAbody を特定し

50

た。抗Her2抗体(トラスツズマブ)の重鎖の変異位置は、Arg19、Lys30、Asp31、Tyr33、Arg50、Tyr62、Asn55、Tyr57、Arg59、Tyr60、Asp62、Lys65、Asp102、Tyr105からなる群から選択され；軽鎖の変異位置は、Asp1、Gln3、Gln27、Asp28、Asn30、Tyr49、Tyr55、Arg66、Asp70、Tyr92からなる群から選択される。Hisタグ付Her2タンパク質(シノバイオロジカル)をELISAに使用した。遮断効率が高く回復が良い選択された部位を表69にまとめた。

【0396】

【表69】

表69：遮断および回復の効率に基づく選択された抗Her2 TMEAbody候補

選択された変異のID	重鎖または軽鎖	変異部位	R4	コンジュゲーション効率	S47の遮断効率	R4のコンジュゲーション後に復活した活性
Trast-se001	HC	Tyr33	R4-7	97%	13倍	復活
Trast-se002	HC	Lys65	R4-7	95%	8倍	復活
Trast-se003	HC	Tyr105	R4-7	90%	25倍	復活
Trast-se004	LC	Gln30	R4-11	89%	16倍	復活
Trast-se005	LC	Tyr49	R4-7	91%	20倍	復活
Trast-se006	LC	Asp70	R4-11	96%	7倍	復活

【0397】

実施例27：抗TNFα TMEAbody(アダリムマブ)の生成および特性解析

アダリムマブの重鎖配列および軽鎖配列を、Drug Bank(<https://www.drugbank.ca/drugs/DB00051>)からダウンロードし、部位スクリーニングを実施して、遮断効率の良い抗TNFα TMEAbodyを特定した。抗TNFα抗体の重鎖の変異位置は、Ser7、Gly8、Gly9、Gly10、Leu11、Gly15、Ser17、Leu18、Leu20、Ala24、Ser25、Gly26、Thr28、Asp30、Asp31、Tyr32、Ala33、Ala40、Gly42、Gly44、Leu45、Ser49、Ala50、Ile51、Thr52、Asn54、Ser55、Gly56、Ile58、Asp59、Tyr60、Ala61、Asp62、Ser63、Glu65、Gly66、Phe68、Thr69、Ile70、Ser71、Asp73、Asn74、Ala75、Lys76、Ser78、Leu79、Tyr80、Leu81、Ser85、Leu86、Ala88、Thr91、Ala92、Lys98、Ser100、Tyr101、Leu102、Ser103、Thr104、Ala105、Ser106、Ser107、Leu108、Asp109、Tyr110、Gly112、Gly114、Thr115、Leu116、Thr118、Ser120、Ser121、Ala122、Ser123、およびThr124からなる群から選択され；軽鎖の変異位置は、Asp1、Thr5、Ser7、Ser9、Ser10、Leu11、Ser12、Ala13、Ser14、Gly16、Thr20、Ile21、Ala25、Ser26、Gln27、Gly28、Ile29、Arg30、Asn31、Tyr32、Leu33、Ala34、Tyr36、Lys39、Gly41、Lys42、Ala43、Leu48、Leu47、Ile48、Tyr49、Ala50、Ala51、Ser52、Thr53、Leu54、Gln55、Ser56、Gly57、Ser60、Ser63、Gly64、Ser65、Gly66、Ser67、Gly68、Thr69、Asp70、Thr72、Leu73、Thr74、Ile75、Ser76、Ser77、Leu78、Ala84

10

20

30

40

50

、Thr85、Tyr91、Asn92、Arg93、Ala94、Tyr96、Thr97、Phe98、Gly99、Gly101、Thr102、Ile106、Lys107、Thr109、およびAla111からなる群から選択される。TNF $\alpha$ タンパク質（シノバイオロジカル）をELISA特性解析に使用し、遮断効率が良い（EC50変化>5倍）回復が良い（EC50変化<2倍）選択された部位を表70にまとめた。

【0398】

【表70】

表70：遮断および回復の効率に基づく選択された抗TNF $\alpha$  TMEAbody候補

選択された変異のID	重鎖または軽鎖	変異部位	R4	コンジュゲーション効率	S47の遮断効率	R4のコンジュゲーション後に復活した活性
Ada-se001	HC	Tyr32	R4-7	95%	11倍	復活
Ada-se002	HC	Asp59	R4-11	92%	7倍	復活
Ada-se003	HC	Tyr101	R4-7	93%	6倍	復活
Ada-se004	LC	Arg30	R4-26	96%	25倍	復活
Ada-se005	LC	Tyr32	R4-7	94%	28倍	復活
Ada-se006	LC	Gln55	R4-11	91%	32倍	復活
Ada-se007	LC	Tyr96	R4-7	92%	9倍	復活

【0399】

実施例28：抗PD-L1 TMEAbody（アテゾリズマブ）の生成および特性解析  
抗PD-L1抗体（アテゾリズマブ）の重鎖配列および軽鎖配列をDrug Bank（<https://www.drugbank.ca/drugs/DB11595>）からダウンロードし、部位スクリーニングを実施して、遮断効率の良い抗TNF $\alpha$  TMEAbodyを特定した。抗PD-L1抗体（アテゾリズマブ）の重鎖の変異位置は、Gln3、Asp31、Tyr54、Tyr59、Tyr60、Asp62、Lys65、Asp73、Lys76、Asn77、Arg99からなる群から選択され；軽鎖の変異位置は、Arg24、Gln27、Asp28、Tyr49、Tyr55、Asp70、Gln89、Gln90、Tyr91、Tyr93からなる群から選択される。Fcタグ付ヒトPD-L1タンパク質（シノバイオロジカル）をELISA特性解析に使用し、遮断効率が良い（EC50変化>5倍）回復が良い（EC50変化<2倍）選択された部位を表71にまとめた。

【0400】

10

20

30

40

50

## 【表 7 1】

表 7 1 : 遮断および回復の効率に基づく選択された抗 PD-L1 TMEAbody 候補

選択された変異の ID	重鎖または軽鎖	変異部位	R4	コンジュゲーション効率	S47 の遮断効率	R4 のコンジュゲーション後に復活した活性
Ate-se001	HC	Tyr54	R4-7	98%	15 倍	復活
Ate-se002	HC	Lys76	R4-7	93%	7 倍	復活
Ate-se003	LC	Asp28	R4-11	91%	10 倍	復活
Ate-se004	LC	Tyr49	R4-7	96%	13 倍	復活
Ate-se005	LC	Tyr91	R4-7	92%	23 倍	復活

10

## 【0401】

実施例 29 : 抗 CD28 TMEAbody の生成および特性解析

抗ヒト CD28 抗体重鎖配列および軽鎖配列を、米国特許第 8709414 号 B2 からダウンロードし、部位スクリーニングを実施して、遮断効率の良い抗 CD28 TMEAbody を特定した。抗 CD28 抗体の重鎖の変異位置は、Ser7、Gly8、Gly15、Ala16、Ser17、Ser21、Ala24、Ser25、Gly26、Tyr27、Thr28、Thr30、Ser31、Tyr32、Ala40、Gly42、Gly44、Gly49、Tyr52、Gly54、Thr58、Ala68、Thr69、Thr71、Thr74、Ser75、Ser77、Thr78、Ala79、Ser84、Leu86、Ser88、Thr91、Ala92、Thr97、Ser99、Tyr101、Gly102、Leu103、Gly113、Thr114、Thr115、Thr117、Ser119、Ser120、Ala121、Ser122、および Thr123 からなる群から選択され；軽鎖の変異位置は、Thr5、Ser7、Ser9、Ser10、Ser11、Ser12、Ala13、Ser14、Gly16、Thr20、Thr22、Ala25、Ser26、Ser27、Ile29、Tyr30、Ala43、Leu46、Leu47、Tyr49、Lys50、Ala51、Ser52、Leu54、Thr56、Gly57、Ser60、Ser63、Gly64、Ser65、Gly66、Ser67、Gly68、Thr69、Asp70、Thr72、Thr74、Ser76、Ser77、Ala84、Thr85、Gly91、Thr93、Tyr94、Tyr96、Thr97、Phe98、Gly99、Gly100、Gly101、Thr102、Thr109、および Ala111 からなる群から選択される。Fc タグ付ヒト CD28 タンパク質 (シノバイオロジカル) を ELISA 特性解析に使用して、遮断効率が良い (EC50 変化 > 5 倍) 回復が良い (EC50 変化 < 2 倍) 選択された部位を表 7 2 に示す。

20

30

40

## 【0402】

50

## 【表 7 2】

表 7 2：遮断および回復の効率に基づく選択された抗 CD28 TME A b o d y 候補

選択された変異の ID	重鎖または軽鎖	変異部位	R4	コンジュゲーション効率	S47 の遮断効率	R4 のコンジュゲーション後に復活した活性
CD28-se001	HC	Tyr27	R4-7	95%	6 倍	復活
CD28-se002	HC	Thr58	R4-1	93%	7 倍	復活
CD28-se003	HC	Tyr101	R4-7	91%	6 倍	復活
CD28-se004	LC	Tyr30	R4-7	91%	16 倍	復活
CD28-se005	LC	Tyr49	R4-7	98%	32 倍	復活
CD28-se006	LC	Lys50	R4-7	92%	27 倍	復活
CD28-se007	LC	Tyr96	R4-7	90%	13 倍	復活

10

## 【 0 4 0 3】

実施例 3 0：腫瘍の微小環境で活性化される I L - 1 0 サイトカイン ( I L - 1 0 T M E A k i n e )

20

## 1. 変異体 I L - 1 0 サイトカインの発現および精製

改変型 p T T 5 ベクター ( バイオベクター ) にライゲーションされた変異体 I L - 1 0 の DNA 配列は、2 9 3 T 細胞の発現のために最適化し合成 ( ジーンウィズ社、蘇州、中国 ) したものである。変異体 I L - 1 0 の DNA のトランスフェクションを実施し、4 ~ 7 日間のインキュベーションの後、変異体 I L - 1 0 を含有する上清を採集した。

## 【 0 4 0 4】

ピキア・パストリスでの発現では、変異体 I L - 1 0 遺伝子を含む発現ベクター p P I C Z A を最適化し調製 ( ジーンウィズ社、蘇州、中国 ) した。変異体 I L - 1 0 のアミノ酸配列を配列番号 1 に記載した。発現ベクター p P I C Z A を、プラスミド精製のために大腸菌 ( D H 5 ) に形質転換した。次いで、p P I C Z A を、エレクトロポレーションによって G S 1 1 5 に形質転換した。1 0 0、3 0 0、5 0 0、1 0 0 0、1 5 0 0、2 0 0 0 u g / m L のゼオシン ( 商標 ) 含有 Y P D プレート上で成長させた後に成長していたコロニーを得ることによって、形質転換されたコロニーを選択した。形質転換体を最終的に選択した後、組換え G S 1 1 5 株を、バッフルフラスコにて激しい攪拌により、B M G Y 培地中 3 0 で成長させて O D 6 0 0 値 2 ~ 6 とした。次いで、細胞を遠心分離によりペレットとし、B M M Y に再懸濁して O D 6 0 0 値 1 とし、異種タンパク質発現を誘導するために 0 . 5 % メタノールを毎日添加した。4 日間の誘導後、分泌された変異体 I L - 1 0 タンパク質を含有する上清を、遠心分離により採集した。上清中の総タンパク質を、1 0 k D a 分子量カットオフ膜を用いて限外濾過により濃縮した。濃縮されたタンパク質を、緩衝液 A ( 2 0 m M B I S - T R I S、0 . 0 6 5 M N a C l、p H 6 . 5 ) により 2 4 時間超にわたって透析し、次いで、緩衝液 A により平衡化された陽イオン交換カラムにロードした。変異体 I L - 1 0 を、0 . 0 6 5 ~ 0 . 4 M の範囲の勾配濃度の N a C l によりカラムから溶出し、溶出物を採集し濃縮した。濃縮された試料を、S e p h a c r y l S - 1 0 0 H R ゲル濾過カラムにて、1 0 m M T r i s - H C l、p H 7 . 4 を溶出緩衝液として用いてさらに精製した。

30

40

## 【 0 4 0 5】

2. S 4 8 を変異体 I L - 1 0 へコンジュゲートし、それを I L - 1 0 T M E A k i n e という名称で呼んだ ( 腫瘍の微小環境で活性化され I L - 1 - サイトカイン )。

変異体 I L - 1 0 タンパク質を、上記に記載されたように生成して精製した。精製された変異体 I L - 1 0 を、2 m M E D T A を含有する 2 0 m M T r i s 緩衝液 ( p H 7 .

50

4) 中、濃度 0.5 mg/mL として実施した。TCEP 溶液を変異体 IL-10 にモル比 100:1 で添加し、穏やかに振盪しながら 4 で 4 時間インキュベートした。次いで、変異体 IL-10 溶液を、150 mM NaCl を含有する 20 mM Tris 緩衝液 (pH 7.4) により、4 で 4 時間透析した。その後、S48 を直ちに変異体 IL-10 溶液にモル比 20:1 で添加し、穏やかに振盪しながら 25 で 16 時間インキュベートした。残存する S48 を除去することによって、反応を停止した。酵素切断の前に、IL-10 TMEActive 緩衝液を、透析を介して酵素緩衝液に交換した。活性化のために、酵素を IL-10 TMEActive 溶液に添加し、37 で 16 時間インキュベートした。

#### 【0406】

3. IL-10 R1 または R2 との結合を遮断し、*in vitro* での酵素切断後に結合活性を回復する IL-10 TMEActive のスクリーニング

1  $\mu$ g の IL-10 R1-Fc / IL-10 R2-Fc / His 溶液を含有する 60  $\mu$ L の PBS 緩衝液を、ウェルに分注した。シールテープをプレートの上部に貼り、プレートを 4 で一晩インキュベートした。インキュベーション後、テープを取り外して、各ウェルを吸引した。PBST で 3 回洗浄した後、2% BSA を含有する 200  $\mu$ L の PBS 緩衝液を各ウェルに分注することによってプレートをブロッキングし、プレートを室温で 2 時間インキュベートした。プレートを 3 回洗浄し、60  $\mu$ L の系列希釈された試料を適切なウェルに添加した。プレートを室温で 1.5 時間インキュベートした。PBS で 3 回洗浄した後、60  $\mu$ L の 2  $\mu$ g/mL IL-10 ビオチン化抗体溶液を各ウェルに分注し、室温で 1 時間インキュベートした。プレートを 3 回洗浄し、次いで、60  $\mu$ L のストレプトアビジン溶液を各ウェルに分注した。プレートを室温で 30 分間インキュベートした。3 回洗浄した後、100  $\mu$ L の HRP 基質溶液を各ウェルに分注し、プレートを 37 で 15 分間インキュベートした。発色を展開させた後、50  $\mu$ L の停止溶液を各ウェルに分注し、各ウェルの吸光度を直ちに波長 450 nm で測定した。

#### 【0407】

##### 4. 様々な IL-10 変異部位の概要

細胞表面の IL-10 受容体は、2 つの異なる形態を形成する：高親和性の受容体：IL-10 に対する IL-10 R1 ( $K_d = 50 \sim 200$  pM) および低親和性の受容体：IL-10 に対する IL-10 R2。低親和性の結合 ( $K_d = 10$  nM) ゆえに、結合親和性を回復するための R4 基に連結するのに用いる位置をスクリーニングするのは、抗体の CDR 領域よりも容易である。R4 にコンジュゲートされた IL-10 は、R4 ライブラリースクリーニングの化学修飾成熟により、いくつかの位置で > 80% の結合を回復することができる。薬剤候補を選択するために、我々はまた、スクリーニング発現と、IL-10 R1 および IL-10 R2 を結合するドメイン内の IL-10 の全アミノ酸との S48 のコンジュゲーション反応を実施した。我々は、将来性のある薬剤候補を取得したので、結果を以下の表 73 に示す。

#### 【0408】

10

20

30

40

50

## 【表 7 3】

表 7 3 : 変異型 I L - 1 0 の活性およびリンカーアームについてのスクリーニング

位置	アミノ酸	アミノ酸	阻害性リガンドのタイプ	R4	結合回復 (>60%)	S48 とコンジュゲートした後のリガンドとの結合の減少倍率 (>3 倍)
6	T	Thr	1	R4-7	101.2%	3 倍
8	S	Ser	1	R4-5	100.0%	3 倍
11	S	Ser	1	R4-7	132.9%	9 倍
13	T	Thr	1	R4-6	99.1%	7 倍
17	G	Gly	1	R4-1	90.2%	15 倍
18	N	Asn	1	R4-18	92.3%	12 倍
19	L	Leu	1	R4-7	95.3%	8 倍
21	N	Asn	1	R4-18	99.7%	7 倍
22	M	Met	1	R4-1	96.8%	5 倍
23	L	Leu	1	R4-6	101.2%	12 倍
24	R	Arg	1	R4-20	90.0%	33 倍
25	D	Asp	1	R4-12	97.1%	3 倍
26	L	Leu	1	R4-6	93.4%	3 倍
27	R	Arg	1	R4-20	86.6%	12 倍
28	D	Asp	1	R4-11	92.3%	30 倍
30	F	Phe	1	R4-8	97.1%	6 倍
31	S	Ser	1	R4-2	124.6%	39 倍
32	R	Arg	1	R4-7	90.4%	13 倍
34	K	Lys	1	R4-7	99.6%	50 倍
35	T	Thr	1	R4-6	90.1%	36 倍
38	Q	Gln	1	R4-19	87.0%	52 倍
39	M	Met	1	R4-1	88.0%	62 倍
41	D	Asp	1	R4-11	95.2%	13 倍
42	Q	Gln	1	R4-19	90.0%	18 倍
44	D	Asp	1	R4-11	92.1%	43 倍
45	N	Asn	1	R4-18	97.7%	7 倍
46	L	Leu	1	R4-6	89.6%	22 倍
48	L	Leu	1	R4-7	98.9%	3 倍
49	K	Lys	1	R4-5	114.0%	7 倍
50	E	Glu	1	R4-12	99.8%	4 倍
51	S	Ser	1	R4-7	96.7%	3 倍
53	L	Leu	1	R4-6	99.4%	3 倍

10

20

30

40

50

54	L	Leu	1	R4-6	98.4%	3 倍
56	Q	Gln	1	R4-19	95.1%	3 倍
57	E	Glu	1	R4-12	95.4%	10 倍
65	L	Leu	1	R4-6	92.3%	3 倍
69	I	Ile	1	R4-6	97.3%	3 倍
72	Y	Tyr	1	R4-4	109.0%	3 倍
75	V	Val	1	R4-5	98.6%	4 倍
90	H	His	1	R4-19	86.5%	8 倍
91	V	Val	1	R4-5	97.2%	3 倍
93	S	Asp	1	R4-2	100.1%	3 倍
94	L	Leu	1	R4-6	88.4%	5 倍
97	N	Asn	1	R4-18	94.5%	5 倍
100	T	Thr	1	R4-7	99.3%	4 倍
104	R	Arg	1	R4-20	98.5%	3 倍
105	L	Leu	1	R4-6	92.3%	5 倍
107	R	Arg	1	R4-20	99.5%	3 倍
111	F	Phe	1	R4-8	90.1%	12 倍
117	K	Lys	1	R4-7	116.6%	3 倍
118	S	Ser	1	R4-5	100.0%	3 倍
119	K	Lys	1	R4-7	99.0%	3 倍
130	K	Lys	1	R4-7	100.0%	3 倍
131	L	Leu	1	R4-6	98.5%	5 倍
134	K	Lys	1	R4-7	128.3%	5 倍
135	G	Gly	1	R4-1	99.5%	3 倍
137	Y	Tyr	1	R4-4	99.1%	5 倍
138	K	Lys	1	R4-7	97.6%	23 倍
140	M	Met	1	R4-1	89.0%	3 倍
141	S	Ser	1	R4-7	112.5%	19 倍
142	E	Glu	1	R4-12	78.0%	13 倍
143	F	Phe	1	R4-8	69.0%	7 倍
144	D	Asp	1	R4-11	90.5%	15 倍
148	N	Asn	1	R418	84.3%	10 倍
149	Y	Tyr	1	R4-4	115.3%	5 倍
151	E	Glu	1	R4-12	82.5%	13 倍
155	T	Thr	1	R4-7	98.1%	3 倍

10

20

30

40

50

157	K	Lys	1	R4-7	98.6%	3 倍
158	I	Ile	1	R4-6	81.7%	9 倍
159	R	Arg	1	R4-20	99.0%	3 倍
15	F	Phe	2	R4-8	90.0%	3 倍
18	N	Asn	2	R4-18	99.8%	4 倍
21	N	Asn	2	R4-18	85.3%	6 倍
22	M	Met	2	R4-1	80.0%	6 倍
24	R	Arg	2	R4-20	98.1%	9 倍
25	D	Asp	2	R4-11	91.5%	5 倍
28	R	Arg	2	R4-20	99.0%	6 倍
29	A	Ala	2	R4-5	78.0%	3 倍
31	S	Ser	2	R4-2	87.4%	7 倍
32	R	Arg	2	R4-7	89.6%	9 倍
33	V	Val	2	R4-7	91.4%	3 倍
34	K	Lys	2	R4-7	97.3%	5 倍
35	T	Thr	2	R4-5	123.0%	6 倍
36	F	Phe	2	R4-8	79.6%	3 倍
81	E	Glu	2	R4-12	93.6%	3 倍
86	D	Asp	2	R4-11	81.0%	3 倍
87	I	Ile	2	R4-6	95.7%	4 倍
88	K	Lys	2	R4-7	99.0%	3 倍
89	A	Ala	2	R4-1	78.7%	5 倍
90	H	His	2	R4-19	79.0%	7 倍
92	N	Asn	2	R4-18	86.4%	3 倍
96	E	Glu	2	R4-12	98.0%	3 倍
97	N	Asn	2	R4-18	80.7%	4 倍
99	K	Lys	2	R4-7	116.6%	3 倍
100	T	Thr	2	R4-7	90.7%	8 倍
101	L	Leu	2	R4-6	91.0%	3 倍
102	R	Arg	2	R4-20	99.0%	3 倍
103	L	Leu	2	R4-6	89.4%	3 倍
104	R	Arg	2	R4-20	96.6%	6 倍
106	R	Arg	2	R4-7	99.6%	3 倍
107	R	Arg	2	R4-20	84.0%	5 倍

10

20

30

40

50

119	K	Lys	2	R4-7	105.9%	4倍
122	E	Glu	2	R4-12	99.8%	3倍
123	Q	Gln	2	R4-19	96.5%	3倍
126	N	Asn	2	R4-18	99.0%	3倍
130	K	Lys	2	R4-7	99.7%	3倍

10

## 【0409】

5. BALB/CマウスモデルにおいてIL10-K34C-S48が4T1腫瘍モデルに及ぼす有効性の試験

試験目的：4T1腫瘍モデルの治療のためのBALB/CマウスにおけるIL10-K34C-S48の抗腫瘍の有効性を検討する。試験薬剤：IL10-K34C-S48およびIL-10の注射剤であり、試験時にPBSによって対応の濃度に希釈。

20

## 【0410】

方法および結果：

1. 動物：5週齢のBALB/Cマウス、全て雌。

## 【0411】

2. 腫瘍モデルの作製

1) 4T1細胞をアメリカ培養細胞系統保存機関(ATCC)から購入し、ATCCにより提供された仕様書に従って識別した。細胞を、10%ウシ胎児血清を含有するRPMI1640培養溶液中、37℃、5%CO<sub>2</sub>で培養した。細胞を3日毎に継代し、13継代以内の細胞を使用した。

## 【0412】

2) 腫瘍モデルの作製。4T1細胞をBALB/Cマウスの背中に皮下注射した。腫瘍が約100mm<sup>3</sup>に成長した後、マウスを無作為に群分けし、薬剤治療を開始した。マウスを28日目で麻酔後に殺した。

30

## 【0413】

3) 治療過程。各群に6頭の動物を含む3つの群があった。含めたのは、毎日治療された対照群、ならびに2つの単剤群(1mg/kg IL-10で毎日治療、またはIL-10-K34C-S48で毎日(1mg/kg IL-10に等しい用量)であった。

## 【0414】

4) 群分けおよび試験結果を表74に示す。

## 【0415】

5) 結果および考察。表74に示されるように、IL-10に比べて、BALB/Cマウスの4T1腫瘍に及ぼされる完全な退縮が、IL10-K34C-S48の注射後に大きく向上し、このことは、IL10-K34C-S48が、優れた抗腫瘍有効性を4T1腫瘍モデルに呈することを示している。

40

## 【0416】

50

## 【表 7 4】

表 7 4 : BALB/C マウスモデルにおいて IL10-K34C-S48 が 4 T1 腫瘍モデルに及ぼす効果

群	動物の数	完全な退縮
対照群	6	0
IL10-K34C-S48	6	33.33%
IL-10	6	0

10

## 【0 4 1 7】

腫瘍体積を週に 2 ~ 3 回モニタリングしたので、図 4 6 に提示する。

## 【0 4 1 8】

実施例 3 1 : 異なる組織における標的化された活性化を行うための異なる各種 R 2 の活性化効率

R 1 を S 1 3、R 3 を R 3 - 5、R 4 を R 4 - 7、かつ R 2 を表 7 5 に示される群のそれぞれとしたコンジュゲートの切断効率を、異なる組織で評価した。コンジュゲートをそれぞれ溶解し、10 回希釈して濃度 0.1 mM/mL とした。37 で、コンジュゲートを 100 µg の各種酸性化ヒト腫瘍組織ホモジネート (pH 6.0) に濃度 0.2 mg/mL で添加した。腫瘍組織ホモジネート中の酵素は、R 1 を放出することができた。放出された R 1 を HPLC により検出し、それによって、リンカーの活性化効率を比較した。結果を表 7 5 に示した。

20

## 【0 4 1 9】

## 【表 7 5】

表 7 5 : 異なる腫瘍組織由来のホモジネート中での各種 R 2 ペプチドの活性化効率 (%)

ヒト組織	腫瘍を産生する細胞	R2=LTPRLGPAAN	R2=GPAAN	R2=LSGRSDN	R2=AAN
線維肉腫	HT-1080	66.4	47.8	19.8	45.9
乳がん	MDA-MB231	71.8	76.7	25.4	68.4
肝臓がん	Hepg2	68.9	58.4	21.8	55.7
心臓		1.6	1.1	4.3	0
肺		1.7	1.5	5.9	0

30

## 【0 4 2 0】

この結果によれば、複数の酵素によって活性化された、引き伸ばされた R 2 は、AAN よりも高い活性化を呈する。しかし、複数の酵素を用いた活性化は、心臓および肺の組織に示されたような安定性の問題を引き起こすことがある。

40

## 【0 4 2 1】

実施例 3 2 : 抗 VEGF TMEABody (ベバシズマブ) の生成および特性解析

ベバシズマブの重鎖配列および軽鎖配列を、Drug Bank (<https://www.drugbank.ca/drugs/DB00112>) からダウンロードし、部位スクリーニングを実施して、遮断効率の良い抗 VEGF TMEABody を特定した。抗 VEGF 抗体 (ベバシズマブ) の重鎖の変異位置は、Tyr 32、Asn 35、Tyr 54、Tyr 60、Lys 65、Arg 66、Tyr 102、Tyr 103、および T

50

y r 1 0 9 からなる群から選択され；軽鎖の変異位置は、S e r 2 4、S e r 2 6、A s p 2 8、T y r 3 2、T y r 4 9、T h r 5 1、T y r 9 1、S e r 9 2、およびT h r 9 3 からなる群から選択される。H i s タグ付V E G F タンパク質をE L I S A に使用した。遮断効率が良く回復が良い選択された部位を表 7 6 にまとめた。

【 0 4 2 2 】

【表 7 6 】

表 7 6：遮断および回復の効率に基づく選択された抗V E G F T M E A b o d y 候補

選択された変異の ID	重鎖または軽鎖	変異部位	R4	コンジュゲーション効率	S47 の遮断効率	R4 のコンジュゲーション後に復活した活性
Beva-se001	HC	Lys65	R4-7	95%	9 倍	復活
Beva-se002	LC	Ser26	R4-1	91%	16 倍	復活
Beva-se003	LC	Tyr49	R4-7	95%	26 倍	復活
Beva -se004	LC	Thr51	R4-1	87%	13 倍	復活

10

20

【 0 4 2 3 】

実施例 3 3：抗 C D 2 0 T M E A b o d y ( リツキシマブ ) の生成および特性解析

ベバシズマブの重鎖配列および軽鎖配列を、Drug Bank ( <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00073> ) からダウンロードし、部位スクリーニングを実施して、遮断効率の良い抗 C D 2 0 T M E A b o d y を特定した。抗 C D 2 0 抗体 ( リツキシマブ ) の重鎖の変異位置は、T y r 3 2、A s n 3 3、T y r 5 2、A s n 5 5、L y s 6 3、L y s 6 5、T y r 1 0 1、T y r 1 0 2、およびT y r 1 0 7 からなる群から選択され；軽鎖の変異位置は、S e r 2 6、S e r 2 8、T y r 3 1、T y r 4 8、T h r 5 0、A s n 5 2、T h r 9 1、およびT h r 9 6 からなる群から選択される。H i s タグ付C D 2 0 タンパク質をE L I S A に使用した。遮断効率が良く回復が良い選択された部位を表 7 7 にまとめた。

30

【 0 4 2 4 】

【表 7 7 】

表 7 7：遮断および回復の効率に基づく選択された抗V E G F T M E A b o d y 候補

選択された変異の ID	重鎖または軽鎖	変異部位	R4	コンジュゲーション効率	S47 の遮断効率	R4 のコンジュゲーション後に復活した活性
Ritu-se001	HC	Tyr32	R4-7	92%	16 倍	復活
Ritu-se002	HC	Lys63	R4-7	98%	8 倍	復活
Ritu-se003	LC	Tyr31	R4-7	91%	13 倍	復活
Ritu-se004	LC	Tyr48	R4-7	92%	15 倍	復活
Ritu-se005	LC	Thr50	R4-1	89%	21 倍	復活

40

50

## 【 0 4 2 5 】

実施例 3 4 : 薬剤候補についての各種 R 4 および R 5 の遮断および切断スクリーニング  
 標示されたコンジュゲーションにおけるコンジュゲートの遮断および切断効果を評価した。  
 コンジュゲートをそれぞれ溶解し、10回希釈して終濃度 0.1 mM / mL とした。  
 37 で、コンジュゲートを 100 μg の MDA - MB 231 ヒト腫瘍組織ホモジネート  
 (pH 7) に濃度 1 mg / mL で 8 時間添加した。コンジュゲートされ放出された生体分子を、  
 E L I S A により結合を検出し、それによってリンカーの活性化効率を比較した。  
 結果を表 7 8 に示した。

## 【 0 4 2 6 】

## 【表 7 8】

10

表 7 8 : 各種生体分子への S 4 8 の遮断および切断効果

R1-R2-R3-R4	R5	コンジュゲーション により減少した結合	活性化後の回復した結合 (%)
S48	配列番号 13	34 倍	96
S48	配列番号 14	25 倍	95
S48	配列番号 15	18 倍	105
S48	配列番号 16	42 倍	96
S48	配列番号 17	67 倍	95
S48	配列番号 18	32 倍	96
S48	配列番号 19	67 倍	85
S48	配列番号 26	24 倍	94
S48	配列番号 27	54 倍	94
S48	配列番号 28	14 倍	107
S48	配列番号 29	18 倍	106
S48	配列番号 30	9 倍	91
S48	配列番号 31	13 倍	89
S48	配列番号 32	14 倍	93
S48	配列番号 44	75 倍	99
S48	配列番号 54	24 倍	96
S48	配列番号 60	16 倍	96
S48	配列番号 61	19 倍	107
S48	配列番号 62	74 倍	96
S48	配列番号 63	34 倍	93

20

30

## 【 0 4 2 7 】

表 7 9 に標示されたコンジュゲーションにおけるコンジュゲートの遮断および切断効果  
 を評価した。コンジュゲートをそれぞれ溶解し、10回希釈して終濃度 0.1 mM / mL  
 とした。37 で、コンジュゲートを MMP 2 (pH 6) に濃度 1 mg / mL で 16 時間  
 添加した。コンジュゲートされ放出された生体分子を、E L I S A により結合を検出し、  
 それによってリンカーの活性化効率を比較した。結果を表 7 9 に示した。

## 【 0 4 2 8 】

40

50

## 【表 7 9】

表 7 9 : 各種生体分子への S 6 5 のコンジュゲーションの遮断および切断効果

R1-R2-R3-R4	R5	コンジュゲーションにより減少した結合	活性化後の回復した結合
S65	配列番号 13	19 倍	96
S65	配列番号 14	21 倍	99
S65	配列番号 15	58 倍	95
S65	配列番号 16	124 倍	97
S65	配列番号 17	164 倍	99
S65	配列番号 18	26 倍	95
S65	配列番号 19	35 倍	89
S65	配列番号 26	43 倍	94
S65	配列番号 27	17 倍	95
S65	配列番号 28	12 倍	99
S65	配列番号 29	25 倍	105
S65	配列番号 30	48 倍	101
S65	配列番号 31	75 倍	97
S65	配列番号 32	34 倍	93
S65	配列番号 44	19 倍	96
S65	配列番号 54	25 倍	94
S65	配列番号 60	75 倍	97
S65	配列番号 61	34 倍	93
S65	配列番号 62	19 倍	96
S65	配列番号 63	25 倍	94

## 【 0 4 2 9】

標示されたコンジュゲーションにおけるコンジュゲートの遮断および切断効果を評価した。コンジュゲートをそれぞれ溶解し、10回希釈して終濃度0.1mM/mLとした。37℃で、コンジュゲートを100μgのMDA-MB231酸性化ヒト腫瘍組織ホモジネート(pH6.5)に添加した。コンジュゲートされ放出された生体分子を、ELISAにより結合を検出し、それによってリンカーの活性化効率を比較した。結果を表80に示した。

## 【 0 4 3 0】

10

20

30

40

50

## 【表 8 0】

表 8 0 : 各種生体分子への S 2 7 のコンジュゲーションの遮断および切断効果

R1-R2-R3-R4	R5	コンジュゲーションにより減少した結合	活性化後の回復した結合
S27	配列番号 13	43 倍	91
S27	配列番号 14	11 倍	95
S27	配列番号 15	8 倍	98
S27	配列番号 16	14 倍	95
S27	配列番号 17	19 倍	98
S27	配列番号 18	33 倍	95
S27	配列番号 19	45 倍	96
S27	配列番号 26	28 倍	99
S27	配列番号 27	37 倍	95
S27	配列番号 28	36 倍	97
S27	配列番号 29	106 倍	106
S27	配列番号 30	135 倍	102
S27	配列番号 31	75 倍	107
S27	配列番号 32	58 倍	97
S27	配列番号 44	74 倍	99
S27	配列番号 54	35 倍	97

## 【 0 4 3 1】

この結果によれば、これらの薬剤候補は、標示された活性化条件で遮断効果および活性化効果を呈する。

## 【 0 4 3 2】

実施例 3 5 : C T 2 6 腫瘍免疫モデルにおける、マウス C T L A - 4 抗体とコンジュゲートされた標示の S 2 7、S 3 9、S 4 0、S 4 7、S 4 8、および S 6 5 の有効性に関する試験

試験目的：免疫治療のための、マウス C T L A - 4 抗体とコンジュゲートされた S 2 7、S 3 9、S 4 0、S 4 7、S 4 8、および S 6 5 の抗腫瘍の有効性を検討する。

## 【 0 4 3 3】

試験薬剤：マウス C T L A - 4 抗体 ( 9 D 9 ) にコンジュゲートされた S 2 7、S 3 9、S 4 0、S 4 7、S 4 8、および S 6 5 であり、全て 2 0 m g / k g ( C T L A - 4 抗体の等モル ) で使用。

## 【 0 4 3 4】

腫瘍モデルの作製：

1 ) C T 2 6 細胞を A T C C から購入した。細胞を、1 0 % ウシ胎児血清を含有する D M E M 培養溶液中、3 7 ° C、5 % C O 2 で培養した。細胞を 3 日毎に継代し、1 5 継代以内の細胞を使用した。

## 【 0 4 3 5】

2 ) 腫瘍免疫。放射線照射により死滅させた  $5 \times 10^5$  個の C T 2 6 がん細胞 ( A T C C から購入 ) を、マウスに腹腔内注射した。マウスを 2 週間毎に 1 回、3 回注射した。免疫後、マウスに腫瘍細胞を注射し、薬剤を 4 週間にわたって毎週投与した。

## 【 0 4 3 6】

3 ) 腫瘍の作製。3 2 日目に、 $10^6$  個の生きた肺腫瘍細胞を、主要により免疫された C 5 7 マウスの背中に皮下注射した。腫瘍が 0 . 3 ~ 0 . 4 c m に成長した際に治療を始

10

20

30

40

50

めた。

【 0 4 3 7 】

4) 腫瘍のCD8+T細胞の分析。腫瘍組織を均一化し、腫瘍中の個々の細胞を濾過し、分離し、緩衝液で2回洗浄し、次いで、白血球共通抗原であるCD45-PEおよびCD8-FITCで標識された抗体と共に、周囲温度で1時間培養した。細胞を、1%ウシ胎児血清を含有するリン酸緩衝液により2回洗浄し、次いで、白血球共通抗原(CD45)陽性細胞中のTリンパ球抗原(CD8)陽性細胞の比率について、フローサイトメトリーにより分析した。比率の増分はTリンパ球細胞の増加を標示するが、このことから、腫瘍に対する動物の免疫は向上していた。

【 0 4 3 8 】

5) 群分けおよび試験結果を表81に示す。

【 0 4 3 9 】

【表81】

表81：マウスCTLA-4抗体にコンジュゲートされたS27、S39、S40、S47、S48、およびS65ならびに対照により腫瘍の阻害および免疫活性化に及ぼされる効果

群	動物の数	腫瘍のサイズ (mm <sup>3</sup> )	マウスの治癒数	CD8:CD45 (%)
		28日目	28日目	
PBS	8	1887.56±323.4	0	5.2
マウスCTLA-4抗体 (WT)	8	74.46±467.34	2 (死亡2)	13.1
S27-マウスCTLA-4 抗体(9D9)	8	37.60±358.57	6	28.4
S39-マウスCTLA-4 抗体(9D9)	8	31.57±124.45	5	29.7
S40-マウスCTLA-4 抗体(9D9)	8	57.63±157.32	6	26.3
S47-マウスCTLA-4 抗体(9D9)	8	53±216.47	7	38.4
S48-マウスCTLA-4 抗体(9D9)	8	75.78±32.74	4	23.6
S65-マウスCTLA-4 抗体(9D9)	8	74.28±38.45	6	26.7

5

【 0 4 4 0 】

6) 結果および考察。マウスCTLA-4抗体にコンジュゲートされたS27、S39、S40、S47、S48、およびS65の治療効果は、対照群およびWTCTLA-4抗体治療群に比べて大きく向上した。WTCTLA-4抗体はWTCTLA-4抗体治療時に1頭の死亡を生じたが、それは高用量治療の毒性によって引き起こされた可能性がある。マウスCTLA-4抗体にコンジュゲートされたS27、S39、S40、S47、S48、およびS65の治療効果は、優れた効果を示し、腫瘍組織中のCD8/CD45T細胞の比率を高めた。

10

20

30

40

50

【0441】

実施例36：RAマウスモデルにおけるS27、S47、S48、またはS65にコンジュゲートされたアダリムマブ（配列番号29）の有効性に関する試験

ヒトTNF $\alpha$ -グロビン（TNFグロビン）組換え遺伝子構築物を用いて、TgTcマウスを生成した。上記構築物は、hTNF $\alpha$  遺伝子の全コード領域とプロモーターを含む2.8kbの断片を含有し、この断片は、hTNF $\alpha$  の3'非翻訳領域（UTR）およびポリアデニル化部位に換えて、ヒト $\alpha$ -グロビンのそれらを含む0.77kb断片に融合されている。上記断片を、次いで、FVB/J近交系統の受精卵の前核内にマイクロインジェクションした。最後に、注射された受精卵を、8週齢の雌の偽妊娠ICRマウスの卵管内に移植した。トランスジェニック創始個体をFVB/J近交系統と戻し交配することによって、トランスジェニック系統を確立した。ルーチンの尾部ジェノタイピングと同様に、ジェノタイピングをPCRにより実施して、トランスジェニック動物をスクリーニングした。導入遺伝子特異的PCRプライマーは、

5'-GAAC TCCCTCGATGTTAACCA-3'（フォワードプライマー、配列番号87）；および

5'-TTCAATCCCCAAATCCTAGCC-3'（リバースプライマー、配列番号88）とした。

【0442】

PCR反応を以下のように実施した：94℃を4分間；95℃を30秒間、57℃を40秒間、72℃を40秒間で35サイクル；72℃を10分間。

【0443】

生理食塩水に溶解された各種抗hTNF $\alpha$  抗体（アダリムマブ2mg/kg）およびコンジュゲート抗体（2mg/kgのアダリムマブの等モル）を、3週間から10週間にわたって毎週、TgTcマウスに腹腔内投与（2mg/kg）するとともに、生理食塩水で処置されたTgTcマウスを対照として供した。臨床評価 離乳後、毎週の体重および四肢全ての関節炎スコアを記録した。各脚（指、足根、および足首）についての関節炎の臨床的重症度を、0から3までに及びスコアを帰属させることによって定量し；1を僅かな赤みおよび/または腫脹；2を顕著な浮腫状の腫脹；3を関節の変形および強直とした。マウス当たりの関節炎スコアを四肢の平均とした。群分けおよび試験結果を表82に示す。

【0444】

【表82】

表82：アダリムマブ抗体にコンジュゲートされたS27、S47、S48、およびS65により関節炎の阻害に及ぼす効果

群	動物の数	関節炎スコア	
		5日目	10日目
PBS	4	3	3
アダリムマブ	4	3	2
S27-アダリムマブ	4	1	1
S47-アダリムマブ	4	2	1
S48-アダリムマブ	4	1	1
S65-アダリムマブ	4	1	1

10

20

30

40

50

【 0 4 4 5 】

結果は、S 2 7、S 4 7、S 4 8、およびS 6 5にコンジュゲートされたアダリムマブが、関節炎スコアを大きく低減したことを示した。

【 0 4 4 6 】

実施例 3 7：抗 Her 2 / 抗 CD 3 二重特異性 T M E A b o d y 生成および特性解析

トラスツズマブの重鎖配列および軽鎖配列を、Drug Bank ( https : / / www . drugbank . ca / drugs / DB00072 ) からダウンロードし、部位スクリーニングを実施して、遮断効率の良い抗 Her 2 の s c F v 体を特定した。軽鎖の変異位置は、Asp 1、Gln 3、Gln 2 7、Asp 2 8、Asn 3 0、Tyr 4 9、Tyr 5 5、Arg 6 6、Asp 7 0、および Tyr 9 2 からなる群から選択される。軽鎖の変異位置は、Arg 1 9、Lys 3 0、Asp 3 1、Tyr 3 3、Arg 5 0、Tyr 6 2、Asn 5 5、Tyr 5 7、Arg 5 9、Tyr 6 0、Asp 6 2、Lys 6 5、Asp 1 0 2、および Tyr 1 0 5 からなる群から選択される。上記の選択された変異体の s c F v 体を、C 末端の 6 H i s タグと共に HEK 2 9 3 で発現し、Ni - NTA カラムにより精製し、対応する化学リンカーにコンジュゲートした。結合 ELISA は、His タグ付ヒト Her 2 タンパク質を抗原として、抗ヒトカッパ鎖を二次抗体として用いて行った。遮断効率を表 8 4 にまとめた。

10

【 0 4 4 7 】

【表 8 3】

20

表 8 3：遮断および回復の効率に基づく選択された抗 Her 2 の s c F v 体の候補

scFv 体の選択された変異の ID	単鎖の重鎖/軽鎖	変異部位	R4	コンジュゲーション効率	S47 の遮断効率	R4 のコンジュゲーション後の活性
Trast-se001scFv	重鎖	Tyr33	R4-7	95%	15 倍	復活
Trast-se002scFv	重鎖	Lys65	R4-7	93%	6 倍	復活
Trast-se003scFv	重鎖	Tyr105	R4-7	92%	32 倍	復活
Trast -se004scFv	軽鎖	Gln30	R4-11	83%	15 倍	復活
Trast -se005scFv	軽鎖	Tyr49	R4-7	93%	43 倍	復活
Trast -se006scFv	軽鎖	Asp70	R4-11	91%	13 倍	復活

30

【 0 4 4 8 】

我々は、選択されたシステイン変異（軽鎖内の Tyr 4 9）を有する抗 Her 2 s c F v を、C 末端の 6 H i s タグを含有する抗ヒト CD 3 s c F v に融合して、腫瘍および T 細胞を標的とする二重特異性抗体を形成した。これらの Her 2 / CD 3 二重特異性個体を、HEK 2 9 3 細胞で生産し、Ni - NTA カラムにより精製した。変異体を有するこれらの Her 2 / CD 3 二重特異性抗体を、S 4 7 にさらにコンジュゲートして、ヒト Her 2 タンパク質に対する 3 8 倍に減少した結合活性を得た。レグマインによる消化後、両方の結合活性が復活した。

40

【 0 4 4 9 】

単鎖の Her 2 / CD 3 T M E A b o d y は、表 8 4 に示されるように、抗 Her 2 s c F V と抗 CD 3 またはその s c F v との融合タンパク質に S 2 7、S 4 7、または S 4 8 をコンジュゲートすることによって作製した。

【 0 4 5 0 】

50

## 【表 8 4】

表 8 4 : 遮断および回復の効率に基づく選択された抗 Her 2 の s c F v 体の候補

二重特異性 TMEAbody	抗 Her2	抗 CD3	配列情報	R1-R2-R3-R4
Her2/CD3 TMEAbody1	抗 Her2 scFv	抗 CD3 scFv	70	S27
Her2/CD3 TMEAbody2	抗 Her2 scFv	抗 CD3 scFv	70	S47
Her2/CD3 TMEAbody3	抗 Her2 scFv	抗 CD3 scFv	70	S48
Her2/CD3 TMEAbody4	抗 Her2 scFv	抗 CD3 scFv	82	S27
Her2/CD3 TMEAbody5	抗 Her2 scFv	抗 CD3 scFv	82	S47
Her2/CD3 TMEAbody6	抗 Her2 scFv	抗 CD3 scFv	82	S48
Her2/CD3 TMEAbody7	抗 Her2	抗 CD3	抗 Her2: 71 および 72 抗 CD3: 75	S27
Her2/CD3 TMEAbody8	抗 Her2	抗 CD3	抗 Her2: 71 および 72 抗 CD3: 75	S47
Her2/CD3 TMEAbody9	抗 Her2	抗 CD3	抗 Her2: 71 および 72 抗 CD3: 75	S48

10

20

## 【 0 4 5 1】

我々は、PD - 1 抗体または PD - L 1 抗体を変異体 IL - 2 ( IL 2 - S 8 7 C ) に融合して、標的腫瘍関連抗原の PD - L 1 / IL - 2 T M E A k i n e または PD - 1 / IL - 2 T M E A k i n e を形成した。

## 【 0 4 5 2】

これらの IL 2 - T 4 1 C 変異体を含む T M E A k i n e を、S 4 7 にさらにコンジュゲートした。ヒト IL - 2 R に対する > 1 3 5 倍に減少した結合活性を得た。レグマインによる消化後、IL - 2 R との両方の結合活性が復活した。変異体 IL - 2 ( IL - 2 R との結合の変異体 S 8 7 C ) に融合された PD - L 1 または PD - 1 抗体を、S 4 7 にさらにコンジュゲートして、表 8 5 に示されるようなレグマイン活性化型融合型 T M E A k i n e を得た。

## 【 0 4 5 3】

30

40

50

【表 8 5】

表 8 5 : 遮断および回復の効率に基づく融合タンパク質の候補

融合 TMEAkine	融合タンパク質配列	R1-R2-R3-R4
1	N 末端-IL2 (S87C) -GSGS-PD-1 (配列情報 15)	S47
2	N 末端-IL2 (S87C) -GSGS-PD-1 (配列情報 17)	S47
3	N 末端-IL2 (S87C) -GSGS-PD-L1 (配列情報 27)	S47
4	N 末端-PD-1 (配列情報 15) -GSGS-IL2 (S87C)	S47
5	N 末端-PD-1 (配列情報 17) -GSGS-IL2 (S87C)	S47
6	N 末端-PD-L1 (配列情報 27) -GSGS-IL2 (S87C)	S47
7	N 末端-EGFR (配列情報 78&79) -GSGS-IL2 (S87C)	S47
8	N 末端-VEGFR (配列情報 80&81) -GSGS-IL2 (S87C)	S47
9	N 末端-Her2 (配列情報 82&83) -GSGS-IL2 (S87C)	S47
10	PD-1/IL-2 融合タンパク質 (配列情報 73)	S47
11	PD-L1/IL-2 融合タンパク質 (配列情報 74)	S47

10

【0 4 5 4】

ヒト P B M C 移入マウスモデルにおける毒性の i n v i v o 特性解析

試験目的：静脈内注射を介した融合型 T M E A b o d y の急性毒性を検討すること。

【0 4 5 5】

動物：体重 1 9 ~ 2 1 g の第 1 クラスの S C I D マウスであり、全てのマウスは雌である。

【0 4 5 6】

方法および結果：S C I D マウスを体重に従って無作為に 2 1 群に分け、各群 1 0 頭のマウスとした。表 8 6 に示されるように、マウスに、D 1、D 7、および D 1 4 を 1 回のみ、3 0 m g / k g (抗体の等モル) の用量で静脈内注射した。対照試験は、3 0 m g / k g のヒト I g G を注射することによって実施した。連続した 2 1 日間にわたって毎日、下記の行動：立毛、毛の乱れおよびくすみ、倦怠、前屈、ならびに易怒反応の有無について、動物を観察し、表 8 6 に示されるように体重および死亡を記録した。

30

【0 4 5 7】

【表 8 6】

表 8 6 : 異なる融合型 T M E A b o d y の注射を受けた試験マウスの死亡率の比較

群	注射	動物の数	Number of 死亡 animal (21 日目)	Mortality rate (%)
1	ヒト IgG	10	0	0
2	Her2/CD3 scFv	10	4	40
3	Her2/CD3 抗体	10	3	30
4	Her2/CD3 TMEAbody1	10	0	0
5	Her2/CD3 TMEAbody2	10	0	0
6	Her2/CD3 TMEAbody3	10	0	0
7	Her2/CD3 TMEAbody4	10	0	0
8	Her2/CD3 TMEAbody5	10	0	0
9	Her2/CD3 TMEAbody6	10	0	0

40

50

【0458】

結果および考察：第2群、第3群、第10群、および第14群の30mg/kgを受けたマウスに、立毛、毛の乱れおよびくすみ、倦怠、前屈、易怒反応はなく、死亡が観察された。表86に示されるように、融合タンパク質のMTDは30mg/kg未満であり、この濃度では毒性または死亡が観察される可能性がある。

【0459】

ヒトPBMCM移入マウスモデルにおける毒性のin vivo特性解析

試験目的：静脈内注射を介した融合型TMEAbodyの急性毒性を検討すること。

【0460】

動物：体重19～21gの第1クラスのSCIDマウスであり、全てのマウスは雌である。

10

【0461】

方法および結果：SCIDマウスを体重に従って無作為に21群に分け、各群5頭のマウスとした。表88に示されるように、融合タンパク質ならびにD1、D7、およびD14でS47を含む融合タンパク質コンジュゲートを、マウスに、1回のみ、30mg/kg（抗体の等モル）の用量で静脈内注射した。対照試験は、30mg/kgの生理食塩水を注射することによって実施した。連続した21日間にわたって毎日、下記の行動：立毛、毛の乱れおよびくすみ、倦怠、前屈、ならびに易怒反応の有無について、動物を観察し、表87に示されるように体重および死亡を記録した。

【0462】

20

【表87】

表87：異なる融合型TMEAkineの注射を受けた試験マウスの死亡率の比較

融合タンパク質配列	死亡数	S47とコンジュゲートした後の死亡数
生理食塩水	0	0
N末端-IL2 (S87C) -GSGS-PD-1 (配列情報 15)	5	0
N末端-IL2 (S87C) -GSGS-PD-1 (配列情報 17)	3	0
N末端-IL2 (S87C) -GSGS-PD-L1 (配列情報 27)	5	0
N末端-PD-1 (配列情報 15) -GSGS-IL2 (S87C)	2	0
N末端-PD-1 (配列情報 17) -GSGS-IL2 (S87C)	1	0
N末端-PD-L1 (配列情報 27) -GSGS-IL2 (S87C)	4	0
N末端-EGFR (配列情報 77&79) -GSGS-IL2 (S87C)	3	0
N末端-VEGFR (配列情報 80&81) -GSGS-IL2 (S87C)	4	0
N末端-Her2 (配列情報 82&83) -GSGS-IL2 (S87C)	5	1
PD-1/IL-2 融合タンパク質 (配列情報 73)	4	0
PD-L1/IL-2 融合タンパク質 (配列情報 74)	5	1

30

【0463】

結果および考察：全ての群の融合型TMEAkineの30mg/kgを受けたマウスに、立毛、毛の乱れおよびくすみ、倦怠、前屈、易怒反応はなく、死亡が観察された。しかし、S47との融合後、毒性が低減した。

【0464】

マウス腫瘍モデルにおける単鎖のCD3-Her2 TMEAbodyのin vivo特性解析

動物モデルにおいて腫瘍を治療する際の単鎖のCD3-Her2 TMEAbodyのin vivo有効性の特徴をさらに明らかにするために、単鎖のCD3-Her2 TMEAbody、ならびに単鎖のCD3-Her2抗体を、腫瘍異種移植片内に投与した。

40

50

腫瘍異種移植片を発生させるために、 $3 \times 10^6$ 個のKPL-4細胞を、雌の重症複合免疫不全(SCID)ページマウスの右側の最後から2番目の鼠径部の乳房の脂肪体内に、同所移植した。移植後、治療の開始前に、腫瘍を成長させた(KPL4で20日間)。KPL-4腫瘍(100mm<sup>3</sup>)を有するマウスを、試験期間にわたって、標示された薬剤(5週間、毎日10mg/kg)により治療した。腫瘍体積および体重を週に2回測定した。腫瘍体積阻害率を表88にまとめた。結果は、単鎖のCD3-Her2 TMEAbodyが腫瘍の微小環境で活性化され、単鎖のCD3-Her2抗体の有効性を増強できることを意味していた。

【0465】

【表88】

10

表88：投与の20日後の腫瘍成長阻害率

群	用量	治癒率 (%)	死亡
ヒトIgG	10mg/kg	0	0
Her2/CD3 scFv	10mg/kg	16.7	0
Her2/CD3 抗体	10mg/kg	33.3	2
Her2/CD3 TMEAbody1	10 mg/kg	66.7%	0
Her2/CD3 TMEAbody2	10mg/kg	83.3%	0
Her2/CD3 TMEAbody3	10mg/kg	100%	0
Her2/CD3 TMEAbody4	10mg/kg	100%	0
Her2/CD3 TMEAbody5	10mg/kg	100%	0
CD3-Her2 TMEAbody6	10mg/kg	100%	0
PD-1/IL-2 融合	10mg/kg	100%	2
融合 TMEAkine1	10mg/kg	83.3%	0
融合 TMEAkine 2	10mg/kg	100%	0
TMEAkine4	10mg/kg	100%	0
融合 TMEAkine5	10mg/kg	100%	0
融合 TMEAkine10	10mg/kg	100%	0
PD-L1/IL-2 融合	10mg/kg	100%	2
融合 TMEAkine3	10mg/kg	83.3%	0
融合 TMEAkine6	10mg/kg	100%	0
融合 TMEAkine11	10mg/kg	83.3%	0

20

30

40

50



【 図 7 】



Fig. 7

【 図 8 】

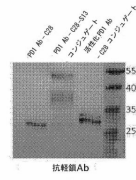


Fig. 8

【 図 9 】

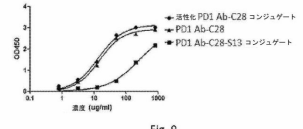


Fig. 9

【 図 10 】

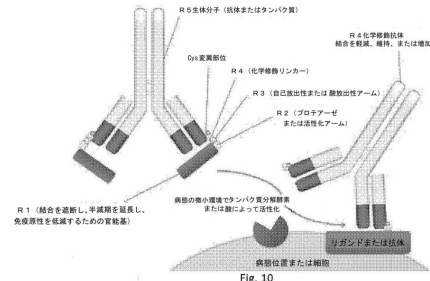


Fig. 10

【 図 11 】

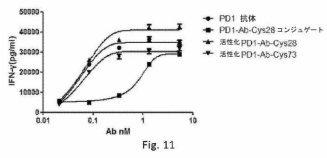


Fig. 11

【 図 12 】

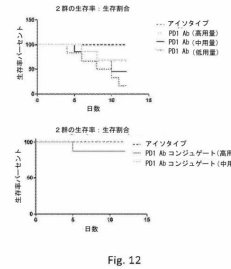


Fig. 12

10

20

30

40

50

【 図 1 3 】

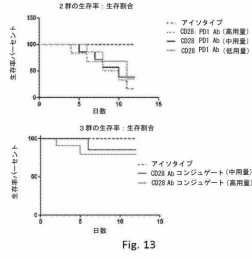


Fig. 13

【 図 1 4 】

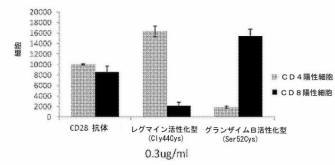


Fig. 14

10

【 図 1 5 】

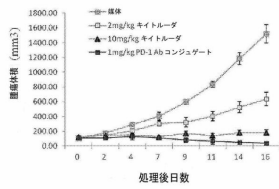


Fig. 15

【 図 1 6 】

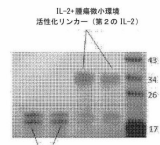


Fig. 16

20

【 図 1 7 】

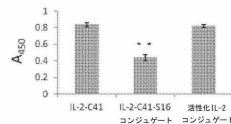


Fig. 17

【 図 1 8 】

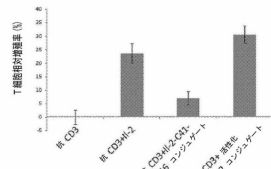


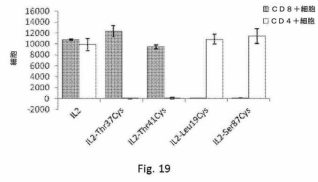
Fig. 18

30

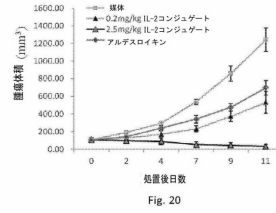
40

50

【 図 19 】

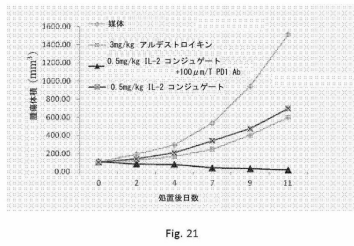


【 図 20 】

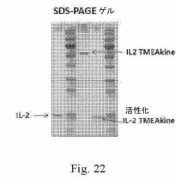


10

【 図 21 】

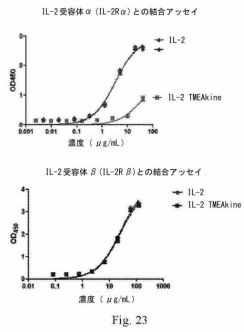


【 図 22 】

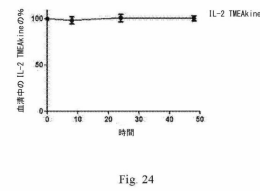


20

【 図 23 】



【 図 24 】



30

40

50

【図 25】

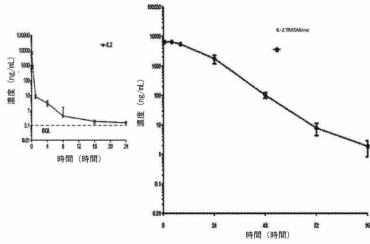


Fig. 25

【図 26】

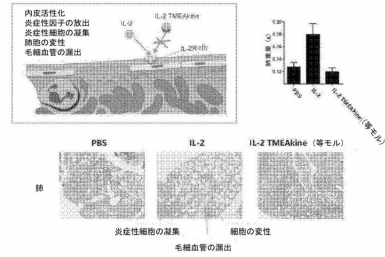


Fig. 26

10

【図 27】

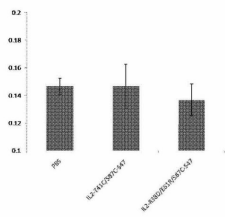


Fig. 27

【図 28】

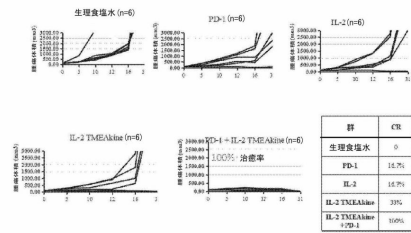


Fig. 28

20

【図 29】

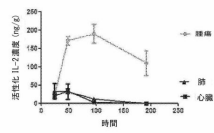


Fig. 29

【図 30】

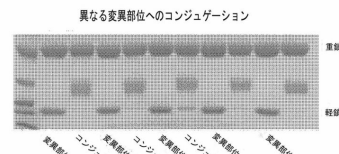


Fig. 30

30

40

50

【 図 3 1 】

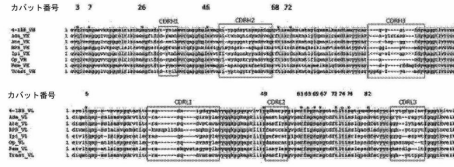


Fig. 31

【 図 3 2 】

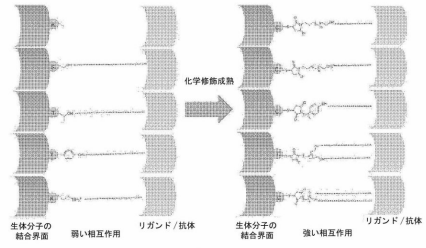


Fig. 32

10

【 図 3 3 】

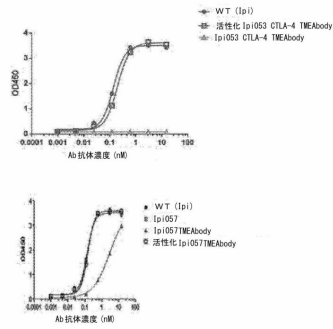


Fig. 33

【 図 3 4 】

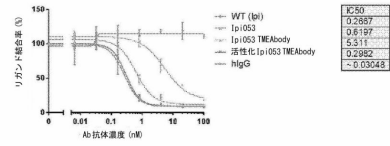


Fig. 34

20

【 図 3 5 】

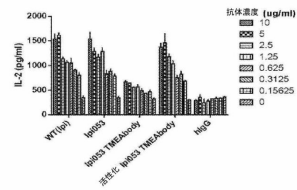


Fig. 35

【 図 3 6 】

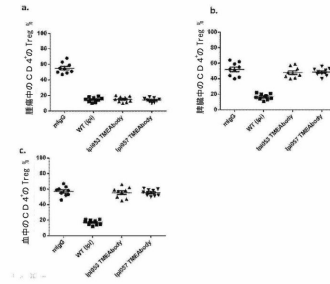


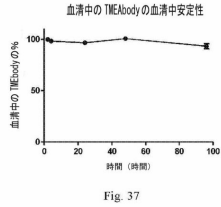
Fig. 36

30

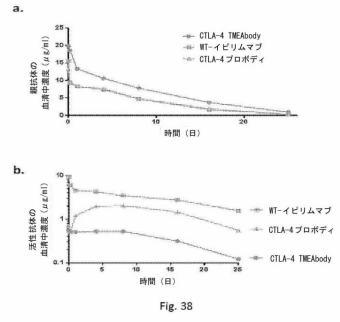
40

50

【 図 3 7 】

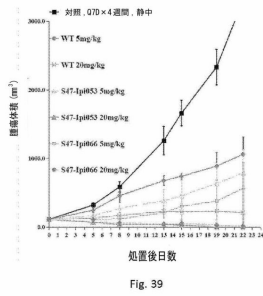


【 図 3 8 】

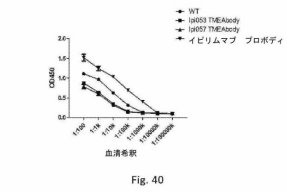


10

【 図 3 9 】

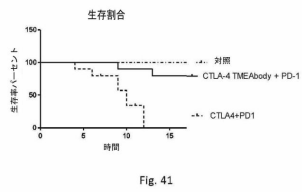


【 図 4 0 】

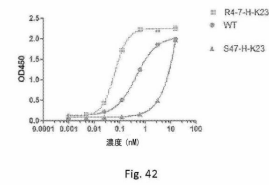


20

【 図 4 1 】



【 図 4 2 】



30

40

50

【 図 4 3 】

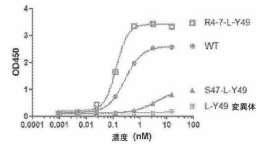


Fig. 43

【 図 4 4 】

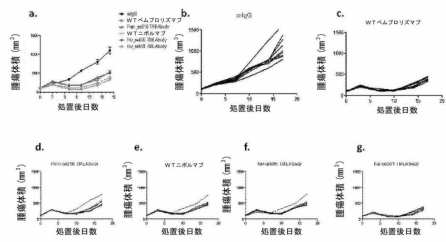


Fig. 44

10

【 図 4 5 】

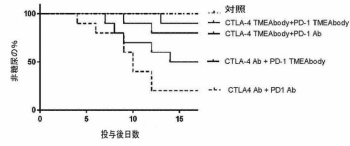


Fig. 45

【 図 4 6 】

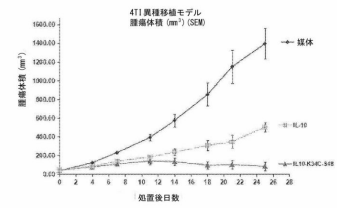


Fig. 46

20

【 配列表 】

0007404252000001.app

30

40

50

## フロントページの続き

## (51)国際特許分類

		F I		
A 6 1 K	38/19 (2006.01)	A 6 1 K	38/19	
C 0 7 K	16/18 (2006.01)	C 0 7 K	16/18	
C 0 7 K	14/52 (2006.01)	C 0 7 K	14/52	
C 0 7 K	14/54 (2006.01)	C 0 7 K	14/54	
C 0 7 K	14/555 (2006.01)	C 0 7 K	14/555	
C 0 7 K	14/53 (2006.01)	C 0 7 K	14/53	
C 0 7 K	14/525 (2006.01)	C 0 7 K	14/525	
C 0 7 K	14/47 (2006.01)	C 0 7 K	14/47	
C 0 7 K	19/00 (2006.01)	C 0 7 K	19/00	Z N A
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00	
A 6 1 P	29/00 (2006.01)	A 6 1 P	29/00	
A 6 1 K	47/64 (2017.01)	A 6 1 K	47/64	
C 1 2 N	15/13 (2006.01)	C 1 2 N	15/13	
C 1 2 P	21/08 (2006.01)	C 1 2 P	21/08	

テク パーク, カイ ルン ロード 7 8 1 番, 1 3 0 1 号室

## (72)発明者

ワン, ハイヤン

中華人民共和国 上海 2 0 1 2 0 3, プドン ディストリクト, ザンジャン ハイテク パーク, カイ ルン ロード 7 8 1 番, 1 3 0 1 号室

## (72)発明者

リー, レンク

中華人民共和国 上海 2 0 1 2 0 3, プドン ディストリクト, ザンジャン ハイテク パーク, カイ ルン ロード 7 8 1 番, 1 3 0 1 号室

## (72)発明者

ジャン, ルイ

中華人民共和国 上海 2 0 1 2 0 3, プドン ディストリクト, ザンジャン ハイテク パーク, カイ ルン ロード 7 8 1 番, 1 3 0 1 号室

## (72)発明者

リユー, チャン

中華人民共和国 上海 2 0 1 2 0 3, プドン ディストリクト, ザンジャン ハイテク パーク, カイ ルン ロード 7 8 1 番, 1 3 0 1 号室

## 審査官

渡邊 潤也

## (56)参考文献

国際公開第 2 0 1 1 / 1 1 8 7 3 9 ( W O , A 1 )

米国特許出願公開第 2 0 0 6 / 0 0 6 3 2 0 9 ( U S , A 1 )

特表 2 0 0 7 - 5 2 6 2 0 7 ( J P , A )

特表平 0 4 - 5 0 4 8 0 1 ( J P , A )

特表 2 0 1 7 - 5 3 1 0 2 9 ( J P , A )

特表 2 0 1 0 - 5 3 6 3 7 0 ( J P , A )

特表 2 0 0 3 - 5 3 4 3 8 7 ( J P , A )

Science, 1993年, 261, pp.212-215

抗体-抗がん剤複合体におけるリンカーテクノロジー, Drug Delivery System, 2013年, 28(5), pp.406-411

Conjugation site modulates the in vivo stability and therapeutic activity of antibody-drug conjugates, Nature Biotechnology, 2012年, 30(2), pp.184-189

Antibody-drug conjugates: design, formulation and physicochemical stability, Pharm Res., 2015年, 32, pp.3541-3571

## (58)調査した分野 (Int.Cl., D B 名)

A 6 1 K

C 0 7 K

C 0 7 D

C A p l u s / R E G I S T R Y / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S ( S T N )