

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6709844号
(P6709844)

(45) 発行日 令和2年6月17日(2020.6.17)

(24) 登録日 令和2年5月27日(2020.5.27)

(51) Int. Cl.		F I	
C07K	7/06	(2006.01)	C07K 7/06 ZNA
C07K	7/08	(2006.01)	C07K 7/08
C07K	14/00	(2006.01)	C07K 14/00
C07K	19/00	(2006.01)	C07K 19/00
A61P	37/06	(2006.01)	A61P 37/06

請求項の数 12 (全 74 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2018-511232 (P2018-511232)	(73) 特許権者	517405987 イミュンワーク インク. Immunwork Inc. タイワン、タイペイ シティ、ナンガン ディストリクト、パーク セントジェーム ズ、ナンバー 3、18エフ 18F., No. 3, Park St., Nangang Dist., Taipei City 115, Taiwan
(86) (22) 出願日	平成28年9月1日(2016.9.1)	(74) 代理人	110001139 SK特許業務法人
(65) 公表番号	特表2018-531904 (P2018-531904A)	(74) 代理人	100130328 弁理士 奥野 彰彦
(43) 公表日	平成30年11月1日(2018.11.1)	(74) 代理人	100130672 弁理士 伊藤 寛之
(86) 国際出願番号	PCT/CN2016/097783		
(87) 国際公開番号	W02017/036407		
(87) 国際公開日	平成29年3月9日(2017.3.9)		
審査請求日	平成30年5月1日(2018.5.1)		
(31) 優先権主張番号	62/213,012		
(32) 優先日	平成27年9月1日(2015.9.1)		
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	62/308,349		
(32) 優先日	平成28年3月15日(2016.3.15)		
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 移植拒絶反応を治療するための分子構築物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

中心コア、複数のリンクアーム、複数の第1成分、必要に応じてカップリングアーム、及び必要に応じて第2成分を含むリンカーユニットであって、

前記中心コアは、(1)第1ポリペプチド又は(2)第2ポリペプチドを含み、前記第1ポリペプチドが2~15個のK残基及び各K残基との次のK残基を区切る1以上の充填配列を含み、上記充填配列は、グリシン(G)及びセリン(S)残基を含み、前記第2ポリペプチドは、(X_a - K)₂₋₁₅配列を含み、前記X_aが2~12個のエチレングリコール(EG)の繰り返し単位を有するPEG化アミノ酸であり、

前記複数のリンクアームは、それぞれ前記中心コアのK残基に結合され、

前記中心コアのN末端又はC末端にあるアミノ酸残基は、アジド又はアルキン基を有し、或いは、前記中心コアのN末端又はC末端にあるアミノ酸残基は、システイン残基であり、システイン残基のチオール基がカップリングアームに結合され、

前記カップリングアームは、その遊離末端にアジド基、アルキン基、テトラジン基、シクロオクテン基、又はシクロオクチン基を有し、

前記複数の第1成分は、それぞれ前記複数のリンクアームに、それらの間にアミド結合を形成することにより結合され、又は、チオール-マレイミド反応、銅触媒型アジド-アルキン環化付加(CuAAC)反応、歪み促進型アジド-アルキクリックケミストリー(SPAAc)反応若しくは逆電子要請型ディールス-アルダー(iEDDA)反応により結合され、

10

20

前記第 2 成分が存在する場合に、前記第 2 成分は、C u A A C 反応、S P A A C 反応又は i E D D A 反応により前記中心コア又は前記カップリングアームに結合され、

各前記第 1 成分は標的化成分であり、前記第 2 成分はエフェクター成分であり、又はその逆もまた然りであり、前記標的化成分は、ドナー移植物の細胞のみに存在するヒト白血球抗原 (H L A) アロタイプに特異的な抗体断片であり、前記エフェクター成分は、免疫抑制剤、免疫チェックポイントタンパク質、又は C D 2 5 に特異的な抗体断片であり、前記複数の第 1 成分が C u A A C 又は S P A A C 反応によりそれぞれ前記複数のリンクアームに結合される場合に、前記中心コアの N 末端又は C 末端にあるアミノ酸残基は、システイン残基であり、前記カップリングアームの遊離末端は、テトラジン基又はシクロオクテン基であり、

10

前記複数の第 1 成分が i E D D A 反応によりそれぞれ複数のリンクアームに結合される場合に、前記中心コアの N 末端又は C 末端にあるアミノ酸残基は、アジド基又はアルキン基を有し、或いは、前記中心コアの N 末端又は C 末端にあるアミノ酸残基は、システイン残基であり、カップリングアームの遊離末端は、アジド基、アルキン基、又はシクロオクテン基であるリンカーユニット。

【請求項 2】

前記 H L A アロタイプは、H L A - A、H L A - B、又は H L A - C である請求項 1 に記載のリンカーユニット。

【請求項 3】

前記免疫抑制剤は、ラパマイシンの哺乳動物標的 (m T O R) の阻害剤、又はカルシニューリンの阻害剤である請求項 1 に記載のリンカーユニット。

20

【請求項 4】

前記 m T O R の阻害剤は、シロリムス又はエベロリムスであり、又は前記カルシニューリンの阻害剤は、タクロリムスである請求項 3 に記載のリンカーユニット。

【請求項 5】

前記免疫抑制剤は、フィンゴリモドである請求項 1 に記載のリンカーユニット。

【請求項 6】

前記免疫チェックポイントタンパク質は、細胞傷害性 T リンパ球関連タンパク質 4 (C T L A - 4) の細胞外ドメイン、又はプログラム細胞死リガンド 1 (P D - L 1) の細胞外ドメインである請求項 1 に記載のリンカーユニット。

30

【請求項 7】

前記充填配列は、G S、G G S、G S G、又は配列番号： 1 - 1 6 の配列を含む請求項 1 に記載のリンカーユニット。

【請求項 8】

各前記リンクアームは、2 - 2 0 個の E G の繰り返し単位を有する P E G 鎖であり、前記カップリングアームは、2 - 1 2 個の E G の繰り返し単位を有する P E G 鎖である請求項 1 に記載のリンカーユニット。

【請求項 9】

前記アジド基を有するアミノ酸残基は、L - アジドホモアラニン (A H A)、4 - アジド - L - フェニルアラニン、4 - アジド - D - フェニルアラニン、3 - アジド - L - アラニン、3 - アジド - D - アラニン、4 - アジド - L - ホモアラニン、4 - アジド - D - ホモアラニン、5 - アジド - L - オルニチン、5 - アジド - d - オルニチン、6 - アジド - L - リジン、又は 6 - アジド - D - リジンであり、

40

前記アルキン基を有するアミノ酸残基は、L - ホモプロパギルグリシン (L - H P G)、D - ホモプロパギルグリシン (D - H P G)、又は - ホモプロパギルグリシン (- H P G) であり、

前記シクロオクテン基は、トランス - シクロオクテン (T C O) であり、前記シクロオクテン基は、ジベンゾシクロオクチン (D B C O)、ジフルオロシクロオクチン (D I F O)、ピシクロノニン (B C N)、又はジベンゾシクロオクチン (D I C O) であり、

前記テトラジン基は、1, 2, 3, 4 - テトラジン、1, 2, 3, 5 - テトラジン若しく

50

は1, 2, 4, 5 - テトラジンである請求項1に記載のリンカーユニット。

【請求項10】

前記第2成分は、CuAAC反応又はSPAAC反応により前記中心コアのN末端又はC-末端アミノ酸残基のアジド基又はアルキン基に結合される請求項1に記載のリンカーユニット。

【請求項11】

iEDA反応により前記カップリングアームに結合される第3成分をさらに含む請求項10に記載のリンカーユニット。

【請求項12】

ドナー移植体を受けている被験体の移植拒絶を治療するための医薬組成物であって、請求項1に記載のリンカーユニットを含む医薬組成物。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本開示は、医薬品分野に関し、特に、エフェクター(例えば、治療薬)を標的部位に送達するための標的化成分及びエフェクター成分を有するような多機能分子構築物に関する。

【背景技術】

【0002】

標的化抗原に対するモノクローナル抗体(mAb)の広範な選別及び選択方法の継続的な発展は、数年前に治療できないと考えられた多くの疾患に対する多くの治療用抗体の開発に寄与してきた。治療用抗体のデータベースに基づいて、約2,800種類の抗体が研究されているか、又はヒト臨床試験のために計画されており、約80種類の抗体の臨床応用が政府の薬物規制当局により承認されている。抗体の治療効果に関する大量のデータは、抗体が治療薬として作用する薬理学的メカニズムに関する情報を提供している。

20

【0003】

抗体が治療薬として作用する1つの主要な薬理学的メカニズムは、抗体が、血液循環、間質腔、又はリンパ節に存在するサイトカイン又は免疫成分であり得る疾患を引き起こすメディエーターを中和又は捕捉できることである。中和活性は、疾患を引き起こすメディエーターとそれらの受容体との相互作用を阻害する。サイトカインの可溶性受容体又は受容体の細胞外部分及びIgGのFc部分からの融合タンパク質は、抗体による中和と同様に、サイトカイン又は免疫因子を中和することができるため、治療剤として開発されている。

30

【0004】

臨床応用が承認されているか、又は臨床開発に供されているいくつかの治療用抗体は、受容体との結合により薬理学的効果を発揮することで、受容体とそのリガンドとの相互作用を遮断する。これらの抗体薬物では、抗体依存性細胞毒性(ADCC)及び補体媒介性細胞溶解(CMC)等のFc媒介性メカニズムは、主要なメカニズムではない。

【0005】

いくつかの治療用抗体は、標的細胞上の特定の表面抗原に結合することにより、標的細胞でFc媒介性機能及び他のメカニズムを発揮する。最も重要なFc媒介性メカニズムは、抗体依存性細胞毒性(ADCC)、及び補体媒介性細胞溶解(CMC)であり、いずれも抗体結合標的細胞の溶解を引き起こす。特定の細胞表面抗原に結合するいくつかの抗体は、結合した標的細胞のアポトーシスを誘導することができる。

40

【0006】

二重特異性を有する抗体を調製する概念及び方法が生まれたのは、30年以上前のことである。近年、組換え抗体工学方法の発展、及び改良医薬品の開発の推進に伴い、種々の構造を有する二重特異性抗体が開発されてきた。

【0007】

例えば、二価又は多価抗体は、2つ以上の抗原結合部位を含み得る。接続構造を介して3つ又は4つのFab断片を共有結合することにより多価抗体を調製する方法は、多く報告されている。例えば、組換え工学により、タンデムの3つ又は4つのFab繰り返し単位を発現でき

50

る抗体が調製されている。

【0008】

合成架橋剤を用いて異なる抗体又は結合断片を化学的に結合することにより、多価抗体を調製するいくつかの方法は開示されている。上記方法の1つとして、異なるリンカーを用いて、3つ、4つ、又はそれ以上の別々のFab断片を化学的に架橋する方法がある。別の方法として、複数のFabを有する構築物を調製し、それを一次元DNA足場に組み立てる方法が提供されている。標的分子への結合のために設計されたそれらの種々の多価Ab構築物は、サイズ、半減期、構造の可撓性、及び免疫系を調節する能力において互いに異なる。以上のことから、一定数のエフェクター成分を有する分子構築物、又は2つ以上の異なる種類の機能成分(例えば、少なくとも1つの標的化成分及び少なくとも1つのエフェクター成分)を有する分子構築物の調製に関する報告が成されている。しかし、通常、化学合成又は組換え技術により、標的化成分とエフェクター成分との特定の組み合わせを有する分子構築物を構築することは、困難である。従って、従来技術において、幅広い疾患に適用されるより汎用性の高い分子を構築するための新たな分子プラットフォームを提供する必要がある。

10

【発明の概要】

【0009】

以下は、読者に基本的な理解を提供するために本開示の簡略化された概要を提示する。この概要は、開示の広範な概要ではなく、本開示の重要な/決定的な要素を特定するものでも、本開示の範囲を描写するものでもない。その唯一の目的は、後に提示されるより詳細な説明の前置きとして、本明細書に開示されるいくつかの概念を簡略化した形で提示することである。

20

【0010】

< I >移植拒絶反応を治療するためのペプチドコアに基づくマルチアームリンカー及びその応用

【0011】

第1の態様において、本開示は、被験体の移植拒絶を治療するためのリンカーユニットに関する。具体的には、該リンカーユニットは、それに結合される少なくとも2つの異なる機能成分を有する。例えば、該リンカーユニットには、2つの異なるエフェクター成分、1つの標的化成分及び1つのエフェクター成分、又は1つのエフェクター成分及びリンカーユニットの循環時間を延長可能なポリエチレングリコール(PEG)鎖が結合され得る。本発明のリンカーユニットは、少なくとも2つの異なる官能基を有するように設計されることにより、機能成分が各官能基と反応することでリンカーユニットに結合されることができる。従って、本発明のリンカーユニットは、2つ以上の機能成分を有する分子構築物を調製するためのプラットフォームとして機能することができる。理解され得るように、このリンカーユニットを使用する移植患者の治療方法も本開示の態様に含まれる。

30

【0012】

本開示の様々な実施形態によれば、上記リンカーユニットは、中心コア、複数のリンクアーム、複数の第1成分、必要に応じてカップリングアーム、及び第2成分を含む。

【0013】

本開示の様々な実施形態によれば、上記中心コアは、リンクアームに結合される前に所定の数のアミン(-NH₂)基を有するペプチドコアである。例えば、上記ペプチドコアは、側鎖にアミン(-NH₂)基を有する2以上のリジン(K)残基を含み得る。

40

【0014】

特定の実施形態において、上記ペプチドコアは、2~15個のK残基及び1以上の充填配列を含む。各K残基とその次のK残基は、1つの充填配列によって分離される。各充填配列は、グリシン(G)及びセリン(S)残基を含む。必要に応じて、充填配列は、2~20個のアミノ酸残基から構成される。様々な実施形態において、充填配列は、GS, GGS, GSG又は配列番号: 1-16の配列を含み得る。本開示の特定の実施形態において、1つのペプチドコアにおける少なくとも1つの充填配列は、同ペプチドコアにおける他の充填配列と異なる。本開示

50

のいくつかの実施形態によれば、ペプチドコアは、2~15単位のG₁₋₅SK配列を含み、好ましくは、ペプチドコアは、(GSK)₂₋₁₅配列を含む。

【0015】

いくつかの他の実施形態によれば、上記ペプチドコアは、(X_{aa}-K)₂₋₁₅配列を含み、X_{aa}は2~12個のエチレングリコール(EG)の繰り返し単位を有するPEG化アミノ酸である。

【0016】

各リンクアームは、アミノ基とリンクアームとの間にアミド結合を形成することにより中心コアのアミノ基に結合される。理解され得るように、ペプチドコアの場合に、リンクアームは、K残基の側鎖のアミノ基との反応により中心コアに結合される。さらに、中心コアに結合されるリンクアームは、その遊離末端にマレイミド基、N-ヒドロキシスクシンイミジル(NHS)基、アジド基、アルキン基、テトラジン基、シクロオクテン基、又はシクロオクチン基を有する。

【0017】

一方、上記ペプチドコアでは、中心コアのN末端又はC末端にあるアミノ酸残基は、アジド基又はアルキン基を有する。或いは/さらに、中心コアのN末端又はC末端にあるアミノ酸残基は、システイン(C)残基である。

【0018】

本開示の特定の実施形態によれば、中心コアがペプチドコアである場合に、システインの末端アミノ酸残基を有する場合に、本発明のリンカーユニットは、上記カップリングアームを含む。末端を有するペプチドコアでは、システインの末端アミノ酸残基、即ち、カップリングアームの一端はシステイン残基にそのチオール基との反応により結合される。

【0019】

アジド基を有するアミノ酸残基として、L-アジドホモアラニン(AHA)、4-アジド-L-フェニルアラニン、4-アジド-D-フェニルアラニン、3-アジド-L-アラニン、3-アジド-D-アラニン、4-アジド-L-ホモアラニン、4-アジド-D-ホモアラニン、5-アジド-L-オルニチン、5-アジド-d-オルニチン、6-アジド-L-リジン、及び6-アジド-D-リジン等が挙げられる。アルキン基を有するアミノ酸残基として、例えば、L-ホモプロパギルグリシン(L-HPG)、D-ホモプロパギルグリシン(D-HPG)、及び -ホモプロパギルグリシン(-HPG)が挙げられる。

【0020】

中心コアのN末端又はC末端にあるアミノ酸残基がシステイン残基である場合に、カップリングアームの遊離末端にあるシクロオクテン基は、トランス-シクロオクテン(TCO)基であり、カップリングアームの遊離末端にあるシクロオクチン基は、ジベンゾシクロオクチン(DBCO)基、ジフルオロシクロオクチン(DIFO)基、ビスクロノニン(BCN)基、又はジベンゾシクロオクチン(DICO)基であり得る。或いは、カップリングアームの遊離末端にあるテトラジン基は、1, 2, 3, 4-テトラジン、1, 2, 3, 5-テトラジン、1, 2, 4, 5-テトラジン、及びそれらの誘導体、例えば、6-メチルテトラジンを含むが、これらに制限されない。

【0021】

いくつかの実施形態において、リンクアームは、PEG鎖であり、好ましくは、2~20個のEGの繰り返し単位を有するPEG鎖である。他の実施形態において、カップリングアームは、PEG鎖であり、好ましくは、2~12個のEGの繰り返し単位を有するPEG鎖である。

【0022】

本開示の様々な任意の実施形態によれば、上記第1成分は、被験体において所望の効果(例えば、治療効果)を発揮するのに適したエフェクター成分である。或いは、上記第1成分は、リンカーユニットを目的部位に案内する標的化成分であり得る。好ましい実施形態において、第1成分がエフェクター成分である場合に、第2成分は、標的化成分であり、その逆もまた然りである。

【0023】

具体的には、本開示の様々な実施形態に係る標的化成分は、レシピエントの細胞ではなく、ドナー移植物の細胞のみに存在するヒト白血球抗原(HLA)アロタイプ(例えば、HLA-A、

10

20

30

40

50

HLA-B及びHLA-Cアロタイプ)に特異的な抗体断片である。また、エフェクター成分は、免疫抑制剤、免疫チェックポイントタンパク質、又はCD25に特異的な抗体断片である。免疫抑制剤の例示的な例は、ラパマイシンの哺乳動物標的(mTOR)の阻害剤、例えば、シロリムス及びエベロリムスである。他のセットの免疫抑制剤は、カルシニューリンの阻害剤、例えば、タクロリムスである。フィンゴリモド及びその誘導体(例えば、フィンゴリモドリオン酸塩)も適切な免疫抑制剤の例である。免疫チェックポイントタンパク質は、免疫チェックポイントに関与するものであり、例えば、細胞傷害性Tリンパ球関連タンパク質4(CTLA-4;CD151としても知られているもの)の細胞外ドメイン及びプログラム細胞死リガンド1(PD-L1;CD274としても知られているもの)の細胞外ドメインである。

【0024】

いくつかの実施形態において、各第1成分は、リンクアームと第1成分との間にアミド結合を形成することにより、1つのリンクアームに結合される。他の実施形態において、各第1成分は、リンクアームと第1成分の間で起きるチオール-マレイミド反応、銅触媒型アジド-アルキン環化付加(CuAAC)反応、歪み促進型アジド-アルキンクリックケミストリー(SPAAC)反応、又は逆電子要請型ディールス・アルダー(iEDDA)反応により、1つのリンクアームに結合される。

【0025】

本開示のいくつかの実施形態によれば、複数の第1成分がそれぞれCuAAC又はSPAAC反応により複数のリンクアームに結合される場合に、中心コアのN末端又はC末端にあるアミノ酸残基は、システイン残基であり、カップリングアームの遊離末端は、テトラジン基又はシクロオクテン基である。本開示の他の実施形態によれば、複数の第1成分がそれぞれiEDDA反応により複数のリンクアームに結合される場合に、中心コアのN末端又はC末端にあるアミノ酸残基は、アジド基又はアルキン基を有し、或いは、中心コアのN末端又はC末端にあるアミノ酸残基は、システイン残基であり、カップリングアームの遊離末端は、アジド基、アルキン基、又はシクロオクテン基である。

【0026】

いくつかの実施形態において、上記第2成分は、アジド基又はアルキン基を有することにより、CuAAC反応で、中心コア又はカップリングアームの対応するアルキン基若しくはアジド基に結合されることで中心コア又はカップリングアームに結合される。或いは、いくつかの実施形態において、アジド基又はシクロオクテン基を有する第2成分は、SPAAC反応により、中心コア又はカップリングアームの対応するシクロオクテン基若しくはアジド基に結合されることで、中心コア又はカップリングアームに結合される。或いは、特定の実施形態において、テトラジン基若しくはシクロオクテン基を有する第2成分は、iEDDA反応により、中心コア又はカップリングアームの対応するシクロオクテン基若しくはテトラジン基に結合されることで、中心コア又はカップリングアームに結合される。

【0027】

特定の実施形態において、リンカーユニットは、必要に応じて第1成分及び第2成分と異なる第3成分をさらに含む。第2成分が中心コアに直接結合される場合に、中心コアのもう一方の末端(即ち、第2成分に結合されていない遊離末端)は、必要に応じて、第3成分の導入に用いられることができるシステイン残基であってもよい。具体的には、システイン残基のチオール基をPEG鎖のマレイミド基と反応させ、このように結合されたPEG鎖は、カップリングアームと呼ばれ、その遊離末端にテトラジン基又はシクロオクテン基を有する。従って、第3成分は、iEDDA反応によりカップリングアームに結合される。好ましくは、第3成分は、リンカーユニットの薬物動態学的特性を改善させるための成分である。薬物動態学的特性を改善させる成分の一例として、分子量約20,000~50,000ダルトンの長いPEG鎖である。

【0028】

本開示のこの態様に係るリンカーユニットは、臨床医学において、移植拒絶の治療に適用される。そのため、本開示は、ドナー移植体(例えば、器官、組織又は細胞)を受けている被験体の移植拒絶を抑制又は阻害するための方法、或いは、これらの用途のための医薬の

10

20

30

40

50

製造における使用に関する。本開示の様々な実施形態によれば、特定の被験体の移植拒絶を治療するための方法は、治療を必要とする被験体に治療有効量の本開示の上記態様及び実施形態に係るリンカーユニットを投与するステップを含む。理解され得るように、上記リンカーユニットは、医薬製剤として投与され得る。該医薬製剤には、本発明のリンカーユニットに加えて、所望の投与経路に適した薬学的に許容される賦形剤を含む。

【0029】

< 11 >移植における拒絶反応を治療するためのFcに基づく分子構築物及びその使用

【0030】

この態様において、本開示は、免疫グロブリンのCH2-CH3ドメインに直接的又は間接的に結合される少なくとも1つの標的化成分及び少なくとも1つのエフェクター成分を有する結晶化可能断片(Fc)に基づく分子構築物に関する。本発明のFcに基づく分子構築物の標的化成分及びエフェクター成分は、器官、組織又は細胞移植を受けている被験体(又はレシピエント)の移植拒絶の抑制又は阻害、或いは、このような用途のための医薬の製造に適されるように特異的に選択される。理解され得るように、このFcに基づく分子構築物を用いて移植拒絶を治療する方法も本開示の態様に含まれる。

10

【0031】

本開示の特定の実施形態によれば、Fcに基づく分子構築物は、IgG.Fcの1対のCH2-CH3セグメント、1対のエフェクター成分、及び1対の標的化成分を含む。

【0032】

本開示の様々な実施形態によれば、1対の標的化成分は、レシピエントの細胞ではなく、ドナー移植物の細胞のみに存在するヒト白血球抗原(HLA)アロタイプに特異的な抗体断片、例えば、ドナー移植物の細胞のみに存在するHLA-A、HLA-B、及びHLA-Cアロタイプである。また、1対の成分は、免疫チェックポイントタンパク質、CD25に特異的な抗体断片、又は免疫抑制剤を含む薬物バンドルである。免疫チェックポイントタンパク質は、免疫チェックポイントに関与するものであり、例えば、細胞傷害性Tリンパ球関連タンパク質4(CTLA-4; CD151としても知られているもの)の細胞外ドメイン、及びプログラム細胞死リガンド1(PD-L1; CD274としても知られているもの)の細胞外ドメインである。免疫抑制剤の例示的な例は、ラパマイシンの哺乳動物標的(mTOR)の阻害剤、例えば、シロリムス及びエベロリムスである。他のセットの免疫抑制剤は、カルシニューリンの阻害剤、例えば、タクロリムスである。フィンゴリモド及びその誘導体(例えば、フィンゴリモドリン酸塩)も適切な免疫抑制剤の例である。

20

30

【0033】

エフェクター成分が免疫チェックポイントタンパク質である場合に、1対のエフェクター成分は、1対のCH2-CH3セグメントのN末端に結合され、1対の標的化成分は、1対のCH2-CH3セグメントのC末端に結合され、その逆もまた然りである。或いは、エフェクター成分が薬物バンドルである場合に、1対のエフェクター成分は、1対のCH2-CH3セグメントのC末端に結合され、1対の標的化成分は、1対のCH2-CH3セグメントのN末端に結合される。さらに、或いは、エフェクター成分が抗体断片である場合に、エフェクター成分は、それぞれ1対のCH2-CH3セグメントのN末端に結合され、標的化成分は、それぞれ1対のCH2-CH3セグメントのC末端に結合され、その逆もまた然りである。

40

【0034】

特定の実施形態によれば、1対のエフェクター成分及び1対の標的化成分が共に一本鎖可変領域断片(scFv)の形態である場合に、1対の標的化成分は、タンデム又はダイアボディ構造で、1対のエフェクター成分のN末端に結合されることにより、1対のCH2-CH3セグメントのN末端に結合される1対の二重特異性を形成する。

【0035】

いくつかの例において、1対の標的化成分はFab構造(即ち、 V_H -CH1ドメイン及び V_L -Cドメインからなる)をとる。このFab断片は、第1重鎖及び第2重鎖のN末端に結合されることにより、Fcに基づく分子構築物は、IgG構造を採用する。この場合に、1対のエフェクター成分は、1対のCH2-CH3セグメントのC末端に結合される。

50

【0036】

本開示のいくつかの他の実施形態によれば、1対のエフェクター成分が抗原結合断片(Fab)の形態であり、1対の標的化成分がscFvの形態である場合に、及びその逆の場合に、Fab及びscFvは、それぞれCH2-CH3セグメントのN末端及びC末端に結合されることにより、分子構築物は、延伸IgG構造を採用する。

【0037】

特定の実施形態において、1対のCH2-CH3セグメントは、ヒトIgG重鎖4又はヒトIgG重鎖1に由来する。

【0038】

いくつかの任意の実施形態によれば、エフェクター成分は、リンカーユニットに基づく薬物バンドルである。このような薬物バンドルは、少なくとも抗体分子に結合される前に別々に製造され得るという点で有利であり、それにより、抗体分子との直接結合の過酷な化学条件下で薬物分子を施すことを回避できる。本開示の様々な実施形態によれば、上記薬物バンドルは、複数の免疫抑制剤分子を含む。非制限的な例として、これらのFcに基づく分子構築物は、移植拒絶の治療に有用である。

10

【0039】

特定の実施形態によれば、本発明のFcに基づく分子構築物は、延長ペプチド及びカップリングアームをさらに含む。具体的には、延長ペプチドは、 $(G_{2-4}S)_{2-8}C$ の配列を含み、1対のCH2-CH3セグメントの1つのC末端に結合される。この場合に、カップリングアームは、延長ペプチドのC末端にそれらの間で起きるチオール-マレイミド反応により結合される。また、薬物バンドルに結合される前に、カップリングアームの遊離末端(即ち、システイン残基に結合されていない末端)が、アルキル基、アジド基、歪んだアルキル基、又はテトラジン基で修飾されることにより、薬物バンドルが該遊離末端に、それらの間で起きる、逆電子要請型ディールス-アルダー(iEDDA)反応、歪み促進型アジド-アルキンクリックケミストリー(SPAAC)反応、又は銅(I)触媒型アルキン-アジド環化付加(CuAAC)反応により結合される。

20

【0040】

いくつかの任意の実施形態によれば、上記薬物バンドルは、本開示の第1の態様及び実施形態に係るリンカーユニットに基づく分子構築物である。

【0041】

簡単に言えば、中心コアは、本開示の様々な実施形態によれば、複数のリジン(K)残基を含むポリペプチドであり得る。各リンクアームは、ポリペプチドコアのK残基の側鎖にあるアミノ基との反応により中心コアに結合される1つの末端を有する。リンクアームは、その遊離末端にマレイミド基も有し、各分子(例えば、免疫抑制剤分子)は、リンクアームを介してマレイミド基との反応により中心コアに結合される。

30

【0042】

中心コアがポリペプチドコアである場合に、中心コアN末端又はC末端にあるアミノ酸残基は、システイン残基であり、又はアジド基若しくはアルキル基を有する。

【0043】

アジド基又はアルキル基を有する末端アミノ酸残基を含むポリペプチドコアの場合、薬物バンドルは、末端残基と延長ペプチドのC末端との間で起きるCuAAC反応により延長ペプチドに結合される。

40

【0044】

被験体の移植拒絶の抑制又は阻害方法は、被験体に有効量のこの態様の分子構築物を投与するステップを含む。

【図面の簡単な説明】

【0045】

本説明は、以下に簡単に説明する添付図面に照らして読むことで以下の詳細な説明からよりよく理解されるであろう。

【0046】

50

【図1A-1K】図1A-1Kは、本開示の特定の実施形態に係るリンカーユニットを示す模式図である。

【0047】

【図2A-2C】図2A-2Cは、本開示の様々な実施形態に係るFcに基づく分子構築物を示す模式図である。

【0048】

【図3】図3は、本開示のいくつかの実施形態に係るFcに基づく分子構築物を示す模式図である。

【0049】

【図4A-4C】図4A-4Cは、本開示の様々な実施形態に係るFcに基づく分子構築物を示す模式図である。

10

【0050】

【図5A-5B】図5A-5Bは、本開示の様々な実施形態に係るFcに基づく分子構築物を示す模式図である。

【0051】

【図6A-6B】図6A-6Bは、それぞれ本開示の実施例に係るシロリムス-Gly及びシロリムス-diGlyの質量分析を示す。

【0052】

【図7A-7B】図A-Bは、それぞれ本開示の実施例に係るアジド-PEG3-S-S結合シロリムス-Gly及びシロリムス-diGlyのMALDI-TOF分析を示す。

20

【0053】

【図8】図8は、NHS-PEG5結合フィンゴリモドのMALDI-TOF分析を示す。

【0054】

【図9】図9は、本開示の一実施例に係るアジド-PEG3-S-S結合フィンゴリモドの質量分析を示す。

【0055】

【図10A-10B】図10A-図10Bは、それぞれ本開示の一実施例に係るNHS-PEG4-PEG3-S-S結合シロリムス-Gly及びシロリムス-diGlyの質量分析を示す。

【0056】

【図11】図11は、本開示の一実施例に係るNHS-PEG4-PEG3-S-S結合フィンゴリモドの質量分析を示す。

30

【0057】

【図12A-12D】図12A-12Dは、それぞれ本開示の一実施例に係る、遊離TCO官能基及び1つのセットの5つのシロリムス-Glyを有するリンカーユニット、5つのフィンゴリモド、10個のフィンゴリモド、及び5つのフィンゴリモドリン酸塩分子を含む薬物バンドルのMALDI-TOF分析を示す。

【0058】

【図13A-13C】図13A-13Cは、それぞれ本開示の一実施例に係る、精製したヒトHLA-A1-IgG1.Fc、HLA-A2-IgG1.Fc、及びPD-1-IgG1.Fc融合タンパク質のSDS-PAGE分析を示す。

40

【0059】

【図14A-14B】図14A-14Bは、それぞれ本開示の一実施例に係る精製したヒトCTLA-4及びPD-L1タンパク質のSDS-PAGEを示す。図14Cは、本開示の一実施例に係る精製したヒトCTLA-4のウエスタンブロット分析を示す。図14Dは、本開示の一実施例に係る精製したヒトPD-L1タンパク質のELISA分析を示す。

【0060】

【図15A-15C】図15A-15Cは、それぞれ本開示の一実施例に係る精製したヒトHLA-A1に特異的なmAbのscFvのSDS-PAGE、質量分析及びELISA分析を示す。

【0061】

【図16A-16B】図16A-16Bは、それぞれ本開示の一実施例に係る、ヒトHLA-A2に特

50

異的なscFvを有するファージの力価、ヒトHLA-A2に特異的なファージディスプレイscFvのシングルコロニーELISA分析を示す。

【0062】

【図17A - 17B】図17A-17Bは、それぞれ本開示の一実施例に係る、テトラジン結合ヒトHLA-A1に特異的なscFvの質量分析及びELISA分析を示す。

【0063】

【図18】図18は、本開示の一実施例に係る、遊離TCO官能基及び1つのセットの3つのPDL-1分子（エフェクター成分として）を有するリンカーユニットで構成されるエフェクターリンカーユニットの10% SDS-PAGE分析を示す。

【0064】

【図19】図19は、本開示の一実施例に係る、標的化成分としてHLA-A1に特異的な1つのscFv及びエフェクター成分として3つのPD-L1分子を有する単一のリンカーユニット分子構築物の10% SDS-PAGE分析を示す。

【0065】

【図20A - 20B】図20A-20Bは、それぞれ本開示の一実施例に係る、シロリムス及びシロリムス誘導体化合物のmTOR阻害及びT細胞増殖分析を示す。

【0066】

【図21A - 21B】図21Aは、S1P1受容体発現ヒトB細胞の染色分析を示す。図21Bは、本開示の一実施例に係る、リンクアームを介してペプチドコアに結合された後のフィンゴリモドのトランスウェル遊走分析を示す。

【0067】

【図22A - 22C】図22Aは、本開示の一実施例に係る精製した組換え二本鎖(CTLA-4)-IgG1.Fc-(scFv HLA-A1)融合タンパク質のSDS-PAGE分析を示す。図22B及び図22Cは、それぞれ本開示の一実施例に係る、CTLA-4に特異的なscFv及びヒトHLA-A1を有する精製した組換え二本鎖(CTLA-4)-IgG1.Fc-(scFv HLA-A1)融合タンパク質のELISA分析を示す。

【0068】

【図23A - 23D】図23Aは、本開示の一実施例に係る、精製した組換え二本鎖(PD-L1)-IgG4.Fc-(scFv HLA-A1)融合タンパク質のSDS-PAGE分析を示す。図23B~23Dは、それぞれ本開示の一実施例に係る、PD-L1、ヒトPD-1、及びヒトHLA-A1に特異的なmAbを有する精製した組換え二本鎖(PD-L1)-IgG4.Fc-(scFv HLA-A1)融合タンパク質のELISA分析を示す。

【0069】

一般的な実施に従って、説明された種々の特徴/要素は、縮尺通りに描かれておらず、代わりに、本発明に関連する特定の特征/要素を最もよく例示するために描かれている。また、種々の図面における同様の参照番号及び名称は、可能な場合には、同様の要素/部品を示すために使用される。

【発明を実施するための形態】

【0070】

添付の図面に関連して以下に提供される詳細な説明は、本実施例の説明として意図されており、本実施例が構築又は利用され得る唯一の形態を表すものではない。この説明は、この実施例の機能と、この実施例を構成し動作させるための一連のステップを示す。しかし、同じ又は同等の機能及び順序は、異なる実施例によって達成されてもよい。

【0071】

便宜上、本明細書、実施例及び添付の特許請求の範囲で使用される特定の用語をここに集める。本明細書中で他に定義されない限り、本開示において使用される科学技術用語は、当業者によって一般に理解され使用される意味を有するものとする。

【0072】

文脈によって他に必要とされない限り、単数形の用語は複数の形を含むものとし、複数形の用語は単数形を含むものとする。具体的には、本明細書及び特許請求の範囲で使用されるように、文脈が明らかに他に示されない限り、単数形「a」及び「an」は複数の言及を

10

20

30

40

50

含む。また、本明細書及び特許請求の範囲で使用する「少なくとも1つの」と及び「1つ以上の」という用語は、同じ意味を有し、1,2,3又はそれ以上を含む。さらに、「A、B及び/又はCの少なくとも1つ」、「A、B又はCの少なくとも1つ」、及び「A、B及び/又はCの少なくとも1つ」という表現は、本明細書及び特許請求の範囲で使用されるように、A単独、B単独、C単独、AとB、BとC、AとC、及びAとBとC、をカバーすることを意図している。

【0073】

本発明の広い範囲を示す数値範囲及びパラメータが近似値であるにもかかわらず、特定の実施例に示された数値は可能な限り正確に報告される。しかし、いずれの数値も本質的に、それぞれの試験測定値に見られる標準偏差から必然的に生じる特定の誤差を含む。また、本明細書で使用する「約」という用語は、一般に、所与の値又は範囲の10%、5%、1%又は0.5%以内を意味する。或いは、用語「約」は、当業者によって考慮される場合、平均の許容可能な標準誤差内にあることを意味する。操作例/実施例以外で、又は特に明記しない限り、本明細書中に開示される材料の量、時間、温度、操作条件、量の比などについての、数値範囲、量、値及びパーセンテージの全てが、すべての場合において、用語「約」により修飾されているものと理解されるべきである。したがって、反対に示されない限り、本開示及び添付の請求項に記載される数値パラメータは、所望に応じて変化することのできる近似値である。少なくとも、各数値パラメータは、報告された有効数字の数に照らして、及び通常の丸め技法を適用することによって、少なくとも解釈されるべきである。範囲は、本明細書では、1つのエンドポイントから別のエンドポイントまで、又は2つのエンドポイント間で表現することができる。特に明記しない限り、本明細書中に開示される全ての範囲は、エンドポイントを包含する。

【0074】

本開示は、一般に分子構築物に関する。各分子構築物は、標的化成分(T)及びエフェクター成分(E)を含む。本明細書において、これらの分子構築物は、「T-E分子」、「T-E医薬品」又は「T-E薬物」と呼ばれる場合がある。

【0075】

本明細書において、用語「標的化成分」とは、対象となる標的(例えば、細胞表面上の受容体、又は組織内のタンパク質)に直接的又は間接的に結合することにより、本発明の分子構築物の対象となる標的への輸送を容易にする分子構築物の部分を指す。いくつかの場合において、標的化成分は、分子構築物を標的細胞の近傍に誘導する。他の場合には、標的化成分は、標的細胞表面に存在する分子、又は細胞表面に存在する分子に特異的に結合する第2分子に特異的に結合する。いくつかの場合において、標的化成分は、対象となる標的に結合されると、本発明の分子構築物とともに内部に移行することができることにより、標的細胞の細胞質基質に移転される。標的化成分は、細胞表面の受容体に対する抗体若しくはリガンドであり得るか、又は、そのような抗体若しくはリガンドに結合する分子であることで、本発明の分子構築物を標的部位(例えば、選択した細胞の表面)に標的化してもよい。標的化機能を有しない治療薬に比べて、本発明の分子構築物は、疾患部位でのエフェクター(治療剤)の局在化を強化でき、又は該局在化に有利である。上記局在化は、程度又は相対的な割合をいい、疾患部位へのエフェクターの全体的又は完全な局在化を意味しない。

【0076】

本発明によれば、用語「エフェクター成分」とは、分子構築物が標的部位に誘導されると、生物学的活性(例えば、免疫応答、細胞毒性効果の発揮等を含む)又は他の機能的活性(例えば、他のハプテナグ付き治療分子の動員)を誘発する分子構築物の部分を意味する。「エフェクト」は、治療的又は診断的であり得る。エフェクター成分は、細胞、及び/又は、細胞外免疫調節因子に結合するものを包含する。エフェクター成分は、タンパク質、核酸、脂質、炭水化物、糖ペプチド、薬物部分(小分子薬物及び生物製剤の両方)、化合物、元素、及び同位体、並びにそれらの断片等の薬剤を含む。

【0077】

使用される第1、第2、第3等の用語は、本明細書において、種々の成分、構成要素、領域

10

20

30

40

50

、及び/又は、セクションを説明するために使用することができるが、これらの成分(並びに、構成要素、領域、及び/又は、セクション)は、これらの用語によって制限されない。また、そのような順序番号の使用は、文脈によって明白に示されない限り、順番や順序を意味するものではない。むしろ、これらの用語は、単にある要素を別の要素と区別するために使用される。従って、以下に説明する第1成分は、例示的な実施形態の教示から逸脱することなく、第2成分と呼ぶことができる。

【0078】

ここで、用語「リンク」、「カップル」及び「接合」は、交換可能に使用され、直接結合又は間接結合により2つの要素を結合することを指すものである。

【0079】

ここで使用される用語「ポリペプチド」とは、少なくとも2つのアミノ酸残基を有するポリマーを意味する。典型的には、ポリペプチドは、2~約200残基、好ましくは2~50残基の長さのアミノ酸残基を含む。本明細書でいうアミノ酸配列は、該配列の、L-、D-、又は -アミノ酸の構成を含む。ポリペプチドは、アミノ酸ポリマーも含む。該アミノ酸ポリマーにおいて、1つ又は複数のアミノ酸残基は、天然に存在するアミノ酸に対応する人工化学類似体、又は天然に存在するアミノ酸ポリマーである。さらに、該用語は、ペプチド結合、又は他の「修飾された結合」、例えば、ペプチド結合が -エステル、 -エステル、チオアミド、ホスホラミド、カーボネート、ヒドロキシレート等に置換されたものにより結合されたアミノ酸に適用される。

【0080】

特定の実施形態において、本明細書に記載された配列を含むアミノ酸の保存的置換も含まれる。種々の実施形態において、1、2、3、4、又は5つの異なる残基が置換される。用語「保存的置換」とは、アミノ酸の置換が分子の活性(例えば、生物学的若しくは機能的活性、及び/又は、特異性)を実質的に変更しないことをいう。典型的には、保存的アミノ酸置換は、あるアミノ酸を、類似の化学的性質(例えば、電荷又は疎水性)を有する他アミノ酸で置換することである。ある保存的置換は、標準アミノ酸が親残基と僅かに異なる非標準アミノ酸(例えば、希アミノ酸、合成アミノ酸等)に置換された「類似体置換」を含む。アミノ酸類似体は、親アミノ酸の構造を大幅に変化させず、標準アミノ酸から合成的に得ることができ、異性体、又は代謝産物前駆体である。

【0081】

特定の実施形態において、本明細書に記載されている配列のいずれかと少なくとも80%、好ましくは少なくとも85%又は90%、より好ましくは少なくとも95%又は98%の配列同一性を有するポリペプチドも含む。

【0082】

本明細書でいうポリペプチド配列に関する「アミノ酸配列同一性パーセンテージ(%)」は、特定のポリペプチド配列におけるアミノ酸残基と同一である候補配列におけるポリペプチド残基のパーセンテージとして定義される。上記配列を整列させ、必要に応じてギャップを導入することにより、最大パーセント配列同一性が得られる。なお、保存的置換は、配列同一性の一部として考慮されていない。配列同一性パーセンテージを決定するためのアライメントは、当分野内の様々な方法、例えば、公然に入手可能なコンピュータソフトウェア、例えば、BLAST、BLAST-2、ALIGN又はガリン(DNASTAR)ソフトウェアにより達成することができる。当業者であれば、アライメントを測定するための適切なパラメータを決定することができる。上記パラメータは、比較される配列の全長にわたって最大のアライメントを達成するために必要である任意のアルゴリズムを含む。本明細書の目的を達成するために、2つのポリペプチド配列間の配列比較は、国立生物工学情報センター(NCBI)によってオンラインで提供されるコンピュータプログラムBlastp(タンパク質-タンパク質BLAST)により実施される。所与のポリペプチド配列Bに対する所与のポリペプチド配列Aのアミノ酸配列同一性パーセンテージ(本明細書において、所与のポリペプチド配列Bと特定の%アミノ酸配列同一性を有する所与のポリペプチド配列Aとも呼ばれる)は、以下の式により計算される。

10

20

30

40

50

【0083】

$$\frac{X}{Y} \times 100$$

%

【0084】

ここで、Xは、配列アライメントプログラムBLASTにより、配列A、Bをアライメントすることで同一のマッチとして得られたアミノ酸残基の数である。Yは、配列A又はBのいずれか短い方のアミノ酸残基の総数である。

【0085】

本明細書で使用される用語「PEG化アミノ酸」は、1つのアミノ基及び1つのカルボキシル基を有するポリエチレングリコール(PEG)鎖である。一般的には、PEG化アミノ酸の一般式は、 $\text{NH}_2-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{COOH}$ である。本開示において、nの値は、1~20、好ましくは、2~12である。

10

【0086】

本明細書において、ポリペプチドについては、用語「末端」は、ポリペプチドのN端又はC端にあるアミノ酸残基を指す。ポリマーについては、用語「末端」は、ポリマー(例えば、本開示のポリエチレングリコール)におけるポリマー骨格の端に位置する構成単位を指す。本明細書及び特許請求の範囲において、用語「遊離末端」は、他の分子に化学的に結合していない末端アミノ酸残基又は構成単位を指す。

【0087】

本明細書において、用語「抗原」又は「Ag」は、免疫応答を誘発する分子として定義される。この免疫応答は、分泌性、体液性、及び/又は、細胞性抗原-特異的応答を含む。本開示において、用語「抗原」は、タンパク質、ポリペプチド(その変異型又は生物学的活性断片を含む)、多糖類、糖タンパク質、糖脂質、核酸、又はそれらの組合せでありえる。

20

【0088】

本明細書及び特許請求の範囲において、用語「抗体」は最も広い意味で使用され、完全に集合した抗体、抗原に結合する抗体断片、例えば、抗原結合断片(Fab/Fab')、 F(ab')_2 断片(互いにジスルフィド結合により結合された2つの抗原結合Fab部分を有する)、可変断片(Fv)、一本鎖可変断片(scFv)、二重特異的性一本鎖可変領域断片(bi-scFv)、ナノボディ、ユニボディ及びダイアボディを包含する。「抗体断片」は、完全抗体の一部、好ましくは、完全抗体の抗原結合領域又は可変領域を含む。典型的には、「抗体」は、免疫グロブリン遺伝子又は免疫グロブリン遺伝子の断片により実質的にコードされる1つ以上のポリペプチドからなるタンパク質を指す。よく知られている免疫グロブリン遺伝子には、カッパ、ラムダ、アルファ、ガンマ、デルタ、イプシロン及びミュー定常領域遺伝子、並びに、ミリアド免疫グロブリン可変領域遺伝子が含まれる。軽鎖は、カッパ又はラムダに分類される。重鎖は、ガンマ、ミュー、アルファ、デルタ、又はイプシロンに分類される。これにより、免疫グロブリン:IgG、IgM、IgA、IgD、及びIgEをそれぞれ定義する。典型的な免疫グロブリン(抗体)の構造単位は四量体である。各四量体は、2つの同一の1対のポリペプチド鎖から構成される、各1対のポリペプチド鎖は、1本の「軽」鎖(約25kDa)及び1本の「重」鎖(約50-70kDa)を含む。各鎖のN末端は、抗原認識主に関与する約100~110又はそれ以上のアミノ酸を含む可変領域を定義する。用語可変軽鎖(V_L)及び可変重鎖(V_H)は、それぞれ上述した軽鎖及び重鎖を指す。本開示の実施形態によれば、抗体断片は、天然抗体を改変することによって、又は組換えDNA技術を使用して新規合成によって調製され得る。本開示の特定の実施形態において、抗体、及び/又は、抗体断片は、二重特異性であり得、且つ様々な構造であり得る。例えば、二重特異性抗体は、2つの異なる抗原結合部位(可変領域)を含み得る。種々の実施形態において、二重特異性抗体は、ハイブリドーマ技術又は組換えDNA技術によって調製されることができる。特定の実施形態において、二重特異性抗体は、少なくとも2つの異なるエピトープに対し結合特異性を有する。

30

40

【0089】

本明細書において、用語「特異的に結合」は、抗体又はその抗原結合断片が、約 1×10^{-6}

50

M、 1×10^{-7} M、 1×10^{-8} M、 1×10^{-9} M、 1×10^{-10} M、 1×10^{-11} M、 1×10^{-12} M以下の解離定数(Kd)で抗原に結合する能力、及び/又は、非特異的抗原に対する親和性よりも少なくとも2倍大きい親和性で抗原に結合する能力を指す。

【0090】

本明細書において、用語「治療」は、予防的(例えば、予防薬)、治癒的又は緩和的治療を含む。本明細書で使用される「治療」行為も、予防的(例えば、予防薬)、治癒的又は緩和的治療を含む。特に、本明細書において、用語「治療」は、本発明の分子構築物又はそれを含む医薬組成物を、症状、症状に関連した病状、症状に関連した二次的な疾患若しくは障害、又は症状を引き起こす素因を有する被験体に、上記特定の疾患、障害及び/又は症状の1つ以上の病状又は特徴の、部分的若しくは完全な緩和、改善、軽減、発症の遅延、
10 進行の阻害、重症度の軽減、及び/又は、罹患率の低減を達成する目的で、適用又は投与することを指す。治療は、疾患、障害及び/又は症状の徴候を示していない被験体、及び/又は、疾患、障害及び/又は症状の初期徴候のみを示す被験体にも、疾患、障害及び/又は症状に関連した病理学変化の発展リスクを減少させる目的で施すことができる。

【0091】

本明細書において、用語「有効量」とは、所望の治療応答を生じるのに十分な本発明の組換えタンパク質の量を指す。薬剤の有効量は、疾患又は症状を治癒する必要はないが、疾患若しくは症状の発症を遅延、妨害又は予防し、又は疾患若しくは症状を緩和し、疾患若しくは症状を治療することができる。有効量は、適切な投薬形態で1回、2回又はそれ以上の用量に分割されることで、所定の期間内で1回、2回又はそれ以上で投与されることが
20 できる。具体的な有効量又は十分量は、処置される特定の病状、患者の身体的条件(例えば、患者の体重、年齢、又は性別)、治療を受けている被験体のタイプ、治療期間、併用療法の性質(存在する場合)、採用される特定の処方、化合物の構造又はその誘導体などの要因によって変化する。有効量は、例えば、有効成分の総質量(例えば、グラム、ミリグラム又はマイクログラム)、又は体重に対する活性成分の質量比、例えば、ミリグラム/キログラム(mg / kg)として表すことができる。

【0092】

用語「適用」及び「投与」は、本明細書において互換的に使用され、本発明の分子構築物又は医薬組成物を、治療を必要とする被験体に適用することを意味する。

【0093】

用語「被験体」及び「患者」は、本明細書では互換的に使用され、本発明の分子構築物、医薬組成物及び/又は方法によって治療可能な人類を含む動物を意味する。用語「被験体」又は「患者」は、1つの性別が特定されていない限り、オスとメスの両方の性別を指すことが意図される。従って、用語「被験体」又は「患者」は、本開示の治療方法から利益を得ることができる任意の哺乳動物を含む。「被験体」又は「患者」の例は、ヒト、ラット、マウス、モルモット、サル、ブタ、ヤギ、ウシ、ウマ、イヌ、ネコ、トリ及びニワトリを含むがこれらに限定されない。例示的な実施形態において、患者はヒトである。用語「哺乳動物」は、ヒト、霊長類、家畜、及び、農場動物、例えば、ウサギ、ブタ、ヒツジ又は牛;動物園、スポーツ又はペット動物;及びマウス及びラットのようなげっ歯類を含む哺乳綱のすべてのメンバーを指す。用語「非ヒト哺乳動物」は、ヒト以外の哺乳綱の
40 すべてのメンバーを指す。

【0094】

本開示全体を通じて、用語「移植拒絶」は、脾臓、幹細胞、骨髄、皮膚、筋肉、角膜組織、神経組織、心臓、肺臓、複合心臓-肺、腎臓、肝臓、腸、膵臓、気管又は食道からの細胞、組織又は固形器官の同種移植片若しくは異種移植片の急性若しくは慢性拒絶、又は移植片対宿主病を指す。

【0095】

本明細書における用語「ドナー移植片」は、レシピエントの破損又は欠損した組織又は器官を置換する目的で、ある身体から別の身体、又は被験体自身のドナー部位から別の部位に移そうとする細胞集団、組織又は器官を指す。

10

20

30

40

50

【0096】

本開示は、少なくとも、T-E医薬品の構築に基づいている。このようなT-E医薬品は、標的細胞、標的組織又は器官に、血液循環、リンパ系、及び他の細胞、組織又は器官よりも相対的に高い割合で送達できる。この場合に、医薬品の治療効果は増加する一方、副作用及び毒性の範囲、重症度は低下する。標的成分を含まない形態よりも低い用量でT-E分子の形態で治療エフェクターを投与することもできる。従って、より低い投薬量で治療エフェクターを投与しても、効力を失うことなく、副作用及び毒性を低下させることができる。

【0097】

より良い薬物標的から恩恵を受けることができる疾患

【0098】

多くの疾患に使用される薬物は、疾患部位を標的とすることができれば、すなわち正常組織又は器官よりも有利に疾患部位に局在化又は分配できれば、より良い効力及び安全性を有するように改善されることができる。特定の抗体薬物は、感染性微生物又はそれらの毒性生成物を標的とし、免疫細胞を動員して抗体結合粒子を貪食して消失させる能力を持たせると、治療効果を向上できる。以下は疾患の主要な例であり、薬物を疾患部位又は細胞に優先的に分布させることができれば、又は、貪食免疫細胞を摂取することができれば、これらの薬物を改善することができる。

【0099】

移植関連の疾患/病状の例は、臓器移植拒絶(慢性、急性、亜急性及び超急性拒絶)及び移植片対宿主病(GvHD)を含むが、これらに限定されない。

【0100】

移植は、移植細胞、組織又は器官をある身体から別の身体、又は自体のドナー部位から別の部位に移す行為である。器官系の機能不全は、ドナーから器官を移植することにより矯正することができる。しかし、ドナー移植片(例えば、移植される器官、組織又は細胞)、特に、同種移植片又は異種移植片は、レシピエントの免疫系によって外来因子として認識されることから、移植された器官、組織又は細胞の拒絶を引き起こす。

【0101】

遺伝的に異種の組織の拒絶に関与する抗原が多く存在するが、最も活発な同種移植片拒絶反応の原因となるものは、主要組織適合遺伝子複合体(MHC)である。ヒトでは、MHCは、ヒト白血球抗原(HLA)系と呼ばれ、補体遺伝子の近くにある第6染色体の短腕に位置する。最も研究されているHLA遺伝子は、9つの典型的なMHC遺伝子、即ち、HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-DPA1、HLA-DPB1、HLA-DQA1、HLA-DQB1、HLA-DRA及びHLA-DRB1である。ヒトでは、MHC遺伝子クラスターは、クラスI、II、IIIの3つの領域に分けられる。A、B及びC遺伝子は、MHCクラスIに属し、6つのD遺伝子は、クラスIIに属する。

【0102】

MHC発現は共優性であり、2つのセットの遺伝的対立遺伝子が両方とも細胞表面上で等しく発現されることを意味する。さらに、1つのセットのMHC対立遺伝子は、ハプロタイプとして承継されるため、ヘテロ接合性個体は、2つのMHCハプロタイプ(1つは父性染色体由来、もう1つは母性染色体由来)を有する。各個体は、3つのクラスI遺伝子(HLA-A、HLA-B、及びHLA-C)のそれぞれの2つの対立遺伝子を有するので、6つの異なるタイプのMHC-Iを発現することができる。クラスII遺伝子座において、各個体は、1対のHLA-DP遺伝子(DPA1及びDPB1)、複数の遺伝子HLA-DQ(DQA1及びDQB1)、1つの遺伝子HLA-DR (DRA1)、及び1以上の遺伝子HLA-DR (DRB1及びDRB3、DRB4又はDRB5)を承継する。従って、1つのヘテロ接合性個体は、6つ又は8つの機能的クラスIIの対立遺伝子を継承することができ、そのうち、3又は4つは各親に由来する。MHC遺伝子は高度に多型性である。多くの異なる対立遺伝子が集団内の異なる個体に存在する。

【0103】

MHCクラスI及びMHCクラスIIタンパク質は、両方とも移植拒絶に役割を果たす。MHCクラスIは、全ての有核細胞上に発現され、これらのクラスI分子は、細胞内からの抗原性ペプチド(例えば、自己抗原、細胞内ウイルス由来の抗原、及び腫瘍関連抗原)をCD8受容体を有

10

20

30

40

50

するT細胞、例えば、アロ反応性キラーT細胞(細胞傷害性Tリンパ球(CTL)としても知られているもの)に提示することに関与する。CTLのT細胞受容体(TCR)が移植組織のMHCクラスII分子を認識すると、CTLは、アポトーシスにより標的T細胞のプログラム細胞死を誘発する。一方、MHCクラスIIは、通常、樹状細胞、活性化マクロファージ、及びB細胞のようなプロフェッショナル抗原提示細胞(APC)にのみ発生する。MHCクラスIIは、細胞外抗原をCD4 T細胞に提示する。記憶ヘルパーT細胞のCD4受容体が移植片組織の標的T細胞の表面上で表現されたMHCクラスII分子に結合する場合に、記憶ヘルパーT細胞のTCRは、それらの標的抗原を認識し、その後、エフェクター細胞としてのクローンを産生し、記憶ヘルパーT細胞が抗原の記憶をプライミングすることに優勢であったサイトカインバランスに接近するように、免疫シグナル伝達分子(サイトカイン)を分泌する。

10

【0104】

移植片対宿主病は、遺伝的に異なる個体からドナー組織を受け取った後の医学的合併症である。GvHDは、一般に、幹細胞移植又は骨髄移植に関連するが、他の形態の組織移植にも適用される。ドナー組織(移植片)における免疫細胞(白血球)がレシピエント(宿主)を「外来物」として認識することから、移植された免疫細胞は、宿主の体細胞を攻撃する。

【0105】

本発明のT-E分子設計は、ドナー移植物の拒絶を防止するための分子構築物の調製に適用され得る。

【0106】

本発明の分子構築物では、標的化成分は、移植を受ける患者の細胞ではなく、ドナー移植物の細胞に発現されるHLA A、B又はCアロタイプに特異的な抗体のscFvである。HLA A、B及びCハプロタイプに6つの遺伝子が存在するため、異なるアロタイプを有する1つの遺伝子を見出すことは困難ではない。多くの抗HLAアロタイプ抗体が既に知られている。例えば、HLA A2及びB27に特異的な抗体が周知である。Cw1抗原に特異的な抗体(対立遺伝子:C*01:02に対応する)が既に調製されている。いくつかの抗体は、複数のアロタイプによって共有される決定基に結合する。例えば、ある抗体はA11及びA24に結合する一方、別の抗体はA11、A25、A26及びA66に結合する。様々なHLAアロタイプに結合する抗体のパネルは、移植を受ける患者の末梢血からHLA A、B、及びCアロタイプ特異的B細胞を分離し、RT-PCRによりそれらのB細胞のVH及びVL配列をクローニングすることにより構築され得る。類似する手順は、様々なウイルス抗原に対する抗原特異的ヒトモノクローナル抗体の調製において確立されている。HLAアロタイプに特異的なscFvを有する分子構築物は、特定のハプロタイプを有する移植物を受けている患者のために選択され得る。

20

30

【0107】

エフェクター成分は、(1)進行中の免疫活性化を阻害できる、免疫チェックポイントタンパク質(例えば、CTLA-4及びPD-L1)の外部ドメイン又は細胞外ドメイン;(2)活性化T細胞に発現されるCD25に特異的な抗体のscFv;及び(3)移植拒絶の防止に広く使用されている小分子免疫抑制薬、例えば、シロリムス(ラパマイシン)、エベロリムス、及びタクロリムス(FK-506)から選択され得る。mTOR(ラパマイシンの哺乳動物標的)を阻害するシロリムス及びエベロリムス、及びカルシニューリンを阻害するタクロリムスは、T細胞活性の強力な阻害剤である。フィンゴリモド及びその誘導體(例えば、フィンゴリモドリン酸塩)も適切な免疫抑制剤の例である。抗CD25、フィンゴリモド、シロリムス、エベロリムス及びタクロリムスは、それらの免疫抑制効果により、それぞれ重篤な副作用の範囲を有する。従って、この薬物の移植物における割合を増加されると共に、身体他の部分、特に血液及びリンパ系における割合を低減させることが望ましい。

40

【0108】

シロリムス(m.w.:914.172ダルトン)及びタクロリムス(m.w.804.018ダルトン)は、本発明に適している。それは、ほとんどの用途において、シロリムス又はエベロリムスは約2~10mg /日で使用され、タクロリムスは約5~15mg /日で使用されるためである。同様に移植拒絶の防止に用いられる免疫抑制薬であるシクロスポリン(m.w.:1,202.61ダルトン)及びミコフェノール酸(m.w.:320.34ダルトン)は、本明細書での使用には適していない。それ

50

は、シクロスポリンは、約150-1,000mg/日で使用され、ミコフェノール酸は、約800-1,500mg/日で使用されるためである。標的化成分として2つのscFv及びエフェクター成分として10個のシロリムス分子を有する分子構築物の場合には、scFvの分子量(m.w.:25,000ダルトン)は、シロリムスの分子量の約6倍である。従って、5mgのシロリムスを投与する際に、30mgのscFvを投与する必要がある。この投与量は実行可能である。投与されたシロリムスが移植体に運ばれるので、薬物が移植体を標的とせず投与される場合よりも少ない量が必要となる。

【0109】

シロリムス、エベロリムス、及びタクロリムスは、T細胞の細胞内標的に作用するので、可逆的結合によりマルチアームリンカーユニットに結合される。これらの薬物は、加水分解又は標的組織に存在する組織プロテアーゼによる切断によってリンカーから切断される。本発明の分子構築物は、静脈内投与されるので、高速薬物動態で標的部位に到達することができるため、経路中の加水分解は大きな問題にはならない。シロリムス、エベロリムス、及びタクロリムス分子は、有機化学実験室で新たに合成されている。様々な結合基、例えば、スルフヒドリル基及びアミノ基は、薬物分子を妨げてそれらの標的を阻害しない側鎖に導入されることができる。さらに、リンカーユニットへの結合は、フィンゴリモド、シロリムス、エベロリムス及びタクロリムスの活性をブロックする懸念がない。免疫抑制剤は、放出後に活性を回復する。本開示の実施形態によれば、単一のリンカーユニット又はジョイント-リンカー構造であるいくつかのT-E分子は、標的化成分として同種異系のHLA A、B又はC抗原(治療されている患者に存在しない)に特異的なscFv、及びエフェクター成分としてシロリムス、エベロリムス、タクロリムス又はCD25に特異的なscFvを含む。

【0110】

フィンゴリモド及びフィンゴリモドリン酸塩は、移植時の拒絶反応を阻害するための良い候補薬物として提供され得る。腎臓移植のためのフィンゴリモドの臨床試験において、他の確立された、標準的なケアよりも優れていることは発見されていない。しかし、移植器官に到達したフィンゴリモドの濃度を増加できると、移植された器官で宿主免疫応答に対する効果的な免疫抑制を達成できる。

【0111】

移植器官への免疫抑制薬剤の標的の化戦略は、移植片対宿主病(GvHD)の治療に適用することができる。幹細胞、骨髄移植、さらに組織又は血液移植を受ける患者において、移植物における免疫細胞は、宿主細胞を外來物として認識し、宿主細胞に対して免疫応答をマウントすることで、レシピエントの肝臓、皮膚、粘膜、胃腸管、及び他の器官及び組織に深刻な損傷を引き起こす。免疫抑制薬剤、例えば、シロリムス、エベロリムス、タクロリムス、フィンゴリモド又はフィンゴリモドリン酸塩は、移植片白血球上に発現されるHLA対立遺伝子を発現する細胞に運ばれ得る。これらの標的細胞は、GvHDにおいて観察された細胞溶解活性を主に担うT細胞を含む。移植片からのT細胞が阻害される場合に、GvHDは改善されるべきである。

【0112】

パートI特定疾患の治療に使用されるマルチアームリンカー

【0113】

様々な実施形態において、本開示は、被験体の移植拒絶を治療するためのマルチアームリンカーユニットを提供する。本開示の様々な実施形態によれば、該リンカーユニットは、中心コア、複数のリンクアーム、複数の第1成分、必要に応じてカップリングアーム、及び第2成分を含む。

【0114】

中心コアは、リンクアームに結合される前に所定の数のアミン(-NH₂)基を有するペプチドコアであり得る。例えば、ペプチドコアは、側鎖にアミン(-NH₂)基を有する2以上のリジン(K)残基を含み得る。

【0115】

次のセクションでは、本発明に適用されるペプチドコアの構造を開示し、さらに、本発明

10

20

30

40

50

のマルチアームリンカーの構築に適用される機能成分、及びこのようなマルチアームリンカーの使用を説明する。

【 0 1 1 6 】

本開示の第1の態様は、(1)2-15個のリジン(K)残基を含む中心コア、(2)それぞれ中心コアのK残基に結合される2-15個のリンクアームを含むリンカーユニットに関する。本発明の中心コアは、本発明の中心コアは、そのN末端若しくはC末端に、アジド基、アルキン基、テトラジン基若しくは歪んだアルキン基を有する、又は結合していることを特徴とする。

【 0 1 1 7 】

本発明のリンカーユニットの調製において、一端にN-ヒドロキシスクシンイミジル(NHS)基を有し、他端に官能基(例えば、NHS、マレイミド、アジド、アルキン、テトラジン、又は歪んだアルキン基)を有するPEG鎖は、PEG鎖のNHS基とK残基のアミン基との間にアミド結合を形成することにより、中心コアのK残基に結合される。本開示において、K残基に結合されるPEG鎖は、リンクアームと呼ばれ、その遊離末端に官能基を有する。

10

【 0 1 1 8 】

本開示の実施形態によれば、上記中心コアは、長さが8-120個のアミノ酸残基を含むポリペプチドであり、2~15個のリジン(K)残基を含み、各K残基とその次のK残基との間が充填配列により区切られる。

【 0 1 1 9 】

本開示の実施形態によれば、上記充填配列は、グリシン(G)及びセリン(S)残基を含み、好ましくは、上記充填配列は、G、S、及びそれらの組合せから選択される2-15残基からなる。

20

【 0 1 2 0 】

GS,
GGS,
GSG,
GGGS(配列番号: 1),
GSGS(配列番号: 2),
GGSG(配列番号: 3),
GSGGS(配列番号: 4),
SGGSG(配列番号: 5),
GGGGS(配列番号: 6),
GGSGGS(配列番号: 7),
GGSGGSG(配列番号: 8),
SGSGGSGS(配列番号: 9),
GSGGSGSGS(配列番号: 10),
SGGSGGSGSG(配列番号: 11),
GGSGGSGGSGS(配列番号: 12),
SGGSGGSGGSGS(配列番号: 13),
GGGSGGSGGSGGS(配列番号: 14),
GGGSGGSGGSGGGS(配列番号: 15), 又は
SGSGGGGSGGSGGSG(配列番号: 16)であり得る。

30

40

【 0 1 2 1 】

2つのリジン残基間にある充填配列は、グリシン及びセリン残基のランダムな配列及び/又は長さが様々であり得る。長い充填配列は、より少ないリジン残基を有するポリペプチドに使用され得る一方、短い充填配列は、多くのリジン残基を有するポリペプチドに使用され得る。親水性アミノ酸残基、例えばアスパラギン酸及びヒスチジンは、グリシン及びセリンと共に充填配列に挿入され得る。充填配列は、グリシン及びセリン残基で構成されたものに加えて、アルブミン及び免疫グロブリンのような一般的なヒト血清タンパク質における可撓性、可溶性のループを採用することもできる。

【 0 1 2 2 】

50

基本的に、リジン残基間の充填配列はグリシン及びセリン残基でペプチドを覆う。しかし、側鎖にアミン基を有するもの以外のアミノ酸からなるペプチドであってもよい。これらのアミノ酸は、必ずではないが、主として完全に親水性のアミノ酸である。アミノ酸は必ずしも天然アミノ酸である必要はない。

【0123】

本開示の好ましい実施形態によれば、中心コアは、2-15単位の G_{1-5} SK配列を含む。或いは、ポリペプチドは、 $(GSK)_{2-15}$ 配列を含む。即ち、ポリペプチドは、少なくとも2つの連続した、GSK配列の単位を含む。例えば、本発明の中心コアは、

【0124】

Ac-CGGSGGSGGSKGSGSK(配列番号: 17),

Ac-CGGSGGSGGSKGSGSKGSK(配列番号: 18), 又は

Ac-CGSKGSKGSKGSKGSKGSKGSKGSKGSKGSK(配列番号: 19),

ここで、Acは、アセチル基を示す。

【0125】

本開示の特定の実施形態によれば、上記中心コアは、 $(X_{aa}-K)_n$ 配列を含むポリペプチドである。ここで、 X_{aa} は、2~12個のエチレングリコール(EG)の繰り返し単位を有するPEG化アミノ酸であり、 n は、2~15の整数である。

【0126】

理解されるように、本発明の中心コアのリジン残基は、側鎖にアミン基を有するアミノ酸で置換されていてもよい。例えば、 $(CH_2-)nNH_2$ 側鎖を有する -アミノ酸 ($n=1-3$ 又は 5)、 $(CH(OH)-)nCH_2-NH_2$ 側鎖を有する -アミノ酸 ($n=1-5$)、 $(CH_2-CH(OH)-)nCH_2-NH_2$ 側鎖を有する -アミノ酸 ($n=1-3$)、 $(CH_2-CH_2-O-)nCH_2-NH_2$ 側鎖を有する -アミノ酸 ($n=1-2$)。これらのアミノ酸は必ずしも天然アミノ酸である必要はない。

【0127】

上述したように、本発明の中心コアは、そのN末端若しくはC末端に、アジド基、アルキン基、テトラジン基若しくは歪んだアルキン基を有する、又は結合していることを特徴とする。本開示のいくつかの実施形態によれば、本発明の中心コアは、そのN末端又はC末端にアジド基又はアルキン基を有するアミノ酸残基を含む。アジド基を有するアミノ酸残基は、L-アジドホモアラニン(AHA)、4-アジド-L-フェニルアラニン、4-アジド-D-フェニルアラニン、3-アジド-L-アラニン、3-アジド-D-アラニン、4-アジド-L-ホモアラニン、4-アジド-D-ホモアラニン、5-アジド-L-オルニチン、5-アジド-d-オルニチン、6-アジド-L-リジン、又は6-アジド-D-リジンであり得る。例えば、本発明の中心コアは、以下の配列を含み得る。即ち、

【0128】

Ac-(GSK) $_{2-7}$ -(G $_{2-4}$ S) $_{1-8}$ -A^{AH},

Ac-A^{AH}-(SG $_{2-4}$) $_{1-8}$ -(GSK) $_{2-7}$,

Ac-A^{AH}-(SG $_{2-4}$) $_{0-7}$ -(GSK) $_{2-6}$ -(G $_{2-4}$ S) $_{1-8}$ -C,

Ac-C-(SG $_{2-4}$) $_{0-7}$ -(GSK) $_{2-6}$ -(G $_{2-4}$ S) $_{1-8}$ -A^{AH},

Ac-K-(Xaa $_{2-12}$ -K) $_{2-4}$ -Xaa $_{2-12}$ -A^{AH},

Ac-A^{AH}-Xaa $_{2-12}$ -K-(Xaa $_{2-12}$ -K) $_{2-4}$,

Ac-A^{AH}-Xaa $_{2-12}$ -K-(Xaa $_{2-12}$ -K) $_{1-3}$ -Xaa $_{2-12}$ -C, 又は

Ac-C-Xaa $_{2-12}$ -K-(Xaa $_{2-12}$ -K) $_{1-3}$ -Xaa $_{2-12}$ -A^{AH}である。

【0129】

ここで、Xaaは、特定のEGの繰り返し単位を有するPEG化アミノ酸であり、Acは、アセチル基を示し、A^{AH}は、AHA残基を示す。

【0130】

アルキン基を有するアミノ酸の例は、L-ホモプロパギルグリシン(L-HPG)、D-ホモプロパギルグリシン(D-HPG)、又は -ホモプロパギルグリシン(-HPG)を含むが、これらに限定されない。この場合に、本発明の中心コアは、以下の配列を含み得る。即ち、

【0131】

10

20

30

40

50

Ac-(GSK)₂₋₇-(G₂₋₄S)₁₋₈-G^{HP},
 Ac-G^{HP}-(SG₂₋₄)₁₋₈-(GSK)₂₋₇,
 Ac-G^{HP}-(SG₂₋₄)₀₋₇-(GSK)₂₋₆-(G₂₋₄S)₁₋₈-C,
 Ac-C-(SG₂₋₄)₀₋₇-(GSK)₂₋₆-(G₂₋₄S)₁₋₈-G^{HP},
 Ac-K-(Xaa₂₋₁₂-K)₂₋₄-Xaa₂₋₁₂-G^{HP},
 Ac-G^{HP}-Xaa₂₋₁₂-K-(Xaa₂₋₁₂-K)₂₋₄,
 Ac-G^{HP}-Xaa₂₋₁₂-K-(Xaa₂₋₁₂-K)₁₋₃-Xaa₂₋₁₂-C, 又は
 Ac-C-Xaa₂₋₁₂-K-(Xaa₂₋₁₂-K)₁₋₃-Xaa₂₋₁₂-G^{HP}である。

【 0 1 3 2 】

ここで、Xaaは、特定のEGの繰り返し単位を有するPEG化アミノ酸であり、Acは、アセチル基を示し、G^{HP}は、HPG残基を示す。

10

【 0 1 3 3 】

なお、側鎖にアジド基又はアルキン基を含む多くのアミノ酸、及びPEG化アミノ酸は、市販されている。これらのアミノ酸は、t-boc(tert-ブチルカルボニル)-又はFmoc(9-フルオレニルメチルオキシカルボニル)の保護基を有し、固相ペプチド合成に容易に適用可能である。

【 0 1 3 4 】

本開示のいくつかの実施例によれば、中心コアは、下記の配列を含み得る。即ち、

【 0 1 3 5 】

Ac-G^{HP}GGSGGSGGSKGSGSK(配列番号: 20),
 Ac-G^{HP}GGSGGSGGSKGSGSKGSK(配列番号: 21),
 Ac-A^{AH}GGSGGSGGSKGSGSKGSK(配列番号: 22),
 Ac-G^{HP}GGSGGSGGSKGSGSKGSGSC(配列番号: 23),
 Ac-C-Xaa₂-K-Xaa₂-K-Xaa₂-K(配列番号: 24), 又は
 Ac-C-Xaa₆-K-Xaa₆-K-Xaa₆-K-Xaa₆-K-Xaa₆-K(配列番号: 25),

20

【 0 1 3 6 】

ここで、Xaaは、特定のEGの繰り返し単位を有するPEG化アミノ酸であり、Acは、アセチル基を示し、A^{AH}は、AHA残基を示し、G^{HP}は、HPG残基を示す。

【 0 1 3 7 】

或いは、本発明の中心コアは、カップリングアームに結合される。該カップリングアームは、その遊離末端(即ち、中心コアに結合されていない末端)に、官能基(例えば、アジド基、アルキン基、テトラジン基、又は歪んだアルキン基)を有する。この場合に、本発明の中心コアは、そのN末端又はC末端にシステイン残基を有する。カップリングアームに結合されるリンカーユニットを調製するためには1つの末端にマレイミド基を有し、もう1つの末端に官能基を有するPEG鎖を、PEG鎖のマレイミド基とシステイン残基のチオール基との間で起きるチオール-マレイミド反応により、中心コアのシステイン残基に結合する。本開示において、中心コアのシステイン残基に結合されるPEG鎖は、カップリングアームと呼ばれる。該カップリングアームは、その遊離末端に官能基を有する。

30

【 0 1 3 8 】

理解されるように、本発明の中心コアのシステイン残基は、側鎖がスルフヒドリル基を有するアミノ酸で置換されていてもよい。例えば、(CH(OH)-)nCH₂-SH側鎖を有する -アミノ酸(n=1-5)、(CH₂-CH(OH)-)nCH₂-SH側鎖を有する -アミノ酸(n=1-3)、(CH₂-CH₂-O-)nCH₂-SH側鎖を有する -アミノ酸(n=1-2)。これらのアミノ酸は必ずしも天然アミノ酸である必要はない。システイン残基は、ペプチドコアのN末端又はC末端に配置する必要はない。例えば、システイン残基をペプチドの中央に配置することでリジン残基をシステイン残基の2つの側に分布させることができる。

40

【 0 1 3 9 】

好ましくは、その遊離末端にカップリングアームは、テトラジン基又は歪んだアルキン基(例えば、シクロオクテン基又はシクロオクチン基)を有する。これらのカップリングアームは、2-12個のEG単位を有する。本開示の実施形態によれば、テトラジン基は、1, 2, 3,

50

4-テトラジン、1, 2, 3, 5-テトラジン、1, 2, 4, 5-テトラジン、又はそれらの誘導体である。歪んだアルキン基は、シクロオクテン基又はシクロオクチン基であり得る。本開示の実施例によれば、シクロオクテン基は、トランス-シクロオクテン(TCO)基であり、シクロオクチン基の例は、ジベンゾシクロオクチン(DBCO)、ジフルオロシクロオクチン(DIFO)、ピシクロニン(BCN)、及びジベンゾシクロオクチン(DICO)を含むが、これらに限定されない。本開示のいくつかの実施形態によれば、テトラジン基は、6-メチル-テトラジンである。

【0140】

カップリングアームに結合するように構成される本発明の中心コアの例は、

【0141】

Ac-(GSK)₂₋₇-(G₂₋₄S)₁₋₈-C-Xaa₂₋₁₂-テトラジン、
 Ac-(GSK)₂₋₇-(G₂₋₄S)₁₋₈-C-Xaa₂₋₁₂-歪んだアルキン、
 Ac-K-(Xaa₂₋₁₂-K)₂₋₄-Xaa₂₋₁₂-C-Xaa₂₋₁₂-テトラジン、
 Ac-K-(Xaa₂₋₁₂-K)₂₋₄-Xaa₂₋₁₂-C-Xaa₂₋₁₂-歪んだアルキン、
 テトラジン-Xaa₂₋₁₂-C(Ac)-(SG₂₋₄)₁₋₈-(GSK)₂₋₇、
 歪んだアルキン-Xaa₂₋₁₂-C(Ac)-(SG₂₋₄)₁₋₈-(GSK)₂₋₇、
 テトラジン-Xaa₂₋₁₂-C(Ac)-Xaa₂₋₁₂-K-(Xaa₂₋₁₂-K)₂₋₄、及び
 歪んだアルキン-Xaa₂₋₁₂-C(Ac)-Xaa₂₋₁₂-K-(Xaa₂₋₁₂-K)₂₋₄を含むが、これらに限定されない。

【0142】

或いは、上記中心コアは、その1つの末端にアジド基又はアルキン基を有し、1つの末端にテトラジン基又は歪んだアルキン基を有するカップリングアームに結合される。その例は、

【0143】

Ac-A^{AH}-(SG₂₋₄)₀₋₇-(GSK)₂₋₆-(G₂₋₄S)₁₋₈-C-Xaa₂₋₁₂-テトラジン、
 Ac-A^{AH}-(SG₂₋₄)₀₋₇-(GSK)₂₋₆-(G₂₋₄S)₁₋₈-C-Xaa₂₋₁₂-歪んだアルキン、
 テトラジン-Xaa₂₋₁₂-C(Ac)-(SG₂₋₄)₀₋₇-(GSK)₂₋₆-(G₂₋₄S)₁₋₈-A^{AH}、
 歪んだアルキン-Xaa₂₋₁₂-C(Ac)-(SG₂₋₄)₀₋₇-(GSK)₂₋₆-(G₂₋₄S)₁₋₈-A^{AH}、
 Ac-A^{AH}-Xaa₂₋₁₂-K-(Xaa₂₋₁₂-K)₁₋₃-Xaa₂₋₁₂-C-Xaa₂₋₁₂-テトラジン、
 Ac-A^{AH}-Xaa₂₋₁₂-K-(Xaa₂₋₁₂-K)₁₋₃-Xaa₂₋₁₂-C-Xaa₂₋₁₂-歪んだアルキン、
 テトラジン-Xaa₂₋₁₂-C(Ac)-Xaa₂₋₁₂-K-(Xaa₂₋₁₂-K)₁₋₃-Xaa₂₋₁₂-A^{AH}、
 歪んだアルキン-Xaa₂₋₁₂-C(Ac)-Xaa₂₋₁₂-K-(Xaa₂₋₁₂-K)₁₋₃-Xaa₂₋₁₂-A^{AH}、
 Ac-G^{HP}-(SG₂₋₄)₀₋₇-(GSK)₂₋₆-(G₂₋₄S)₁₋₈-C-Xaa₂₋₁₂-テトラジン、
 Ac-G^{HP}-(SG₂₋₄)₀₋₇-(GSK)₂₋₆-(G₂₋₄S)₁₋₈-C-Xaa₂₋₁₂-歪んだアルキン、
 テトラジン-Xaa₂₋₁₂-C(Ac)-(SG₂₋₄)₀₋₇-(GSK)₂₋₆-(G₂₋₄S)₁₋₈-G^{HP}、
 歪んだアルキン-Xaa₂₋₁₂-C(Ac)-(SG₂₋₄)₀₋₇-(GSK)₂₋₆-(G₂₋₄S)₁₋₈-G^{HP}、
 Ac-G^{HP}-Xaa₂₋₁₂-K-(Xaa₂₋₁₂-K)₁₋₃-Xaa₂₋₁₂-C-Xaa₂₋₁₂-テトラジン、
 Ac-G^{HP}-Xaa₂₋₁₂-K-(Xaa₂₋₁₂-K)₁₋₃-Xaa₂₋₁₂-C-Xaa₂₋₁₂-歪んだアルキン、
 テトラジン-Xaa₂₋₁₂-C(Ac)-Xaa₂₋₁₂-K-(Xaa₂₋₁₂-K)₁₋₃-Xaa₂₋₁₂-G^{HP}、及び
 歪んだアルキン-Xaa₂₋₁₂-C(Ac)-Xaa₂₋₁₂-K-(Xaa₂₋₁₂-K)₁₋₃-Xaa₂₋₁₂-G^{HP}である。

【0144】

ポリペプチドは、組換え技術を用いて、細菌又は哺乳動物の宿主細胞において、設計された遺伝子セグメントを発現させることにより合成することもできる。コアが数多くのリジン残基を有し、且つかなり長い場合に、組換えタンパク質としてポリペプチドを調製することが好ましい。固相合成が採用される場合に、ポリペプチドの長さが増加するにつれて、エラーの発生確率が増加する一方、純度及び/又は収率が低下する。細菌又は哺乳動物宿主細胞においてポリペプチドを調製する際に、数個のアミノ酸残基から10-20残基の範囲の充填配列を2つのK残基間に配置することができる。さらに、AHA及びHPGは遺伝暗号によりコードされる天然アミノ酸ではないため、それらの組換えポリペプチドのN末端又はC末端残基はシステインである。組換えタンパク質を発現させ、精製した後、末端システイ

10

20

30

40

50

ン残基を短い二官能性架橋剤と反応させる。該二官能性架橋剤は、その1つの末端にシステイン残基のSH基と反応可能なマレイミド基を有し、もう1つの末端にアルキン基、アジド基、テトラジン基、又は歪んだアルキン基を有する。

【0145】

PEG化アミノ酸を用いてポリペプチドを合成することは、グリシン及びセリンのような通常のアミノ酸を用いることよりも、少ない工程を必要とする。さらに、異なる長さ(即ち、異なる数のエチレングリコールの繰り返し単位)を有するPEG化アミノ酸を使用することにより、可撓性及び可溶性を提供するとともに、リジン残基の隣接するアミノ基の間に空間を提供することができる。PEG化アミノ酸以外、中心コアは、D型アミノ酸、ホモアミノ酸、N-メチルアミノ酸等の人工アミノ酸を含むように構築されてもよい。アミノ酸分子に含まれるPEG部分が構造的な可撓性及び結合基間の適切な間隔を提供し、水溶性を増強し、且つ、その免疫原性が弱いため、ポリエチレングリコール(PEG)の様々な長さを有するPEG化アミノ酸を用いて中心コアを構築することが好ましい。PEG化アミノ酸含有中心コアの合成は、通常のポリペプチドの合成方法と同様である。

10

【0146】

必要に応じて、安定性を達成するため、本発明の中心コアは、そのN末端にあるアミノ基を保護するアセチル基を有する。

【0147】

理解され得るように、中心コアに結合されるリンクアームの数は、主に、中心コアに含まれるリジン残基の数によって決定される。本発明の中心コアに少なくとも2つのリジン残基が含まれるため、本発明のリンカーユニットは、複数のリンクアームを含み得る。

20

【0148】

図1Aに示すように、リンカーユニット10Aは、1つのHPG(G^{HP})残基及びそれぞれ充填配列(図面において、点線で示される)によって区切られる4つのリジン(K)残基を有する中心コア11aを含む。HPG残基とK残基との間、又はいずれの2つのK残基の間にある充填配列は、同一又は異なるアミノ酸配列を含み得る。この例において、4つのリンクアーム20a-20dは、それぞれNHS基とリジン残基のアミン基との間にアミド結合を形成することによりリジン残基に結合される。理解され得るように、上述したリンカーユニット10A又は後述のリンカーユニットのある特徴は、ここで開示される他のリンカーユニットと共通であるため、具体的な実施形態の文脈に矛盾しない限り、これらの特徴のいくつか又はすべては、以下の実施例においても適用される。しかし、簡潔のために、以下、これらの共通特徴を繰り返して説明しないこともある。

30

【0149】

図1Bは、本開示の別の実施形態に係るリンカーユニット10Bを提供する。中心コア11bは、1つのシステイン(C)残基及びそれぞれ充填配列により区切られる6つのリジン(K)残基を含む。この例において、リンカーユニット10Bは、それぞれリジン残基に結合される6つのリンクアーム20a-20fを含む。本開示の実施形態によれば、リンクアームは、2-20個のEGの繰り返し単位を有するPEG鎖である。

【0150】

図1Aのリンカーユニット10Aと異なり、リンカーユニット10Bは、カップリングアーム60をさらに含む。上述したように、1つの末端にマレイミド基を有し、もう1つの末端に官能基を有するPEG鎖は、カップリングアーム60の形成に用いられる。このようにして、カップリングアーム60は、チオール-マレイミド反応により中心コア11bのシステイン残基に結合される。この例において、カップリングアーム60の遊離末端にある官能基は、テトラジン基72である。本開示の実施形態によれば、カップリングアームは、2-12個のEGの繰り返し単位を有するPEG鎖である。

40

【0151】

標的部位にあるエフェクター成分の放出を必要となる場合に、リンクアームに切断可能な結合を導入することができる。このような結合は、酸/アルカリ加水分解、還元/酸化、又は酵素によって切断される。カップリングアームの形成に適用される切断可能なPEG鎖の

50

一実施形態は、NHS-PEG₂₋₂₀-S-S-マレイミドであり、ここで、S-Sはゆっくりと還元され得るジスルフィド結合であり、NHS基は中心コアのアミン基と結合することにより、PEG鎖が中心コアに結合される。リンクアームの遊離末端にあるマレイミド基は、アジド基、アルキン基、テトラジン基、又は歪んだアルキン基で置換されてもよい。

【0152】

本開示の実施形態によれば、中心コアのK残基に結合されるリンクアームは、その遊離末端に官能基(即ち、マレイミド、NHS、アジド、アルキン、テトラジン、又は歪んだアルキン基)を有する。好ましくは、リンクアームの遊離末端がアジド、アルキン基又はシクロオクチン基である場合に、中心コアのN末端又はC末端にあるアミノ酸残基は、システイン残基であり、カップリングアームの遊離末端は、テトラジン又はシクロオクテン基である。或いは、リンクアームの遊離末端は、テトラジン基又はシクロオクテン基である場合に、中心コアのN末端又はC末端にあるアミノ酸残基は、アジド基若しくはアルキン基を有し、又は中心コアのN末端又はC末端にあるアミノ酸残基は、システイン残基であり、カップリングアームの遊離末端は、アジド基、アルキン基、又はシクロオクチン基である。

10

【0153】

本発明の好ましいリンクアームは PEGであるが、適用可能なリンクアーム及びカップリングアームは、PEG鎖に限られない。グリシン、セリン及び他のアミノ酸親水性残基を含むペプチド、及び多糖類、並びに、NHS及びマレイミド基を含むように修飾された他の生体適合性線状ポリマーを使用することができる。

【0154】

リンクアームの長さはいくつかの考慮事項にとって重要である。リンクアームの長さは、可撓性がある結合scFv又は他の種類の機能成分が、立体的制約なしに標的細胞表面上の標的抗原部位に到達することを可能にするのに十分な長さであって、リンクアーム及びそれらのscFv断片若しくは機能成分の分子内及び分子間の絡み合いを引き起こすに至らない長さ、又は組織浸透を防げるために分子構築物全体のサイズを不必要に増加させるに至らない長さである。リンクアームが長すぎると、圧縮されたクラスタがアポトーシス又は他の細胞効果のための信号伝達プロセスを開始するために必要とされる場合に、抗原分子を引っ張って圧縮されたクラスタを形成することができない。標的抗原とその結合剤との異なる種類の組み合わせに対するリンクアームの最適長さは、過度の実験をすることなく当業者によって決定され得る。本発明のいくつかの分子構築物においては、NHS-(PEG)₁₂-マレイミド(約500ダルトン)のリンクアームが好ましい。完全に伸張した(PEG)₁₂の長さは40-50オングストロームである。

20

30

【0155】

リンクアームの遊離末端にある官能基(即ち、マレイミド、NHS、アジド、アルキン、テトラジン又は歪んだアルキン基)によって、対応する官能基を有する機能成分(例えば、標的化成分、エフェクター成分、又は薬物動態学的特性を改善させる成分)を設計することにより、機能成分は、以下のいずれかの化学反応によりリンクアームの遊離末端に結合され得る。

【0156】

(1)アミド結合の形成:この場合に、リンクアームは、その遊離末端にNHS基を有し、機能成分は、アミン基を有する。

40

【0157】

(2)チオール-マレイミド反応:この場合に、リンクアームは、その遊離末端にマレイミド基を有し、機能成分は、チオール基を有する。

【0158】

(3)銅(I)触媒型アルキン-アジド環化付加反応(CuAAC反応、又は「クリック」反応と略称する):リンクアームの遊離末端と機能成分のうちの1つは、アジド基を有し、もう1つは、アルキン基を有する。CuAAC反応をスキーム1に示す。

【0159】

(4)逆電子要請型ディールス・アルダー(iEDDA)反応:リンクアームの遊離末端と機能成分

50

のうちの1つは、テトラジン基を有し、もう1つは、シクロオクテン基を有する。iEDDA反応をスキーム2に示す。

【0160】

(5)歪み促進型アジド-アルキンクリックケミストリー(SPAAC)反応:リンクアームの遊離末端と機能成分のうちの1つは、アジド基を有し、もう1つは、シクロオクチン基を有する。SPAAC反応をスキーム3に示す。

【0161】

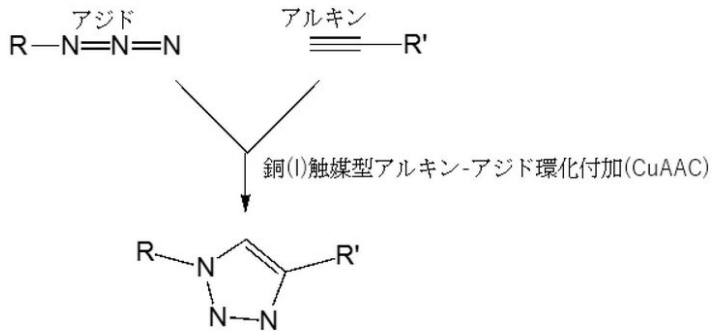
CuAAC反応により、1,5-二置換-1,2,3-トリアゾールが得られる。アルキンとアジドとの間の反応は、非常に選択的であり、天然の生体分子の中にアルキン基及びアジド基は存在しない。さらに、この反応は迅速かつpH非感受性である。クリック反応を触媒するために、臭化第一銅又はヨウ化第一銅のような銅(I)を使用する代わりに、銅(II)と、還元剤、例えば、アスコルビン酸ナトリウムとの混合物を使用して、反応混合物中のその場で銅(I)を生成することがより好ましい。或いは、第2成分は、銅フリー反応により、本発明の中心コアのN末端又はC末端に結合され得る。この銅フリー反応において、ペンタメチルシクロペンタジエニルルテニウムクロライド錯体を触媒として使用して、アジド-アルキンクリックケミストリーを触媒する。

10

【0162】

<<スキーム 1 CuAAC反応>>

【0163】

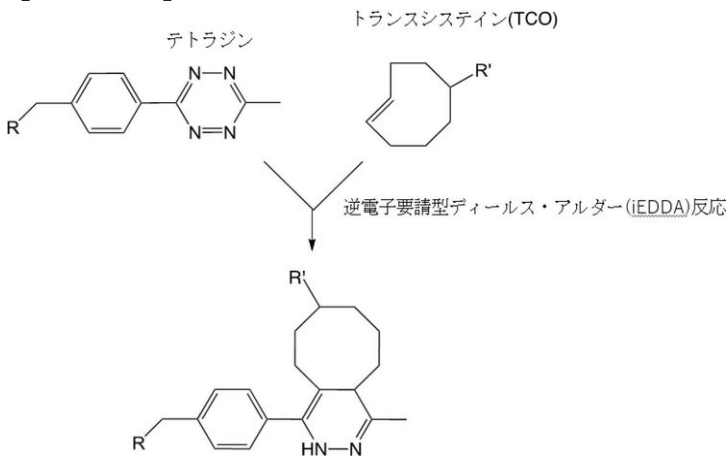


20

【0164】

<<スキーム 2 iEDDA反応>>

【0165】



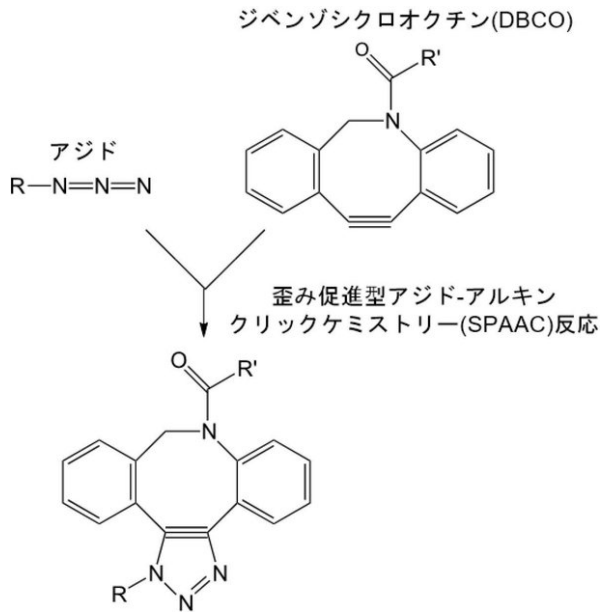
30

40

【0166】

<<スキーム 3 SPAAC反応>>

【0167】



10

【0168】

説明の便宜上、リンカーアームに結合される機能成分を第1成分と呼ぶ。理解され得るように、本発明のリンカーユニットが有する第1成分の数は、中心コアのK残基の数(そのため、リンカーアームの数)により決定される。従って、当業者であれば、必要に応じて、例えば、所望の標的化又は治療効果を達成するために、リンカーユニットの第1成分の数を調整することができる。

20

【0169】

第1成分を有するリンカーユニット10Cの例を図1Cに示す。後述の特徴以外、図1Cは図1Bと同様である。第一に、中心コア11dに5つのK残基があり、5つのリンカーアーム20a-20eがそれぞれそれらのK残基に結合される。第二に、リンカーユニット10Cは各リンカーアーム20a-20eに結合される5つの第1成分30a-30eを有する。以下に述べるように、必要に応じて使用されるテトラジン基72は、追加の機能成分、別の分子構築物(以下のパートII又はパートIIIを参照)との結合を可能にする。

【0170】

所望の効果(例えば、治療効果)を向上させるために、本発明のリンカーユニットは、上記第1成分に加えて、第2成分をさらに含み得る。例えば、第2成分は、標的化成分又はエフェクター成分であり得る。本開示の任意の実施形態において、第1成分は、エフェクター成分であり、第2成分は、第1成分と相加的若しくは相乗的、又は第1成分と独立して作用する別のエフェクター成分であり得る。必要に応じて、第1成分及び第2成分は、異なる特性を示す。例えば、第1成分は、標的化成分であり、第2成分は、エフェクター成分であり、その逆もまた然りである。或いは、第1成分は、エフェクター成分であり、第2成分は、リンカーユニットの溶解性、クリアランス、半減期、及び生物学的利用能等の薬物動態学的特性を改善させる成分である。特定の第1成分及び/又は第2成分の選択は、本発明のリンカーユニット(又はマルチアームリンカー)が使用される予定の用途に依存する。これらの機能成分の例は、本明細書のパートI(iii)で後述する。

30

40

【0171】

構造上、第2成分は、中心コアのN末端又はC末端にあるアジド基、アルキン基、テトラジン基若しくは歪んだアルキン基に結合される。具体的には、必要に応じて、第2成分を短いPEG鎖(好ましくは、2-12個のEGの繰り返し単位を有する)に結合した後、アジド基若しくはアルキン基を有するN末端又はC末端アミノ酸残基(例えば、AHA残基又はHPG残基)に結合してもよい。或いは、必要に応じて、第2成分を短いPEG鎖に結合した後、中心コアのカップリングアームに結合してもよい。

【0172】

本開示のいくつかの実施形態によれば、中心コアは、そのN末端又はC末端に、アジド基(

50

例えば、AHA残基)を有するアミノ酸残基を含む。従って、アルキン基を有する第2成分は、CuAAC反応により中心コアのN末端又はC末端に結合される。本開示の他の実施形態によれば、中心コアは、そのN末端又はC末端に、アルキン基(例えば、HPG残基)を有するアミノ酸残基を含む。それにより、アジド基を有する第2成分は、CuAAC反応により中心コアのN末端又はC末端に結合可能となる。

【0173】

図1Dは、複数の第1成分及び1つの第2成分を有する本発明のリンカーユニット10Dの例を示す。この例において、中心コア11cは、1つのHPG(G^{HP})残基及び5つのリジン(K)残基を含む。5つのリンクアーム20a-20eは、それぞれ中心コア11cの5つのK残基に結合される。5つの第1成分30a-30eは、それぞれチオール-マレイミド反応により上記5つのリンクアーム20a-20eに結合される。上記第1成分に加えて、リンカーユニット10Dは、短いPEG鎖62の1つの末端に結合される1つの第2成分50をさらに含む。中心コア11cとの結合前に、短いPEG鎖62のもう1つの末端にアジド基を有する。このように、アジド基は、CuAAC反応により、アルキン基を有するHPG残基と反応できることにより、第2成分50は、中心コア11cに結合される。図1Dにおけるソリッドドット40は、HPG残基とアジド基との間で起きるCuAAC反応から生じる化学結合を表す。

10

【0174】

或いは、第2成分は、カップリングアームを介して中心コアに結合される。本開示の特定の実施形態によれば、カップリングアームは、iEDDA反応によりTCO基を有する第2成分に効率的に結合可能なテトラジン基を有する。本開示の他の実施形態によれば、カップリングアームは、iEDDA反応によりテトラジン基を有する第2成分に結合可能なTCO基を有する。iEDDA反応において、末端アルキン基よりも、活性化エネルギーが顕著に低い歪んだシクロオクテン基を採用するため、外因性触媒を使用する必要がない。

20

【0175】

図1Eに示すように、リンカーユニット10Eの中心コア11dは、末端システイン(C)残基及び5つのリジン(K)残基を含む。また、図1Eに示すように、5つのリンクアーム20a-20eは、それぞれ中心コア11dの5つのK残基に結合され、且つ、5つの第1成分30a-30eは、それぞれチオール-マレイミド反応により5つのリンクアーム20a-20eに結合される。システイン残基は、カップリングアーム60に結合される。該システイン残基は、第2成分と結合する前に、その遊離末端にテトラジン基又はTCO基を有する。この例において、対応するTCO基又はテトラジン基を有する短いPEG鎖62に結合される第2成分50は、iEDDA反応によりカップリングアーム60に結合され得る。図1Eにおける楕円70は、カップリングアーム60と短いPEG鎖62との間で起きるiEDDA反応から生じる化学結合を表す。

30

【0176】

本開示の他の実施形態によれば、第2成分と結合する前に、カップリングアームは、アジド基を有する。そのように、カップリングアームは、SPAAC反応(スキーム3を参照)により、短いPEG鎖の遊離末端に歪んだアルキン基(例えば、DBCO、DIFO、BCN、又はDICO基)を有する第2成分に結合されることができ、その逆もまた然りである。

【0177】

図1Fにおいて、リンカーユニット10Fは、カップリングアーム60が、テトラジン基又はTCO基の代わりに、アジド基又は歪んだアルキン基(例えば、DBCO基、DIFO基、BCN基、又はDICO基)を有する以外、図1Eのリンカーユニット10Eと類似する構造を有する。従って、短いPEG鎖62に結合される第2成分50は、対応する歪んだアルキン基(例えば、DBCO基、DIFO基、BCN基、又はDICO基)又はアジド基を有することで、SPAAC反応によりカップリングアーム60に結合することができる。図1Fにおけるダイヤモンド90は、カップリングアーム60と短いPEG鎖62との間で起きるSPAAC反応から生じる化学結合を表す。

40

【0178】

スキーム4は、本発明のリンカーユニットの調製プロセスの例示である。ステップ1において、中心コアを調製する。該中心コアは、 $(GSK)_3$ のアミノ酸配列を含み、且つ中心コアのC末端にL-アジドホモアラニン(AHA)残基を有する。ステップ2において、NHS基とアミン基

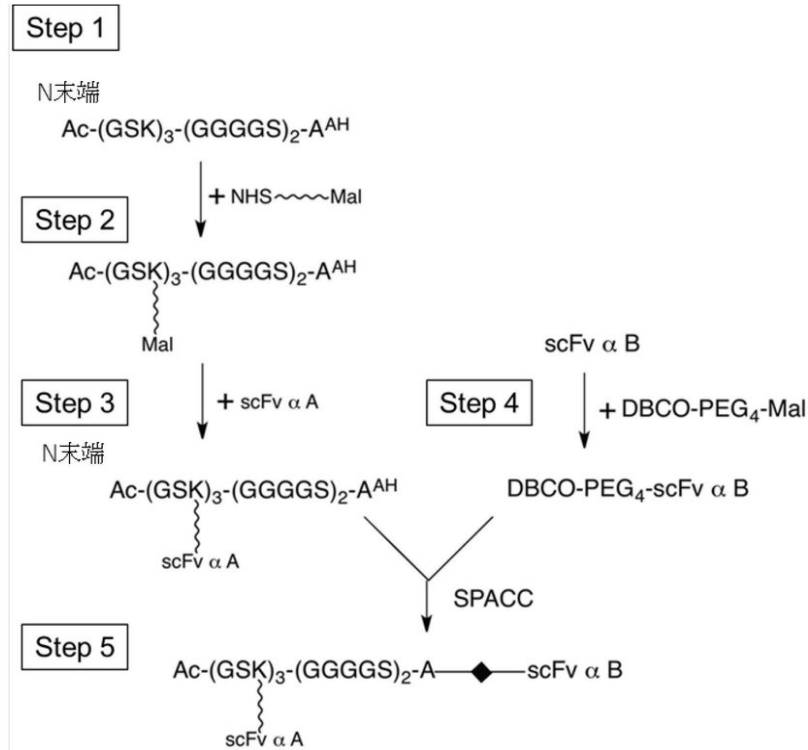
50

との間にアミド結合を形成することにより、3つのリンクアームをそれぞれ中心コアのリジン(K)残基に結合する。中心コアに結合されるリンクアームは、その遊離末端にマレイミド(Mal)基を有する。ステップ3において、チオール-マレイミド反応により、3つの抗A抗原scFv(scFv A)を第1成分として、それぞれリンクアームに結合する。ステップ4において、1つの抗B抗原scFv(scFv B)を第2成分として短いPEG鎖に結合する。該短いPEG鎖は、4つのEGの繰り返し単位を含み、且つその遊離末端にDBCO基を有する。最後に、ステップ5において、SPAAC反応により第2成分を中心コアのAHA残基に結合する。

【0179】

<<スキーム4 リンクアーム及びC末端アミノ酸残基を介して2つの異なるscFvを結合するリンカーユニットの調製>>

【0180】



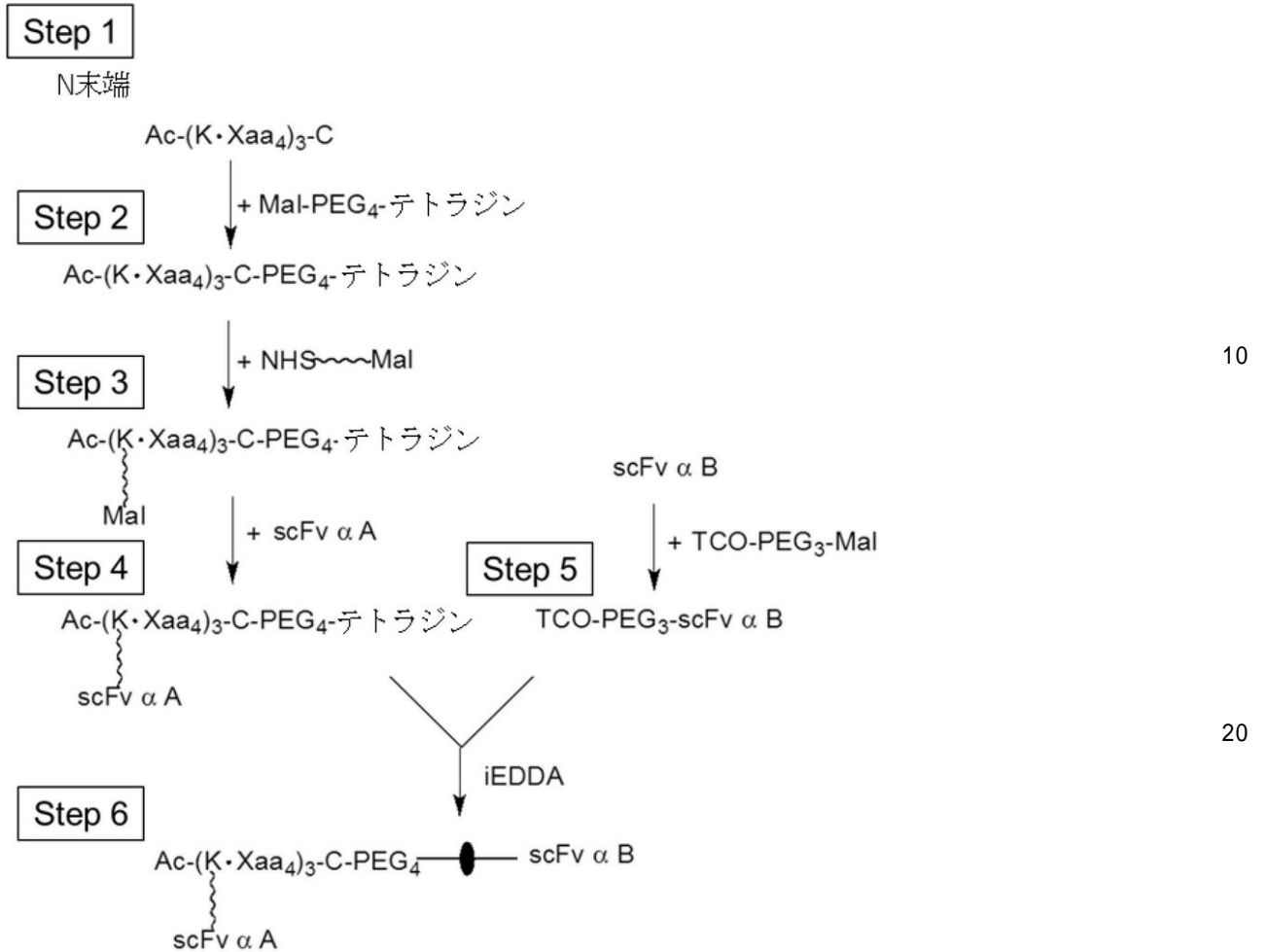
【0181】

スキーム5は、本発明のリンカーユニットの調製プロセスの別の例を例示する。ステップ1において、中心コアを調製する。該中心コアは、(K-Xaa)₃のアミノ酸配列を含み、且つ中心コアのC末端にシステイン残基を有する。ステップ2において、チオール-マレイミド反応によりPEG鎖を(カップリングアームとして)システイン残基に結合する。該PEG鎖は、その1つの末端にマレイミド(Mal)基を有し、もう1つの末端にテトラジン基を有する。ステップ3において、3つのリンクアームをそれぞれ中心コアのリジン(K)残基に結合する。さらに、ステップ4で説明したように、チオール-マレイミド反応により、3つの抗A抗原scFv(scFv A)を第1成分としてそれぞれリンクアームに結合する。ステップ5において、1つの抗B抗原scFv(scFv B)を第2成分として短いPEG鎖に結合する。該短いPEG鎖は、3つのEGの繰り返し単位を含み、且つPEG鎖の遊離末端にTCO基を有する。最後に、ステップ6において、iEDDA反応により第2成分をカップリングアームに結合する。

【0182】

<<スキーム5 リンクアーム及びカップリングアームを介して2つの異なるscFvを結合するリンカーユニットの調製>>

【0183】



【 0 1 8 4 】

PEG化は、PEG鎖を分子（例えば、薬物又はタンパク質）に結合又は連結するプロセスである。PEG化は、未修飾形態よりもいくつかの有意な薬理的利点、例えば、溶解性の改善、安定性の向上、循環寿命の延長、及びタンパク質分解の減少を与えることが知られている。本開示の一実施形態によれば、第2成分は、分子量が約20,000～50,000ダルトンのPEG鎖である。

【 0 1 8 5 】

図1Gは、本発明のリンカーユニット(リンカーユニット10G)の別の例を示す。ここで、5つの第1成分30は、それぞれリンクアーム20を介してリジン残基に結合される。中心コア11eのHPG(A^{HP})残基は、CuAAC反応によりPEG鎖80に結合される。図1Gにおけるソリッドドット40は、HPG残基とPEG鎖80との間で起きるCuAAC反応から生じる化学結合を表す。

【 0 1 8 6 】

図1Hは、本開示の別の例を提供する。ここで、中心コア11dのN末端は、カップリングアーム60に結合されるシステイン残基である。iEDDA反応により、PEG鎖80をカップリングアーム60に効率的に結合することができる。リンカーユニット10Hの楕円70は、カップリングアーム60とPEG鎖80との間で起きるiEDDA反応から生じる化学結合を表す。

【 0 1 8 7 】

図1Iは、本発明のリンカーユニットの別の例を提供する。ここで、リンカーユニット10Iは、PEG鎖80がSPAAC反応によりカップリングアーム60に結合される以外、図1Gのリンカーユニット10Gと類似する構造を有する。図1Iにおけるダイヤモンド90は、カップリングアーム60とPEG鎖80との間で起きるSPAAC反応から生じる化学結合を表す。

【 0 1 8 8 】

本開示のいくつかの実施形態によれば、第1成分及び第2成分に加えて、本発明のリンカーユニットは、第3成分をさらに含む。この場合に、中心コアのN末端及びC末端のうちの一

10

20

30

40

50

方は、アジド基又はアルキン基を有するアミノ酸であり、中心コアのN末端及びC末端のうちの他方は、システイン残基である。中心コアのリジン残基は、それぞれリンクアームに結合される。各リンクアームは、その遊離末端にマレイミド基を有する。中心コアのシステイン残基は、カップリングアームに結合される。該カップリングアームは、その遊離末端にテトラジン基又は歪んだアルキン基を有する。それにより、上述したように、第1成分は、チオール-マレイミド反応によりリンクアームに結合され、第2成分は、iEDDA反応によりカップリングアームに結合される。さらに、第3成分は、CuAAC反応又はSPAAC反応によりアジド基又はアルキン基を有する末端アミノ酸に結合される。

【0189】

図1Jのリンカーユニット10Jにおいて、中心コア11fは、そのN末端にHPG(G^{HP})残基を有し、そのC末端にシステイン残基を有する。リンクアーム20及びカップリングアーム60は、それぞれ中心コア11fのリジン(K)残基及びシステイン(C)残基に結合される。さらに、5つの第1成分30は、それぞれ5つのリンクアーム20に結合され、第2成分(即ち、PEG鎖)80は、カップリングアーム60に結合され、第3成分50は、短いPEG鎖62を介してHPG残基に結合される。ソリッドドット40は、HPG残基と短いPEG鎖62との間で起きるCuAAC反応から生じる化学結合を表す。楕円70は、カップリングアーム60とPEG鎖80との間で起きるiEDDA反応から生じる化学結合を表す。

【0190】

図1Kは、本開示の別の実施形態を提供する。ここで、リンカーユニット10Kは、iEDDA反応の代わりに、SPAAC反応により短いPEG鎖62がHPG残基に結合される以外、図1Jのリンカーユニット10Jと類似する構造を有する。図1Kにおけるダイヤモンド90は、短いPEG鎖62とHPG残基との間で起きるSPAAC反応から生じる化学結合を表す。

【0191】

本開示の好ましい実施形態において、リンクアームは、チオール-マレイミド反応によりスルフヒドリル基を有する第1成分に結合するために、遊離末端にマレイミド基を有する。また、第2成分に結合するために、ペプチドコアの1つの末端にシステイン残基、又はアジド基若しくはアルキン基を有するアミノ酸残基があることで、カップリングアームに結合される。

【0192】

当業者であれば、上述した構造について様々な変更を施すことができる。リンクアームの遊離末端に、マレイミド基以外の連結基、例えば、アジド基、アルキン基、テトラジン基、又は歪んだアルキン基を使用することにより、CuAAC、iEDDA、又はSPAAC反応により第1成分と結合することができる。また、ペプチドコアのシステイン残基(又は、アジド基若しくはアルキン基を有するアミノ酸残基)をN末端又はC末端に位置させる必要がない。さらに、2つ以上の上記残基をペプチドコアに導入することにより、複数のカップリングアームを結合することができ、それにより、複数の第2成分と結合する。

【0193】

リンカーユニット(又はマルチアームリンカー)が第2及び/又は第3成分を含まず、第1成分のみを含む場合に、第1成分は、被験体において治療効果を発揮できるエフェクター成分である。一方、本発明のリンカーユニットは、第1成分に加えて別の成分を含む場合に、少なくとも1つの該成分は、エフェクター成分であり、他の成分は、別のエフェクター成分、標的化成分、又はリンカーユニットの1つ以上の薬物動態特性(例えば、溶解性、クリアランス、半減期、及び生物学的利用能)を向上できる成分であり得る。例えば、リンカーユニットは、2つの異なる種類のエフェクター成分;1つのエフェクター成分及び1つの標的化成分又は1つの薬物動態特性向上成分;2つの異なる種類の標的化成分及び1種類のエフェクター成分;2つの異なる種類のエフェクター成分及び1種類の標的化成分;又は1種類の標的化成分、1種類のエフェクター成分、及び1種類のリンカーユニットの薬物動態特性を改善できる成分を含み得る。

【0194】

本開示のいくつかの実施形態によれば、標的化成分は、レシピエントの細胞ではなく、ド

10

20

30

40

50

ナー移植物の細胞のみに存在するヒト白血球抗原(HLA)アロタイプのみの特異的な抗体断片である。

【0195】

また、本開示の実施形態に係るエフェクター成分は、免疫抑制剤、免疫チェックポイントタンパク質、又はCD25に特異的な抗体断片である。免疫抑制剤の例示的な例は、ラパマイシンの哺乳動物標的(mTOR)の阻害剤、例えば、シロリムス及びエベロリムスである。他のセットの免疫抑制剤は、カルシニューリンの阻害剤、例えば、タクロリムスである。免疫チェックポイントタンパク質は、免疫チェックポイントに関与するものであり、例えば、細胞傷害性Tリンパ球関連タンパク質4(CTLA-4;CD151としても知られているもの)の細胞外ドメイン及びプログラム細胞死リガンド1(PD-L1;CD274としても知られているもの)の細胞外ドメインである。

10

【0196】

本開示は、適切なマルチアームリンカーを用いてドナー移植物(組織又は細胞)を受けている被験体の移植拒絶を治療する方法にも関する。一般的に、該方法は、治療を必要とする被験体に有効量の本開示の実施形態に係るマルチアームリンカーを投与するステップを含む。

【0197】

従来の治療用構築物と比較して、パートIで説明した本発明のマルチアームリンカー(又はリンカーユニット)は、2点で有利である。

【0198】

(1)機能成分の数は、必要又は用途に応じて調整することができる。本発明のリンカーユニットは、適用要件(例えば、治療される疾患、本発明のリンカーユニットの投与経路、本発明のリンカーユニットが有する抗体の結合活性及び/又は親和性)に応じて、2つの成分(即ち、第1成分及び第2成分)又は3つの成分(即ち、第1成分、第2成分、及び第3成分)を含むことができる。例えば、本発明のリンカーユニットを組織/器官(例えば、目の治療)に直接送達する場合に、化標的成分としての第2成分を必要とせず、エフェクター成分だけで十分である。しかし、本発明のリンカーユニットを周皮的に(例えば、経口、経腸、鼻、局所、経粘膜、筋肉内、静脈内、又は腹腔内注射)送達する場合に、本発明のリンカーユニットは、本発明のリンカーユニットを病変部位に標的化する標的化成分、及び病変部位で治療効果を発揮するエフェクター成分を同時に含む必要がある。本発明のリンカーユニットの標的化効果若しくは治療効果、又は安定性を向上させるために、本発明のリンカーユニットに、第3成分(例えば、第2標的化成分、第2エフェクター成分、又はPEG鎖)をさらに含むことができる。

20

30

【0199】

(2)第1成分は、バンドルの形で提供される。上述したように、第1成分の数は、中心コアに含まれるリジン残基の数によって変化する。中心コアにおけるリジン残基の数が2~15である場合に、各リンカーユニットに少なくとも2つの第1成分を含み得る。このように、従来の治療用構築物又は方法のように単一分子(例えば、免疫抑制薬及び抗体)を提供する代わりに、本発明のリンカーユニットは、一度により多くの機能成分(標的化成分又はエフェクター成分)を提供することができ、それによって、治療効果が大きく改善される。

40

【0200】

特定の治療用途において、シングルコピーの標的化成分又はエフェクター成分を有することが望ましい。例えば、シングルコピーの標的化成分は、過度に緊密な結合による望ましくない影響を避けるために使用することができる。この考察は、scFvが標的抗原に対して比較的高い親和性を有する場合、及び標的抗原が標的細胞ではない正常細胞上の細胞表面抗原である場合に関連する。別の例では、薬物動態特性を高めるために長鎖PEGをシングルコピーだけ有することが望ましい。2つ以上の長いPEG鎖は、もつれを引き起こし、標的化成分又はエフェクター成分の結合特性に影響を与える恐れがある。

【0201】

パートII移植拒絶を治療するためのFcに基づく分子構築物及びその使用

50

【0202】

Fcに基づく構成の広い意味では、免疫グロブリン抗体を、標的化成分又はエフェクター成分の基礎として使用し、その2つの重鎖のC末端にその対応するエフェクター又は標的化成分をscFvドメインの形態で導入することができる。典型的な「Fcに基づく」構成の場合、二本鎖IgG.Fcを分子プラットフォームの基礎を使用することができる。ポリペプチド鎖の各々は、各鎖に合計2~3個の成分を有するように、1つ又は2つの標的成分及び1つ又は2つのエフェクター成分と融合することができる。Fcに基づく構成を有するT-E分子は、合計4~6個の成分(例えば、scFv、タンパク質又は薬物バンドル)を有する。必要に応じて、分子構築物のFc部分も、Fc媒介エフェクター機能、ADCC及び/又は補体媒介活性化機能を有する。特定の他の用途では、そのFc媒介エフェクター機能が望ましくない。

10

【0203】

本発明のFcに基づく分子構築物のT-E成分を選択することにより、分子構築物は、移植拒絶に関連する病状の防止及び/又は治療に適用され得る。本開示は、以下の点にも有利である。即ち、いくつかの実施形態において、本開示のリンカーユニットを利用し、本発明のFcに基づく分子構築物の標的化成分及びエフェクター成分の数を制御するための容易な手段を提供する。選択される標的化及び/又はエフェクター成分に応じて、本発明のFcに基づく分子構築物は、以下にそれぞれ説明する異なる構成であり得る。

【0204】

本発明の多くの分子構築物において、好ましい標的化成分又はエフェクター成分は、Fab、Fv、一本鎖Fv(scFv)、単ドメイン抗体(sdAb)、又は抗体の他の抗原結合断片である。本発明の好ましい実施形態によれば、scFvである場合に、(GGGGS)₂₋₅配列を有するポリペプチドリンカーがV_LとV_Hとの間、又はV_HとV_Lとの間に配置される。剛性の二次構造がない他の可撓性の配列は、例えば、いくつかのヒト免疫グロブリンアイソタイプのCH1ドメインとCH2ドメインとの間、及びCH2ドメインとCH3ドメインとの間の連結配列も使用されてもよい。任意のいくつかの実施形態において、(GGGGS)₁₋₃のポリペプチドリンカー及び末端システイン残基は、scFv若しくは他の抗体断片、又は治療用ペプチドのC-末端に配置される。スルフヒドリル基は、リンカーユニットから伸びるリンクアームの末端にあるマレイミド基と結合するためのものである。

20

【0205】

第1のシリーズのFcに基づく分子構築物において、標的化成分は、HLA アロタイプに特異的な抗体(又はその断片)、エフェクター成分は、CD25に特異的な抗体(又は抗体断片)であり得る。このFcに基づく分子構築物のいくつかの例示的な構造は、後述する。

30

【0206】

図2Aは、本開示の特定の実施形態に係るFcに基づく分子構築物800Aを説明する模式図である。図2Aに示すように、Fcに基づく分子構築物800Aは、同一のCH2-CH3鎖810、CH2-CH3鎖810のN末端に結合される1対のエフェクター成分E1(例えば、CD25に特異的なscFv)、及びCH2-CH3鎖810のC末端に結合される1対の標的化成分T1(例えば、CD25に特異的なscFv)を含む。

【0207】

図2Bに示すFcに基づく分子構築物800Bは、2つのエフェクター成分E1がそれぞれCH2-CH3鎖810のC末端に結合され、2つの標的化成分T1がそれぞれCH2-CH3鎖810のN末端に結合される以外、図2AのFcに基づく分子構築物800Aの構造と非常に類似する。

40

【0208】

特定の実施形態によれば、エフェクター成分及び標的化成分は、両方ともCH2-CH3鎖のN末端に結合される。例えば、エフェクター成分及び標的化成分が両方とも一本鎖可変領域断片(scFv)の形態である場合に、エフェクター成分及び標的化成分をタンデム又はダイアボディ構造で結合して、CH2-CH3鎖のN末端に結合される二重特異性scFvを形成することができる。Fcに基づく分子構築物800C(図2C)がFc部分を含むため、各CH2-CH3鎖810は、そのN末端にT1-E1二重特異性scFvを有する。

【0209】

50

いくつかの例において、1対のエフェクター成分又は1対の標的化成分は、Fab構造(即ち、 V_H -CH1ドメイン及び V_L -Cドメインからなる)を採用する。このFab断片は、CH2-CH3鎖のN末端に結合されることにより、Fcに基づく分子構築物はIgG構造となる。この場合に、Fab構造でない1対の成分は、1対のCH2-CH3セグメントのC末端に結合され得る。例えば、図3のFcに基づく分子構築物800Dにおいて、2つの標的化成分T1の各々は、 V_H -CH1ドメイン820及び V_L -Cドメイン825を含むため、CH2-CH3鎖810のN末端に結合されるFab構造830を形成する。それにより、Fcに基づく分子構築物800Dは、IgG構造となる。この場合に、1対のエフェクター成分E1は、1対のCH2-CH3鎖810のC末端に結合される。

【0210】

上述したように、本発明のFcに基づく分子構築物は、多くとも合計6つの成分を有することができる。別の成分は、第2の1対のエフェクター成分又は第2の1対の標的化成分であり得る。

10

【0211】

第2のシリーズのFcに基づく分子構築物において、標的化成分は、抗体又はその断片(例えば、HLAアロタイプに特異的なscFv)であり、エフェクター成分は、タンパク質又はペプチド(例えば、免疫チェックポイントタンパク質又はその断片)である。

【0212】

図4Aは、1対のCH2-CH3セグメント1210のN末端に結合される1対の標的化成分T1(scFv)、及び1対のCH2-CH3セグメント1210のC末端に結合される1対のエフェクター成分E1(治療用ペプチドの形態)を含むFcに基づく分子構築物1200Aを示す模式図である。或いは、図4BのFcに基づく分子構築物1200Bにおいて、1対の標的化成分T1(scFv)は、1対のCH2-CH3セグメント1210のC末端に結合され、1対のエフェクター成分E1(治療用ペプチドの形態)は、1対のCH2-CH3セグメント1210のC末端に結合される。

20

【0213】

いくつかの例において、1対の標的化成分は、Fab構造(即ち、 V_H -CH1ドメイン及び V_L -Cドメインを含む)を取る。このFab断片は、CH2-CH3鎖のN末端に結合されることにより、Fcに基づく分子構築物は、IgG構造を採用する。この場合に、1対のエフェクター成分は、1対のCH2-CH3セグメントのC末端に結合され得る。

【0214】

例えば、図8CのFcに基づく分子構築物1200Cにおいて、2つの標的化成分T1のそれぞれは、 V_H -CH1ドメイン820及び V_L -Cドメイン825を含んで、CH2-CH3鎖810のN末端に結合されるFab構造830を形成することにより、Fcに基づく分子構築物1200Cは、IgG構造を採用する。この場合に、1対のエフェクター成分E1(治療用ペプチド)は、1対のCH2-CH3鎖810のC末端に結合される。

30

【0215】

第3のシリーズのFcに基づく分子構築物において、標的化成分は、抗体又はその断片、エフェクター成分は、複数の免疫抑制剤分子を含む薬物バンドルであり得る。

【0216】

これらの場合に、疾患細胞を治療するためのFcに基づく分子構築物は、図5Aの分子構築物1000A又は図5Bの分子構築物1000Bの構造を有し得る。図5Aに示すように、エフェクター成分E1(例えば、薬物バンドル)は、1対のCH2-CH3セグメント1010のC末端に結合され、標的化成分T1(この場合、scFv)は、1対のCH2-CH3セグメント1010のN末端に結合される。代替的な実施形態によれば、分子構築物1000B(図5B)は、Fab1030の形態を有する1対の標的化成分T1を含む。具体的には、Fab1030構造は、 V_H -CH1ドメイン1020及び V_L -Cドメイン1025を含み、1対のCH2-CH3セグメント1010のN末端に結合されることにより、Fcに基づく分子構築物1000Aは、IgG構造を採用する。この場合に、1対のエフェクター成分E1は、1対のCH2-CH3鎖1010のC末端に結合される。

40

【0217】

理解されるように、薬物バンドル(即ち、エフェクター成分E1)は、本開示で論じられるリンカーユニットとして提供され得る(例えば、図1A~図1C)。本開示の原理及び精神によれ

50

ば、標的構築物(1対のCH₂-CH₃セグメント1010及び標的化成分T1を含む)及び薬物バンドル(エフェクター成分E1として用いられる)は、別々に調製され、さらに互いに結合されることができる。

【0218】

本開示の実施形態によるいずれのシリーズにおいても、CH₂-CH₃鎖は、ヒト免疫グロブリン 1又は 4から採用される。一般的に、 1は、抗体依存性細胞毒性(ADCC)及び補体媒介活性(炎症性活性化又は標的細胞溶解)等のFc媒介性機能が望ましい場合に選択される。Fc媒介性機能が望ましくない場合に、 4は、本発明のFcに基づく分子構築物を構築するために選択される。

【0219】

本開示の実施形態によれば、薬物バンドルは、中心コア、複数のリンクアーム、及び必要に応じてカップリングアームを含む。本開示の様々な実施形態によれば、中心コアは、複数のリジン(K)残基を含むポリペプチドであり得る。各リンクアームは、ポリペプチドコアのK残基のアミン側鎖との反応により中心コアに結合される1つの末端を有する。リンクアームは、その遊離末端にマレイミド基も有する。各薬物分子は、マレイミド基との反応によりリンクアームを介して中心コアに結合される。本開示の任意の実施形態によれば、各エフェクター成分E1は、3-5個の免疫抑制剤分子を有する薬物バンドルである。

【0220】

中心コアがポリペプチドコアである場合に、中心コアのN末端又はC末端にあるアミノ酸残基は、システイン残基であり、又はアジド基若しくはアルキン基を有する。特定の実施形態によれば、末端アミノ酸残基を有するポリペプチドコアがアジド基を有するため、薬物バンドルは、末端残基と延長ペプチドのC末端との間で起きるSPAAC反応又はCuAAC反応により延長ペプチドに結合される。或いは、ポリペプチドコアがアルキン基を有する末端アミノ酸残基を有する場合に、薬物バンドルは、末端残基と延長ペプチドのC末端との間で起きるCuAAC反応により延長ペプチドに結合される。或いは、システイン基である末端残基を有するポリペプチドコアの場合に、薬物バンドルは、上記カップリングアームをさらに含む。具体的には、カップリングアームは、ポリペプチドコアのシステイン残基との反応により中心コアに結合される1つの末端を有する。カップリングアームは、その遊離末端にアルキン基、アジド基、テトラジン基、又は歪んだアルキン基を含むことにより、薬物バンドルは、延長ペプチドのC末端に、それらの間で起きるiEDDA反応(テトラジン基又はシクロオクテン基を有するカップリングアーム)、SPAAC(アジド基又はシクロオクテン基を有するカップリングアーム)反応、又はCuAAC反応(アルキン基又はアジド基を有するカップリングアーム)により結合される。

【0221】

特定の実施形態によれば、疾患細胞を治療するための本発明のFcに基づく分子構築物は、それぞれ(G₂₋₄S)₂₋₈C配列を有する1対の延長ペプチド1050(図10A及び10Bを参照)をさらに含む。図示のように、1対の延長ペプチド1050は、1対のCH₂-CH₃セグメント1010のC末端に結合される。延長ペプチドのC末端にあるシステイン残基は、カップリングアーム1055に、それらの間で起きるチオール-マレイミド反応により結合される。エフェクター成分E1(この場合に、薬物バンドル)に結合される前に、結合アームの遊離末端(即ち、システイン残基に結合されていない末端)がアルキン基、アジド基、歪んだアルキン基、又はテトラジン基で修飾されることにより、薬物バンドルは、該遊離末端に、それらの間で起きるiEDDA反応(図5A)、SPAAC(図5B)又はCUAAC反応(図示せず)により結合される。

【0222】

例えば、図5Aにおいて、エフェクター成分 E1(この場合に、薬物バンドル)のカップリングアーム1040は、iEDDA反応によりCH₂-CH₃セグメント1010に結合される。図5Aに示す橋脚1045は、延長ペプチド1050とエフェクター成分E1との間で起きるiEDDA反応により生じる化学結合を示す。理解され得るように、iEDDA反応は、テトラジン基と、シクロオクテン基、例えば、トランスシクロオクテン(TCO)基との間で起きる。

【0223】

10

20

30

40

50

或いは、図5Bにおいて、エフェクター成分E1は、SPAAC反応によりCH₂-CH₃セグメント1010に結合される。図10Bに示すダイヤモンド1045は、延長ペプチド1050とエフェクター成分E1との間で起きるSPAAC反応により生じる化学結合を示す。具体的には、SPAAC反応は、アジド基と歪んだアルキル基(例えば、ジベンゾシクロオクチン(DBCO)基、ジフルオロシクロオクチン(DIFO)基、ビスクロノニン(BCN)基、及びジベンゾシクロオクチン(DICO)基を含むシクロオクチン基)との間で起きる。

【0224】

第3のシリーズのFcに基づく分子構築物において、標的化成分及びエフェクター成分のうちの一つはペプチドであり得る。

【0225】

理解されるように、Fcに基づく分子構築物のFc領域及び薬物バンドルについての記載は本実施形態にも適用可能であるため、説明を簡潔にするために、その詳細な説明を省略する。

【0226】

本開示の実施形態によれば、標的化成分及びエフェクター成分の数に特に制限されないが、標的の特異性及びエフェクター活性を向上させることができればよい。標的化成分及びエフェクター成分に対するリンカーユニットは、結合前に別々に調製することができる。ADCの調製において、免疫抑制剤のバンドルは、厳しい化学条件に抗体を暴露することなく別々に調製することができる。このアプローチを使用することにより、薬物が抗体分子上に直接結合される場合よりも、薬物対抗体比(DAR)を良好に制御することができる。Fcに基づく分子構築物及び薬物バンドルを採用することにより、様々な標的化//エフェクター医薬分子分子の調製に対応することができる。別の利点は、IgG.Fcが分子構築物に含まれず、補体媒介活性化のような潜在的なFc媒介効果が望ましくない場合、該効果を最小にすることができることである。

【0227】

以上、Fcに基づく分子構築物の基本的な構造的配置を説明した。以下、エフェクター成分及び標的化成分の特定の組合せを説明する。

【0228】

ドナー移植物(例えば、器官、組織又は細胞)を受けている被験体(レシピエント)の移植拒絶に関する疾患/病状を防止及び/又は治療するためのFcに基づく分子構築物の構築において、レシピエントの細胞ではなく、ドナー移植物の細胞のみに存在するHLA アロタイプに特異的な抗体(又はその断片)を標的化成分として使用することができる。

【0229】

移植拒絶を治療するためのエフェクター成分について、免疫チェックポイントタンパク質、CD25に特異的な抗体断片、又は複数の免疫抑制剤分子として含まれる薬物バンドルであり得る。免疫チェックポイントタンパク質は、免疫チェックポイントに関与するものであり、例えば、細胞傷害性Tリンパ球関連タンパク質4(CTLA-4; CD151としても知られているもの)の細胞外ドメイン及びプログラム細胞死リガンド1(PD-L1; CD274としても知られているもの)の細胞外ドメインである。免疫抑制剤の例示的な例は、ラパマイシンの哺乳動物標的(mTOR)の阻害剤、例えば、シロリムス及びエベロリムスである。他のセットの免疫抑制剤は、カルシニューリンの阻害剤、例えば、タクロリムスである。フィンゴリモド及びその誘導体(例えば、フィンゴリモドリン酸塩)も適切な免疫抑制剤の例である。

【0230】

本発明の本質は、標的化成分とエフェクター成分との特定の組合せ又はペアリングの合理化及び概念である。好ましい実施形態において、分子構築物についてFc融合構成を採用する。当業者であれば、他の分子プラットフォームを用いて本発明の1対の標的化成分及びエフェクター成分を結合することを想到できる。上記の分子プラットフォームは、例えば、ペプチド、タンパク質(例えば、アルブミン)、多糖類、ポリエチレングリコール、及び他の種類のポリマーであり、複数の分子成分を結合する構造基礎として機能する。

【0231】

本開示は、ドナー移植体(例えば、器官、組織又は細胞)を受けている被験体(レシピエント)の移植拒絶に関連する疾患/病状の予防及び/又は治療方法にも関する。一般的に、該方法は、この治療を必要とする被験体に有効量の本開示の実施形態に係るFcに基づく分子構築物を投与するステップを含む。

【0232】

実施例

【0233】

実施例1: ペプチドコアとしてのペプチド1(配列番号: 18)、ペプチド2(配列番号: 26)、及びペプチド3(配列番号: 19)の合成、及びシステイン残基のSH基とカップリングアームとしてのマレイミド-PEG₃-トランスシクロオクテン(TCO)との結合

10

【0234】

ペプチド1~3のそれぞれ(Chinapeptide Inc., Shanghai, China)を最終濃度2mMとなるように50mMのNaCl及び5mMのEDTAを含む100mMのリン酸ナトリウム緩衝液(pH7.0)に溶解した。溶解したペプチドを1 mMのトリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン(TCEP)を用いて25°Cで2時間還元した。ペプチドとマレイミド-PEG₃-TCOを1/5の割合で混合し、pH7.0、4°Cで18時間反応させることにより、システイン残基のSH基とマレイミド-PEG₃-TCO(Conju-probe Inc.)とを結合して機能的連結基であるTCOを形成した。TCO結合ペプチドを逆相HPLC(カラム: Supelco C18(250mm X 10 mm; 5 µm); 移動相: アセトニトリル及び0.1%トリフルオロ酢酸; アセトニトリルの線形勾配: 0% ~ 100%; 30分間以上; 流速: 1.0 mL/min; カラム温度: 25°C)により精製した。

20

【0235】

以下に示す本発明のTCO-ペプチド1は、分子量が2,078.9ダルトンである。

【0236】



【0237】

以下に示す本発明のTCO-ペプチド2は、分子量が2,020.09ダルトンである。

【0238】



30

【0239】

以下に示す本発明のTCO-ペプチド3は、分子量が3,381.85ダルトンである。

【0240】



【0241】

実施例2: NHS-PEG₁₂-MalとTCO-ペプチド1 NH₂基との結合によるリンカーユニットの合成

40

【0242】

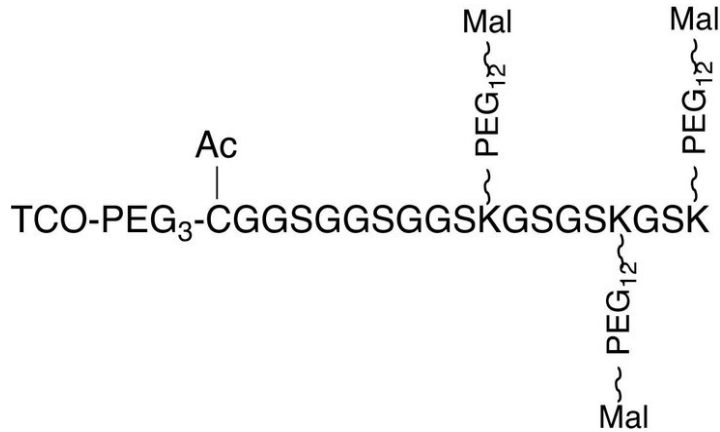
Conju-probe Incから、架橋剤であるNHS-PEG₁₂-マレイミド(スクシンイミジル-[(N-マレイミド-プロピオンアミド)-ドデカエチレングリコール]エステルを購入した。製造業者の指示に従って、結合手順を行った。リジン残基を有するペプチドを100mMで結合緩衝液(リン酸緩衝生理食塩水(PBS、pH7.5))に溶解した。NHS-PEG₁₂-マレイミド架橋剤を1mMの最終濃度(0.1mMのペプチド溶液に対してモルで10倍過剰)となるようにペプチドに添加した。反応混合物を室温で18時間インキュベートした。マレイミド-PEG₁₂結合TCO-ペプチド1を逆相HPLC(カラム: Supelco C18カラム(250mmX4.6mm; 5 µm); 移動相: アセトニトリル及び0.1%トリフルオロ酢酸; アセトニトリルの線形勾配: 0% ~ 100%; 30分間以上; 流速: 1.0mL/min; カラム温度: 25°C)により精製した。

50

【0243】

以下に示すように、このようにして合成したマレイミド-PEG₁₂結合TCO-ペプチド1は、TCO基を有する1つのカップリングアーム及びマレイミド基を有する3つのPEGリンクアームを含み、分子量が4,332ダルトンである。

【0244】



10

【0245】

実施例3: シロリムス-Gly及びシロリムス-diGly分子の合成

【0246】

シロリムスモノグリシン(シロリムス-Gly)及びシロリムスジグリシン(シロリムス-diGly)は、Dr. Jiann-Jyh Huangの研究室(国立嘉義大学の応用化学科(台湾 嘉義))と結約を結んで設計、調製された。

20

【0247】

シロリムス-Gly(7a)及びシロリムス-diGly(7b)の合成について、シロリムス(1)を出発材料として使用し、イミダゾールをベースとして塩化トリメチルシリル(TMSCI)と反応させることにより、28,40-bis-O-TMSシロリムスを得た(以下のスキーム6を参照)。28,40-bis-O-TMSシロリムスの40-O位置にあるトリメチルシリル基をイミダゾール及びイミダゾール塩酸塩により選択的に除去することで、合計収率82%の28-O-TMSシロリムス(2)を得た。DCCをカップリング剤、DMAPを触媒として使用してトリチルグリシン(3)及びトリチルグリシングリシン(4)によりCH₂Cl₂で40-OHをエステル化することにより、それぞれ75%及び>99%の収率で28-O-TMS シロリムス-GlyTrt(5a)及び28-O-TMS シロリムス-diGlyTrt(5b)を得た。酸性条件下で5a及び5bにおけるトリメチルシリル基を除去して、99%の収率でシロリムス-GlyTrt(6a)、及び85%の収率でシロリムス-diGlyTrt(6b)を得た。トリフルオロエタノールでHOBtにより6a及び6bにおけるトリチル基を脱保護することにより、それぞれ61%及び27%の収率で所望のシロリムス-Gly(7a)及びシロリムス-diGly(7b)を得た。

30

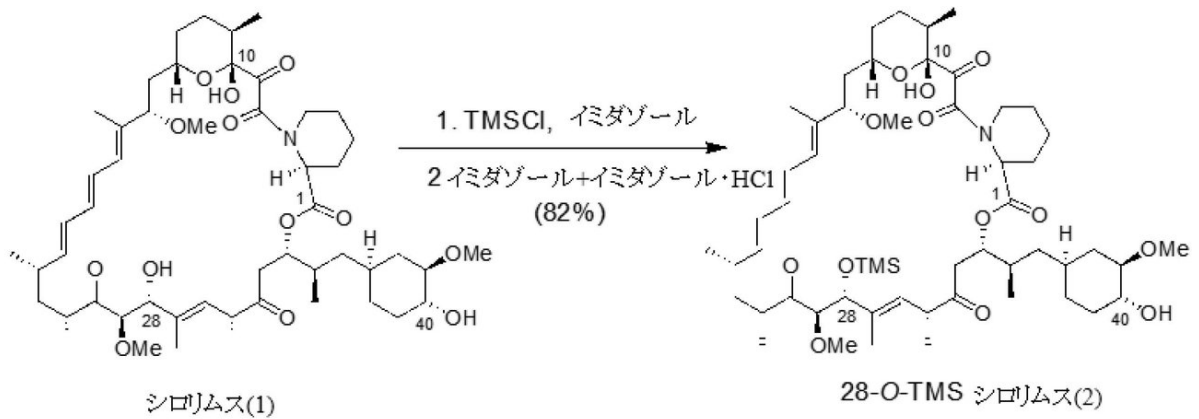
【0248】

試薬及び出発材料は、さらに精製することなく市販品をそのまま使用した。Merck Incから購入したプレコートプレート(silica gel 60 F-254)で分析薄層クロマトグラフィー(TLC)を行った。Merck Reagents Silica Gel 60(粒子サイズ:0.063-0.200 mm;70-230メッシュASTM)を用いてカラムクロマトグラフィーによる精製を行った。Agilent 400-MR(400 MHz)スペクトロメーター(溶媒:CD₃OD又はDMSO-d₆)でプロトンNMRスペクトルを記録した。

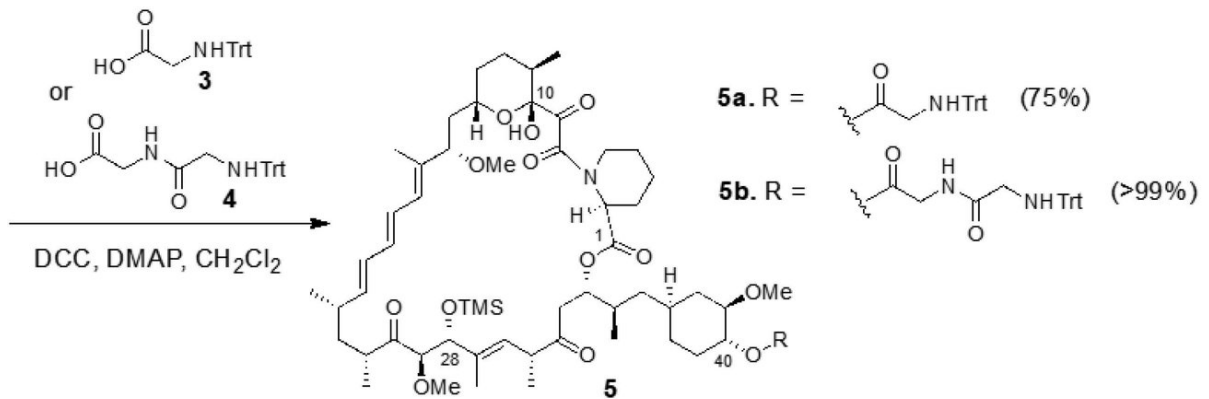
40

【0249】

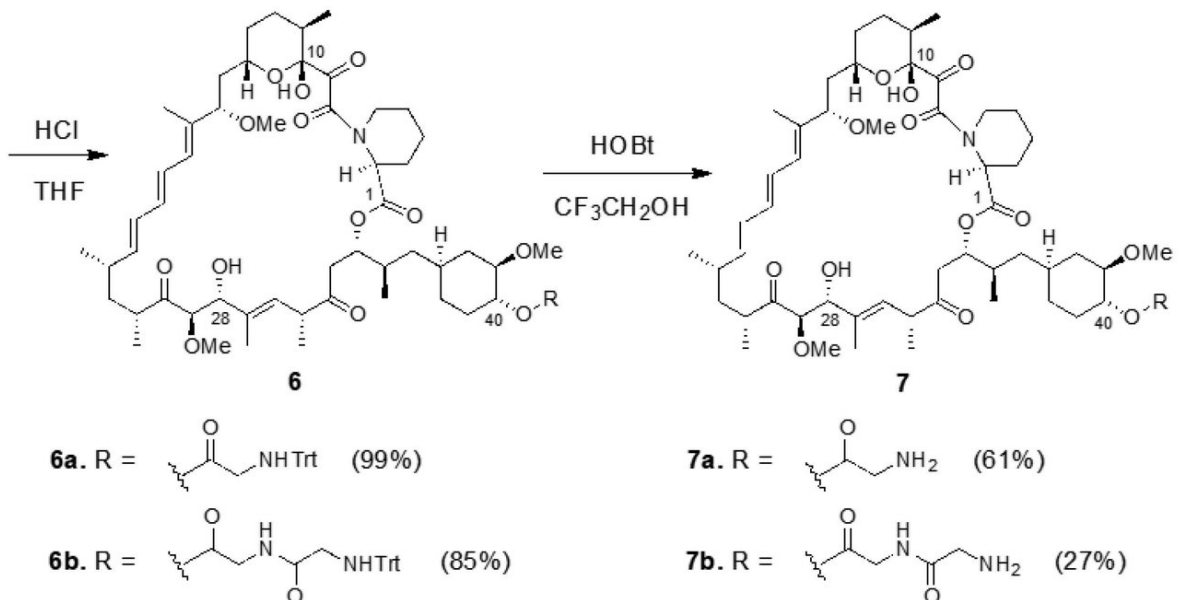
<<スキーム6 シロリムス-Gly(7a)及びシロリムス-diGly(7b)の合成>>



10



20



30

【0250】

次のように多重度を省略する。即ち、s:一重線、d:二重線、t:三重線、q:四重線、m:多重線。フィニガンLCQマスマスペクトロメーターでESI-MSマスマスペクトルを得た。LTQ Orbitrap XLマスマスペクトロメーター(Thermo Fisher Scientific)で高分解能マスマスペクトルを得た。報告された手順に従って、トリチルグリシン(3)及びトリチルグリシングリシン(4)を調製した(Nogusa et al., 1995)。

【0251】

28-O-TMS シロリムス(2)

氷浴で、 CH_2Cl_2 (109mL)に溶解したシロリムス(1, 1.992g, 2.179mmol, 1.0当量)及びイミダゾール(0.1494g, 2.194mmol, 1.0当量)に塩化トリメチルシリル(TMSCl, 1.0 M in CH_2Cl_2 , 13.0 mL, 13.0mmol, 6.0当量)をゆっくりと加えた。0 で反応混合物を攪拌し、反応

50

をTLCにより監視した。反応が完了した後(約10分間)、溶液を減圧下で濃縮した。50% EtOAc(ヘキサン)を溶離液としてフラッシュカラムクロマトグラフィーにより残基を精製することにより、28,40-bis-O-TMSシロリムス(2.261g, 2.136mmol): ESI-MS: 1080.62(M + Na)⁺を得た。得られた28,40-Bis-O-TMSシロリムスをイミダゾール(2.250g, 33.05mmol, 15当量)及びイミダゾール塩酸塩(3.463g, 33.13mmol, 16当量)とCH₂Cl₂(218mL)で混合した。反応混合物を室温で攪拌し、反応をTLCにより監視した。反応が完了した後(約3時間)、溶液を減圧下で濃縮し、フラッシュカラムクロマトグラフィーにより、50% EtOAc(ヘキサン)を溶離液として残留物を精製することにより、合計収率82%で28-O-TMSシロリムス(2,1.772g, 1.796mmol)(ESI-MS: 1008.58(M + Na)⁺)を得た。

【0252】

28-O-TMS シロリムス-GlyTrt(5a)

化合物2(0.305g, 0.309mmole, 1.0当量)、トリチルグリシン(3, 0.592g, 1.87mmol, 6.1当量)及びDMAP(0.065g, 0.532mmol, 1.7当量)を含む無水CH₂Cl₂(10mL)溶液にDCC(0.386g, 1.87mmol, 6.当量)を含む無水CH₂Cl₂(5.0mL)をゆっくりと加えた。反応混合物を室温で攪拌し、反応をTLCにより監視した。反応が完了した後(約3時間)、溶液にH₂O(1.0mL)を添加し、ろ過して白色のDBU沈殿物を得た。濾液をEtOAcで希釈し、飽和NaHCO₃で洗浄した。有機層をMgSO₄で乾燥させ、ろ過し、減圧下で濃縮した。カラムクロマトグラフィーにより、25% EtOAc(ヘキサン中)を溶離液として残留物を精製することにより、収率75%で5a(300mg, 0.233mmol)を得た。

【0253】

28-O-TMS シロリムス-diGlyTrt(5b)

化合物5aの調製と同様に、化合物2(0.305g, 0.309mmol, 1.0当量)、トリチルグリシングリシン(4, 0.347g, 0.927mmol, 3.0当量)、DMAP(11mg, 0.090mmol, 0.30当量)及びDCC(0.240g, 1.16mmol, 3.8当量)を用いて化合物5bを調製した。反応により>99%の収率で5b(0.535g, 0.398mmol)を得た。HRMS calcd for C₇₇H₁₀₇N₃NaO₁₅Si(M + H)⁺ 1364.7364, found 1364.7275。

【0254】

シロリムス-GlyTrt(6a)

氷浴で、化合物5a(0.193g, 0.150mmol, 1.0当量)を含むTHF(10mL)にH₂O(2.0mL)及び0.10N HCl(0.50mL)を加えた。反応混合物を室温で12時間攪拌した。溶液にNaHCO₃(0.10M, 1.0mL)を加え、EtOAcで希釈した。溶液を水で洗浄し、MgSO₄で乾燥させ、減圧下で濃縮した。カラムクロマトグラフィーにより、50% EtOAc(ヘキサン中)を溶離液として残留物を精製することにより、99%の収率で化合物6a(180mg, 0.148mmol)を得た。HRMS calcd for C₇H₉₇N₂O₁₄(M + H)⁺ 1213.6934, found 1213.6887。

【0255】

シロリムス-diGlyTrt(6b)

化合物6aと同様に、5b(0.535g, 0.398mmol, 1.0当量)を用いて化合物6bを調製した。反応により、85%の収率で化合物6b(0.431g, 0.339mmol)を得た。HRMS calcd for C₇₄H₁₀₀N₃O₁₅(M + H)⁺ 1270.7149, found 1270.7054。

【0256】

シロリムス-Gly(7a)

化合物6a(0.168g, 0.138mmol, 1.0当量)を0.10M HOBtのトリフルオロエタノール溶液(1.0mL)に溶解し、反応をTLCにより監視した。反応が完了した後(~12h)、溶液にH₂O(0.10mL)を加え、EtOAcで希釈した。溶液を飽和Na₂CO₃で洗浄し、MgSO₄で乾燥させ、ろ過し、減圧下で濃縮した。カラムクロマトグラフィーにより残留物を精製することにより、61%の収率で化合物7a(82mg, 0.084mmol)を得た。HRMS calcd for C₅₃H₈₃N₂O₁₄(M + H)⁺ 971.5839, found 971.5806; ¹H NMR(CD₃OD) 6.48-6.36(m, 2 H), 6.30-6.03(m, 3 H), 5.47(s, 1 H), 5.42(d, 1 H), 5.21(d, 1 H), 5.06(d, 1 H), 4.68(s, 1 H), 4.15(d, 1 H), 4.08(d, 1 H), 3.98(d, 1 H), 3.66(d, 1 H), 3.56-3.50(m, 1 H), 3.41(s, 2 H), 3.36(s, 3 H), 3.26(s, 3 H), 3.12(s, 3 H), 2.84-2.80(m, 1 H), 2.79-2.76(m, 1 H), 2.48-2.40

10

20

30

40

50

(m, 2 H), 2.35-0.90(m, 52 H)。

【 0 2 5 7 】

シロリムス-diGly(7b)

化合物7aと同様に、化合物6b(0.431g, 0.339mmol, 1.0当量)を用いて化合物7bを調製した。反応により27%の収率で7b(96mg, 0.093mmol)を得た。¹H NMR(DMSO-d₆) 6.70-6.53(m, 1 H), 6.48-6.22(m, 2 H), 6.23-6.00(m, 3 H), 5.58-5.33(m, 1 H), 5.29-5.10(m, 2 H), 4.98-4.84(m, 2 H), 4.60-4.41(m, 2 H), 4.14-4.01(m, 5 H), 3.99-3.46(m, 2 H), 3.76-3.46(m, 3 H), 3.21(s, 3 H), 3.12(s, 3 H), 3.00(s, 1 H), 2.94(s, 3 H), 2.75-2.60(m, 2 H), 2.39-2.28(m, 1 H), 2.26-2.16(m, 1 H), 2.15-1.75(m, 3 H), 1.68-0.53(m, 45 H)。

10

【 0 2 5 8 】

図6Aは、このようにして合成したシロリムス-Gly(スキーム6の化合物7a)の質量分析を示す。MS(ESI)calculated for C₅₃H₈₂N₂O₁₄ 971.22; found 993.5668, corresponding to [M+Na]⁺。MSスペクトルにおいて、[M+Na+1]⁺, [M+Na+2]⁺, [M+Na+3]⁺に対応する994.57, 995.574, 996.58に3つの同位体ピークが観察された。

【 0 2 5 9 】

図6Bは、このようにして合成したシロリムス-diGly(スキーム6の化合物7b)の質量分析を示す。MS(ESI)calculated for C₅₅H₈₅N₃O₁₅ 1028.27; found 1028.6067, corresponding to [M+H]⁺。MSスペクトルにおいて、[M+H+1]⁺, [M+H+2]⁺, [M+H+3]⁺に対応する1029.6113, 1030.6152, 1031.6191に3つの同位体ピークが観察された。

20

【 0 2 6 0 】

実施例4:シロリムス-Gly及びシロリムス-diGly分子とNHS-S-S-PEG₃-アジドリンクアームとの結合

【 0 2 6 1 】

この例では、シロリムス-Gly及びシロリムス-diGly分子のNH₂基をヘテロ二官能性切断可能リンカーであるNHS-S-S-PEG₃-アジド(Conju-probe Inc.)と反応させた。

【 0 2 6 2 】

簡単に言えば、シロリムス-Glyを50mMの最終濃度で100% DMSOに溶解し、NHS-S-S-PEG₃-アジドを250 mMの最終濃度で100% DMSOに溶解した。59.76 μlのNHS-S-S-PEG₃-アジドリンカー溶液を5mMの最終濃度(2.5mM シロリムス-Gly溶液に対してモルで2倍過剰)で149.4 μlの溶解したシロリムス-Gly溶液に加えた。その後、100mM リン酸ナトリウム緩衝液(pH7.5)を含有する298.8 μlの緩衝溶液及び2,480 μlの100% DMSOを総体積2,988 μlまで反応混合物に加えた。反応混合物を室温で3時間インキュベートし、次いで溶媒真空下で蒸発させた。

30

【 0 2 6 3 】

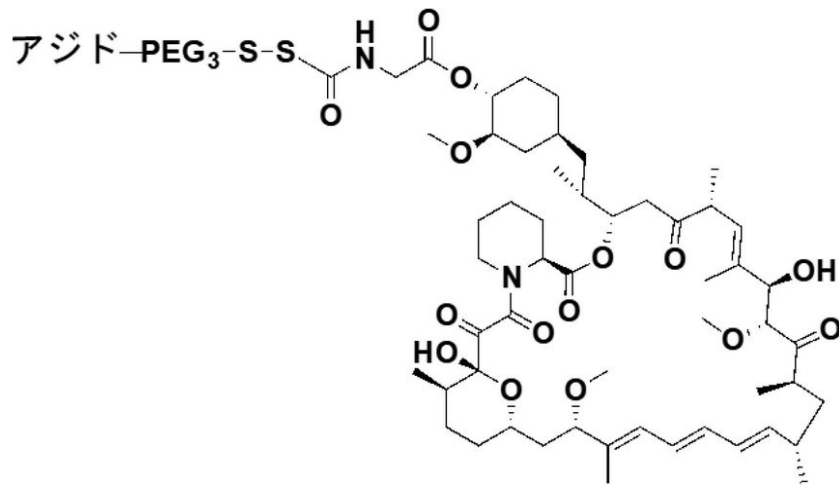
生成物アジド-PEG₃-S-S結合シロリムス-Glyを65% アセトニトリルに溶解した後、逆相HPLC(カラム:Supelco C18カラム(250mmX10.0mm;5 μm);移動相:アセトニトリル及び0.1%トリフルオロ酢酸;アセトニトリルの線形勾配:50%~100%;00分間以上、流速:3.0mL/min;カラム温度:45 °C)により精製した。

【 0 2 6 4 】

図7Aは、以下に示す合成したアジド-PEG₃-S-S結合シロリムス-Glyの質量分析を示す。MS(ESI)calculated for C₆₄H₁₀₁N₅O₁₈S₂ 1292.64; found 1314.6463, corresponding to [M+Na]⁺。MSスペクトルにおいて、[M+Na+1]⁺, [M+Na+2]⁺, [M+Na+3]⁺に対応する1315.65, 1316.6532, 1317.6559に3つの同位体ピークが観察された。

40

【 0 2 6 5 】



10

【0266】

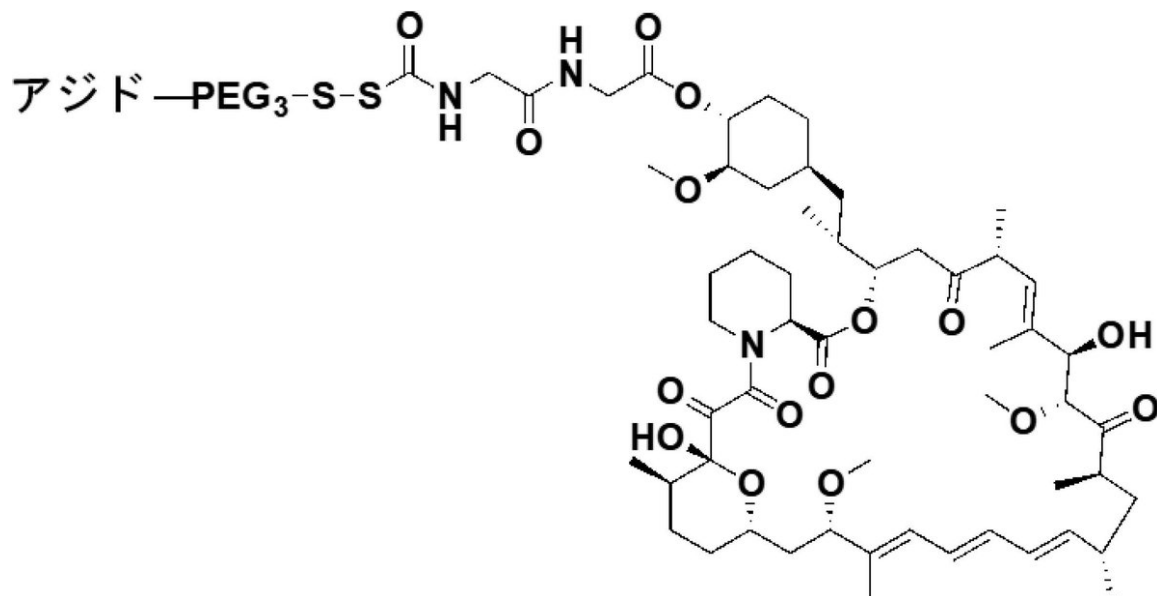
同様に、シロリムス-diGlyを最終濃度50mMで100% DMSOに溶解し、NHS-S-S-PEG₃-アジドリンカーを最終濃度250mMで100% DMSOに溶解した。その後、46.68 μ lのNHS-S-S-PEG₃-アジドリンカー溶液を最終濃度5mM(2.5mMシロリムス-diGly溶液に対してモルで2倍過剰)で116.7 μ lの溶解したシロリムス-diGly溶液に溶解した。次いで、100mM リン酸ナトリウム緩衝液(pH7.5)を含有する233.4 μ lの緩衝溶液及び1,937.22 μ lの100% DMSOを総体積2,334 μ lまで反応混合物に加えた。The反応混合物を室温で3時間インキュベートした後、溶媒を真空下で蒸発させた。上記のプロトコルに従って生成物を逆相HPLCにより精製した。

20

【0267】

図7Bは、以下に示す合成したアジド-PEG₃-S-S結合シロリムス-diGlyの質量分析を示す。MS(ESI)calculated for C₆₆H₁₀₄N₅O₁₉S₂ 1349.69; found 1371.6785, corresponding to [M+Na]⁺. MSスペクトルにおいて、[M+Na+1]⁺, [M+Na+2]⁺, [M+Na+3]⁺に対応する1372.6817, 1373.682, 1374.6828に3つの同位体ピークが観察された。

【0268】



30

40

【0269】

実施例5:フィンゴリモド及びフィンゴリモドリン酸塩分子とNHS-PEG₅-NHS架橋剤との結合

【0270】

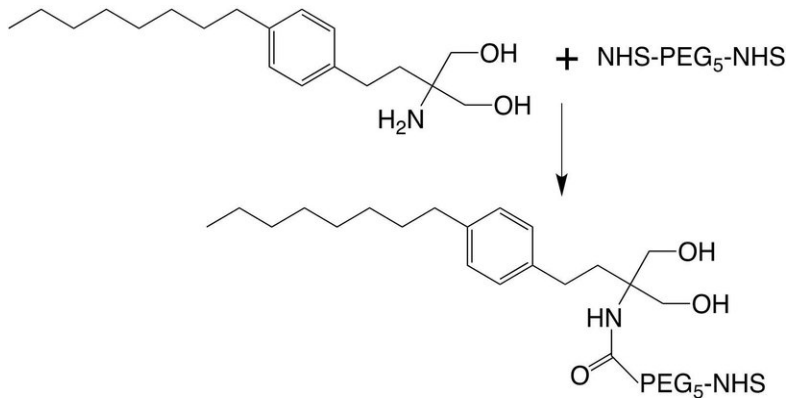
フィンゴリモドをBiotang Inc.(Lexington, USA)から購入し、フィンゴリモドリン酸塩をKM3 Scientific Corporation(New Taipei City, Taiwan)から購入した。スキーム7に示すように、フィンゴリモド分子のNH₂基をホモ二機能性架橋剤(NHS-PEG₅-NHS)と反応させた。

50

【0271】

<<スキーム7 フィンゴリモド分子とNHS-PEG₅-NHS架橋剤との結合>>

【0272】



10

【0273】

簡単に言えば、フィンゴリモドを最終濃度10mM 100% DMSOに溶解し、NHS-PEG₅-NHSのホモ二機能性架橋剤を最終濃度250mMで100% DMSOに溶解した。フィンゴリモドのNH₂基を活性化するために、6%(v/v)の塩基性リン酸ナトリウム緩衝液(pH12.7)をフィンゴリモド溶液に添加し、さらに、10分間インキュベートした。NHS-PEG₅-NHS架橋剤をで最終濃度30mM(10mM フィンゴリモド溶液に対してモルで3倍過剰)で溶解したフィンゴリモド溶液に添加した。反応混合物を室温で3時間インキュベートした。

20

【0274】

フィンゴリモドリン酸塩を最終濃度5mMで100% DMSOに溶解し、NHS-PEG₅-NHS架橋剤を最終濃度250mMで100% DMSOに溶解した。NHS-PEG₅-NHS架橋剤を最終濃度15mM(5mM フィンゴリモドリン酸塩溶液に対してモルで3倍過剰)で溶解したフィンゴリモドリン酸塩溶液に加えた。反応混合物を室温で3時間インキュベートした後、18%(v/v)酸性リン酸ナトリウム緩衝液(緩衝溶液のpH値を下げる)を添加して反応を停止させた。溶媒を真空下で蒸発させた。

【0275】

NHS-PEG₅結合フィンゴリモド及びNHS-PEG₅結合フィンゴリモドリン酸塩をそれぞれ30%アセトニトリルに溶解した後、逆相HPLC(カラム:Supelco C18カラム(250mmX4.6mm;5 μm);移動相:アセトニトリル及び0.1%トリフルオロ酢酸;アセトニトリルの線形勾配:30%~100%;30分間以上、流速:1.0mL/min;カラム温度:25 °C)により精製した。

30

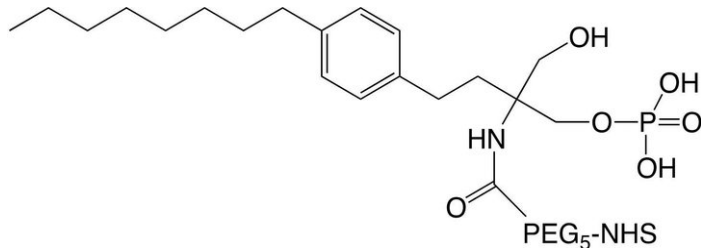
【0276】

図8は、このようにして合成したNHS-PEG₅結合フィンゴリモド(上記のスキーム7に示すように)の分子量が725.41ダルトンである。

【0277】

以下に示す本発明のNHS-PEG₅フィンゴリモドリン酸塩は、分子量の803.3ダルトンである。

【0278】



40

【0279】

実施例6:フィンゴリモド分子と NHS-S-S-PEG₃-アジドリンクアームとの結合

【0280】

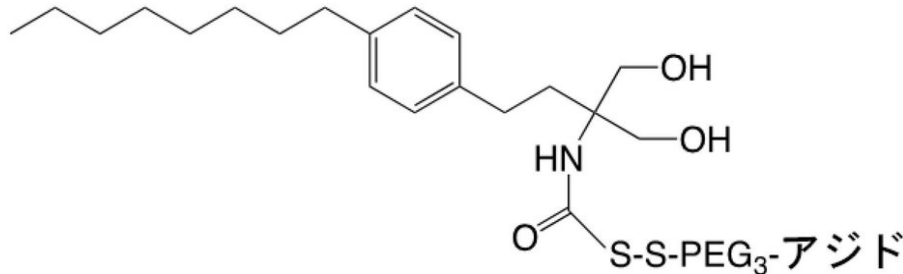
50

フィンゴリモド分子のNH₂基をヘテロ二官能性切断可能リンカーであるNHS-S-S-PEG₃-アジド(Conju-probe Inc.)と1:3のモル比で反応させた。アジド-PEG₃-S-S-フィンゴリモドをHPLCにより精製して過剰で未反応のフィンゴリモド分子を除去した。結合及び精製の手順は、上記の実施例と同様である。

【0281】

図9は、以下に示す合成したアジド-PEG₃-S-S結合フィンゴリモドの質量分析を示す。MS(ESI)calculated for C₃₀H₅₃N₄O₆S₂ 629.9007; found 651.321, corresponding to [M+Na]⁺。MSスペクトルにおいて、[M+Na+1]⁺、[M+Na+2]⁺に対応する652.315、653.328に3つの同位体ピークが観察された。

【0282】



【0283】

実施例7:アジド-PEG₃-S-S結合シロリムス-Gly分子とDBCO-PEG₄-NHS架橋剤との結合

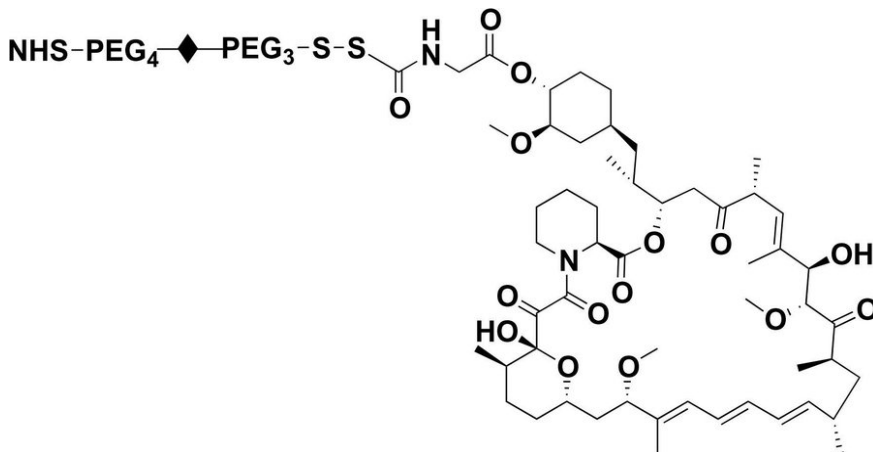
【0284】

アジド-PEG₃-S-S結合シロリムス-Gly分子を最終濃度10mMで100% DMSOに溶解し、DBCO-PEG₄-NHS架橋剤を最終濃度250mMで100% DMSOに溶解した。4 μlのDBCO-PEG₄-NHS架橋剤溶液を最終濃度4mMで50 μlのアジド-PEG₃-S-S結合シロリムス-Gly溶液に添加することにより、DBCO-PEG₄-NHSとアジド-PEG₃-S-S結合シロリムス-Glyとの最終モル比が2:1となった。反応混合物を室温で3時間インキュベートしてSPAAC反応を行った。

【0285】

図10Aは、以下に示す合成したNHS-PEG₄-PEG₃-S-S結合シロリムス-Glyの質量分析を示す(ダイヤモンド記号はSPAACの縮合生成物を表す)。MS(ESI)calculated for C₉₈H₁₄₀N₈O₂₈S₂ 1942.33; found 1941.9267, corresponding to [M+H]⁺。MSスペクトルにおいて、[M+H+1]⁺、[M+H+2]⁺、[M+H+3]⁺、[M+H+4]⁺に対応する1942.9299, 1943.9328, 1944.9349, 1945.9371に4つの同位体ピークが観察された。

【0286】



【0287】

図10Bは、以下に示す合成したNHS-PEG₄-PEG₃-S-S結合シロリムス-diGlyの質量分析を示す(ダイヤモンド記号はSPAACの縮合生成物を表す)。MS(ESI)calculated for C₁₀₀H₁₄₃N₉O₂₉S₂ 1999.38; found 1998.9514, corresponding to [M+H]⁺。MSスペクトルにおいて、[M+H+1]⁺、[M+H+2]⁺、[M+H+3]⁺、[M+H+4]⁺に対応する1999.9546, 2000.9571, 2001.9591, 20

10

20

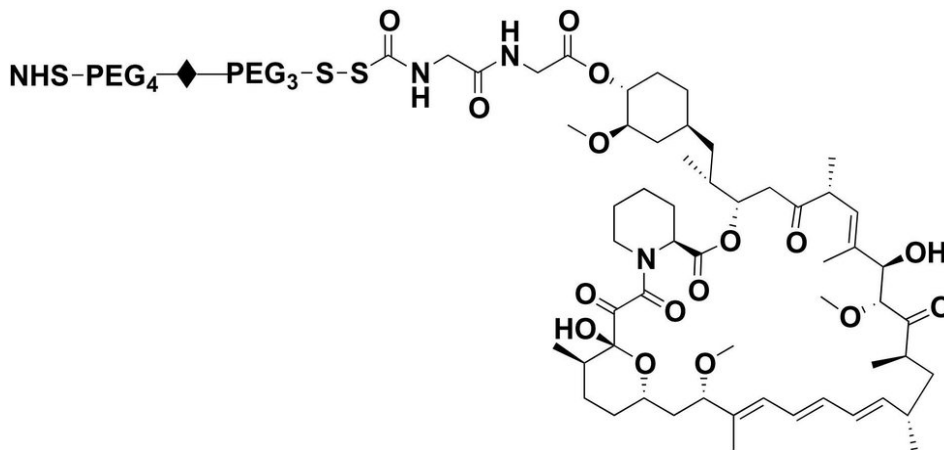
30

40

50

02.9609 に4つの同位体ピークが観察された。

【 0 2 8 8 】



10

【 0 2 8 9 】

実施例8: アジド-PEG₃-S-S結合フィンゴリモド分子とNHS-PEG₄-DBCO架橋剤との結合

【 0 2 9 0 】

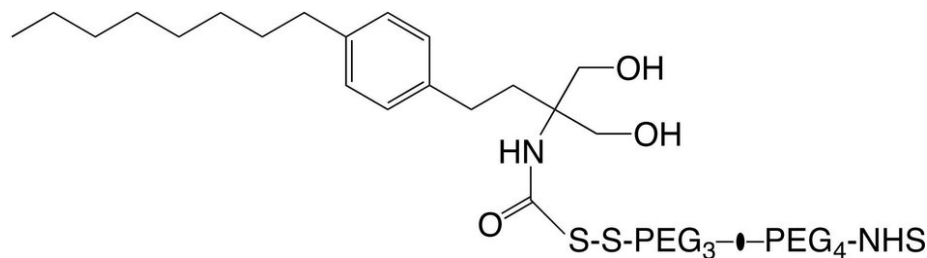
アジド-PEG₃-S-S結合フィンゴリモド分子を最終濃度10 mMで100% DMSOに溶解し、NHS-PEG₄-DBCO架橋剤を最終濃度250mMで100% DMSOに溶解した。5 μlのNHS-PEG₄-DBCO架橋剤溶液を最終モル比1/3.2(NHS-PEG₄-DBCO: アジド-PEG₃-S-S結合フィンゴリモド)となるように400 μlのアジド-PEG₃-S-S結合フィンゴリモド溶液に添加した(100mM リン酸ナトリウム緩衝液(pH7.5;最終濃度10mM))。反応混合物を室温で3時間インキュベートしてSPAAC反応を行った。

20

【 0 2 9 1 】

図11は、以下に示す合成したNHS-PEG₄-PEG₃-S-S結合フィンゴリモドの質量分析を示す(ダイヤモンド記号はSPAACの縮合生成物を表す)。MS(ESI)calculated for C₆₄H₉₂N₇O₁₆S₂ 1278.5938; found 1278.613, corresponding to [M+H]⁺。MSスペクトルにおいて、[M+H+1]⁺、[M+H+2]⁺に対応する1279.640、1280.635に2つの同位体ピークが観察された。

【 0 2 9 2 】



30

【 0 2 9 3 】

実施例9: NHS-PEG₄-PEG₃-S-S結合シロリムス-GlyとTCO-ペプチド2との結合

【 0 2 9 4 】

TCO-ペプチド2 を最終濃度20mMで100mM リン酸ナトリウム緩衝液(pH7.5)に溶解し、NHS-PEG₄-PEG₃-S-S結合シロリムス-Glyを最終濃度10 mMで100% DMSOに溶解した。1.5 μlのTCO-ペプチド2と60 μlのNHS-PEG₄-PEG₃-S-S結合シロリムス-Glyをモル比1:20(TCO-ペプチド2: NHS-PEG₄-PEG₃-S-S結合シロリムス-Gly)で混合した。さらに、100mM リン酸ナトリウム緩衝液(pH10)を含有する3.5 μlの緩衝液及び35 μlの100% DMSO総体積100 μlまでを反応混合物に加え、反応混合物を室温で3時間インキュベートした。

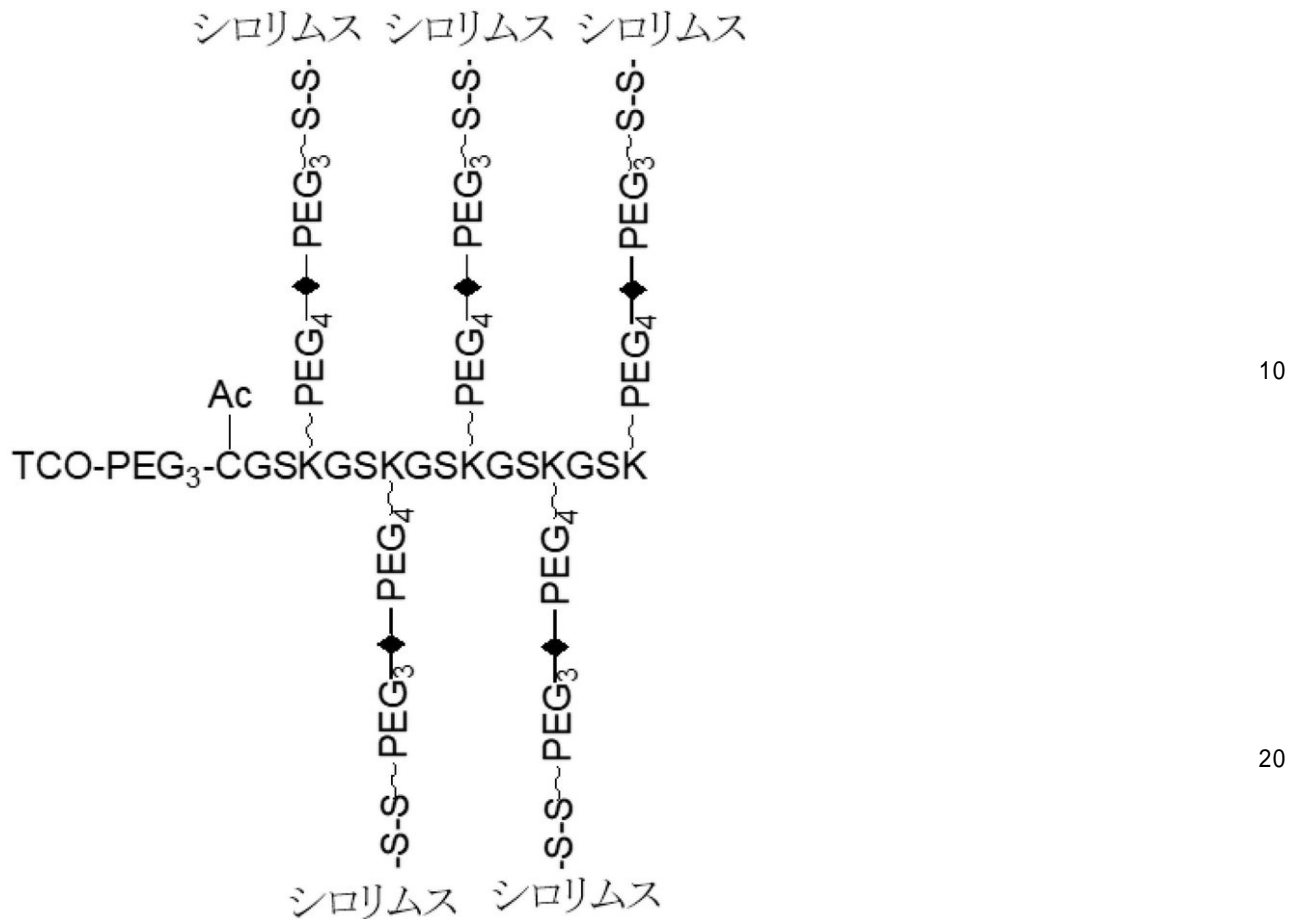
40

【 0 2 9 5 】

図12Aは、以下に示す合成した薬物バンドルの分子量が11,562ダルトンであることを示す。其れは、1つの遊離TCO官能基及び1つのセットの5つのシロリムス-Gly分子を有するリンカーユニットで構成される。

【 0 2 9 6 】

50



【 0 2 9 7 】

実施例10: NHS-PEG₅結合フィンゴリモド分子とTCO-ペプチド2、3との結合

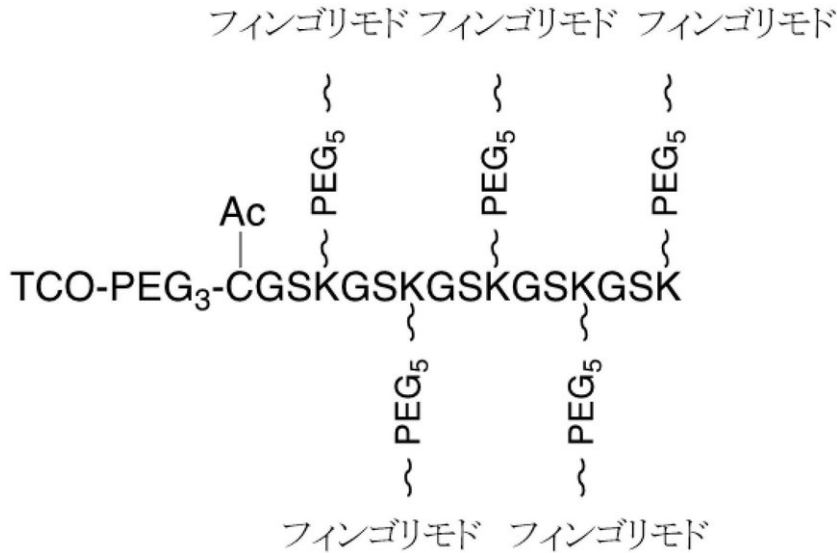
【 0 2 9 8 】

TCO-ペプチド2を濃度20mMで100mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH7.5) に溶解し、NHS-PEG₅結合フィンゴリモドを濃度50mMで100% DMSOに溶解した。TCO-ペプチド2とNHS-PEG₅結合フィンゴリモドをモル比1/42で室温で3時間インキュベートした。次いで、追加のTCO-ペプチド2を最終モル比1/13.5(TCO-ペプチド2: NHS-PEG₅結合フィンゴリモド)で反応溶液に加えた。混合物を室温でさらに3時間インキュベートした。

【 0 2 9 9 】

図12Bは、フィンゴリモドを有するTCO-ペプチド2の薬物バンドルの分子量が5,069ダルトンであることを示す。このようにして合成した薬物バンドルは、以下に示すように、1つの遊離TCO官能基及び1つのセットの5つのフィンゴリモド分子を有するリンカーユニットから構成される。

【 0 3 0 0 】



10

【0301】

TCO-ペプチド3を濃度10 mMで100mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH7.5) に溶解し、NHS-PEG₅ 結合フィンゴリモドを濃度50mMで100% DMSOに溶解した。TCO-ペプチド3 とPEG₅-NHS結合フィンゴリモドを室温でモル比1/42で一晩混合した。

【0302】

図12Cは、フィンゴリモドを有するTCO-ペプチド3の薬物バンドルの分子量が9,478.958ダルトンであることを示し、それは、10個のフィンゴリモド分子がTCO-ペプチド3リンカーユニットに結合されることを示している。本発明の薬物バンドルは、以下に示すように、1つの遊離TCO官能基及び1つのセットの10個のフィンゴリモド分子を有するリンカーユニットから構成される。

20

【0303】



30

【0304】

実施例11: NHS-PEG₅ 結合フィンゴリモドリン酸塩分子とTCO-ペプチド2との結合

【0305】

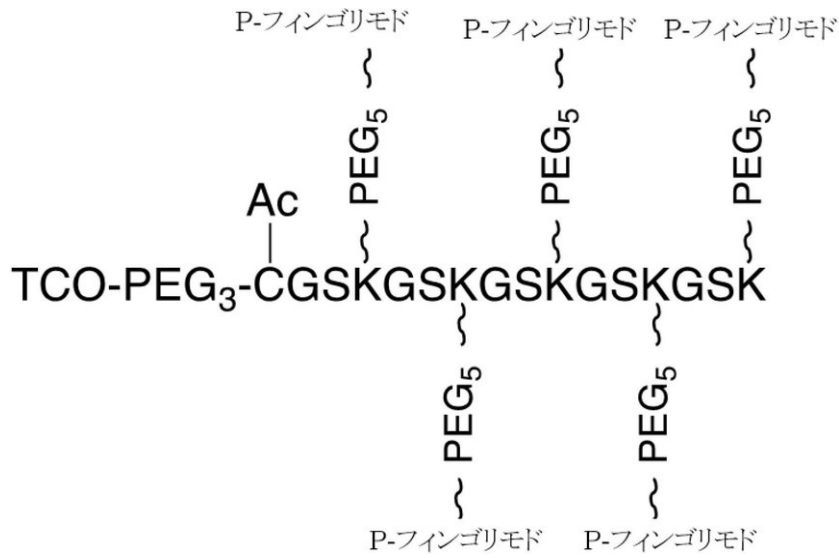
TCO-ペプチド2とNHS-PEG₅ 結合フィンゴリモドリン酸塩とをモル比1/42で室温で100mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH7.5) に3時間混合した。

40

【0306】

質量分析は、フィンゴリモドリン酸塩を有するTCO-ペプチド2の薬物バンドルの分子量が5,379.16ダルトンであることを示す(図12D)。このようにして合成した薬物バンドルは、以下に示すように、1つの遊離TCO官能基及び1つのセットの5つのフィンゴリモドリン酸塩分子(エフェクター成分)を有するリンカーユニットから構成される。

【0307】



10

【 0 3 0 8 】

実施例12: NHS-PEG₄-PEG₃-S-S結合フィンゴリモド分子とTCO-ペプチド2との結合

【 0 3 0 9 】

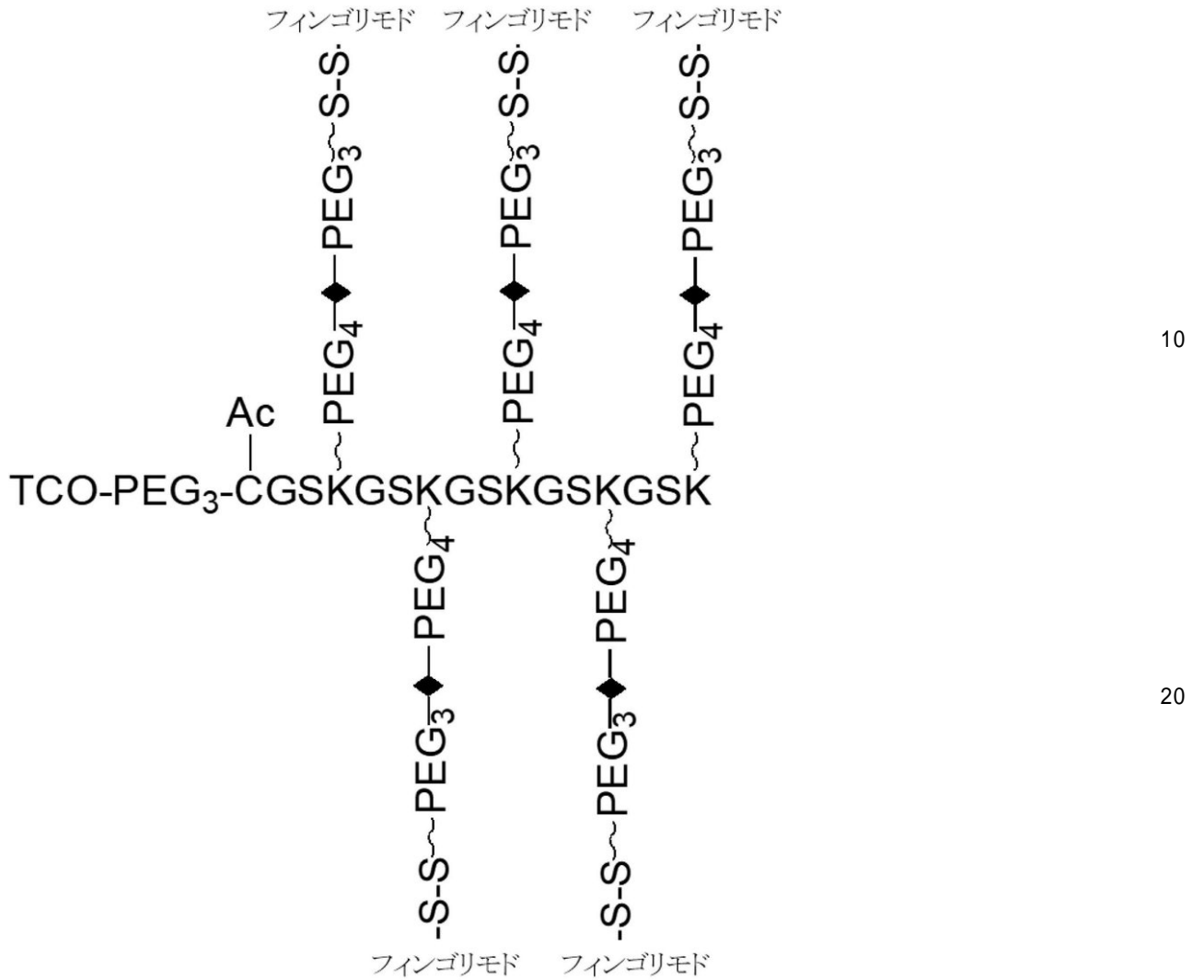
この例では、5つのNHS-PEG₄-PEG₃-S-S結合フィンゴリモド分子をTCO-ペプチド2に連結した。上記の実施例と同様に、NHS-PEG₄-PEG₃-S-S結合フィンゴリモド分子とTCO-ペプチド2のリジン残基のNH₂基とを結合した。質量分析MALDI-TOFにより同定した。

20

【 0 3 1 0 】

以下に示す合成した薬物バンドルは、分子量が7,815ダルトンであり、1つの遊離TCO官能基、及び1つのセットの5つのフィンゴリモド分子を有するリンカーユニットから構成される。

【 0 3 1 1 】



【 0 3 1 2 】

実施例13: Expi293F 過剰発現システムによる組換えヒトHLA-A1-IgG1.Fc, HLA-A2-IgG1.Fc及びPD-1-IgG1.Fcの調製 30

【 0 3 1 3 】

The 遺伝子をコードする配列をpG1K発現カセットに入れた。ヒトHLA-A1-IgG1.Fc、HLA-A2-IgG1.Fc 及びPD-1-IgG1.Fcのアミノ酸配列は、それぞれ配列番号：27～29に記載される。

【 0 3 1 4 】

To prepare using a 哺乳動物発現システムを用いて組換えタンパク質を調製する際に、実験においてExpi293FTM細胞株に基づく過剰発現システムを用いた。該システムは、Expi293FTM細胞株、カチオン性脂質系ExpiFectamineTM293試薬、ExpiFectamineTM293トランスフェクションエンハンサー1、2、及び発現システムの一部である培地(Gibco、New York、USA)を含むExpiFectamineTM293トランスフェクションキット(Life Technologies、Carlsbad、USA)を使用した。 40

【 0 3 1 5 】

Expi293F細胞を2.0 × 10⁶ 生存細胞/mlの密度でExpi293F発現培地に接種した後、トランスフェクションの際に細胞が活発な分裂の状態にあることを確保するために、18～24時間維持した後トランスフェクションした。トランスフェクションの際に、7.5 × 10⁸ 個の細胞を入れた255mlの培地を2Lのエルレンマイヤーシェーカーフラスコに入れた後、ExpiFectamineTM293トランスフェクション試薬でトランスフェクションした。トランスフェクション後、オービタルシェーカー(125 rpm)においてトランスフェクションされた細胞を37 °Cで16～18時間インキュベートし、次いで、そこにExpiFectamineTM293トランスフェクション 50

エンハンサー-1及びエンハンサー-2を加えた後、引き続き、5-6日間インキュベートした。培養上清液を回収し、プロテインAアフィニティークロマトグラフィーにより培地におけるscFvタンパク質を精製した。図13A、13B及び13Cは、それぞれ精製したヒトHLA-A1-IgG1.Fc、HLA-A2-IgG1.Fc及びPD-1-IgG1.Fc融合タンパク質(矢印)のSDS-PAGE分析結果を示す。

【0316】

実施例14: Expi293F過剰発現システムによる組換えヒトCTLA-4及びPD-L1の調製

【0317】

組換えヒトCTLA-4及びPD-L1の配列は、配列番号: 30及び31に提供される。この2つのタンパク質は、C末端に可撓性リンカー (GGGGSGGGGS) 及び末端システイン残基を有するように設計した。

10

【0318】

上記の実施例と同様に、Expi293F細胞において構築された遺伝子の発現を行った。培地における発現したCTLA-4タンパク質をアフィニティークロマトグラフィーによりCTLA-4に特異的な固定化抗体で精製した。培地における発現したPD-L1タンパク質をアフィニティークロマトグラフィーにより固定化PD-1で精製した。

【0319】

分子構築物の定性分析を12% SDS-PAGEにより行った。図14A及び14BのSDA-PAGE結果は、精製したCTLA-4及びPD-L1 タンパク質がそれぞれ約26 kDa、32 kDaのサイズ(矢印)(予想サイズと同じ)を有することを示している。

20

【0320】

ウェスタンブロッティングにより、組換えCTLA-4タンパク質を分析し、検出した。簡単に言えば、50 µlの精製したCTLA-4タンパク質を12% SDS-PAGEゲル(レーン2)で電気泳動し、PDVF膜にエレクトロブロッティングした。タンパク質(CTLA-4)-IgG1Fc-(scFv HLA-A1)を陽性対照(レーン1)として用いた。TBSTにおいて、室温で5% BSAで1時間ブロックした後、希釈したCTLA-4に特異的なscFv(1 µg/ml)を添加し、4°Cでこの膜とともに静かに振盪しながら一晩インキュベートした。この膜をすすぎ、TBSTで3回洗浄した。希釈したHRP結合プロテインL(1:5000)を加え、室温で膜とともに1時間インキュベートし、TBSTですすぎ及び洗浄サイクルを3回繰り返した。次いで、この膜をHRP基質溶液とともに20分間インキュベートした後、写真フィルムに露光した。

30

【0321】

図14Cは、ウェスタンブロットの結果を示す。この結果は、組換えヒトCTLA-4がCTLA-4に特異的なscFv(レーン2の矢印で示される)により特異的に結合され得ることを示している。CTLA-4に特異的なscFvは、PCT特許出願公開No. WO/2016112870に記載の本発明者の実験室で調製されたものである。

【0322】

組換えPD-L1タンパク質の結合活性をELISAにより濃度50 µg/mlの組換えPD-L1タンパク質でコーティングした96ウェルプレート(100 µl/ウェル)を用いて分析した。余分なPD-L1を洗い流し、固相をブロックした後、100 µl/ウェルで50 µg/ml PD1-IgG1.Fcを加えた。HRP結合ヤギ抗ヒトIgG.Fcにより結合したPD1-IgG1.Fcを確定した。50 µlのTMB基質を加えて発色させた。50 µlの1M HClで反応を停止した。450nmでの吸光度をプレートリーダーで測定した。各バーは、重複サンプルの平均OD450値を表した。

40

【0323】

図14Dは、LISA結果を示す。この結果は、組換えヒトPD-L1が組換えPD1-IgG1.Fcに特異的に結合されることを示している。

【0324】

実施例15: Expi293F過剰発現システムによるHLA-A1に特異的なmAbのscFv及びCD25に特異的なmAbのscFvの調製

【0325】

ヒトHLA-A1に特異的なscFvの V_L 及び V_H は、モノクローナル抗体4-35-7に由来し、ヒトCD2

50

5に特異的なscFvのV_L及びV_Hは、モノクローナル抗体ダクリズマブに由来する。それらの抗体由来のscFvを、C末端に可撓性リンカー（GGGGSGGGGS）及び末端システイン残基を有するように設計した。システイン残基は、種々のリンカーユニットのリンクアームの遊離末端に存在するマレイミド基との結合のために、スルフヒドリル基を提供する。ヒトHLA-A1に特異的なmAbのscFv及びヒトCD25に特異的なmAbのscFvを調製するために、これらの2つの抗体のV_L及びV_HのDNA配列をさらにコドン最適化した。V_L-(GGGGGS)₃-V_H-(GGGGGS)₂-CをコードするDNA配列を合成した。本発明の実験で調製した、ヒトHLA-A1に特異的なmAbのscFv及びヒトCD25に特異的なmAbのscFvのアミノ酸配列は、それぞれ配列番号：32及び33に記載されている。

【0326】

10

上記の実施例と同様に、Expi293F細胞において構築された遺伝子の発現を行った。培養上清液を回収し、プロテインLアフィニティークロマトグラフィーにより培地におけるscFvタンパク質を精製した。図15A、15B及び15Cは、精製したヒトHLA-A1に特異的なmAbのscFvの12% SDS-PAGE、質量分析及びELISA分析を示す。図15AのSDA-PAGE結果は、精製したヒトHLA-A1に特異的なmAbのscFvが約25kDaのサイズ予想サイズと同じ）を有することを示している（矢印）。図15CのELISA結果は、精製したヒトHLA-A1に特異的なmAbのscFvがヒトHLA-A1に特異的に結合されることを示している。PCT特許出願公開No. WO/2016112870に記載されているように調製したTNF- に特異的なscFvを陰性対照として用いた。

【0327】

実施例16: ヒトHLA-A2に特異的なファージディスプレイscFvの構築及び選択

20

【0328】

ヒトHLA-A2に特異的なヒトscFvを有するファージクローンは、中央研究院ゲノミクス研究センター（台湾、台北）のDr. An-Suei Yangの研究室と結約を結んで得た。IgG抗体断片であるG6抗VEGF Fab(タンパク質バンクコード:2FJG)に由来のGH2 scFvライブラリーのフレームワーク配列を、ファージミドベクター-pCANTAB5E(GE Healthcare)の制限部位SfiIとNotIにクローン化した。該ファージミドベクターは、アンピシリン耐性、lacZプロモーター、scFv断片を培養上清液に分泌させるためのpelBリーダー配列、及び検出用のE-タグを有する。オリゴヌクレオチド指向性変異誘発法により、scFvテンプレートのV_H及びV_Lドメインを別々に多様化し、各可変ドメインにおける3つのCDRを同時に多様化した。10⁹を超えたクローンを有するscFvライブラリーを用いて上記の実施例で調製したヒトHLA-A2-IgG .Fc融合タンパク質の選択を行った。

30

【0329】

組換えヒトHLA-A2-IgG1.Fc融合タンパク質でコーティングしたマキシソープ96-ウェルプレート(Nunc)(1µg/100µL PBS/ウェル)を用いて、抗HLA-A2抗体をパニングした。簡単に言えば、室温で、ウェルをブロッキングバッファー(5%スキムミルク含有PBST(0.1%トウイン20を含むリン酸緩衝生理食塩水))で1時間処理した。ブロッキングバッファーにおける組換えファージを6x10¹¹CFU(コロニー形成単位)/mlに希釈した後、抗原コーティングウェルに添加し、1時間静かに振とうした。次いで、ウェルをPBSTで10回激烈に洗浄し、続いてPBSで6回洗浄して非特異的結合ファージを除去した。0.1M HCl/グリシン緩衝液(pH 2.2)で結合したファージを溶出した直後、溶出液を2M トリス塩基緩衝液(pH 9.0)で中和した。大腸菌株ER2738(OD600= ~0.6)を用いて、37 °Cで30分間ファージ感染した。アンピシリンで30分間処理して感染していない大腸菌を除去した。アンピシリン処理後、カナマイシン耐性を有するヘルパーファージM13K07を添加し、さらに1時間インキュベートした。大腸菌培地からヘルパーファージにより救出されたファージを選択し、37 °Cでカナマイシンの存在下で、一晚激烈に振とうして増幅させた。増幅されたファージをPEG/NaClで沈殿させ、次の選択-増幅サイクルのためにPBSに再懸濁させた。この選択増幅-手順を繰り返すことにより、ヒトHLA-A2に対して計3回の連続的パニングラウンドを行った。

40

【0330】

ファージ感染ER2738コロニーを段階的に希釈した後、ファージ力価を計算し、各パニング

50

グラウンド後の出力力価/ml (CFU/ml)を得た。3ラウンドのパンニング後に、ファージ出力力価が $4.0E+05$ CFU /ウェルから $1.0E+09$ CFU/ウェルに2500倍増加した。各ラウンドのファージ出力/入力力価比を図16Aに示す。各パンニングラウンドにおいて、ファージ出力/入力力価比をy軸に示す。3ラウンドのパンニング後に、陽性クローンが明確に富化した。3回目のパンニングラウンドのファージ出力/入力力価は1回目の300倍であり、結合クローンがライブラリーにおいて支配的になった。

【0331】

実施例17: ヒトHLA-A2に特異的なファージディスプレイscFvのシングルコロニーELISA分析

【0332】

シングルクローンファージで感染した大腸菌株ER2738のそれぞれは、そのファージミドに選択scFv遺伝子を持っている。深いウェルに2YTブロス(16g/Lトリプトン、10g/L酵母エキス、5g/L NaCl、pH7.0)及び100 µg/mlアンピシリンを添加し、37 °Cで振とうし、これらの大腸菌を中間対数期まで成長させた。ブロスのOD600が1.0に達した後、IPTGを最終濃度1 µg/mlとなるように添加した。該プレートを37 °Cで一晩激烈に振とうしながらインキュベートした。その後、該プレートを4000g、4 °Cで15分間遠心分離した。

【0333】

ELISAにより、可溶性scFv結合試験を行った。簡単に言えば、マキシソープ96-ウェルプレート(Nunc)をヒトHLA-A2(0.5 µg/100 µl PBS/ウェル)又は2つの陰性対照抗原、ヒト熱ショックタンパク質70(Hsp 70)及びRSV-IgG1.Fc融合タンパク質(本発明者の実験室で調製されたもの)でコーティングし、4 °Cで18時間振とうした。300 µlのブロッキングバッファーで1時間処理した後、分泌scFvを含む上清100 µlを100 µlのブロッキングバッファーに混合し、コーティングされたプレートに添加しさらに1時間処理した。ヤギ抗Eタグ抗体(HRP結合、1:4000, Cat. No. AB19400, Abcam)をプレートに添加し、さらに1時間処理した。ウェルにTMB基質(50 µl/ウェル)を添加し、1N HCl(50 µl/ウェル)の添加により反応を停止した後、450nmにおける吸光度を測定した。

【0334】

3回目のパンニング後に、計192個のファージクローンを本分析に供した。そのうち、10を超えるOD450の差異を有するHLA-A2に結合した12個のscFvクローンを、これらのscFv遺伝子をコードする遺伝子のDNA配列決定によってさらに特徴付けた。8つの異なるDNA配列が同定された。図16Bは、scFvクローン3E10のELISA結果を示す。1.3のOD450でヒトHLA-A2に結合したscFvクローン3E10のアミノ酸配列を配列番号:34に示す。

【0335】

実施例18: ヒトHLA-A1に特異的なテトラジン-scFvの調製

【0336】

上記の実施例に従って、ヒトHLA-A1に特異的なscFv(配列番号: 32)をコードするDNA配列を合成し、発現した。Mal-PEG₄-テトラジン(Conju-probe, Inc.)との結合において、10 µM TCEPと共に静かに振とうしながら室温で4時間インキュベートすることによって、精製したヒトHLA-A1 に特異的なmAbのscFv のC-末端にあるシステイン残基を還元した。NAP-10 Sephadex G-25カラムを用いて、還元型scFvタンパク質を含む緩衝液を、リン酸ナトリウム緩衝液(100mMリン酸ナトリウム、pH7.0、及び50 mM NaCl)に置換した。還元反応及び緩衝液置換後、4°Cで反応モル比10:1([Mal-PEG₄-テトラジン]:[scFv])で一晩反応させることにより結合を行った。余分な架橋剤を脱塩カラムで除去し、テトラジン結合scFv生成物を分析した。

【0337】

質量分析MALDI-TOFの結果は、ヒトHLA-A1に特異的なテトラジン結合scFvのサンプルの分子量が27,462ダルトンであることを示した。ヒトHLA-A1に特異的なテトラジン結合scFvの純度を、12%SDS-PAGEのクーマシーブルーによって分析した。図17A 及び17Bは、それぞれヒトHLA-A1に特異的なテトラジン結合scFvの質量分析及びELISA分析を示し、ここで、未修飾のヒトHLA-A1に特異的なscFvを陽性対照とした。ELISAの結果から分かるように、ヒトHLA-A1に特異的なテトラジン結合scFvが組換えHLA-A1に結合された

10

20

30

40

50

【 0 3 3 8 】

実施例19:3つのCTLA-4分子と、TCO-ペプチド1に基づく3つのマレイミド-PEG₁₂ リンクアームとの結合

【 0 3 3 9 】

3つのマレイミド-PEG₁₂ リンクアームを有するTCO-ペプチド1との結合前に、CTLA-4とTCEPとをモル比2:1([TCEP]:[タンパク質])で室温で静かに振とうしながら4時間インキュベートすることにより、そのC末端システインを還元状態に維持した。その後、NAP-10 Sephadex G-25カラム(GE Healthcare)を用いて、還元型CTLA-4タンパク質を含む緩衝液を、マレイミド-SH結合反応緩衝液(100 mM リン酸ナトリウム、pH7.0及び50mM NaCl)に置換した。還元反応及び緩衝液交換の後、4°Cで、1:4([リンカー]:[タンパク質])のモル比で、3つ

10

【 0 3 4 0 】

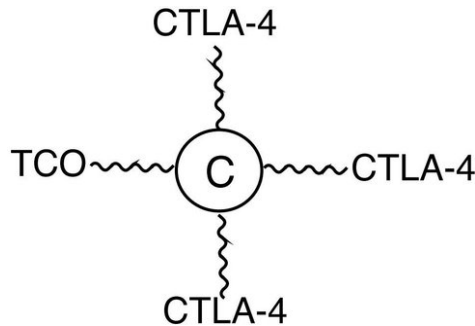
反応混合物をサイズ排除クロマトグラフィーカラムS75に使用した。3つのCTLA-4分子に結合されたPEG₁₂-マレイミド結合TCO-ペプチド1をサイズ排除クロマトグラフィーカラムS75により、遊離CTLA-4、遊離PEG₁₂-マレイミド結合TCO-ペプチド1及び1つ及び2つのCTLA-4分子に結合されたPEG₁₂-マレイミド結合TCO-ペプチド1から分離した。精製した生成物(3つのCTLA-4分子に結合されたマレイミド-PEG₁₂結合TCO-ペプチド1)を濃縮し、緩衝液をクリック反応緩衝液(100mM リン酸カリウム;pH 7.0)に交換した。

【 0 3 4 1 】

以下は、このようにして合成したエフェクターリンカーユニットであり、1つの遊離TCO官能基及び1つのセットの3つのCTLA-4分子(エフェクター成分)を有するリンカーユニットから構成される。

20

【 0 3 4 2 】



30

【 0 3 4 3 】

実施例20: TCO-ペプチド1に基づく3つのマレイミド-PEG₁₂ リンクアームに結合された3つのCTLA-4分子を有するエフェクターリンカーユニットのSDS-PAGE分析

【 0 3 4 4 】

TCO-ペプチド1に基づく3つのマレイミド-PEG₁₂ リンクアームに結合される3つのCTLA-4分子を有するエフェクターリンカーユニットのサンプルは、8% SDS-PAGEで分析した。実験的分子量のサイズは、3つのマレイミド-PEG₁₂ リンクアームを有するTCO-ペプチド1に結合される3つのCTLA-4分子の理論分子量のサイズと一致した。3つのマレイミド-PEG₁₂ リンクアームを有するTCO-ペプチド1とCTLA-4分子との結合後の反応混合物についてSDS-PAGE分析を行った。生成物について10% SDS-PAGE分析を行った結果、3つのCTLA-4分子に結合されるTCO-ペプチド1に対応する弱いバンドを示している。

40

【 0 3 4 5 】

実施例21:3つのPD-L1分子有するTCO-ペプチド1に基づくエフェクターリンカーユニットの調製

【 0 3 4 6 】

ヒトPD-L1とリンカーユニットとの結合、並びに生成物の精製及び分析を前の実施例に記載のプロトコールに従って実施した。

【 0 3 4 7 】

50

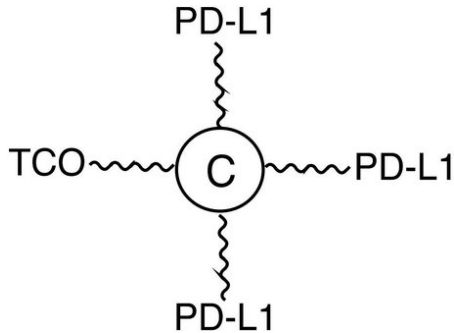
図18は、3つのマレイミド-PEG₁₂リンクアームを有するTCO-ペプチド1とPD-L1分子(レーン1)との結合後の反応混合物の10% SDS-PAGE分析を示す。矢印 #1、#2は、それぞれ3つ及び2つのPD-L1分子に結合されたTCO-ペプチド1である。

【0348】

TCO-ペプチド1に基づく3つのマレイミド-PEG₁₂リンクアームに結合される3つのPD-L1を有するエフェクターリンカーユニットのサンプルをMALDI-TOFにより分析した。実験的分子量の中央値は、3つのマレイミド-PEG₁₂リンクアームを有するTCO-ペプチド1に結合される3つのPD-L1の理論分子量の中央値と一致した。以下に示す合成したエフェクターリンカーユニットは、1つの遊離TCO官能基及び1つのセットの3つのPD-L1分子(エフェクター成分)を有するリンカーユニットから構成される。

10

【0349】



20

【0350】

実施例23: ヒトCD25分子に特異的な3つのscFvを有するTCO-ペプチド1に基づくエフェクターリンカーユニットの調製

【0351】

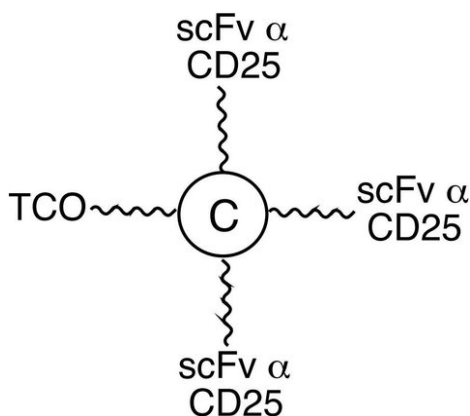
ヒトCD25に特異的なscFvとリンカーユニットとの結合、並びに生成物の精製及び分析を前の実施例に記載のプロトコールに従って実施した。

【0352】

以下に示す合成したエフェクターリンカーユニットは、1つの遊離TCO官能基及びヒトCD25の細胞外ドメインに特異的な1つのセットの3つのscFv(エフェクター成分)を有するリンカーユニットから構成される。

30

【0353】



40

【0354】

実施例22: 標的化成分としてHLA-A1に特異的な1つのscFv及びエフェクター成分として3つのCTLA-4分子を有する分子構築物の調製

【0355】

この例では、上記実施例のエフェクターリンカーユニットとテトラジン結合ヒトHLA-A1に特異的なscFvとをテトラジン-TCO iEDDA反応により結合した。具体的には、エフェクターリンカーユニットは、3つのCTLA-4分子及び1つの遊離TCO基を有する。

【0356】

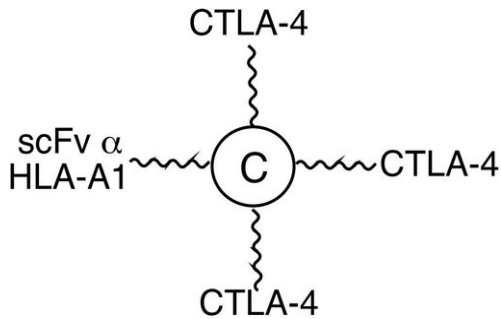
50

製造者(Jena Bioscience GmbH, Jena, Germany)の指示に従って、テトラジン-TCOライゲーションを行った。簡単に言えば、100 μ lの標的化リンカーユニット(0.3mg/ml)をエフェクターユニットを含む溶液に1:2([テトラジン]:[TCO])のモル比で加えた。室温で反応混合物を3時間インキュベートした。

【0357】

質量分析において、実験的分子量の中央値は、得られたジョイント-リンカー分子構築物の理論分子量の中央値と一致した。以下に示す得られた単一リンカー分子構築物は、標的化成分としてヒトHLA-A1に特異的な1つのscFv及びエフェクター成分として3つのCTLA-4分子を有する。

【0358】



【0359】

実施例23: 標的化成分としてHLA-A1に特異的な1つのscFv及びエフェクター成分として3つのPD-L1分子を有する分子構築物の調製

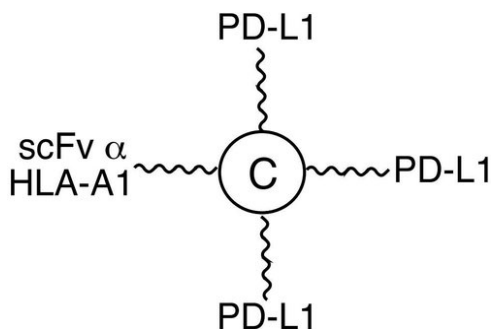
【0360】

この例では、上記の実施例のエフェクターリンカーユニットとテトラジン結合ヒトHLA-A1に特異的なscFvとをテトラジン-TCO iEDDA反応により結合した。具体的には、エフェクターリンカーユニットは、3つのPD-L1分子及び1つのTCO基を有する。テトラジン-TCOライゲーションの手順は、上記の実施例と同様であった。

【0361】

以下は、標的化成分としてヒトHLA-A1に特異的な1つのscFv及びエフェクター成分として3つのPD-L1分子を有する得られた単一リンカー分子構築物を示す。

【0362】



【0363】

図19は、標的化成分としてヒトHLA-A1に特異的な1つのscFv及びエフェクター成分として3つのPD-L1分子を有する得られた単一リンカー分子構築物の反応混合物(レーン2)の10% SDS-PAGE分析を示す。レーン1は、3つのマレイミド-PEG₁₂リンクアームを有するTCO-ペプチド1とPD-L1分子との結合後の反応混合物を示した。矢印 #1(レーン2)は、標的化成分としてヒトHLA-A1に特異的な1つのscFv及びエフェクター成分として3つのPD-L1分子を有する単一リンカー分子構築物である。矢印 #2及び#3は、それぞれ3つ及び2つのPD-L1分子に結合されたTCO-ペプチド1である。

【0364】

実施例24: 標的化成分としてHLA-A1に特異的な1つのscFv及びエフェクター成分としてヒトCD25に特異的な3つのscFvを有する分子構築物の調製

10

20

30

40

50

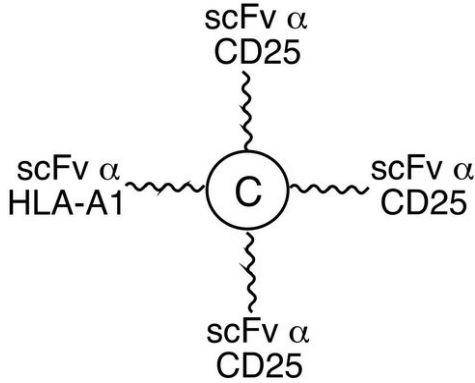
【 0 3 6 5 】

この例では、上記の実施例のエフェクターリンカーユニットとテトラジン結合ヒトHLA-A1に特異的なscFvとをテトラジン-TCO iEDDA反応により結合した。具体的には、エフェクターリンカーユニットは、ヒトCD25の細胞外ドメインに特異的な3つのscFv及び1つの遊離TCO基を有する。テトラジン-TCOライゲーシヨンの手順は、上記の実施例と同様であった。

【 0 3 6 6 】

以下に示す得られたジョイント-リンカー分子構築物は、標的化成分としてヒトHLA-A1に特異的な1つのscFv及びエフェクター成分としてヒトCD25の細胞外ドメインに特異的な3つのscFvを有する。

【 0 3 6 7 】



10

20

【 0 3 6 8 】

実施例25: 標的化成分としてHLA-A1に特異的な1つのscFv及びエフェクター成分として5つのシロリムス-Gly分子を有する分子構築物の調製

【 0 3 6 9 】

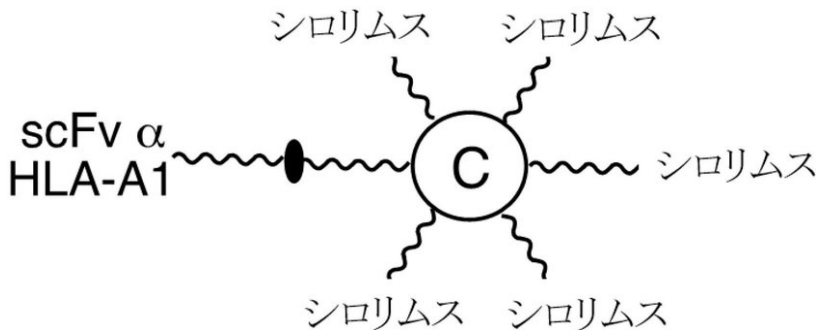
この例では、ヒトHLA-A1に特異的な1つのscFv及び5つのシロリムス-Gly分子の薬物バンドルを有する分子構築物を構築した。この分子構築物は、TCO-テトラジン iEDDA反応により作製した。テトラジン-TCOライゲーシヨンの手順は、上記の実施例と同様であった。

【 0 3 7 0 】

MALDI-TOF質量分析は、実験的分子量の中央値が得られたジョイント-リンカー分子構築物の理論分子量の中央値と一致することを示している。以下に示す生成物は、ヒトHLA-A1に特異的な1つのscFv及び5つのシロリムス-Gly分子を含む1つの薬物バンドルを有する分子構築物である。

30

【 0 3 7 1 】



40

【 0 3 7 2 】

実施例26: 標的化成分としてHLA-A1に特異的な1つのscFv及びエフェクター成分として5つのフィンゴリモド分子を有する分子構築物の調製

【 0 3 7 3 】

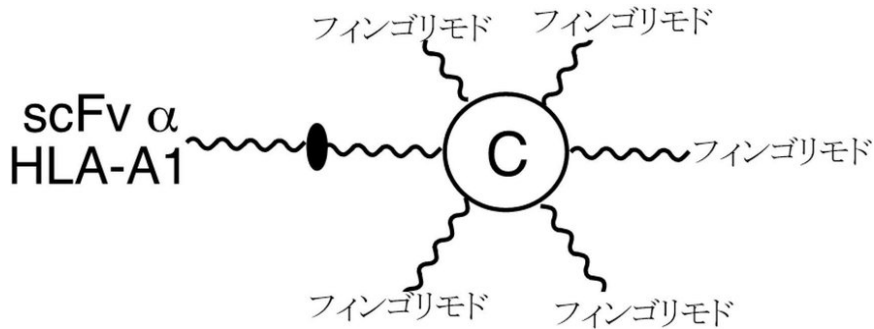
この例では、ヒトHLA-A1に特異的な1つのscFv及び5つのフィンゴリモド分子の薬物バンドルを有する分子構築物を構築した。この分子構築物は、TCO-テトラジン iEDDA反応により作製された。テトラジン-TCOライゲーシヨンの手順は、上記の実施例と同様であった。

【 0 3 7 4 】

50

実験的分子量の中央値は、得られたジョイント-リンカー分子構築物の理論分子量の中央値と一致した。以下に示す生成物は、ヒトHLA-A1に特異的な1つのscFv及び5つのフィンゴリモド分子を含む1つの薬物バンドルを有する分子構築物である。

【0375】



10

【0376】

実施例27: NHS-S-S-PEG₃-アジドリンクアームに結合されたシロリムスの生物学的活性分析

【0377】

ラパマイシンの哺乳動物標的(mTOR)は、T細胞の活性化と増殖を制御するプロテインキナーゼである。ラパマイシンとしても知られているシロリムスは、イムノフィリン、FK結合タンパク質(FKBP12)に結合することによって間接的にmTORを阻害する。次いで、ラパマイシンとFKBP12との複合体は、mTORと相互作用し、その下流標的であるp70 S6キナーゼ(p70S6K)をリン酸化する機能を阻害し、細胞の活性化及び増殖の阻害をもたらす。

20

【0378】

これらの修飾したシロリムス分子(シロリムス-Gly、シロリムス-diGly及びアジド-PEG₃-S-S結合シロリムス-Gly)の合成は、上記の実施例に示された。これらの化合物の生物学的活性を確定するため、mTOR/p70S6Kシグナル伝達経路のウエスタンブロット分析及びT細胞増殖分析をヒトジャーカットT細胞により行った。T細胞の生存率及び増殖を、AlamarBlue(登録商標)細胞生存性試薬(Invitrogen)を用いて評価した。

【0379】

mTOR/p70S6Kシグナル伝達経路のウエスタンブロット分析では、簡単に言えば、ジャーカットT細胞を6cmの細胞培養皿(10%ウシ胎仔血清を含むRPMI1640培地)に接種した。1時間後、細胞を10ng/mlのIL2、及び100nMのシロリムス、シロリムス-Gly、アジド-PEG₃-S-S結合シロリムス-Gly、シロリムス-diGlyで24時間共処理した。

30

【0380】

次いで細胞を金溶解緩衝液(30mM Tris-HCl(pH7.9), 5mM EGTA, 137mM NaCl, 15% グリセロール, 1% Triton X-100及び1X プロテアーゼ阻害剤カクテルを含有)中で溶解した。4°Cで14,000 × gで20分間遠心分離して不溶性物質を回収した。10% SDS-PAGEゲルにより細胞溶解物のサンプルを分離し、PVDF膜(Millipore)に移した。室温で5% BSA含有するPBSにおいて膜ブロットを1時間ブロックし、一次抗体、抗ホスホp70S6K抗体(Cell Signaling Technology, Danvers, USA)及び抗p70S6K抗体(Cell Signaling Technology)と共に4°Cで一晩インキュベートした。20mM Tris-HCl(pH7.6), 0.8%(w/v)NaCl及び0.25% Tween-20を含有するTBSTで3回洗浄した後、ブロットを西洋ワサビペルオキシダーゼ(Millipore)と結合されたヤギ抗マウスIgG.Fc抗体と共にインキュベートした。その後、膜をTBSTで3回洗浄し、ECLTMウエスタンブロットインク検出試薬(Millipore)により免疫反応性バンドを検出し、Fujifilm(Tokyo, Japan)に暴露した。Image J(NIH, Bethesda, MD, USA)を用いてX線フィルム上のECL信号の相対定量を分析した。

40

【0381】

図20Aは、ウエスタンブロット分析による、シロリムス、シロリムス-Gly、シロリムス-diGly及びアジド-PEG₃-S-S結合シロリムス-Glyの、ジャーカットT細胞におけるmTORタンパク質に対する影響を示す。図20Aに示すように、総p70S6Kタンパク質レベルに変化はなく

50

、シロリムス及びシロリムス誘導体化合物で処理した細胞において、p70S6Kのリン酸化レベルが低減した。この結果、処理したT細胞におけるmTOR/p70S6Kシグナル経路は、シロリムス誘導体化合物によってブロックされ、未修飾のシロリムスと同様の効果を有することを示している。

【0382】

T細胞増殖分析では、ジャーカットT細胞(2×10^4 /ウェル)を96ウェルプレート(10%ウシ胎仔血清を含むRPMI1640培地)に接種した。1時間後、細胞を10 ng/mlのIL2を用いて又は用いずに処理した。24時間インキュベートした後、細胞を異なる濃度(200nMから2倍希釈)のシロリムス、シロリムス-Gly、アジド-PEG₃-S-S結合シロリムス-Gly、及びシロリムス-di Glyで24時間、48時間、72時間処理した。alarBlue細胞生存性試薬キット(Invitrogen)により製造業者の説明に従って細胞の生存率を測定した。

10

【0383】

図20Bは、シロリムス、シロリムス-Gly、シロリムス-diGly及びアジド-PEG₃-S-S結合シロリムス-Glyの生物学的活性の分析結果を示す。その結果は、シロリムス誘導体化合物は、未修飾のシロリムスと同様のmTORの活性を阻害する生物学的活性を有する。

【0384】

実施例28: リンクアームを介してペプチドコアに結合されたフィンゴリモドの生物学的活性分析

【0385】

フィンゴリモドは、シンゴシン-1リン酸塩(S1P)受容体-1(S1P₁)機能の機能的アンタゴニストとして使用されているため、フィンゴリモドで前処理した、S1P₁受容体を発現する細胞は、その後のS1P刺激に対して応答しない(Pedro J. et al., 2012)。フィンゴリモドの、S1P₁機能を調節する能力は、S1P₁を膜から細胞質コンパートメントに迅速に内在化するその能力に依存し、それにより、細胞が外部S1Pシグナルに応答することができなくなる。最近のデータは、フィンゴリモドのリン酸化形態がS1P受容体に結合し、Tリンパ球及びBリンパ球の放出及び循環をブロックすることを示している。

20

【0386】

これらの修飾したフィンゴリモド分子(NHS-PEG₅結合フィンゴリモド、1つの遊離TCO官能基及び5つのフィンゴリモド分子を有する薬物バンドル)の合成は、上記の実施例に示される。ヒトPBMC(末梢血単核細胞)から単離されたヒト初代B細胞により、S1P駆動型トランスウェル遊走分析を行うことにより、3つの化合物の生物学的活性を調べた。

30

【0387】

ヒト初代B細胞の調製において、B細胞分離キット(MyItenyi Biotech)によりヒトB細胞をヒトPBMC(末梢血単核細胞)から単離した。その後、単離されたB細胞を15cmのディッシュに接種し、10%ウシ胎仔血清(Gibco)及び20 ng/ml IL2(Peprotech Inc.)を添加したIMDM培地に維持した。

【0388】

図21Aは、単離されたS1P₁受容体発現ヒトB細胞の染色分析を示す。2x10⁵個のB細胞を10 µg/mlの抗S1P₁受容体抗体(AbD Serotec)とともに、1%BSA含有PBSにより氷上で30分間インキュベートした。細胞を洗浄し、PBS/BSAで1:200に希釈したFITC結合ヤギ抗マウスIgGにより、暗所、氷上で30分間インキュベートした。次いで、該細胞をFACS(FACSCanto II, BD Biosciences)により分析した。

40

【0389】

走化性分析において、100 µlの維持されたヒトB細胞(4x10⁵個の細胞)を1.5mlのエッペンドルフチューブに移転し、フィンゴリモド、フィンゴリモドリン酸塩、NHS-PEG₅結合フィンゴリモド、又は遊離TCO官能基と5つのフィンゴリモド分子を有する薬物バンドルをそれぞれ最終濃度が1及び10 µMとなるように添加し、37 °Cで4時間反応させた。その後、100 µlの処理されたB細胞を、5 µm細孔ポリエステル膜インサート(Corning)を有する6.5mmのトランスウェルの上部チャンパーに添加し、トランスウェルの下部チャンパーに最終濃度10 nMのS1Pを有する500 µlのIMDM培地を含む。3時間後、下部チャンパーにおける遊走した細

50

胞を収集し、さらにトリパンブルーで染色し、血球計数器により計数した。各測定において、以下のように比遊走率を計算した。即ち、[(下部チャンバーにおける細胞数)/(上部+下部チャンバーにおける細胞数)x100]-(0nM誘引物質での細胞遊走百分率)]である。比細胞遊走百分率を図21Bに示す。

【0390】

図21Bは、NHS-PEG₅結合フィンゴリモド、及び1つの遊離TCO官能基と5つのフィンゴリモド分子を有する薬物バンドルの生物学的活性の分析結果を示す。この結果は、リンクアームと結合したフィンゴリモド分子がB細胞遊走を阻止する上に、非修飾フィンゴリモドと同様の生物学的活性を有することを示した。

【0391】

実施例29: CTLA-4及びHLA-A1に特異的なscFvを含む二本鎖IgG1.Fc融合タンパク質をコードする遺伝子セグメントの構築

【0392】

アバターセプトは、ヒトIgG1のFc領域とCTLA-4の細胞外ドメインと融合して形成された融合タンパク質である。組換え鎖にアバターセプト-(scFv HLA-A1)を構築することにより、二本鎖IgG.Fc融合タンパク質を調製した。アバターセプトのC-末端を可撓性リンカー(GGGGS)₂を介してヒトHLA-A1に特異的なscFv 4-35-7のN-末端に融合した。

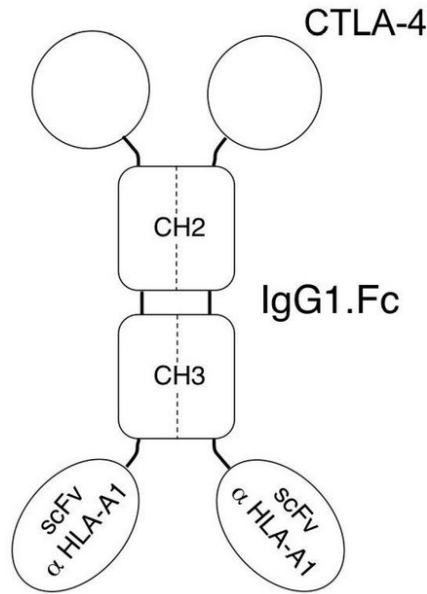
【0393】

(ヒトHLA-A1に特異的な)scFv は、V_L-リンカー-V_Hの配向を有する。scFv におけるV_L及びV_Hは、親水性リンカーである(GGGGS)₃を介して結合された。IgG1.Fc融合タンパク質分子構築物における組換え鎖の配列を配列番号:35に示す。

【0394】

以下は、調製した二本鎖CTLA-4-hIgG1.Fc-(scFv HLA-A1)分子構築物の構成である。

【0395】



【0396】

実施例30: 組換え二本鎖 CTLA-4-hIgG1.Fc-(scFv HLA-A1)融合タンパク質の発現及び精製

【0397】

本実施例において、遺伝子をコードする配列をpcDNA3発現カセットに入れた。Expi293F細胞を2.0×10⁶生存細胞/mlの密度でExpi293F発現培地に接種した後、トランスフェクションの際に細胞が活発な分裂の状態にあることを確保するために、18~24時間維持した後トランスフェクションした。トランスフェクションの際に、7.5×10⁸個の細胞を入れた255mlの培地を2Lのエルレンマイヤーシェーカーフラスコに入れた後、ExpiFectamineTM293トランスフェクション試薬でトランスフェクションした。トランスフェクション後、オービ

10

20

30

40

50

タルシェーカー(125 rpm)においてトランスフェクションされた細胞を37℃で16~18時間インキュベートし、次いで、そこにExpiFectamine™293トランスフェクションエンハンサー1及びエンハンサー2を加えた後、7日間インキュベートした。培養上清液を回収し、プロテインAクロマトグラフィーにより培地における組換え二本鎖CTLA-4-hIgG1.Fc-(scFv HLA-A1)融合タンパク質を精製した。緩衝液をPBSに交換した後、8%SDS-PAGEによりCTLA-4-hIgG1.Fc-(scFv HLA-A1)タンパク質の濃度を測定し分析した。その結果を図22Aに示した。Fc融合分子構築物の主要なバンド(矢印)が約72kDa(予想サイズと同じ)に観察された。

【0398】

実施例31:組換え二本鎖CTLA-4-hIgG1.Fc-(scFv HLA-A1)融合タンパク質の結合のELISA分析 10

【0399】

ELISAにより、濃度5µg/mlの組換えCTLA-4-hIgG1.Fc-(scFv HLA-A1)タンパク質でコーティングした96ウェルプレート(100µl/ウェル)を用いて組換えCTLA-4-hIgG1.Fc-(scFv HLA-A1)の結合活性を分析した。本発明者の実験室で調製した(scFv エンドトキシン)-hIgG1.Fc-(scFv CD32a)を陰性対照として使用した。

【0400】

200µlのブロッキングバッファーで1時間処理した後、100µlの抗CTLA-4 scFvをコーティングしたプレートに添加しさらに1時間処理した。その後、HRP結合タンパク質L(1:5000)をコーティングしたプレートに添加し1時間処理した。次いで、50µlのTMB基質を加えて発色させた。50µlの1M HClを加えて反応を停止した。450nmでの吸光度をプレートリーダーで測定した。各バーは、重複サンプルの平均OD450値を表している。 20

【0401】

図22Bは、本発明の分子構築物のELISA分析を示す。ELISA結果は、CTLA-4-hIgG1.Fc-(scFv HLA-A1)融合タンパク質がCTLA-4に特異的な scFvによって特異的に結合されることを示している。CTLA-4に特異的なscFvは、PCT特許出願公開No. WO/2016112870に記載されている本発明者の実験室で調製された。

【0402】

組換えCTLA-4-hIgG1.Fc-(scFv HLA-A1)の結合活性をELISAにより組換えHLA-A1タンパク質でコーティングした96ウェルプレート(濃度:5µg/ml;100µl/ウェル)を用いて分析した。GSTタンパク質(Dr. Kuo I Lin, Genomics Research Center, Academia Sinica, Taipei, Taiwanからのサンプル)を陰性対照として使用した。 30

【0403】

200µlのブロッキングバッファーで1時間処理した後、100µlの組換えCTLA-4-hIgG1.Fc-(scFv HLA-A1)(濃度5µg/ml)をコーティングしたプレートに添加しさらに1時間処理した。その後、HRP結合ヤギ抗ヒトIgG.Fc(1:2000)をコーティングしたプレートに添加し1時間処理した。次いで、50µlのTMB基質を加えて発色させた。50µlの1M HClを加えて反応を停止した。450nmでの吸光度をプレートリーダーで測定した。各バーは、重複サンプルの平均OD450値を表している。

【0404】

図22Cは、本発明の分子構築物のELISA分析を示す。ELISA結果は、CTLA-4-hIgG1.Fc-(scFv HLA-A1)融合タンパク質がヒトHLA-A1に特異的に結合されたことを示している。 40

【0405】

実施例32:組換え二本鎖(PD-L1)-hIgG4.Fc-(scFv HLA-A1)融合タンパク質の調製

【0406】

ヒトPD-L1を可撓性のヒンジ領域を介してIgG4.FcのCH2ドメインのN-末端に融合し、ヒトHLA-A1に特異的なscFv 4-35-7を可撓性リンカー(GGGGS)₃を介してCH3ドメインのC-末端に融合することにより、PD-L1-CH2-CH3-scFv(ヒト 4)組換え鎖を構築した。

【0407】

scFvは、V_L-リンカー-V_H配向を有する。scFvにおけるV_L及びV_Hは、親水性リンカーである 50

(GGGGS)₃を介して結合された。IgG1.Fc融合タンパク質分子構築物における組換え鎖の配列を配列番号:36に示す。

【0408】

新しい構築物についてSDS-PAGE及びELISAにより定性分析を行った。図23AのSDA-PAGE結果は、新しい構築物の組換え鎖が約80kDaのサイズ(矢印)(予想サイズと同じ)を有することを示している。

【0409】

ELISAにより、濃度5 µg/mlの組換え(PD-L1)-hIgG4.Fc-(scFv HLA-A1)タンパク質でコーティングした96ウェルプレート(100 µl/ウェル)を用いて組換え(PD-L1)-hIgG4.Fc-(scFv HLA-A1)の結合活性を分析した。余分な(PD-L1)-hIgG4.Fc-(scFv HLA-A1)を洗い流し、固相をブロックした後、100 µl/ウェルで5 µg/ml抗PD-L1抗体を加えた。結合した抗PD-L1抗体をHRP結合ヤギ抗ヒトIgG.Fcにより確定した。50 µlのTMB 基質を加えて発色させた。50 µlの1M HClで反応を停止した。450nmでの吸光度をプレートリーダーで測定した。各バーは、重複サンプルの平均OD450値を表した。図23Bは、ELISA結果を示す。この結果は、ヒトPD-L1に特異的なmAb(MPDL3280A, Dr. An Suei Yang, Genomics Research Center, Academia Sinica, Taipei, Taiwanからのサンプル)が(PD-L1)-hIgG4.Fc-(scFv HLA-A1)に特異的に結合されたことを示している。

10

【0410】

ELISAにより、濃度10 µg/mlの組換え(PD-L1)-hIgG4.Fc-(scFv HLA-A1)タンパク質でコーティングした96ウェルプレート(100 µl/ウェル)を用いて組換え(PD-L1)-hIgG4.Fc-(scFv HLA-A1)の結合活性を分析した。余分な(PD-L1)-hIgG4.Fc-(scFv HLA-A1)を洗い流し、固相をブロックした後、100 µl/ウェルで10 µg/mlのPD1-IgG1.Fcを加えた。結合したPD1-IgG1.FcをHRP結合ヤギ抗ヒトIgG.Fc(1:2000)により確定した。50 µlのTMB 基質を加えて発色させた。50 µlの1M HClで反応を停止した。450nmでの吸光度をプレートリーダーで測定した。各バーは、重複サンプルの平均OD450値を表した。図23Cは、組換えヒト(PD-L1)-hIgG4.Fc-(scFv HLA-A1)が組換え(PD1)-hIgG1.Fcに特異的に結合されたことを示している。(レテプラゼ)-hIgG4.Fc-(scFv フィブリン)融合タンパク質(本発明者の実験室で調製したもの)を陰性対照とした。

20

【0411】

ELISAにより、濃度10 µg/mlの組換えヒトHLA-A1タンパク質でコーティングした96ウェルプレート(100 µl/ウェル)を用いて組換え(PD-L1)-hIgG4.Fc-(scFv HLA-A1)とヒトHLA-A1との結合活性を分析した。余分な HLA-A1タンパク質を洗い流し、固相をブロックした後、100 µl/ウェルで10 µg/ml(PD-L1)-hIgG4.Fc-(scFv HLA-A1)を加えた。結合した(PD-L1)-hIgG4.Fc-(scFv HLA-A1)をHRP結合ヤギ抗ヒトIgG.Fcにより確定した。50 µlのTMB 基質を加えて発色させた。50 µlの1M HClで反応を停止した。450nmでの吸光度をプレートリーダーで測定した。各バーは、重複サンプルの平均OD450値を表した。図18Dは、組換えヒト(PD-L1)-hIgG4.Fc-(scFv HLA-A1)が組換えHLA-A1に特異的に結合されたことを示している。GSTタンパク質を陰性対照として使用した。

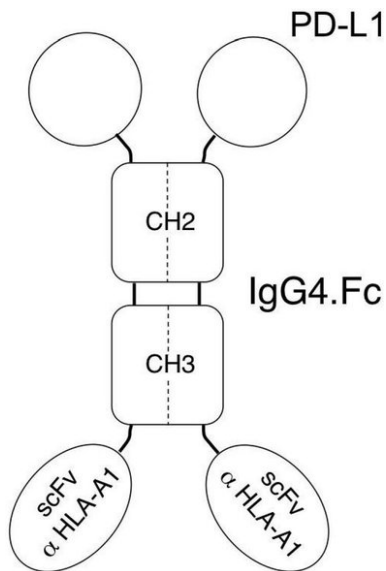
30

【0412】

以下は、調製した二本鎖(PD-L1)-hIgG4.Fc-(scFv HLA-A1)分子構築物の構成である。

40

【0413】



10

【 0 4 1 4 】

実施例33:二本鎖(scFv CD25)-hIgG4.Fc-(scFv HLA-A1)融合タンパク質をコードする遺伝子セグメントの構築

【 0 4 1 5 】

ヒトCD25に特異的なscFvのV_L及びV_Hは、モノクローナル抗体ダクリズマブに由来する。組換え鎖に(scFv CD25)-CH2-CH3-(scFv HLA-A1)(ヒト 4)を構築することにより、二本鎖IgG.Fc融合タンパク質を調製した。ヒトCD25に特異的なscFvのC-末端を短いリンカーASGGGを介してCH2のN-末端に融合した。HLA-A1に特異的なscFvを可撓性リンカー(GGGG)₃を介してCH3ドメインのC-末端に融合した。

20

【 0 4 1 6 】

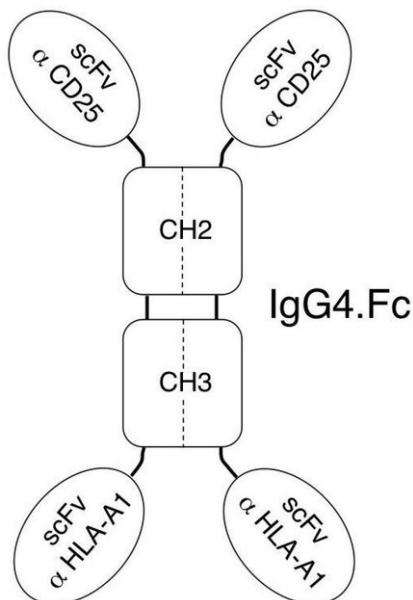
2つのscFvは、V_L-リンカー-V_Hの配向を有する。上記の2つのscFvのそれぞれにおけるV_L及びV_Hは、親水性リンカーである(GGGG)₃を介して結合された。IgG4.Fc融合タンパク質分子構築物における組換え鎖の配列を配列番号:37に示す。Fc融合タンパク質の調製は、上記の実施例と同様である。

【 0 4 1 7 】

以下は、調製した二本鎖(scFv CD25-IgG4.Fc-(scFv HLA-A1)分子構築物の構成である。

30

【 0 4 1 8 】



40

【 0 4 1 9 】

50

実施形態の上記の説明が単なる例として与えられており、当業者によって様々な変更がなされ得ることが理解されるだろう。上記の明細書、実施例及びデータは、本発明の例示的な実施形態の構造及び使用の完全な説明を提供する。本発明の様々な実施形態が、ある程度具体的に、又は1又は複数の個々の実施形態を参照して、上述されているが、当業者は、本発明の精神又は範囲から逸脱することなく、開示された実施形態に多数の変更を行うことができる。

【図1A】

10A

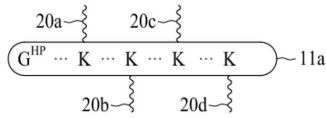


FIG. 1A

【図1B】

10B

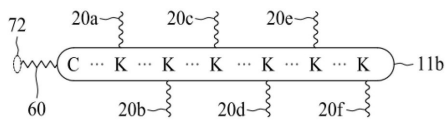


FIG. 1B

【図1C】

10C

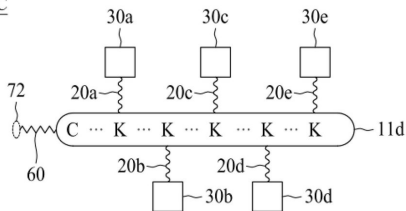


FIG. 1C

【図1D】

10D

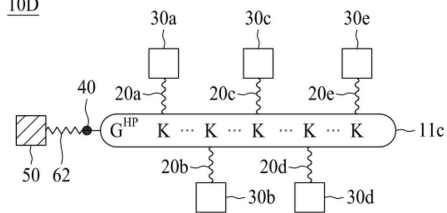


FIG. 1D

【図1E】

10E

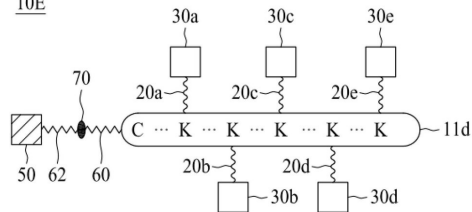


FIG. 1E

【 1 F 】

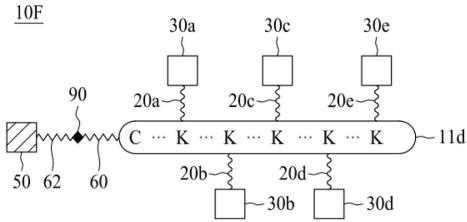


FIG. 1F

【 1 I 】

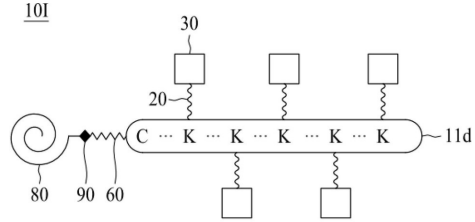


FIG. 1I

【 1 G 】

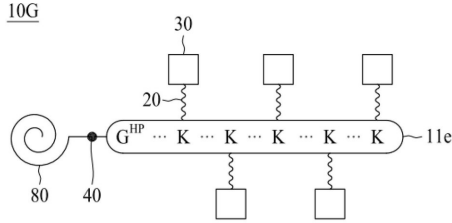


FIG. 1G

【 1 J 】

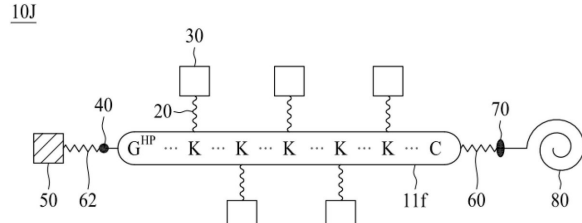


FIG. 1J

【 1 H 】

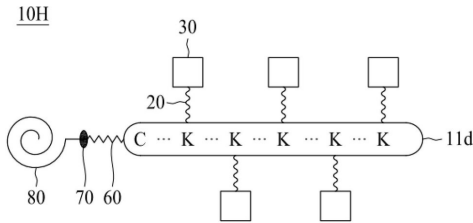


FIG. 1H

【 1 K 】

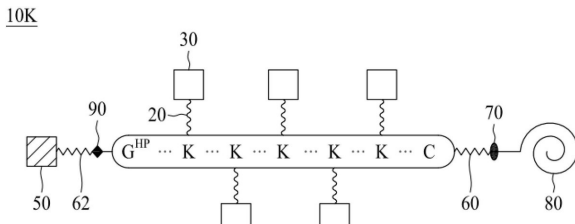


FIG. 1K

【 2 B 】

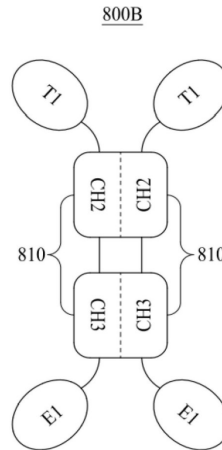


FIG. 2B

【 2 A 】

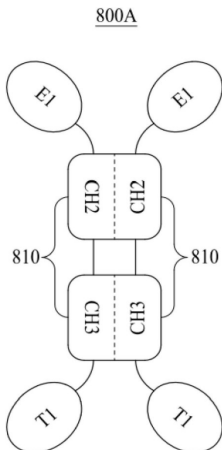


FIG. 2A

【 図 2 C 】

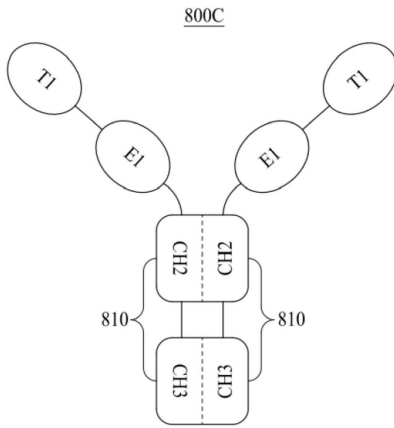


FIG. 2C

【 図 3 】

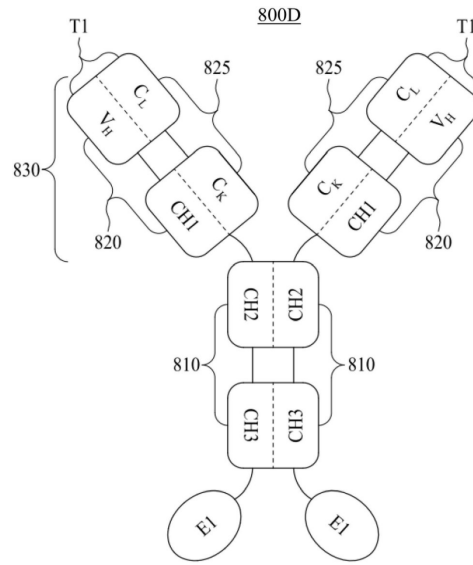


FIG. 3

【 図 4 A 】

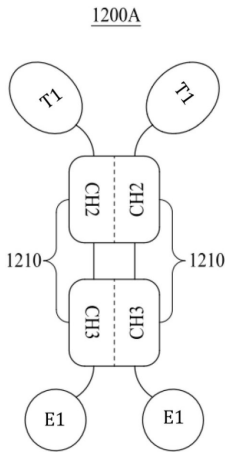


FIG.4A

【 図 4 B 】

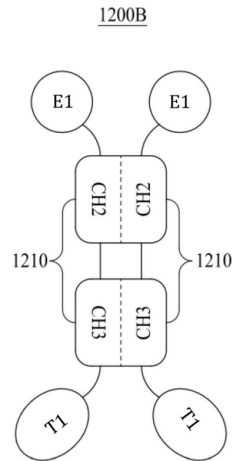


FIG. 4B

【 図 4 C 】

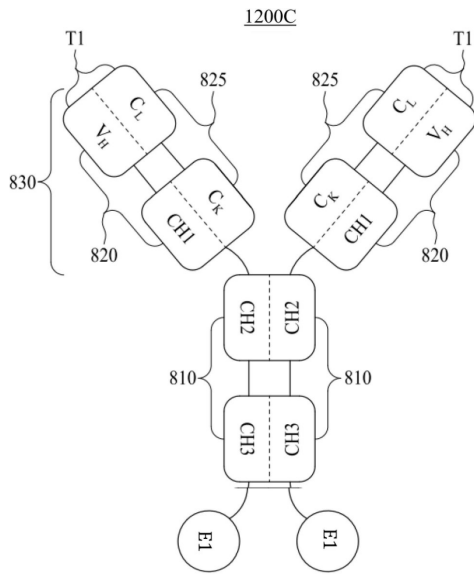


FIG. 4C

【 図 5 A 】

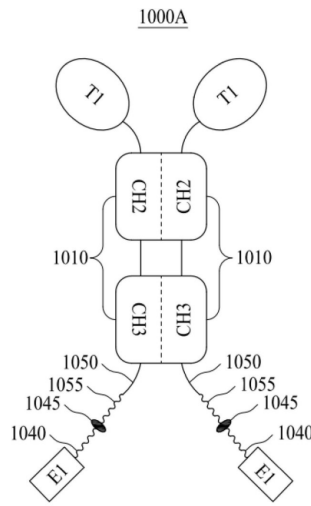


FIG. 5A

【 図 5 B 】

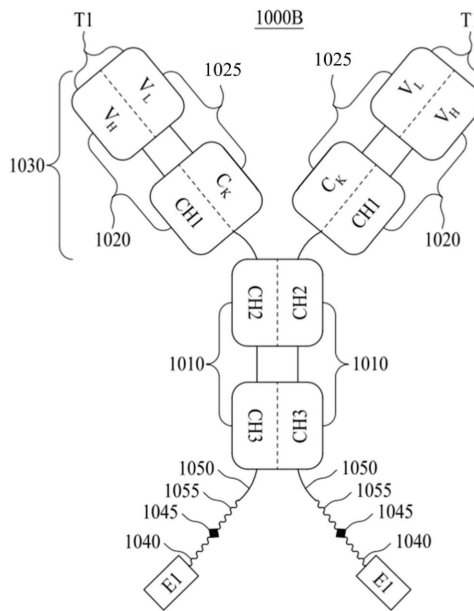


FIG. 5B

【 図 6 A 】

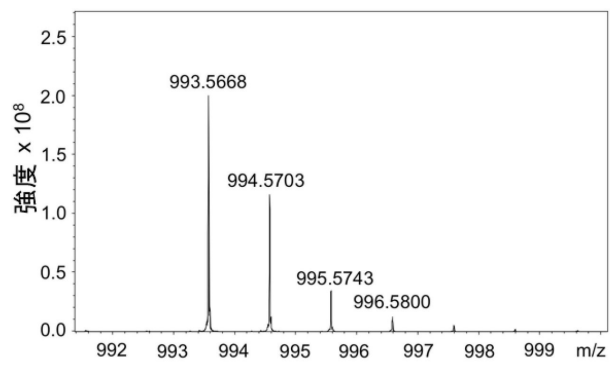


FIG. 6A

【 図 6 B 】

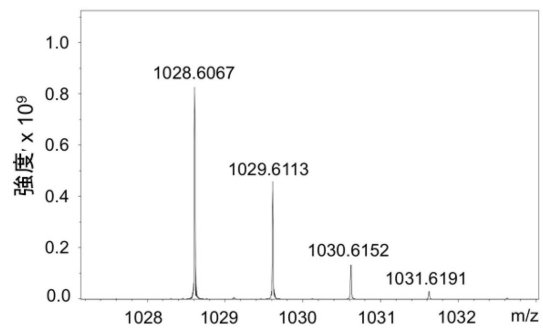


FIG. 6B

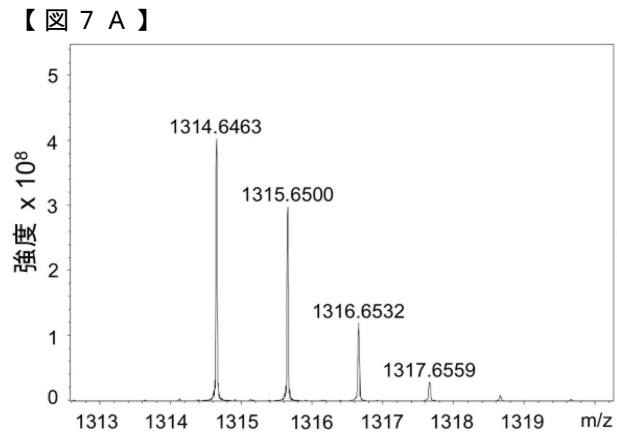


FIG. 7A

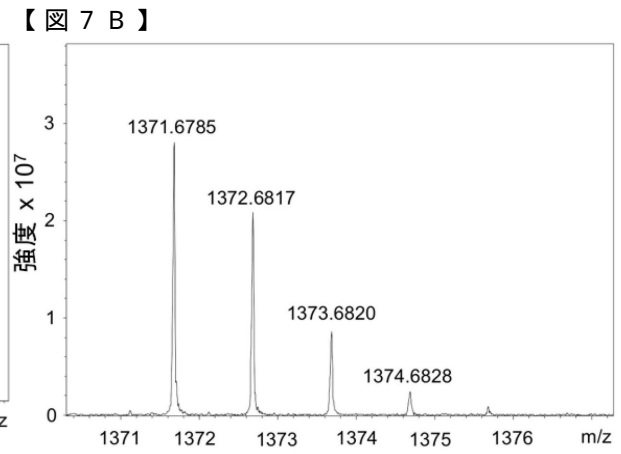


FIG. 7B

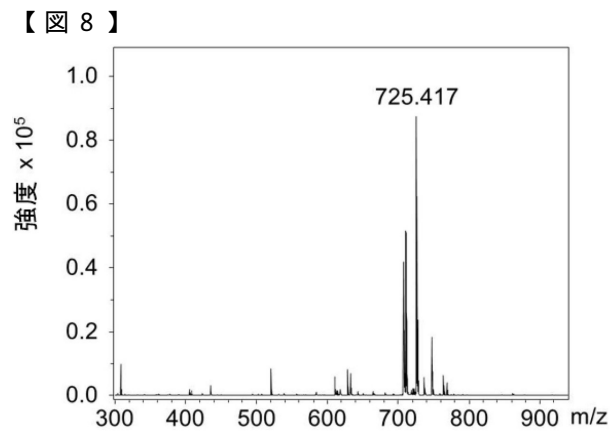


FIG. 8

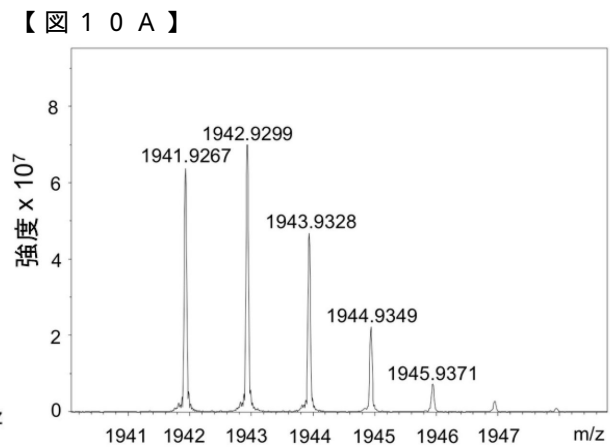


FIG. 10A

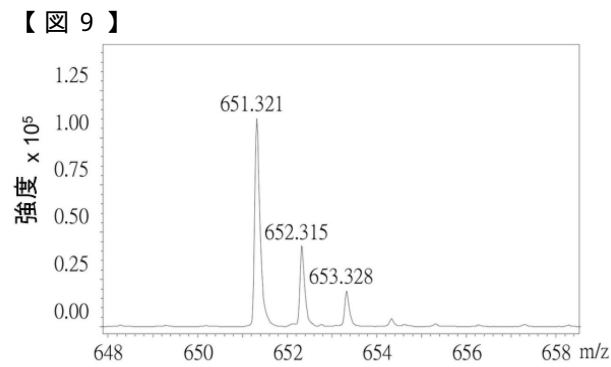


FIG. 9

【 図 1 0 B 】

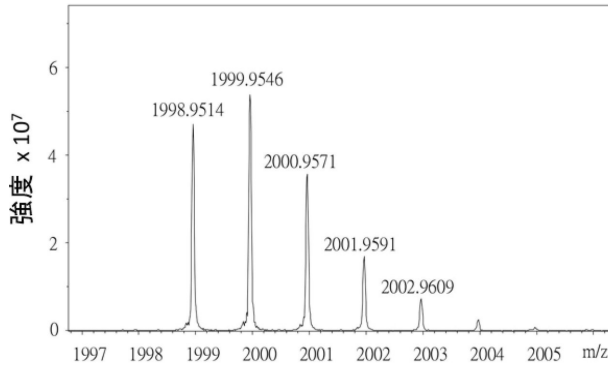


FIG. 10B

【 図 1 2 A 】

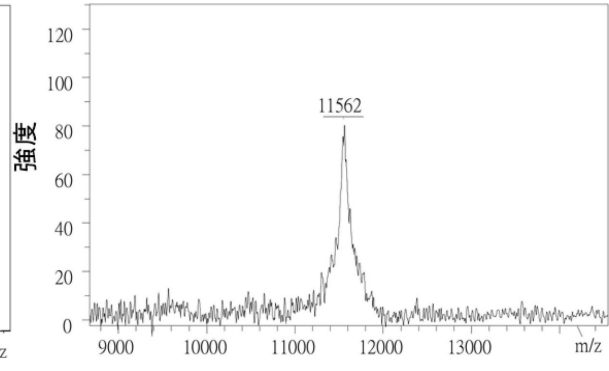


FIG. 12A

【 図 1 1 】

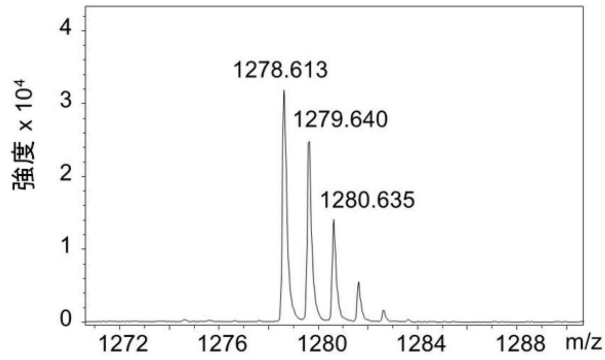


FIG. 11

【 図 1 2 B 】

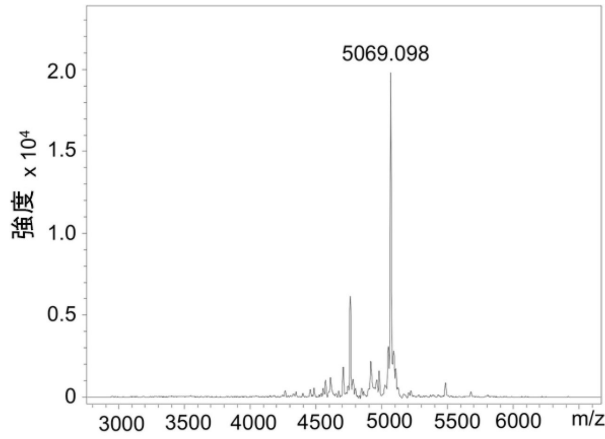


FIG. 12B

【 図 1 2 C 】

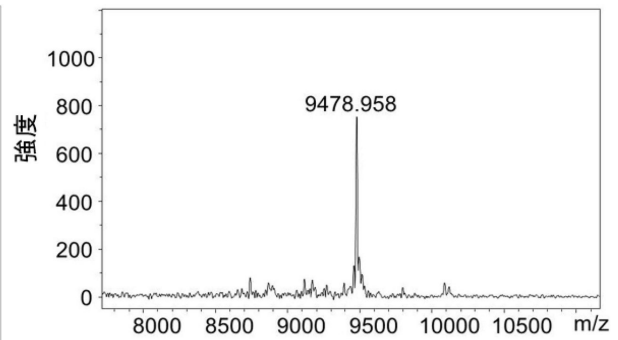


FIG. 12C

【 図 1 2 D 】

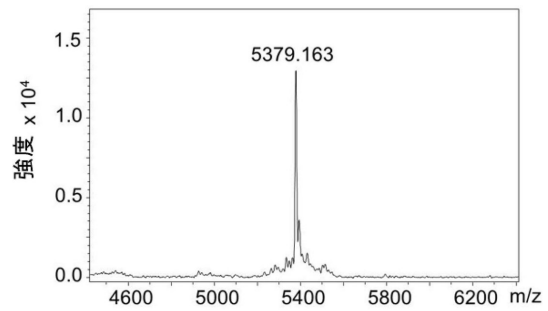


FIG. 12D

【 13 A 】

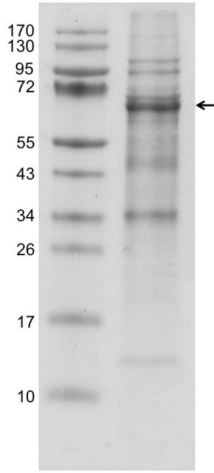


FIG. 13A

【 13 B 】

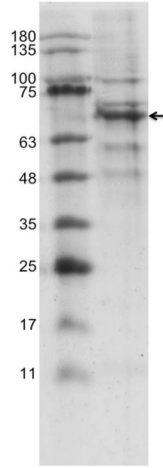


FIG. 13B

【 13 C 】

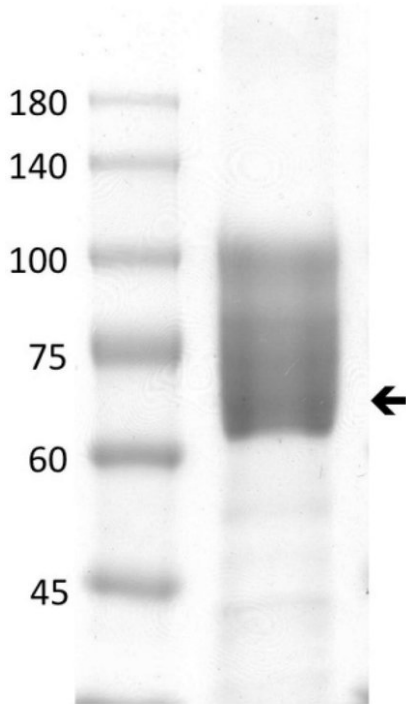


FIG. 13C

【 14 A 】

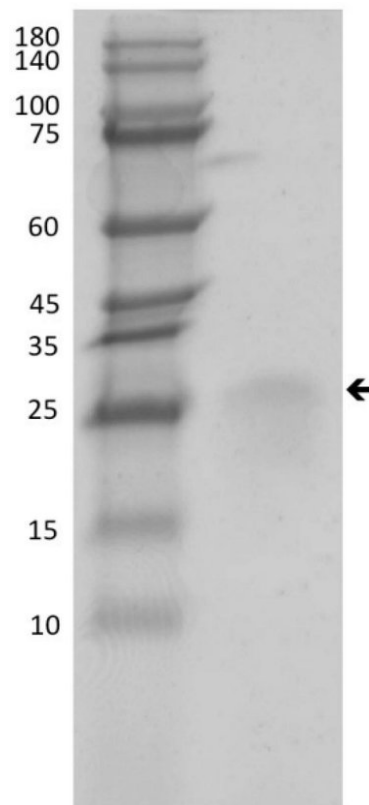


FIG. 14A

【 図 1 4 B 】

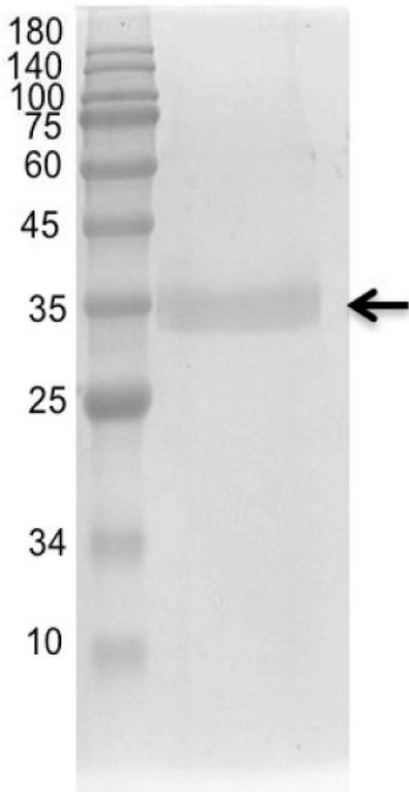


FIG. 14B

【 図 1 4 C 】

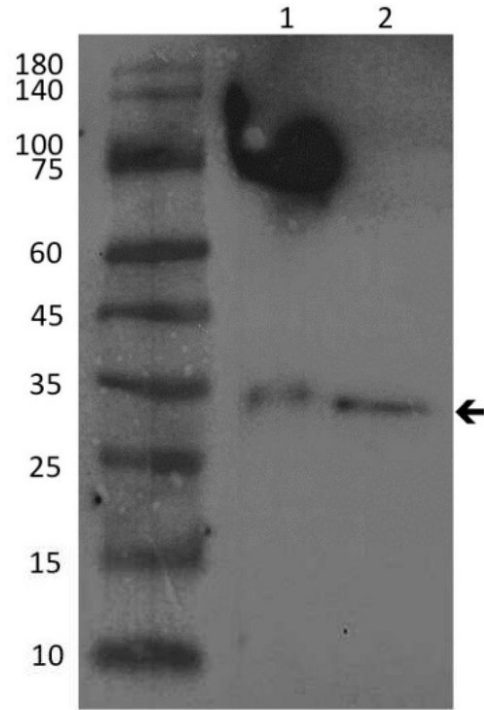


FIG. 14C

【 図 1 4 D 】

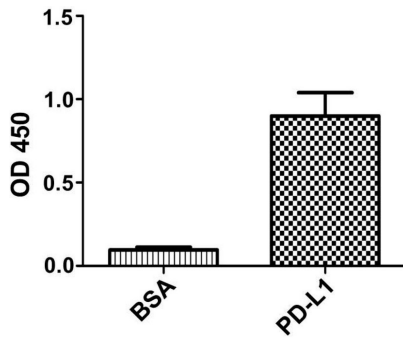


FIG. 14

【 図 1 5 A 】

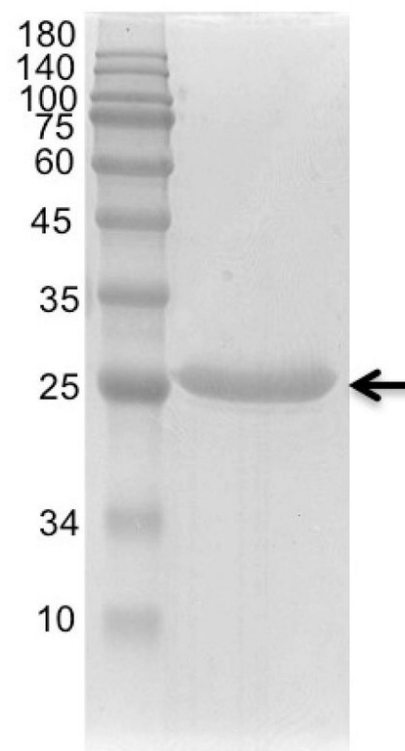


FIG. 15A

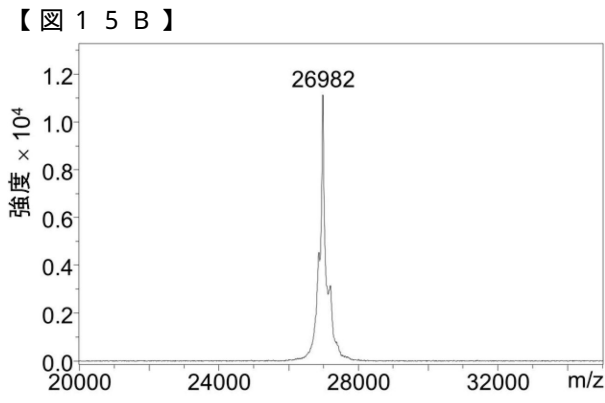


FIG. 15B

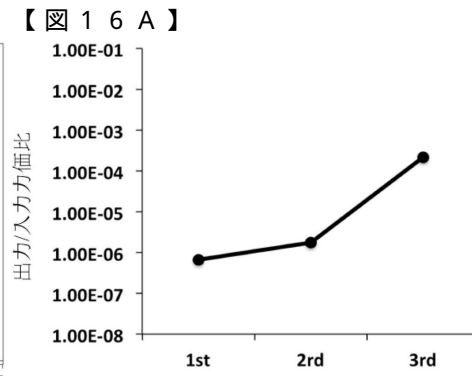


FIG. 16A

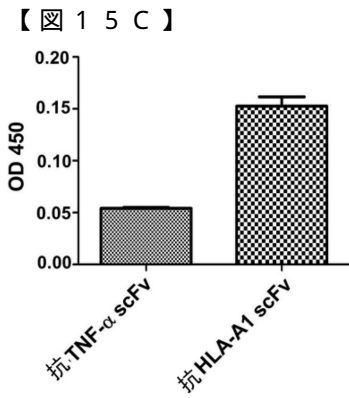


FIG. 15C

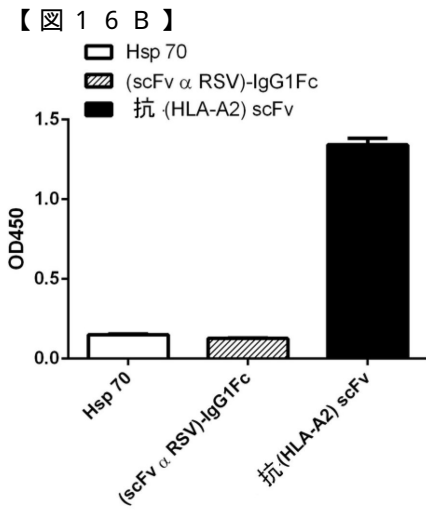


FIG. 16B

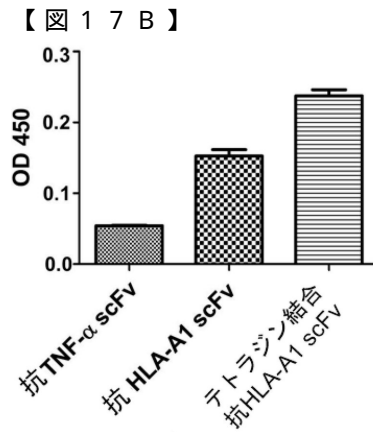


FIG. 17B

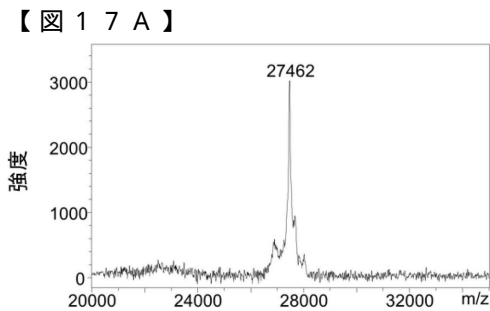


FIG. 17A

【図18】

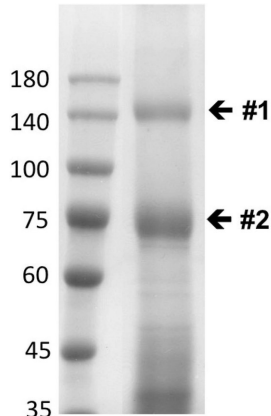


FIG. 18

【図19】

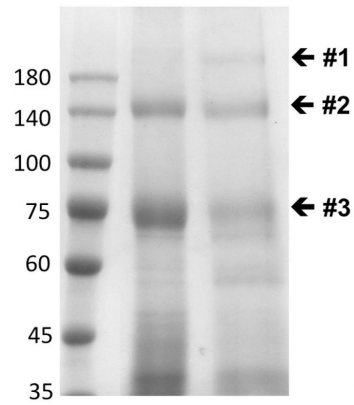


FIG. 19

【図20A】

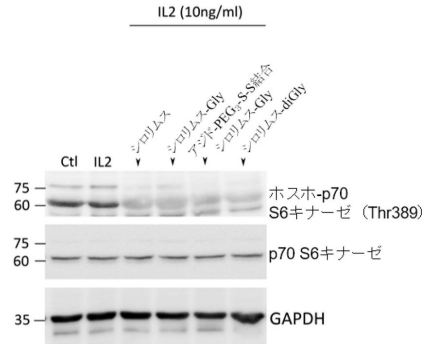


FIG. 20A

【図20B】

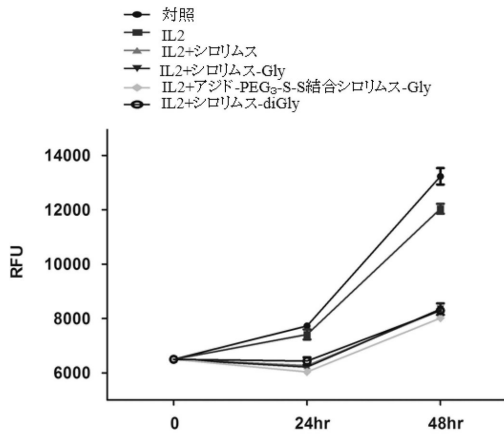


FIG. 20B

【図21A】

抗S1P₁受容体抗体10μg/ml

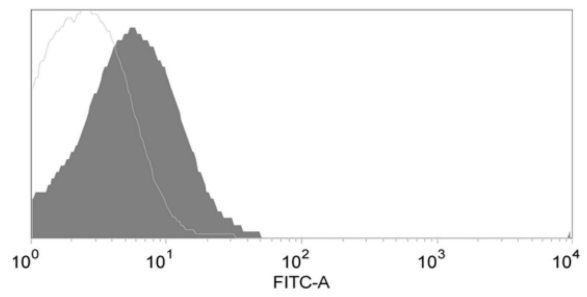


FIG. 21A

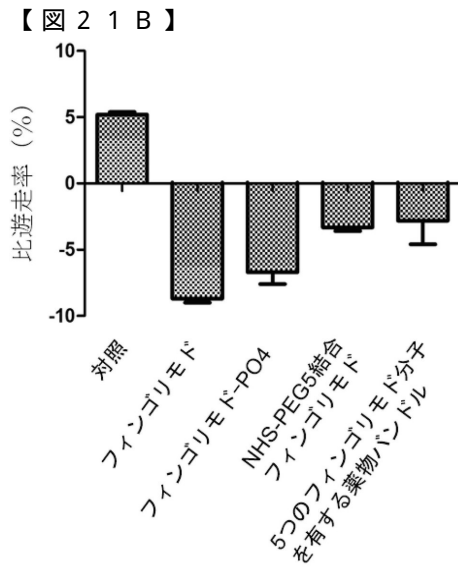


FIG. 21B

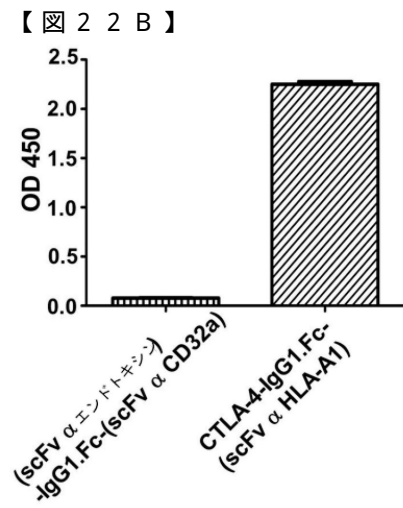
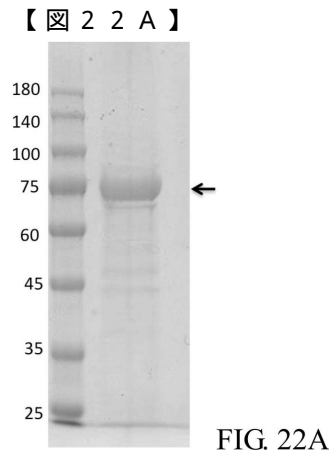


FIG. 22B

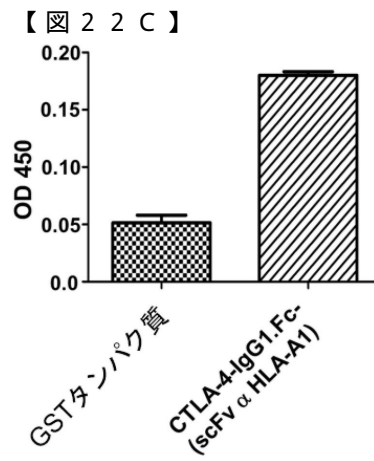


FIG. 22C

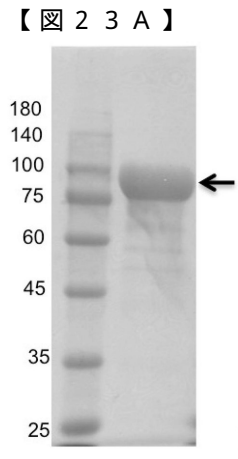


FIG. 23A

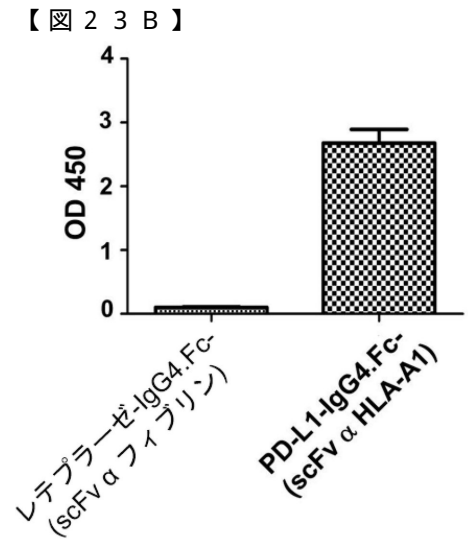


FIG. 23B

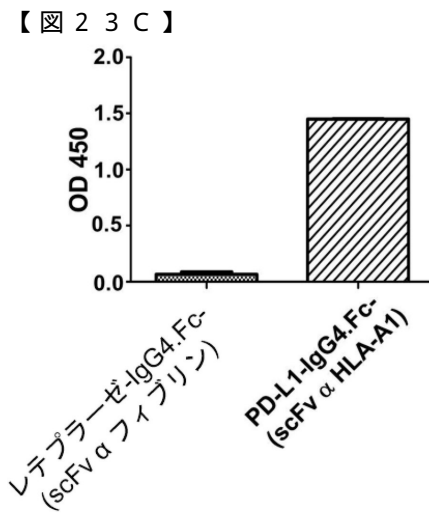


FIG. 23C

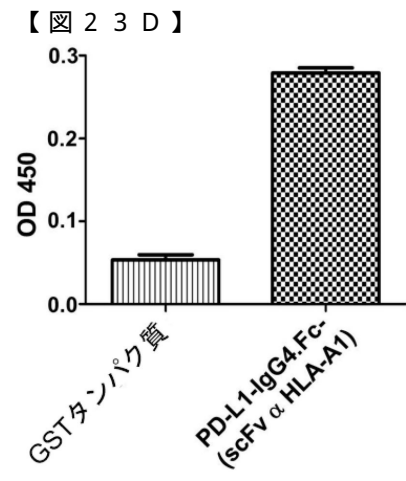


FIG. 23D

【配列表】

0006709844000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 6 1 K	38/02 (2006.01)	A 6 1 K	38/02
A 6 1 K	47/60 (2017.01)	A 6 1 K	47/60
A 6 1 K	45/00 (2006.01)	A 6 1 K	45/00
A 6 1 P	43/00 (2006.01)	A 6 1 P	43/00 1 1 1

(72)発明者 チャン、ツェ - ウェン
 タイワン、タイペイ シティ、ナンガン ディストリクト、アカデミア ロード、セクション 2
 、ナンバー 47、1エフ

(72)発明者 チュ、シン - マウ
 タイワン、タイペイ シティ、ナンガン ディストリクト、アカデミア ロード、セクション 2
 、ナンバー 47、1エフ

(72)発明者 リン、チュン - ユ
 タイワン、タイペイ シティ、ナンガン ディストリクト、アカデミア ロード、セクション 2
 、ナンバー 47、1エフ

審査官 鈴木 崇之

(56)参考文献 国際公開第2016/112870(WO, A1)
 国際公開第2011/029008(WO, A2)
 米国特許出願公開第2012/0270787(US, A1)
 特表2013-534535(JP, A)
 Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 1990年, Vol. 87, pp. 1066-1070
 Circulation, 2000年, Vol. 101, pp. 1158-1164
 J. Immunol., 2010年, Vol. 184, pp. 1210-1217

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
 C07K 1/00 - 19/00
 Caplus/REGISTRY(STN)
 JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)
 PubMed