

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2020-504123

(P2020-504123A)

(43) 公表日 令和2年2月6日(2020.2.6)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C07K 19/00 (2006.01)</b>	C07K 19/00 ZNA	4C076
<b>C07K 16/22 (2006.01)</b>	C07K 16/22	4C084
<b>A61P 25/00 (2006.01)</b>	A61P 25/00	4C085
<b>A61P 35/00 (2006.01)</b>	A61P 35/00	4H045
<b>A61P 29/00 (2006.01)</b>	A61P 29/00	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 19 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2019-535841 (P2019-535841)  
 (86) (22) 出願日 平成29年12月29日 (2017.12.29)  
 (85) 翻訳文提出日 令和1年7月26日 (2019.7.26)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2017/069135  
 (87) 国際公開番号 W02018/126232  
 (87) 国際公開日 平成30年7月5日 (2018.7.5)  
 (31) 優先権主張番号 62/440,296  
 (32) 優先日 平成28年12月29日 (2016.12.29)  
 (33) 優先権主張国・地域又は機関 米国 (US)

(71) 出願人 515269718  
 ディベロップメント センター フォー  
 バイオテクノロジー  
 DEVELOPMENT CENTER  
 FOR BIOTECHNOLOGY  
 台湾, 221, ニュー タイペイ シティ  
 , カンニン ストリート, レーン 169  
 , ナンバー 101  
 (74) 代理人 100116850  
 弁理士 廣瀬 隆行  
 (74) 代理人 100165847  
 弁理士 関 大祐

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 K L K 6 媒介性 C N S 特異的抗体プロドラッグ活性化

(57) 【要約】

中枢神経系 (CNS) においてプロテアーゼ K L K 6 によって選択的に活性化され得る抗体プロドラッグには、前記 CNS において疾患または障害を治療するための抗体、抗体の重鎖および/または軽鎖の N 末端に融合した K L K 6 切断可能ペプチド、および K L K 6 切断可能ペプチドの N 末端に融合したブロッカーが含まれる。前記疾患または障害は、癌、炎症性疾患、自己免疫疾患、感染症、またはニューロン変性疾患である。

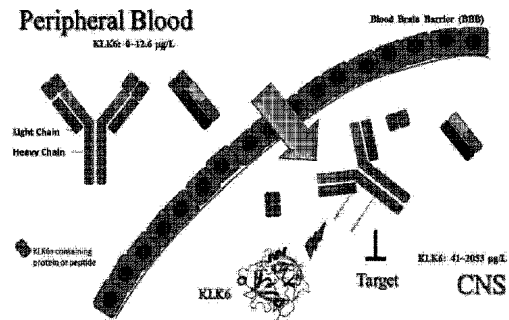


FIG. 1

- 【特許請求の範囲】
- 【請求項 1】  
 中枢神経系（CNS）においてプロテアーゼ K L K 6 によって選択的に活性化され得る抗体プロドラッグであって、  
 前記 CNS において疾患または障害を治療するための、抗体、またはその結合フラグメント、  
 前記抗体の重鎖および / または軽鎖の N 末端に融合した K L K 6 切断可能ペプチド、および  
 前記 K L K 6 切断可能ペプチドの N 末端に融合したブロッカーを含む、  
 抗体プロドラッグ。 10
- 【請求項 2】  
 前記ブロッカーが、タンパク質、タンパク質ドメイン、またはペプチドを含む、  
 請求項 1 に記載の抗体プロドラッグ。
- 【請求項 3】  
 前記 K L K 6 切断可能ペプチドが、天然の K L K 6 基質、ペプチドファージライブラリー、合成ペプチドライブラリー、または K L K 6 によって切断され得るペプチド配列に由来する、  
 請求項 1 または 2 に記載の抗体プロドラッグ。
- 【請求項 4】  
 前記抗体が、モノクローナル抗体、二重特異性抗体、多重特異性抗体、または抗体薬物複合体（ADC）である、  
 請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の抗体プロドラッグ。 20
- 【請求項 5】  
 前記抗体薬物複合体が、免疫サイトカイン、免疫ホルモン、または免疫毒素である、  
 請求項 4 に記載の抗体プロドラッグ。
- 【請求項 6】  
 前記抗体が他の抗体関連用途で使用され得る、  
 請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の抗体プロドラッグ。
- 【請求項 7】  
 前記抗体関連用途が、キメラ抗原受容体（CAR）T 細胞のためのものである、  
 請求項 6 に記載の抗体プロドラッグ。 30
- 【請求項 8】  
 前記疾患または障害が、癌、炎症性疾患、自己免疫疾患、感染症、またはニューロン変性疾患である、  
 請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の抗体プロドラッグ。
- 【請求項 9】  
 前記抗体が、ネズミ抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、またはヒト抗体である、  
 請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の抗体プロドラッグ。
- 【請求項 10】  
 前記抗体が抗 V E G F 抗体または抗 P D - 1 抗体である、  
 請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の抗体プロドラッグ。 40
- 【請求項 11】  
 CNS における疾患または障害を治療する方法であって、  
 有効量の請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の抗体プロドラッグを、それを必要とする対象に投与することを含む、  
 方法。
- 【発明の詳細な説明】
- 【技術分野】
- 【0001】  
 本発明は、一般に CNS 関連疾患の治療のための抗体に基づく分子に関する。 50

**【背景技術】****【0002】**

治療は、しばしば有害作用に関連している。有害作用を最小減に抑えるために、治療薬の特異性、すなわち疾患剤または細胞/組織だけを攻撃することを改善する必要がある。しかし、そのような選択性を有することが常に可能とは限らない。例えば、抗体は、それらの標的抗原に対して高い親和性で非常に特異的であり、一部の疾患では治療的または診断的適用について承認されている。しかし、標的抗原発現は、必ずしも疾患特異的ではない。そのため、大部分の治療用抗体は、疾患病変を標的とすることに加えて、正常組織も標的とすることがあり、それによって有害作用を引き起こすことがある。

**【0003】**

有害作用を減らすためのもう一つのアプローチは、治療薬を標的部位だけで活性化されるプロドラッグとして送達することである。多くのプロドラッグが望ましくない副作用を低減させるのに効果的であることが示されている。しかし、大部分のプロドラッグは小分子である。

**【0004】**

中枢神経系(CNS)は、治療薬を特異的に標的化することに特有の課題を提示する。そのため、CNS疾患または障害の治療へのより良好なアプローチが依然として必要とされている。

**【発明の概要】****【発明が解決しようとする課題】****【0005】**

本発明の実施形態は、抗原認識機能の低下したプロドラッグ抗体(プロ抗体)を製造するために抗体のN末端と融合するKLK6基質を含有する組換えタンパク質またはペプチドの使用に関する。これらのプロ抗体は、高濃度のKLK6プロテアーゼを有する組織、例えばCNSなどにおいて活性化させることができる。

**【0006】**

本発明の発明者らは、プロ抗体中のKLK6基質配列が、血清中のKLK6の濃度が低いために血清中でKLK6によって切断されないことを見出した。対照的に、プロ抗体は、CNS中のKLK6の濃度が高いために、CNSにおいてKLK6によって切断される。そのため、抗体の機能は、有害作用を防ぎ、末梢組織における抗体の消耗を最小減に抑えるために、末梢血中で抑制され得る。これらのプロ抗体は、CNSに入った後に、活性化してCNS関連疾患または障害を標的化できる。

**【課題を解決するための手段】****【0007】**

一態様では、本発明の実施形態は、中枢神経系(CNS)においてプロテアーゼKLK6によって選択的に活性化され得る抗体プロドラッグに関する。本発明の一実施形態による抗体プロドラッグには、CNSにおいて疾患または障害を治療するための抗体、またはその結合フラグメント、抗体の重鎖および/または軽鎖のN末端に融合したKLK6切断可能ペプチド、およびKLK6切断可能ペプチドのN末端に融合したプロッカーが含まれる。

**【0008】**

本発明の実施形態によれば、中枢神経系(CNS)における疾患または障害は、癌、炎症性疾患、自己免疫疾患、感染症、またはニューロン変性疾患であり得る。

**【0009】**

本発明の実施形態によれば、プロッカーは、タンパク質、タンパク質ドメイン、またはペプチドを含む。本発明の実施形態によれば、KLK6切断可能ペプチドは、天然のKLK6基質、ペプチドファージライブラリー、合成ペプチドライブラリー、またはKLK6によって切断され得るペプチド配列に由来する。

**【0010】**

本発明の実施形態によれば、抗体は、モノクローナル抗体もしくはその結合フラグメン

10

20

30

40

50

ト、二重特異性抗体、多重特異性抗体、抗体薬物複合体（ADC）、免疫サイトカイン、免疫ホルモン、または免疫毒素である。抗体は、ネズミ抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、またはヒト抗体であり得る。本発明の実施形態によれば、抗体は任意の適した抗体、例えば抗VEGF抗体または抗PD-1抗体であり得る。

【0011】

本発明のもう一つの態様では、本発明の実施形態は、CNSにおける疾患または障害を治療するための方法に関する。本発明の一実施形態による方法は、有効量の本発明の抗体プロドラッグ（すなわちプロ抗体）を、それを必要とする対象に投与することを含む。

【0012】

有効量は、望ましい治療効果を達成できる量である。当業者は、有効量が病状、投与経路、患者の状態（例えば、年齢、体重、性別等）に依存することを理解し、当業者は過度の実験を行うことなく有効量を決定することが可能であろう。例えば、本発明の実施形態によれば、有効量は、患者の体重に基づいて  $0.1 \mu\text{g}/\text{Kg} \sim 10 \text{mg}/\text{Kg}$ 、好ましくは  $1 \mu\text{g}/\text{Kg} \sim 1 \text{mg}/\text{Kg}$ 、より好ましくは  $1 \mu\text{g}/\text{Kg} \sim 0.1 \text{mg}/\text{Kg}$  の範囲であり得る。

10

【0013】

本発明のその他の態様および利点は、以下の説明および添付される特許請求の範囲によって明らかであろう。

【図面の簡単な説明】

【0014】

【図1】KLK6に媒介されるCNS特異的抗体プロドラッグ作用の戦略を示す図である。

20

【0015】

【図2(A)】タンパク質バンドのクーマシー染色による、KLK6基質（KLK6s）含有タンパク質融合抗体FabのインビトロKLK6切断の結果を示す図である。

【図2(B)】ウエスタンブロットによる、KLK6基質（KLK6s）含有タンパク質融合抗体FabのインビトロKLK6切断の結果を示す図である。

【0016】

【図3(A)】KLK6消化の前後のKLK6基質（KLK6s）含有タンパク質融合抗体Fabの抗原認識能を示す図であり、表面プラズモン共鳴（BIACORE）によって測定した抗VEGF Fab（Lucentics（登録商標））対照の結合を示す図である。

30

【図3(B)】KLK6消化の前後のKLK6基質（KLK6s）含有タンパク質融合抗体Fabの抗原認識能を示す図であり、プロ抗体が抗原に結合できなかったことを示す図である。

【図3(C)】KLK6消化の前後のKLK6基質（KLK6s）含有タンパク質融合抗体Fabの抗原認識能を示す図であり、KLK6消化後に、プロ抗体が活性化されて抗原との結合を明らかにしたことを示す図である。

【0017】

【図4】抗体に融合したKLK6基質（KLK6s）含有ペプチドのインビトロKLK6切断の結果を示す図である。

40

【0018】

【図5(A)】KLK6消化の前後のKLK6基質（KLK6s）含有ペプチド融合抗体の抗原認識能を示す図であり、アバスチン対照の結合を示す図である。

【図5(B)】KLK6消化の無いアバスチン-KLK6s-レプチンに融合したFR1ペプチド-KLK6sが、その抗原VEGFとの結合親和性の低下を示したことを示す図である（KLK6消化の0時間）。KLK6消化時間の増加とともに、アバスチン-KLK6s-レプチンに融合したFR1ペプチド-KLK6sはVEGF結合に対して次第に活性化された。

【図5(C)】KLK6消化の無いアバスチン-KLK6s-レプチンに融合したFR1

50

ペプチド - K L K 6 s が、その抗原 V E G F との結合親和性の低下を示したことを示す図である ( K L K 6 消化後 6 時間 ) 。

【図 5 ( D )】 K L K 6 消化の無いアバスチン - K L K 6 s - レプチンに融合した F R 1 ペプチド - K L K 6 s が、その抗原 V E G F との結合親和性の低下を示したことを示す図である ( K L K 6 消化後 2 4 時間 ) 。

【図 5 ( E )】 K L K 6 消化の無いアバスチン - K L K 6 s - レプチンに融合した F R 1 ペプチド - K L K 6 s が、その抗原 V E G F との結合親和性の低下を示したことを示す図である ( K L K 6 消化後 4 8 時間 ) 。

【 0 0 1 9 】

【図 6 ( A )】 C B R 染色によって明らかにされる、インビトロ K L K 6 切断の結果を示す図である。

【図 6 ( B )】 C B R 染色によって明らかにされる、インビトロ K L K 6 切断の結果を示す図である。

【図 6 ( C )】異なるペプチドブロッカーおよび K L K 6 基質によるアバスチンプロドラッグの K L K 6 消化の前後の抗原認識能の結果を示す図である。

【 0 0 2 0 】

【図 7 ( A )】インビトロ K L K 6 切断の結果を示す図である。

【図 7 ( B )】抗 P D - 1 m A b オブジーボプロドラッグの K L K 6 消化の前後の抗原認識能を示す図である。

【 0 0 2 1 】

【図 8】マウスにおける K L K 6 基質 ( K L K 6 s ) 含有ペプチド融合抗体のインビボ抗体活性化の結果を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 2 2 】

定義

本明細書において、用語「抗体」とは、モノクローナル抗体、二重特異性抗体、多重特異性抗体、または抗体薬物複合体 ( A D C ) をさす。「抗体薬物複合体」は、免疫サイトカイン、免疫ホルモン、または免疫毒素であり得る。用語「免疫サイトカイン」とは、組換え抗体 - サイトカイン融合タンパク質をさす。用語「免疫ホルモン」とは、組換え抗体 - ホルモン融合タンパク質をさす。免疫ホルモンの一例は、抗体 - レプチン融合タンパク質である。用語「免疫毒素」とは、組換え抗体 - 毒素複合体をさす。抗体の結合フラグメントは、s c F v、F a b、または F ( a b ' )<sub>2</sub> であり得る。

【 0 0 2 3 】

用語「タンパク質の N 末端に融合した」とは、タンパク質の N 末端で融合タンパク質を形成することをさす。用語「ブロッカー」とは、抗体の活性を低下または遮断するために、すなわち抗体をプロドラッグに変換するために使用されるペプチドまたはタンパク質をさす。その上、ブロッカーを用いて CNS 系への送達を促進することができる、例えば、Yu, Y. J. et al., " Boosting brain uptake of a therapeutic antibody by reducing its affinity for a transcytosis target, " Sci. Trans. Med. 3, 84ra44 ( 2011 ) を参照されたい。

【 0 0 2 4 】

用語「 K L K 6 切断可能ペプチド」とは、トリプシン様プロテアーゼである K L K 6 によって切断され得るペプチドをさす。多様な K L K 6 切断可能ペプチド配列が当技術分野で公知であり、当業者は特定の配列が過度の実験を行うことなく K L K 6 によって切断され得るかどうかを容易に決定することができる。

【 0 0 2 5 】

本発明の実施形態は、中枢神経系 ( CNS ) における疾患または障害の治療のための治療用抗体に関する。これらの抗体は、プロドラッグ ( プロ抗体 ) の形態であり、これには、抗体と標的抗原の結合を遮断するために抗体の可変ドメインの N 末端に結合したペプチ

10

20

30

40

50

ドフラグメント（ブロッキングペプチド、またはブロッカー）が含まれる。ブロッキングペプチドは、特定のプロテアーゼのプロペプチドに類似している。選択的プロテアーゼによるブロッキングペプチドの切断により、活性抗体が放出される。

【0026】

本発明の実施形態は、プロ抗体の特異的活性化をカリクレイン - 6（KLK - 6）に頼る。具体的には、本発明の実施形態は、KLK6基質を含有する組換えタンパク質またはペプチドを用いて抗体のN末端と融合する。KLK6基質含有組換えタンパク質またはペプチドは、プロペプチドのように機能して、抗体の抗原認識機能を遮断するかまたは低下させる。

【0027】

KLK6基質は、末梢血中の血清中のKLK6の濃度が低いために、血液循環中のKLK6によって認識される程度には切断されないであろう。しかし、KLK6基質含有組換えタンパク質またはペプチドは、CNS中に見出される濃度のKLK6によって効率的に切断され得る。そのため、抗体の機能を末梢血中で遮断または最小化して、有害作用を防ぎ、抗体の不要な消耗を減らすことができる。これらのプロ抗体は、CNSに入った後に、活性化してCNS関連疾患を標的化できる。

【0028】

ヒトカリクレイン（KLK）ファミリーには、様々な組織で発現する15の分泌セリンプロテアーゼが含まれる。これらの中で、KLK6は、CNSにおいて高度に発現することが見出されており、乳癌および卵巣癌組織においても過剰発現する。ザイム、プロテアーゼM、およびニューロシンとしても公知であるKLK6は、トリプシン様セリンプロテアーゼである。KLK6はCNSの乏突起神経膠細胞で構成的に発現し、その発現は脊髄損傷（SCI）後および活動性多発性硬化症（MS）病変で増強される。ヒトミエリン塩基性タンパク質（MBP）、アミロイドペプチド（A $\beta$ ）、プラスミノゲン、ミエリン、および - シヌクレイン等を含む、多くのタンパク質がKLK6によって切断されることが示されている。

【0029】

様々なヒトの体液中のKLK6レベルが決定されており、KLK6は、血液循環と比較して、脳脊髄液（CSF）において有意に濃縮されていることが見出されている。この発現レベルの差異が、CNSでのプロドラッグ活性化の機会を可能にする。

【0030】

本発明の実施形態によれば、望ましくない副作用を減らすために、末梢血での機能が低下した抗体プロドラッグが開発された。これらの抗体プロドラッグは、中枢神経系でKLK6によって活性化される。本発明は、様々なCNS関連疾患、例えば、癌、炎症性疾患、自己免疫疾患、感染症、またはニューロン変性疾患に適用できる。

【0031】

図1は、KLK6に媒介されるCNS特異的抗体プロドラッグ作用の戦略を示す。本発明の実施形態によれば、抗体の軽鎖および/または重鎖のN末端をブロッカー（ブロッキングペプチド）と融合させて抗体をプロドラッグ（すなわちプロ抗体）に変換することができる。ブロッカーは、抗体の抗原認識を低下させる。ブロッカーはKLK6によって切断され得るペプチド配列を含む。ペプチド配列はKLK6基質（KLK6s）として機能する。

【0032】

本発明の一部の実施形態によれば、軽鎖N末端だけがブロッカーを含む。本発明の他の実施形態によれば、重鎖N末端だけがブロッカーを含む。抗原 - 抗体結合は重鎖と軽鎖の両方の可変ドメインを伴うので、重鎖または軽鎖のいずれかのN末端を遮断すれば抗原 - 抗体結合を妨害するのに十分となる。

【0033】

本発明の一部の実施形態によれば、軽鎖N末端と重鎖N末端の両方がそれぞれブロッカーを含む。重鎖と軽鎖の両方の可変領域を二重に遮断することにより、抗原 - 抗体相互作用

10

20

30

40

50

用のより良好な遮断を生成することができる。

【0034】

本発明の実施形態によれば、ブロッカーは、活性抗体が特定の濃度を越えるK L K 6を有する環境においてのみ放出されるように、K L K 6基質を含有するタンパク質、タンパク質ドメイン、またはペプチドを含む。K L K 6は、トリプシン様プロテアーゼであることが示されており、アルギニン残基のカルボキシル側で切断することを好む。L iらは、K L K 6が、P 1位がA r gによって占められ、S e rがP 1'で強く優先されるペプチド基質を好むことを見出した。(P r o t e i n S c i . , 17(4):664-672(2008))。M a g k l a l r a s(B i o c h e m . B i o p h y s . R e s . C o m m u n . , 307(4):948-55(2003))も、K L K 6はL y sよりもA r gの後ではるかに高い効率で切断し、P 2位ではS e rまたはP r oが優先されることを見出した。この情報に基づいて、K L K 6によって効率的に切断されるペプチド配列を設計することができる。当業者は、多くのペプチド配列がこれらの基準を満たし、本発明の実施形態がこの説明に使用される特定の例に限定されないことを理解するであろう。そのようなペプチドは、本明細書において一般にK L K 6基質(またはK L K 6 s)と呼ばれる。

10

【0035】

本発明の実施形態は、K L K 6が末梢血よりもはるかに高い濃度でC N Sに存在するという知見に基づく。末梢血中のK L K 6の濃度は0~12.6 μ g / Lの範囲であるが、C N S中のK L K 6の濃度は41~2053 μ g / Lの範囲である。末梢血とC N Sとの間のこのK L K 6濃度の有意な違いによって、本発明のブロッカー融合抗体(プロ抗体)は、末梢血中ではその低い活性を維持して有害作用を防ぐことができるが、C N S中ではその治療機能のためにK L K 6によって活性化され得る。

20

【0036】

以下の説明は、本発明の実施形態を説明するために具体例を使用する。当業者は、これらの例が例示のためだけのものであり、本発明の範囲から逸脱することなくその他の変形および変更が可能であるので本発明の範囲を限定するものではないことを理解するであろう。

【0037】

以下の例では、様々な融合タンパク質が、所望の配列を含有する発現ベクター構築することによって調製される。当技術分野で公知の任意の適したベクターが使用されてよい。以下の例では、K L K 6 s含有ペプチド/タンパク質融合抗体を、ポリメラーゼ連鎖反応(P C R)によって構築し、p T C A E 8ベクター(プラスミド)の多重クローニング部位にクローニングした。これらのタンパク質およびベクターの特定のc D N A配列は当技術分野で公知であり、容易に入手可能である。使用される方法は従来のものである。様々なベクターおよび試薬は、商業的供給源から入手することができる。したがって、当業者はこれらの試薬を入手し、過度の実験を行うことなく記載される実験を行うことが可能であろう。

30

【0038】

実施例1:プロ抗体からのブロッカータンパク質の特異的切断

40

この実施例では、アバスチンF a bに融合したレプチン-K L K 6 sをプロ抗体として使用して、アバスチンF a bを放出するK L K 6の能力を試験する。融合タンパク質(プロ抗体)を、それぞれ血清濃度、C S F濃度、1 μ M、または2 μ MのK L K 6とともに24時間インキュベートする。図2は、K L K 6基質(K L K 6 s)含有タンパク質融合抗体F a bのインビトロK L K 6切断の結果を示す。この実施例では、K L K 6 s(K L K 6基質配列)は、好ましいK L K 6切断部位-R-S-を含むY M T R S A M G(配列番号1)の配列を有するオクタペプチドである。

【0039】

タンパク質をS D S - P A G Eによって分離し、クーマシーブリリアントブルーR-250(C B R)で染色するか(図2A)またはウエスタンブロットによって分析した(図

50

2 B)。対照（レーン 1、2、および 3）と比較して、血清濃度の K L K 6 は、プロックターの切断に効果がなかったが（レーン 4）、C S F 濃度またはそれよりも高濃度の K L K 6 は、矢印によって示される切断タンパク質（レーン 5、6、および 7）から明らかのように、効率的な切断を示した。

#### 【0040】

これらの結果は、本発明の実施形態によるプロ抗体が末梢血中に残存し、C N S 中で一度効率的に活性化され得ることを示す。

#### 【0041】

実施例 2：プロ抗体および再活性化抗体による抗原結合

この実施例では、抗 V E G F Fab (Lucentics (登録商標)；ラニビズマブ) またはアバスチン Fab に融合したレプチン - K L K 6 s の結合速度を表面プラズモン共鳴 (S P R) (B I A c o r e) によって求める。図 3 は、K L K 6 消化の前後の K L K 6 基質 (K L K 6 s) 含有タンパク質融合抗体 Fab の抗原認識能を示す。Lucentics (登録商標) 対照と比較して (図 3 A)、K L K 6 消化の無いアバスチン Fab に融合したレプチン - K L K 6 s は、その抗原 V E G F に対する結合親和性を示さなかった (図 3 B)。対照的に、K L K 6 消化後のアバスチン Fab に融合したレプチン - K L K 6 s は、V E G F に対して良好な結合親和性を示した (図 3 C)。

10

#### 【0042】

これらの結果は、ブロッキングペプチド / タンパク質がプロ抗体のその抗原との結合を防止するのに有効であること、そしてプロックター (プロペプチドまたはプロタンパク質) の切断後に、活性抗体が放出されてその標的に特異的に結合できたことを示す。これらの結果は本発明のアプローチの正当性を立証する。

20

#### 【0043】

実施例 3：プロペプチドの K L K 6 切断の効率

この実施例では、アバスチン - K L K 6 s - レプチンに融合した F R 1 ペプチド - K L K 6 s を C S F 濃度の K L K 6 とともにそれぞれ 6、24、または 48 時間インキュベートした。ここで、F R 1 ペプチドはアバスチンのフレームワーク領域 1 である。次に、タンパク質を S D S - P A G E によって分離し、C B R で染色した。図 4 は、抗体に融合した K L K 6 基質 (K L K 6 s) 含有ペプチドのインビトロ K L K 6 切断の結果を示す。対照 (レーン 1) と比較して、異なる時点の C S F 濃度の K L K 6 は、矢印で示されるように切断されたタンパク質を示した。6 時間で切断は実質的に終了し、切断が極めて効率的であることを示している。

30

#### 【0044】

実施例 4：K L K 6 によるプロックターの時間依存的切断

この実施例では、抗 V E G F 抗体 (アバスチン)、またはアバスチン - K L K 6 s - レプチンに融合した F R 1 ペプチド - K L K 6 s の結合速度を S P R (B I A c o r e) によって求める。図 5 は、K L K 6 消化の前後の、抗体に融合した K L K 6 基質 (K L K 6 s) 含有ペプチドの抗原認識能の結果を示す。アバスチン対照 (図 5 A) と比較して、K L K 6 消化の無いアバスチン - K L K 6 s - レプチンに融合した F R 1 ペプチド - K L K 6 s は、その抗原 V E G F との結合親和性の低下を示した (図 5 B の 0 時) が、K L K 6 消化時間の増加とともに、アバスチン - K L K 6 s - レプチンに融合した F R 1 ペプチド - K L K 6 s は V E G F 結合のために再活性化された (それぞれ、図 5 C、5 D、および 5 E の 6、24、および 48 時間)。これらの結果は、本発明の実施形態が K L K 6 によって活性化され得ることを裏付ける。

40

#### 【0045】

実施例 5：異なるペプチドプロックターおよび K L K 6 基質によるプロ抗体の K L K 6 媒介性プロックター切断

この実施例では、アバスチンと融合した異なる K L K 6 s 含有ペプチドプロックターを、C S F 濃度の K L K 6 とともに 24 時間インキュベートする。図 6 は、S D S - P A G E により分析され、C B R で染色された、K L K 6 s 含有ペプチド融合アバスチンのインビ

50



トロ K L K 6 切断の結果を示す ( 図 6 A および 6 B ) 。アバスチンと融合したプロックア含有する全ての K L K 6 切断可能ペプチドは、K L K 6 によって切断され得る。K L K 6 消化の前後の V E G F とアバスチンまたはアバスチン誘導体との相互作用は、S P R ( B I A c o r e ) によって決定される ( 図 6 C ) 。

【 0 0 4 6 】

アバスチン対照と比較して、K L K 6 消化無しではアバスチンに融合したプロックア含有する異なる K L K 6 切断可能ペプチドは、応答の低下を示したが、K L K 6 消化有りでは、アバスチンに融合したプロックア含有する異なる K L K 6 切断可能ペプチドは V E G F 結合のために再活性化された。切断不能なリンカー配列 ( S S Y I S N Y G ; 配列番号 1 3 ) を有するアバスチンと融合したペプチドプロックアにおいて、アバスチンと融合したペプチドプロックアの V E G F 結合能は、K L K 6 消化の前後で応答単位の低下を示した。これらの結果は、異なるプロックア配列または K L K 6 基質配列を有する本発明の実施形態が、K L K 6 によって活性化され得ることを実証した。この例では、ペプチドプロックア配列および K L K 6 s 配列が表 1 に記載される。示されるように、ペプチドプロックア配列には、K L K 6 基質配列を抗体配列から分離するためのスペーサーとして機能する特定のアミノ酸が含まれ得る。スペーサーは、K L K 6 が切断配列にアクセスできることを確実にするように機能する。切断配列の N 末端側へのペプチドプロックア配列は、任意のタンパク質または任意のペプチド配列であり得る。

【 表 1 】

名称	鎖	ペプチドプロックア配列+K L K 6 s (配列番号)	K L K 6 配列 (配列番号)	切断
K5-KLK6s-アバスチン	LC	DIQMGRQSCGGFGFGYMTRSAMGGGG (2)	YMTRSAMG (1)	有
	HC	EVQLVESC GGFGFGYMTRSAMGGGG (3)	YMTRSAMG (1)	有
TA1-KLK6s-アバスチン	LC	DIQMGRQSCGGGGGGTAFRSAYGGGG (4)	TAFRSAYG (12)	有
	HC	EVQLVESC GGGGGGTAFRSAYGGGG (5)	TAFRSAYG (12)	有
TA2-KLK6s-アバスチン	LC	DIQMGRQSCGGFGFGTAFRSAYGGGG (6)	TAFRSAYG (12)	有
	HC	EVQLVESC GGFGFGTAFRSAYGGGG (7)	TAFRSAYG (12)	有
SA1-KLK6s-アバスチン	LC	DIQMGRQSCGGGGGGSSYISNYGGGG (8)	SSYISNYG (13)	無
	HC	EVQLVESC GGGGGGSSYISNYGGGG (9)	SSYISNYG (13)	無
SA2-KLK6s-アバスチン	LC	DIQMGRQSCGGFGFGSSYISNYGGGG (10)	SSYISNYG (13)	無
	HC	EVQLVESC GGFGFGSSYISNYGGGG (11)	SSYISNYG (13)	無

【 0 0 4 7 】

実施例 6 : オブジーボ ( 登録商標 ) のプロ抗体からのペプチドプロックアの特異的切断 この実施例では、抗 P D - 1 m A b s ( ニボルマブ ; オブジーボ ( 登録商標 ) ) の N 末端に融合した K L K 6 s 含有ペプチドプロックアを、C S F 濃度の K L K 6 とともに 2 4 時間インキュベートする。図 7 A は、S D S - P A G E によって分析され、C B R で染色された、K L K 6 s 含有ペプチド融合オブジーボ ( 登録商標 ) のインビトロ K L K 6 切断の結果を示す図である。K L K 6 s 含有ペプチド融合オブジーボ ( 登録商標 ) は、K L K 6 によって切断され得る。K L K 6 消化の前後の P D - 1 と抗 P D - 1 m A b ( オブジーボ ( 登録商標 ) ) またはオブジーボ ( 登録商標 ) 誘導体との相互作用は、S P R ( B I A c o r e ) によって決定される ( 図 7 B ) 。オブジーボ ( 登録商標 ) 対照と比較して、K L K 6 消化無しではオブジーボ ( 登録商標 ) に融合した K L K 6 s 含有ペプチドプロックアは、応答の低下を示したが、K L K 6 消化有りではオブジーボ ( 登録商標 ) に融合した K L K 6 s 含有ペプチドプロックアは P D - 1 結合のために再活性化された。これらの結果は、異なる抗体に適用される本発明の実施形態が、K L K 6 によっても活性化され得ることを裏付ける。この例では、ペプチドプロックア配列および K L K 6 s 配列が表 2 に

記載される。

【表 2】

名称	鎖	ペプチドブロッカー+K L K 6 s 配列 (配列番号)	K L K 6 配列 (配列番号)	切断
KO1-KLK6s-	LC	EIVLTQSCGGGGGGGYMTRSAMGGGG (14)	YMTRSAMG (1)	有
オプジーボ®	HC	QVQLVESCAGGGGGGYMTRSAMGGGG (15)	YMTRSAMG (1)	有
KO2-KLK6s-	LC	EIVLTGRSCGGGGGGGYMTRSAMGGGG (16)	YMTRSAMG (1)	有
オプジーボ®	HC	QVQLVESCAGGGGGGYMTRSAMGGGG (15)	YMTRSAMG (1)	有
KO3-KLK6s-	LC	EIVLTGRSCGGFGFGYMTRSAMGGGG (17)	YMTRSAMG (1)	有
オプジーボ®	HC	QVQLVESCAGGGFGFGYMTRSAMGGGG (18)	YMTRSAMG (1)	有

10

【0048】

実施例 7：プロ抗体活性化のインビトロ試験

この実施例では、アバスチン - K L K 6 s - レプチンに融合した F R 1 ペプチド - K L K 6 s を静脈注射によって B A L B / c マウスに注射した。血清試料および脳試料をそれぞれ注射後 0 . 0 8、2、4、および 8 時間に回収した。活性抗体および総抗体濃度を E L I S A によって決定した。

【0049】

図 8 は、マウスにおける K L K 6 基質 ( K L K 6 s ) 含有ペプチド融合抗体のインビボ抗体活性化の結果を示す。血漿において、アバスチン - K L K 6 s - レプチンに融合した活性 F R 1 ペプチド - K L K 6 s の割合は低下したレベルに維持されたが、脳においてアバスチン - K L K 6 s - レプチンに融合した F R 1 ペプチド - K L K 6 s は活性抗体の割合の増加を示した。これらの結果は、ブロッカー - K L K 6 s 融合抗体が C N S においてインビボで再活性化され得ることを示す。

20

【0050】

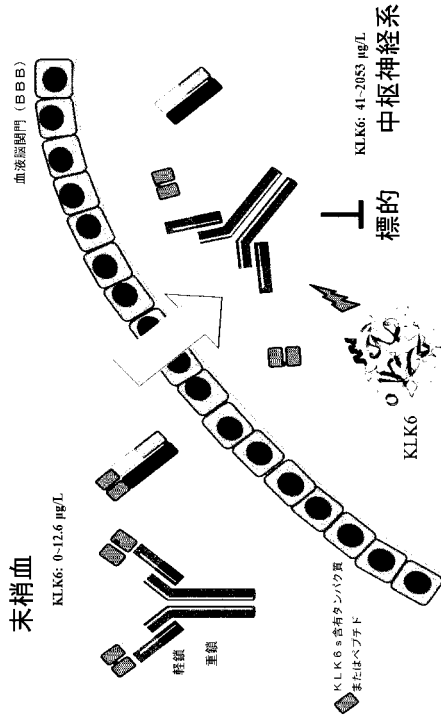
本発明の一部の実施形態は、C N S 疾患を治療するための方法に関する。本発明の一実施形態による方法は、有効量の本発明のプロ抗体をそれを必要とする対象に投与することを含む。プロ抗体は、抗体またはその結合フラグメントの重鎖および / または軽鎖の N 末端と結合したブロッキングペプチドを含む。抗体の結合フラグメントは、F a b、s c F v、または F ( a b ' )<sub>2</sub> 等であり得る。

30

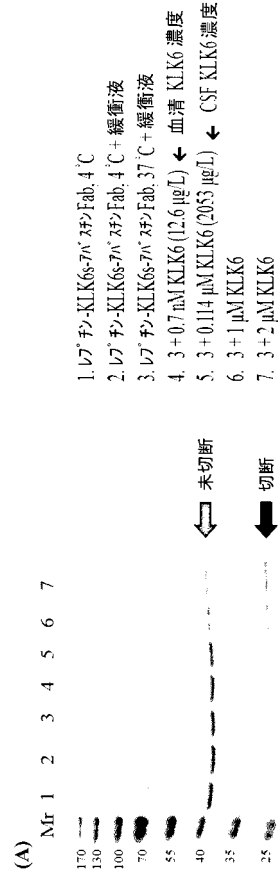
【0051】

本発明を限られた数の実施形態に関して説明してきたが、本開示の恩恵を受ける当業者であれば、本明細書に開示した本発明の範囲から逸脱しないその他の実施形態が考案され得ることを理解するであろう。例えば、他の抗体をこれらの例に示した抗体の代わりに使用してもよい。同様に、ブロッキングペプチドフラグメントには、K L K 6 基質配列によって抗体に連結された任意のタンパク質またはペプチドが含まれ得る。したがって、本発明の範囲は、添付の特許請求の範囲によってのみ限定されるべきである。

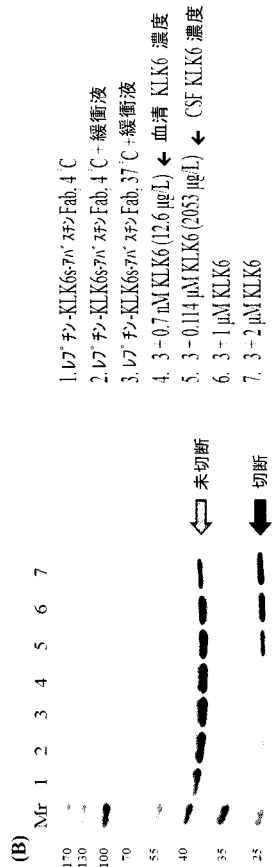
【 図 1 】



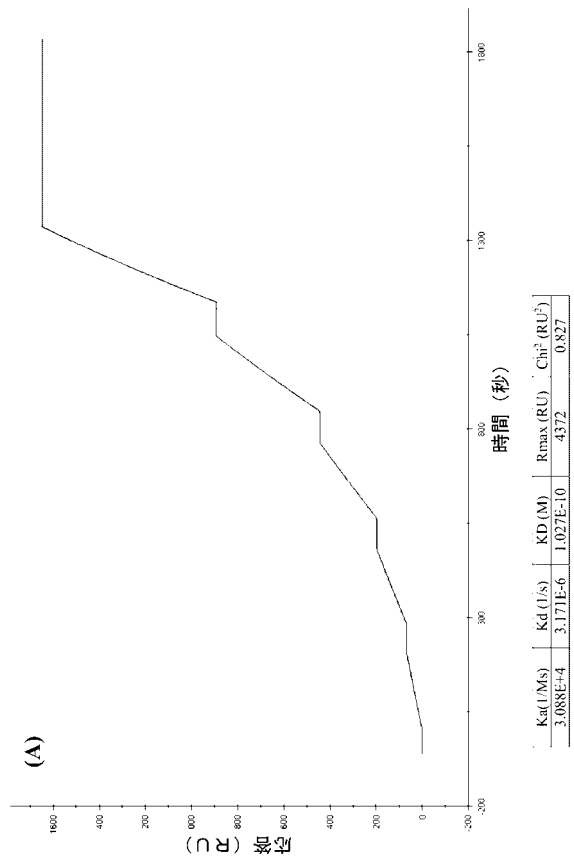
【 図 2 ( A ) 】



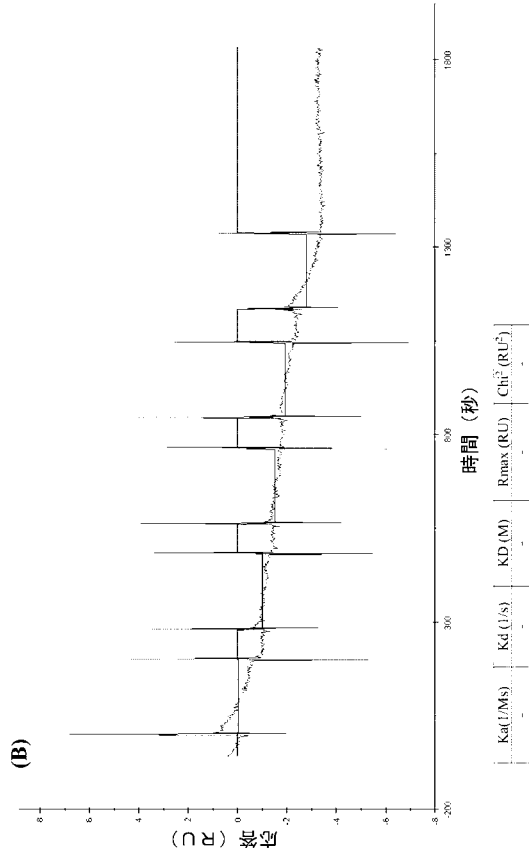
【 図 2 ( B ) 】



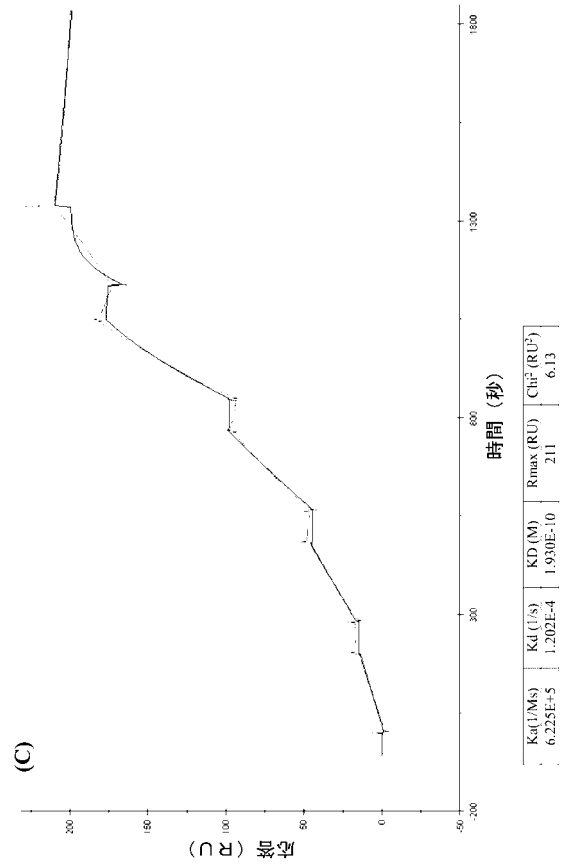
【 図 3 ( A ) 】



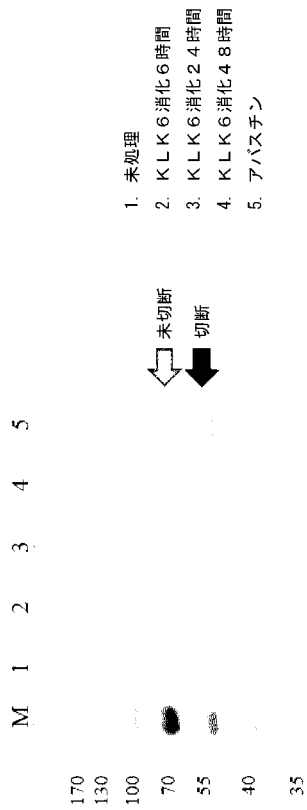
【 図 3 ( B ) 】



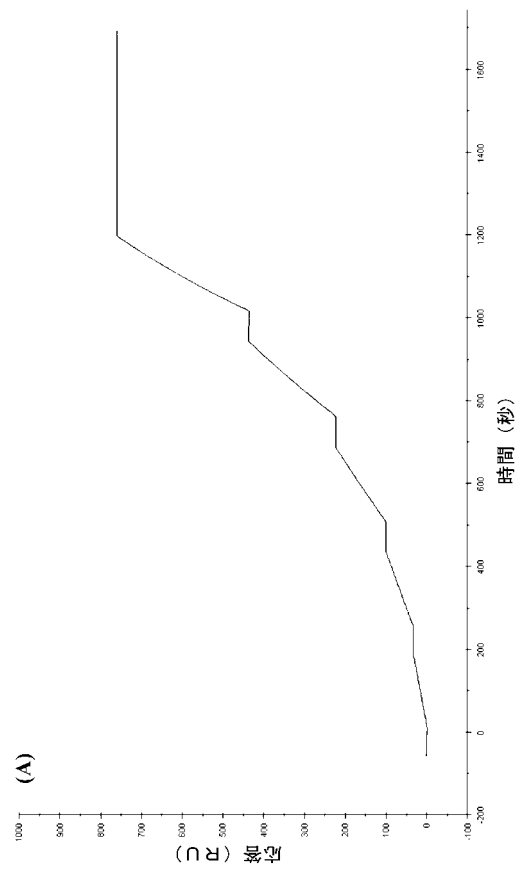
【 図 3 ( C ) 】



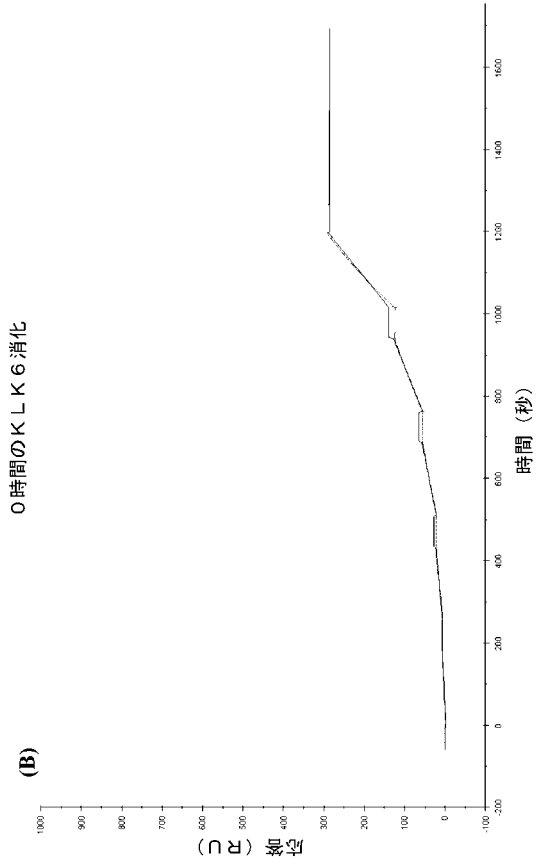
【 図 4 】



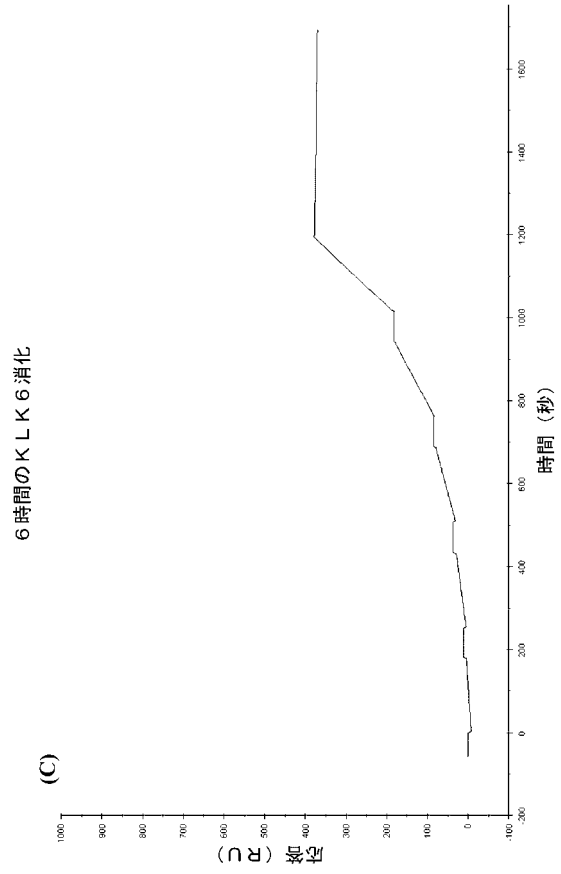
【 図 5 ( A ) 】



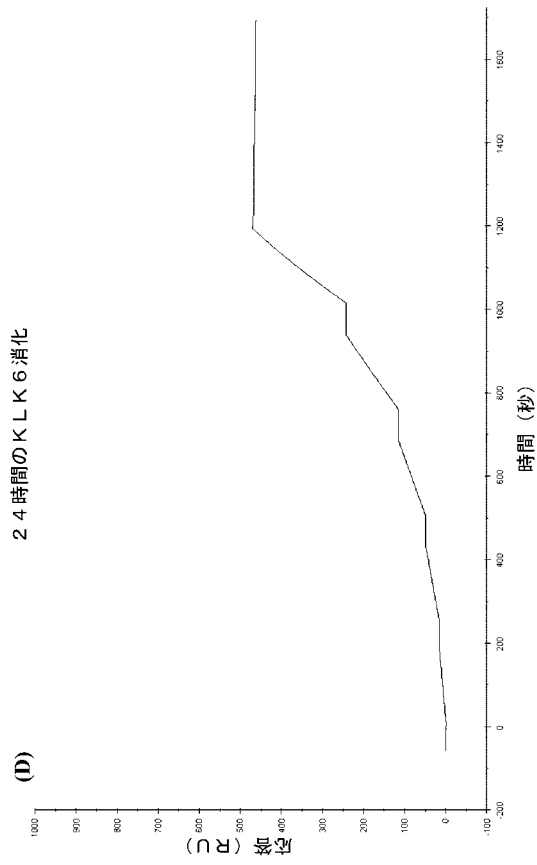
【 図 5 ( B ) 】



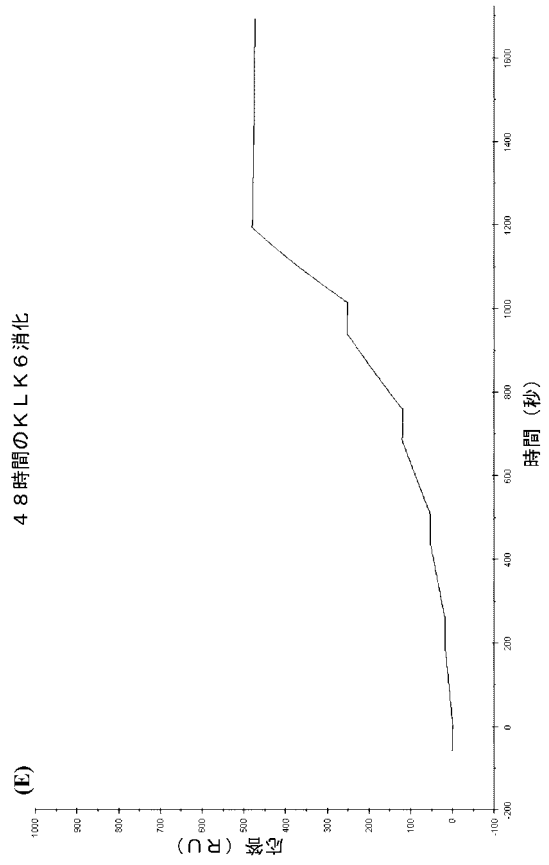
【 図 5 ( C ) 】



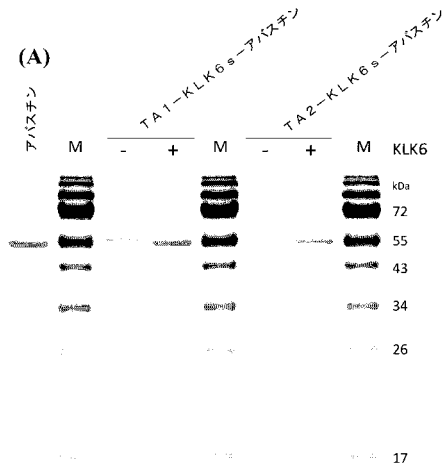
【 図 5 ( D ) 】



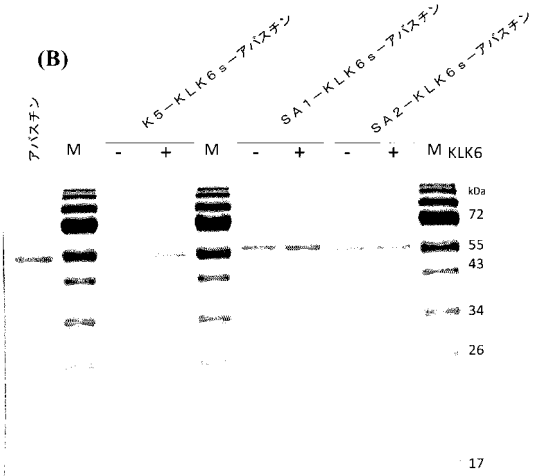
【 図 5 ( E ) 】



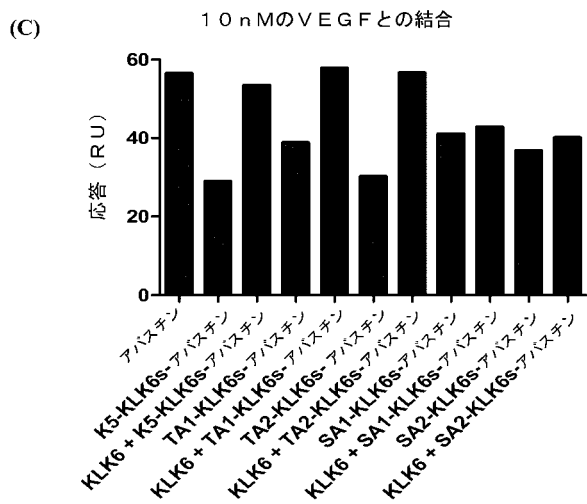
【 図 6 ( A ) 】



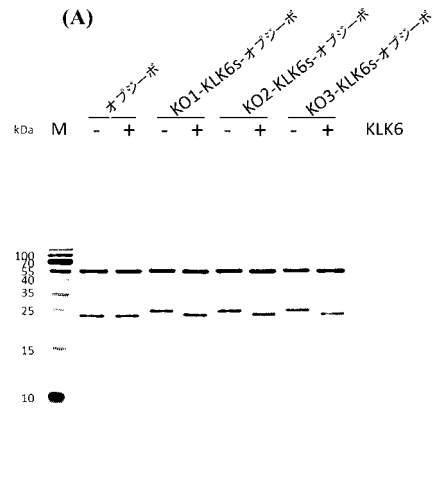
【 図 6 ( B ) 】



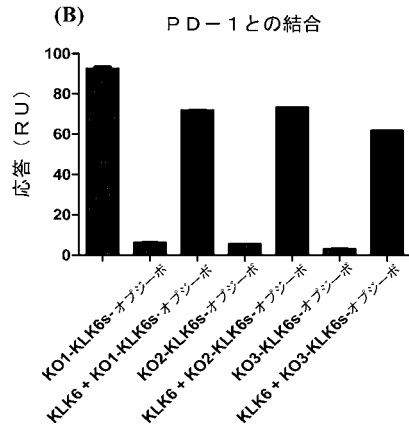
【 図 6 ( C ) 】



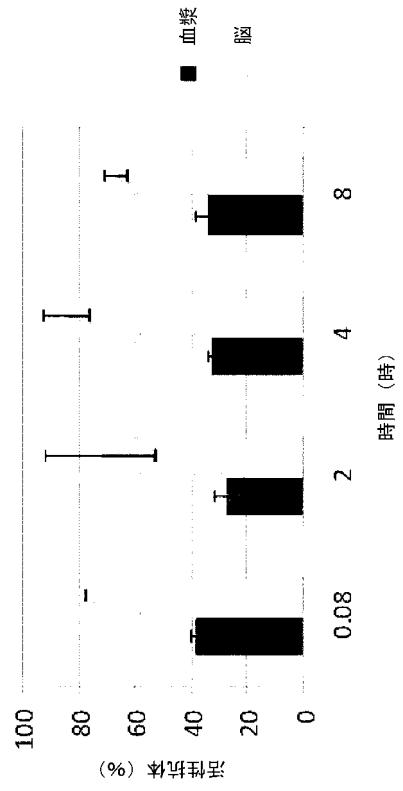
【 図 7 ( A ) 】



【 図 7 ( B ) 】



【 図 8 】



【 配列表 】

[2020504123000001.app](#)

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2017/069135

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

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

a.  forming part of the international application as filed:

in the form of an Annex C/ST.25 text file.

on paper or in the form of an image file.

b.  furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.

c.  furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:

in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).

on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2.  In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

ISA/225 mailed on 26 January 2018. No approved electronic sequence listing was submitted in response to the ISA/225.



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2017/069135

**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
  
3.  Claims Nos.: 4-11  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US2017/069135

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC(8) - A61K 39/395; C07K 16/00; C07K 16/46; C07K 19/00; C12N 15/09 (2018.01) CPC - A61K 39/395; A61K 2039/505; C07K 16/00; C07K 16/18; C07K 16/46 (2018.02)		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) See Search History document		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched USPC - 424/134.1; 424/192.1; 435/69.6; 530/387.1 (keyword delimited)		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) See Search History document		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2016/0289324 A1 (CYTOMX THERAPEUTICS, INC.) 06 October 2016 (06.10.2016) entire document	1-3
A	US 2016/0228546 A1 (CYTOMX THERAPEUTICS, INC.) 11 August 2016 (11.08.2016) entire document	1-3
A	WO 2015/171822 A1 (GENENTECH, INC. et al) 12 November 2015 (12.11.2015) entire document	1-3
A	US 2016/0185875 A1 (KAOHSIUNG MEDICAL UNIVERSITY et al) 30 June 2016 (30.06.2016) entire document	1-3
A	US 2011/0287009 A1 (SCHEER et al) 24 November 2011 (24.11.2011) entire document	1-3
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 26 March 2018		Date of mailing of the international search report <b>13 APR 2018</b>
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300		Authorized officer <b>Blaine R. Copenheaver</b> PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT QSP: 571-272-7774

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 P 37/06 (2006.01)	A 6 1 P 37/06	
A 6 1 P 31/00 (2006.01)	A 6 1 P 31/00	
A 6 1 P 25/28 (2006.01)	A 6 1 P 25/28	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	N
A 6 1 K 47/65 (2017.01)	A 6 1 K 39/395	D
A 6 1 K 47/68 (2017.01)	A 6 1 K 47/65	
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 47/68	
A 6 1 K 38/19 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	
A 6 1 K 38/22 (2006.01)	A 6 1 K 38/19	
	A 6 1 K 38/22	

(81) 指定国・地域 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT

- (72) 発明者 ユー ジェイ - ファ  
台湾, 2 2 1, ニュー タイペイ シティ シーザー ディストリクト, カンニン ストリート, レーン 1 6 9, ナンバー 1 0 1 ディベロップメント センター フォー バイオテクノロジー内
- (72) 発明者 フォン ロク - ウ  
台湾, 2 2 1, ニュー タイペイ シティ シーザー ディストリクト, カンニン ストリート, レーン 1 6 9, ナンバー 1 0 1 ディベロップメント センター フォー バイオテクノロジー内
- (72) 発明者 スー ス - イ  
台湾, 2 2 1, ニュー タイペイ シティ シーザー ディストリクト, カンニン ストリート, レーン 1 6 9, ナンバー 1 0 1 ディベロップメント センター フォー バイオテクノロジー内
- (72) 発明者 フー チ - ヨン  
台湾, 2 2 1, ニュー タイペイ シティ シーザー ディストリクト, カンニン ストリート, レーン 1 6 9, ナンバー 1 0 1 ディベロップメント センター フォー バイオテクノロジー内
- (72) 発明者 ウー チア - チェン  
台湾, 2 2 1, ニュー タイペイ シティ シーザー ディストリクト, カンニン ストリート, レーン 1 6 9, ナンバー 1 0 1 ディベロップメント センター フォー バイオテクノロジー内

F ターム(参考) 4C076 AA95 AA99 CC01 CC04 CC07 CC27 CC29 CC30 CC31 CC42  
EE41 EE59 FF67  
4C084 AA03 AA07 AA17 DA01 DB01 MA05 NA06 NA13 NA15 ZA011  
ZA012 ZB081 ZB082 ZB111 ZB112 ZB261 ZB262 ZB311 ZB312  
4C085 AA13 AA14 AA16 BB11 BB41 CC22 CC23 EE01  
4H045 AA11 AA20 AA30 BA41 BA72 DA76 EA21 FA74