

明 細 書

発明の名称： リガンド結合活性が調整可能なリガンド結合分子

技術分野

[0001] 本発明は、少なくとも一つの切断サイトを有し、当該切断サイトが切断された状態でリガンドとの結合が減弱されるリガンド結合分子、当該リガンド結合分子の製造方法、ならびに当該リガンド結合分子を含む医薬組成物を提供する。

背景技術

[0002] 抗体は血漿中での安定性が高く、副作用も少ないことから医薬品として注目されている。中でもIgG型の抗体医薬は多数上市されており、現在も数多くの抗体医薬が開発されている（非特許文献1、および非特許文献2）。

[0003] 抗体医薬を用いた癌治療薬として、これまでのCD20抗原に対するリツキサン、EGFR抗原に対するセツキシマブ、HER2抗原に対するハーセプチン等が承認されている（非特許文献3）。これらの抗体分子は、癌細胞に発現している抗原に対して結合し、ADCCやシグナル阻害等によって癌細胞に対する傷害活性を発揮する。

[0004] また、癌細胞に高発現する癌抗原に結合する抗体分子にサイトカインなどの生理活性を有するリガンドを融合させたイムノサイトカインによって、リガンドを固形癌にデリバリーする方法が知られている。イムノサイトカインによって固形癌にデリバリーされたサイトカインが免疫を活性化させることで抗腫瘍効果を発揮する。IL-2、IL-12やTNFをはじめとするサイトカインは毒性が強いため、これらのサイトカインを癌局所で働かせるために抗体によって癌局所にデリバリーすることで副作用を軽減しつつ、効果を強めることが期待されているが（非特許文献4、5、6）、これらはいずれも全身投与では臨床で十分な効果を示さない、therapeutic windowが狭い、毒性が強く全身投与ができない、などの課題があり、未だに医薬品として承認されていない。

[0005] この大きな原因として、イムノサイトカインであっても全身投与したサイトカインは全身に暴露されてしまうため、全身で作用して毒性を発揮しうる、あるいは毒性を回避するために極めて低い用量でしか投与できないことが挙げられる。癌抗原に結合する抗体にIL-2を融合したイムノサイトカインと癌抗原に結合しない抗体にIL-2を融合したイムノサイトカインで抗腫瘍効果は変わらなかったという報告もある（非特許文献7）。

[0006] 上記の問題を回避する方法として、サイトカインとサイトカインレセプターの間を癌で高発現するプロテアーゼによって切断されるリンカーで結合させた分子が報告されている。サイトカインはリンカーで結合されたサイトカインレセプターによって阻害されているが、リンカーがプロテアーゼによって切断されるとサイトカインがサイトカインレセプターから遊離し、活性体になる。例としてTNF- α とTNF-RをuPAで切断されるリンカーで結合させた分子（非特許文献8）が報告され、IL-2とIL-2RをMMP-2で切断されるリンカーで結合させた分子（非特許文献9）が報告されている。しかしながら、これらの分子はリンカーの切断前であってもサイトカインは活性を有しており、リンカーの切断によって活性が約10倍程度しか向上しない。また、IL-2Rに代わり抗IL-2 scFvをMMP-2で切断されるリンカーを介してIL-2と結合させた分子（非特許文献9）が報告されている。

先行技術文献

非特許文献

[0007] 非特許文献1: Monoclonal antibody successes in the clinic. Janice M Reichert, Clark J Rosensweig, Laura B Faden & Matthew C Dewitz, Nat. Biotechnol. (2005) 23, 1073-1078

非特許文献2: The therapeutic antibodies market to 2008. Pavlou AK, Belsey MJ., Eur. J. Pharm. Biopharm. (2005) 59 (3), 389-396

非特許文献3: Monoclonal antibodies: versatile platforms for cancer immunotherapy. Weiner LM, Surana R, Wang S., Nat. Rev. Immunol. (2010) 10 (5), 317-327

非特許文献4 : Cyclophosphamide and tucotuzumab (huKS-IL2) following first-line chemotherapy in responding patients with extensive-disease small-cell lung cancer. Gladkov O, Ramlau R, Serwatowski P, Milanowski J, Tomeczko J, Komarnitsky PB, Kramer D, Krzakowski MJ. *Anticancer Drugs*. 2015 Nov;26(10):1061-8.

非特許文献5 : Defining the Pharmacodynamic Profile and Therapeutic Index of NHS-IL12 Immunocytokine in Dogs with Malignant Melanoma. Paoloni M, Mazcko C, Selting K, Lana S, Barber L, Phillips J, Skorupski K, Vail D, Wilson H, Biller B, Avery A, Kiupel M, LeBlanc A, Bernhardt A, Brunkhorst B, Tighe R, Khanna C. *PLoS One*. 2015 Jun 19;10(6):e0129954.

非特許文献6 : Isolated limb perfusion with the tumor-targeting human monoclonal antibody-cytokine fusion protein L19-TNF plus melphalan and mild hyperthermia in patients with locally advanced extremity melanoma. Papadia F, Basso V, Patuzzo R, Maurichi A, Di Florio A, Zardi L, Ventura E, Gonzalez-Iglesias R, Lovato V, Giovannoni L, Tasciotti A, Neri D, Santinami M, Menssen HD, De Cian F. *J Surg Oncol*. 2013 Feb;107(2):173-9.

非特許文献7 : Antigen specificity can be irrelevant to immunocytokine efficacy and biodistribution. Tzeng A, Kwan BH, Opel CF, Navaratna T, Wittrup KD. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015 Mar 17;112(11):3320-5.

非特許文献8 : *Cancer Immunol Immunother*. 2006 Dec;55(12):1590-600. Epub 2006 Apr 25. Target-selective activation of a TNF prodrug by urokinase-type plasminogen activator (uPA) mediated proteolytic processing at the cell surface. Gerspach J1, Nemeth J, Munkel S, Wajant H, Pfizmaier K.

非特許文献9 : *Immunology*. 2011 Jun;133(2):206-20. doi: 10.1111/j.1365-2567.2011.03428.x. Epub 2011 Mar 23. Development of an attenuated int

erleukin-2 fusion protein that can be activated by tumour-expressed proteases. Puskas J1, Skrombolas D, Sedlacek A, Lord E, Sullivan M, Frelinger J.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0008] 本発明は、このような状況に鑑みて為されたものであり、その目的の一つは、サイトカインあるいはケモカイン等のリガンドを標的組織において選択的に活性化するリガンド結合分子、当該リガンド結合分子を含む医薬組成物、当該医薬組成物および当該有効成分の製造方法を提供することにある。

課題を解決するための手段

- [0009] 本発明者らは、上記の目的を達成するために鋭意研究を進めたところ、切断サイトが切断されることでリガンドへの結合活性が減弱するリガンド結合分子を創作した。また、本発明者らは、当該リガンド結合分子または当該リガンド結合分子を含む医薬組成物が、当該リガンドを用いて疾患を治療することに有用であることを見出すとともに、当該リガンド結合分子を投与することを含む疾患の治療に有用であること、及び疾患の治療のための医薬の製造において当該リガンド結合分子が有用であることを見出した。また、本発明者らは、当該リガンド結合分子の製造方法を創作して本発明を完成させた。

- [0010] 本発明はこのような知見に基づくものであり、具体的には以下に例示的に記載する態様を包含するものである。

(1) リガンドに結合可能な分子であって、当該分子は切断サイトを少なくとも一つ有するポリペプチドであり、且つ当該分子が少なくとも一つの切断サイトで切断された状態でリガンドとの結合が減弱される、リガンド結合分子。

(2) 前記切断サイトが切断された状態では、前記リガンドが前記リガンド結合分子から遊離する、(1)に記載のリガンド結合分子。

(3) 前記切断サイトはプロテアーゼ切断配列を含む、(1)または(2)

に記載のリガンド結合分子。

(4) 前記プロテアーゼは標的組織特異的プロテアーゼである、(3)に記載のリガンド結合分子。

(5) 前記標的組織が癌組織であり、前記標的組織特異的プロテアーゼは癌組織特異的プロテアーゼである、(4)に記載のリガンド結合分子。

(6) 前記標的組織が炎症組織であり、前記標的組織特異的プロテアーゼは炎症組織特異的プロテアーゼである、(4)に記載のリガンド結合分子。

(7) 前記プロテアーゼは、マトリプターゼ、ウロキナーゼ (uPA)、およびメタロプロテアーゼから選択される少なくとも一つのプロテアーゼである、(3)から(6)のいずれかに記載のリガンド結合分子。

(8) 前記プロテアーゼ切断配列は、配列番号：3、34、66、70、71、72、73、35、75、76、335～345、1161～1180、1392～1411で示す配列、表1に記載の配列から選ばれる配列を含む配列である、(3)に記載のリガンド結合分子。

(9) 前記プロテアーゼ切断配列の一端に、第一可動リンカーが更に付加されている、(3)から(8)のいずれかに記載のリガンド結合分子。

(10) 前記プロテアーゼ切断配列の他端に、第二可動リンカーが更に付加されている、(9)に記載のリガンド結合分子。

(11) 前記第一可動リンカーは、グリシン-セリンポリマーからなる可動リンカーである、(9)に記載のリガンド結合分子。

(12) 前記第二可動リンカーは、グリシン-セリンポリマーからなる可動リンカーである、(10)に記載のリガンド結合分子。

(13) 前記リガンド結合分子は抗体VHと、抗体VLと、抗体定常領域を含む、(1)から(12)のいずれかに記載のリガンド結合分子。

(14) 前記切断サイト、または前記プロテアーゼ切断配列、またはプロテアーゼ切断配列と第一可動リンカー、またはプロテアーゼ切断配列と第一可動リンカーと第二可動リンカーは、前記抗体定常領域内に位置する、(13)に記載のリガンド結合分子。

(15) 前記切断サイト、または前記プロテアーゼ切断配列、またはプロテアーゼ切断配列と第一可動リンカー、またはプロテアーゼ切断配列と第一可動リンカーと第二可動リンカーは、抗体重鎖定常領域118番アミノ酸(EUナンバリング)から抗体重鎖定常領域140番アミノ酸(EUナンバリング)までの配列中の任意の位置に挿入される、(14)に記載のリガンド結合分子。

(16) 前記切断サイト、または前記プロテアーゼ切断配列、またはプロテアーゼ切断配列と第一可動リンカー、またはプロテアーゼ切断配列と第一可動リンカーと第二可動リンカーは、抗体軽鎖定常領域108番アミノ酸(EUナンバリング)(Kabatナンバリング108番)から抗体軽鎖定常領域131番アミノ酸(EUナンバリング)(Kabatナンバリング131番)までの配列中の任意の位置に挿入される、(14)に記載のリガンド結合分子。

(17) 前記切断サイト、または前記プロテアーゼ切断配列、またはプロテアーゼ切断配列と第一可動リンカー、またはプロテアーゼ切断配列と第一可動リンカーと第二可動リンカーは、前記抗体VH内もしくは前記抗体VL内に位置する、(13)に記載のリガンド結合分子。

(18) 前記切断サイト、または前記プロテアーゼ切断配列、またはプロテアーゼ切断配列と第一可動リンカー、またはプロテアーゼ切断配列と第一可動リンカーと第二可動リンカーは、抗体VH7番アミノ酸(Kabatナンバリング)から16番アミノ酸(Kabatナンバリング)まで、40番アミノ酸(Kabatナンバリング)から47番アミノ酸(Kabatナンバリング)まで、55番アミノ酸(Kabatナンバリング)から69番アミノ酸(Kabatナンバリング)まで、73番アミノ酸(Kabatナンバリング)から79番アミノ酸(Kabatナンバリング)まで、83番アミノ酸(Kabatナンバリング)から89番アミノ酸(Kabatナンバリング)まで、95番アミノ酸(Kabatナンバリング)から99番アミノ酸(Kabatナンバリング)まで、および101番アミノ酸(Kabatナンバリング)から113番アミノ酸(Kabatナンバリング)までからなる群より選択される配列中の任意位置に挿入される、(17)に記載のリガンド結

合分子。

(19) 前記切断サイト、または前記プロテアーゼ切断配列、またはプロテアーゼ切断配列と第一可動リンカー、またはプロテアーゼ切断配列と第一可動リンカーと第二可動リンカーは、抗体VL 7番アミノ酸 (Kabatナンバリング) から19番アミノ酸 (Kabatナンバリング) まで、39番アミノ酸 (Kabatナンバリング) から46番アミノ酸 (Kabatナンバリング) まで、49番アミノ酸 (Kabatナンバリング) から62番アミノ酸 (Kabatナンバリング) まで、および96番アミノ酸 (Kabatナンバリング) から107番アミノ酸 (Kabatナンバリング) までからなる群より選択される配列中の任意位置に挿入される、(17) に記載のリガンド結合分子。

(20) 前記切断サイト、または前記プロテアーゼ切断配列、またはプロテアーゼ切断配列と第一可動リンカー、またはプロテアーゼ切断配列と第一可動リンカーと第二可動リンカーは、前記抗体定常領域と前記抗体VHの境界付近、または／および前記抗体定常領域と前記抗体VLとの境界付近に位置する、(13) に記載のリガンド結合分子。

(21) 前記切断サイト、または前記プロテアーゼ切断配列、またはプロテアーゼ切断配列と第一可動リンカー、またはプロテアーゼ切断配列と第一可動リンカーと第二可動リンカーは、抗体VH 109番のアミノ酸 (Kabatナンバリング) から抗体重鎖定常領域122番のアミノ酸 (EUナンバリング) までの配列中の任意位置に挿入される、(20) に記載のリガンド結合分子。

(22) 前記切断サイト、または前記プロテアーゼ切断配列、またはプロテアーゼ切断配列と第一可動リンカー、またはプロテアーゼ切断配列と第一可動リンカーと第二可動リンカーは、抗体VL 104番のアミノ酸 (Kabatナンバリング) から抗体軽鎖定常領域113番のアミノ酸 (EUナンバリング) (Kabatナンバリング113位) までの配列中の任意位置に挿入される、(20) に記載のリガンド結合分子。

(23) 前記リガンド結合分子中の前記抗体VLと前記抗体VHは会合しており、当該会合は前記切断サイトが切断されることにより解消される、または前

記プロテアーゼ切断配列がプロテアーゼで切断されることにより解消される、(13)から(22)のいずれかに記載のリガンド結合分子。

(24) 前記リガンドは生物活性を有する分子であり、前記リガンド結合分子は前記リガンドとの結合で前記リガンドの生物活性を阻害する、(1)から(23)のいずれかに記載のリガンド結合分子。

(25) 前記リガンドはサイトカインまたはケモカインである、(1)から(24)のいずれかに記載のリガンド結合分子。

(26) 前記リガンドは、インターロイキン、インターフェロン、造血因子、TNFスーパーファミリー、ケモカイン、細胞増殖因子、及びTGF- β ファミリーから選ばれるリガンドである、(1)から(24)のいずれかに記載のリガンド結合分子。

(27) 前記リガンドはCXCL10、IL-12、PD-1、またはIL-6Rである、(1)から(24)のいずれかに記載のリガンド結合分子。

(28) 前記リガンドはCXCL10であり、前記リガンド結合分子は抗体VHと抗体VLを含み、当該リガンド結合分子は：

(a) 配列番号：374となるH-CDR1、配列番号：375となるH-CDR2、配列番号：376となるH-CDR3を含む抗体VH、配列番号：377となるL-CDR1、配列番号：378となるL-CDR2、配列番号：379となるL-CDR3を含む抗体VLを有する；または

(b) 配列番号：380となるH-CDR1、配列番号：381となるH-CDR2、配列番号：382となるH-CDR3を含む抗体VH、配列番号：383となるL-CDR1、配列番号：384となるL-CDR2、配列番号：385となるL-CDR3を含む抗体VLを有する；または

(c) (a) または (b) と競合する抗体VHと抗体VLを有する；または

(d) (a) または (b) と同一エпитープに結合する抗体VHと抗体VLを有する、(27)に記載のリガンド結合分子。

(29) 前記リガンド結合分子は、配列番号：4～14、23～27、33、59、60、および346～367で示す配列から選ばれる抗体重鎖、ま

たは配列番号：１５～２２、１１４６～１１６０、１２８２～１３８０、および１３８６～１３８９で示す配列から選ばれる抗体軽鎖を含む抗体である、（２８）に記載のリガンド結合分子。

（３０）前記リガンドはIL-12であり、前記リガンド結合分子は抗体VHと抗体VLを含み、当該リガンド結合分子は：

（a） 配列番号：３８６となるH-CDR1、配列番号：３８７となるH-CDR2、配列番号：３８８となるH-CDR3を含む抗体VH、配列番号：３８９となるL-CDR1、配列番号：３９０となるL-CDR2、配列番号：３９１となるL-CDR3を含む抗体VL有する；または

（b） （a）と競合する抗体VHと抗体VLを有する；または

（c） （a）と同一エピトープに結合する抗体VHと抗体VLを有する、（２７）に記載のリガンド結合分子。

（３１）前記リガンド結合分子は、配列番号：１４６で示す抗体重鎖を含む抗体である、（３０）に記載のリガンド結合分子。

（３２）前記リガンドはPD-1であり、前記リガンド結合分子は抗体VHと抗体VLを含み、当該リガンド結合分子は：

（a） 配列番号：３９２となるH-CDR1、配列番号：３９３となるH-CDR2、配列番号：３９４となるH-CDR3を含む抗体VH、配列番号：３９５となるL-CDR1、配列番号：３９６となるL-CDR2、配列番号：３９７となるL-CDR3を含む抗体VL有する；または

（b） （a）と競合する抗体VHと抗体VLを有する；または

（c） （a）と同一エピトープに結合する抗体VHと抗体VLを有する、（２７）に記載のリガンド結合分子。

（３３）前記リガンド結合分子は、配列番号：３０４および３０５で示す配列から選ばれる抗体重鎖、または配列番号：３０６～３１５、および３２２で示す配列から選ばれる抗体軽鎖を含む抗体である、（３２）に記載のリガンド結合分子。

（３４）前記リガンドはIL-6R（IL-6受容体）であり、前記リガンド結合分子

は抗体VHと抗体VLを含み、当該リガンド結合分子は：

(a) 配列番号：398となるH-CDR1、配列番号：399となるH-CDR2、配列番号：400となるH-CDR3を含む抗体VH、配列番号：401となるL-CDR1、配列番号：402となるL-CDR2、配列番号：403となるL-CDR3を含む抗体VL有する；または

(b) (a) と競合する抗体VHと抗体VLを有する；または

(c) (a) と同一エピトープに結合する抗体VHと抗体VLを有する、(27)に記載のリガンド結合分子。

(35) 前記リガンド結合分子は、配列番号：153～156、157～159、および404～470で示す配列から選ばれる抗体重鎖、または配列番号：471～535で示す配列から選ばれる抗体軽鎖を含む抗体である、

(34)に記載のリガンド結合分子。

(36) 前記リガンド結合分子はIgG抗体である、(1)から(35)のいずれかに記載のリガンド結合分子。

(37) 前記リガンドと結合している(1)から(36)のいずれかに記載のリガンド結合分子。

(38) 前記リガンドと融合されている(1)から(36)のいずれかに記載のリガンド結合分子。

(39) 前記リガンド結合分子がリガンドと融合されている状態では更に別のリガンドと結合しない、(38)に記載のリガンド結合分子。

(40) 前記リガンド結合分子は、リンカーを介して前記リガンドと融合されている、(38)または(39)に記載のリガンド結合分子。

(41) 前記リンカーはプロテアーゼ切断配列を含まない、(40)に記載のリガンド結合分子。

(42) 前記リガンドはCXCL10であり、前記リガンド結合分子は抗体軽鎖と抗体重鎖を含んでおり、前記抗体軽鎖または前記抗体重鎖は前記リガンドと融合されている、(38)から(41)のいずれかに記載のリガンド結合分子。

(43) 前記切断サイトは前記抗体軽鎖または前記抗体重鎖に含まれる、(42)に記載のリガンド結合分子。

(44) 前記リガンドはCXCL10であり、前記リガンド結合分子に含まれる抗体軽鎖が前記リガンドと融合されており、前記リガンド結合分子は：

(a) 配列番号：374となるH-CDR1、配列番号：375となるH-CDR2、配列番号：376となるH-CDR3を含む抗体重鎖と、配列番号：377となるL-CDR1、配列番号：378となるL-CDR2、配列番号：379となるL-CDR3を含む抗体軽鎖を有する；または

(b) 配列番号：380となるH-CDR1、配列番号：381となるH-CDR2、配列番号：382となるH-CDR3を含む抗体重鎖と、配列番号：383となるL-CDR1、配列番号：384となるL-CDR2、配列番号：385となるL-CDR3を含む抗体軽鎖を有する、

(42)または(43)に記載のリガンド結合分子。

(45) 前記リガンドは配列番号：370で示されるCXCL10改変体である、

(42)から(44)のいずれかに記載のリガンド結合分子。

(46) 前記リガンド結合分子に含まれる抗体軽鎖が前記リガンドと融合されており、CXCL10と抗体軽鎖が融合された一連のポリペプチドは配列番号：372で示す配列を含む、(42)から(45)のいずれかに記載のリガンド結合分子。

(47) 前記リガンドはPD-1であり、前記リガンド結合分子は抗体軽鎖と抗体重鎖を含んでおり、前記抗体軽鎖または前記抗体重鎖は前記リガンドと融合されている、(38)から(41)のいずれかに記載のリガンド結合分子。

(48) 前記切断サイトは前記抗体軽鎖または前記抗体重鎖に含まれる、(47)に記載のリガンド結合分子。

(49) 前記リガンドはPD-1であり、前記抗体軽鎖は配列番号：395となるL-CDR1、配列番号：396となるL-CDR2、配列番号：397となるL-CDR3を有し、前記抗体重鎖は配列番号：392となるH-CDR1、配列番号：393

となるH-CDR2、配列番号：394となるH-CDR3を有する、(47)または(48)に記載のリガンド結合分子。

(50) 前記リガンドは配列番号：320で示されるPD-1である、(47)から(49)のいずれかに記載のリガンド結合分子。

(51) 前記リガンドはPD-1であり、前記リガンド結合分子に含まれる抗体重鎖が前記リガンドと融合されており、PD-1と抗体重鎖が融合された一連のポリペプチドは配列番号：323および324で示す配列から選ばれる配列を含む、(47)から(50)のいずれかに記載のリガンド結合分子。

(52) 前記リガンドはPD-1であり、前記リガンド結合分子に含まれる抗体軽鎖が前記リガンドと融合されており、PD-1と抗体軽鎖が融合された一連のポリペプチドは配列番号：325～334で示す配列から選ばれる配列を含む、(47)から(50)のいずれかに記載のリガンド結合分子。

(53) 前記リガンドはIL-12であり、前記リガンド結合分子は抗体軽鎖と抗体重鎖を含んでおり、前記抗体軽鎖または前記抗体重鎖は前記リガンドと融合されている、(38)から(41)のいずれかに記載のリガンド結合分子。

(54) 前記切断サイトは前記抗体軽鎖または前記抗体重鎖に含まれる、(53)に記載のリガンド結合分子。

(55) 前記リガンドはIL-12であり、前記抗体軽鎖は配列番号：389となるL-CDR1、配列番号：390となるL-CDR2、配列番号：391となるL-CDR3を有し、前記抗体重鎖は配列番号：386となるH-CDR1、配列番号：387となるH-CDR2、配列番号：388となるH-CDR3を有する、(53)または(54)に記載のリガンド結合分子。

(56) 前記リガンドはIL-6Rであり、前記リガンド結合分子は抗体軽鎖と抗体重鎖を含んでおり、前記抗体軽鎖または前記抗体重鎖は前記リガンドと融合されている、(38)から(41)のいずれかに記載のリガンド結合分子。

(57) 前記切断サイトは前記抗体軽鎖または前記抗体重鎖に含まれる、(

56)に記載のリガンド結合分子。

(58)前記リガンドはIL-6Rであり、前記抗体軽鎖は配列番号：401となるL-CDR1、配列番号：402となるL-CDR2、配列番号：403となるL-CDR3を有し、前記抗体重鎖は配列番号：398となるH-CDR1、配列番号：399となるH-CDR2、配列番号：400となるH-CDR3を有する、(56)または(57)に記載のリガンド結合分子。

(59)前記リガンドと、前記リガンドと結合している(1)から(36)のいずれかに記載のリガンド結合分子とで形成されている複合体。

(60)前記リガンドと(1)から(36)のいずれかに記載のリガンド結合分子が融合されている融合タンパク質。

(61)前記リガンド結合分子がリガンドと融合されている状態では更に別のリガンドと結合しない、(60)に記載の融合タンパク質。

(62)前記リガンド結合分子は、リンカーを介して前記リガンドと融合されている、(60)または(61)に記載の融合タンパク質。

(63)前記リンカーはプロテアーゼ切断配列を含まない、(62)に記載の融合タンパク質。

(64)前記リンカーは、グリシン-セリンポリマーからなるリンカーである、(62)または(63)に記載の融合タンパク質。

(65)前記リガンドはCXCL10であり、前記リガンド結合分子は抗体軽鎖と抗体重鎖を含んでおり、前記抗体軽鎖または前記抗体重鎖は前記リガンドと融合されている、(60)から(64)のいずれかに記載の融合タンパク質。

(66)前記切断サイトは前記リガンド結合分子の前記抗体軽鎖または前記抗体重鎖に含まれる、(65)に記載の融合タンパク質。

(67)前記リガンドはCXCL10であり、前記リガンド結合分子に含まれる抗体軽鎖が前記リガンドと融合されており、前記リガンド結合分子は：

(a) 配列番号：374となるH-CDR1、配列番号：375となるH-CDR2、配列番号：376となるH-CDR3を含む抗体重鎖と、配列番号：377となるL-CDR1

、配列番号：３７８となるL-CDR2、配列番号：３７９となるL-CDR3を含む抗体軽鎖を有する；または

(b) 配列番号：３８０となるH-CDR1、配列番号：３８１となるH-CDR2、配列番号：３８２となるH-CDR3を含む抗体重鎖と、配列番号：３８３となるL-CDR1、配列番号：３８４となるL-CDR2、配列番号：３８５となるL-CDR3を含む抗体軽鎖を有する、

(６５) または (６６) に記載の融合タンパク質。

(６８) 前記リガンドは配列番号：３７０で示されるCXCL10改変体である、

(６５) から (６７) のいずれかに記載の融合タンパク質。

(６９) 前記リガンド結合分子に含まれる抗体軽鎖が前記リガンドと融合されており、CXCL10と抗体軽鎖が融合された一連のポリペプチドは配列番号：３７２で示す配列を含む、(６５) から (６８) のいずれかに記載の融合タンパク質。

(７０) 前記リガンドはPD-1であり、前記リガンド結合分子は抗体軽鎖と抗体重鎖を含んでおり、前記抗体軽鎖または前記抗体重鎖は前記リガンドと融合されている、(６０) から (６４) のいずれかに記載の融合タンパク質。

(７１) 前記切断サイトは前記抗体軽鎖または前記抗体重鎖に含まれる、(７０) に記載のリガンド結合分子。

(７２) 前記リガンドはPD-1であり、前記抗体軽鎖は配列番号：３９５となるL-CDR1、配列番号：３９６となるL-CDR2、配列番号：３９７となるL-CDR3を有し、前記抗体重鎖は配列番号：３９２となるH-CDR1、配列番号：３９３となるH-CDR2、配列番号：３９４となるH-CDR3を有する、(７０) または (７１) に記載の融合タンパク質。

(７３) 前記リガンドは配列番号：３２０で示されるPD-1である、(７０) から (７２) のいずれかに記載の融合タンパク質。

(７４) 前記リガンドはPD-1であり、前記リガンド結合分子に含まれる抗体重鎖が前記リガンドと融合されており、PD-1と抗体重鎖が融合された一連のポリペプチドは配列番号：３２３および３２４で示す配列から選ばれる配列

を含む、(70)から(73)のいずれかに記載の融合タンパク質。

(75) 前記リガンドはPD-1であり、前記リガンド結合分子に含まれる抗体軽鎖が前記リガンドと融合されており、PD-1と抗体軽鎖が融合された一連のポリペプチドは配列番号：325～334で示す配列から選ばれる配列を含む、(70)から(73)のいずれかに記載の融合タンパク質。

(76) 前記リガンドはIL-12であり、前記リガンド結合分子は抗体軽鎖と抗体重鎖を含んでおり、前記抗体軽鎖または前記抗体重鎖は前記リガンドと融合されている、(60)から(64)のいずれかに記載の融合タンパク質。

(77) 前記切断サイトは前記抗体軽鎖または前記抗体重鎖に含まれる、(76)に記載の融合タンパク質。

(78) 前記リガンドはIL-12であり、前記抗体軽鎖は配列番号：389となるL-CDR1、配列番号：390となるL-CDR2、配列番号：391となるL-CDR3を有し、前記抗体重鎖は配列番号：386となるH-CDR1、配列番号：387となるH-CDR2、配列番号：388となるH-CDR3を有する、(76)または(77)に記載の融合タンパク質。

(79) 前記リガンドはIL-6Rであり、前記リガンド結合分子は抗体軽鎖と抗体重鎖を含んでおり、前記抗体軽鎖または前記抗体重鎖は前記リガンドと融合されている、(60)から(64)のいずれかに記載の融合タンパク質。

(80) 前記切断サイトは前記抗体軽鎖または前記抗体重鎖に含まれる、(79)に記載の融合タンパク質。

(81) 前記リガンドはIL-6Rであり、前記抗体軽鎖は配列番号：401となるL-CDR1、配列番号：402となるL-CDR2、配列番号：403となるL-CDR3を有し、前記抗体重鎖は配列番号：398となるH-CDR1、配列番号：399となるH-CDR2、配列番号：400となるH-CDR3を有する、(79)または(80)に記載の融合タンパク質。

(82) (1)から(58)のいずれかに記載のリガンド結合分子を含む、医薬組成物。

(83) (1)から(37)のいずれかに記載のリガンド結合分子とリガン

ドを含む、医薬組成物。

(84) (59) に記載の複合体を含む、医薬組成物。

(85) (60) から (81) のいずれかに記載の融合タンパク質を含む、
医薬組成物。

(86) (1) から (58) のいずれかに記載のリガンド結合分子を製造する
方法。

(87) リガンドに結合可能な分子中に、プロテアーゼ切断配列を導入する
ことを含む、(86) に記載の製造方法。

(88) プロテアーゼ切断配列を有するリガンド結合分子とそのリガンドを
融合させることを含む、(60) から (81) のいずれかに記載の融合タン
パク質の製造方法。

(89) (1) から (58) のいずれかに記載のリガンド結合分子をコード
するポリヌクレオチド。

(90) (89) に記載のポリヌクレオチドを含むベクター。

(91) (89) に記載のポリヌクレオチドもしくは (90) に記載のベク
ターを含む宿主細胞。

(92) (91) に記載の宿主細胞を培養する工程を含む、(1) から (5
8) のいずれかに記載のリガンド結合分子を製造する方法。

(93) (60) から (81) のいずれかに記載の融合タンパク質をコード
するポリヌクレオチド。

(94) (93) に記載のポリヌクレオチドを含むベクター。

(95) (93) に記載のポリヌクレオチドもしくは (94) に記載のベク
ターを含む宿主細胞。

(96) (95) に記載の宿主細胞を培養する工程を含む、(60) から (8
1) のいずれかに記載の融合タンパク質を製造する方法。

(97) 配列番号： 1161～1180、1392～1411 で示す配列、
表1 に記載の配列から選ばれる配列を含む、プロテアーゼ基質。

(98) 前記プロテアーゼはマトリプターゼまたはウロキナーゼである、(

９７）に記載のプロテアーゼ基質。

（９９）前記プロテアーゼはMT-SP1またはuPAである、（９７）または（９８）に記載のプロテアーゼ基質。

（１００）配列番号：１１６１～１１８０、１３９２～１４１１で示す配列、表１に記載の配列から選ばれる一つまたは複数の配列を含む、ポリペプチド。

[0011] 本発明はまた、具体的には以下に例示的に記載する態様を包含することができる。

（Ｂ１）リガンド結合分子であって、当該リガンド結合分子はリガンドに結合可能であり、当該分子は配列番号：１１６１～１１８０、１３９２～１４１１で示す配列、表１に記載の配列から選ばれる一つまたは複数の配列を含むプロテアーゼ切断配列を少なくとも一つ含むポリペプチドであり、前記プロテアーゼ切断配列が切断された状態における当該リガンド結合分子のリガンドに対する結合が、前記プロテアーゼ切断配列が未切断の状態における当該リガンド結合分子のリガンドに対する結合より弱い、リガンド結合分子。

（Ｂ２）前記プロテアーゼ切断配列が切断された状態では、前記リガンドが前記リガンド結合分子から遊離する、（Ｂ１）に記載のリガンド結合分子。

（Ｂ３）前記プロテアーゼは標的組織特異的プロテアーゼである、（Ｂ１）または（Ｂ２）に記載のリガンド結合分子。

（Ｂ４）前記標的組織が癌組織であり、前記標的組織特異的プロテアーゼは癌組織特異的プロテアーゼである、（Ｂ３）に記載のリガンド結合分子。

（Ｂ５）前記標的組織が炎症組織であり、前記標的組織特異的プロテアーゼは炎症組織特異的プロテアーゼである、（Ｂ３）に記載のリガンド結合分子。

（Ｂ６）前記プロテアーゼは、マトリプターゼ、ウロキナーゼ（uPA）、およびメタロプロテアーゼから選択される少なくとも一つのプロテアーゼである、（Ｂ１）から（Ｂ５）のいずれか一つに記載のリガンド結合分子。

（Ｂ７）前記プロテアーゼ切断配列の一端に、第一可動リンカーが更に付加されている、（Ｂ１）から（Ｂ６）のいずれか一つに記載のリガンド結合分

子。

(B 8) 前記第一可動リンカーは、グリシン-セリンポリマーからなる可動リンカーである、(B 7) に記載のリガンド結合分子。

(B 9) 前記プロテアーゼ切断配列の他端に、第二可動リンカーが更に付加されている、(B 7) または (B 8) に記載のリガンド結合分子。

(B 10) 前記第二可動リンカーは、グリシン-セリンポリマーからなる可動リンカーである、(B 9) に記載のリガンド結合分子。

(B 11) 前記リガンド結合分子は抗体VHと、抗体VLと、抗体定常領域を含む、(B 1) から (B 10) のいずれか一つに記載のリガンド結合分子。

(B 12) 前記プロテアーゼ切断配列、またはプロテアーゼ切断配列と第一可動リンカー、またはプロテアーゼ切断配列と第一可動リンカーと第二可動リンカーは、前記抗体定常領域内に位置する、(B 11) に記載のリガンド結合分子。

(B 13) 前記プロテアーゼ切断配列、またはプロテアーゼ切断配列と第一可動リンカー、またはプロテアーゼ切断配列と第一可動リンカーと第二可動リンカーは、抗体重鎖定常領域 118 番アミノ酸 (EUナンバリング) から抗体重鎖定常領域 140 番アミノ酸 (EUナンバリング) までの配列中の任意の位置に導入される、(B 12) に記載のリガンド結合分子。

(B 14) 前記プロテアーゼ切断配列、またはプロテアーゼ切断配列と第一可動リンカー、またはプロテアーゼ切断配列と第一可動リンカーと第二可動リンカーは、抗体軽鎖定常領域 108 番アミノ酸 (EUナンバリング) (Kabatナンバリング 108 番) から抗体軽鎖定常領域 131 番アミノ酸 (EUナンバリング) (Kabatナンバリング 131 番) までの配列中の任意の位置に導入される、(B 12) に記載のリガンド結合分子。

(B 15) 前記プロテアーゼ切断配列、またはプロテアーゼ切断配列と第一可動リンカー、またはプロテアーゼ切断配列と第一可動リンカーと第二可動リンカーは、前記抗体VH内もしくは前記抗体VL内に位置する、(B 11) に記載のリガンド結合分子。

(B 1 6) 前記プロテアーゼ切断配列、またはプロテアーゼ切断配列と第一可動リンカー、またはプロテアーゼ切断配列と第一可動リンカーと第二可動リンカーは、抗体VH 7番アミノ酸 (Kabatナンバリング) から 1 6番アミノ酸 (Kabatナンバリング) まで、4 0番アミノ酸 (Kabatナンバリング) から 4 7番アミノ酸 (Kabatナンバリング) まで、5 5番アミノ酸 (Kabatナンバリング) から 6 9番アミノ酸 (Kabatナンバリング) まで、7 3番アミノ酸 (Kabatナンバリング) から 7 9番アミノ酸 (Kabatナンバリング) まで、8 3番アミノ酸 (Kabatナンバリング) から 8 9番アミノ酸 (Kabatナンバリング) まで、9 5番アミノ酸 (Kabatナンバリング) から 9 9番アミノ酸 (Kabatナンバリング) まで、および 1 0 1番アミノ酸 (Kabatナンバリング) から 1 1 3番アミノ酸 (Kabatナンバリング) までからなる群より選択される配列中の任意位置に導入される、(B 1 5) に記載のリガンド結合分子。

(B 1 7) 前記プロテアーゼ切断配列、またはプロテアーゼ切断配列と第一可動リンカー、またはプロテアーゼ切断配列と第一可動リンカーと第二可動リンカーは、抗体VL 7番アミノ酸 (Kabatナンバリング) から 1 9番アミノ酸 (Kabatナンバリング) まで、3 9番アミノ酸 (Kabatナンバリング) から 4 6番アミノ酸 (Kabatナンバリング) まで、4 9番アミノ酸 (Kabatナンバリング) から 6 2番アミノ酸 (Kabatナンバリング) まで、および 9 6番アミノ酸 (Kabatナンバリング) から 1 0 7番アミノ酸 (Kabatナンバリング) までからなる群より選択される配列中の任意位置に導入される、(B 1 5) に記載のリガンド結合分子。

(B 1 8) 前記プロテアーゼ切断配列、またはプロテアーゼ切断配列と第一可動リンカー、またはプロテアーゼ切断配列と第一可動リンカーと第二可動リンカーは、前記抗体定常領域と前記抗体VHの境界付近、または／および前記抗体定常領域と前記抗体VLとの境界付近に位置する、(B 1 1) に記載のリガンド結合分子。

(B 1 9) 前記プロテアーゼ切断配列、またはプロテアーゼ切断配列と第一可動リンカー、またはプロテアーゼ切断配列と第一可動リンカーと第二可動

リンカーは、抗体VH109番のアミノ酸（Kabatナンバリング）から抗体重鎖定常領域122番のアミノ酸（EUNanバリング）までの配列中の任意位置に導入される、（B18）に記載のリガンド結合分子。

（B20）前記プロテアーゼ切断配列、またはプロテアーゼ切断配列と第一可動リンカー、またはプロテアーゼ切断配列と第一可動リンカーと第二可動リンカーは、抗体VL104番のアミノ酸（Kabatナンバリング）から抗体軽鎖定常領域113番のアミノ酸（EUNanバリング）（Kabatナンバリング113位）までの配列中の任意位置に導入される、（B18）に記載のリガンド結合分子。

（B21）前記リガンド結合分子中の前記抗体VLと前記抗体VHは会合しており、当該会合は前記プロテアーゼ切断配列がプロテアーゼで切断されることにより解消される、（B11）から（B20）のいずれか一つに記載のリガンド結合分子。

（B22）前記リガンドは生物活性を有する分子であり、前記リガンド結合分子は前記リガンドとの結合で前記リガンドの生物活性を阻害する、（B1）から（B21）のいずれか一つに記載のリガンド結合分子。

（B23）前記リガンドはサイトカインまたはケモカインである、（B1）から（B22）のいずれか一つに記載のリガンド結合分子。

（B24）前記リガンドは、インターロイキン、インターフェロン、造血因子、TNFスーパーファミリー、ケモカイン、細胞増殖因子、及びTGF- β ファミリーから選ばれるリガンドである、（B1）から（B22）のいずれか一つに記載のリガンド結合分子。

（B25）前記リガンドはCXCL10、IL-12、PD-1、IL-6R、またはIL-1Raである、（B1）から（B22）のいずれか一つに記載のリガンド結合分子。

（B26）前記リガンドはCXCL10であり、前記リガンド結合分子は抗体VHと抗体VLを含み、当該リガンド結合分子は：

(a) 配列番号：374となるH-CDR1、配列番号：375となるH-CDR2、配列番号：376となるH-CDR3を含む抗体VH、配列番号：377となるL-CDR1、配

列番号：３７８となるL-CDR2、配列番号：３７９となるL-CDR3を含む抗体VL有する；または

(b) 配列番号：３８０となるH-CDR1、配列番号：３８１となるH-CDR2、配列番号：３８２となるH-CDR3を含む抗体VH、配列番号：３８３となるL-CDR1、配列番号：３８４となるL-CDR2、配列番号：３８５となるL-CDR3を含む抗体VL有する；または

(c) (a) または (b) と競合する抗体VHと抗体VLを有する；または

(d) (a) または (b) と同一エピトープに結合する抗体VHと抗体VLを有する、(B 2 5) に記載のリガンド結合分子。

(B 2 7) 前記リガンド結合分子は、配列番号：４～１４、２３～２７、３３、５９、６０、および３４６～３６７で示す配列から選ばれる抗体重鎖、または配列番号：１５～２２、１１４６～１１６０、１２８２～１３８０、および１３８６～１３８９で示す配列から選ばれる抗体軽鎖を含む抗体である、(B 2 6) に記載のリガンド結合分子。

(B 2 8) 前記リガンドはIL-12であり、前記リガンド結合分子は抗体VHと抗体VLを含み、当該リガンド結合分子は：

(a) 配列番号：３８６となるH-CDR1、配列番号：３８７となるH-CDR2、配列番号：３８８となるH-CDR3を含む抗体VH、配列番号：３８９となるL-CDR1、配列番号：３９０となるL-CDR2、配列番号：３９１となるL-CDR3を含む抗体VL有する；または

(b) (a) と競合する抗体VHと抗体VLを有する；または

(c) (a) と同一エピトープに結合する抗体VHと抗体VLを有する、(B 2 5) に記載のリガンド結合分子。

(B 2 9) 前記リガンド結合分子は、配列番号：１４６で示す抗体重鎖を含む抗体である、(B 2 8) に記載のリガンド結合分子。

(B 3 0) 前記リガンドはPD-1であり、前記リガンド結合分子は抗体VHと抗体VLを含み、当該リガンド結合分子は：

(a) 配列番号：３９２となるH-CDR1、配列番号：３９３となるH-CDR2、配列

番号：３９４となるH-CDR3を含む抗体VH、配列番号：３９５となるL-CDR1、配列番号：３９６となるL-CDR2、配列番号：３９７となるL-CDR3を含む抗体VL有する；または

(b) (a) と競合する抗体VHと抗体VLを有する；または

(c) (a) と同一エпитープに結合する抗体VHと抗体VLを有する、(B 2 5) に記載のリガンド結合分子。

(B 3 1) 前記リガンド結合分子は、配列番号：３０４および３０５で示す配列から選ばれる抗体重鎖、または配列番号：３０６～３１５、および３２２で示す配列から選ばれる抗体軽鎖を含む抗体である、(B 3 0) に記載のリガンド結合分子。

(B 3 2) 前記リガンドはIL-6R (IL-6受容体) であり、前記リガンド結合分子は抗体VHと抗体VLを含み、当該リガンド結合分子は：

(a) 配列番号：３９８となるH-CDR1、配列番号：３９９となるH-CDR2、配列番号：４００となるH-CDR3を含む抗体VH、配列番号：４０１となるL-CDR1、配列番号：４０２となるL-CDR2、配列番号：４０３となるL-CDR3を含む抗体VL有する；または

(b) (a) と競合する抗体VHと抗体VLを有する；または

(c) (a) と同一エпитープに結合する抗体VHと抗体VLを有する、(B 2 5) に記載のリガンド結合分子。

(B 3 3) 前記リガンド結合分子は、配列番号：１５３～１５６、１５７～１５９、および４０４～４７０で示す配列から選ばれる抗体重鎖、または配列番号：４７１～５３５で示す配列から選ばれる抗体軽鎖を含む抗体である、(B 3 2) に記載のリガンド結合分子。

(B 3 4) 前記リガンド結合分子はIgG抗体である、(B 1) から(B 3 3) のいずれか一つに記載のリガンド結合分子。

(B 3 5) 前記リガンドと結合している(B 1) から(B 3 4) のいずれか一つに記載のリガンド結合分子。

(B 3 6) 前記リガンドと融合されている(B 1) から(B 3 4) のいずれ

か一つに記載のリガンド結合分子。

(B 3 7) 前記リガンド結合分子がリガンドと融合されている状態では更に別のリガンドと結合しない、(B 3 6) に記載のリガンド結合分子。

(B 3 8) 前記リガンド結合分子は、リンカーを介して前記リガンドと融合されている、(B 3 6) または (B 3 7) に記載のリガンド結合分子。

(B 3 9) 前記リンカーはプロテアーゼ切断配列を含まない、(B 3 8) に記載のリガンド結合分子。

(B 4 0) 前記リガンドはCXCL10であり、前記リガンド結合分子は抗体軽鎖と抗体重鎖を含んでおり、前記抗体軽鎖または前記抗体重鎖は前記リガンドと融合されている、(B 3 6) から (B 3 9) のいずれか一つに記載のリガンド結合分子。

(B 4 1) 前記プロテアーゼ切断配列は前記抗体軽鎖または前記抗体重鎖に含まれる、(B 4 0) に記載のリガンド結合分子。

(B 4 2) 前記リガンドはCXCL10であり、前記リガンド結合分子に含まれる抗体軽鎖が前記リガンドと融合されており、前記リガンド結合分子は：

(a) 配列番号：374となるH-CDR1、配列番号：375となるH-CDR2、配列番号：376となるH-CDR3を含む抗体重鎖と、配列番号：377となるL-CDR1、配列番号：378となるL-CDR2、配列番号：379となるL-CDR3を含む抗体軽鎖を有する；または

(b) 配列番号：380となるH-CDR1、配列番号：381となるH-CDR2、配列番号：382となるH-CDR3を含む抗体重鎖と、配列番号：383となるL-CDR1、配列番号：384となるL-CDR2、配列番号：385となるL-CDR3を含む抗体軽鎖を有する、

(B 4 0) または (B 4 1) に記載のリガンド結合分子。

(B 4 3) 前記リガンドは配列番号：370で示されるCXCL10改変体である、(B 4 0) から (B 4 2) のいずれか一つに記載のリガンド結合分子。

(B 4 4) 前記リガンド結合分子に含まれる抗体軽鎖が前記リガンドと融合されており、CXCL10と抗体軽鎖が融合された一連のポリペプチドは配列番号

： 3 7 2 で示す配列を含む、（B 4 0）から（B 4 3）のいずれか一つに記載のリガンド結合分子。

（B 4 5）前記リガンドはPD-1であり、前記リガンド結合分子は抗体軽鎖と抗体重鎖を含んでおり、前記抗体軽鎖または前記抗体重鎖は前記リガンドと融合されている、（B 3 6）から（B 3 9）のいずれか一つに記載のリガンド結合分子。

（B 4 6）前記プロテアーゼ切断配列は前記抗体軽鎖または前記抗体重鎖に含まれる、（B 4 5）に記載のリガンド結合分子。

（B 4 7）前記リガンドはPD-1であり、前記抗体軽鎖は配列番号： 3 9 5 となるL-CDR1、配列番号： 3 9 6 となるL-CDR2、配列番号： 3 9 7 となるL-CDR3を有し、前記抗体重鎖は配列番号： 3 9 2 となるH-CDR1、配列番号： 3 9 3 となるH-CDR2、配列番号： 3 9 4 となるH-CDR3を有する、（B 4 5）または（B 4 6）に記載のリガンド結合分子。

（B 4 8）前記リガンドは配列番号： 3 2 0 で示されるPD-1である、（B 4 5）から（B 4 7）のいずれか一つに記載のリガンド結合分子。

（B 4 9）前記リガンドはPD-1であり、前記リガンド結合分子に含まれる抗体重鎖が前記リガンドと融合されており、PD-1と抗体重鎖が融合された一連のポリペプチドは配列番号： 3 2 3 および 3 2 4 で示す配列から選ばれる配列を含む、（B 4 5）から（B 4 8）のいずれか一つに記載のリガンド結合分子。

（B 5 0）前記リガンドはPD-1であり、前記リガンド結合分子に含まれる抗体軽鎖が前記リガンドと融合されており、PD-1と抗体軽鎖が融合された一連のポリペプチドは配列番号： 3 2 5 ～ 3 3 4 で示す配列から選ばれる配列を含む、（B 4 5）から（B 4 8）のいずれか一つに記載のリガンド結合分子。

（B 5 1）前記リガンドはIL-12であり、前記リガンド結合分子は抗体軽鎖と抗体重鎖を含んでおり、前記抗体軽鎖または前記抗体重鎖は前記リガンドと融合されている、（B 3 6）から（B 3 9）のいずれか一つに記載のリガ

ド結合分子。

(B 5 2) 前記プロテアーゼ切断配列は前記抗体軽鎖または前記抗体重鎖に含まれる、(B 5 1) に記載のリガンド結合分子。

(B 5 3) 前記リガンドはIL-12であり、前記抗体軽鎖は配列番号：3 8 9となるL-CDR1、配列番号：3 9 0となるL-CDR2、配列番号：3 9 1となるL-CDR3を有し、前記抗体重鎖は配列番号：3 8 6となるH-CDR1、配列番号：3 8 7となるH-CDR2、配列番号：3 8 8となるH-CDR3を有する、(B 5 1) または(B 5 2) に記載のリガンド結合分子。

(B 5 4) 前記リガンドはIL-6Rであり、前記リガンド結合分子は抗体軽鎖と抗体重鎖を含んでおり、前記抗体軽鎖または前記抗体重鎖は前記リガンドと融合されている、(B 3 6) から(B 3 9) のいずれか一つに記載のリガンド結合分子。

(B 5 5) 前記プロテアーゼ切断配列は前記抗体軽鎖または前記抗体重鎖に含まれる、(B 5 4) に記載のリガンド結合分子。

(B 5 6) 前記リガンドはIL-6Rであり、前記抗体軽鎖は配列番号：4 0 1となるL-CDR1、配列番号：4 0 2となるL-CDR2、配列番号：4 0 3となるL-CDR3を有し、前記抗体重鎖は配列番号：3 9 8となるH-CDR1、配列番号：3 9 9となるH-CDR2、配列番号：4 0 0となるH-CDR3を有する、(B 5 4) または(B 5 5) に記載のリガンド結合分子。

(B 5 7) 前記リガンドと、前記リガンドと結合している(B 1) から(B 3 4) のいずれか一つに記載のリガンド結合分子とで形成されている複合体。

(B 5 8) 前記リガンドと(B 1) から(B 3 4) のいずれか一つに記載のリガンド結合分子が融合されている融合タンパク質。

(B 5 9) 前記リガンド結合分子がリガンドと融合されている状態では更に別のリガンドと結合しない、(B 5 8) に記載の融合タンパク質。

(B 6 0) 前記リガンド結合分子は、リンカーを介して前記リガンドと融合されている、(B 5 8) または(B 5 9) に記載の融合タンパク質。

(B 6 1) 前記リンカーはプロテアーゼ切断配列を含まない、(B 6 0) に記載の融合タンパク質。

(B 6 2) 前記リンカーは、グリシン - セリンポリマーからなるリンカーである、(B 6 0) または (B 6 1) に記載の融合タンパク質。

(B 6 3) 前記リガンドはCXCL10であり、前記リガンド結合分子は抗体軽鎖と抗体重鎖を含んでおり、前記抗体軽鎖または前記抗体重鎖は前記リガンドと融合されている、(B 5 8) から (B 6 2) のいずれか一つに記載の融合タンパク質。

(B 6 4) 前記プロテアーゼ切断配列は前記リガンド結合分子の前記抗体軽鎖または前記抗体重鎖に含まれる、(B 6 3) に記載の融合タンパク質。

(B 6 5) 前記リガンドはCXCL10であり、前記リガンド結合分子に含まれる抗体軽鎖が前記リガンドと融合されており、前記リガンド結合分子は：

(a) 配列番号：374となるH-CDR1、配列番号：375となるH-CDR2、配列番号：376となるH-CDR3を含む抗体重鎖と、配列番号：377となるL-CDR1、配列番号：378となるL-CDR2、配列番号：379となるL-CDR3を含む抗体軽鎖を有する；または

(b) 配列番号：380となるH-CDR1、配列番号：381となるH-CDR2、配列番号：382となるH-CDR3を含む抗体重鎖と、配列番号：383となるL-CDR1、配列番号：384となるL-CDR2、配列番号：385となるL-CDR3を含む抗体軽鎖を有する、

(B 6 3) または (B 6 4) に記載の融合タンパク質。

(B 6 6) 前記リガンドは配列番号：370で示されるCXCL10改変体である、(B 6 3) から (B 6 5) のいずれか一つに記載の融合タンパク質。

(B 6 7) 前記リガンド結合分子に含まれる抗体軽鎖が前記リガンドと融合されており、CXCL10と抗体軽鎖が融合された一連のポリペプチドは配列番号：372で示す配列を含む、(B 6 3) から (B 6 6) のいずれか一つに記載の融合タンパク質。

(B 6 8) 前記リガンドはPD-1であり、前記リガンド結合分子は抗体軽鎖と

抗体重鎖を含んでおり、前記抗体軽鎖または前記抗体重鎖は前記リガンドと融合されている、(B 5 8) から (B 6 2) のいずれか一つに記載の融合タンパク質。

(B 6 9) 前記プロテアーゼ切断配列は前記抗体軽鎖または前記抗体重鎖に含まれる、(B 6 8) に記載のリガンド結合分子。

(B 7 0) 前記リガンドはPD-1であり、前記抗体軽鎖は配列番号：3 9 5 となるL-CDR1、配列番号：3 9 6 となるL-CDR2、配列番号：3 9 7 となるL-CDR3を有し、前記抗体重鎖は配列番号：3 9 2 となるH-CDR1、配列番号：3 9 3 となるH-CDR2、配列番号：3 9 4 となるH-CDR3を有する、(B 6 8) または (B 6 9) に記載の融合タンパク質。

(B 7 1) 前記リガンドは配列番号：3 2 0 で示されるPD-1である、(B 6 8) から (B 7 0) のいずれか一つに記載の融合タンパク質。

(B 7 2) 前記リガンドはPD-1であり、前記リガンド結合分子に含まれる抗体重鎖が前記リガンドと融合されており、PD-1と抗体重鎖が融合された一連のポリペプチドは配列番号：3 2 3 および3 2 4 で示す配列から選ばれる配列を含む、(B 6 8) から (B 7 1) のいずれか一つに記載の融合タンパク質。

(B 7 3) 前記リガンドはPD-1であり、前記リガンド結合分子に含まれる抗体軽鎖が前記リガンドと融合されており、PD-1と抗体軽鎖が融合された一連のポリペプチドは配列番号：3 2 5 ～3 3 4 で示す配列から選ばれる配列を含む、(B 6 8) から (B 7 1) のいずれか一つに記載の融合タンパク質。

(B 7 4) 前記リガンドはIL-12であり、前記リガンド結合分子は抗体軽鎖と抗体重鎖を含んでおり、前記抗体軽鎖または前記抗体重鎖は前記リガンドと融合されている、(B 5 8) から (B 6 2) のいずれか一つに記載の融合タンパク質。

(B 7 5) 前記プロテアーゼ切断配列は前記抗体軽鎖または前記抗体重鎖に含まれる、(B 7 4) に記載の融合タンパク質。

(B 7 6) 前記リガンドはIL-12であり、前記抗体軽鎖は配列番号：3 8 9 と

なるL-CDR1、配列番号：390となるL-CDR2、配列番号：391となるL-CDR3を有し、前記抗体重鎖は配列番号：386となるH-CDR1、配列番号：387となるH-CDR2、配列番号：388となるH-CDR3を有する、(B74)または(B75)に記載の融合タンパク質。

(B78) 前記リガンドはIL-6Rであり、前記リガンド結合分子は抗体軽鎖と抗体重鎖を含んでおり、前記抗体軽鎖または前記抗体重鎖は前記リガンドと融合されている、(B58)から(B62)のいずれか一つに記載の融合タンパク質。

(B78) 前記プロテアーゼ切断配列は前記抗体軽鎖または前記抗体重鎖に含まれる、(B77)に記載の融合タンパク質。

(B79) 前記リガンドはIL-6Rであり、前記抗体軽鎖は配列番号：401となるL-CDR1、配列番号：402となるL-CDR2、配列番号：403となるL-CDR3を有し、前記抗体重鎖は配列番号：398となるH-CDR1、配列番号：399となるH-CDR2、配列番号：400となるH-CDR3を有する、(B77)または(B78)に記載の融合タンパク質。

(B80) (B1)から(B56)のいずれか一つに記載のリガンド結合分子を含む、医薬組成物。

(B81) (B1)から(B35)のいずれか一つに記載のリガンド結合分子とリガンドを含む、医薬組成物。

(B82) (B57)に記載の複合体を含む、医薬組成物。

(B83) (B58)から(B79)のいずれか一つに記載の融合タンパク質を含む、医薬組成物。

(B84) (B1)から(B56)のいずれか一つに記載のリガンド結合分子を製造する方法。

(B85) リガンドに結合可能な分子中に、プロテアーゼ切断配列を導入することを含み、(B84)に記載の製造方法。

(B86) プロテアーゼ切断配列を有するリガンド結合分子とそのリガンドを融合させることを含み、(B58)から(B79)のいずれか一つに記載

の融合タンパク質の製造方法。

(B 8 7) (B 1) から (B 5 6) のいずれか一つに記載のリガンド結合分子をコードするポリヌクレオチド。

(B 8 8) (B 8 7) に記載のポリヌクレオチドを含むベクター。

(B 8 9) (B 8 7) に記載のポリヌクレオチドもしくは (B 8 8) に記載のベクターを含む宿主細胞。

(B 9 0) (B 8 9) に記載の宿主細胞を培養する工程を含む、(B 1) から (B 5 6) のいずれか一つに記載のリガンド結合分子を製造する方法。

(B 9 2) (B 5 8) から (B 7 9) のいずれか一つに記載の融合タンパク質をコードするポリヌクレオチド。

(B 9 2) (B 9 1) に記載のポリヌクレオチドを含むベクター。

(B 9 3) (B 9 1) に記載のポリヌクレオチドもしくは (B 9 2) に記載のベクターを含む宿主細胞。

(B 9 4) (B 9 3) に記載の宿主細胞を培養する工程を含む、(B 5 8) から (B 7 9) のいずれか一つに記載の融合タンパク質を製造する方法。

図面の簡単な説明

- [0012] [図1]標的組織で特異的に遊離されるリガンドーリンカーー抗リガンド抗体の VH分子を含むIgG抗体とリガンドの融合タンパク質、及びその活性化の一様式を示す図である。リガンドと抗リガンド抗体はリンカーで連結されている。
- [図2]標的組織で特異的にリガンドを遊離させるIgG抗体、及びその活性化の一様式を示す図である。VHとCH1の境界付近にプロテアーゼ切断配列が挿入された抗リガンド抗体とリガンドは混合されて個体に投与される。
- [図3]標的組織で特異的にリガンドを遊離させるIgG抗体、及びその活性化の一様式を示す図である。VHとCH1の境界付近にプロテアーゼ切断配列が挿入された抗リガンド抗体が個体に投与される。投与された抗体は体内に元々存在するリガンドに結合し、以降は図2の活性化様式と同様である。
- [図4]MabCXCL10とヒトCXCL10の相互作用をBiacoreを用いて評価した結果を示す図である。

[図5A]MabCXCL10の抗体可変領域と定常領域の境界付近にプロテアーゼ切断配列を挿入することで作成した抗体分子のモデルを示す図である。

[図5B]作成した各重鎖改変体の名前、プロテアーゼ切断配列を挿入した位置、挿入したアミノ酸配列を示す図である。挿入部位を [insert]で示す図である。

[図5C]作成した各軽鎖改変体の名前、プロテアーゼ切断配列を挿入した位置、挿入したアミノ酸配列を示す図である。挿入部位を [insert]で示す図である。

[図6A]MabCXCL10の重鎖の可変領域と定常領域の境界付近にプロテアーゼ切断配列を挿入することで作成した抗体分子とヒトCXCL10の相互作用をBiacoreを用いて評価した結果を示す図である。

[図6B]MabCXCL10の軽鎖の可変領域と定常領域の境界付近にプロテアーゼ切断配列を挿入することで作成した抗体分子とヒトCXCL10の相互作用をBiacoreを用いて評価した結果を示す図である。

[図7-1] (A) MabCXCL10 の重鎖の可変領域と定常領域の境界付近にプロテアーゼ切断配列を挿入することで作成した抗体分子をプロテアーゼ (MT-SP1) 処理後、還元SDS-PAGEで泳動し、クマシーブリリアントブルー (CBB) で検出することによって切断の程度を評価した結果を示す図である。プロテアーゼ処理によって生じた2本の新たなバンドのうち、15 kDa 付近に生じたバンドがVHに由来するバンドであり、25-50 kDaの位置に現れたバンドが定常領域に由来するバンドである。

[図7-2] (A) の続き、および、(B) MabCXCL10 の軽鎖の可変領域と定常領域にプロテアーゼ切断配列を挿入することで作成した抗体分子をプロテアーゼ (MT-SP1) 処理後、切断の程度を還元SDS-PAGEで評価した結果を示す図である。プロテアーゼ処理によって切断された軽鎖由来の2本の新たなバンドが生じている。

[図7-3] (B) の続きを示す図である。

[図8]MabCXCL10の可変領域と定常領域の境界付近にプロテアーゼ切断配列と

可動リンカー配列を挿入することで作成した各重鎖改変体の名前、プロテアーゼ切断配列と可動リンカー配列を挿入した位置、挿入したアミノ酸配列を示す図である。挿入部位を [insert] で示す。

[図9] MabCXCL10 の重鎖の可変領域と定常領域の境界付近にプロテアーゼ切断配列と可動リンカー配列を挿入することで作成した抗体分子とヒトCXCL10の相互作用をBiacoreを用いて評価した結果を示す図である。

[図10A] MabCXCL10 の重鎖の可変領域と定常領域の境界付近にプロテアーゼ切断配列とリンカー配列を挿入することで作成した抗体分子をプロテアーゼ (uPA, MT-SP1) 処理後、還元SDS-PAGEで泳動し、CBBで検出することによって切断の程度を評価した結果を示す図である。プロテアーゼ処理によって生じた2本の新たなバンドのうち、15 kDa 付近に生じたバンドがVHに由来するバンドであり、25-50 kDaの位置に現れたバンドが定常領域に由来するバンドである。

[図10B] 図10Aの続きを示す図である。

[図11A] MabCXCL10a とCXCL10の複合体をプロテアーゼ (MT-SP1) 処理することによってCXCL10が遊離するかどうかを評価した結果を示す図である。

[図11B] EEIVHC006a/EEIVLとCXCL10の複合体をプロテアーゼ (MT-SP1) 処理することによってCXCL10が遊離するかどうかを評価した結果を示す図である。

[図12] MabCXCL10の可変領域と定常領域の境界付近のアミノ酸配列の一部をプロテアーゼ切断配列と可動リンカー配列で置換することで作成した各重鎖の名前、アミノ酸を挿入及び改変した部位、挿入配列、挿入及び改変後のアミノ酸配列を示す図である。挿入部位を [insert] で示す。「挿入位置及び改変位置」の欄において取り消し線で示すアミノ酸残基は挿入配列を挿入時に除去されている、即ち、挿入配列の一番C末端側のアミノ酸に置換されている。

[図13] MabCXCL10の可変領域と定常領域の境界付近のアミノ酸配列の一部をプロテアーゼ切断配列と可動リンカーで置換することで作成した抗体分子をプロテアーゼ (uPA, MT-SP1) 処理後、還元SDS-PAGEで泳動し、CBBで検出することによって切断の程度を評価した結果を示す図である。プロテアーゼ処理

によって生じた2本の新たなバンドのうち、15 kDa 付近に生じたバンドがVH に由来するバンドであり、25-50 kDaの位置に現れたバンドが定常領域に由来するバンドである。

[図14]ルシフェラーゼ活性（発光値）を表す図である。

[図15]CXCL10-抗CXCL10抗体融合タンパク質をプロテアーゼで切断した前後の SDS-PAGEの結果である。

[図16]ルシフェラーゼ活性（発光値）を表す図である。

[図17]プロテアーゼ切断配列と可動リンカー配列を導入した抗IL-12中和抗体のプロテアーゼによる切断を評価した還元SDS-PAGEの図である。

[図18]IL-12と抗体を添加した時のインターフェロンガンマの産生を示した図である。NoAbは抗体を添加せずIL-12のみを添加したサンプルであり、NoIL-12はIL-12も抗体も添加しなかったサンプルである。

[図19A]抗体のプロテアーゼによる切断を示す図である。

[図19B]抗体のプロテアーゼによる切断を示す図である。

[図20A]各種プロテアーゼで切断した結果を示す図である。

[図20B]各種プロテアーゼで切断した結果を示す図である。

[図21]各種プロテアーゼで切断した結果を示す図である。

[図22A]MRA改変体をプロテアーゼで切断した結果を示す図である。

[図22B]MRA改変体をプロテアーゼで切断した結果を示す図である。

[図22C]MRA改変体をプロテアーゼで切断した結果を示す図である。

[図22D]MRA改変体をプロテアーゼで切断した結果を示す図である。

[図22E]MRA改変体をプロテアーゼで切断した結果を示す図である。

[図22F]MRA改変体をプロテアーゼで切断した結果を示す図である。

[図22G]MRA改変体をプロテアーゼで切断した結果を示す図である。

[図22H]MRA改変体をプロテアーゼで切断した結果を示す図である。

[図22I]MRA改変体をプロテアーゼで切断した結果を示す図である。

[図23A]MRA改変体をプロテアーゼで切断した結果を示す図である。

[図23B]MRA改変体をプロテアーゼで切断した結果を示す図である。

[図23C]MRA改変体をプロテアーゼで切断した結果を示す図である。

[図24A]MRA改変体をプロテアーゼで切断した結果を示す図である。

[図24B]MRA改変体をプロテアーゼで切断した結果を示す図である。

[図24C]MRA改変体をプロテアーゼで切断した結果を示す図である。

[図24D]MRA改変体をプロテアーゼで切断した結果を示す図である。

[図24E]MRA改変体をプロテアーゼで切断した結果を示す図である。

[図25A]MRA改変体をプロテアーゼで切断した結果を示す図である。

[図25B]MRA改変体をプロテアーゼで切断した結果を示す図である。

[図26]プロテアーゼ処理抗体／プロテアーゼ未処理抗体とPD-1を含む結合評価用サンプル中のPD-1の5C4-bioへの結合を示すリアルタイムグラフを比較した図である。黒色の太線はプロテアーゼ処理抗体を含む結合評価用サンプル、灰色の細線はプロテアーゼ未処理抗体を含む結合評価用サンプルである。X軸は測定時間（秒）を表し、測定開始を0秒とした。Y軸は結合を示す。各グラフの名前は評価用サンプル中に含まれる抗体を示しており、None（抗原のみ）のグラフでは評価用サンプルとして抗原のみを使用し、抗体を混合していない。

[図27]プロテアーゼ処理抗体とプロテアーゼ未処理抗体の電気泳動結果である。Protease(+)レーンはプロテアーゼ処理抗体であり、protease(-)レーンはプロテアーゼ未処理抗体である。

[図28]プロテアーゼ処理抗体とプロテアーゼ未処理抗体のPD-1への結合を示すリアルタイムグラフを比較した図である。黒色の太線はプロテアーゼ処理抗体、灰色の細線はプロテアーゼ未処理抗体を示す。X軸は測定時間（秒）を表し、測定開始を0秒とした。Y軸は結合を示す。各グラフの名前は使用した抗体を示しており、NoneのグラフではPBS bufferのみを使用し、抗体を使用していない。

[図29]PD-1存在下でプロテアーゼ処理を行ったサンプルとPD-1存在下でプロテアーゼ処理を行わなかったサンプルに存在する遊離PD-1の5C4-bioへの結合を示すリアルタイムグラフを比較した図。黒色の太線はプロテアーゼ処理を

行ったサンプル、灰色の細線はプロテアーゼ処理を行わなかったサンプルを示す。X軸は測定時間（秒）を表し、測定開始を0秒とした。Y軸は結合を示す。各グラフの名前はサンプル中に含まれる抗体を示しており、「抗原とプロテアーゼ」のグラフではサンプル中にPD-1のみを含み、抗体を含んでいない。

[図30]プロテアーゼ処理融合タンパク質とプロテアーゼ未処理タンパク質溶液中に存在する遊離PD-1の5C4-bioへの結合を示すリアルタイムグラフを比較した図。黒色の太線はプロテアーゼ処理を行ったサンプル、灰色の細線はプロテアーゼ処理を行わなかったサンプルを示す。X軸は測定時間（秒）を表し、測定開始を0秒とした。Y軸は結合を示す。各グラフの名前は融合タンパク質中の抗体を示しており、None（抗原のみ）のグラフでは評価用サンプルとして融合タンパク質を使用せず、抗原PD-1のみを使用した。5C4H-G1T4/5C4L-KT0と示すグラフは融合タンパク質を使用せず、5C4H-G1T4/5C4L-KT0抗体のみを使用した。

[図31]プロテアーゼ処理した抗体-PD-1融合タンパク質の電気泳動結果である。Protease(+)レーンはプロテアーゼ処理融合タンパク質であり、protease(-)レーンはプロテアーゼ未処理融合タンパク質である。

[図32]プロテアーゼ切断配列を挿入した抗体分子をマウスに投与し、生体内での切断効率を評価した図である。

発明を実施するための形態

[0013] 本発明におけるポリペプチドとは、通常、4 アミノ酸程度以上の長さを有するペプチド、およびタンパク質を指す。また、本発明におけるポリペプチドは通常、人工的に設計された配列からなるポリペプチドであるが、特に限定されず、例えば、生物由来のポリペプチドであってもよい。また、天然ポリペプチド、あるいは合成ポリペプチド、組換えポリペプチド等のいずれであってもよい。さらに、上記のポリペプチドの断片もまた、本発明のポリペプチドに含まれる。

[0014] 本明細書において、たとえば、Ala/A、Leu/L、Arg/R、Lys/K、Asn/N、Met/

M、Asp/D、Phe/F、Cys/C、Pro/P、Gln/Q、Ser/S、Glu/E、Thr/T、Gly/G、Trp/W、His/H、Tyr/Y、Ile/I、Val/Vと表されるように、アミノ酸は1文字コードまたは3文字コード、またはその両方で表記されている。

[0015] ポリペプチドのアミノ酸配列中のアミノ酸の改変のためには、部位特異的変異誘発法（Kunkelら（Proc. Natl. Acad. Sci. USA（1985）82，488-492））やOverlap extension PCR等の公知の方法が適宜採用され得る。また、天然のアミノ酸以外のアミノ酸に置換するアミノ酸の改変方法として、複数の公知の方法もまた採用され得る（Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.（2006）35，225-249、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.（2003）100（11），6353-6357）。例えば、終止コドンの1つであるUAGコドン（アンバーコドン）の相補的アンバーサプレッサーtRNAに非天然アミノ酸が結合されたtRNAが含まれる無細胞翻訳系システム（Clover Direct（Protein Express））等も好適に用いられる。

[0016] 本明細書において、アミノ酸の改変部位を表す際に用いられる「および/または」の用語の意義は、「および」と「または」が適宜組み合わせられたあらゆる組合せを含む。具体的には、例えば「37番、45番、および/または47番のアミノ酸が置換されている」とは以下のアミノ酸の改変のバリエーションが含まれる；

(a) 37番、(b)45番、(c)47番、(d) 37番および45番、(e) 37番および47番、(f) 45番および47番、(g) 37番および45番および47番。

[0017] 本明細書において、また、アミノ酸の改変を表す表現として、特定の位置を表す数字の前後に改変前と改変後のアミノ酸の1文字コードまたは3文字コードを併記した表現が適宜使用され得る。例えば、抗体可変領域に含まれるアミノ酸の置換を加える際に用いられるF37VまたはPhe37Valという改変は、Kabatナンバリングで表される37位のPheのValへの置換を表す。すなわち、数字はKabatナンバリングで表されるアミノ酸の位置を表し、その前に記載されるアミノ酸の1文字コード又は3文字コードは置換前のアミノ酸、そのあとに記載されるアミノ酸の1文字コードまたは3文字コードは置換後のアミノ酸を

表す。同様に、抗体定常領域に含まれるFc領域にアミノ酸の置換を加える際に用いられるP238AまたはPro238Alaという改変は、EUナンバリングで表される238位のProのAlaへの置換を表す。すなわち、数字はEUナンバリングで表されるアミノ酸の位置を表し、その前に記載されるアミノ酸の1文字コードまたは3文字コードは置換前のアミノ酸、そのあとに記載されるアミノ酸の1文字コードまたは3文字コードは置換後のアミノ酸を表す。

- [0018] 本発明は、切断サイトを有し、かつ当該切断サイトが切断された状態でリガンドとの結合が減弱されるリガンド結合分子に関する。本発明のリガンド結合分子はポリペプチドであり、リガンドに結合可能な分子を指す。
- [0019] 本発明のリガンド結合分子は、リガンドに結合可能な分子、特に未切断の状態においてリガンドに結合可能な分子である。この「結合」は通常、静電力、ファンデルワールス力、水素結合等の非共有結合を主とした相互作用による結合をいう。本発明のリガンド結合分子のリガンド結合態様の好適な例として、それだけに限定されないが、例えば、抗原結合領域、抗原結合分子、抗体、および抗体断片等が抗原に結合するような抗原抗体反応が挙げられる。
- [0020] なおリガンドに結合可能とは、リガンド結合分子とリガンドがたとえ別分子であっても、リガンド結合分子はリガンドに結合可能であることを意味し、共有結合によりリガンド結合分子とリガンドを繋ぐことを意味しない。例えばリガンドとリガンド結合分子がリンカーを介して共有結合されていることをもって、リガンドに結合可能とは言わない。またリガンドとの結合が減弱されるとは、前記結合可能である能力が減弱されることを言う。例えばリガンドとリガンド結合分子がリンカーを介して共有結合されている場合に、そのリンカーが切断されることをもってリガンドとの結合が減弱されるとはみなせない。なお本発明においては、リガンド結合分子がリガンドに結合可能である限り、リガンド結合分子はリンカー等を介してリガンドとつながっていてもよい。
- [0021] 本発明のリガンド結合分子は、未切断の状態ではリガンドに結合することの

みで制限され、未切断の状態で目的とするリガンドに結合できる限りどのような構造の分子も使用され得る。リガンド結合分子の例として、それだけに限定されないが、例えば、抗体の重鎖可変領域（VH）および抗体の軽鎖可変領域（VL）、単ドメイン抗体（sdAb）、生体内に存在する細胞膜タンパクであるAvimerに含まれる35アミノ酸程度のAドメインと呼ばれるモジュール（国際公開W02004/044011、W02005/040229）、細胞膜に発現する糖たんぱく質であるfibronectin中のタンパク質に結合するドメインである10Fn3ドメインを含むAdnectin（国際公開W02002/032925）、ProteinAの58アミノ酸からなる3つのヘリックスの束（bundle）を構成するIgG結合ドメインをscaffoldとするAffibody（国際公開W01995/001937）、33アミノ酸残基を含むターンと2つの逆並行ヘリックスおよびループのサブユニットが繰り返し積み重なった構造を有するアンキリン反復（ankyrin repeat：AR）の分子表面に露出する領域であるDARPin（Designed Ankyrin Repeat proteins）（国際公開W02002/020565）、好中球ゲラチナーゼ結合リポカリン（neutrophil gelatinase-associated lipocalin（NGAL））等のリポカリン分子において高度に保存された8つの逆並行ストランドが中央方向にねじれたバレル構造の片側を支える4つのループ領域であるAnticalin等（国際公開W02003/029462）、ヤツメウナギ、ヌタウナギなど無顎類の獲得免疫システムとしてイムノグロブリンの構造を有さない可変性リンパ球受容体（variable lymphocyte receptor（VLR））のロイシン残基に富んだリピート（leucine-rich-repeat（LRR））モジュールが繰り返し積み重なった馬てい形の構造の内部の並行型シート構造のくぼんだ領域（国際公開W02008/016854）が挙げられる。

[0022] 本明細書で用語「抗体」は、最も広い意味で使用され、所望の抗原結合活性を示す限りは、これらに限定されるものではないが、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、多重特異性抗体（例えば、二重特異性抗体）および抗体断片を含む、種々の抗体構造を包含する。

[0023] 所望の結合活性を有する抗体を作製する方法は当業者において公知である。以下に、IL-6Rに結合する抗体（抗IL-6R抗体）を作製する方法が例示され

る。IL-6R以外の抗原に結合する抗体も下記の例示に準じて適宜作製され得る。

[0024] 抗IL-6R抗体は、公知の手段を用いてポリクローナルまたはモノクローナル抗体として取得され得る。抗IL-6R抗体としては、哺乳動物由来のモノクローナル抗体が好適に作製され得る。哺乳動物由来のモノクローナル抗体には、ハイブリドーマにより産生されるもの、および遺伝子工学的手法により抗体遺伝子を含む発現ベクターで形質転換した宿主細胞によって産生されるもの等が含まれる。本願中に言及される抗体には、「ヒト化抗体」や「キメラ抗体」が含まれる。

[0025] モノクローナル抗体産生ハイブリドーマは、公知技術を使用することによって、例えば以下のように作製され得る。すなわち、IL-6Rタンパク質を感作抗原として使用して、通常の免疫方法にしたがって哺乳動物が免疫される。得られる免疫細胞が通常の細胞融合法によって公知の親細胞と融合される。次に、通常のスクリーニング法によって、モノクローナルな抗体産生細胞をスクリーニングすることによって抗IL-6R抗体を産生するハイブリドーマが選択され得る。

[0026] 具体的には、モノクローナル抗体の作製は例えば以下に示すように行われる。まず、IL-6R遺伝子を発現することによって、抗体取得の感作抗原として使用されるIL-6Rタンパク質が取得され得る。すなわち、IL-6Rをコードする遺伝子配列を公知の発現ベクターに挿入することによって適当な宿主細胞が形質転換される。当該宿主細胞中または培養上清中から所望のヒトIL-6Rタンパク質が公知の方法で精製される。培養上清中から可溶型のIL-6Rを取得するためには、例えば、Mullbergら（J. Immunol. (1994) 152 (10), 4958-4968）によって記載されているような可溶型IL-6Rが発現される。また、精製した天然のIL-6Rタンパク質もまた同様に感作抗原として使用され得る。

[0027] 哺乳動物に対する免疫に使用する感作抗原として当該精製IL-6Rタンパク質が使用できる。IL-6Rの部分ペプチドもまた感作抗原として使用できる。この際、当該部分ペプチドはヒトIL-6Rのアミノ酸配列より化学合成によっても取

得され得る。また、IL-6R遺伝子の一部を発現ベクターに組込んで発現させることによっても取得され得る。さらにはタンパク質分解酵素を用いてIL-6Rタンパク質を分解することによっても取得され得るが、部分ペプチドとして用いるIL-6Rペプチドの領域および大きさは特に特別の態様に限定されない。感作抗原とするペプチドを構成するアミノ酸の数は少なくとも5以上、例えば6以上、或いは7以上であることが好ましい。より具体的には8~50、好ましくは10~30残基のペプチドが感作抗原として使用され得る。

[0028] また、IL-6Rタンパク質の所望の部分ポリペプチドやペプチドを異なるポリペプチドと融合した融合タンパク質が感作抗原として利用され得る。感作抗原として使用される融合タンパク質を製造するために、例えば、抗体のFc断片やペプチドタグなどが好適に利用され得る。融合タンパク質を発現するベクターは、所望の二種類又はそれ以上のポリペプチド断片をコードする遺伝子がインフレームで融合され、当該融合遺伝子が前記のように発現ベクターに挿入されることにより作製され得る。融合タンパク質の作製方法はMolecular Cloning 2nd ed. (Sambrook, J et al., Molecular Cloning 2nd ed., 9, 47-9.58 (1989) Cold Spring Harbor Lab. press) に記載されている。感作抗原として用いられるIL-6Rの取得方法及びそれを用いた免疫方法は、W02003/000883、W02004/022754、W02006/006693等にも具体的に記載されている。

[0029] 当該感作抗原で免疫される哺乳動物としては、特定の動物に限定されるものではないが、細胞融合に使用する親細胞との適合性を考慮して選択するのが好ましい。一般的にはげっ歯類の動物、例えば、マウス、ラット、ハムスター、あるいはウサギ、サル等が好適に使用される。

[0030] 公知の方法にしたがって上記の動物が感作抗原により免疫される。例えば、一般的な方法として、感作抗原が哺乳動物の腹腔内または皮下に投与によって投与されることにより免疫が実施される。具体的には、PBS (Phosphate-Buffered Saline) や生理食塩水等で適当な希釈倍率で希釈された感作抗原が、所望により通常のアジュバント、例えばフロイント完全アジュバントと混合され、乳化された後に、該感作抗原が哺乳動物に4から21日毎に数回投与さ

れる。また、感作抗原の免疫時には適当な担体が使用され得る。特に分子量の小さい部分ペプチドが感作抗原として用いられる場合には、アルブミン、キーホールリンペットヘモシアニン等の担体タンパク質と結合した該感作抗原ペプチドを免疫することが望ましい場合もある。

[0031] また、所望の抗体を産生するハイブリドーマは、DNA免疫を使用し、以下のようにしても作製され得る。DNA免疫とは、免疫動物中で抗原タンパク質をコードする遺伝子が発現され得るような態様で構築されたベクターDNAが投与された当該免疫動物中で、感作抗原が当該免疫動物の生体内で発現されることによって、免疫刺激が与えられる免疫方法である。蛋白質抗原が免疫動物に投与される一般的な免疫方法と比べて、DNA免疫には、次のような優位性が期待される。

- －IL-6Rのような膜蛋白質の構造を維持して免疫刺激が与えられ得る
- －免疫抗原を精製する必要が無い

[0032] DNA免疫によって本発明のモノクローナル抗体を得るために、まず、IL-6Rタンパク質を発現するDNAが免疫動物に投与される。IL-6RをコードするDNAは、PCRなどの公知の方法によって合成され得る。得られたDNAが適当な発現ベクターに挿入され、免疫動物に投与される。発現ベクターとしては、たとえばpcDNA3.1などの市販の発現ベクターが好適に利用され得る。ベクターを生体に投与する方法として、一般的に用いられている方法が利用され得る。たとえば、発現ベクターが吸着した金粒子が、gene gunで免疫動物個体の細胞内に導入されることによってDNA免疫が行われる。さらに、IL-6Rを認識する抗体の作製は国際公開WO 2003/104453に記載された方法を用いても作製され得る。

[0033] このように哺乳動物が免疫され、血清中におけるIL-6Rに結合する抗体力価の上昇が確認された後に、哺乳動物から免疫細胞が採取され、細胞融合に供される。好ましい免疫細胞としては、特に脾細胞が使用され得る。

[0034] 前記免疫細胞と融合される細胞として、哺乳動物のミエローマ細胞が用いられる。ミエローマ細胞は、スクリーニングのための適当な選択マーカーを

備えていることが好ましい。選択マーカーとは、特定の培養条件の下で生存できる（あるいはできない）形質を指す。選択マーカーには、ヒポキサンチン-グアニン-ホスホリボシルトランスフェラーゼ欠損（以下HGPRT欠損と省略する）、あるいはチミジンキナーゼ欠損（以下TK欠損と省略する）などが公知である。HGPRTやTKの欠損を有する細胞は、ヒポキサンチン-アミノプテリン-チミジン感受性（以下HAT感受性と省略する）を有する。HAT感受性の細胞はHAT選択培地中でDNA合成を行うことができず死滅するが、正常な細胞と融合すると正常細胞のサルベージ回路を利用してDNAの合成を継続することができるためHAT選択培地中でも増殖するようになる。

[0035] HGPRT欠損やTK欠損の細胞は、それぞれ6チオグアニン、8アザグアニン（以下8AGと省略する）、あるいは5' ブロモデオキシウリジンを含む培地で選択され得る。これらのピリミジンアナログをDNA中に取り込む正常な細胞は死滅する。他方、これらのピリミジンアナログを取り込めないこれらの酵素を欠損した細胞は、選択培地の中で生存することができる。この他G418耐性と呼ばれる選択マーカーは、ネオマイシン耐性遺伝子によって2-デオキシストレプトミン系抗生物質（ゲンタマイシン類似体）に対する耐性を与える。細胞融合に好適な種々のミエローマ細胞が公知である。

[0036] このようなミエローマ細胞として、例えば、P3 (P3x63Ag8.653) (J. Immunol. (1979) 123 (4), 1548-1550)、P3x63Ag8U.1 (Current Topics in Microbiology and Immunology (1978) 81, 1-7)、NS-1 (C. Eur. J. Immunol. (1976) 6 (7), 511-519)、MPC-11 (Cell (1976) 8 (3), 405-415)、SP2/0 (Nature (1978) 276 (5685), 269-270)、F0 (J. Immunol. Methods (1980) 35 (1-2), 1-21)、S194/5.XX0.BU.1 (J. Exp. Med. (1978) 148 (1), 313-323)、R210 (Nature (1979) 277 (5692), 131-133) 等が好適に使用され得る。

[0037] 基本的には公知の方法、たとえば、ケーラーとミルステインらの方法 (Methods Enzymol. (1981) 73, 3-46) 等に準じて、前記免疫細胞とミエローマ細胞との細胞融合が行われる。

より具体的には、例えば細胞融合促進剤の存在下で通常の栄養培養液中で、前記細胞融合が実施され得る。融合促進剤としては、例えばポリエチレングリコール（PEG）、センダイウイルス（HVJ）等が使用され、更に融合効率を高めるために所望によりジメチルスルホキシド等の補助剤が添加されて使用される。

- [0038] 免疫細胞とミエローマ細胞との使用割合は任意に設定され得る。例えば、ミエローマ細胞に対して免疫細胞を1から10倍とするのが好ましい。前記細胞融合に用いる培養液としては、例えば、前記ミエローマ細胞株の増殖に好適なRPMI1640培養液、MEM培養液、その他、この種の細胞培養に用いられる通常の培養液が使用され、さらに、牛胎児血清（FCS）等の血清補液が好適に添加され得る。
- [0039] 細胞融合は、前記免疫細胞とミエローマ細胞との所定量を前記培養液中でよく混合し、予め37℃程度に加温されたPEG溶液（例えば平均分子量1000から6000程度）が通常30から60%（w/v）の濃度で添加される。混合液が緩やかに混合されることによって所望の融合細胞（ハイブリドーマ）が形成される。次いで、上記に挙げた適当な培養液が逐次添加され、遠心して上清を除去する操作を繰り返すことによりハイブリドーマの生育に好ましくない細胞融合剤等が除去され得る。
- [0040] このようにして得られたハイブリドーマは、通常の実験培養液、例えばHAT培養液（ヒポキサンチン、アミノプテリンおよびチミジンを含む培養液）で培養することにより選択され得る。所望のハイブリドーマ以外の細胞（非融合細胞）が死滅するのに十分な時間（通常、係る十分な時間は数日から数週間である）上記HAT培養液を用いた培養が継続され得る。次いで、通常の限界希釈法によって、所望の抗体を産生するハイブリドーマのスクリーニングおよび単クローニングが実施される。
- [0041] このようにして得られたハイブリドーマは、細胞融合に用いられたミエローマが有する選択マーカーに応じた選択培養液を利用することによって選択され得る。例えばHGPRTやTKの欠損を有する細胞は、HAT培養液（ヒポキサン

チン、アミノプテリンおよびチミジンを含む培養液)で培養することにより選択され得る。すなわち、HAT感受性のミエローマ細胞を細胞融合に用いた場合、HAT培養液中で、正常細胞との細胞融合に成功した細胞が選択的に増殖し得る。所望のハイブリドーマ以外の細胞(非融合細胞)が死滅するのに十分な時間、上記HAT培養液を用いた培養が継続される。具体的には、一般に、数日から数週間の培養によって、所望のハイブリドーマが選択され得る。次いで、通常の限界希釈法によって、所望の抗体を産生するハイブリドーマのスクリーニングおよび単クローニングが実施され得る。

[0042] 所望の抗体のスクリーニングおよび単クローニングが、公知の抗原抗体反応に基づくスクリーニング方法によって好適に実施され得る。例えば、IL-6Rに結合するモノクローナル抗体は、細胞表面に発現したIL-6Rに結合することができる。このようなモノクローナル抗体は、たとえば、FACS (fluorescence activated cell sorting) によってスクリーニングされ得る。FACSは、蛍光抗体と接触させた細胞をレーザー光で解析し、個々の細胞が発する蛍光を測定することによって細胞表面に対する抗体の結合を測定することを可能にするシステムである。

[0043] FACSによって本発明のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマをスクリーニングするためには、まずIL-6Rを発現する細胞を調製する。スクリーニングのための好ましい細胞は、IL-6Rを強制発現させた哺乳動物細胞である。宿主細胞として使用した形質転換されていない哺乳動物細胞を対照として用いることによって、細胞表面のIL-6Rに対する抗体の結合活性が選択的に検出され得る。すなわち、宿主細胞に結合せず、IL-6R強制発現細胞に結合する抗体を産生するハイブリドーマを選択することによって、IL-6Rモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマが取得され得る。

[0044] あるいは固定化したIL-6R発現細胞に対する抗体の結合活性がELISAの原理に基づいて評価され得る。たとえば、ELISAプレートのウェルにIL-6R発現細胞が固定化される。ハイブリドーマの培養上清をウェル内の固定化細胞に接触させ、固定化細胞に結合する抗体が検出される。モノクローナル抗体がマ

ウス由来の場合、細胞に結合した抗体は、抗マウスイムノグロブリン抗体によって検出され得る。これらのスクリーニングによって選択された、抗原に対する結合能を有する所望の抗体を産生するハイブリドーマは、限界希釈法等によりクローニングされ得る。

[0045] このようにして作製されるモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマは通常の培養液中で継代培養され得る。また、該ハイブリドーマは液体窒素中で長期にわたって保存され得る。

[0046] 当該ハイブリドーマを通常の方法に従い培養し、その培養上清から所望のモノクローナル抗体が取得され得る。あるいはハイブリドーマをこれと適合性がある哺乳動物に投与して増殖せしめ、その腹水からモノクローナル抗体が取得され得る。前者の方法は、高純度の抗体を得るのに好適なものである。

[0047] 当該ハイブリドーマ等の抗体産生細胞からクローニングされる抗体遺伝子によってコードされる抗体も好適に利用され得る。クローニングした抗体遺伝子を適当なベクターに組み込んで宿主に導入することによって、当該遺伝子によってコードされる抗体が発現する。抗体遺伝子の単離と、ベクターへの導入、そして宿主細胞の形質転換のための方法は例えば、Vandammeらによって既に確立されている (Eur. J. Biochem. (1990) 192 (3), 767-775)。下記に述べるように組換え抗体の製造方法もまた公知である。

[0048] たとえば、抗IL-6R抗体を産生するハイブリドーマ細胞から、抗IL-6R抗体の可変領域 (V領域) をコードするcDNAが取得される。そのために、通常、まずハイブリドーマから全RNAが抽出される。細胞からmRNAを抽出する方法として、たとえば次のような方法を利用することができる。

ーグアニジン超遠心法 (Biochemistry (1979) 18 (24), 5294-5299)

ーAGPC法 (Anal. Biochem. (1987) 162 (1), 156-159)

[0049] 抽出されたmRNAは、mRNA Purification Kit (GEヘルスケアバイオサイエンス製) 等を使用して精製され得る。あるいは、QuickPrep mRNA Purification Kit (GEヘルスケアバイオサイエンス製) などのように、細胞から直接全

mRNAを抽出するためのキットも市販されている。このようなキットを用いて、ハイブリドーマからmRNAが取得され得る。得られたmRNAから逆転写酵素を用いて抗体V領域をコードするcDNAが合成され得る。cDNAは、AMV Reverse Transcriptase First-strand cDNA Synthesis Kit（生化学工業社製）等によって合成され得る。また、cDNAの合成および増幅のために、SMART RACE cDNA増幅キット（Clontech製）およびPCRを用いた5' -RACE法（Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1988) 85 (23), 8998-9002, Nucleic Acids Res. (1989) 17 (8), 2919-2932) が適宜利用され得る。更にこうしたcDNAの合成の過程においてcDNAの両末端に後述する適切な制限酵素サイトが導入され得る。

- [0050] 得られたPCR産物から目的とするcDNA断片が精製され、次いでベクターDNAと連結される。このように組換えベクターが作製され、大腸菌等に導入されコロニーが選択された後に、該コロニーを形成した大腸菌から所望の組換えベクターが調製され得る。そして、該組換えベクターが目的とするcDNAの塩基配列を有しているか否かについて、公知の方法、例えば、ジデオキシヌクレオチドチェインターミネーション法等により確認される。
- [0051] 可変領域をコードする遺伝子を取得するためには、可変領域遺伝子増幅用のプライマーを使った5' -RACE法を利用するのが簡便である。まずハイブリドーマ細胞より抽出されたRNAを鋳型としてcDNAが合成され、5' -RACE cDNAライブラリが得られる。5' -RACE cDNAライブラリの合成にはSMART RACE cDNA増幅キットなど市販のキットが適宜用いられる。
- [0052] 得られた5' -RACE cDNAライブラリを鋳型として、PCR法によって抗体遺伝子が増幅される。公知の抗体遺伝子配列をもとにマウス抗体遺伝子増幅用のプライマーがデザインされ得る。これらのプライマーは、イムノグロブリンのサブクラスごとに異なる塩基配列である。したがって、サブクラスは予めIso Stripマウスモノクローナル抗体アイソタイピングキット（ロシュ・ダイアグノスティックス）などの市販キットを用いて決定しておくことが望ましい。
- [0053] 具体的には、たとえばマウスIgGをコードする遺伝子の取得を目的とすると

きには、重鎖として γ 1、 γ 2a、 γ 2b、 γ 3、軽鎖として κ 鎖と λ 鎖をコードする遺伝子の増幅が可能なプライマーが利用され得る。IgGの可変領域遺伝子を増幅するためには、一般に3'側のプライマーには可変領域に近い定常領域に相当する部分にアニールするプライマーが利用される。一方5'側のプライマーには、5' RACE cDNAライブラリ作製キットに付属するプライマーが利用される。

[0054] こうして増幅されたPCR産物を利用して、重鎖と軽鎖の組み合わせからなるイムノグロブリンが再構成され得る。再構成されたイムノグロブリンの、IL-6Rに対する結合活性を指標として、所望の抗体がスクリーニングされ得る。たとえばIL-6Rに対する抗体の取得を目的とするとき、抗体のIL-6Rに対する結合は、特異的であることがさらに好ましい。IL-6Rに結合する抗体は、たとえば次のようにしてスクリーニングされ得る；

(1) ハイブリドーマから得られたcDNAによってコードされるV領域を含む抗体をIL-6R発現細胞に接触させる工程、

(2) IL-6R発現細胞と抗体との結合を検出する工程、および

(3) IL-6R発現細胞に結合する抗体を選択する工程。

[0055] 抗体とIL-6R発現細胞との結合を検出する方法は公知である。具体的には、先に述べたFACSなどの手法によって、抗体とIL-6R発現細胞との結合が検出され得る。抗体の結合活性を評価するためにIL-6R発現細胞の固定標本が適宜利用され得る。

[0056] 結合活性を指標とする抗体のスクリーニング方法として、ファージベクターを利用したパニング法も好適に用いられる。ポリクローナルな抗体発現細胞群より抗体遺伝子を重鎖と軽鎖のサブクラスのリブラリとして取得した場合には、ファージベクターを利用したスクリーニング方法が有利である。重鎖と軽鎖の可変領域をコードする遺伝子は、適当なリンカー配列で連結することによってシングルチェインFv (scFv) を形成することができる。scFvをコードする遺伝子をファージベクターに挿入することにより、scFvを表面に発現するファージが取得され得る。このファージと所望の抗原との接触の

後に、抗原に結合したファージを回収することによって、目的の結合活性を有するscFvをコードするDNAが回収され得る。この操作を必要に応じて繰り返すことにより、所望の結合活性を有するscFvが濃縮され得る。

[0057] 目的とする抗IL-6R抗体のV領域をコードするcDNAが得られた後に、当該cDNAの両末端に挿入した制限酵素サイトを認識する制限酵素によって該cDNAが消化される。好ましい制限酵素は、抗体遺伝子を構成する塩基配列に出現する頻度が低い塩基配列を認識して消化する。更に1コピーの消化断片をベクターに正しい方向で挿入するためには、付着末端を与える制限酵素の挿入が好ましい。上記のように消化された抗IL-6R抗体のV領域をコードするcDNAを適当な発現ベクターに挿入することによって、抗体発現ベクターが取得され得る。このとき、抗体定常領域（C領域）をコードする遺伝子と、前記V領域をコードする遺伝子とがインフレイムで融合されれば、キメラ抗体が取得される。ここで、キメラ抗体とは、定常領域と可変領域の由来が異なることをいう。したがって、マウスーヒトなどの異種キメラ抗体に加え、ヒトーヒト同種キメラ抗体も、本発明におけるキメラ抗体に含まれる。予め定常領域を有する発現ベクターに、前記V領域遺伝子を挿入することによって、キメラ抗体発現ベクターが構築され得る。具体的には、たとえば、所望の抗体定常領域（C領域）をコードするDNAを保持した発現ベクターの5'側に、前記V領域遺伝子を消化する制限酵素の制限酵素認識配列が適宜配置され得る。同じ組み合わせの制限酵素で消化された両者がインフレイムで融合されることによって、キメラ抗体発現ベクターが構築される。

[0058] 抗IL-6Rモノクローナル抗体を製造するために、抗体遺伝子が発現制御領域による制御の下で発現するように発現ベクターに組み込まれる。抗体を発現するための発現制御領域とは、例えば、エンハンサーやプロモーターを含む。また、発現した抗体が細胞外に分泌されるように、適切なシグナル配列がアミノ末端に付加され得る。例えば、シグナル配列として、アミノ酸配列MGWSCIILFLVATATGVHS（配列番号：536）を有するペプチドが使用され得るが、これ以外にも適したシグナル配列が付加される。発現されたポリペプチドは上

記配列のカルボキシル末端部分で切断され、切断されたポリペプチドが成熟ポリペプチドとして細胞外に分泌され得る。次いで、この発現ベクターによって適当な宿主細胞が形質転換されることによって、抗IL-6R抗体をコードするDNAを発現する組換え細胞が取得され得る。

[0059] 「抗体断片」は、完全抗体が結合する抗原に結合する当該完全抗体の一部を含む、当該完全抗体以外の分子のことをいう。抗体断片の例は、それだけに限定されるものではないが、Fv、Fab、Fab'、Fab' -SH、F(ab')₂、ダイアボディ、線状抗体、単鎖抗体分子（例えば、scFv）、および抗体断片から形成された多重特異性抗体を含む。

[0060] 用語「全長抗体」、「完全抗体」、および「全部抗体」は、本明細書では相互に交換可能に用いられ、天然型抗体構造に実質的に類似した構造を有する、または本明細書で定義するFc領域を含む重鎖を有する抗体のことをいう。

[0061] 用語「可変領域」または「可変ドメイン」は、抗体を抗原へと結合させることに関与する、抗体の重鎖または軽鎖のドメインのことをいう。抗体の重鎖および軽鎖の可変ドメイン（それぞれVHおよびVL）は、通常、各ドメインが4つの保存されたフレームワーク領域（FR）および3つの相補性決定領域（CDR）を含む、類似の構造を有する。（例えば、Kindt et al., Kuby Immunology, 6th ed., W.H. Freeman and Co., page 91 (2007) 参照。）1つのVHまたはVLドメインで、抗原結合特異性を与えるに充分であろう。

[0062] 本明細書で用いられる用語「相補性決定領域」または「CDR」は、配列において超可変であり、および／または構造的に定まったループ（「超可変ループ」）を形成し、および／または抗原接触残基（「抗原接触」）、抗体の可変ドメインの各領域のことをいう。通常、抗体は6つのCDRを含む：VHに3つ（H1、H2、H3）、およびVLに3つ（L1、L2、L3）である。本明細書での例示的なCDRは、以下のものを含む：

(a) アミノ酸残基26-32 (L1)、50-52 (L2)、91-96 (L3)、26-32 (H1)、53-55 (H2)、および96-101 (H3)のところで生じる超可変ループ (Chothia and L

esk, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987));

(b) アミノ酸残基24-34 (L1)、50-56 (L2)、89-97 (L3)、31-35b (H1)、50-65 (H2)、および95-102 (H3)のところで生じるCDR (Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991));

(c) アミノ酸残基27c-36 (L1)、46-55 (L2)、89-96 (L3)、30-35b (H1)、47-58 (H2)、および93-101 (H3) のところで生じる抗原接触 (MacCallum et al., J. Mol. Biol. 262: 732-745 (1996)); ならびに、

(d) HVRアミノ酸残基46-56 (L2)、47-56 (L2)、48-56 (L2)、49-56 (L2)、26-35 (H1)、26-35b (H1)、49-65 (H2)、93-102 (H3)、および94-102 (H3)を含む、(a)、(b)、および/または(c)の組合せ。

別段示さない限り、CDR残基および可変ドメイン中の他の残基 (例えば、FR残基) は、本明細書では上記のKabatらにしたがって番号付けされる。

[0063] 「フレームワーク」または「FR」は、相補性決定領域 (CDR) 残基以外の、可変ドメイン残基のことをいう。可変ドメインのFRは、通常4つのFRドメイン: FR1、FR2、FR3、およびFR4からなる。それに応じて、CDRおよびFRの配列は、通常次の順序でVH (またはVL) に現れる: FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4。

[0064] 本明細書で用語「定常領域」または「定常ドメイン」は、抗体の可変領域以外の部分を言う。例えば、IgG抗体は、ジスルフィド結合している2つの同一の軽鎖と2つの同一の重鎖から構成される約150,000ダルトンのヘテロ四量体糖タンパク質であり、N末端からC末端に向かって、各重鎖は、可変重鎖ドメインまたは重鎖可変ドメインとも呼ばれる可変領域 (VH) を有し、CH1ドメイン、ヒンジ領域、CH2ドメイン、CH3ドメインを含む重鎖定常領域 (CH) が続く。同様に、N末端からC末端に向かって、各軽鎖は、可変軽鎖ドメインまたは軽鎖可変ドメインとも呼ばれる可変領域 (VL) を有し、それに定常軽鎖 (CL) ドメインが続く。天然型抗体の軽鎖は、その定常ドメインのアミノ酸配列に基づいて、カッパ (κ) およびラムダ (λ) と呼ばれる、2つのタイプの

1つに帰属させられてよい。

- [0065] 抗体の「クラス」は、抗体の重鎖に備わる定常ドメインまたは定常領域のタイプのことをいう。抗体には5つの主要なクラスがある：IgA、IgD、IgE、IgG、およびIgMである。そして、このうちいくつかはさらにサブクラス（アイソタイプ）に分けられてもよい。例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、およびIgA2である。異なるクラスの免疫グロブリンに対応する重鎖定常ドメインを、それぞれ、 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 、および μ と呼ぶ。
- [0066] 本明細書で用語「Fc領域」は、少なくとも定常領域の一部分を含む免疫グロブリン重鎖のC末端領域を定義するために用いられる。この用語は、天然型配列のFc領域および変異体Fc領域を含む。一態様において、ヒトIgG1の場合、重鎖Fc領域はCys226から、またはPro230から、重鎖のカルボキシル末端まで延びる。ただし、Fc領域のC末端のリジン（Lys447）またはグリシン-リジン（Gly446-Lys447）は、存在していてもしていなくてもよい。本明細書では別段特定しない限り、Fc領域または定常領域中のアミノ酸残基の番号付けは、Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD 1991 に記載の、EUナンバリングシステム（EUインデックスとも呼ばれる）にしたがう。
- [0067] 本発明のリガンド結合分子は、切断サイトを含むポリペプチドである。切断サイトは、例えば酵素によって切断することが出来るか、また還元剤によって還元することが出来るか、または光分解することが出来る。切断サイトは、切断されることによってリガンド結合分子のリガンドへの結合を減弱できる限り、ポリペプチド中のどの位置に配置されても良い。また、ポリペプチド中に含まれる切断サイトは、一つであっても複数であっても良い。
- [0068] また、本発明のリガンド結合分子は、未切断状態と比べて、切断された状態でのリガンド結合が弱い（即ち、減弱されている）。リガンド結合分子とリガンドの結合が抗原抗体反応である実施態様において、リガンド結合の減弱はリガンド結合分子のリガンド結合活性により評価され得る。

[0069] リガンド結合分子とリガンドの結合活性の評価は、FACS、ELISAフォーマット、ALPHAスクリーン(Amplified Luminescent Proximity Homogeneous Assay)や表面プラズモン共鳴(SPR)現象を利用したBIAcore法、BLI (Bio-Layer Interferometry) 法 (Octet) 等、周知の方法によって確認することができる(Proc. Natl. Acad. Sci. USA (2006) 103 (11), 4005-4010)。

ALPHAスクリーンは、ドナーとアクセプターの2つのビーズを使用するALPHAテクノロジーによって下記の原理に基づいて実施される。ドナービーズに結合した分子が、アクセプタービーズに結合した分子と相互作用し、2つのビーズが近接した状態の時にのみ、発光シグナルが検出される。レーザーによって励起されたドナービーズ内のフォトセンシタイザーは、周辺の酸素を励起状態の一重項酸素に変換する。一重項酸素はドナービーズ周辺に拡散し、近接しているアクセプタービーズに到達するとビーズ内の化学発光反応を引き起こし、最終的に光が放出される。ドナービーズに結合した分子とアクセプタービーズに結合した分子が相互作用しないときは、ドナービーズの産生する一重項酸素がアクセプタービーズに到達しないため、化学発光反応は起きない。

[0070] 例えば、ドナービーズにビオチン標識されたリガンド結合分子が結合され、アクセプタービーズにはグルタチオンSトランスフェラーゼ (GST) でタグ化されたリガンドが結合される。競合するタグ化されていないリガンド結合分子の非存在下では、リガンド結合分子とリガンドは相互作用し520-620 nmのシグナルを生ずる。タグ化されていないリガンド結合分子は、タグ化されたリガンド結合分子とリガンド間の相互作用と競合する。競合の結果表れる蛍光の減少を定量することによって相対的な結合親和性が決定され得る。抗体等のリガンド結合分子をSulfo-NHS-ビオチン等を用いてビオチン化することは公知である。リガンドをGSTでタグ化する方法としては、リガンドをコードするポリヌクレオチドとGSTをコードするポリヌクレオチドをインフレームで融合した融合遺伝子を発現可能なベクターを保持した細胞等においてGST融合リガンドを発現し、グルタチオンカラムを用いて精製する方法等が適宜採

用され得る。得られたシグナルは例えばGRAPHPAD PRISM (GraphPad社、San Diego) 等のソフトウェアを用いて非線形回帰解析を利用する一部位競合 (one-site competition) モデルに適合させることにより好適に解析される。

[0071] 相互作用を観察する物質の一方 (リガンド) をセンサーチップの金薄膜上に固定し、センサーチップの裏側から金薄膜とガラスの境界面で全反射するように光を当てると、反射光の一部に反射強度が低下した部分 (SPRシグナル) が形成される。相互作用を観察する物質の他方 (アナライト) をセンサーチップの表面に流しリガンドとアナライトが結合すると、固定化されているリガンド分子の質量が増加し、センサーチップ表面の溶媒の屈折率が変化する。この屈折率の変化により、SPRシグナルの位置がシフトする (逆に結合が解離するとシグナルの位置は戻る)。Biacoreシステムは上記のシフトする量、すなわちセンサーチップ表面での質量変化を縦軸にとり、質量の時間変化を測定データとして表示する (センサーグラム)。センサーグラムのカーブからカインेटクス: 結合速度定数 (k_a) と解離速度定数 (k_d) が、当該定数の比から解離定数 (KD) が求められる。BIACORE法では阻害測定法や平衡値解析法も好適に用いられる。阻害測定法の例はProc. Natl. Acad. Sci. USA (2006) 103 (11), 4005-4010において、平衡値解析法の例はMethods Enzymol. 2000;323:325-40. において記載されている。

[0072] リガンド結合分子がリガンドと結合する機能が減弱されているとは、例えば、上記の測定方法に基づいて、被験リガンド結合分子あたりのリガンド結合量が、対照のリガンド結合分子に比較して、50%以下、好ましくは45%以下、40%以下、35%以下、30%以下、20%以下、15%以下、特に好ましくは10%以下、9%以下、8%以下、7%以下、6%以下、5%以下、4%以下、3%以下、2%以下、または1%以下の結合量を示すことをいう。結合活性の指標は適宜所望の指標を用いてよいが、例えば解離定数 (KD) を用いてよい。結合活性の評価指標として解離定数 (KD) を用いる場合、被験リガンド結合分子のリガンドに対する解離定数 (KD) が、対照のリガンド結合分子のリガンドに対する解離定数 (KD) に比較して大きいことが、被験リガンド結合分子の

リガンドに対する結合活性が対照のリガンド結合分子に比較して弱いことを示す。リガンドと結合する機能が減弱されているとは、例えば、被験リガンド結合分子のリガンドに対する解離定数 (KD) が、対照のリガンド結合分子のリガンドに対する解離定数 (KD) に比較して、2倍以上、好ましくは5倍以上、10倍以上、特に好ましくは100倍以上であることをいう。

対照のリガンド結合分子としては、例えば、未切断型のリガンド結合分子が挙げられる。

[0073] 本発明の一実施態様において、本発明のリガンド結合分子は、切断サイトが切断されることにより、リガンド結合分子からリガンドが遊離する。ここで、リガンドがリンカーを介してリガンド結合分子の一部分と結合しており、該リンカーに切断サイトがない場合は、リガンドは、リガンド結合分子の該一部分とリンカーを介してつながったまま遊離することになる（例えば図1を参照）。このように、リガンドがリガンド結合分子の一部と共に遊離する場合であっても、リガンド結合分子の過半から遊離する限り、リガンド結合分子からリガンドが遊離したと言える。

[0074] リガンド結合分子からリガンドが切断サイトの切断により遊離することを検出する方法として、リガンドを認識するリガンド検出用抗体等でリガンドを検出する方法がある。リガンド結合分子が抗体断片である場合、リガンド検出用抗体はリガンド結合分子と同様なエピトープに結合することが好ましい。リガンド検出用抗体を用いるリガンドの検出は、FACS、ELISAフォーマット、ALPHAスクリーン(Amplified Luminescent Proximity Homogeneous Assay)や表面プラズモン共鳴(SPR)現象を利用したBIAcore法、BLI (Bio-Layer Interferometry) 法 (Octet) 等、周知の方法によって確認することができる(Proc. Natl. Acad. Sci. USA (2006) 103 (11), 4005-4010)。

例えば、Octetを用いてリガンドの遊離を検出する場合、リガンドを認識するリガンド検出用抗体をビオチン化し、バイオセンサーと接触させたのちに、サンプル中のリガンドに対する結合を測定することで、リガンドの遊離を検出することができる。具体的には、プロテアーゼ処理前またはプロテアー

ぜ処理後のリガンド結合分子とリガンドが含まれるサンプルに対して、リガンド検出抗体を用いてリガンドの量を測定し、プロテアーゼ処理前後のサンプル中のリガンド検出量を比較することでリガンドの遊離を検出することができる。また、プロテアーゼとリガンド結合分子とリガンドが含まれるサンプル及び、プロテアーゼを含まないでリガンド結合分子とリガンドが含まれるサンプルに対して、リガンド検出抗体を用いてリガンドの量を測定し、プロテアーゼ有無のサンプル中のリガンド検出量を比較することでリガンドの遊離を検出することができる。より具体的に、本願実施例中の方法によりリガンドの遊離を検出できる。リガンド結合分子がリガンドと融合され融合タンパク質を形成している場合、プロテアーゼ処理前またはプロテアーゼ処理後の融合タンパク質が含まれるサンプルに対して、リガンド検出抗体を用いてリガンドの量を測定し、プロテアーゼ処理前後のサンプル中のリガンド検出量を比較することでリガンドの遊離を検出することができる。また、プロテアーゼと融合タンパク質が含まれるサンプル及び、プロテアーゼを含まないで融合タンパク質が含まれるサンプルに対して、リガンド検出抗体を用いてリガンドの量を測定し、プロテアーゼ有無のサンプル中のリガンド検出量を比較することでリガンドの遊離を検出することができる。より具体的に、本願実施例中の方法によりリガンドの遊離を検出できる。

[0075] また、リガンド結合分子と結合するときにリガンドの生理活性が阻害される実施態様において、リガンド結合分子から遊離することを検出する方法として、サンプル中のリガンドの生理活性を測定することによりリガンドの遊離を検出できる。具体的には、プロテアーゼ処理前またはプロテアーゼ処理後のリガンド結合分子とリガンドが含まれるサンプルに対して、リガンドの生理活性を測定し比較することによりリガンドの遊離を検出できる。また、プロテアーゼとリガンド結合分子とリガンドが含まれるサンプル及び、プロテアーゼを含まないでリガンド結合分子とリガンドが含まれるサンプルに対して、リガンドの生理活性を測定し比較することによりリガンドの遊離を検出できる。リガンド結合分子がリガンドと融合され融合タンパク質を形成して

いる場合、プロテアーゼ処理前またはプロテアーゼ処理後の融合タンパク質が含まれるサンプルに対して、リガンドの生理活性を測定し比較することによりリガンドの遊離を検出できる。また、プロテアーゼと融合タンパク質が含まれるサンプル及び、プロテアーゼを含まないで融合タンパク質が含まれるサンプルに対して、リガンドの生理活性を測定し比較することによりリガンドの遊離を検出できる。

[0076] 本発明の一実施態様において、切断サイトはプロテアーゼ切断配列を含み、プロテアーゼによって切断される。

[0077] 本明細書において、用語「プロテアーゼ」は、ペプチド結合を加水分解するエンドペプチダーゼまたはエキソペプチダーゼなどの酵素、通常はエンドペプチダーゼを言う。本発明に用いられるプロテアーゼは、プロテアーゼ切断配列を切断できることのみによって制限され、その種類は特に限定されない。いくつかの実施態様において、標的組織特異的プロテアーゼが使用される。標的組織特異的プロテアーゼは、例えば、

- (1) 標的組織にて正常組織より高レベルで発現するプロテアーゼ、
- (2) 標的組織にて正常組織より高い活性を有するプロテアーゼ、
- (3) 標的細胞にて正常細胞より高レベルで発現するプロテアーゼ、
- (4) 標的細胞にて正常細胞より高い活性を有するプロテアーゼ、

のいずれかを指すことができる。より具体的な実施態様において、癌組織特異的プロテアーゼまたは炎症組織特異的プロテアーゼが使用される。

[0078] 本明細書で用語「標的組織」は、少なくとも一つの標的細胞を含む組織を意味する。本発明のいくつかの実施態様においては、標的組織は癌組織である。本発明のいくつかの実施態様においては、標的組織は炎症組織である。

[0079] 用語「癌組織」とは、少なくとも一つの癌細胞を含む組織を意味する。したがって、例えば癌組織が癌細胞と血管を含んでいるように、癌細胞および内皮細胞を含む腫瘍 (tumor mass) の形成に寄与するすべての細胞型をいう。本明細書において、腫瘍とは腫瘍組織巣 (a foci of tumor tissue) をいう。「腫瘍」という用語は、一般に、良性新生物または悪性新生物を意味す

るために用いられる。

[0080] 本明細書において、「炎症組織」とは、例えば、以下が例示的に挙げられる。

- ・ 関節リウマチや変形性関節症における関節
- ・ 気管支喘息やCOPDにおける肺（肺胞）
- ・ 炎症性腸疾患やクローン病や潰瘍性大腸炎における消化器官
- ・ 肝臓、腎臓、肺における線維化症における線維化組織
- ・ 臓器移植における拒絶反応が起こっている組織
- ・ 動脈硬化や心不全における血管、心臓（心筋）
- ・ メタボリック症候群における内臓脂肪
- ・ アトピー性皮膚炎その他皮膚炎における皮膚組織
- ・ 椎間板ヘルニアや慢性腰痛における脊髄神経

[0081] いくつかの種類の標的組織において、特異的に発現するもしくは特異的に活性化されるプロテアーゼまたは標的組織の疾患状態と関連すると考えられるプロテアーゼ（標的組織特異的プロテアーゼ）が知られている。例えば、国際公開W02013/128194号、国際公開W02010/081173号、国際公開W02009/025846号等で癌組織に特異的に発現するプロテアーゼが開示されている。また、J Inflamm (Lond). 2010; 7: 45.、Nat Rev Immunol. 2006 Jul;6(7):541-50.、Nat Rev Drug Discov. 2014 Dec;13(12):904-27.、Respir Res. 2016 Mar 4;17:23.、Dis Model Mech. 2014 Feb;7(2):193-203.、Biochim Biophys Acta. 2012 Jan;1824(1):133-45.で炎症と関連すると考えられるプロテアーゼが開示されている。

[0082] 標的組織にて特異的に発現するプロテアーゼ以外に、標的組織で特異的に活性化されるプロテアーゼも存在する。例えば、プロテアーゼは不活性型で発現し、その後活性型となる場合があり、多くの組織では活性型プロテアーゼを阻害する物質が存在し、活性化のプロセスと阻害剤の存在によって活性がコントロールされている(Nat Rev Cancer. 2003 Jul;3(7):489-501.)。標的組織において、活性型プロテアーゼが阻害から逃れ、特異的に活性化され

ることがある。

活性型プロテアーゼの測定方法は、活性化型のプロテアーゼを認識する抗体を用いる方法 (PNAS 2013 Jan 2; 110(1): 93-98.) やプロテアーゼが認識するペプチドを蛍光標識し、切断前は消光 (クエンチ) しているが、切断後に発光する方法 (Nat Rev Drug Discov. 2010 Sep;9(9):690-701. doi: 10.1038/nrd3053.) を用いて測定されうる。

[0083] 一つの視点から、用語「標的組織特異的プロテアーゼ」は、

- (i) 標的組織にて正常組織より高レベルで発現するプロテアーゼ、
- (ii) 標的組織にて正常組織より高い活性を有するプロテアーゼ、
- (iii) 標的細胞にて正常細胞より高レベルで発現するプロテアーゼ、
- (iv) 標的細胞にて正常細胞より高い活性を有するプロテアーゼ、

のいずれかを指すことができる。

[0084] 限定して解釈されるものではないが、具体的なプロテアーゼとしては、システインプロテアーゼ (カテプシンファミリー B、L、S などを含む)、アスパルチルプロテアーゼ (カテプシン D、E、K、O 等)、セリンプロテアーゼ (マトリプターゼ (MT-SP1 を含む)、カテプシン A および G、トロンビン、プラスミン、ウロキナーゼ (uPA)、組織プラスミノゲン活性化因子 (tPA)、エラスターゼ、プロテイナーゼ 3、トロンビン、カリクレイン、トリプターゼ、キマーゼを含む)、メタロプロテアーゼ (膜結合型 (MMP 14-17 および MMP 24-25) および分泌型 (MMP 1-13 および MMP 18-23 および MMP 26-28) の両方を含むメタロプロテアーゼ (MMP 1-28)、プロテアーゼの A ディスインテグリン およびメタロプロテアーゼ (ADAM)、A ディスインテグリンまたはトロンボスポンジンモチーフを有するメタロプロテアーゼ (ADAMTS)、メプリン (メプリン α (meprin alpha)、メプリン β (meprin beta))、CD10 (CALLA)、ならびに前立腺特異的抗原 (PSA)、レグマイン、TMPRSS3、TMPRSS4、好中球エラスターゼ (HNE)、ベータセクレターゼ (BACE)、線維芽細胞活性化蛋白質アルファ (FAP)、グランザイム B、グアニジノベンゾアタ

ーゼ (GB)、ヘプシン、ネプリライシン、NS3/4A、HCV-NS3/4、カルパイン、ADAMDEC1、レニン、カテプシンC、カテプシンV/L2、カテプシン X/Z/P、クルジパイン、オツバイン2、カリクレイン関連ペプチダーゼ (KLKs (KLK3、KLK4、KLK5、KLK6、KLK7、KLK8、KLK10、KLK11、KLK13、KLK14))、骨形成タンパク質1 (BMP-1)、活性化プロテインC、血液凝固関連プロテアーゼ (Factor VIIa、Factor IXa、Factor Xa、Factor XIa、Factor XIIa)、HtrA1、ラクトフェリン、マラプシン、PACE4、DESC1、ジペプチジルペプチダーゼ4 (DPP-4)、TMPRSS2、カテプシンF、カテプシンH、カテプシンL2、カテプシンO、カテプシンS、グランザイムA、Gepsinカルパイン2、グルタミン酸カルボキシペプチダーゼ2、AMSH-Like Proteases、AMSH、ガンマセクレターゼ、抗プラスミン切断酵素 (APCE)、Decysin 1、N-Acetylated Alpha-Linked Acidic Dipetidase-Like 1 (NAALADL1)、フーリン (furin) 等が挙げられる。

[0085] 別の視点から、標的組織特異的プロテアーゼは、癌組織特異的プロテアーゼまたは炎症組織特異的プロテアーゼを指すことができる。

[0086] 癌組織特異的プロテアーゼとしては、例えば、国際公開W02013/128194号、国際公開W02010/081173号、国際公開W02009/025846号等で開示される癌組織に特異的に発現するプロテアーゼが挙げられる。

[0087] 癌組織特異的プロテアーゼの種類は、治療対象の癌組織での発現の特異性が高いほど、副作用低減効果が得られる。癌組織特異的プロテアーゼは、癌組織における濃度が正常組織における濃度の5倍以上高いことが好ましく、10倍以上高いことがより好ましく、100倍以上高いことがさらに好ましく、500倍以上高いことが特に好ましく、1000倍以上高いことが最も好ましい。また、癌組織特異的プロテアーゼは、癌組織における活性が正常組織における活性の2倍以上高いことが好ましく、3倍以上高いこと、4倍以上高いこと、5倍以上高いこと、10倍以上高いことがより好ましく、100倍以上高いことがさらに好ましく、500倍以上高いことが特に好ましく、1000倍以上高いことが最も好ましい。

また、癌組織特異的プロテアーゼは、癌細胞の細胞膜に結合しているものでもよく、細胞膜に結合しておらず細胞外に分泌されるものでもよい。癌組織特異的プロテアーゼが癌細胞の細胞膜に結合していない場合、免疫細胞による細胞傷害が癌細胞に特異的であるためには、癌組織特異的プロテアーゼは癌組織の内部または近傍に存在するものであることが好ましい。本明細書で「癌組織の近傍」とは、癌組織特異的プロテアーゼ切断配列が切断されて、リガンド結合活性の低下効果を発揮する範囲内であることを意味する。ただし、できるだけ正常細胞を傷害しない範囲であることが好ましい。

別の視点から、癌組織特異的プロテアーゼは、

- (i) 癌組織にて正常組織より高レベルで発現するプロテアーゼ、
- (ii) 癌組織にて正常組織より高い活性を有するプロテアーゼ、
- (iii) 癌細胞にて正常細胞より高レベルで発現するプロテアーゼ、
- (iv) 癌細胞にて正常細胞より高い活性を有するプロテアーゼ、

のいずれかである。

癌組織特異的プロテアーゼは、1種単独でもよく、2種以上が組み合わされてもよい。癌組織特異的プロテアーゼの種類数は、治療対象の癌種を考慮して、当業者が適宜設定することができる。

[0088] 以上の観点から、癌組織特異的プロテアーゼとしては、上記例示したプロテアーゼの中でも、セリンプロテアーゼとメタロプロテアーゼが好ましく、マトリプターゼ (MT-SP1を含む)、ウロキナーゼ (uPA) とメタロプロテアーゼがより好ましく、MT-SP1、uPA、MMP-2、MMP-9が更に好ましい。

[0089] 炎症組織特異的プロテアーゼの種類は、治療対象の炎症組織での発現の特異性が高いほど、副作用低減効果が得られる。炎症組織特異的プロテアーゼは、炎症組織における濃度が正常組織における濃度の5倍以上高いことが好ましく、10倍以上高いことがより好ましく、100倍以上高いことがさらに好ましく、500倍以上高いことが特に好ましく、1000倍以上高いことが最も好ましい。また、炎症組織特異的プロテアーゼは、炎症組織における活性が正常組織における活性の2倍以上高いことが好ましく、3倍以上高

いこと、4倍以上高いこと、5倍以上高いこと、10倍以上高いことがより好ましく、100倍以上高いことがさらに好ましく、500倍以上高いことが特に好ましく、1000倍以上高いことが最も好ましい。

また、炎症組織特異的プロテアーゼは、炎症細胞の細胞膜に結合しているものでもよく、細胞膜に結合しておらず細胞外に分泌されるものでもよい。炎症組織特異的プロテアーゼが炎症細胞の細胞膜に結合していない場合、免疫細胞による細胞傷害が炎症細胞に特異的であるためには、炎症組織特異的プロテアーゼは炎症組織の内部または近傍に存在するものであることが好ましい。本明細書で「炎症組織の近傍」とは、炎症組織特異的プロテアーゼ切断配列が切断されて、リガンド結合活性の低下効果を発揮する範囲内であることを意味する。ただし、できるだけ正常細胞を傷害しない範囲であることが好ましい。

別の観点から、炎症組織特異的プロテアーゼは、

- (i) 炎症組織にて正常組織より高レベルで発現するプロテアーゼ、
- (ii) 炎症組織にて正常組織より高い活性を有するプロテアーゼ、
- (iii) 炎症細胞にて正常細胞より高レベルで発現するプロテアーゼ、
- (iv) 炎症細胞にて正常細胞より高い活性を有するプロテアーゼ、

のいずれかである。

炎症組織特異的プロテアーゼは、1種単独でもよく、2種以上が組み合わされてもよい。炎症組織特異的プロテアーゼの種類数は、治療対象の病状を考慮して、当業者が適宜設定することができる。

[0090] 以上の観点から、炎症組織特異的プロテアーゼとしては、上記例示したプロテアーゼの中でも、メタロプロテアーゼが好ましく、メタロプロテアーゼの中でも、ADAMTS5、MMP-2、MMP-7、MMP-9、MMP-13がより好ましい。

[0091] プロテアーゼ切断配列は、水溶液中でポリペプチドが標的組織特異的プロテアーゼによって加水分解を受ける際に、該標的組織特異的プロテアーゼにより特異的に認識される特定のアミノ酸配列である。

プロテアーゼ切断配列は、副作用低減の点から、治療対象の標的組織／細

胞においてより特異的に発現している、もしくは治療対象の標的組織／細胞においてより特異的に活性化されている標的組織特異的プロテアーゼにより、高い特異性で加水分解されるアミノ酸配列であることが好ましい。

具体的なプロテアーゼ切断配列としては、例えば、国際公開W02013/128194号、国際公開W02010/081173号、国際公開W02009/025846号等で開示されている上記で例示した癌組織に特異的に発現するプロテアーゼ、炎症組織特異的プロテアーゼ等によって特異的に加水分解される標的配列が挙げられる。既知のプロテアーゼによって特異的に加水分解される標的配列に、適宜アミノ酸変異を導入する等、人工的に改変した配列も使用できる。また、プロテアーゼ切断配列は、Nature Biotechnology 19, 661 - 667 (2001)に記載のような当業者公知の方法で同定したものをを用いてもよい。

更に、天然に存在するプロテアーゼ切断配列を用いても良い。例えば、TGF β がプロテアーゼの切断を受けることで潜在型に変化するような、プロテアーゼの切断を受けることで分子形が変わるタンパク質中のプロテアーゼ切断を受ける配列を使用することもできる。

[0092] プロテアーゼ切断配列の例として、それだけに限定されないが、国際公開W02015/116933号、国際公開W02015/048329号、国際公開W02016/118629号、国際公開W02016/179257号、国際公開W02016/179285号、国際公開W02016/179335号、国際公開W02016/179003号、国際公開W02016/046778号、国際公開W02016/014974号、米国特許公開US2016/0289324号、米国特許公開US2016/0311903号、PNAS (2000) 97: 7754-7759.、Biochemical Journal (2010) 426 : 219-228.、Beilstein J Nanotechnol. (2016) 7: 364-373. 中で示された配列を用いることができる。

プロテアーゼ切断配列は、上述のように、好適な標的組織特異的プロテアーゼにより特異的に加水分解されるアミノ酸配列であることがより好ましい。標的組織特異的プロテアーゼにより特異的に加水分解されるアミノ酸配列の中でも、以下のアミノ酸配列が好ましい。

LSGRSDNH（配列番号：3、MT-SP1、uPAにより切断可能）

PLGLAG（配列番号：34、MMP-2、MMP-9により切断可能）

VPLSLTMG（配列番号：35、MMP-7により切断可能）

プロテアーゼ切断配列として、以下の配列を用いることもできる。

TSTSGRSANPRG（配列番号：66、MT-SP1、uPAにより切断可能）

ISSGLLSGRSDNH（配列番号：67、MT-SP1、uPAにより切断可能）

AVGLLAPPGGLSGRSDNH（配列番号：68、MT-SP1、uPAにより切断可能）

GAGVPMSMRGGAG（配列番号：69、MMP-1により切断可能）

GAGIPVSLRSGAG（配列番号：70、MMP-2により切断可能）

GPLGIAGQ（配列番号：71、MMP-2により切断可能）

GGPLGMLSQS（配列番号：72、MMP-2により切断可能）

PLGLWA（配列番号：73、MMP-2により切断可能）

GAGRPFISMIGAG（配列番号：74、MMP-3により切断可能）

GAGVPLSLTMGAG（配列番号：75、MMP-7により切断可能）

GAGVPLSLYSGAG（配列番号：76、MMP-9により切断可能）

AANLRN（配列番号：77、MMP-11により切断可能）

AQAYVK（配列番号：78、MMP-11により切断可能）

AANYMR（配列番号：79、MMP-11により切断可能）

AAALTR（配列番号：80、MMP-11により切断可能）

AQNLMR（配列番号：81、MMP-11により切断可能）

AANYTK（配列番号：82、MMP-11により切断可能）

GAGPQGLAGQRGIVAG（配列番号：83、MMP-13により切断可能）

PRFKIIGG（配列番号：84、pro-ウロキナーゼにより切断可能）

PRFRIIGG（配列番号：85、pro-ウロキナーゼにより切断可能）

GAGSGRSAG（配列番号：86、uPAにより切断可能）

SGRSA（配列番号：87、uPAにより切断可能）

GSGRSA（配列番号：88、uPAにより切断可能）

SGKSA（配列番号：89、uPAにより切断可能）

SGRSS (配列番号 : 9 0、uPAにより切断可能)
SGRRA (配列番号 : 9 1、uPAにより切断可能)
SGRNA (配列番号 : 9 2、uPAにより切断可能)
SGRKA (配列番号 : 9 3、uPAにより切断可能)
QGRSA (配列番号 : 9 4、tPAにより切断可能)
GAGSLLKSRMVPNFNAG (配列番号 : 9 5、カテプシン B により切断可能)
TQGAAA (配列番号 : 9 6、カテプシン B により切断可能)
GAAAAA (配列番号 : 9 7、カテプシン B により切断可能)
GAGAAG (配列番号 : 9 8、カテプシン B により切断可能)
AAAAAG (配列番号 : 9 9、カテプシン B により切断可能)
LCGAAI (配列番号 : 1 0 0、カテプシン B により切断可能)
FAQALG (配列番号 : 1 0 1、カテプシン B により切断可能)
LLQANP (配列番号 : 1 0 2、カテプシン B により切断可能)
LAAANP (配列番号 : 1 0 3、カテプシン B により切断可能)
LYGAQF (配列番号 : 1 0 4、カテプシン B により切断可能)
LSQAQG (配列番号 : 1 0 5、カテプシン B により切断可能)
ASAASG (配列番号 : 1 0 6、カテプシン B により切断可能)
FLGASL (配列番号 : 1 0 7、カテプシン B により切断可能)
AYGATG (配列番号 : 1 0 8、カテプシン B により切断可能)
LAQATG (配列番号 : 1 0 9、カテプシン B により切断可能)
GAGSGVVIATVIVITAG (配列番号 : 1 1 0、カテプシン L により切断可能)
APMAEGGG (配列番号 : 1 1 1、メプリン α 、メプリン β により切断可能)
EAQGDKII (配列番号 : 1 1 2、メプリン α 、メプリン β により切断可能)
LAFSDAGP (配列番号 : 1 1 3、メプリン α 、メプリン β により切断可能)
YVADAPK (配列番号 : 1 1 4、メプリン α 、メプリン β により切断可能)
RRRRR (配列番号 : 1 1 5、フーリンにより切断可能)
RRRRR (配列番号 : 1 1 6、フーリンにより切断可能)
QGSSRHRRAL (配列番号 : 1 1 7、フーリンにより切断可能)

SSRHRRALD（配列番号：118）

RKSSIIIRMDVVL（配列番号：119、プラスミノゲン（Plasminogen）により切断可能）

SSSFDKGKYKGDDA（配列番号：120、Staphylokinaseにより切断可能）

SSSFDKGKYKRGDDA（配列番号：121、Staphylokinaseにより切断可能）

IEGR（配列番号：122、FactorIXaにより切断可能）

IDGR（配列番号：123、FactorIXaにより切断可能）

GGSIDGR（配列番号：124、FactorIXaにより切断可能）

GPQGIAGQ（配列番号：125、Collagenaseにより切断可能）

GPQGLLGA（配列番号：126、Collagenaseにより切断可能）

GIAGQ（配列番号：127、Collagenaseにより切断可能）

GPLGIAG（配列番号：128、Collagenaseにより切断可能）

GPEGLRVG（配列番号：129、Collagenaseにより切断可能）

YGAGLGVV（配列番号：130、Collagenaseにより切断可能）

AGLGVVER（配列番号：131、Collagenaseにより切断可能）

AGLGISST（配列番号：132、Collagenaseにより切断可能）

EPQALAMS（配列番号：133、Collagenaseにより切断可能）

QALAMSAI（配列番号：134、Collagenaseにより切断可能）

AAYHLVSQ（配列番号：135、Collagenaseにより切断可能）

MDAFLESS（配列番号：136、Collagenaseにより切断可能）

ESLPVVAV（配列番号：137、Collagenaseにより切断可能）

SAPAVESE（配列番号：138、Collagenaseにより切断可能）

DVAQFVLT（配列番号：139、Collagenaseにより切断可能）

VAQFVLTE（配列番号：140、Collagenaseにより切断可能）

AQFVLTEG（配列番号：141、Collagenaseにより切断可能）

PVQPIGPQ（配列番号：142、Collagenaseにより切断可能）

LVPRGS（配列番号：143、Thrombinにより切断可能）

TSGSGRSANARG（配列番号：335）

TSQSGRSANQRG (配列番号 : 3 3 6)

TSPSGRSAYPRG (配列番号 : 3 3 7)

TSGSGRSATPRG (配列番号 : 3 3 8)

TSQSGRSATPRG (配列番号 : 3 3 9)

TSASGRSATPRG (配列番号 : 3 4 0)

TSYSGRSAVPRG (配列番号 : 3 4 1)

TSYSGRSANFRG (配列番号 : 3 4 2)

TSSSGRSATPRG (配列番号 : 3 4 3)

TSTTGRSASPRG (配列番号 : 3 4 4)

TSTSGRSANPRG (配列番号 : 3 4 5)

[0093] プロテアーゼ切断配列として、表 1 で示す配列を用いることもできる。

[0094]

[表1]

プロテアーゼ切断配列（uPA およびMTSP1により切断可能）

配列番号	切断配列	配列番号	切断配列
538	TSASGRSANPRG	837	ASGRSANP
539	TSESGRSANPRG	838	ESGRSANP
540	TSFSGRSANPRG	839	FSGRSANP
541	TSGSGRSANPRG	840	GSGRSANP
542	TSHSGRSANPRG	841	HSGRSANP
543	TSKSGRSANPRG	842	KSGRSANP
544	TSMGSRANPRG	843	MSGRSANP
545	TSNSGRSANPRG	844	NSGRSANP
546	TSPSGRSANPRG	845	PSGRSANP
547	TSQSGRSANPRG	846	QSGRSANP
548	TSWSGRSANPRG	847	WSGRSANP
549	TSYSGRSANPRG	848	YSGRSANP
550	TSTAGRSANPRG	849	TAGRSANP
551	TSTDGRSANPRG	850	TDGRSANP
552	TSTEGRSANPRG	851	TEGRSANP
553	TSTFGRSANPRG	852	TFGRSANP
554	TSTLGRSANPRG	853	TLGRSANP
555	TSTMGRSANPRG	854	TMGRSANP
556	TSTPGRSANPRG	855	TPGRSANP
557	TSTQGRSANPRG	856	TQGRSANP
558	TSTVGRSANPRG	857	TVGRSANP
559	TSTWGRSANPRG	858	TWGRSANP
560	TSTSARSANPRG	859	TSARSANP
561	TSTSERSANPRG	860	TSERSANP
562	TSTSFRSANPRG	861	TSFRSANP
563	TSTSHRSANPRG	862	TSHRSANP
564	TSTSIRSANPRG	863	TSIRSANP
565	TSTSKRSANPRG	864	TSKRSANP
566	TSTSLRSANPRG	865	TSLRSANP
567	TSTSMRSANPRG	866	TSMRSANP
568	TSTSNRSANPRG	867	TSNRSANP

569	TSTSPRSANPRG	868	TSPRSANP
570	TSTSQRSANPRG	869	TSQRSANP
571	TSTSRRSANPRG	870	TSRRSANP
572	TSTSTRSANPRG	871	TSTRSANP
573	TSTSVRSANPRG	872	TSVRSANP
574	TSTSWRSANPRG	873	TSWRSANP
575	TSTSYRSANPRG	874	TSYRSANP
576	TSTSGRAANPRG	875	TSGRAANP
577	TSTSGRDANPRG	876	TSGRDANP
578	TSTSGREANPRG	877	TSGREANP
579	TSTSGRGANPRG	878	TSGRGANP
580	TSTSGRHANPRG	879	TSGRHANP
581	TSTSGRIANPRG	880	TSGRIANP
582	TSTSGRKANPRG	881	TSGRKANP
583	TSTSGRLANPRG	882	TSGRLANP
584	TSTSGRMANPRG	883	TSGRMANP
585	TSTSGRNANPRG	884	TSGRNANP
586	TSTSGRPANPRG	885	TSGRPANP
587	TSTSGRQANPRG	886	TSGRQANP
588	TSTSGRRANPRG	887	TSGRRANP
589	TSTSGRTANPRG	888	TSGRTANP
590	TSTSGRVANPRG	889	TSGRVANP
591	TSTSGRWANPRG	890	TSGRWANP
592	TSTSGRYANPRG	891	TSGRYANP
593	TSTSGRSENPRG	892	TSGRSEN
594	TSTSGRSFNPRG	893	TSGRSFNP
595	TSTSGRSKNPRG	894	TSGRSKNP
596	TSTSGRSMNPRG	895	TSGRSMNP
597	TSTSGRSNNPRG	896	TSGRSNNP
598	TSTSGRSPNPRG	897	TSGRSPNP
599	TSTSGRSQNPRG	898	TSGRSQNP
600	TSTSGRSRNPRG	899	TSGRSRNP
601	TSTSGRSSNPRG	900	TSGRSSNP
602	TSTSGRSWNPRG	901	TSGRSWNP
603	TSTSGRSYNPRG	902	TSGRSYNP

604	TSTSGRSAAPRG	903	TSGRSAAP
605	TSTSGRSADPRG	904	TSGRSADP
606	TSTSGRSAEPRG	905	TSGRSAEP
607	TSTSGRSAFPRG	906	TSGRSAFP
608	TSTSGRSAGPRG	907	TSGRSAGP
609	TSTSGRSAKPRG	908	TSGRSAKP
610	TSTSGRSALPRG	909	TSGRSALP
611	TSTSGRSAMPRG	910	TSGRSAMP
612	TSTSGRSAPPRG	911	TSGRSAPP
613	TSTSGRSAQPRG	912	TSGRSAQP
614	TSTSGRSAPRG	913	TSGRSAVP
615	TSTSGRSAWPRG	914	TSGRSAWP
616	TSTSGRSAYPRG	915	TSGRSAYP
617	TSTSGRSANARG	916	TSGRSANA
618	TSTSGRSANDRG	917	TSGRSAND
619	TSTSGRSANERG	918	TSGRSANE
620	TSTSGRSANFRG	919	TSGRSANF
621	TSTSGRSANGRG	920	TSGRSANG
622	TSTSGRSANIRG	921	TSGRSANI
623	TSTSGRSANKRG	922	TSGRSANK
624	TSTSGRSANNRG	923	TSGRSANN
625	TSTSGRSANQRG	924	TSGRSANQ
626	TSTSGRSANSRG	925	TSGRSANS
627	TSTSGRSANTRG	926	TSGRSANT
628	TSTSGRSANWRG	927	TSGRSANW
629	TSDSGRSANPRG	928	DSGRSANP
630	TSISGRSANPRG	929	ISGRSANP
631	TSSSGRSANPRG	930	SSGRSANP
632	TSTHGRSANPRG	931	THGRSANP
633	TSTKGRSANPRG	932	TKGRSANP
634	TSTTGRSANPRG	933	TTGRSANP
635	TSTYGRSANPRG	934	TYGRSANP
636	TSTSDRSANPRG	935	TSDRSANP
637	TSTSSRSANPRG	936	TSSRSANP
638	TSTSGRFANPRG	937	TSGRFANP

639	TSTSGRSDNPRG	938	TSGRSDNP
640	TSTSGRSHNPRG	939	TSGRSHNP
641	TSTSGRSINPRG	940	TSGRSINP
642	TSTSGRSLNPRG	941	TSGRSLNP
643	TSTSGRSTNPRG	942	TSGRSTNP
644	TSTSGRSVNPRG	943	TSGRSVNP
645	TSTSGRSAHPRG	944	TSGRSAHP
646	TSTSGRSAIPRG	945	TSGRSAIP
647	TSTSGRSARPRG	946	TSGRSARP
648	TSTSGRSASPRG	947	TSGRSASP
649	TSTSGRSATPRG	948	TSGRSATP
650	TSTSGRSANHRG	949	TSGRSANH
651	TSTSGRSANLRG	950	TSGRSANL
652	TSTSGRSANMRG	951	TSGRSANM
653	TSTSGRSANRRG	952	TSGRSANR
654	TSTSGRSANVRG	953	TSGRSANV
655	TSTSGRSANYRG	954	TSGRSANY
656	TSGSGRSAPRG	955	GSGRSAPV
657	TSGSGRSAYPRG	956	GSGRSAYP
658	TSGSGRSANQRG	957	GSGRSANQ
335	TSGSGRSANARG	958	GSGRSANA
659	TSGSGRSANIRG	959	GSGRSANI
660	TSGSGRSANFRG	960	GSGRSANF
661	TSGSGRSANSRG	961	GSGRSANS
662	TSQSGRSAPRG	962	QSGRSAPV
663	TSQSGRSAYPRG	963	QSGRSAYP
336	TSQSGRSANQRG	964	QSGRSANQ
664	TSQSGRSANARG	965	QSGRSANA
665	TSQSGRSANIRG	966	QSGRSANI
666	TSQSGRSANFRG	967	QSGRSANF
667	TSQSGRSANSRG	968	QSGRSANS
668	TSPSGRSAPRG	969	PSGRSAVP
337	TSPSGRSAYPRG	970	PSGRSAYP
669	TSPSGRSANQRG	971	PSGRSANQ
670	TSPSGRSANARG	972	PSGRSANA

671	TSPSGRSANIRG	973	PSGRSANI
672	TSPSGRSANFRG	974	PSGRSANF
673	TSPSGRSANSRG	975	PSGRSANS
674	TSASGRSAVPRG	976	ASGRSAVP
675	TSASGRSAYPRG	977	ASGRSAYP
676	TSASGRSANQRG	978	ASGRSANQ
677	TSASGRSANARG	979	ASGRSANA
678	TSASGRSANIRG	980	ASGRSANI
679	TSASGRSANFRG	981	ASGRSANF
680	TSASGRSANSRG	982	ASGRSANS
681	TSYSGRSENPRG	983	YSGRSENP
682	TSGSGRSENPRG	984	GSGRSENP
683	TSQSGRSENPRG	985	QSGRSENP
684	TSPSGRSENPRG	986	PSGRSENP
685	TSASGRSENPRG	987	ASGRSENP
686	TSHSGRSENPRG	988	HSGRSENP
687	TSTSGRSENQRG	989	TSGRSENQ
688	TSTSGRSENARG	990	TSGRSENA
689	TSTSGRSENIRG	991	TSGRSENI
690	TSTSGRSENFRG	992	TSGRSENF
691	TSTSGRSENSRG	993	TSGRSENS
692	TSYSGRSAEPRG	994	YSGRSAEP
693	TSGSGRSAEPRG	995	GSGRSAEP
694	TSQSGRSAEPRG	996	QSGRSAEP
695	TSPSGRSAEPRG	997	PSGRSAEP
696	TSASGRSAEPRG	998	ASGRSAEP
697	TSHSGRSAEPRG	999	HSGRSAEP
698	TSTSGRSAEQRG	1000	TSGRSAEQ
699	TSTSGRSAEARG	1001	TSGRSAEA
700	TSTSGRSAEIRG	1002	TSGRSAEI
701	TSTSGRSAEFRG	1003	TSGRSAEF
702	TSTSGRSAESRG	1004	TSGRSAES
703	TSGTGRSANPRG	1005	GTGRSANP
704	TSGKGRSANPRG	1006	GKGRSANP
705	TSGSGRSAIPRG	1007	GSGRSAIP

338	TSGSGRSATPRG	1008	GSGRSATP
706	TSGSGRSASPRG	1009	GSGRSASP
707	TSGSGRSAHPRG	1010	GSGRSAHP
708	TSGSGRSANYRG	1011	GSGRSANY
709	TSGSGRSANVRG	1012	GSGRSANV
710	TSGSGRSANHRG	1013	GSGRSANH
711	TSQTGRSANPRG	1014	QTGRSANP
712	TSQKGRSANPRG	1015	QKGRSANP
713	TSQSGRSAIPRG	1016	QSGRSAIP
339	TSQSGRSATPRG	1017	QSGRSATP
714	TSQSGRSASPRG	1018	QSGRSASP
715	TSQSGRSAHPRG	1019	QSGRSAHP
716	TSQSGRSANYRG	1020	QSGRSANY
717	TSQSGRSANVRG	1021	QSGRSANV
718	TSQSGRSANHRG	1022	QSGRSANH
719	TSPTGRSANPRG	1023	PTGRSANP
720	TSPKGRSANPRG	1024	PKGRSANP
721	TSPSGRSAIPRG	1025	PSGRSAIP
722	TSPSGRSATPRG	1026	PSGRSATP
723	TSPSGRSASPRG	1027	PSGRSASP
724	TSPSGRSAHPRG	1028	PSGRSAHP
725	TSPSGRSANYRG	1029	PSGRSANY
726	TSPSGRSANVRG	1030	PSGRSANV
727	TSPSGRSANHRG	1031	PSGRSANH
728	TSATGRSANPRG	1032	ATGRSANP
729	TSAKGRSANPRG	1033	AKGRSANP
730	TSASGRSAIPRG	1034	ASGRSAIP
340	TSASGRSATPRG	1035	ASGRSATP
731	TSASGRSASPRG	1036	ASGRSASP
732	TSASGRSAHPRG	1037	ASGRSAHP
733	TSASGRSANYRG	1038	ASGRSANY
734	TSASGRSANVRG	1039	ASGRSANV
735	TSASGRSANHRG	1040	ASGRSANH
736	TSYTGRSANPRG	1041	YTGRSANP
737	TSYKGRSANPRG	1042	YKGRSANP

341	TSYSGRSAVPRG	1043	YSGRSAVP
738	TSYSGRSAIPRG	1044	YSGRSAIP
739	TSYSGRSATPRG	1045	YSGRSATP
740	TSYSGRSASPRG	1046	YSGRSASP
741	TSYSGRSAHPRG	1047	YSGRSAHP
742	TSYSGRSANARG	1048	YSGRSANA
342	TSYSGRSANFRG	1049	YSGRSANF
743	TSYSGRSANYRG	1050	YSGRSANY
744	TSYSGRSANVRG	1051	YSGRSANV
745	TSYSGRSANHRG	1052	YSGRSANH
746	TSSTGRSANPRG	1053	STGRSANP
747	TSSKGRSANPRG	1054	SKGRSANP
748	TSSSGRSAVPRG	1055	SSGRSAVP
749	TSSSGRSAIPRG	1056	SSGRSAIP
343	TSSSGRSATPRG	1057	SSGRSATP
750	TSSSGRSASPRG	1058	SSGRSASP
751	TSSSGRSAHPRG	1059	SSGRSAHP
752	TSSSGRSANARG	1060	SSGRSANA
753	TSSSGRSANFRG	1061	SSGRSANF
754	TSSSGRSANYRG	1062	SSGRSANY
755	TSSSGRSANVRG	1063	SSGRSANV
756	TSSSGRSANHRG	1064	SSGRSANH
757	TSITGRSANPRG	1065	ITGRSANP
758	TSIKGRSANPRG	1066	IKGRSANP
759	TSISGRSAVPRG	1067	ISGRSAVP
760	TSISGRSAIPRG	1068	ISGRSAIP
761	TSISGRSATPRG	1069	ISGRSATP
762	TSISGRSASPRG	1070	ISGRSASP
763	TSISGRSAHPRG	1071	ISGRSAHP
764	TSISGRSANARG	1072	ISGRSANA
765	TSISGRSANFRG	1073	ISGRSANF
766	TSISGRSANYRG	1074	ISGRSANY
767	TSISGRSANVRG	1075	ISGRSANV
768	TSISGRSANHRG	1076	ISGRSANH
769	TSTTGRSAVPRG	1077	TTGRSAVP

770	TSTTGRSAIPRG	1078	TTGRSAIP
771	TSTTGRSATPRG	1079	TTGRSATP
344	TSTTGRSASPRG	1080	TTGRSASP
772	TSTTGRSAHPRG	1081	TTGRSAHP
773	TSTTGRSANARG	1082	TTGRSANA
774	TSTTGRSANFRG	1083	TTGRSANF
775	TSTTGRSANYRG	1084	TTGRSANY
776	TSTTGRSANVRG	1085	TTGRSANV
777	TSTTGRSANHRG	1086	TTGRSANH
778	TSTKGRSAVPRG	1087	TKGRSAVP
779	TSTKGRSAIPRG	1088	TKGRSAIP
780	TSTKGRSATPRG	1089	TKGRSATP
781	TSTKGRSASPRG	1090	TKGRSASP
782	TSTKGRSAHPRG	1091	TKGRSAHP
783	TSTKGRSANARG	1092	TKGRSANA
784	TSTKGRSANFRG	1093	TKGRSANF
785	TSTKGRSANYRG	1094	TKGRSANY
786	TSTKGRSANVRG	1095	TKGRSANV
787	TSTKGRSANHRG	1096	TKGRSANH
788	TSTSGRSAVYRG	1097	TSGRSAVY
789	TSTSGRSVVVRG	1098	TSGRSVVV
790	TSTSGRSVHRG	1099	TSGRSVHV
791	TSTSGRSAIYRG	1100	TSGRSAIY
792	TSTSGRSAIVRG	1101	TSGRSAIV
793	TSTSGRSAIHRG	1102	TSGRSAIH
794	TSTSGRSASYRG	1103	TSGRSASY
795	TSTSGRSASVRG	1104	TSGRSASV
796	TSTSGRSASHRG	1105	TSGRSASH
797	TSTSGRSAHYRG	1106	TSGRSAHY
798	TSTSGRSAHVRG	1107	TSGRSAHV
799	TSTSGRSAHHRG	1108	TSGRSAHH
800	TSPSGRSEVPRG	1109	PSGRSEVP
801	TSPSGRSAEPRG	1110	PSGRSAEP
802	TSPSGRSAGPRG	1111	PSGRSAGP
803	TSASGRSENAARG	1112	ASGRSENA

804	TSASGRSAEARG	1 1 1 3	ASGRSAEA
805	TSASGRSAGARG	1 1 1 4	ASGRSAGA
806	TSGTGRSATPRG	1 1 1 5	GTGRSATP
807	TSGSGRSATYRG	1 1 1 6	GSGRSATY
808	TSGSGRSATVRG	1 1 1 7	GSGRSATV
809	TSGSGRSATHRG	1 1 1 8	GSGRSATH
810	TSGTGRSATYRG	1 1 1 9	GTGRSATY
811	TSGTGRSATVRG	1 1 2 0	GTGRSATV
812	TSGTGRSATHRG	1 1 2 1	GTGRSATH
813	TSGSGRSETPRG	1 1 2 2	GSGRSETP
814	TSGTGRSETPRG	1 1 2 3	GTGRSETP
815	TSGSGRSETYRG	1 1 2 4	GSGRSETY
816	TSGSGRSETVRG	1 1 2 5	GSGRSETV
817	TSGSGRSETHRG	1 1 2 6	GSGRSETH
818	TSYTGRSAVPRG	1 1 2 7	YTGRSAVP
819	TSYSGRSAVYRG	1 1 2 8	YSGRSAVY
820	TSYSGRSAVV RG	1 1 2 9	YSGRS AVV
821	TSYSGRSAVHRG	1 1 3 0	YSGRS AVH
822	TSYTGRSAVYRG	1 1 3 1	YTGRSAVY
823	TSYTGRSAVV RG	1 1 3 2	YTGRSAVV
824	TSYTGRSAVHRG	1 1 3 3	YTGRSAVH
825	TSYSGRSEVPRG	1 1 3 4	YSGRSEVP
826	TSYTGRSEVPRG	1 1 3 5	YTGRSEVP
827	TSYSGRSEVYRG	1 1 3 6	YSGRSEVY
828	TSYSGRSEVV RG	1 1 3 7	YSGRSEVV
829	TSYSGRSEVHRG	1 1 3 8	YSGRSEVH
830	TSYTGRSAVPGG	1 1 3 9	YTGRSAVP
831	TSYSGRSAVYGG	1 1 4 0	YSGRSAVY
832	TSYSGRSAVV GG	1 1 4 1	YSGRS AVV
833	TSYSGRSAVHGG	1 1 4 2	YSGRS AVH
834	TSYTGRSAVYGG	1 1 4 3	YTGRSAVY
835	TSYTGRSAVV GG	1 1 4 4	YTGRSAVV
836	TSYTGRSAVHGG	1 1 4 5	YTGRSAVH

1183	TSTSGRSANPRG	1235	TSYTGRSANPLG
1184	TSTSGRSANPAG	1236	TSYSGRSAIPLG
1185	TSTSGRSANPHG	1237	TSISGRSANYLG
1186	TSTSGRSANPIG	1238	TSPSGRSAGPLG
1187	TSTSGRSANPLG	1239	TSYTGRSAVPLG
1188	TSTSGRSANPSG	1240	TSYTGRSAVYLG
1189	ISTSGRSANPIG	1241	TSYTGRSAVVLG
1190	YSTSGRSANPIG	1242	TSYTGRSAVHLG
1191	TSYSGRSAPAG	1243	TSYSGRSAPVPSG
1192	TSPSGRSANIAG	1244	TSPSGRSANISG
1193	TSPSGRSANFAG	1245	TSPSGRSANFSG
1194	TSPTGRSANPAG	1246	TSPTGRSANPSG
1195	TSPSGRSAIPAG	1247	TSPSGRSAIPSG
1196	TSYTGRSANPAG	1248	TSYTGRSANPSG
1197	TSYSGRSAIPAG	1249	TSYSGRSAIPSG
1198	TSISGRSANYAG	1250	TSISGRSANYSG
1199	TSPSGRSAGPAG	1251	TSPSGRSAGPSG
1200	TSYTGRSAVPAG	1252	TSYTGRSAVPSG
1201	TSYTGRSAVYAG	1253	TSYTGRSAVYSG
1202	TSYTGRSAVVAG	1254	TSYTGRSAVVSG
1203	TSYTGRSAVHAG	1255	TSYTGRSAVHSG
1204	TSYSGRSAPVPHG	1256	ISYSGRSAPVPIG
1205	TSPSGRSANIHG	1257	ISPSGRSANIIG
1206	TSPSGRSANFHG	1258	ISPSGRSANFIG
1207	TSPTGRSANPHG	1259	ISPTGRSANPIG
1208	TSPSGRSAIPHG	1260	ISPSGRSAIPIG
1209	TSYTGRSANPHG	1261	ISYTGRSANPIG
1210	TSYSGRSAIPHG	1262	ISYSGRSAIPIG
1211	TSISGRSANYHG	1263	ISISGRSANYIG
1212	TSPSGRSAGPHG	1264	ISPSGRSAGPIG
1213	TSYTGRSAVPHG	1265	ISYTGRSAVPIG
1214	TSYTGRSAVYHG	1266	ISYTGRSAVYIG
1215	TSYTGRSAVVHG	1267	ISYTGRSAVVIG
1216	TSYTGRSAVHHG	1268	ISYTGRSAVHIG
1217	TSYSGRSAPVPIG	1269	YSYSGRSAPVPIG
1218	TSPSGRSANIIG	1270	YSPSGRSANIIG
1219	TSPSGRSANFIG	1271	YSPSGRSANFIG
1220	TSPTGRSANPIG	1272	YSPTGRSANPIG
1221	TSPSGRSAIPIG	1273	YSPSGRSAIPIG
1222	TSYTGRSANPIG	1274	YSYTGRSANPIG
1223	TSYSGRSAIPIG	1275	YSYSGRSAIPIG
1224	TSISGRSANYIG	1276	YSISGRSANYIG

1225	TSPSGRSAGPIG	1277	YSPSGRSAGPIG
1226	TSYTGRSAVPIG	1278	YSYTGRSAVPIG
1227	TSYTGRSAVYIG	1279	YSYTGRSAVYIG
1228	TSYTGRSAVVIG	1280	YSYTGRSAVVIG
1229	TSYTGRSAVHIG	1281	YSYTGRSAVHIG
1230	TSYSGRSAVPLG	1382	TSYTGRSAVPRG
1231	TSPSGRSANILG	1383	TSYSGRSAVVIRG
1232	TSPSGRSANFLG	1384	TSYTGRSAVYRG
1233	TSPTGRSANPLG	1385	TSYTGRSAVHRG
1234	TSPSGRSAIPLG		

[0095] プロテアーゼ切断配列として以下で示すものを用いることもできる：

X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8（配列番号：1 1 6 1）

中で、X1からX8はそれぞれ一つのアミノ酸を表し、X1 は A, D, E, F, G, H, I, K, M, N, P, Q, S, T, W および Yから選択されるアミノ酸である；X2 は A, D, E, F, H, K, L, M, P, Q, S, T, V, W および Yから選択されるアミノ酸である；X3 は A, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W および Yから選択されるアミノ酸である；X4 はRである；X5 はA, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W および Yから選択されるアミノ酸である；X6 は A, D, E, F, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W および Yから選択されるアミノ酸である；X7 は A, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W および Yから選択されるアミノ酸である；X8 は A, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W および Yから選択されるアミノ酸である。

[0096] プロテアーゼ切断配列として以下で示すものを用いることもできる：

X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8（配列番号：1 1 6 2）

中で、X1からX8はそれぞれ一つのアミノ酸を表し、X1 は A, E, F, G, H, K, M, N, P, Q, W および Yから選択されるアミノ酸である；X2 は A, D, E, F, H, K, L, M, P, Q, S, T, V, W および Yから選択されるアミノ酸である；X3 は A, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W および Yから選択されるアミノ酸である；X4 はRである；X5 はA, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W および Yから選択されるアミノ酸である

; X6 は A, D, E, F, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W および Y から選択されるアミノ酸である; X7 は A, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W および Y から選択されるアミノ酸である; X8 は A, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W および Y から選択されるアミノ酸である。

[0097] プロテアーゼ切断配列として以下で示すものを用いることもできる:

X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8 (配列番号: 1 1 6 3)

中で、X1からX8はそれぞれ一つのアミノ酸を表し、X1 は A, D, E, F, G, H, I, K, M, N, P, Q, S, T, W および Y から選択されるアミノ酸である; X2 は A, D, F, L, M, P, Q, V, W および Y から選択されるアミノ酸である; X3 は A, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W および Y から選択されるアミノ酸である; X4 は R である; X5 は A, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W および Y から選択されるアミノ酸である; X6 は A, D, E, F, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W および Y から選択されるアミノ酸である; X7 は A, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W および Y から選択されるアミノ酸である; X8 は A, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W および Y から選択されるアミノ酸である。

[0098] プロテアーゼ切断配列として以下で示すものを用いることもできる:

X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8 (配列番号: 1 1 6 4)

中で、X1からX8はそれぞれ一つのアミノ酸を表し、X1 は A, D, E, F, G, H, I, K, M, N, P, Q, S, T, W および Y から選択されるアミノ酸である; X2 は A, D, E, F, H, K, L, M, P, Q, S, T, V, W および Y から選択されるアミノ酸である; X3 は A, E, F, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, T, V, W および Y から選択されるアミノ酸である; X4 は R である; X5 は A, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W および Y から選択されるアミノ酸である; X6 は A, D, E, F, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W および Y から選択されるアミノ酸である; X7 は A, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N,

P, Q, R, S, T, V, W および Yから選択されるアミノ酸である；X8 は A, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W および Yから選択されるアミノ酸である。

[0099] プロテアーゼ切断配列として以下で示すものを用いることもできる：

X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8 (配列番号：1 1 6 5)

中で、X1からX8はそれぞれ一つのアミノ酸を表し、X1 は A, D, E, F, G, H, I, K, M, N, P, Q, S, T, W および Yから選択されるアミノ酸である；X2 は A, D, E, F, H, K, L, M, P, Q, S, T, V, W および Yから選択されるアミノ酸である；X3 は A, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W および Yから選択されるアミノ酸である；X4 はRである；X5 はA, D, E, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, T, V, W および Yから選択されるアミノ酸である；X6 は A, D, E, F, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W および Yから選択されるアミノ酸である；X7 は A, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W および Yから選択されるアミノ酸である；X8 は A, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W および Yから選択されるアミノ酸である。

[0100] プロテアーゼ切断配列として以下で示すものを用いることもできる：

X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8 (配列番号：1 1 6 6)

中で、X1からX8はそれぞれ一つのアミノ酸を表し、X1 は A, D, E, F, G, H, I, K, M, N, P, Q, S, T, W および Yから選択されるアミノ酸である；X2 は A, D, E, F, H, K, L, M, P, Q, S, T, V, W および Yから選択されるアミノ酸である；X3 は A, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W および Yから選択されるアミノ酸である；X4 はRである；X5 はA, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W および Yから選択されるアミノ酸である；X6 は E, F, K, M, N, P, Q, R, S および W から選択されるアミノ酸である；X7 は A, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W および Yから選択されるアミノ酸である；X8 は A, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W および Yから選択されるアミノ酸である。

。

[0101] プロテアーゼ切断配列として以下で示すものを用いることもできる：

X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8 (配列番号：1 1 6 7)

中で、X1からX8はそれぞれ一つのアミノ酸を表し、X1 は A, D, E, F, G, H, I, K, M, N, P, Q, S, T, W および Yから選択されるアミノ酸である；X2 は A, D, E, F, H, K, L, M, P, Q, S, T, V, W および Yから選択されるアミノ酸である；X3 は A, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W および Yから選択されるアミノ酸である；X4 はRである；X5 はA, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W および Yから選択されるアミノ酸である；X6 は A, D, E, F, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W および Yから選択されるアミノ酸である；X7 は A, D, F, G, L, M, P, Q, VおよびWから選択されるアミノ酸である；X8 は A, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W および Yから選択されるアミノ酸である。

[0102] プロテアーゼ切断配列として以下で示すものを用いることもできる：

X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8 (配列番号：1 1 6 8)

中で、X1からX8はそれぞれ一つのアミノ酸を表し、X1 は A, D, E, F, G, H, I, K, M, N, P, Q, S, T, W および Yから選択されるアミノ酸である；X2 は A, D, E, F, H, K, L, M, P, Q, S, T, V, W および Yから選択されるアミノ酸である；X3 は A, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W および Yから選択されるアミノ酸である；X4 はRである；X5 はA, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W および Yから選択されるアミノ酸である；X6 は A, D, E, F, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W および Yから選択されるアミノ酸である；X7 は A, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W および Yから選択されるアミノ酸である；X8 は A, D, E, F, G, I, K, N, TおよびWから選択されるアミノ酸である。

[0103] プロテアーゼ切断配列として以下で示すものを用いることもできる：

X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8 (配列番号：1 1 6 9)

中で、X1からX8はそれぞれ一つのアミノ酸を表し、X1はA, G, I, P, Q, S

およびYから選択されるアミノ酸である；X2はKもしくはTから選択されるアミノ酸である；X3はGである；X4はRである；X5はSである；X6はAである；X7はH, IおよびVから選択されるアミノ酸である；X8はH, VおよびYから選択されるアミノ酸である。

[0104] プロテアーゼ切断配列として以下で示すものを用いることもできる：

X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8 (配列番号：1 1 7 0)

中で、X1からX8はそれぞれ一つのアミノ酸を表し、X1はYである；X2はSおよびTから選択されるアミノ酸である；X3はGである；X4はRである；X5はSである；X6はAおよびEから選択されるアミノ酸である；X7はNおよびVから選択されるアミノ酸である；X8はH, P, VおよびYから選択されるアミノ酸である。

[0105] プロテアーゼ切断配列として以下で示すものを用いることもできる：

X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8-X9 (配列番号：1 1 7 1)

中で、X1からX9はそれぞれ一つのアミノ酸を表し、X1はA, D, E, F, G, H, I, K, M, N, P, Q, S, T, W および Yから選択されるアミノ酸である；X2はA, D, E, F, H, K, L, M, P, Q, S, T, V, W および Yから選択されるアミノ酸である；X3はA, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W および Yから選択されるアミノ酸である；X4はRである；X5はA, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W および Yから選択されるアミノ酸である；X6はA, D, E, F, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W および Yから選択されるアミノ酸である；X7はA, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W および Yから選択されるアミノ酸である；X8はA, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W および Yから選択されるアミノ酸である；X9はA, G, H, I, LおよびRから選択されるアミノ酸である。

[0106] プロテアーゼ切断配列として以下で示すものを用いることもできる：

X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8-X9 (配列番号：1 1 7 2)

中で、X1からX9はそれぞれ一つのアミノ酸を表し、X1はA, E, F, G, H,

K, M, N, P, Q, W および Yから選択されるアミノ酸である；X2 は A, D, E, F, H, K, L, M, P, Q, S, T, V, W および Yから選択されるアミノ酸である；X3 は A, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W および Yから選択されるアミノ酸である；X4 はRである；X5 はA, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W および Yから選択されるアミノ酸である；X6 は A, D, E, F, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W および Yから選択されるアミノ酸である；X7 は A, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W および Yから選択されるアミノ酸である；X8 は A, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W および Yから選択されるアミノ酸である；X9はA, G, H, I, LおよびRから選択されるアミノ酸である。

[0107] プロテアーゼ切断配列として以下で示すものを用いることもできる：

X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8-X9（配列番号：1173）

中で、X1からX9はそれぞれ一つのアミノ酸を表し、X1 は A, D, E, F, G, H, I, K, M, N, P, Q, S, T, W および Yから選択されるアミノ酸である；X2 は A, D, F, L, M, P, Q, V, W および Yから選択されるアミノ酸である；X3 は A, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W および Yから選択されるアミノ酸である；X4 はRである；X5 はA, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W および Yから選択されるアミノ酸である；X6 は A, D, E, F, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W および Yから選択されるアミノ酸である；X7 は A, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W および Yから選択されるアミノ酸である；X8 は A, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W および Yから選択されるアミノ酸である；X9はA, G, H, I, LおよびRから選択されるアミノ酸である。

[0108] プロテアーゼ切断配列として以下で示すものを用いることもできる：

X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8-X9（配列番号：1174）

中で、X1からX9はそれぞれ一つのアミノ酸を表し、X1 は A, D, E, F, G, H, I, K, M, N, P, Q, S, T, W および Yから選択されるアミノ酸である；X2

は A, D, E, F, H, K, L, M, P, Q, S, T, V, W および Y から選択されるアミノ酸である ; X3 は A, E, F, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, T, V, W および Y から選択されるアミノ酸である ; X4 は R である ; X5 は A, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W および Y から選択されるアミノ酸である ; X6 は A, D, E, F, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W および Y から選択されるアミノ酸である ; X7 は A, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W および Y から選択されるアミノ酸である ; X8 は A, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W および Y から選択されるアミノ酸である ; X9 は A, G, H, I, L および R から選択されるアミノ酸である。

[0109] プロテアーゼ切断配列として以下で示すものを用いることもできる :

X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8-X9 (配列番号 : 1 1 7 5)

中で、X1 から X9 はそれぞれ一つのアミノ酸を表し、X1 は A, D, E, F, G, H, I, K, M, N, P, Q, S, T, W および Y から選択されるアミノ酸である ; X2 は A, D, E, F, H, K, L, M, P, Q, S, T, V, W および Y から選択されるアミノ酸である ; X3 は A, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W および Y から選択されるアミノ酸である ; X4 は R である ; X5 は A, D, E, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, T, V, W および Y から選択されるアミノ酸である ; X6 は A, D, E, F, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W および Y から選択されるアミノ酸である ; X7 は A, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W および Y から選択されるアミノ酸である ; X8 は A, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W および Y から選択されるアミノ酸である ; X9 は A, G, H, I, L および R から選択されるアミノ酸である。

[0110] プロテアーゼ切断配列として以下で示すものを用いることもできる :

X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8-X9 (配列番号 : 1 1 7 6)

中で、X1 から X9 はそれぞれ一つのアミノ酸を表し、X1 は A, D, E, F, G, H, I, K, M, N, P, Q, S, T, W および Y から選択されるアミノ酸である ; X2

は A, D, E, F, H, K, L, M, P, Q, S, T, V, W および Y から選択されるアミノ酸である ; X3 は A, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W および Y から選択されるアミノ酸である ; X4 は R である ; X5 は A, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W および Y から選択されるアミノ酸である ; X6 は E, F, K, M, N, P, Q, R, S および W から選択されるアミノ酸である ; X7 は A, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W および Y から選択されるアミノ酸である ; X8 は A, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W および Y から選択されるアミノ酸である ; X9 は A, G, H, I, L および R から選択されるアミノ酸である。

[0111] プロテアーゼ切断配列として以下で示すものを用いることもできる :

X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8-X9 (配列番号 : 1 1 7 7)

中で、X1 から X9 はそれぞれ一つのアミノ酸を表し、X1 は A, D, E, F, G, H, I, K, M, N, P, Q, S, T, W および Y から選択されるアミノ酸である ; X2 は A, D, E, F, H, K, L, M, P, Q, S, T, V, W および Y から選択されるアミノ酸である ; X3 は A, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W および Y から選択されるアミノ酸である ; X4 は R である ; X5 は A, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W および Y から選択されるアミノ酸である ; X6 は A, D, E, F, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W および Y から選択されるアミノ酸である ; X7 は A, D, F, G, L, M, P, Q, V および W から選択されるアミノ酸である ; X8 は A, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W および Y から選択されるアミノ酸である ; X9 は A, G, H, I, L および R から選択されるアミノ酸である。

[0112] プロテアーゼ切断配列として以下で示すものを用いることもできる :

X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8-X9 (配列番号 : 1 1 7 8)

中で、X1 から X9 はそれぞれ一つのアミノ酸を表し、X1 は A, D, E, F, G, H, I, K, M, N, P, Q, S, T, W および Y から選択されるアミノ酸である ; X2 は A, D, E, F, H, K, L, M, P, Q, S, T, V, W および Y から選択されるアミノ酸である ; X3 は A, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V

, W および Yから選択されるアミノ酸である ; X4 はRである ; X5 はA, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W および Yから選択されるアミノ酸である ; X6 は A, D, E, F, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W および Yから選択されるアミノ酸である ; X7 は A, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W および Yから選択されるアミノ酸である ; X8 は A, D, E, F, G, I, K, N, TおよびWから選択されるアミノ酸である ; X9 はA, G, H, I, LおよびRから選択されるアミノ酸である。

[0113] プロテアーゼ切断配列として以下で示すものを用いることもできる :

X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8-X9 (配列番号 : 1 1 7 9)

中で、X1からX9はそれぞれ一つのアミノ酸を表し、X1はA, G, I, P, Q, S およびYから選択されるアミノ酸である ; X2はKもしくはTから選択されるアミノ酸である ; X3はGである ; X4はRである ; X5はSである ; X6はAである ; X7はH, IおよびVから選択されるアミノ酸である ; X8はH, VおよびYから選択されるアミノ酸である ; X9はA, G, H, I, LおよびRから選択されるアミノ酸である。

[0114] プロテアーゼ切断配列として以下で示すものを用いることもできる :

X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8-X9 (配列番号 : 1 1 8 0)

中で、X1からX9はそれぞれ一つのアミノ酸を表し、X1はYである ; X2はSおよびTから選択されるアミノ酸である ; X3はGである ; X4はRである ; X5はSである ; X6はAおよびEから選択されるアミノ酸である ; X7はNおよびVから選択されるアミノ酸である ; X8はH, P, VおよびYから選択されるアミノ酸である ; X9はA, G, H, I, LおよびRから選択されるアミノ酸である。

[0115] プロテアーゼ切断配列として以下で示すものを用いることもできる :

X10-X11-X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8 (配列番号 : 1392)

中で、X1からX11はそれぞれ一つのアミノ酸を表し、X10 は I, Tおよび Yから選択されるアミノ酸である ; X11 は Sである ; X1 は A, D, E, F, G, H, I, K, M, N, P, Q, S, T, W および Yから選択されるアミノ酸である ; X2 は A, D, E, F, H, K, L, M, P, Q, S, T, V, W および Yから選択されるア

ミノ酸である；X3 は A, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W および Y から選択されるアミノ酸である；X4 は R である；X5 は A, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W および Y から選択されるアミノ酸である；X6 は A, D, E, F, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W および Y から選択されるアミノ酸である；X7 は A, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W および Y から選択されるアミノ酸である；X8 は A, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W および Y から選択されるアミノ酸である。

[0116] プロテアーゼ切断配列として以下で示すものを用いることもできる：

X10-X11-X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8 (配列番号：1393)

中で、X1からX11はそれぞれ一つのアミノ酸を表し、X10 は I, T および Y から選択されるアミノ酸である；X11 は S である；X1 は A, E, F, G, H, K, M, N, P, Q, W および Y から選択されるアミノ酸である；X2 は A, D, E, F, H, K, L, M, P, Q, S, T, V, W および Y から選択されるアミノ酸である；X3 は A, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W および Y から選択されるアミノ酸である；X4 は R である；X5 は A, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W および Y から選択されるアミノ酸である；X6 は A, D, E, F, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W および Y から選択されるアミノ酸である；X7 は A, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W および Y から選択されるアミノ酸である；X8 は A, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W および Y から選択されるアミノ酸である。

[0117] プロテアーゼ切断配列として以下で示すものを用いることもできる：

X10-X11-X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8 (配列番号：1394)

中で、X1からX11はそれぞれ一つのアミノ酸を表し、X10 は I, T および Y から選択されるアミノ酸である；X11 は S である；X1 は A, D, E, F, G, H, I, K, M, N, P, Q, S, T, W および Y から選択されるアミノ酸である；X2 は A, D, F, L, M, P, Q, V, W および Y から選択されるアミノ酸である；X3

は A, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W および Y から選択されるアミノ酸である ; X4 は R である ; X5 は A, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W および Y から選択されるアミノ酸である ; X6 は A, D, E, F, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W および Y から選択されるアミノ酸である ; X7 は A, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W および Y から選択されるアミノ酸である ; X8 は A, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W および Y から選択されるアミノ酸である。

[0118] プロテアーゼ切断配列として以下で示すものを用いることもできる :

X10-X11-X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8 (配列番号 : 1395)

中で、X1からX11はそれぞれ一つのアミノ酸を表し、X10 は I, T および Y から選択されるアミノ酸である ; X11 は S である ; X1 は A, D, E, F, G, H, I, K, M, N, P, Q, S, T, W および Y から選択されるアミノ酸である ; X2 は A, D, E, F, H, K, L, M, P, Q, S, T, V, W および Y から選択されるアミノ酸である ; X3 は A, E, F, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, T, V, W および Y から選択されるアミノ酸である ; X4 は R である ; X5 は A, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W および Y から選択されるアミノ酸である ; X6 は A, D, E, F, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W および Y から選択されるアミノ酸である ; X7 は A, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W および Y から選択されるアミノ酸である ; X8 は A, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W および Y から選択されるアミノ酸である。

[0119] プロテアーゼ切断配列として以下で示すものを用いることもできる :

X10-X11-X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8 (配列番号 : 1396)

中で、X1からX11はそれぞれ一つのアミノ酸を表し、X10 は I, T および Y から選択されるアミノ酸である ; X11 は S である ; X1 は A, D, E, F, G, H, I, K, M, N, P, Q, S, T, W および Y から選択されるアミノ酸である ; X2 は A, D, E, F, H, K, L, M, P, Q, S, T, V, W および Y から選択されるア

ミノ酸である；X3 は A, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W および Y から選択されるアミノ酸である；X4 は R である；X5 は A, D, E, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, T, V, W および Y から選択されるアミノ酸である；X6 は A, D, E, F, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W および Y から選択されるアミノ酸である；X7 は A, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W および Y から選択されるアミノ酸である；X8 は A, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W および Y から選択されるアミノ酸である。

[0120] プロテアーゼ切断配列として以下で示すものを用いることもできる：

X10-X11-X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8 (配列番号：1397)

中で、X1からX11はそれぞれ一つのアミノ酸を表し、X10 は I, T および Y から選択されるアミノ酸である；X11 は S である；X1 は A, D, E, F, G, H, I, K, M, N, P, Q, S, T, W および Y から選択されるアミノ酸である；X2 は A, D, E, F, H, K, L, M, P, Q, S, T, V, W および Y から選択されるアミノ酸である；X3 は A, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W および Y から選択されるアミノ酸である；X4 は R である；X5 は A, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W および Y から選択されるアミノ酸である；X6 は E, F, K, M, N, P, Q, R, S および W から選択されるアミノ酸である；X7 は A, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W および Y から選択されるアミノ酸である；X8 は A, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W および Y から選択されるアミノ酸である。

[0121] プロテアーゼ切断配列として以下で示すものを用いることもできる：

X10-X11-X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8 (配列番号：1398)

中で、X1からX11はそれぞれ一つのアミノ酸を表し、X10 は I, T および Y から選択されるアミノ酸である；X11 は S である；X1 は A, D, E, F, G, H, I, K, M, N, P, Q, S, T, W および Y から選択されるアミノ酸である；X2 は A, D, E, F, H, K, L, M, P, Q, S, T, V, W および Y から選択されるア

ミノ酸である；X3 は A, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W および Y から選択されるアミノ酸である；X4 は R である；X5 は A, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W および Y から選択されるアミノ酸である；X6 は A, D, E, F, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W および Y から選択されるアミノ酸である；X7 は A, D, F, G, L, M, P, Q, V および W から選択されるアミノ酸である；X8 は A, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W および Y から選択されるアミノ酸である。

[0122] プロテアーゼ切断配列として以下で示すものを用いることもできる：

X10-X11-X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8 (配列番号：1399)

中で、X1からX11はそれぞれ一つのアミノ酸を表し、X10 は I, T および Y から選択されるアミノ酸である；X11 は S である；X1 は A, D, E, F, G, H, I, K, M, N, P, Q, S, T, W および Y から選択されるアミノ酸である；X2 は A, D, E, F, H, K, L, M, P, Q, S, T, V, W および Y から選択されるアミノ酸である；X3 は A, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W および Y から選択されるアミノ酸である；X4 は R である；X5 は A, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W および Y から選択されるアミノ酸である；X6 は A, D, E, F, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W および Y から選択されるアミノ酸である；X7 は A, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W および Y から選択されるアミノ酸である；X8 は A, D, E, F, G, I, K, N, T および W から選択されるアミノ酸である。

[0123] プロテアーゼ切断配列として以下で示すものを用いることもできる：

X10-X11-X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8 (配列番号：1400)

中で、X1からX11はそれぞれ一つのアミノ酸を表し、X10 は I, T および Y から選択されるアミノ酸である；X11 は S である；X1 は A, G, I, P, Q, S および Y から選択されるアミノ酸である；X2 は K もしくは T から選択されるアミノ酸である；X3 は G である；X4 は R である；X5 は S である；X6 は A である；X7 は H, I および V から選択されるアミノ酸である；X8 は H, V および Y から選択されるアミノ酸である。

[0124] プロテアーゼ切断配列として以下で示すものを用いることもできる：

X10-X11-X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8（配列番号：1401）

中で、X1からX11はそれぞれ一つのアミノ酸を表し、X10 は I, Tおよび Y から選択されるアミノ酸である；X11 は Sである；X1はYである；X2はSおよび Tから選択されるアミノ酸である；X3はGである；X4 はRである；X5はSである；X6はAおよびEから選択されるアミノ酸である；X7はNおよびVから選択されるアミノ酸である；X8はH, P, VおよびYから選択されるアミノ酸である。

[0125] プロテアーゼ切断配列として以下で示すものを用いることもできる：

X10-X11-X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8-X9（配列番号：1402）

中で、X1からX11はそれぞれ一つのアミノ酸を表し、X10 は I, Tおよび Y から選択されるアミノ酸である；X11 は Sである；X1 は A, D, E, F, G, H, I, K, M, N, P, Q, S, T, W および Yから選択されるアミノ酸である；X2 は A, D, E, F, H, K, L, M, P, Q, S, T, V, W および Yから選択されるアミノ酸である；X3 は A, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W および Yから選択されるアミノ酸である；X4 はRである；X5 はA, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W および Yから選択されるアミノ酸である；X6 は A, D, E, F, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W および Yから選択されるアミノ酸である；X7 は A, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W および Yから選択されるアミノ酸である；X8 は A, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W および Yから選択されるアミノ酸である；X9はA, G, H, I, LおよびRから選択されるアミノ酸である。

[0126] プロテアーゼ切断配列として以下で示すものを用いることもできる：

X10-X11-X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8-X9（配列番号：1403）

中で、X1からX11はそれぞれ一つのアミノ酸を表し、X10 は I, Tおよび Y から選択されるアミノ酸である；X11 は Sである；X1 は A, E, F, G, H, K, M, N, P, Q, W および Yから選択されるアミノ酸である；X2 は A, D, E

, F, H, K, L, M, P, Q, S, T, V, W および Y から選択されるアミノ酸である ; X3 は A, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W および Y から選択されるアミノ酸である ; X4 は R である ; X5 は A, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W および Y から選択されるアミノ酸である ; X6 は A, D, E, F, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W および Y から選択されるアミノ酸である ; X7 は A, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W および Y から選択されるアミノ酸である ; X8 は A, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W および Y から選択されるアミノ酸である ; X9 は A, G, H, I, L および R から選択されるアミノ酸である。

[0127] プロテアーゼ切断配列として以下で示すものを用いることもできる :

X10-X11-X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8-X9 (配列番号 : 1404)

中で、X1 から X11 はそれぞれ一つのアミノ酸を表し、X10 は I, T および Y から選択されるアミノ酸である ; X11 は S である ; X1 は A, D, E, F, G, H, I, K, M, N, P, Q, S, T, W および Y から選択されるアミノ酸である ; X2 は A, D, F, L, M, P, Q, V, W および Y から選択されるアミノ酸である ; X3 は A, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W および Y から選択されるアミノ酸である ; X4 は R である ; X5 は A, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W および Y から選択されるアミノ酸である ; X6 は A, D, E, F, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W および Y から選択されるアミノ酸である ; X7 は A, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W および Y から選択されるアミノ酸である ; X8 は A, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W および Y から選択されるアミノ酸である ; X9 は A, G, H, I, L および R から選択されるアミノ酸である。

[0128] プロテアーゼ切断配列として以下で示すものを用いることもできる :

X10-X11-X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8-X9 (配列番号 : 1405)

中で、X1 から X11 はそれぞれ一つのアミノ酸を表し、X10 は I, T および Y から選択されるアミノ酸である ; X11 は S である ; X1 は A, D, E, F, G, H,

I, K, M, N, P, Q, S, T, W および Yから選択されるアミノ酸である ; X2 は A, D, E ,F, H, K, L, M, P, Q, S, T, V, W および Yから選択されるアミノ酸である ; X3 は A, E, F, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, T, V, W および Yから選択されるアミノ酸である ; X4 はRである ; X5 はA, D, E, F ,G, H , I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W および Yから選択されるアミノ酸である ; X6 は A, D, E, F, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W および Yから選択されるアミノ酸である ; X7 は A, D, E, F ,G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W および Yから選択されるアミノ酸である ; X8 は A, D , E, F ,G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W および Yから選択されるアミノ酸である ; X9はA, G, H, I, LおよびRから選択されるアミノ酸である。

[0129] プロテアーゼ切断配列として以下で示すものを用いることもできる :

X10-X11-X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8-X9 (配列番号 : 1406)

中で、X1からX11はそれぞれ一つのアミノ酸を表し、X10 は I, Tおよび Yから選択されるアミノ酸である ; X11 は Sである ; X1 は A, D, E ,F ,G, H, I, K, M, N, P, Q, S, T, W および Yから選択されるアミノ酸である ; X2 は A, D, E ,F, H, K, L, M, P, Q, S, T, V, W および Yから選択されるアミノ酸である ; X3 は A, D, E, F ,G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V , W および Yから選択されるアミノ酸である ; X4 はRである ; X5 はA, D, E, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, T, V, W および Yから選択されるアミノ酸である ; X6 は A, D, E, F, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W および Yから選択されるアミノ酸である ; X7 は A, D, E, F ,G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W および Yから選択されるアミノ酸である ; X8 は A, D , E, F ,G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W および Yから選択されるアミノ酸である ; X9はA, G, H, I, LおよびRから選択されるアミノ酸である。

[0130] プロテアーゼ切断配列として以下で示すものを用いることもできる :

X10-X11-X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8-X9 (配列番号 : 1407)

中で、X1からX11はそれぞれ一つのアミノ酸を表し、X10 は I, Tおよび Y から選択されるアミノ酸である；X11 は Sである；X1 は A, D, E ,F ,G, H, I, K, M, N, P, Q, S, T, W および Yから選択されるアミノ酸である；X2 は A, D, E ,F, H, K, L, M, P, Q, S, T, V, W および Yから選択されるアミノ酸である；X3 は A, D, E, F ,G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V , W および Yから選択されるアミノ酸である；X4 はRである；X5 はA, D, E, F ,G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W および Yから選択されるアミノ酸である；X6 は E, F, K, M, N, P, Q, R, SおよびW から選択されるアミノ酸である；X7 は A, D, E, F ,G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V , W および Yから選択されるアミノ酸である；X8 は A, D, E, F ,G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W および Yから選択されるアミノ酸である；X9はA, G, H, I, LおよびRから選択されるアミノ酸である。

[0131] プロテアーゼ切断配列として以下で示すものを用いることもできる：

X10-X11-X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8-X9 (配列番号：1408)

中で、X1からX11はそれぞれ一つのアミノ酸を表し、X10 は I, Tおよび Y から選択されるアミノ酸である；X11 は Sである；X1 は A, D, E ,F ,G, H, I, K, M, N, P, Q, S, T, W および Yから選択されるアミノ酸である；X2 は A, D, E ,F, H, K, L, M, P, Q, S, T, V, W および Yから選択されるアミノ酸である；X3 は A, D, E, F ,G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V , W および Yから選択されるアミノ酸である；X4 はRである；X5 はA, D, E, F ,G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W および Yから選択されるアミノ酸である；X6 は A, D, E, F, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W および Yから選択されるアミノ酸である；X7 は A, D, F ,G, L, M, P, Q, VおよびWから選択されるアミノ酸である；X8 は A, D, E, F ,G, H, I, K, L , M, N, P, Q, R, S, T, V, W および Yから選択されるアミノ酸である；X9 はA, G, H, I, LおよびRから選択されるアミノ酸である。

[0132] プロテアーゼ切断配列として以下で示すものを用いることもできる：

X10-X11-X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8-X9 (配列番号：1409)

中で、X1からX11はそれぞれ一つのアミノ酸を表し、X10 は I, Tおよび Y から選択されるアミノ酸である；X11 は Sである；X1 は A, D, E, F, G, H, I, K, M, N, P, Q, S, T, W および Yから選択されるアミノ酸である；X2 は A, D, E, F, H, K, L, M, P, Q, S, T, V, W および Yから選択されるアミノ酸である；X3 は A, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W および Yから選択されるアミノ酸である；X4 はRである；X5 はA, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W および Yから選択されるアミノ酸である；X6 は A, D, E, F, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W および Yから選択されるアミノ酸である；X7 は A, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W および Yから選択されるアミノ酸である；X8 は A, D, E, F, G, I, K, N, TおよびWから選択されるアミノ酸である；X9 はA, G, H, I, LおよびRから選択されるアミノ酸である。

[0133] プロテアーゼ切断配列として以下で示すものを用いることもできる：

X10-X11-X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8-X9 (配列番号：1410)

中で、X1からX11はそれぞれ一つのアミノ酸を表し、X10 は I, Tおよび Y から選択されるアミノ酸である；X11 は Sである；X1はA, G, I, P, Q, SおよびYから選択されるアミノ酸である；X2はKもしくはTから選択されるアミノ酸である；X3はGである；X4はRである；X5はSである；X6はAである；X7はH, IおよびVから選択されるアミノ酸である；X8はH, VおよびYから選択されるアミノ酸である；X9はA, G, H, I, LおよびRから選択されるアミノ酸である。

[0134] プロテアーゼ切断配列として以下で示すものを用いることもできる：

X10-X11-X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8-X9 (配列番号：1411)

中で、X1からX11はそれぞれ一つのアミノ酸を表し、X10 は I, Tおよび Y から選択されるアミノ酸である；X11 は Sである；X1はYである；X2はSおよびTから選択されるアミノ酸である；X3はGである；X4はRである；X5はSである；X6はAおよびEから選択されるアミノ酸である；X7はNおよびVから選択されるアミノ酸である；X8はH, P, VおよびYから選択されるアミノ酸である

; X9はA, G, H, I, LおよびRから選択されるアミノ酸である。

[0135] 上記プロテアーゼ切断配列を使用する以外に、プロテアーゼ切断配列を新たにスクリーニングにより取得しても良い。例えば、既知のプロテアーゼ切断配列の結晶構造解析の結果から、切断配列と酵素の活性残基・認識残基の相互作用を変えて、新たなプロテアーゼ切断配列を探索できる。また、既知のプロテアーゼ切断配列中のアミノ酸に改変を加え、プロテアーゼとの相互作用を確認することにより新たなプロテアーゼ切断配列を探索できる。別の例として、ペプチドライブラリをファージディスプレイ、リボソームディスプレイ等の*in vitro*ディスプレイ法を用いてディスプレイし、またはチップあるいはビーズに固定したペプチドアレイを用いてプロテアーゼとの相互作用を確認することにより、プロテアーゼで切断される配列を探索できる。

プロテアーゼ切断配列とプロテアーゼの相互作用を確認する方法として、*in vitro*もしくは*in vivo*でのプロテアーゼ切断を確認することにより行うことができる。

[0136] SDS-PAGE等の電気泳動法により分離したプロテアーゼ処理後の切断断片量を定量することにより、プロテアーゼ切断配列、プロテアーゼ活性の評価、およびプロテアーゼ切断配列を導入した分子の切断率の評価が可能である。プロテアーゼ切断配列を導入した分子の切断率を評価する方法の非限定な一態様として以下の方法が挙げられる。例えばプロテアーゼ切断配列を導入した抗体改変体をリコンビナントヒトu-Plasminogen Activator/Urokinase (human uPA, huPA) (R&D Systems; 1310-SE-010)もしくはリコンビナントヒトMatrilysin/ST14 Catalytic Domain (human MT-SP1, hMT-SP1) (R&D Systems; 3946-SE-010)を用いて切断率を評価する場合、huPA 40 nMもしくはhMT-SP1 3 nM、抗体改変体 100 µg/mL、PBS、37°Cの条件下で1時間反応させたのちに、キャピラリー電気泳動イムノアッセイに供する。キャピラリー電気泳動イムノアッセイにはWes (Protein Simple) が使用可能であるが、これに限定されずキャピラリー電気泳動イムノアッセイに代わる方法としてSDS-PAGE等により分離後にWestern Blotting法で検出してもよいし、これらの方法に限定さ

れるものではない。切断前後の軽鎖の検出には抗ヒトlambda鎖HRP標識抗体（abcam; ab9007）が使用可能であるが、切断断片を検出できる抗体はいずれの抗体も使用可能である。プロテアーゼ処理後に得られた各ピークの面積をWes専用のソフトウェア（Compass for SW; Protein Simple）を用いて出力することで、抗体改変体の切断率（%）を（切断軽鎖ピーク面積）*100/（切断軽鎖ピーク面積+未切断軽鎖ピーク面積）の式により算出できる。切断率の算出は、プロテアーゼ処理前後のタンパク質断片が検出できれば可能であり、プロテアーゼ切断配列を導入した分子は抗体改変体に限らず様々なタンパク質において切断率を算出することが可能である。

[0137] プロテアーゼ切断配列を導入した分子を動物に投与した後、血液サンプル中の投与分子を検出することにより、生体内における切断率の算出が可能である。例えばプロテアーゼ切断配列を導入した抗体改変体をマウスに投与後、血液サンプルから血漿を回収しDynabeads Protein A（Thermo; 10001D）を用いて当業者公知の方法で抗体を精製し、キャピラリー電気泳動イムノアッセイに供することで抗体改変体のプロテアーゼ切断率の評価が可能である。キャピラリー電気泳動イムノアッセイにはWes（Protein Simple）が使用可能であるが、これに限定されずキャピラリー電気泳動イムノアッセイに代わる方法としてSDS-PAGE等により分離後にWestern Blotting法で検出してもよいし、これらの方法に限定されるものではない。マウスから回収された抗体改変体の軽鎖の検出には抗ヒトlambda鎖HRP標識抗体（abcam; ab9007）が使用可能であるが、切断断片を検出できる抗体はいずれの抗体も使用可能である。キャピラリー電気泳動イムノアッセイにより得られた各ピークの面積をWes専用のソフトウェア（Compass for SW; Protein Simple）で出力し、軽鎖残存比として（軽鎖ピーク面積）/（重鎖ピーク面積）を計算することで、マウス体内で切断されずに残った全長軽鎖の割合の算出が可能である。生体内における切断効率の算出には、生体から回収されたタンパク質断片が検出できれば可能であり、プロテアーゼ切断配列を導入した分子は抗体改変体に限らず様々なタンパク質において切断率を算出することが可能である。上述した

方法を用いて切断率を算出することにより、例えば異なる切断配列を導入した抗体改変体の生体内における切断率を比較することが可能であるし、また同一の抗体改変体の切断率を正常マウスモデルや腫瘍移植マウスモデルなどの異なる動物モデル間で比較することも可能である。

[0138] たとえば、表1に例示したプロテアーゼ切断配列は、いずれも本発明者らによって新たに見出された。これらのプロテアーゼ切断配列を含むポリペプチドは、いずれもプロテアーゼの作用によって加水分解されるプロテアーゼ基質として有用である。すなわち本発明は、配列番号：1161～1180、1392～1411で示す配列、表1に記載の配列から選ばれる配列を含む、プロテアーゼ基質を提供する。本発明のプロテアーゼ基質は、たとえばリガンド結合分子への組み込みに当たって、目的に応じた性状を備えたものを選択するためのライブラリーとして活用することができる。具体的には、リガンド結合分子を病巣に局在するプロテアーゼによって選択的に切断するために、そのプロテアーゼ感受性を評価することができる。リガンドと結合させたリガンド結合分子は、生体に投与された後に、様々なプロテアーゼとの接触を経て、病巣に到達する可能性が有る。したがって、病巣に局在するプロテアーゼには感受性を持ちながら、それ以外のプロテアーゼにはできるだけ高い耐性を持つことが望ましい。目的に応じて、望ましいプロテアーゼ切断配列を選ぶために、予め、各プロテアーゼ基質について、種々のプロテアーゼによる感受性を網羅的に解析すれば、プロテアーゼ耐性を知ることができる。得られたプロテアーゼ耐性スペクトルに基づいて、必要な感受性と耐性を備えたプロテアーゼ切断配列を見出すことができる。

あるいは、プロテアーゼ切断配列を組み込まれたリガンド結合分子は、プロテアーゼによる酵素的な作用のみならず、pHの変化、温度、酸化還元ストレス等の様々な環境負荷を経て病巣に到達する。このような外部要因に対しても、各プロテアーゼ基質の耐性を比較した情報に基づいて、目的に応じた望ましい性状を備えたプロテアーゼ切断配列を選択することもできる。

[0139] 本発明の一実施態様において、プロテアーゼ切断配列のどちらか一端また

は両端に、可動リンカーを更に付加している。プロテアーゼ切断配列の一端の可動リンカーを第一可動リンカーと呼称することが出来、他端の可動リンカーを第二可動リンカーと呼称することが出来る。特定の実施形態では、プロテアーゼ切断配列と可動リンカーは以下の式のうちの一つを含む。

(プロテアーゼ切断配列)

(第一可動リンカー) - (プロテアーゼ切断配列)

(プロテアーゼ切断配列) - (第二可動リンカー)

(第一可動リンカー) - (プロテアーゼ切断配列) - (第二可動リンカー)

本実施態様における可動リンカーはペプチドリンカーが好ましい。第一可動リンカーと第二可動リンカーは、それぞれ独立かつ任意的に存在し、少なくとも1つのフレキシブルアミノ酸 (Gly など) を含む同一または異なる可動リンカーである。例えば、プロテアーゼ切断配列が所望のプロテアーゼアクセス性を得られるほどの十分な数の残基 (Arg、Ile、Gln、Glu、Cys、Tyr、Trp、Thr、Val、His、Phe、Pro、Met、Lys、Gly、Ser、Asp、Asn、Ala などから任意に選択されるアミノ酸、特にGly、Ser、Asp、Asn、Ala、ことさらGlyおよびSer、特にGlyなど) が含まれる。

[0140] プロテアーゼ切断配列の両端で使用するのに適した可動リンカーは通常、プロテアーゼ切断配列へのプロテアーゼのアクセスを向上し、プロテアーゼの切断効率を上昇させるものである。好適な可動リンカーは容易に選択可能であり、1アミノ酸 (Gly など) から20アミノ酸、2アミノ酸から15アミノ酸あるいは、4アミノ酸から10アミノ酸、5アミノ酸から9アミノ酸、6アミノ酸から8アミノ酸または7アミノ酸から8アミノ酸をはじめとして3アミノ酸から12アミノ酸など、異なる長さのうちからの好適なものを選択できる。本発明のいくつかの実施態様においては、可動リンカーは1から7アミノ酸のペプチドリンカーである。

[0141] 可動リンカーの例として、それだけに限定されないが、例えば、グリシンポリマー (G)_n、グリシン-セリンポリマー (例えば、(GS)_n、(G

S G G S : 配列番号 : 4 5) n および (G G G S : 配列番号 : 3 6) n を含み、n は少なくとも 1 の整数である)、グリシン-アラニンポリマー、アラニン-セリンポリマー、従来技術において周知の他の可動リンカーが挙げられる。

このうちグリシンおよびグリシン-セリンポリマーが注目されているが、これらのアミノ酸が比較的構造化されておらず、成分間の中性テザーとして機能しやすいことがその理由である。

グリシン-セリンポリマーからなる可動リンカーの例として、それだけに限定されないが、例えば、

Ser

Gly · Ser (GS)

Ser · Gly (SG)

Gly · Gly · Ser (GGS)

Gly · Ser · Gly (GSG)

Ser · Gly · Gly (SGG)

Gly · Ser · Ser (GSS)

Ser · Ser · Gly (SSG)

Ser · Gly · Ser (SGS)

Gly · Gly · Gly · Ser (GGGS、配列番号 : 3 6)

Gly · Gly · Ser · Gly (GGSG、配列番号 : 3 7)

Gly · Ser · Gly · Gly (GSGG、配列番号 : 3 8)

Ser · Gly · Gly · Gly (SGGG、配列番号 : 3 9)

Gly · Ser · Ser · Gly (GSSG、配列番号 : 4 0)

Gly · Gly · Gly · Gly · Ser (GGGGS、配列番号 : 4 1)

Gly · Gly · Gly · Ser · Gly (GGGSG、配列番号 : 4 2)

Gly · Gly · Ser · Gly · Gly (GGSGG、配列番号 : 4 3)

Gly · Ser · Gly · Gly · Gly (GSGGG、配列番号 : 4 4)

Gly · Ser · Gly · Gly · Ser (GSGGS、配列番号 : 4 5)

Ser · Gly · Gly · Gly · Gly (SGGGG、配列番号：46)
 Gly · Ser · Ser · Gly · Gly (GSSGG、配列番号：47)
 Gly · Ser · Gly · Ser · Gly (GSGSG、配列番号：48)
 Ser · Gly · Gly · Ser · Gly (SGGSG、配列番号：49)
 Gly · Ser · Ser · Ser · Gly (GSSSG、配列番号：50)
 Gly · Gly · Gly · Gly · Gly · Ser (GGGGGS、配列番号：51)
 Ser · Gly · Gly · Gly · Gly · Gly (SGGGGG、配列番号：52)
 Gly · Gly · Gly · Gly · Gly · Gly · Ser (GGGGGS、配列番号：53)
 Ser · Gly · Gly · Gly · Gly · Gly · Gly (SGGGGGG、配列番号：54)
 (Gly · Gly · Gly · Gly · Ser (GGGGS、配列番号：41))_n
 (Ser · Gly · Gly · Gly · Gly (SGGGG、配列番号：46))_n

[_nは1以上の整数である]等を挙げることができる。但し、ペプチドリンカーの長さや配列は目的に応じて当業者が適宜選択することができる。

[0142] 本発明のいくつかの実施態様において、リガンド結合分子は抗体VHと抗体VLを含む。VHとVLを含むリガンド結合分子の例として、それだけに限定されないが、例えば、Fv、scFv、Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂、完全抗体等が挙げられる。

[0143] 本発明のいくつかの実施態様において、リガンド結合分子はFc領域を含む。IgG抗体のFc領域を用いる場合、その種類は限定されず、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4などのFc領域を用いることが可能である。例えば、配列番号：55、56、57、58で示されるアミノ酸配列から選ばれる一つの配列を含むFc領域、またはこれらのFc領域に改変を加えたFc領域変異体を用いることが可能である。また、本発明のいくつかの実施態様において、リガンド結合分子は抗体定常領域を含む。

[0144] 本発明のより具体的ないくつかの実施態様において、リガンド結合分子は抗体である。リガンド結合分子として抗体を使用する場合、リガンドへの結合は可変領域により実現される。更に具体的ないくつかの実施態様において、リガンド結合分子はIgG抗体である。リガンド結合分子としてIgG抗体を使

用する場合、その種類は限定されず、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4などを使用することが出来る。リガンド結合分子としてIgG抗体を使用する場合でも、リガンドへの結合は可変領域により実現され、IgG抗体の二つの可変領域の片方でも両方でも、リガンドへの結合を実現できる。

[0145] 本発明のいくつかの実施態様において、リガンド結合分子中の切断サイト／プロテアーゼ切断配列が切断されることで、リガンド結合分子中のリガンド結合活性を有するドメインが分断され、リガンドへの結合が減弱される。例えば、リガンド結合分子としてIgG抗体を使用する場合、抗体可変領域中に切断サイト／プロテアーゼ切断配列を設け、切断状態においては、完全なる抗体可変領域を形成できなくなり、リガンドへの結合が減弱される実施態様が挙げられる。

[0146] 本明細書における「会合」とは、例えば、2以上のポリペプチド領域が相互作用する状態を指すものと換言することができる。一般的に、対象となるポリペプチド領域の間に、疎水結合、水素結合、イオン結合等が作られ会合体が形成される。よく見る会合の一つの例として、天然型抗体を代表とする抗体においては、重鎖可変領域（VH）と軽鎖可変領域（VL）が両者間の非共有結合等によりペアリング構造を保持することが知られている。

[0147] 本発明のいくつかの実施態様において、リガンド結合分子に含まれるVHとVLは会合する。また、抗体VHと抗体VLの会合は、例えば切断サイト／プロテアーゼ切断配列の切断により解消可能である。会合の解消とは、例えば、2以上のポリペプチド領域の相互作用状態の全部もしくは一部が解消されると換言することができる。VHとVLの会合の解消とは、VHとVLの相互作用が全部解消されても、VHとVLの相互作用の中の一部が解消されても良い。

本発明のリガンド結合分子には、リガンド結合分子中の抗体VLもしくはその一部と抗体VHもしくはその一部との会合が、切断サイトが切断されることにより解消される、またはプロテアーゼ切断配列がプロテアーゼで切断されることにより解消されるリガンド結合分子が包含される。

[0148] 本発明のいくつかの実施態様において、リガンド結合分子が抗体VHと抗体V

Lを含み、リガンド結合分子の切断サイト／プロテアーゼ切断配列が切断されていない状態において、リガンド結合分子中の抗体VHと抗体VLは会合しており、切断サイト／プロテアーゼ切断配列の切断により、リガンド結合分子中の抗体VHと抗体VLの会合が解消される。リガンド結合分子中の切断サイト／プロテアーゼ切断配列は、切断されることによってリガンド結合分子のリガンドへの結合を減弱できる限り、リガンド結合分子中のどの位置に配置されても良い。

[0149] 本発明の更なるいくつかの実施態様において、リガンド結合分子は抗体VHと抗体VLと抗体定常領域を含む。

抗体のVHとVL、CHとCLは、Rothlisbergerら (J Mol Biol. 2005 Apr 8;347 (4):773-89.) により述べられているようにドメイン間で多くのアミノ酸側鎖を介して相互作用していることが知られている。VH-CH1とVL-CLはFabドメインとして安定した構造を形成することが出来ることが知られているが、報告されている通りVHとVLの間のアミノ酸側鎖は一般的には 10^{-5}M から 10^{-8}M 範囲の解離定数で相互作用しており、VHドメインとVLドメインのみが存在する場合では会合状態を形成している割合は少ないと考えられる。

[0150] 本発明のいくつかの実施態様において、抗体VHと抗体VLを含むリガンド結合分子に切断サイト／プロテアーゼ切断配列が設けられ、切断前には、Fab構造において重鎖-軽鎖相互作用のすべてが二つのペプチド間で存在することに対し、切断サイト／プロテアーゼ切断配列を切断した際、VH（またはVHの一部）を含むペプチドとVL（またはVLの一部）を含むペプチドとの間の相互作用が減弱され、VHとVLの会合は解消されるリガンド結合分子が設計される。

[0151] 本発明の一実施態様においては、切断サイト／プロテアーゼ切断配列は抗体定常領域内に位置する。より具体的な実施態様において、切断サイト／プロテアーゼ切断配列は、抗体重鎖定常領域中の140番（EUナンバリング）アミノ酸より可変領域側、好ましくは、抗体重鎖定常領域中の122番（EUナンバリング）アミノ酸より可変領域側に位置する。いくつか具体的な実施態様において、切断サイト／プロテアーゼ切断配列は、抗体重鎖定常領域1

18番アミノ酸（EUナンバリング）から抗体重鎖定常領域140番アミノ酸（EUナンバリング）までの配列中の任意の位置に導入される。別のより具体的な実施態様において、切断サイト／プロテアーゼ切断配列は、抗体軽鎖定常領域中の130番（EUナンバリング）（Kabatナンバリング130番）アミノ酸より可変領域側、好ましくは、抗体軽鎖定常領域中の113番（EUナンバリング）（Kabatナンバリング113番）アミノ酸より可変領域側、抗体軽鎖定常領域中の112番（EUナンバリング）（Kabatナンバリング112番）アミノ酸より可変領域側に位置する。いくつか具体的な実施態様において、切断サイト／プロテアーゼ切断配列は、抗体軽鎖定常領域108番アミノ酸（EUナンバリング）（Kabatナンバリング108番）から抗体軽鎖定常領域131番アミノ酸（EUナンバリング）（Kabatナンバリング131番）までの配列中の任意の位置に導入される。

[0152] 本発明の一実施態様において、切断サイト／プロテアーゼ切断配列は抗体VH内または抗体VL内に位置する。より具体的な実施態様において、切断サイト／プロテアーゼ切断配列は抗体VHの7番（Kabatナンバリング）アミノ酸より抗体定常領域側、好ましくは、抗体VHの40番（Kabatナンバリング）アミノ酸より抗体定常領域側、より好ましくは、抗体VHの101番（Kabatナンバリング）アミノ酸より抗体定常領域側に、更に好ましくは、抗体VHの109番（Kabatナンバリング）アミノ酸より抗体定常領域側に、抗体VHの111番（Kabatナンバリング）アミノ酸より抗体定常領域側に位置する。より具体的な実施態様において、切断サイト／プロテアーゼ切断配列は抗体VLの7番（Kabatナンバリング）アミノ酸より抗体定常領域側、好ましくは、抗体VLの39番（Kabatナンバリング）アミノ酸より抗体定常領域側、より好ましくは、抗体VLの96番（Kabatナンバリング）アミノ酸より抗体定常領域側、更に好ましくは、抗体VLの104番（Kabatナンバリング）アミノ酸より抗体定常領域側、抗体VLの105番（Kabatナンバリング）アミノ酸より抗体定常領域側に位置する。

いくつかのより具体的な実施態様において、切断サイト／プロテアーゼ切

断配列は抗体VHまたは抗体VL中のループ構造を形成している残基及びループ構造に近い残基の位置に導入される。抗体VHまたは抗体VL中のループ構造とは、抗体VHまたは抗体VLの中で、 α -ヘリックス、 β -シート等の二次的構造を形成しない部分を言う。ループ構造を形成している残基及びループ構造に近い残基の位置は、具体的に：抗体VH 7番アミノ酸（Kabatナンバリング）から16番アミノ酸（Kabatナンバリング）まで、40番アミノ酸（Kabatナンバリング）から47番アミノ酸（Kabatナンバリング）まで、55番アミノ酸（Kabatナンバリング）から69番アミノ酸（Kabatナンバリング）まで、73番アミノ酸（Kabatナンバリング）から79番アミノ酸（Kabatナンバリング）まで、83番アミノ酸（Kabatナンバリング）から89番アミノ酸（Kabatナンバリング）まで、95番アミノ酸（Kabatナンバリング）から99番アミノ酸（Kabatナンバリング）まで、101番アミノ酸（Kabatナンバリング）から113番アミノ酸（Kabatナンバリング）まで、抗体VL 7番アミノ酸（Kabatナンバリング）から19番アミノ酸（Kabatナンバリング）まで、39番アミノ酸（Kabatナンバリング）から46番アミノ酸（Kabatナンバリング）まで、49番アミノ酸（Kabatナンバリング）から62番アミノ酸（Kabatナンバリング）まで、96番アミノ酸（Kabatナンバリング）から107番アミノ酸（Kabatナンバリング）までの範囲を指すことができる。

いくつかのより具体的な実施態様において、切断サイト／プロテアーゼ切断配列は、抗体VH 7番アミノ酸（Kabatナンバリング）から16番アミノ酸（Kabatナンバリング）まで、40番アミノ酸（Kabatナンバリング）から47番アミノ酸（Kabatナンバリング）まで、55番アミノ酸（Kabatナンバリング）から69番アミノ酸（Kabatナンバリング）まで、73番アミノ酸（Kabatナンバリング）から79番アミノ酸（Kabatナンバリング）まで、83番アミノ酸（Kabatナンバリング）から89番アミノ酸（Kabatナンバリング）まで、95番アミノ酸（Kabatナンバリング）から99番アミノ酸（Kabatナンバリング）まで、101番アミノ酸（Kabatナンバリング）から113番アミノ酸（Kabatナンバリング）までの配列中の任意位置に導入される。

いくつかのより具体的な実施態様において、切断サイト／プロテアーゼ切断配列は、抗体VL 7番アミノ酸（Kabatナンバリング）から19番アミノ酸（Kabatナンバリング）まで、39番アミノ酸（Kabatナンバリング）から46番アミノ酸（Kabatナンバリング）まで、49番アミノ酸（Kabatナンバリング）から62番アミノ酸（Kabatナンバリング）まで、96番アミノ酸（Kabatナンバリング）から107番アミノ酸（Kabatナンバリング）までの配列中の任意位置に導入される。

[0153] 本発明の一実施態様において、切断サイト／プロテアーゼ切断配列は抗体VHと抗体定常領域の境界付近に位置する。抗体VHと抗体重鎖定常領域の境界付近とは、抗体VHの101番（Kabatナンバリング）のアミノ酸から抗体重鎖定常領域140番（EUナンバリング）のアミノ酸の間を指すことができ、好ましくは抗体VHの109番（Kabatナンバリング）のアミノ酸から抗体重鎖定常領域122番（EUナンバリング）のアミノ酸の間を指すことができ、または抗体VHの111番（Kabatナンバリング）のアミノ酸から抗体重鎖定常領域122番（EUナンバリング）のアミノ酸の間を指すことができる。また、抗体VHと抗体軽鎖定常領域を連結している場合、抗体VHと抗体軽鎖定常領域の境界付近とは、抗体VHの101番（Kabatナンバリング）のアミノ酸から抗体軽鎖定常領域130番（EUナンバリング（Kabatナンバリング130番））のアミノ酸の間を指すことができ、好ましくは抗体VHの109番（Kabatナンバリング）のアミノ酸から抗体軽鎖定常領域113番（EUナンバリング）（Kabatナンバリング113番）のアミノ酸の間を指すことができ、または抗体VHの111番（Kabatナンバリング）のアミノ酸から抗体軽鎖定常領域112番（EUナンバリング）（Kabatナンバリング112番）のアミノ酸の間を指すことができる。

[0154] 一実施態様において、切断サイト／プロテアーゼ切断配列は抗体VLと抗体定常領域の境界付近に位置する。抗体VLと抗体軽鎖定常領域の境界付近とは、抗体VLの96番（Kabatナンバリング）のアミノ酸から抗体軽鎖定常領域130番（EUナンバリング）（Kabatナンバリング130番）のアミノ酸の間を

指すことができ、好ましくは抗体VLの104番（Kabatナンバリング）のアミノ酸から抗体軽鎖定常領域113番（EUNanバリング）（Kabatナンバリング113番）のアミノ酸の間を指すことができ、または抗体VLの105番（Kabatナンバリング）のアミノ酸から抗体軽鎖定常領域112番（EUNanバリング）（Kabatナンバリング112番）のアミノ酸の間を指すことが出来る。抗体VLと抗体重鎖定常領域を連結している場合、抗体VLと抗体重鎖定常領域の境界付近とは、抗体VLの96番（Kabatナンバリング）のアミノ酸から抗体重鎖定常領域140番（EUNanバリング）のアミノ酸の間を指すことができ、好ましくは抗体VLの104番（Kabatナンバリング）のアミノ酸から抗体重鎖定常領域122番（EUNanバリング）のアミノ酸の間を指すことができ、または抗体VLの105番（Kabatナンバリング）のアミノ酸から抗体重鎖定常領域122番（EUNanバリング）のアミノ酸の間を指すことが出来る。

[0155] 切断サイト／プロテアーゼ切断配列は、リガンド結合分子中に複数設けられることが出来、例えば、抗体定常領域内、抗体VH内、抗体VL内、抗体VHと抗体定常領域の境界付近、抗体VLと抗体定常領域の境界付近から選ばれる複数個所に設けることが出来る。また、本発明に触れた当業者であれば、抗体VHと抗体VLを入れ替える等、抗体VHと抗体VLと抗体定常領域を含む分子の形を変更することは可能であり、当該分子形は本発明の範囲から逸脱しない。

[0156] 本明細書において、用語「リガンド」は生物活性を有する分子である。生物活性を有する分子は通常、細胞表面の受容体と相互作用し、それにより生物学的に刺激、阻害、または他の様式で変調することによって機能し、これらは通常は前記受容体を保有する細胞内のシグナル伝達経路に関与すると思われる。

[0157] 本明細書においてリガンドには、生体分子と相互作用することにより生物活性を発揮する所望の分子が包含される。例えばリガンドは、受容体に相互作用する分子を意味するだけでなく、当該分子に相互作用することにより生物活性を発揮する分子もリガンドであって、例えば当該分子に相互作用する受容体や、その結合断片などもリガンドに含まれる。例えば、受容体として

知られるタンパク質のリガンド結合部位や、当該受容体が他の分子と相互作用する部位を含むタンパク質は、本発明においてリガンドに含まれる。具体的には、可溶性受容体、受容体の可溶性断片、膜貫通型受容体の細胞外ドメイン、およびそれらを含むポリペプチドなどは、本発明においてリガンドに含まれる。

- [0158] 本発明のリガンドは通常、一つまたは複数の結合パートナーに結合することで、望ましい生物活性を発揮することが出来る。リガンドの結合パートナーは、細胞外、細胞内、または膜貫通タンパク質であることができる。一つの実施形態において、リガンドのその結合パートナーは、細胞外タンパク質、たとえば可溶性受容体である。別の実施形態において、リガンドの結合パートナーは、膜結合型受容体である。

本発明のリガンドは、その結合パートナーに $10\ \mu\text{M}$ 、 $1\ \mu\text{M}$ 、 $100\ \text{nM}$ 、 $50\ \text{nM}$ 、 $10\ \text{nM}$ 、 $5\ \text{nM}$ 、 $1\ \text{nM}$ 、 $500\ \text{pM}$ 、 $400\ \text{pM}$ 、 $350\ \text{pM}$ 、 $300\ \text{pM}$ 、 $250\ \text{pM}$ 、 $200\ \text{pM}$ 、 $150\ \text{pM}$ 、 $100\ \text{pM}$ 、 $50\ \text{pM}$ 、 $25\ \text{pM}$ 、 $10\ \text{pM}$ 、 $5\ \text{pM}$ 、 $1\ \text{pM}$ 、 $0.5\ \text{pM}$ 、または $0.1\ \text{pM}$ 以下の解離定数 (K_D) で特異的に結合することができる。

- [0159] 生物活性を有する分子の例として、それだけに限定されないが、例えば、サイトカイン、ケモカイン、ポリペプチドホルモン、成長因子、アポトーシス誘導因子、PAMPs、DAMPs、核酸、またはそれらのフラグメントが挙げられる。詳細な実施形態においては、リガンドとして、インターロイキン、インターフェロン、造血因子、TNFスーパーファミリー、ケモカイン、細胞増殖因子、TGF- β ファミリー、マイオカイン、アディポカイン、または神経栄養因子が使用され得る。より詳細な実施形態においては、リガンドとして、CXCL10、IL-2、IL-7、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21、IFN- α 、IFN- β 、IFN- γ 、MIG、I-TAC、RANTES、MIP-1a、MIP-1b、IL-1R1 (Interleukin-1 receptor, type I)、IL-1R2 (Interleukin-1 receptor, type II)、IL-1RAcP (Interleukin-1 receptor accessory protein)、またはIL-1Ra (タンパク質アクセッションNo. NP_776214、mRNAアクセッションNo. NM_173842.2) が使用され得る。

る。

[0160] ケモカインは、7～16 kDaの間の均質な血清タンパク質のファミリーであり、元来、白血球の遊走を誘導するその能力を特徴とした。ほとんどのケモカインは、4つの特徴的なシステイン(Cys)を有し、最初の2つのシステインによって示されるモチーフによって、CXC、又はアルファ、CC又はベータ、C又はガンマ及びCX3C又はデルタのケモカインクラスに分類されている。2つのジスルフィド結合は、第1と第3のシステインの間、及び第2と第4のシステインの間に形成される。一般に、ジスルフィド架橋は必要であると考えられ、Clark-Lewisと共同研究者らは、少なくともCXCL10についてはジスルフィド結合は、ケモカイン活性に決定的であることを報告した(Clark-Lewis et al., J. Biol. Chem. 269:16075-16081, 1994)。4つのシステインを有することに対する唯一の例外は、リンホタクチンであり、システイン残基を2つしか有さない。従って、リンホタクチンは、1つだけのジスルフィド結合によって機能的構造をなんとか保持する。

さらに、CXC又はアルファのサブファミリーは、第1のシステインに先行するELRモチーフ(Glu-Leu-Arg)の存在によって2つの群: ELR-CXCケモカイン及び非ELR-CXCケモカインに分類されている(たとえば、Clark-Lewis, 上記、及びBelperio et al., "CXC Chemokines in Angiogenesis (脈管形成におけるCXCケモカイン)," J. Leukoc. Biol. 68:1-8, 2000を参照)。

[0161] インターフェロン誘導性のタンパク質-10(IP-10又はCXCL10)は、インターフェロン- γ 及びTNF- α によって誘導され、角化細胞、内皮細胞、線維芽細胞及び単球によって産生される。IP-10は、組織炎症部位への活性化T細胞の動員において役割を担っていると考えられる(Dufour, et al., "IFN-gamma-inducible protein 10 (IP-10; CXCL10)-deficient mice reveal a role for IP-10 in effector T cell generation and trafficking (IFN γ が誘導可能なタンパク質-10(IP-10: CXCL10)欠損マウスは、エフェクターT細胞の生成及び輸送におけるIP-10の役割を

明らかにする),” J Immunol., 168:3195-204, 2002)。さらに、IP-10は、過敏反応に役割を担っている可能性がある。また、炎症性脱髄神経障害の発生にも役割を担っている可能性がある (Kieseier, et al., "Chemokines and chemokine receptors in inflammatory demyelinating neuropathies: a central role for IP-10 (炎症性脱髄神経障害におけるケモカイン及びケモカイン受容体: IP-10の中心的役割),” Brain 125:823-34, 2002)。

[0162] 研究によって、IP-10は、移植に続く幹細胞の生着 (Nagasawa, T., Int. J. Hematol. 72:408-11, 2000)、幹細胞の動員 (Gazitt, Y., J. Hematother Stem Cell Res 10:229-36, 2001; Hattori et al., Blood 97:3354-59, 2001) 及び抗腫瘍免疫の亢進 (Nomura et al., Int. J. Cancer 91:597-606, 2001; Mach and Dranoff, Curr. Opin. Immunol. 12:571-75, 2000) に有用である可能性があることが示されている。たとえば、当業者に既知の報告の中で、ケモカインの生物活性が議論されている (Bruce, L. et al., "Radiolabeled Chemokine binding assays (放射性標識ケモカイン結合アッセイ),” Methods in Molecular Biology (2000) vol. 138, pp129-134, Raphaele, B. et al. "Calcium Mobilization,” Methods in Molecular Biology (2000) vol. 138, pp143-148, Paul D. Ponath et al., "Transwell Chemotaxis,” Methods in Molecular Biology (2000) vol. 138, pp113-120 Humana Press, Totowa, New Jersey)。

[0163] CXCL10の生物活性として、たとえば、CXCL10受容体 (CXCR3) への結合、CXCL10誘導性カルシウム流、CXCL10誘導性細胞走化性、グリコサミノグリカンへのCXCL10の結合およびCXCL10オリゴマー化が挙げられる。

CXCL10の生理活性を測定する方法として、CXCL10の細胞遊走活性を測定する方法、CXCR3安定発現細胞株を用いたReporter assay (PLoS One. 2010 Sep 13;5(9):e12700. 参照)、GPCRシグナル伝達初期に誘導されるB-Arrestin recruitmentを利用したPathHunter™ β -Arrestin recruitment assay等が挙げられる。

[0164] インターロイキン12 (IL-12) は、ジスルフィド結合されている3

0と40kDのグリコシル化ポリペプチド鎖からなるヘテロ二量体のサイトカインである。サイトカインは、樹状細胞、単球、マクロファージ、B細胞、ランゲルハンス細胞および角化細胞ならびにナチュラルキラー（NK）細胞を含む抗原提示細胞によって合成され、そして分泌される。IL-12は、種々の生物学的プロセスを媒介し、そしてNK細胞刺激因子（NKSF）、T細胞刺激因子、細胞障害Tリンパ球成熟因子およびEBV-形質転換されたB細胞系因子として言及されてきた。

[0165] インターロイキン12は、細胞（例えば、T細胞、NK細胞）の細胞質膜に発現されたIL-12受容体に結合し、それによって生物学的プロセスを変える（例えば、開始、阻止する）ことができる。例えば、IL-12受容体へのIL-12の結合は、前活性化されたT細胞およびNK細胞の増殖を刺激し、細胞障害性のT細胞（CTL）、NK細胞およびLAK（リンホカイン活性化キラー）細胞の細胞溶解活性を増進し、T細胞およびNK細胞によるγインターフェロン（IFNγ）の生産を誘導し、そしてIFNγおよびIL-2を生産するTh1細胞へのナイーブTh0細胞（naive Th0 cell）の分化を誘導する。特に、IL-12は、細胞溶解細胞（例えばNK、CTL）の生成および細胞性免疫応答（例えば、Th1細胞媒介の免疫応答）を設定するのに絶対に必要である。かくして、IL-12は、予防免疫（例えば、感染症の根絶）と病理学的免疫応答（例えば、自己免疫）の両方の生成および調節において絶対的に重要である。

[0166] IL-12の生理活性を測定する方法として、IL-12の細胞増殖活性の測定、STAT4 レポーターアッセイ、IL-12による細胞活性化（細胞表面マーカー発現、サイトカイン産生等）、IL-12による細胞分化の促進等を測定する方法が挙げられる。

[0167] タンパク質のProgrammed Death 1（PD-1）は、CD28ファミリーレセプターの阻害メンバーであり、CD28ファミリーには、CD28、CTLA-4、ICOSおよびBTLAもまた含まれる。PD-1は、活性化B細胞、T細胞および骨髄細胞上で発現する（Okazaki

iら(2002) *Curr. Opin. Immunol.* 14:391779-82、Bennettら(2003) *J Immunol* 170:711-8)。当該ファミリーの最初のメンバーであるCD28およびICOSは、モノクローナル抗体添加後のT細胞増殖上昇に及ぼす機能的影響により発見された(Hutloffら(1999) *Nature* 397:263-266、Hansenら(1980) *Immunogenics* 10:247-260)。PD-1は、アポトーシス細胞中における異なった発現をスクリーニングすることにより発見された(Ishidaら(1992) *EMBO J.* 11:3887-95)。当該ファミリーの他のメンバーであるCTLA-4とBTLAは、それぞれ、細胞傷害性Tリンパ球とTH1細胞中における異なった発現をスクリーニングすることにより発見された。CD28、ICOSおよびCTLA-4は全て、対になっていないシステイン残基を有しており、それらはホモダイマー化を可能にする。対照的に、PD-1はモノマーとして存在すると考えられており、他のCD28ファミリーメンバーに特徴的な対になっていないシステインを有していない。

[0168] PD-1遺伝子は、Ig遺伝子スーパーファミリーの一部である55kDaのI型膜貫通タンパク質をコードする遺伝子である。PD-1は、膜近位免疫レセプターチロシン阻害モチーフ(ITIM)および膜遠位のチロシンベーススイッチモチーフ(ITSM)を含む。PD-1は、CTLA-4に構造的に類似しているが、B7-1およびB7-2結合に重要なMYPPPYモチーフ(配列番号:537)を欠損している。PD-1に対する2個のリガンドPD-L1およびPD-L2が同定されており、PD-1に結合するとT細胞活性化を負に制御することが明らかとなっている(Freemanら(2000) *J Exp Med* 192:1027-34、Latchmanら(2001) *Nat Immunol* 2:261-8、Carterら(2002) *Eur J Immunol* 32:634-43)。PD-L1およびPD-L2は両者ともに、PD-1に結合するが、他のCD28ファミリーメンバーには結合しないB7ホモログである。PD-1の一つのリガン

ドであるPD-L1は、様々なヒト癌に豊富に存在している（Dongら（2002）Nat. Med. 8:787-9）。PD-1とPD-L1の相互作用の結果、腫瘍浸潤性リンパ球の減少、T細胞レセプター媒介性増殖の低下、および癌性細胞による免疫回避が起こる（Dongら（2003）J. Mol. Med. 81:281-7、Blankら（2005）Cancer Immunol. Immunother. 54:307-314、Konishiら（2004）Clin. Cancer Res. 10:5094-100）。免疫抑制は、PD-L1とのPD-1の局所的相互作用を阻害することにより回復でき、PD-L2とのPD-2との相互作用が同様に阻害される時、その効果は付加的である（Iwaira（2002）Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 99:12293-7、Brownら（2003）J. Immunol. 170:1257-66）。

[0169] PD-1は、活性化B細胞、T細胞および骨髄細胞上で発現するCD28ファミリーの阻害メンバーである。PD-1欠損動物は、自己免疫性心筋症および関節炎および腎炎を伴うループス様症候群を含む様々な自己免疫性表現型を発症する（Nishimuraら（1999）Immunity 11:141-51、Nishimuraら（2001）Science 291:319-22）。さらに、PD-1は、自己免疫性脳脊髄炎、全身性ループスエリテマトーデス、移植片対宿主病（GVHD）、I型糖尿病およびリウマチ性関節炎に重要な役割を果たすことがわかった（Salamaら（2003）J Exp Med 198:71-78、ProkuninaおよびAlarcon-Riquelme（2004）Hum Mol Genet 13:R143、Nielsenら（2004）Lupus 13:510）。マウスB細胞腫瘍株において、PD-1のITSMは、BCR媒介Ca²⁺の流れおよび下流エフェクター分子のチロシンリン酸化を阻害する際に必須であることが明らかになった（Okazakiら（2001）PNAS 98:13866-71）。

[0170] 本発明のいくつかの実施態様において、リガンドはサイトカインである。

サイトカインは、免疫調節性および炎症性の過程に関与する分泌型細胞シグナル伝達タンパク質のファミリーであり、これは神経システムのグリア細胞によっておよび免疫システムの多数の細胞によって分泌される。サイトカインは、タンパク質、ペプチドまたは糖タンパク質に分類することができ、大きくて多様な調節因子ファミリーを包含する。サイトカインは細胞表面受容体に結合して細胞内シグナル伝達を誘発し、これによって酵素の活性調節、いくつかの遺伝子およびその転写因子の上方制御もしくは下方制御、またはフィードバック阻害等が起こりうる。

いくつかの実施態様において、本発明のサイトカインは、インターロイキン(IL)およびインターフェロン(IFN)などの免疫調節因子を含む。適したサイトカインは以下のタイプの1つまたは複数由来のタンパク質を含むことができる：4つの α -ヘリックスバンドルファミリー(これはIL-2サブファミリー、IFNサブファミリーおよびIL-10サブファミリーを含む)；IL-1ファミリー(これはIL-1およびIL-8を含む)、ならびにIL-17ファミリー。サイトカインは、細胞免疫反応を増強する1型サイトカイン(例えば、IFN- γ 、TGF- β など)、または抗体反応に有利に働く2型サイトカイン(例えば、IL-4、IL-10、IL-13など)に分類されるものを含むこともできる。

[0171] 本発明のいくつかの実施態様において、リガンドはケモカインである。ケモカインは一般に、免疫エフェクター細胞をケモカイン発現部位に動員させる化学誘引物質として作用する。これは、他の免疫系成分を治療部位に動員させる目的で、特定のケモカイン遺伝子を例えばサイトカイン遺伝子とともに発現させるためには有益と考えられる。このようなケモカインには、CXCL10、RANTES、MCAF、MIP1- α 、MIP1- β が含まれる。当業者には、ある種のサイトカインも化学誘引作用を有することが知られていて、それらをケモカインという用語で分類しうることを認識していると考えられる。

[0172] また、本発明のいくつかの実施態様において、リガンドとしてサイトカイン、ケモカイン等の改変体(例：Annu Rev Immunol. 2015;33:139-67.)やそれらを含む融合タンパク質(例：Stem Cells Transl Med. 2015 Jan; 4(1):

66-73.)を使用することができる。

- [0173] 本発明のいくつかの実施態様において、リガンドはCXCL10、PD-1、IL-12、IL-6R、IL-1R1、IL-1R2、IL-1RAcP、IL-1Raから選ばれる。前記CXCL10、PD-1、IL-12、IL-6R、IL-1R1、IL-1R2、IL-1RAcP、IL-1Raは、天然に存在するCXCL10、PD-1、IL-12、IL-6R、IL-1R1、IL-1R2、IL-1RAcP、IL-1Raと同じ配列を有していても良く、天然に存在するCXCL10、PD-1、IL-12、IL-6R、IL-1R1、IL-1R2、IL-1RAcP、IL-1Raと配列が異なるが対応する天然のリガンドを有する生理的活性を保持している改変体であってもよい。リガンドの改変体を取得するには、様々な目的で人為的にリガンド配列に改変を加えてもよく、好ましくはプロテアーゼ切断を受けない（プロテアーゼ抵抗性の）改変を加えることでリガンドの改変体を取得する。
- [0174] 本発明のいくつかの実施態様において、リガンドは未切断のリガンド結合分子と結合することでその生物活性が阻害される。リガンドの生物活性が阻害される実施態様は限定されないが、その例として、例えば、未切断のリガンド結合分子とリガンドの結合は、リガンドとその結合パートナーの結合を実質的または有意的に妨害または競合する実施態様が挙げられる。リガンド結合分子としてリガンド中和活性を有する抗体またはその断片を使用する場合、リガンドと結合したリガンド結合分子がその中和活性を発揮することでリガンドの生物活性が阻害されることが可能である。
- [0175] 本発明の一実施態様において、未切断のリガンド結合分子は、リガンドと結合することによりリガンドの生物活性を十分に中和できることが好ましい。即ち、未切断のリガンド結合分子と結合しているリガンドの生物活性が、未切断のリガンド結合分子と結合していないリガンドの生物活性より低いことが好ましい。これに限定されるものではないが、例えば未切断のリガンド結合分子と結合しているリガンドの生物活性が、未切断のリガンド結合分子と結合していないリガンドの生物活性に比較して、90%以下、好ましくは80%以下、70%以下、60%以下、50%以下、40%以下、30%以下、特に好ましくは20%以下、10%以下、9%以下、8%以下、7%以下、6%以下、5%以下、

4%以下、3%以下、2%以下、または1%以下であってよい。リガンドの生物活性を十分に中和することにより、リガンド結合分子を投与した場合、標的組織に到達前にリガンドが生物活性を発揮してしまうことを防ぐことが期待できる。

あるいは、本発明によって、リガンドの生物活性を中和する方法が提供される。本発明の方法は、生物活性を中和すべきリガンドと本発明のリガンド結合性分子を接触させ、両者の結合生成物を回収する工程を含む。回収された結合生成物のリガンド結合性分子の切断によって、それによって中和されたりガンドの生物活性を復元することができる。つまり本発明のリガンドの生物活性の中和方法は、さらに付加的に、リガンドーリガンド結合性分子からなる結合生成物のリガンド結合性分子を切断してリガンドの生物活性を復元（すなわちリガンド結合性分子の中和作用を解除）する工程を含むことができる。

[0176] また本発明の一実施態様において、切断されたりガンド結合分子のリガンドに対する結合活性は、リガンドに対する生体内の天然の結合パートナー（例えばリガンドに対する天然の受容体）のリガンドに対する結合活性よりも低いことが好ましい。これに限定されるものではないが、例えば切断されたりガンド結合分子とリガンドの結合活性は、生体内における天然の結合パートナーとリガンドの結合量（単位結合パートナーあたり）に比較して、90%以下、好ましくは80%以下、70%以下、60%以下、50%以下、40%以下、30%以下、特に好ましくは20%以下、10%以下、9%以下、8%以下、7%以下、6%以下、5%以下、4%以下、3%以下、2%以下、または1%以下の結合量を示す。結合活性の指標は適宜所望の指標を用いてよいが、例えば解離定数（KD）を用いてよい。結合活性の評価指標として解離定数（KD）を用いる場合、切断されたりガンド結合分子のリガンドに対する解離定数（KD）が、生体内における天然の結合パートナーのリガンドに対する解離定数（KD）に比較して大きいことが、切断されたりガンド結合分子のリガンドに対する結合活性が生体内における天然の結合パートナーに比較して弱いことを示す。切

断されたリガンド結合分子のリガンドに対する解離定数 (KD) は、生体内における天然の結合パートナーのリガンドに対する解離定数 (KD) に比較して、例えば 1. 1 倍以上、好ましくは 1. 5 倍以上、2 倍以上、5 倍以上、10 倍以上、特に好ましくは 100 倍以上である。切断後のリガンド結合分子がリガンドに対して低い結合活性しか持たない、もしくはリガンドに対して結合活性をほぼ持たないことにより、リガンド結合分子が切断された後リガンドを遊離させることを保証し、また別のリガンド分子と再度結合してしまうことを防ぐことが期待できる。

[0177] リガンド結合分子が切断された後、抑制されたリガンドの生物活性が回復することが望ましい。切断されたリガンド結合分子のリガンドへの結合が減弱されることで、リガンド結合分子のリガンド生物活性阻害機能も減弱されることが望ましい。当業者は、リガンドの生物活性を既知の方法、例えば、リガンドとその結合パートナーとの結合を検出する方法で確認することが出来る。

[0178] 本発明のいくつかの実施態様において、未切断状態のリガンド結合分子は、抗原抗体結合によりリガンドと複合体を形成する。より具体的な実施態様において、リガンド結合分子とリガンドとの複合体は、リガンド結合分子とリガンドの非共有結合、例えば抗原抗体結合により形成されている。

[0179] 本発明のいくつかの実施態様において、未切断状態のリガンド結合分子はリガンドと融合され、融合タンパク質を形成した上、当該融合タンパク質内のリガンド結合分子部分とリガンド部分が更に抗原抗体結合により相互作用している。リガンド結合分子とリガンドは、リンカーを介してまたはリンカーを介さずに融合され得る。融合タンパク質中のリガンド結合分子とリガンドはリンカーを介してまたは介さずに融合されている場合でも、リガンド結合分子部分とリガンド部分の間の非共有結合は依然として存在する。言い換えれば、リガンド結合分子がリガンドと融合されている実施態様においても、リガンド結合分子部分とリガンド部分の間の非共有結合は、リガンド結合分子とリガンドが融合されていない実施態様と類似する。リガンド結合分子

が切断されることにより、その非共有結合が減弱する。すなわち、リガンド結合分子とリガンドとの結合は減弱することになる。

本発明の好ましい一実施態様においては、リガンド結合分子とリガンドをリンカーを介して融合させる。リガンド結合分子とリガンドを融合させるとき用いられるリンカーとして、遺伝子工学により導入し得る任意のペプチドリンカー、または合成化合物リンカー（例えば、Protein Engineering, 9 (3), 299-305, 1996参照）に開示されるリンカー等を用いることができるが、本実施態様においてはペプチドリンカーが好ましい。ペプチドリンカーの長さは特に限定されず、目的に応じて当業者が適宜選択することが可能である。例として、それだけに限定されないが、例えば、ペプチドリンカーの場合：

Ser

Gly · Ser (GS)

Ser · Gly (SG)

Gly · Gly · Ser (GGS)

Gly · Ser · Gly (GSG)

Ser · Gly · Gly (SGG)

Gly · Ser · Ser (GSS)

Ser · Ser · Gly (SSG)

Ser · Gly · Ser (SGS)

Gly · Gly · Gly · Ser (GGGS、配列番号：36)

Gly · Gly · Ser · Gly (GGSG、配列番号：37)

Gly · Ser · Gly · Gly (GSGG、配列番号：38)

Ser · Gly · Gly · Gly (SGGG、配列番号：39)

Gly · Ser · Ser · Gly (GSSG、配列番号：40)

Gly · Gly · Gly · Gly · Ser (GGGGS、配列番号：41)

Gly · Gly · Gly · Ser · Gly (GGGSG、配列番号：42)

Gly · Gly · Ser · Gly · Gly (GGSGG、配列番号：43)

Gly · Ser · Gly · Gly · Gly (GSGGG、配列番号：44)
 Gly · Ser · Gly · Gly · Ser (GSGGS、配列番号：45)
 Ser · Gly · Gly · Gly · Gly (SGGGG、配列番号：46)
 Gly · Ser · Ser · Gly · Gly (GSSGG、配列番号：47)
 Gly · Ser · Gly · Ser · Gly (GSGSG、配列番号：48)
 Ser · Gly · Gly · Ser · Gly (SGGSG、配列番号：49)
 Gly · Ser · Ser · Ser · Gly (GSSSG、配列番号：50)
 Gly · Gly · Gly · Gly · Gly · Ser (GGGGGS、配列番号：51)
 Ser · Gly · Gly · Gly · Gly · Gly (SGGGGG、配列番号：52)
 Gly · Gly · Gly · Gly · Gly · Gly · Ser (GGGGGS、配列番号：53)
 Ser · Gly · Gly · Gly · Gly · Gly · Gly (SGGGGGG、配列番号：54)
 (Gly · Gly · Gly · Gly · Ser (GGGGS、配列番号：41))_n
 (Ser · Gly · Gly · Gly · Gly (SGGGG、配列番号：46))_n

[nは1以上の整数である]等を挙げることができる。但し、ペプチドリンカーの長さや配列は目的に応じて当業者が適宜選択することができる。

[0180] 合成化合物リンカー（化学架橋剤）は、ペプチドの架橋に通常用いられている架橋剤、例えばN-ヒドロキシスクシンイミド（NHS）、ジスクシンイミジルスベレート（DSS）、ビス（スルホスクシンイミジル）スベレート（BS3）、ジチオビス（スクシンイミジルプロピオネート）（DSP）、ジチオビス（スルホスクシンイミジルプロピオネート）（DTSSP）、エチレングリコールビス（スクシンイミジルスクシネート）（EGS）、エチレングリコールビス（スルホスクシンイミジルスクシネート）（スルホ-EGS）、ジスクシンイミジル酒石酸塩（DST）、ジスルホスクシンイミジル酒石酸塩（スルホ-DST）、ビス[2-（スクシンイミドオキシカルボニルオキシ）エチル]スルホン（BSOCOES）、ビス[2-（スルホスクシンイミドオキシカルボニルオキシ）エチル]スルホン（スルホ-BSOCOES）などであり、これらの架橋剤は市販されている。

[0181] また本発明は、本発明のリガンド結合分子および医薬的に許容される担体を含む医薬組成物（薬剤）、本発明のリガンド結合分子とリガンドと医薬的

に許容される担体を含む医薬組成物（薬剤）、本発明のリガンド結合分子とリガンドが融合されている融合タンパク質と医薬的に許容される担体を含む医薬組成物（薬剤）にも関する。

[0182] 本明細書で用いられる「治療」（および、その文法上の派生語、例えば「治療する」、「治療すること」など）は、治療される個体の自然経過を改変することを企図した臨床的介入を意味し、予防のためにも、臨床的病態の経過の間にも実施され得る。治療の望ましい効果は、それだけに限定されるものではないが、疾患の発生または再発の防止、症状の軽減、疾患による任意の直接的または間接的な病理的影響の減弱、転移の防止、疾患の進行速度の低減、疾患状態の回復または緩和、および寛解または改善された予後を含む。いくつかの実施態様において、本発明のリガンド結合分子は、リガンドの生物活性を制御することができ、疾患の発症を遅らせる、または疾患の進行を遅くするために用いられる。

[0183] 本発明において医薬組成物とは、通常、疾患の治療もしくは予防、あるいは検査・診断のための薬剤をいう。

また、本発明において、「リガンド結合分子を含む医薬組成物」との用語は、「リガンド結合分子を治療対象に投与することを含む疾患の治療方法」と言い換えることも可能であるし、「疾患を治療するための医薬の製造におけるリガンド結合分子の使用」と言い換えることも可能である。「リガンド結合分子を含む医薬組成物」との用語を、「疾患を治療するためのリガンド結合分子の使用」と言い換えることも可能である。

「リガンド結合分子とリガンドを含む医薬組成物」との用語は、「リガンド結合分子とリガンドを治療対象に投与することを含む疾患の治療方法」と言い換えることも可能であるし、「疾患を治療するための医薬の製造におけるリガンド結合分子とリガンドの使用」と言い換えることも可能である。「リガンド結合分子とリガンドを含む医薬組成物」との用語を、「疾患を治療するためのリガンド結合分子とリガンドの使用」と言い換えることも可能である。

「融合タンパク質を含む医薬組成物」との用語は、「融合タンパク質を治療対象に投与することを含む疾患の治療方法」と言い換えることも可能であるし、「疾患を治療するための医薬の製造における融合タンパク質の使用」と言い換えることも可能である。「融合タンパク質を含む医薬組成物」との用語を、「疾患を治療するための融合タンパク質の使用」と言い換えることも可能である。

[0184] 本発明のいくつかの実施態様において、リガンド結合分子を含む組成物を個体に投与することが出来る。個体に投与されたリガンド結合分子は、個体内、例えば、血中、組織中等で、個体内に元々存在しているリガンドと結合し、リガンドと結合したまま更に生体内で運搬される。標的組織に運搬されたリガンド結合分子は、標的組織にて切断され、リガンドに対する結合が減弱し、標的組織にて結合しているリガンドをリリースすることが出来る。リリースされたリガンドは、標的組織にて生物活性を発揮し、標的組織に起因する疾患を治療することが出来る。リガンド結合分子がリガンドと結合している時リガンドの生物活性を抑制し、かつリガンド結合分子が標的組織特異的に切断される実施態様においては、運搬時のリガンドの生物活性を発揮させることなく、標的組織にて切断されて初めてリガンドの生物活性を発揮させ、疾患を治療することが出来、全身副作用を抑えることが出来る。

[0185] 本発明のいくつかの実施態様において、リガンド結合分子を含む組成物と、リガンドを含む組成物を別々にまたは同時に個体に投与することが出来る。また、リガンド結合分子とリガンドの両方を含む組成物を個体に投与することもできる。リガンド結合分子とリガンドの両方を含む組成物を個体に投与する場合、当該組成物中のリガンド結合分子とリガンドは複合体を形成していても良い。リガンド結合分子とリガンドの両方を個体に投与した場合、リガンド結合分子は、個体に投与されたリガンドと結合し、リガンドを結合したまま生体内で運搬される。標的組織に運搬されたリガンド結合分子は、標的組織にて切断され、リガンドに対する結合が減弱し、標的組織にて結合しているリガンドをリリースすることが出来る。リリースされたリガンドは、標

的組織にて生物活性を発揮し、標的組織に起因する疾患を治療することが出来る。リガンド結合分子がリガンドと結合している時リガンドの生物活性を抑制し、かつリガンド結合分子が標的組織特異的に切断される実施態様においては、運搬時のリガンドの生物活性を発揮させることなく、標的組織にて切断されて初めてリガンドの生物活性を発揮させ、疾患を治療することが出来る。全身副作用を抑えることが出来る。個体に投与されたりリガンド結合分子は、個体に投与されたりリガンド以外に、個体内に元々存在するリガンドとも結合することも可能であり、個体内に元々存在するリガンドまたは個体に投与されたりリガンドを結合したまま生体内で運搬することが出来る。

すなわち本発明は、リガンド結合性分子とリガンドを接触させる工程と、リガンド結合性分子とリガンドからなる複合体を回収する工程を含む、リガンド複合体の製造方法も提供する。本発明の複合体は、例えば薬学的に許容される担体と配合することによって、医薬組成物とすることができる。

[0186] 本発明のいくつかの実施態様において、リガンド結合分子とリガンドを融合した融合タンパク質を個体に投与することが出来る。当該いくつかの実施態様において、融合タンパク質中のリガンド結合分子とリガンドはリンカーを介してまたは介さずに融合タンパク質を形成しているが、リガンド結合分子部分とリガンド部分の間の非共有結合は依然として存在する。リガンド結合分子とリガンドを融合した融合タンパク質を個体に投与した場合、融合タンパク質は生体内で運搬され、標的組織で融合タンパク質中のリガンド結合分子部分が切断されることにより、リガンド結合分子部分のリガンドに対する非共有結合が減弱され、リガンド及びリガンド結合分子の一部が融合タンパク質からリリースされる。リリースされたりリガンド及びリガンド結合分子の一部は、標的組織にてリガンドの生物活性を発揮し、標的組織に起因する疾患を治療することが出来る。リガンド結合分子がリガンドと結合している時リガンドの生物活性を抑制し、かつリガンド結合分子が標的組織特異的に切断される実施態様においては、運搬時の融合タンパク質中のリガンドの生物活性を発揮させることなく、標的組織にて切断されて初めてリガンドの生

物活性を発揮させ、疾患を治療することが出来、全身副作用を抑えることが出来る。

したがって、本発明に基づいて、次の工程を含む、リガンドの投与を必要とする対象にリガンドを投与する方法が提供される；

[1] リガンドと本発明のリガンド結合体を接触させて、両者からなる結合生成物を得る工程；および

[2] [1]の結合生成物を、リガンドの投与を必要とする対象に投与する工程。

[0187] 本発明の医薬組成物は、当業者に公知の方法を用いて製剤化され得る。例えば、水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、又は懸濁液剤の注射剤の形で非経口的に使用され得る。例えば、薬理学上許容される担体もしくは媒体、具体的には、滅菌水や生理食塩水、植物油、乳化剤、懸濁剤、界面活性剤、安定剤、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、結合剤等と適宜組み合わせて、一般に認められた製薬実施に要求される単位用量形態で混和することによって製剤化され得る。これら製剤における有効成分量は、指示された範囲の適当な容量が得られるように設定される。

[0188] 注射のための無菌組成物は注射用蒸留水のようなベヒクルを用いて通常の製剤実施にしたがって処方され得る。注射用の水溶液としては、例えば生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬（例えばD-ソルビトール、D-マンノース、D-マンニトール、塩化ナトリウム）を含む等張液が挙げられる。適切な溶解補助剤、例えばアルコール（エタノール等）、ポリアルコール（プロピレングリコール、ポリエチレングリコール等）、非イオン性界面活性剤（ポリソルベート80（TM）、HCO-50等）が併用され得る。

[0189] 油性液としてはゴマ油、大豆油が挙げられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル及び/またはベンジルアルコールも併用され得る。また、緩衝剤（例えば、リン酸塩緩衝液及び酢酸ナトリウム緩衝液）、無痛化剤（例えば、塩酸プロカイン）、安定剤（例えば、ベンジルアルコール及びフェノール）、酸化防止剤と配合され得る。調製された注射液は通常、適切なアンプルに充填される。

- [0190] 本発明の医薬組成物は、好ましくは非経口投与により投与される。例えば、注射剤型、経鼻投与剤型、経肺投与剤型、経皮投与型の組成物が投与される。例えば、静脈内注射、筋肉内注射、腹腔内注射、皮下注射などにより全身または局部的に投与され得る。
- [0191] 投与方法は、患者の年齢、症状により適宜選択され得る。リガンド結合分子を含有する医薬組成物の投与量は、例えば、一回につき体重1 kgあたり0.0001 mgから1000 mgの範囲に設定され得る。または、例えば、患者あたり0.001~100000 mgの投与量が設定され得るが、本発明はこれらの数値に必ずしも制限されるものではない。投与量及び投与方法は、患者の体重、年齢、症状などにより変動するが、当業者であればそれらの条件を考慮し適当な投与量及び投与方法を設定することが可能である。
- [0192] 本発明は、切断された状態でリガンドへの結合が減弱されるリガンド結合分子、または当該リガンド結合分子とリガンドを融合させた融合タンパク質を製造する方法にも関する。本発明の一実施態様において、リガンドに結合可能な分子中に、プロテアーゼ切断配列を導入することを含みリガンド結合分子または融合タンパク質の製造方法が提供される。
- [0193] リガンドに結合可能な分子中にプロテアーゼ切断配列を導入する方法の例として、リガンドに結合可能なポリペプチドのアミノ酸配列中にプロテアーゼ切断配列を挿入する方法や、リガンドに結合可能なポリペプチドのアミノ酸配列の一部をプロテアーゼ切断配列に置き換える方法等が挙げられる。
- [0194] アミノ酸配列Aをアミノ酸配列B中に「挿入」することは、アミノ酸配列Bを欠損させず二つの部分に分け、二つの部分の間をアミノ酸配列Aで繋げること（即ち、「アミノ酸配列B前半-アミノ酸配列A-アミノ酸配列B後半」のようなアミノ酸配列を新たに作ること）を指す。アミノ酸配列Aをアミノ酸配列B中に「導入」することは、アミノ酸配列Bを二つの部分に分け、二つの部分の間をアミノ酸配列Aで繋げることを指し、前記アミノ酸配列Aをアミノ酸配列B中に「挿入」すること以外に、アミノ酸配列Aと隣接するアミノ酸配列Bのアミノ酸残基を始めとする一つまたは複数のアミノ酸残基

を欠損させてからアミノ酸配列Aで二つの部分を繋げる（即ち、アミノ酸配列Bの一部をアミノ酸配列Aに置き換えること）も可能である。

[0195] リガンドに結合可能な分子を取得する方法の例として、リガンドに結合する能力を有するリガンド結合領域を取得する方法が挙げられる。リガンド結合領域は、例えば、公知の抗体の作製方法を用いた方法により得られる。

該作製方法により得られた抗体は、そのままりガンド結合領域に用いてもよく、得られた抗体のうちFv領域のみを用いてもよく、該Fv領域が一本鎖（「sc」とも称する。）で抗原を認識し得る場合には、該一本鎖のみを用いてもよい。また、Fv領域を含むFab領域を用いてもよい。

[0196] 具体的な抗体の作製方法は当業者によく知られているが、例えばモノクローナル抗体の場合、ハイブリドーマ法（Kohler and Milstein, *Nature* 256:495 (1975)）、組換え方法（米国特許第4,816,567号）により製造してもよい。また、ファージ抗体ライブラリーから単離してもよい（Clackson et al., *Nature* 352:624-628 (1991) ; Marks et al., *J.Mol.Biol.* 222:581-597 (1991)）。また、単一のB細胞クローンから単離してもよい（N. *Biotechnol.* 28 (5): 253-457 (2011)）。

[0197] ヒト化抗体は、再構成（reshaped）ヒト抗体とも称される。具体的には、ヒト以外の動物、例えばマウス抗体のCDRをヒト抗体に移植したヒト化抗体などが公知である。ヒト化抗体を得るための一般的な遺伝子組換え手法も知られている。具体的には、マウスの抗体のCDRをヒトのFRに移植するための方法として、例えばOverlap Extension PCRが公知である。

[0198] 3つのCDRと4つのFRが連結された抗体可変領域をコードするDNAとヒト抗体定常領域をコードするDNAとをインフレームで融合するように発現ベクター中に挿入することによって、ヒト化抗体発現用ベクターが作成できる。該組込みベクターを宿主に導入して組換え細胞を樹立した後に、該組換え細胞を培養し、該ヒト化抗体をコードするDNAを発現させることによって、該ヒト化抗体が該培養細胞の培養物中に産生される（欧州特許出願公開第239400号明細書、国際公開第1996/002576号参照）。

- [0199] 必要に応じ、再構成ヒト抗体のCDRが適切な抗原結合部位を形成するようにFRのアミノ酸残基を置換することもできる。例えば、マウスCDRのヒトFRへの移植に用いたPCR法を応用して、FRにアミノ酸配列の変異を導入することができる。
- [0200] ヒト抗体遺伝子の全てのレパートリーを有するトランスジェニック動物（国際公開第1993/012227号、国際公開第1992/003918号、国際公開第1994/002602号、国際公開第1994/025585号、国際公開第1996/034096号、国際公開第1996/033735号参照）を免疫動物とし、DNA免疫により所望のヒト抗体が取得される。
- [0201] さらに、ヒト抗体ライブラリーを用いて、パニングによりヒト抗体を取得する技術も知られている。例えば、ヒト抗体のFv領域が一本鎖抗体（「scFv」とも称する。）としてファージディスプレイ法によりファージの表面に発現される。抗原に結合するscFvを発現するファージが選択され得る。選択されたファージの遺伝子を解析することにより、抗原に結合するヒト抗体のFv領域をコードするDNA配列が決定できる。抗原に結合するscFvのDNA配列を決定した後、当該Fv領域配列を所望のヒト抗体C領域の配列とインフレームで融合させた後に適当な発現ベクターに挿入することによって発現ベクターが作製され得る。当該発現ベクターを上記に挙げたような好適な発現細胞中に導入し、該ヒト抗体をコードする遺伝子を発現させることにより当該ヒト抗体が取得される。これらの方法は既に公知である（国際公開第1992/001047号、国際公開第1992/020791号、国際公開第1993/006213号、国際公開第1993/011236号、国際公開第1993/019172号、国際公開第1995/001438号、国際公開第1995/015388号参照）。
- [0202] リガンドに結合可能な分子にプロテアーゼ切断配列を導入した分子は、本発明のリガンド結合分子になる。リガンド結合分子に対して、任意的に、当該プロテアーゼ切断配列に対応するプロテアーゼの処理によりリガンド結合

分子が切断されるかを確認することが出来る。例えば、リガンドに結合可能な分子にプロテアーゼ切断配列を導入した分子をプロテアーゼと接触させ、プロテアーゼ処理後産物の分子量をSDS-PAGE等の電気泳動法で確認することにより、プロテアーゼ切断配列が切断されたか否かを確認することができる。

[0203] またSDS-PAGE等の電気泳動法により分離したプロテアーゼ処理後の切断断片量を定量することにより、プロテアーゼ活性の評価やプロテアーゼ切断配列を導入した分子の切断率を評価することが可能である。プロテアーゼ切断配列を導入した分子の切断率を評価する方法の非限定な一態様として以下の方法が挙げられる。例えばプロテアーゼ切断配列を導入した抗体改変体をリコンビナントヒトu-Plasminogen Activator/Urokinase (human uPA, huPA) (R&D Systems; 1310-SE-010)もしくはリコンビナントヒトMatriptase/ST14 Catalytic Domain (human MT-SP1, hMT-SP1) (R&D Systems; 3946-SE-010)を用いて切断率を評価する場合、huPA 40 nMもしくはhMT-SP1 3 nM、抗体改変体 100 μ g/mL、PBS、37℃の条件下で1時間反応させたのちに、キャピラリー電気泳動イムノアッセイに供する。キャピラリー電気泳動イムノアッセイにはWes (Protein Simple) が使用可能であるが、これに限定されずキャピラリー電気泳動イムノアッセイに代わる方法としてSDS-PAGE等により分離後にWestern Blotting法で検出してもよいし、これらの方法に限定されるものではない。切断前後の軽鎖の検出には抗ヒトlambda鎖HRP標識抗体 (abcam; ab9007) が使用可能であるが、切断断片を検出できる抗体はいずれの抗体も使用可能である。プロテアーゼ処理後に得られた各ピークの面積をWes専用のソフトウェア (Compass for SW; Protein Simple) を用いて出力することで、抗体改変体の切断率 (%) を (切断軽鎖ピーク面積) *100 / (切断軽鎖ピーク面積 + 未切断軽鎖ピーク面積) の式により算出できる。切断率の算出は、プロテアーゼ処理前後のタンパク質断片が検出できれば可能であり、プロテアーゼ切断配列を導入した分子は抗体改変体に限らず様々なタンパク質において切断率を算出することが可能である。

- [0204] プロテアーゼ切断配列を導入した分子を動物に投与した後、血液サンプル中の投与分子を検出することにより、生体内における切断率の算出が可能である。例えばプロテアーゼ切断配列を導入した抗体改変体をマウスに投与後、血液サンプルから血漿を回収しDynabeads Protein A (Thermo; 10001D)を用いて当業者公知の方法で抗体を精製し、キャピラリー電気泳動イムノアッセイに供することで抗体改変体のプロテアーゼ切断率の評価が可能である。キャピラリー電気泳動イムノアッセイにはWes (Protein Simple) が使用可能であるが、これに限定されずキャピラリー電気泳動イムノアッセイに代わる方法としてSDS-PAGE等により分離後にWestern Blotting法で検出してもよいし、これらの方法に限定されるものではない。マウスから回収された抗体改変体の軽鎖の検出には抗ヒトlambda鎖HRP標識抗体 (abcam; ab9007) が使用可能であるが、切断断片を検出できる抗体はいずれの抗体も使用可能である。キャピラリー電気泳動イムノアッセイにより得られた各ピークの面積をWes専用のソフトウェア (Compass for SW; Protein Simple) で出力し、軽鎖残存比として (軽鎖ピーク面積) / (重鎖ピーク面積) を計算することで、マウス体内で切断されずに残った全長軽鎖の割合の算出が可能である。生体内における切断効率の算出には、生体から回収されたタンパク質断片が検出できれば可能であり、プロテアーゼ切断配列を導入した分子は抗体改変体に限らず様々なタンパク質において切断率を算出することが可能である。上述した方法を用いて切断率を算出することにより、例えば異なる切断配列を導入した抗体改変体の生体内における切断率を比較することが可能であるし、また同一の抗体改変体の切断率を正常マウスモデルや腫瘍移植マウスモデルなどの異なる動物モデル間で比較することも可能である。
- [0205] また、本発明は、切断された状態でリガンドへの結合が減弱されるリガンド結合分子をエンコードするポリヌクレオチド、または当該リガンド結合分子とリガンドを融合させた融合タンパク質をエンコードするポリヌクレオチドにも関する。
- [0206] 本発明におけるポリヌクレオチドは、通常、適当なベクターへ担持 (挿入

）され、宿主細胞へ導入される。該ベクターとしては、挿入した核酸を安定に保持するものであれば特に制限されず、例えば宿主に大腸菌を用いるのであれば、クローニング用ベクターとしてはpBluescriptベクター(Stratagene社製)などが好ましいが、市販の種々のベクターを利用することができる。本発明のリガンド結合分子または融合タンパク質を生産する目的においてベクターを用いる場合には、特に発現ベクターが有用である。発現ベクターとしては、試験管内、大腸菌内、培養細胞内、生物個体内でリガンド結合分子を発現するベクターであれば特に制限されないが、例えば、試験管内発現であればpBESTベクター(プロメガ社製)、大腸菌であればpETベクター(Invitrogen社製)、培養細胞であればpME18S-FL3ベクター(GenBank Accession No. AB009864)、生物個体であればpME18Sベクター(Mol Cell Biol. 8:466-472(1988))などが好ましい。ベクターへの本発明のDNAの挿入は、常法により、例えば、制限酵素サイトを用いたりガーゼ反応により行うことができる(Current protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley & Sons. Section 11.4-11.11)。

[0207] 上記宿主細胞としては特に制限はなく、目的に応じて種々の宿主細胞が用いられる。リガンド結合分子または融合タンパク質を発現させるための細胞としては、例えば、細菌細胞(例:ストレプトコッカス、スタフィロコッカス、大腸菌、ストレプトミセス、枯草菌)、真菌細胞(例:酵母、アスペルギルス)、昆虫細胞(例:ドロソフィラS2、スポドプテラSF9)、動物細胞(例:CHO、COS、HeLa、C127、3T3、BHK、HEK293、Bowesメラノーマ細胞)および植物細胞を例示することができる。宿主細胞へのベクター導入は、例えば、リン酸カルシウム沈殿法、電気パルス穿孔法(Current protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley & Sons. Section 9.1-9.9)、リポフェクタミン法(GIBCO-BRL社製)、マイクロインジェクション法などの公知の方法で行うことが可能である。

[0208] 宿主細胞において発現したリガンド結合分子または融合タンパク質を小胞体の内腔に、細胞周辺腔に、または細胞外の環境に分泌させるために、適当

な分泌シグナルを目的のリガンド結合分子または融合タンパク質に組み込むことができる。これらのシグナルは目的のリガンド結合分子または融合タンパク質に対して内因性であっても、異種シグナルであってもよい。

[0209] 上記製造方法におけるリガンド結合分子または融合タンパク質の回収は、本発明のリガンド結合分子または融合タンパク質が培地に分泌される場合は、培地を回収する。本発明のリガンド結合分子または融合タンパク質が細胞内に産生される場合は、その細胞をまず溶解し、その後にリガンド結合分子または融合タンパク質を回収する。

[0210] 組換え細胞培養物から本発明のリガンド結合分子または融合タンパク質を回収し精製するには、硫酸アンモニウムまたはエタノール沈殿、酸抽出、アニオンまたはカチオン交換クロマトグラフィー、ホスホセルロースクロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラフィー、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィーおよびレクチンクロマトグラフィーを含めた公知の方法を用いることができる。

[0211] 本明細書に記載の1又は複数の実施態様を任意に組み合わせたものも、当業者の技術常識に基づいて技術的に矛盾しない限り、本発明に含まれることが当業者には当然に理解される。また、本明細書に記載の1又は複数の実施態様を任意に組み合わせたものを本発明から除外した発明も、当業者の技術常識に基づいて技術的に矛盾しない限り、本明細書において意図され、記載された発明とみなされるべきものである。

実施例

[0212] 以下は、本発明の方法および組成物の実施例である。上述の一般的な記載に照らし、種々の他の態様が実施され得ることが、理解されるであろう。

[0213] 実施例1 既報のイムノサイトカインおよびプロテアーゼ活性化サイトカインの課題

癌組織に発現する抗原を標的としたイムノサイトカインは一般にターゲティングさせるIgGやscFvの末端に目的のサイトカインを融合させることで作製されてきた (Expert Opin Investig Drugs. 2009 Jul;18(7):991-1000.、C

urr Opin Immunol. 2016 Jun;40:96-102.)。IL-2やIL-12やTNFをはじめとするサイトカインは毒性が強いため、これらのサイトカインを癌局所で働かせるために抗体によって癌局所にデリバリーすることで副作用を軽減しつつ、効果を強めることが期待されているが（非特許文献4、5、6）、これらはいずれも全身投与では臨床で十分な効果を示さない、therapeutic windowが狭い、毒性が強く全身投与ができない、などの課題がある。この大きな原因として、イムノサイトカインであっても全身投与したサイトカインは全身に暴露されてしまうため、全身で作用して毒性を発揮しうる、あるいは毒性を回避するために極めて低い用量でしか投与できない、ことが挙げられる。また、癌抗原に結合するイムノサイトカインは、腫瘍中で癌細胞に内在化されて消失してしまうため、場合によっては腫瘍局所にサイトカインを暴露することが困難となる。癌抗原に結合する抗体にIL2を融合したイムノサイトカインと癌抗原に結合しない抗体にIL-2を融合したイムノサイトカインで抗腫瘍効果は変わらなかったという報告もある（非特許文献7）。

[0214] イムノサイトカインの大きな課題である全身性の作用を低減させる方法として、サイトカインとサイトカインレセプターの間を癌で高発現するプロテアーゼによって切断されるリンカーで結合させた分子が報告されている。サイトカインはリンカーで結合されたサイトカインレセプターによって阻害されているが、リンカーがプロテアーゼによって切断されるとサイトカインレセプターが遊離し、サイトカインが活性体になる。例としてTNF α とTNFRをuPAで切断されるリンカーで結合させた分子（非特許文献8）、IL-2とIL-2RをMMP-2で切断されるリンカーで結合させた分子（非特許文献9）などが報告されている。しかしながら、これらの分子はリンカーの切断前であってもサイトカインは生物活性を有しており、リンカーの切断によって活性が約10倍程度しか向上しない。

この原因として、サイトカインとサイトカインレセプターの親和性が強いいため、プロテアーゼ切断前でもサイトカインがある程度の活性を有してしまうこと、あるいは、プロテアーゼでリンカーが切断された後でも、サイ

トカインレセプターはサイトカインに結合することができるため、サイトカインの生物活性を阻害してしまうことの2点が挙げられる。

- [0215] IL-2Rに代わり抗IL-2 scFvをMMP-2で切断されるリンカーを介してIL-2と結合させた分子（非特許文献9）が報告されている。このIL-2と抗IL-2 scFvとをプロテアーゼ切断リンカーを介して結合させた分子も、サイトカインとサイトカインレセプターを結合させた分子と同じように、リンカー切断時にIL-2を遊離させることを考慮すれば、IL-2親和性が強くない抗IL-2 scFvを使用することは当然である。

また、これらの報告されているプロテアーゼ活性化サイトカインは上述のIgG-IL-2 fusionと異なりFc領域を有さないため半減期が短いと予想され、高い暴露を維持することが難しい。プロテアーゼ切断により活性化される前後のサイトカインの薬物動態に大きな差が無く（共に半減期が短い）、therapeutic windowを広げることが難しい。

[0216] 実施例2 ケモカインの癌免疫療法への応用における課題

ケモカイン（Nature Immunology 9, 949 - 952 (2008)）は、Gタンパク質共役受容体を介してその作用を発現する塩基性タンパク質であり、サイトカインの一群である。受容体を発現する特定の白血球に作用し、その物質の濃度勾配の方向に白血球を遊走させる活性（走化性）を持つ（Nat Cell Biol. 2016 Jan;18(1):43-53.）。ケモカインは炎症部で大量に産生され、血管内から炎症組織内への白血球の遊走をもたらすことが知られている。

ケモカインを制御することで、白血球の遊走をコントロールできることから、癌免疫療法に活用することが可能であると考えられる。固形癌の局所にT細胞や抗原提示細胞やM1マクロファージなどを遊走させることができれば、抗腫瘍効果を引き起こすことが可能であると考えられる。サイトカインは全身投与によっても作用を発揮することができるが、ケモカインは濃度勾配によって濃度の高い組織に細胞を遊走させるため、ケモカインを全身投与しても期待する効果は得られない。そのため、ケモカインの全身投与による癌免疫療法（ケモカイン療法）は現実的ではないと考えられる。

[0217] 実施例3 プロテアーゼ切断配列を導入した標的組織特異的リガンドをリリースできるリガンド結合分子のコンセプト

実施例1、2に示したように既報のサイトカイン・ケモカイン療法には以下の課題がある。

1. イムノサイトカインにおいては、抗体によりサイトカインを固形癌にターゲティングしたとしても、サイトカインは全身で作用するため副作用が生じる、あるいは、副作用を回避するため低用量でしか投与できないため、腫瘍中に高い暴露をすることができない。

2. サイトカインレセプター（あるいは抗体）とサイトカインをプロテアーゼで切断出来るリンカーで繋ぐプロテアーゼによって活性化されるサイトカインにおいては、サイトカイン活性の中和が不十分でありプロテアーゼ切断前でもサイトカインがある程度の活性を有してしまう。

3. プロテアーゼによって活性化されるサイトカインにおいては、プロテアーゼでリンカーが切断された後でも、サイトカインレセプター（あるいは抗体）がサイトカインに結合することができるため、サイトカインの生物活性を阻害してしまう。

4. プロテアーゼによって活性化されるサイトカインにおいては、不活性型サイトカインの半減期が短く、血中滞留時間が短いため、必要とする投与量が多い。

[0218] この課題を解決するためには以下の条件を満たすことが重要であると考えた。

1. 全身においては、サイトカインあるいはケモカインなどのリガンドがリガンド結合分子によって十分に阻害されている（生物活性が最小化されている）

2. プロテアーゼによる切断によりリガンドの生物活性が回復する（活性型リガンドとなる）

3. プロテアーゼによる切断によりリガンド結合分子がリガンド結合活性を失う

4. プロテアーゼによる切断を受ける前のリガンド結合分子に結合したリガンドと比較して、プロテアーゼによる切断を受けて活性型となったリガンドが短い半減期を有する

[0219] 上記条件を満たす医薬組成物として切断サイトが切断されることによってリガンドへの結合が減弱される分子を考案した。まず、リガンドに対する結合分子を取得し、次に結合分子中に切断サイトを挿入することでリガンド結合分子を作製することができる。

[0220] 実施例4 プロテアーゼ切断配列を導入した抗リガンド抗体の例

図1、2、3ではリガンドへ結合する分子として抗体を用いた分子の例を示している。これらの例では、まずリガンドに対する中和抗体を取得する。続いて、抗リガンド中和抗体の可変領域（VHあるいはVL）と定常領域（CH1あるいはCL）の境界付近にプロテアーゼ切断配列を導入する。当該抗リガンド抗体がプロテアーゼ切断配列導入後においてもリガンド結合活性が保持されていることを確認する。リガンドが抗リガンド中和抗体に結合した状態で、プロテアーゼで切断することにより、リガンドが解離することを確認する。解離したリガンドが生物活性を発揮することを確認する。

図1において、リガンドのC末端と抗リガンド抗体のVHのN末端がリンカーを介して結合されており、VHとCH1の境界付近にプロテアーゼ切断配列が導入されている。抗リガンド抗体のリガンドに対する親和性が十分に強ければ、リガンドの生物活性は十分に阻害されている。このリガンドー抗リガンド抗体融合体を全身投与してもリガンドは中和されているためその生物活性を発揮することは無く、またリガンドー抗リガンド抗体融合体はFc領域を有するため長い半減期を有する。全身投与されたリガンドー抗リガンド抗体融合体は、腫瘍組織で高発現するプロテアーゼによってVHとCH1の境界付近のプロテアーゼ切断配列が切断されると、リガンドーリンカーー抗リガンド抗体のVH分子が遊離する。VHあるいはVL単独ではリガンドに結合することができないため（リガンドへ結合するためにはVHとVL両方が必要）、リガンドの中和は解除され、腫瘍組織において生物学的作用を発揮することが可能である。ま

た、このリリースされたリガンドーリンカー-抗リガンド抗体のVH分子は、Fc領域を有さず、分子量が小さいため、非常に短い半減期を有し、速やかに全身から消失するため、リガンドによる全身性の副作用を最小化することが可能である。

図2においては、リガンドと抗リガンド抗体は図1のようにリンカーで結合されておらず、VHとCH1の境界付近にプロテアーゼ切断配列が導入された抗リガンド抗体とリガンドが混合して投与される。抗リガンド抗体のリガンドに対する親和性が十分に強く、リガンド濃度に対して抗リガンド抗体が十分あれば、リガンドの生物活性は十分に阻害されている。このリガンドー抗リガンド抗体複合体を全身投与してもリガンドは中和されているためその生物活性を発揮することは無く、またリガンドー抗リガンド抗体複合体はFc領域を有するため長い半減期を有する。全身投与されたリガンド-抗リガンド抗体複合体は、腫瘍組織で高発現するプロテアーゼによってVHとCH1の境界付近のプロテアーゼ切断配列が切断されると、抗リガンド抗体のVH分子が遊離する。VHあるいはVL単独ではリガンドに結合することができないため（リガンドへ結合するためにはVHとVL両方が必要）、リガンドの中和は解除され、腫瘍組織において生物学的作用を発揮することが可能である。また、このリリースされたリガンド分子は、Fc領域を有さず、分子量が小さいため、非常に短い半減期を有し、速やかに全身から消失するため、リガンドによる全身性の副作用を最小化することが可能である。

図3において、VHとCH1の境界付近にプロテアーゼ切断配列が導入された抗リガンド抗体が全身投与される。投与された抗体は体内に元々存在するリガンドに結合し、以降は図2の上記記載と同様である。

このようにVHとCH1の境界付近にプロテアーゼ切断配列が導入された抗リガンド抗体を用いることで、リガンドをプロテアーゼが発現する組織で選択的にリリースし、その生物学的作用を発揮させることが可能となる。リガンドがサイトカインであれば、サイトカインをプロテアーゼが発現する組織で選択的に作用させることができる。リガンドがケモカインであれば、プロテア

ーゼが発現する組織でケモカインが高濃度で存在し、末梢血でケモカイン濃度が低くなるため、ケモカイン受容体を発現する細胞をプロテアーゼが発現する組織に遊走させることができる。

[0221] 実施例 5 CXCL10リリース抗体の作製と評価

5-1. 抗CXCL10中和抗体へのプロテアーゼ切断配列の導入

CXCL10はエフェクターT細胞に対する遊走作用を持つケモカインの一つである。ヒトCXCL10に対する中和抗体であるMabCXCL10（重鎖：EEIVH（配列番号：1）、軽鎖：EEIVL（配列番号：2））の発現ベクターを当業者公知の方法で調製し、FreeStyle 293(Life Technology)を用いて当業者公知の方法で発現、精製を行った。MabCXCL10に含まれるCDR配列は以下である：H-CDR1（NNGMH、配列番号：380）、H-CDR2（VIWFDGMNKFYVDSVKG、配列番号：381）、H-CDR3（EGDGSGIYIYYGMDV、配列番号：382）、L-CDR1（RASQSVSSSYLA、配列番号：383）、L-CDR2（GASSRAT、配列番号：384）、L-CDR3（QQYGSSPIFT、配列番号：385）。

MabCXCL10とヒトCXCL10（266-IP-010/CF，R&D Systems）の相互作用をBiacoreを用いて評価した。具体的には、CM3センサーチップ（BR100536，GE Healthcare）にR PROTEIN A（SURE）（28-4018-60，GE Healthcare）をNHS-EDCを用いたアミンカップリング法によって固相化し、ランニングバッファーとして20mM ACES，0.05% Tween20，200mM NaCl，pH 7.4を用い、抗体をキャプチャーした状態で1.563 nMのヒトCXCL10をアナライトとして流し、37℃における抗体の抗原に対する結合を評価した。ランニングバッファーのみをアナライトとしたブランクとの差をとった継時的な結合量を表すセンサーグラムを図4に示す。アナライトを流し始める時間を横軸の開始点としている。アナライトを流し始めた時間におけるレスポンスを0としたときの各時間におけるレスポンス（結合量）が縦軸である。図4のセンサーグラムに示すように、MabCXCL10のヒトCXCL10に対する結合が確認された。

MabCXCL10の重鎖あるいは軽鎖の可変領域と定常領域の境界付近にプロテアーゼ切断配列を挿入する検討を行った。癌特異的に発現しているウロキナー

ゼ（uPA）およびマトリプターゼ（MT-SP1）で切断されることが報告されている配列であるペプチド配列A（配列番号：3）を重鎖または軽鎖の可変領域と定常領域の境界付近の7か所に挿入した図5に示す重鎖および軽鎖を設計した。切断配列挿入に伴う糖鎖付加が起こらないような改変体も設計した。重鎖改変体であるEEIVHA（配列番号：4）、EEIVHB（配列番号：5）、EEIVHC（配列番号：6）、EEIVHD（配列番号：7）、EEIVHE（配列番号：8）、EEIVHF（配列番号：9）、EEIVHG（配列番号：10）、EEIVHBG（配列番号：11）、EEIVHCG（配列番号：12）、EEIVHDG（配列番号：13）、EEIVHEG（配列番号：14）、および軽鎖改変体であるEEIVLA（配列番号：15）、EEIVLB（配列番号：16）、EEIVLC（配列番号：17）、EEIVLD（配列番号：18）、EEIVLE（配列番号：19）、EEIVLF（配列番号：20）、EEIVLG（配列番号：21）、EEIVLEG（配列番号：22）をコードする発現ベクターを当業者公知の方法で作製した。

これらの重鎖改変体と天然型軽鎖を組み合わせ、あるいは、天然型重鎖と軽鎖改変体を組み合わせ、重鎖の可変領域と定常領域の境界付近にプロテアーゼ切断配列を挿入した以下のIgG1抗体：EEIVHA/EEIVL（重鎖配列番号：4、軽鎖配列番号：2）、EEIVHB/EEIVL（重鎖配列番号：5、軽鎖配列番号：2）、EEIVHC/EEIVL（重鎖配列番号：6、軽鎖配列番号：2）、EEIVHD/EEIVL（重鎖配列番号：7、軽鎖配列番号：2）、EEIVHE/EEIVL（重鎖配列番号：8、軽鎖配列番号：2）、EEIVHF/EEIVL（重鎖配列番号：9、軽鎖配列番号：2）、EEIVHG/EEIVL（重鎖配列番号：10、軽鎖配列番号：2）、EEIVHBG/EEIVL（重鎖配列番号：11、軽鎖配列番号：2）、EEIVHCG/EEIVL（重鎖配列番号：12、軽鎖配列番号：2）、EEIVHDG/EEIVL（重鎖配列番号：13、軽鎖配列番号：2）、EEIVHEG/EEIVL（重鎖配列番号：14、軽鎖配列番号：2）、および、軽鎖の可変領域と定常領域の境界付近にプロテアーゼ切断配列を挿入した以下のIgG1抗体：EEIVH/EEIVLA（重鎖配列番号：1、軽鎖配列番号：15）、EEIVH/EEIVLB（重鎖配列番号：1、軽鎖配列番号：16）、EEIVH/EEIVLC（重鎖配列番号：1、軽鎖配列番号：17）、EEIVH/EEIVL

D（重鎖配列番号：1、軽鎖配列番号：18）、EEIVH/EEIVLE（重鎖配列番号：1、軽鎖配列番号：19）、EEIVH/EEIVLF（重鎖配列番号：1、軽鎖配列番号：20）、EEIVH/EEIVLG（重鎖配列番号：1、軽鎖配列番号：21）、EEIVH/EEIVLEG（重鎖配列番号：1、軽鎖配列番号：22）を当業者公知の方法でFreeStyle 293（Life Technologies）を用いた一過性発現により発現し、プロテインAを用いた当業者公知の方法により精製を行った。

[0222] 5-2. プロテアーゼ切断配列を導入した抗CXCL10中和抗体の結合活性の評価

5-1で調製した抗体とヒトCXCL10（266-IP-010/CF，R&D Systems）の相互作用をBiacoreを用いて評価した結果を図6に示す。具体的には、CM3センサーチップ（BR100536，GE Healthcare）にR PROTEIN A（SURE）（28-4018-60，GE Healthcare）をNHS・EDCを用いたアミンカップリング法によって固相化し、ランニングバッファーとして20mM ACES，0.05% Tween20，150mM NaCl，pH 7.4を用い、抗体をキャプチャーした状態で3.125，1.563，0.781 nMのヒトCXCL10をアナライトとして流し、25℃における抗体の抗原に対する結合を評価した。ランニングバッファーのみをアナライトとしたブランクとの差をとった継時的な結合量を表すセンサーグラムを図6に示す。アナライトを流し始める時間を横軸の開始点としている。アナライトを流し始めた時間におけるレスポンスを0としたときの各時間におけるレスポンス（結合量）が縦軸である。図6のセンサーグラムに示すように、いずれの抗体もヒトCXCL10に結合した。すなわち、抗原への結合活性を失わせることなく抗体可変領域と定常領域の境界付近にプロテアーゼ切断配列を挿入することが出来た。

[0223] 5-3. プロテアーゼ切断配列を導入した抗CXCL10中和抗体のプロテアーゼによる切断の評価

5-1で調製した抗体がプロテアーゼにより切断されるどうかを検証した。プロテアーゼとしてリコンビナントヒトマトリプターゼ/ST14触媒ドメイン（MT-SP1）（R&D Systems，3946-SE-010）を用い、プロテアーゼ 20nM、抗体 60または100 μg/mL、PBS、37℃の条件下で20時間反応させたのちに、

プロテアーゼによる切断を還元SDS-PAGEによって評価した結果を図7に示す。その結果、EEIVHA/EEIVL、EEIVHE/EEIVL、EEIVHF/EEIVL、EEIVHG/EEIVL、EEIVHEG/EEIVL、EEIVHBG/EEIVLは、プロテアーゼ処理によって25kDa から 50kDa の間に新たなバンドが生じた。さらに、EEIVH/EEIVLEG、EEIVH/EEIVLF、EEIVH/EEIVLGは、プロテアーゼ処理によって25kDa以下にバンドが生じた。したがって、EEIVHA/EEIVL、EEIVHE/EEIVL、EEIVHF/EEIVL、EEIVHG/EEIVL、EEIVHEG/EEIVL、EEIVHBG/EEIVL、EEIVH/EEIVLEG、EEIVH/EEIVLF、EEIVH/EEIVLGにおいて、抗体がプロテアーゼによって切断されることが確認された。

[0224] 5－4．プロテアーゼ切断配列を導入した抗CXCL10中和抗体のプロテアーゼ切断配列近傍への可動リンカー配列の導入

5－3でリコンビナントヒトマトリプターゼ/ST14 (MT-SP1) 触媒ドメイン (R&D Systems, 3946-SE-010)による切断を受けなかったEEIVHC/EEIVLのプロテアーゼ切断配列の近傍に、グリシン-セリンポリマーからなるリンカーを含む配列を挿入する検討を行った。図8に示す5種類の重鎖を設計した。重鎖改変体であるEEIVHC002 (配列番号：23)、EEIVHC003 (配列番号：24)、EEIVHC004 (配列番号：25)、EEIVHC005 (配列番号：26)、EEIVHC006 (配列番号：27) をコードする発現ベクターを当業者公知の方法で作製した。

これらの重鎖改変体と天然型軽鎖を組み合わせ、重鎖の可変領域と定常領域の境界付近にプロテアーゼ切断配列を挿入した以下のIgG1抗体：EEIVHC002/EEIVL (重鎖配列番号：23、軽鎖配列番号：2)、EEIVHC003/EEIVL (重鎖配列番号：24、軽鎖配列番号：2)、EEIVHC004/EEIVL (重鎖配列番号：25、軽鎖配列番号：2)、EEIVHC005/EEIVL (重鎖配列番号：26、軽鎖配列番号：2)、EEIVHC006/EEIVL (重鎖配列番号：27、軽鎖配列番号：2) を当業者公知の方法でFreeStyle 293 (Life Technologies)を用いた一過性発現により発現し、プロテインAを用いた当業者公知の方法により精製を行った。

[0225] 5－5．プロテアーゼ切断配列と可動リンカー配列を導入した抗CXCL10中和

抗体の結合活性の評価

5-4で調製した抗体とヒトCXCL10 (266-IP-010/CF, R&D Systems) の相互作用をBiacoreを用いて評価した結果を図9に示す。具体的には、CM3センサーチップ (BR100536, GE Healthcare) にR PROTEIN A (SURE) (28-4018-60, GE Healthcare) をNHS・EDCを用いたアミンカップリング法によって固相化し、ランニングバッファーとして20mM ACES, 0.05% Tween20, 300mM NaCl, pH 7.4 を用い、抗体をキャプチャーした状態で6.25, 3.125, 1.563, 0.781 nM のヒトCXCL10をアナライトとして流し、25℃における抗体の抗原に対する結合を評価した。ランニングバッファーのみをアナライトとしたブランクとの差をとった継時的な結合量を表すセンサーグラムを図9に示す。アナライトを流し始める時間を横軸の開始点としている。アナライトを流し始めた時間におけるレスポンスを0としたときの各時間におけるレスポンス (結合量) が縦軸である。図9のセンサーグラムに示すように、いずれの抗体もヒトCXCL10に結合した。すなわち、抗原への結合活性を失わせることなく抗体可変領域と定常領域の境界付近にプロテアーゼ切断配列と可動リンカー配列を挿入することが出来た。

[0226] 5-6. プロテアーゼ切断配列と可動リンカー配列を導入した抗CXCL10中和抗体のプロテアーゼによる切断の評価

5-5で調製した抗体がプロテアーゼにより切断されるどうかを検証した。プロテアーゼとしてヒトウロキナーゼ (uPA) (R&D Systems, 1310-SE-010)、リコンビナントヒトマトリプターゼ/ST14 触媒ドメイン (MT-SP1) (R&D Systems, 3946-SE-010) を用い、プロテアーゼ12.5nM、抗体 133 µg/mL、PBS、37℃の条件下で2、20時間反応させたのちに、プロテアーゼによる切断を還元SDS-PAGEによって評価した結果を図10に示す。その結果、EEIVHC002/EEIVL、EEIVHC003/EEIVL、EEIVHC004/EEIVL、EEIVHC005/EEIVL、EEIVHC006/EEIVLは、プロテアーゼ処理によって25kDa から 50kDaの間に新たなバンドが生じた。したがって、EEIVHC002/EEIVL、EEIVHC003/EEIVL、EEIVHC004/EEIVL、EEIVHC005/EEIVL、EEIVHC006/EEIVLにおいて、抗体がプロテアー

ぜによって切断されることが確認された。

これらの結果から、EEIVHC/EEIVLのようにプロテアーゼ切断サイトのみを可変領域と定常領域の境界付近に導入した場合にはプロテアーゼによる切断を受けない抗体であっても、切断配列近傍に可動リンカー配列を導入することでプロテアーゼによる切断が可能な分子を作成できることが示された。したがって、プロテアーゼ切断配列と可動リンカーを任意に組み合わせることによっても、プロテアーゼによる切断を受ける抗体が作製可能であることが示された。

[0227] 5-7. CXCL10-抗CXCL10中和抗体のプロテアーゼ切断によるリガンドの活性化

次に、5-5で調製した抗体に結合したヒトCXCL10がプロテアーゼ処理によって遊離するかどうかをBiacoreを用いて評価した。具体的には、5-5で調製した抗体EEIVHC006a/EEIVL（重鎖配列番号：33、軽鎖配列番号：2）を用いて、抗原あり／プロテアーゼありのアナライト、抗原なし／プロテアーゼありのアナライト、抗原あり／プロテアーゼなしのアナライトをそれぞれ用意した。抗原あり／プロテアーゼありのアナライトは、抗体とヒトCXCL10を結合させたのちに20nMのリコンビナントヒトマトリプターゼ/ST14触媒ドメイン（MT-SP1）（R&D Systems, 3946-SE-010）で20時間処置したものをを用いた。抗原なし／プロテアーゼありのアナライトは、抗体のみを20nMのリコンビナントヒトマトリプターゼ/ST14触媒ドメイン（MT-SP1）（R&D Systems, 3946-SE-010）で20時間処置したものをを用いた。抗原あり／プロテアーゼなしのアナライトは、抗体とヒトCXCL10を結合させたものをを用いた。また、CXCL10の結合によるレスポンスであることを確認する系のコントロールとして、CXCL10を抗原のみのアナライトとして用意した。CM5センサーチップ（BR100530, GE Healthcare）に抗CXCL10抗体を当業者公知の方法で固相化し、ランニングバッファーとして20mM ACES, 0.05% Tween20, pH 7.4を用い、抗原あり／プロテアーゼありのアナライト、抗原なし／プロテアーゼありのアナライト、抗原あり／プロテアーゼなしのアナライト、抗原のみアナライトの4種類

をそれぞれ流し、25℃におけるセンサーチップ上の抗CXCL10抗体とヒトCXCL10の結合を評価した。

また、プロテアーゼ切断配列を持っていない抗体MabCXCL10と同様のFab領域を持つMabCXCL10a（重鎖：EEIVHa（配列番号：65）、軽鎖：EEIVL（配列番号：2））を用いて、抗体EEIVHC006a/EEIVLと同様に抗原あり／プロテアーゼありのアナライト、抗原なし／プロテアーゼありのアナライト、抗原あり／プロテアーゼなしのアナライトを用意した。同様に、CM5センサーチップ（BR100530, GE Healthcare）に抗CXCL10抗体を当業者公知の方法で固相化し、ランニングバッファーとして20mM ACES, 0.05% Tween20, pH 7.4 を用い、抗原あり／プロテアーゼありのアナライト、抗原なし／プロテアーゼありのアナライト、抗原あり／プロテアーゼなしのアナライト、抗原のみアナライト（CXCL10）の4種類をそれぞれ流し、25℃におけるセンサーチップ上の抗CXCL10抗体とヒトCXCL10の結合を評価した。

抗CXCL10抗体を固相化していないフローセルとの差をとった継時的な結合量を表すセンサーグラムを図11に示す。アナライトを流し始める時間を縦軸の開始点としている。縦軸はアナライトを流し始めたときのレスポンスを100とした際の各時間のレスポンスを表す。その結果、図11(A)に示すように切断配列が導入されていないMabCXCL10aをプロテアーゼ処理してもCXCL10は遊離されないが、図11(B)に示すようにEEIVHC006a/EEIVLをプロテアーゼ処理することでCXCL10が遊離されることが確認された。

[0228] 5－8. 抗体可変領域と定常領域の境界付近のアミノ酸配列の一部をプロテアーゼ切断配列と可動リンカーの配列の一部に置換した抗CXCL10中和抗体の作製とプロテアーゼによる切断の評価

MabCXCL10の重鎖の可変領域と定常領域の境界付近のアミノ酸配列の一部をプロテアーゼ切断配列と可動リンカーの配列の一部で置換する検討を行った。癌特異的に発現しているウロキナーゼ（uPA）およびマトリプターゼ（MT-SP1）で切断されることが報告されている配列であるペプチド配列A（配列番号：3）を重鎖の一部のアミノ酸に置換した図12に示す重鎖を設計した。

重鎖改変体であるEESVHA009（配列番号：59）、EESVHA012（配列番号：60）をコードする発現ベクターを当業者公知の方法で作製した。

これらの重鎖改変体と天然型軽鎖を組み合わせ、以下のIgG1抗体：EESVHA009/EEIVL（重鎖配列番号：59、軽鎖配列番号：2）、EESVHA012/EEIVL（重鎖配列番号：60、軽鎖配列番号：2）を当業者公知の方法でFreeStyle 293（Life Technologies）を用いた一過性発現により発現し、プロテインAを用いた当業者公知の方法により精製を行った。

EESVHA009/EEIVL、EESVHA012/EEIVLがプロテアーゼにより切断されるどうかを検証した。プロテアーゼとしてヒトウロキナーゼ（uPA）（R&D Systems, 1310-SE-010）、リコンビナントヒトマトリプターゼ/ST14 触媒ドメイン（MT-SP1）（R&D Systems, 3946-SE-010）を用い、プロテアーゼ12.5nM、抗体100μg/mL、PBS、37℃の条件下で20時間反応させたのちに、プロテアーゼによる切断を還元SDS-PAGEによって評価した結果を図13に示す。その結果、EESVHA009/EEIVL、EESVHA012/EEIVLは、プロテアーゼ処理によって25kDaから50kDaの間に新たなバンドが生じた。したがって、EESVHA009/EEIVL、EESVHA012/EEIVLにおいて、抗体がプロテアーゼによって切断されることが確認された。

[0229] 実施例6 プロテアーゼ切断によって抗原結合能を失わせるための切断配列挿入許容部位に関する考察

ヒトIgG1抗体の重鎖216番アスパラギン酸の直前にプロテアーゼ切断配列を挿入した抗体の作成及びインビトロでの機能評価に関する報告がなされている（国際公開W02004/021861A2）。実験データは未記載であるが、この抗体と抗原を混合した後に対応するプロテアーゼが含まれる培地を処置すると、抗原抗体複合体から抗原が遊離されると主張している。

当該報告でプロテアーゼ切断配列を挿入したと主張されたヒトIgG1抗体の重鎖216番目のアミノ酸は、Kabat, E. et al. Sequences of Proteins of Immunological Interest 5th editionに記載されているKabatナンバリング、EUナンバリング、OUナンバリングのいずれかのナンバリングシステムにおいて

もアスパラギン酸ではない。一方で異なる文献を参照すると、ヒトIgG1抗体の重鎖216番アミノ酸は重鎖と軽鎖の間にジスルフィド結合が形成されるシステインの直後のアスパラギン酸であると考えられる (Nature 344, 667 - 670 (12 April 1990), Kabat, E. et al. Sequences of Proteins of Immunological Interest 4th edition)。この216番のアスパラギン酸の直前にプロテアーゼ切断配列を挿入した場合、プロテアーゼによる切断を受けた抗体からはパパインによって抗体のヒンジ領域が切断を受けた場合と同様のFab領域が形成されることが考えられる。パパインによる抗体のヒンジ領域の切断によって抗原結合能が失われることは考えにくいと一般的に認識されているため、この216番のアスパラギン酸の直前にプロテアーゼ切断配列を挿入した抗体を対応するプロテアーゼで切断しても、抗原結合能が失われることはないと考えられる。

仮にKabat, E. et al. Sequences of Proteins of Immunological Interest 5th editionに記載されているKabatナンバリングにおけるヒトIgG1抗体の重鎖216番目のアミノ酸 (Kabatナンバリング) の直前にプロテアーゼ切断配列が挿入された場合も検討してみる。この部位は重鎖と軽鎖の間にジスルフィド結合が形成される220番目のシステイン (Kabatナンバリング) よりも数アミノ酸N末端側に存在する。そのため、この部位で起こるプロテアーゼによる重鎖の切断がもたらす影響は、重鎖と軽鎖の間に形成されるジスルフィド結合が失われた際にもたらされる影響と同様であると想定される。過去の文献より、重鎖と軽鎖の間のジスルフィド結合を形成できないFab領域であっても抗原結合が失われることは考えにくい (MAbs. 2014 Jan-Feb;6(1):204-18.)。そのため、Kabat, E. et al. Sequences of Proteins of Immunological Interest 5th editionに記載されているKabatナンバリングにおけるヒトIgG1抗体の重鎖216番目のアミノ酸 (Kabatナンバリング) の直前にプロテアーゼ切断配列が挿入された場合であっても、プロテアーゼ切断によって抗原結合能が失われることはないと考えられる。

[0230] 実施例7 プロテアーゼ切断配列を導入した抗CXCL10中和抗体/CXCL10複合体

のプロテアーゼ切断に伴う遊走活性評価

実施例5で作製されたプロテアーゼ切断配列を導入したCXCL10中和抗体とCXCL10が形成する複合体がプロテアーゼ切断によってCXCL10を遊離させ、CXCL10が細胞遊走活性を発揮するかを評価した。

CXCL10の細胞遊走活性は、マウスCXCR3 (mCXCR3) を発現するBa/F3トランスフェクタント細胞を作製し(以下BaF3/mCXCR3)、この細胞とHTS Transwell™-96 Permeable Support with 5.0 μm Pore Polycarbonate Membrane (Cat. 3387, Corning) を用いて評価された。アナライトとして、CXCL10+プロテアーゼ、EEIVHC006a/EEIVL+CXCL10、EEIVHC006a/EEIVL+CXCL10+プロテアーゼ、EEIVHC006a/EEIVL+プロテアーゼ、MabCXCL10+CXCL10+プロテアーゼの5種類を準備した。プロテオセーブSS 1.5mLマイクロチューブ (Cat. MS-4265 M、住友ベークライト) 中で終濃度10 μg/mLの抗体 (MabCXCL10かEEIVHC006a/EEIVL)、終濃度100 ng/mL のhCXCL10 (Cat. 300-12、Peprotech)、もしくは抗体とhCXCL10両方を入れ、30分間常温で放置し、プロテアーゼありのアナライトについては前記反応後にmouse MT-SP1 (mMT-SP1、Cat. 4735-SE-010、R&D Systems)を終濃度12.5 nMになるように、更に加えた。

各アナライト235 μLをLower chamberに移し、Upper chamberにBaF3/mCXCR3細胞を 2.0×10^5 cells/wellとなるように75 μL/wellで播き、6時間反応させた。反応は5%炭酸ガス、37℃条件下で行われた。6時間の反応後、Lower chamber中の溶液100 μLをフルオレッセンスルミネッセンス96ウェルプレート (Cat. 3912, Corning) に移し、CellTiter-Glo™ Luminescent Cell Viability Assay溶液 (Cat. G7571, Promega) を100 μL加えた。室温で10分反応させた後、SpectraMax M3 マルチモードマイクロプレートリーダー (Molecular Devices) で発光値を測定し、Lower chamberへの細胞の遊走度を評価した。その結果を図14に示す。

CXCL10+プロテアーゼのアナライトと比較して、EEIVHC006a/EEIVL+CXCL10のアナライトを添加した場合には発光強度が減少した。発光強度は遊走した細胞の量を反映することから、EEIVHC006a/EEIVLはCXCL10と複合体を形成し

、CXCL10の作用を中和していることが分かった。一方で、EEIVHC006a/EEIVL +CXCL10+プロテアーゼのアナライトを添加した場合、EEIVHC006a/EEIVL +CXCL10のアナライトを添加した場合と比較して発光強度が回復し、CXCL10+プロテアーゼのアナライト添加の場合と同様に細胞を遊走させることが示された。切断配列を有していないMabCXCL10抗体を用いたMabCXCL10+CXCL10+プロテアーゼのアナライト添加の場合、発光強度の回復は見られなかった。この結果から、EEIVHC006a/EEIVLはプロテアーゼによる抗体切断に伴い、CXCL10の中和能が低下することが示された。

[0231] 実施例8 プロテアーゼ切断配列を導入した抗CXCL10中和抗体-CXCL10融合タンパク質のプロテアーゼ切断に伴う遊走活性評価

8-1 プロテアーゼ切断配列を導入した抗CXCL10中和抗体-CXCL10融合タンパク質の作製及びプロテアーゼ切断評価

ヒトCXCL10に対する中和抗体であるMabCXCL10_G7（重鎖：G7H-G1T4（配列番号：368）、軽鎖：G7L-LT0（配列番号：369））の軽鎖を用いて、当該軽鎖のN末端にグリシン-セリンポリマーからなるリンカー配列を介して、プロテアーゼに耐性になるように変異させたヒトCXCL10変異体hCXCL10R75A（配列番号：370）を連結させて、リガンド融合軽鎖hCXCL10R75A.G4SGGGG.G7L-LT0（配列番号：371）を設計した。また、癌特異的に発現しているウロキナーゼ（uPA）およびマトリプターゼ（MT-SP1）で切断される配列（配列番号：338）をhCXCL10R75A.G4SGGGG.G7L-LT0中の抗体可変領域と抗体定常領域の境界付近に挿入したリガンド融合軽鎖hCXCL10R75A.G7L.12aa0054-LT0（配列番号：372）を設計した。これらのリガンド融合軽鎖とMabCXCL10_G7重鎖のG7H-G1T4を組み合わせて、融合タンパク質：G7H-G1T4/ hCXCL10R75A.G4SGGGG.G7L-LT0（重鎖配列番号：368、リガンド融合軽鎖配列番号：371）および、G7H-G1T4/ hCXCL10R75A.G7L.12aa0054-LT0（重鎖配列番号：368、リガンド融合軽鎖配列番号：372）を当業者公知の方法でExpi293（Life Technologies）を用いた一過性発現により発現し、プロテインAを用いた当業者公知の方法により精製を行った。MabCXCL10_G7のCDR配列は下記通り

: H-CDR1 (SFSIT、配列番号: 374)、H-CDR2 (EITPMFGIANYAQKFQG、配列番号: 375)、H-CDR3 (DGRFDVSDLLTDKPKVTINYNGMDV、配列番号: 376)、L-CDR1 (SGSSSNIGSNTVN、配列番号: 377)、L-CDR2 (NNDQRPS、配列番号: 378)、L-CDR3 (ASWDDSLNGRV、配列番号: 379)。

これらの融合タンパク質がプロテアーゼにより切断されるかを検証した。プロテアーゼとしてヒトに由来するウロキナーゼ (human uPA, huPA) (R&D Systems, 1310-SE-010) を用いた。プロテアーゼによる融合タンパク質の切断は還元SDS-PAGEによって評価した。融合タンパク質0.1 mg/mlに対し30 nM huPAを37°Cで1時間反応させた後、還元SDS-PAGEによって融合タンパク質の切断を評価した。その結果、G7H-G1T4/ hCXCL10R75A, G4SGGGG, G7L-LT0はプロテアーゼ処理により切断されなかったのに対して、プロテアーゼ切断配列を挿入したG7H-G1T4/ hCXCL10R75A, G7L, 12aa0054-LT0はプロテアーゼ処理によって15kDa から 25kDaの間に新たなバンドを生じ (図15)、プロテアーゼ処理による切断が確認された。

[0232] 8-2 プロテアーゼ切断配列を導入した抗CXCL10中和抗体-CXCL10融合タンパク質のプロテアーゼ切断に伴う遊走活性評価

プロテアーゼ切断配列を導入した抗CXCL10中和抗体とCXCL10が融合された抗CXCL10中和抗体-CXCL10融合タンパク質がプロテアーゼ切断によってCXCL10を遊離させ、細胞遊走を引き起こすかを評価した。

融合タンパク質から遊離したhCXCL10R75Aの活性比較対象として、hCXCL10R75Aのみの活性を表すhCXCL10R75A-His (配列番号: 373)を以下の方法で作製・精製した。プロテアーゼに耐性になるように変異させたヒトCXCL10変異体hCXCL10R75A (配列番号: 370) のC末端にヒスチジンタグを付加し、ヒスチジンタグ付加ヒトCXCL10変異体 hCXCL10R75A-His (配列番号: 373)を作製した。hCXCL10R75A-His (配列番号: 373)を当業者公知の方法でExpi293 (Life Technologies)を用いた一過性発現により発現し、ニッケルセファロースを用いた当業者公知の方法により精製を行った。

細胞遊走活性は、マウスCXCR3 (mCXCR3) を発現するBa/F3トランスフェク

タント細胞を作製し(以下BaF3/mCXCR3)、この細胞とHTS Transwell™-96 Permeable Support with 5.0 μ m Pore Polycarbonate Membrane (Cat. 3387、Corning)を用いて評価された。

uPA(+)のアナライトとして、2.0mL 96ウェルディープウェルプレート (Cat. P-DW-20-C-S、Axygen) 中でhCXCL10R75A-His 0.15 μ g/mL、プロテアーゼ切断配列を有さない融合タンパク質G7H-G1T4/ hCXCL10R75A, G4SGGGG, G7L-LT0 1.5 μ g/mL、またはプロテアーゼ切断配列を有する融合タンパク質G7H-G1T4 / hCXCL10R75A, G7L, 12aa0054-LT0 1.5 μ g/mLに対してリコンビナントhuPA (Cat. 1310-SE、R&D systems)を終濃度30 nMになるように加えて準備した。G7H-G1T4/ hCXCL10R75A, G4SGGGG, G7L-LT0、G7H-G1T4/ hCXCL10R75A, G7L, 12aa0054-LT0 1.5 μ g/mLは0.15 μ g/mL相当量のhCXCL10R75Aを含む。uPA(-)のアナライトは、hCXCL10R75A-His 0.15 μ g/mL、プロテアーゼ切断配列を有さない融合タンパク質G7H-G1T4/ hCXCL10R75A, G4SGGGG, G7L-LT0 1.5 μ g/mL、またはプロテアーゼ切断配列を有する融合タンパク質G7H-G1T4/ hCXCL10R75A, G7L, 12aa0054-LT0 1.5 μ g/mLを使用した。

分析対象となる各溶液それぞれ235 μ LをLower chamberに移し、Upper chamberにBaF3/mCXCR3細胞を 2.0×10^5 cells/wellとなるように75 μ L/wellで播き、6時間反応させた。反応は5%炭酸ガス、37°C条件下で行われた。6時間の反応後、Lower chamber中の溶液100 μ LをOptiPlate-96 (Cat. 6005299、PerkinElmer)に移し、CellTiter-Glo™ Luminescent Cell Viability Assay溶液 (Cat. G7571、Promega)を100 μ L加えた。室温で10分反応させた後、SpectraMax M3 マルチモードマイクロプレートリーダー (Molecular Devices)で発光値を測定し、Lower chamberへの細胞の遊走度を評価した。その結果を図16に示す。CXCL10R75A-Hisを添加した場合と比較して、プロテアーゼ未処理のG7H-G1T4/ hCXCL10R75A, G7L, 12aa0054-LT0融合タンパク質を添加した場合の発光強度が減少した。発光強度は遊走した細胞の量を反映することから、G7H-G1T4/ hCXCL10R75A, G7L, 12aa0054-LT0中のCXCL10R75Aの生理活性は中和されていることが分かった。一方で、プロテアーゼ処理のG7H-G1T4/ hCXCL10R75A

. G7L. 12aa0054-LT0を添加した場合には、プロテアーゼ未処理のG7H-G1T4/ hCXCL10R75A. G7L. 12aa0054-LT0を添加した場合と比較して発光強度が回復し、CXCL10R75A-Hisと同等に細胞を遊走させることが示された。切断配列を有していないG7H-G1T4/hCXCL10R75A. G4SGGGG. G7L-LT0ではプロテアーゼ処理を行った場合でも発光強度の回復がみられなかった。この結果から、G7H-G1T4/ hCXCL10R75A. G7L. 12aa0054-LT0はプロテアーゼによる切断に伴い、融合タンパク中の抗体部分のCXCL10R75Aに対する中和能が低下することが示された。

[0233] 実施例9 プロテアーゼ切断配列と可動リンカー配列を導入した抗IL-12中和抗体の作製とプロテアーゼ切断に伴うIL-12活性化の評価

9-1. プロテアーゼ切断配列と可動リンカー配列を導入した抗IL-12中和抗体の作製

IL-12は免疫活性化作用を持つサイトカインの一つである。IL-12は免疫細胞を活性化させることで抗腫瘍効果を発揮するが、同時に全身の暴露によって重篤な副作用を引き起こすことも報告されている(Nat Immunol. 2012 Jul 19;13(8):722-8.)。

ヒトIL-12に対する中和抗体であるUstekinumabと同じ可変領域を有する抗IL-12抗体の重鎖 (UstkH-G1T4, 重鎖配列番号: 144)の可変領域と定常領域の境界付近に、ウロキナーゼ (uPA) およびマトリプターゼ (MT-SP1) で切断されることが報告されているペプチド配列A (配列番号: 3) 及びグリシン-セリンポリマーからなる可動リンカーを含む配列を挿入し、Ustekinumabの重鎖の改変体UstkH-G1T4CYTM1inP1 (配列番号: 146) を設計し、Ustekinumabの軽鎖 (UstkL-kT0、配列番号: 145)と組み合わせて、Ustekinumabの改変体であるUstkH-G1T4CYTM1inP1/UstkL-kT0 (重鎖配列番号: 146、軽鎖配列番号: 145) をコードする発現ベクターを当業者公知の方法で作製した。このUstekinumabの改変体UstkH-G1T4CYTM1inP1/UstkL-kT0を当業者公知の方法でFreeStyle 293 (Life Technologies)を用いた一過性発現により発現し、プロテインAを用いた当業者公知の方法により精製を行った。本実施例中の抗IL-12抗体及びその改変体に含まれるCDR配列は下記通りである: H-CDR1 (T

YWLG、配列番号：386）、H-CDR2（IMSPVDSDIRYSPSFQG、配列番号：387）、H-CDR3（RRPGQGYFDF、配列番号：388）、L-CDR1（RASQGISSWLA、配列番号：389）、L-CDR2（AASSLQS、配列番号：390）、L-CDR3（QQYNIYPYT、配列番号：391）。

[0234] 9-2. プロテアーゼ切断配列と可動リンカー配列を導入した抗IL-12中和抗体のプロテアーゼ切断

前記9-1で調製された抗体がプロテアーゼにより切断されるどうかを検証した。プロテアーゼとしてヒトに由来するリコンビナントヒトマトリプターゼ/ST14 触媒ドメイン（human MT-SP1, hMT-SP1）（R&D Systems, 3946-SE-010）、マウスに由来するリコンビナントマウスマトリプターゼ/ST14 触媒ドメイン（mouse MT-SP1, mMT-SP1）（R&D Systems, 4735-SE-010）、および、ヒトに由来するウロキナーゼ（human uPA, huPA）（R&D Systems, 1310-SE-010）を用いた。プロテアーゼ処理は、Ustekinumab（UstkH-G1T4/ UstkL-kT0）、またはUstekinumabの改変体UstkH-G1T4CYTM1inP1/UstkL-kT0に対してhMT-SP1、mMT-SP1、あるいは、huPAを最終濃度10.1, 16.9, 9.17 μ Mとなるようにそれぞれ加え、37°Cで一晩反応させることで行った。

[0235] 9-3. 切断されたプロテアーゼ切断配列と可動リンカー配列を導入した抗IL-12中和抗体の切断の確認とIL-12活性化の評価

プロテアーゼによる抗体の切断は還元SDS-PAGEによって評価した。その結果、UstkH-G1T4/ UstkL-kT0は各プロテアーゼによる切断を受けなかったのに対して、プロテアーゼ切断配列及び可動リンカーを挿入したUstkH-G1T4CYTM1inP1/UstkL-kT0は各プロテアーゼ処理によって25kDa から 50kDaの間に新たなバンドが生じた（図17）。したがって、プロテアーゼ切断配列と可動リンカー配列を導入した抗IL-12中和抗体（UstkH-G1T4CYTM1inP1/UstkL-kT0）がプロテアーゼによって切断されることが確認された。

つぎに、プロテアーゼにより抗体が切断されたとき、IL-12が抗体との複合体から遊離して生理活性を発揮するかについて評価した。IL-12の生理活性をNK92ヒト細胞株のIFN- γ （インターフェロンガンマ、IFN-gとも記載する）産

生に基づき評価した。96ウェル細胞培養プレートにNK92細胞を 1×10^5 cells/wellで播種した。10 ng/mLのIL-12とプロテアーゼ処理を行った抗体（UstkH-G1T4/ UstkL-kT0またはUstkH-G1T4CYTM1inP1/UstkL-kT0、それぞれ20、4、0.8、0.16、0.032、0.0054、0.0013 μ g/mLの各濃度）を添加し、48時間後のIFN- γ 産生量をELISAで測定した。抗体のIL-12活性に対する影響を評価するために、抗体を添加せずに、プロテアーゼ処理済みのIL-12のみを添加した実験（No Ab）も行われた。図18はインターフェロンガンマの濃度を測定した結果である。各種プロテアーゼで処理したUstkH-G1T4/ UstkL-kT0（プロテアーゼ切断配列を持たない）はIL-12によるインターフェロンガンマの産生を抑制し（中和という）、抗体が0.8 μ g/mLの場合にIL-12を入れなかった場合（No IL-12）と同程度になった。一方で、各種プロテアーゼで処理したUstkH-G1T4CYTM1inP1/UstkL-kT0（プロテアーゼ切断配列を含む）はいずれの抗体濃度においても、プロテアーゼ切断配列を持たないUstkH-G1T4/ UstkL-kT0を添加した場合に比べてインターフェロンガンマが産生されていた。この結果から、UstkH-G1T4CYTM1inP1/UstkL-kT0はプロテアーゼによる切断に伴いIL-12に対する中和能が減弱されることで、IL-12を細胞に作用させることが確認された。

[0236] 実施例10 抗ヒトCXCL10中和抗体に各種プロテアーゼ切断配列を導入した抗体の評価

10-1. 抗ヒトCXCL10中和抗体へのプロテアーゼ切断配列の導入

CXCL10を中和する抗体であるMabCXCL10（重鎖：EEIVH（配列番号：1）、軽鎖：EEIVL（配列番号：2））とMabCXCL10_G7（重鎖：G7H-G1T4（配列番号：368）、軽鎖：G7L-LT0（配列番号：369））の発現ベクターを当業者公知の方法で調製し、FreeStyle293細胞（Invitrogen）もしくはExpi293細胞（Life technologies）を用いて当業者公知の方法で発現、精製を行った。

MabCXCL10あるいはMabCXCL10_G7の重鎖の可変領域と定常領域の境界付近に表2中に示す切断配列をそれぞれ挿入し、MabCXCL10改変重鎖を作製した。プロテアーゼ切断配列が挿入されたMabCXCL10重鎖改変体の配列を表3に示す。

[0237]

[表2]

プロテアーゼ切断配列

配列番号	切断配列
335	TSGSGRSANARG
336	TSQSGRSANQRG
337	TSPSGRSAYPRG
338	TSGSGRSATPRG
339	TSQSGRSATPRG
340	TSASGRSATPRG
341	TSYSGRSAVPRG
342	TSYSGRSANFRG
343	TSSSGRSATPRG
344	TSTTGRSASPRG
345	TSTSGRSANPRG

[0238]

[表3]

MabCXCL10 改変重鎖及び MabCXCL10_G7 改変重鎖

配列番号	改変重鎖名
346	EIdHA12aa0004-G1T4
347	EIdHA12aa0010-G1T4
348	EIdHA12aa0016-G1T4
349	EIdHA12aa0054-G1T4
350	EIdHA12aa0063-G1T4
351	EIdHA12aa0081-G1T4
352	EIdHA12aa0089-G1T4
353	EIdHA12aa0095-G1T4
354	EIdHA12aa0103-G1T4
355	EIdHA12aa0126-G1T4
356	EIdHA0003-G1T4
357	G7H. 12aa0004-G1T4
358	G7H. 12aa0010-G1T4
359	G7H. 12aa0016-G1T4
360	G7H. 12aa0054-G1T4
361	G7H. 12aa0063-G1T4
362	G7H. 12aa0081-G1T4
363	G7H. 12aa0089-G1T4
364	G7H. 12aa0095-G1T4
365	G7H. 12aa0103-G1T4
366	G7H. 12aa0126-G1T4
367	G7H. 12aa-G1T4

[0239] 表3中の改変重鎖と軽鎖を組み合わせ、表4に示すMabCXCL10改変体及びMabCXCL10_G7改変体を当業者公知の方法でFreeStyle293細胞 (Invitrogen) もしくはExpi293細胞 (Life technologies)を用いた一過性発現により発現し、プロテインAを用いた当業者公知の方法により精製を行った。

[0240]

[表4]

MabCXCL10 改変体及び MabCXCL10_G7 改変体

抗体名	重鎖配列番号	軽鎖配列番号
EldHA12aa0004	346	2
EldHA12aa0010	347	2
EldHA12aa0016	348	2
EldHA12aa0054	349	2
EldHA12aa0063	350	2
EldHA12aa0081	351	2
EldHA12aa0089	352	2
EldHA12aa0095	353	2
EldHA12aa0103	354	2
EldHA12aa0126	355	2
EldHA0003	356	2
G7H. 12aa0004	357	369
G7H. 12aa0010	358	369
G7H. 12aa0016	359	369
G7H. 12aa0054	360	369
G7H. 12aa0063	361	369
G7H. 12aa0081	362	369
G7H. 12aa0089	363	369
G7H. 12aa0095	364	369
G7H. 12aa0103	365	369
G7H. 12aa0126	366	369
G7H. 12aa	367	369

[0241] 10-2. 複数のプロテアーゼ切断配列を重鎖領域に導入した抗ヒトCXCL10中
和抗体のプロテアーゼによる切断の評価

10-1で調製した抗体がプロテアーゼにより切断されるどうかを検証した。
プロテアーゼとしてリコンビナントヒトマトリプターゼ/ST14 触媒ドメイン
(human MT-SP1, hMT-SP1) (R&D Systems, 3946-SE-010) を用い、プロ
テアーゼ 10nM、抗体 50 μ g/mL、PBS、37℃の条件下で20時間反応させたのち
に、還元SDS-PAGEに供した。結果は図19A、19Bに示す。表4で示すMabCXCL10

改変体とMabCXCL10_G7改変体のいずれも、hMT-SP1処理によって37kDa付近に新たなバンドが生じた。即ち、表2で示すプロテアーゼ切断配列はhMT-SP1によって切断されることが確認された。また、類似の方法で、表2で示すプロテアーゼ切断配列はhuman uPA, mouse uPAにも切断されることが確認された。

[0242] 実施例11 多様なプロテアーゼの切断配列が導入されたポリペプチドの作製と評価

11-1 多様なプロテアーゼの認識配列が導入されたポリペプチドの作製

ヒトIL-6Rに対する中和抗体であるMRA（重鎖：MRAH-G1T4（配列番号：147）、軽鎖：MRAL-k0（配列番号：148））の発現ベクターを当業者公知の方法で調製した。MRAのCDR配列は以下である：H-CDR1（SDHAWS、配列番号：398）、H-CDR2（YISYSGITTYNPSLKS、配列番号：399）、H-CDR3（SLARTTAMDY、配列番号：400）、L-CDR1（RASQDISSYLN、配列番号：401）、L-CDR2（YTSRLHS、配列番号：402）、L-CDR3（QQGNTLPYT、配列番号：403）。

MMP-2、MMP-7、MMP-9で切断されることが知られているペプチド配列およびそれらの配列の近傍にグリシン-セリンポリマーからなる可動リンカーを含むペプチド配列を表5に示す。

[0243]

[表5]

プロテアーゼ	挿入配列	配列番号
MMP-2 MMP-9	PLGLAG	3 4
MMP-2	GAGIPVSLRSGAG	7 0
MMP-2	GPLGIAGQ	7 1
MMP-2	GGPLGMLSQS	7 2
MMP-2	PLGLWA	7 3
MMP-7	VPLSLTMG	3 5
MMP-7	GAGVPLSLTMGAG	7 5
MMP-9	GAGVPLSLYSGAG	7 6
MMP-2 MMP-9	GGGGSPLGLAGGGGGS	149
MMP-2	GGGGSGPLGIAGQGGGGS	150
MMP-2	GGGGSPLGLWAGGGGS	151
MMP-9	GGGGSAGVPLSLYSGAGGGGGS	152

[0244] これらの挿入配列をMRA抗体の重鎖可変領域と定常領域の境界付近に挿入した改変重鎖MEIVHG4SMP2MP9G4S-MEIVHG4SMP2MP9G4SG1T4（配列番号：153）、MEIVHG4SMP2,2G4S-MEIVHG4SMP2,2G4SG1T4（配列番号：154）、MEIVHG4SMP2,4G4S-MEIVHG4SMP2,4G4SG1T4（配列番号：155）、MEIVHG4SMP9G4S-MEIVHG4SMP9G4SG1T4（配列番号：156）、MEIVHMP2,1-MEIVHMP2,1G1T4（配列番号：157）、MEIVHMP2,3-MEIVHMP2,3G1T4（配列番号：158）、MEIVHMP7,2-MEIVHMP7,2G1T4（重鎖配列番号：159）を設計し、これらの改変重鎖をコードする発現ベクターを当業者公知の方法で作製した。

これらの改変重鎖とMRA軽鎖を組み合わせ、表6に示すMRA改変体を当業者公知の方法でFreeStyle293細胞（Invitrogen）もしくはExpi293細胞（Life technologies）を用いた一過性発現により発現し、プロテインAを用いた当業者公知の方法により精製を行った。

[0245]

[表6]

MRA 改変体

プロテアーゼ	抗体名	重鎖 配列番号	軽鎖 配列番号
MMP-2	MEIVHG4SMP2MP9G4S-MEICHG4SMP2MP9G4SG1T4 /MRAL-k0	153	148
MMP-2	MEIVHG4SMP2. 2G4S-MEICHG4SMP2. 2G4SG1T4 /MRAL-k0	154	148
MMP-2	MEIVHG4SMP2. 4G4S-MEICHG4SMP2. 4G4SG1T4 /MRAL-k0	155	148
MMP-9	MEIVHG4SMP2MP9G4S-MEICHG4SMP2MP9G4SG1T4 /MRAL-k0	153	148
MMP-9	MEIVHG4SMP9G4S-MEICHG4SMP9G4SG1T4 /MRAL-k0	156	148
MMP-2	MEIVHMP2. 1-MEIVHMP2. 1G1T4/MRAL-k0	157	148
MMP-2	MEIVHMP2. 3-MEIVHMP2. 3G1T4/MRAL-k0	158	148
MMP-7	MEIVHMP7. 2-MEIVHMP7. 2G1T4/MRAL-k0	159	148

[0246] 11-2. 多様なプロテアーゼの認識配列が導入されたポリペプチドのプロテアーゼによる切断の評価

11-1 で調製したMRA改変体がプロテアーゼにより切断されるどうかを検証した。プロテアーゼとしてリコンビナントヒトMMP-2 (R&D Systems, 902-MP-010)、リコンビナントヒトMMP-7 (R&D Systems, 907-MP-010)、リコンビナントヒトMMP-9 (R&D Systems, 911-MP-010) を用いた。なお、プロテアーゼは1 mM p-aminophenylmercuric acetate (APMA; abcam, ab112146) と混ぜ、37℃でそれぞれ1、24時間活性化させてから使用した。プロテアーゼ 50 nM、100 nM、または 500 nM、抗体50 µg/mL、assay buffer(MMP Activity Assay Kit(Fluorometric - Green) (ab112146), Component C: Assay Buffer) または 20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 5 mM CaCl₂, pH 7.2 (以下、Tris)、37℃の条件下で20時間反応させた後に、プロテアーゼによる切断を還元SDS-PAGEによって評価した結果を図20A、20B、図21に示す。MRA改変体抗体は、それぞれ表6に示すプロテアーゼと反応させている。MMP-2ではMEIVHG4SMP2MP9G4S-MEIVHG4SMP2MP9G4SG1T4/MRAL-k0, MEIVHG4SMP2. 2G4S-MEIVHG4SMP2. 2G4

SG1T4/MRAL-k0, MEIVHG4SMP2.4G4S-MEIVHG4SMP2.4G4SG1T4/MRAL-k0, MEIVHMP2.1-MEIVHMP2.1G1T4/MRAL-k0, MEIVHMP2.3-MEIVHMP2.3G1T4/MRAL-k0の切断が、MMP-7ではMEIVHMP7.2-MEIVHMP7.2G1T4/MRAL-k0の切断が、MMP-9ではMEIVHG4SMP2MP9G4S-MEIVHG4SMP2MP9G4SG1T4/MRAL-k0, MEIVHG4SMP9G4S-MEIVHG4SMP9G4SG1T4/MRAL-k0の切断が観察された。

[0247] 実施例12 重鎖の多様な位置にプロテアーゼ切断配列を導入した抗体の評価
12-1 重鎖の多様な位置にプロテアーゼ切断配列を導入した抗体の作製

ウロキナーゼ (uPA) およびマトリプターゼ (MT-SP1) で切断されることが報告されているペプチド配列B (配列番号 : 160) をMRA重鎖可変領域 (MRAH、配列番号 : 161) 内の異なる位置にそれぞれ挿入し、表7で示すMRA重鎖可変領域の改変体を作製した。これらのMRA重鎖可変領域の改変体をそれぞれMRA重鎖定常領域 (G1T4、配列番号 : 162) と連結させMRA重鎖改変体の作製し、対応する遺伝子をコードする発現ベクターを当業者公知の方法で作製した。また、ペプチド配列B (配列番号 : 160) をMRA重鎖定常領域 (G1T4、配列番号 : 162) 内の異なる位置にそれぞれ挿入し、表8に示すMRA重鎖定常領域の改変体を作製した。これらのMRA重鎖定常領域の改変体をそれぞれMRA重鎖可変領域 (MRAH、配列番号 : 161) と連結させMRA重鎖改変体を作製し、対応する遺伝子をコードする発現ベクターを当業者公知の方法で作製した。作製されたMRA重鎖可変領域の改変体およびMRA重鎖定常領域の改変体におけるプロテアーゼ切断配列挿入位置も表7、8に示す。表7における挿入箇所とは、抗体重鎖可変領域中の記載ポジション (Kabatナンバリング) の定常領域側隣を指し、表8における挿入箇所とは、抗体重鎖定常領域中の記載ポジション (EUナンバリング) の可変領域側隣を指す。

[0248]

[表7]

MRA 重鎖可変領域の改変体及びプロテアーゼ切断配列挿入位置

MRA 重鎖可変領域の改変体	プロテアーゼ切断配列挿入位置 (Kabat ナンバリング)	配列番号
MRVH007. 12aa	7 番	163
MRVH008. 12aa	8 番	164
MRVH009. 12aa	9 番	165
MRVH010. 12aa	10 番	166
MRVH011. 12aa	11 番	167
MRVH012. 12aa	12 番	168
MRVH013. 12aa	13 番	169
MRVH014. 12aa	14 番	170
MRVH015. 12aa	15 番	171
MRVH041. 12aa	40 番	172
MRVH042. 12aa	41 番	173
MRVH043. 12aa	42 番	174
MRVH044. 12aa	43 番	175
MRVH045. 12aa	44 番	176
MRVH046. 12aa	45 番	177
MRVH056. 12aa	55 番	178
MRVH057. 12aa	56 番	179
MRVH058. 12aa	57 番	180
MRVH059. 12aa	58 番	181
MRVH060. 12aa	59 番	182
MRVH061. 12aa	60 番	183
MRVH062. 12aa	61 番	184
MRVH063. 12aa	62 番	185
MRVH064. 12aa	63 番	186
MRVH065. 12aa	64 番	187
MRVH066. 12aa	65 番	188
MRVH067. 12aa	66 番	189
MRVH068. 12aa	67 番	190
MRVH069. 12aa	68 番	191
MRVH074. 12aa	73 番	192
MRVH075. 12aa	74 番	193
MRVH076. 12aa	75 番	194

MRVH077. 12aa	76 番	195
MRVH078. 12aa	77 番	196
MRVH087. 12aa	83 番	197
MRVH088. 12aa	84 番	198
MRVH089. 12aa	85 番	199
MRVH099. 12aa	95 番	200
MRVH100. 12aa	96 番	201
MRVH101. 12aa	97 番	202
MRVH102. 12aa	98 番	203
MRVH109. 12aa	103 番	204
MRVH110. 12aa	104 番	205
MRVH111. 12aa	105 番	206
MRVH112. 12aa	106 番	207
MRVH113. 12aa	107 番	208
MRVH114. 12aa	108 番	209
MRVH115. 12aa	109 番	210
MRVH116. 12aa	110 番	211
MRVH117. 12aa	111 番	212
MRVH118. 12aa	112 番	213
MRVH119. 12aa	113 番	214

[0249]

[表8]

MRA 重鎖定常領域の改変体及びプロテアーゼ切断配列挿入位置

MRA 重鎖定常領域の改変体	プロテアーゼ切断配列挿入位置 (EU ナンバリング)	配列番号
G1T4. 118. 12aa	119 番	215
G1T4. 119. 12aa	120 番	216
G1T4. 120. 12aa	121 番	217
G1T4. 121. 12aa	122 番	218
G1T4. 122. 12aa	123 番	219
G1T4. 123. 12aa	124 番	220
G1T4. 124. 12aa	125 番	221
G1T4. 129. 12aa	130 番	222
G1T4. 130. 12aa	131 番	223
G1T4. 131. 12aa	132 番	224
G1T4. 132. 12aa	133 番	225
G1T4. 134. 12aa	135 番	226
G1T4. 135. 12aa	136 番	227
G1T4. 137. 12aa	138 番	228
G1T4. 139. 12aa	140 番	229

[0250] 上記で作製したMRA重鎖改変体とMRA軽鎖を組み合わせて、表9に示すMRA改変体を当業者公知の方法でFreeStyle293細胞 (Invitrogen) もしくはExpi293細胞 (Life technologies)を用いた一過性発現により発現し、プロテインAを用いた当業者公知の方法により精製を行った。

[0251]

[表9]

MRA 改变体

抗体名	重鎖配列番号	軽鎖配列番号
MRVH007. 12aa-G1T4/MRAL-k0	404	148
MRVH008. 12aa-G1T4/MRAL-k0	405	148
MRVH009. 12aa-G1T4/MRAL-k0	406	148
MRVH010. 12aa-G1T4/MRAL-k0	407	148
MRVH011. 12aa-G1T4/MRAL-k0	408	148
MRVH012. 12aa-G1T4/MRAL-k0	409	148
MRVH013. 12aa-G1T4/MRAL-k0	410	148
MRVH014. 12aa-G1T4/MRAL-k0	411	148
MRVH015. 12aa-G1T4/MRAL-k0	412	148
MRVH041. 12aa-G1T4/MRAL-k0	413	148
MRVH042. 12aa-G1T4/MRAL-k0	414	148
MRVH043. 12aa-G1T4/MRAL-k0	415	148
MRVH044. 12aa-G1T4/MRAL-k0	416	148
MRVH045. 12aa-G1T4/MRAL-k0	417	148
MRVH046. 12aa-G1T4/MRAL-k0	418	148
MRVH056. 12aa-G1T4/MRAL-k0	419	148
MRVH057. 12aa-G1T4/MRAL-k0	420	148
MRVH058. 12aa-G1T4/MRAL-k0	421	148
MRVH059. 12aa-G1T4/MRAL-k0	422	148
MRVH060. 12aa-G1T4/MRAL-k0	423	148
MRVH061. 12aa-G1T4/MRAL-k0	424	148
MRVH062. 12aa-G1T4/MRAL-k0	425	148
MRVH063. 12aa-G1T4/MRAL-k0	426	148
MRVH064. 12aa-G1T4/MRAL-k0	427	148
MRVH065. 12aa-G1T4/MRAL-k0	428	148
MRVH066. 12aa-G1T4/MRAL-k0	429	148
MRVH067. 12aa-G1T4/MRAL-k0	430	148
MRVH068. 12aa-G1T4/MRAL-k0	431	148
MRVH069. 12aa-G1T4/MRAL-k0	432	148
MRVH074. 12aa-G1T4/MRAL-k0	433	148
MRVH075. 12aa-G1T4/MRAL-k0	434	148
MRVH076. 12aa-G1T4/MRAL-k0	435	148
MRVH077. 12aa-G1T4/MRAL-k0	436	148

MRAVH078. 12aa-G1T4/MRAL-k0	437	148
MRAVH087. 12aa-G1T4/MRAL-k0	438	148
MRAVH088. 12aa-G1T4/MRAL-k0	439	148
MRAVH089. 12aa-G1T4/MRAL-k0	440	148
MRAVH099. 12aa-G1T4/MRAL-k0	441	148
MRAVH100. 12aa-G1T4/MRAL-k0	442	148
MRAVH101. 12aa-G1T4/MRAL-k0	443	148
MRAVH102. 12aa-G1T4/MRAL-k0	444	148
MRAVH109. 12aa-G1T4/MRAL-k0	445	148
MRAVH110. 12aa-G1T4/MRAL-k0	446	148
MRAVH111. 12aa-G1T4/MRAL-k0	447	148
MRAVH112. 12aa-G1T4/MRAL-k0	448	148
MRAVH113. 12aa-G1T4/MRAL-k0	449	148
MRAVH114. 12aa-G1T4/MRAL-k0	450	148
MRAVH115. 12aa-G1T4/MRAL-k0	451	148
MRAVH116. 12aa-G1T4/MRAL-k0	452	148
MRAVH117. 12aa-G1T4/MRAL-k0	453	148
MRAVH118. 12aa-G1T4/MRAL-k0	454	148
MRAVH119. 12aa-G1T4/MRAL-k0	455	148
MRAH-G1T4. 118. 12aa/MRAL-k0	456	148
MRAH-G1T4. 119. 12aa/MRAL-k0	457	148
MRAH-G1T4. 120. 12aa/MRAL-k0	458	148
MRAH-G1T4. 121. 12aa/MRAL-k0	459	148
MRAH-G1T4. 122. 12aa/MRAL-k0	460	148
MRAH-G1T4. 123. 12aa/MRAL-k0	461	148
MRAH-G1T4. 124. 12aa/MRAL-k0	462	148
MRAH-G1T4. 129. 12aa/MRAL-k0	463	148
MRAH-G1T4. 130. 12aa/MRAL-k0	464	148
MRAH-G1T4. 131. 12aa/MRAL-k0	465	148
MRAH-G1T4. 132. 12aa/MRAL-k0	466	148
MRAH-G1T4. 134. 12aa/MRAL-k0	467	148
MRAH-G1T4. 135. 12aa/MRAL-k0	468	148
MRAH-G1T4. 137. 12aa/MRAL-k0	469	148
MRAH-G1T4. 139. 12aa/MRAL-k0	470	148

[0252] 12-2. プロテアーゼ切断配列を抗体重鎖に導入した抗ヒトIL-6R中和抗体

のプロテアーゼによる切断の評価

12-1で調製したMRA改変体がプロテアーゼにより切断されるどうかを検証した。プロテアーゼとしてリコンビナントヒトマトリプターゼ/ST14 触媒ドメイン (human MT-SP1, hMT-SP1) (R&D Systems, 3946-SE-010) を用い、プロテアーゼ 10nM、抗体 50 μ g/mL、PBS、37°Cの条件下で20時間反応させたのちに、還元SDS-PAGEに供した。結果は図22A、22B、22C、22D、22E、22F、22G、22H、22I、図23A、23B、23Cに示す。プロテアーゼ処理後のMRA改変体は、重鎖が切断され、プロテアーゼ処理を受けていないMRA改変体の重鎖 (図中のMT-SP1(-) laneの50kDa付近に出現するバンド) と比べて、より分子量の小さい位置に重鎖バンドが出現している。この結果から、12-1で調製したMRA改変体は、hMT-SP1によって切断されることが確認された。

[0253] 実施例13 軽鎖の多様な位置にプロテアーゼ切断配列を導入した抗体の評価

13-1 軽鎖の多様な位置にプロテアーゼ切断配列を導入した抗体の作製

ウロキナーゼ (uPA) およびマトリプターゼ (MT-SP1) で切断されることが報告されているペプチド配列B (配列番号 : 160) をMRA軽鎖可変領域 (MRAL、配列番号 : 230) 内の異なる位置にそれぞれ挿入し、表 1 0 で示すMRA軽鎖可変領域の改変体を作製した。これらのMRA軽鎖可変領域の改変体をそれぞれMRA軽鎖定常領域 (k0、配列番号 : 231) と連結させMRA軽鎖改変体の作製し、対応する遺伝子コードする発現ベクターを当業者公知の方法で作製した。また、ペプチド配列B (配列番号 : 160) をMRA軽鎖定常領域 (k0、配列番号 : 231) 内の異なる位置にそれぞれ挿入し、表 1 1 に示すMRA軽鎖定常領域の改変体を作製した。これらのMRA軽鎖定常領域の改変体をそれぞれMRA軽鎖可変領域 (MRAL、配列番号 : 230) と連結させMRA軽鎖改変体を作製し、対応する遺伝子をコードする発現ベクターを当業者公知の方法で作製した。作製されたMRA軽鎖可変領域の改変体およびMRA軽鎖定常領域の改変体におけるプロテアーゼ切断配列挿入位置も表 1 0、1 1 に示す。表 1 0 における挿入箇所とは、抗体軽鎖可変領域中の記載アミノ酸 (Kabatナンバリング) の定常領域側隣を指し、表 1 1 における挿入箇所とは、抗体軽鎖定常領域中の記載アミノ

酸（EUナンバリング）の可変領域側隣を指す。

[0254] [表10]

MRA 軽鎖可変領域の改変体及びプロテアーゼ切断配列挿入位置

MRA 軽鎖可変領域の改変体	プロテアーゼ切断配列挿入位置 (Kabat ナンバリング)	配列番号
MRAVL007. 12aa	7 番	232
MRAVL008. 12aa	8 番	233
MRAVL009. 12aa	9 番	234
MRAVL010. 12aa	10 番	235
MRAVL011. 12aa	11 番	236
MRAVL012. 12aa	12 番	237
MRAVL013. 12aa	13 番	238
MRAVL014. 12aa	14 番	239
MRAVL015. 12aa	15 番	240
MRAVL016. 12aa	16 番	241
MRAVL017. 12aa	17 番	242
MRAVL018. 12aa	18 番	243
MRAVL039. 12aa	39 番	244
MRAVL040. 12aa	40 番	245
MRAVL041. 12aa	41 番	246
MRAVL042. 12aa	42 番	247
MRAVL043. 12aa	43 番	248
MRAVL044. 12aa	44 番	249
MRAVL045. 12aa	45 番	250
MRAVL049. 12aa	49 番	251
MRAVL050. 12aa	50 番	252
MRAVL051. 12aa	51 番	253
MRAVL052. 12aa	52 番	254
MRAVL053. 12aa	53 番	255
MRAVL054. 12aa	54 番	256
MRAVL055. 12aa	55 番	257
MRAVL056. 12aa	56 番	258
MRAVL057. 12aa	57 番	259
MRAVL058. 12aa	58 番	260
MRAVL059. 12aa	59 番	261
MRAVL060. 12aa	60 番	262
MRAVL096. 12aa	96 番	263

MRAVL097. 12aa	97 番	264
MRAVL098. 12aa	98 番	265
MRAVL099. 12aa	99 番	266
MRAVL100. 12aa	100 番	267
MRAVL101. 12aa	101 番	268
MRAVL102. 12aa	102 番	269
MRAVL103. 12aa	103 番	270
MRAVL104. 12aa	104 番	271
MRAVL105. 12aa	105 番	272
MRAVL106. 12aa	106 番	273
MRAVL107. 12aa	107 番	274

[0255]

[表11]

MRA 軽鎖定常領域の改変体及びプロテアーゼ切断配列挿入位置

MRA 軽鎖定常領域の改変体	プロテアーゼ切断配列挿入位置 (EU ナンバリング)	配列番号
k0. 108. 12aa	109 番 (Kabat ナンバリング 109 番)	275
k0. 109. 12aa	110 番 (Kabat ナンバリング 110 番)	276
k0. 110. 12aa	111 番 (Kabat ナンバリング 111 番)	277
k0. 111. 12aa	112 番 (Kabat ナンバリング 112 番)	278
k0. 112. 12aa	113 番 (Kabat ナンバリング 113 番)	279
k0. 113. 12aa	114 番 (Kabat ナンバリング 114 番)	280
k0. 115. 12aa	116 番 (Kabat ナンバリング 116 番)	281
k0. 116. 12aa	117 番 (Kabat ナンバリング 117 番)	282
k0. 117. 12aa	118 番 (Kabat ナンバリング 118 番)	283
k0. 118. 12aa	119 番 (Kabat ナンバリング 119 番)	284
k0. 119. 12aa	120 番 (Kabat ナンバリング 120 番)	285
k0. 120. 12aa	121 番 (Kabat ナンバリング 121 番)	286
k0. 121. 12aa	122 番 (Kabat ナンバリング 122 番)	287
k0. 122. 12aa	123 番 (Kabat ナンバリング 123 番)	288
k0. 123. 12aa	124 番 (Kabat ナンバリング 124 番)	289
k0. 124. 12aa	125 番 (Kabat ナンバリング 125 番)	290
k0. 125. 12aa	126 番 (Kabat ナンバリング 126 番)	291
k0. 126. 12aa	127 番 (Kabat ナンバリング 127 番)	292
k0. 127. 12aa	128 番 (Kabat ナンバリング 128 番)	293
k0. 128. 12aa	129 番 (Kabat ナンバリング 129 番)	294
k0. 129. 12aa	130 番 (Kabat ナンバリング 130 番)	295
k0. 130. 12aa	131 番 (Kabat ナンバリング 131 番)	296

[0256] 上記で作製したMRA軽鎖改変体とMRA重鎖を組み合わせて、表 1 2 に示すMRA改変体を当業者公知の方法でFreeStyle293細胞 (Invitrogen) もしくはExpi293細胞 (Life technologies)を用いた一過性発現により発現し、プロテインAを用いた当業者公知の方法により精製を行った。

[0257]

[表12]

MRAH 改变体

抗体名	重鎖配列番号	軽鎖配列番号
MRAH-G1T4/MRAVL007. 12aa-k0	147	471
MRAH-G1T4/MRAVL008. 12aa-k0	147	472
MRAH-G1T4/MRAVL009. 12aa-k0	147	473
MRAH-G1T4/MRAVL010. 12aa-k0	147	474
MRAH-G1T4/MRAVL011. 12aa-k0	147	475
MRAH-G1T4/MRAVL012. 12aa-k0	147	476
MRAH-G1T4/MRAVL013. 12aa-k0	147	477
MRAH-G1T4/MRAVL014. 12aa-k0	147	478
MRAH-G1T4/MRAVL015. 12aa-k0	147	479
MRAH-G1T4/MRAVL016. 12aa-k0	147	480
MRAH-G1T4/MRAVL017. 12aa-k0	147	481
MRAH-G1T4/MRAVL018. 12aa-k0	147	482
MRAH-G1T4/MRAVL039. 12aa-k0	147	483
MRAH-G1T4/MRAVL040. 12aa-k0	147	484
MRAH-G1T4/MRAVL041. 12aa-k0	147	485
MRAH-G1T4/MRAVL042. 12aa-k0	147	486
MRAH-G1T4/MRAVL043. 12aa-k0	147	487
MRAH-G1T4/MRAVL044. 12aa-k0	147	488
MRAH-G1T4/MRAVL045. 12aa-k0	147	489
MRAH-G1T4/MRAVL049. 12aa-k0	147	490
MRAH-G1T4/MRAVL050. 12aa-k0	147	491
MRAH-G1T4/MRAVL051. 12aa-k0	147	492
MRAH-G1T4/MRAVL052. 12aa-k0	147	493
MRAH-G1T4/MRAVL053. 12aa-k0	147	494
MRAH-G1T4/MRAVL054. 12aa-k0	147	495
MRAH-G1T4/MRAVL055. 12aa-k0	147	496
MRAH-G1T4/MRAVL056. 12aa-k0	147	497
MRAH-G1T4/MRAVL057. 12aa-k0	147	498
MRAH-G1T4/MRAVL058. 12aa-k0	147	499
MRAH-G1T4/MRAVL059. 12aa-k0	147	500
MRAH-G1T4/MRAVL060. 12aa-k0	147	501
MRAH-G1T4/MRAVL096. 12aa-k0	147	502
MRAH-G1T4/MRAVL097. 12aa-k0	147	503

MRAH-G1T4/MRAVL098. 12aa-k0	147	504
MRAH-G1T4/MRAVL099. 12aa-k0	147	505
MRAH-G1T4/MRAVL100. 12aa-k0	147	506
MRAH-G1T4/MRAVL101. 12aa-k0	147	507
MRAH-G1T4/MRAVL102. 12aa-k0	147	508
MRAH-G1T4/MRAVL103. 12aa-k0	147	509
MRAH-G1T4/MRAVL104. 12aa-k0	147	510
MRAH-G1T4/MRAVL105. 12aa-k0	147	511
MRAH-G1T4/MRAVL106. 12aa-k0	147	512
MRAH-G1T4/MRAVL107. 12aa-k0	147	513
MRAH-G1T4/MRAL-k0. 108. 12aa	147	514
MRAH-G1T4/MRAL-k0. 109. 12aa	147	515
MRAH-G1T4/MRAL-k0. 110. 12aa	147	516
MRAH-G1T4/MRAL-k0. 111. 12aa	147	517
MRAH-G1T4/MRAL-k0. 112. 12aa	147	518
MRAH-G1T4/MRAL-k0. 113. 12aa	147	519
MRAH-G1T4/MRAL-k0. 115. 12aa	147	520
MRAH-G1T4/MRAL-k0. 116. 12aa	147	521
MRAH-G1T4/MRAL-k0. 117. 12aa	147	522
MRAH-G1T4/MRAL-k0. 118. 12aa	147	523
MRAH-G1T4/MRAL-k0. 119. 12aa	147	524
MRAH-G1T4/MRAL-k0. 120. 12aa	147	525
MRAH-G1T4/MRAL-k0. 121. 12aa	147	526
MRAH-G1T4/MRAL-k0. 122. 12aa	147	527
MRAH-G1T4/MRAL-k0. 123. 12aa	147	528
MRAH-G1T4/MRAL-k0. 124. 12aa	147	529
MRAH-G1T4/MRAL-k0. 125. 12aa	147	530
MRAH-G1T4/MRAL-k0. 126. 12aa	147	531
MRAH-G1T4/MRAL-k0. 127. 12aa	147	532
MRAH-G1T4/MRAL-k0. 128. 12aa	147	533
MRAH-G1T4/MRAL-k0. 129. 12aa	147	534
MRAH-G1T4/MRAL-k0. 130. 12aa	147	535

[0258] 13-2. プロテアーゼ切断配列を抗体軽鎖可変領域に導入した抗ヒトIL-6R中
和抗体のプロテアーゼによる切断の評価

13-1で調製したMRA改変体がプロテアーゼにより切断されるどうかを検証した。プロテアーゼとしてリコンビナントヒトマトリプターゼ/ST14 触媒ドメイン (MT-SP1) (R&D Systems, 3946-SE-010) を用い、プロテアーゼ 10 nM、抗体 50 μ g/mL、PBS、37°Cの条件下で20時間反応させたのちに、還元SDS-PAGEに供した。結果は図24A、24B、24C、24D、24E、図25A、25Bに示す。プロテアーゼ処理後切断されたMRA改変体は、プロテアーゼ処理を受けていないMRA改変体の軽鎖 (図中MT-SP1(-) laneの25kDa付近に出願するバンド) と比べて、より分子量の小さい位置に軽鎖バンドが出現している。

[0259] 実施例14 プロテアーゼ切断配列が導入された抗ヒトPD-1中和抗体の作製およびヒトPD-1に対する結合評価

14-1. 抗ヒトPD-1中和抗体へのプロテアーゼ切断配列の導入

ヒトPD-1に対する中和抗体5C4H-G1T4/5C4L-KT0 (重鎖5C4H-G1T4、配列番号: 297; 重鎖可変領域5C4H、配列番号: 300; 重鎖定常領域G1T4、配列番号: 301; 軽鎖5C4L-KT0、配列番号: 298; 軽鎖可変領域5C4L、配列番号: 302; 軽鎖定常領域KT0、配列番号: 303; H-CDR1 (NSGMH、配列番号: 392)、H-CDR2 (VIWYDGSKRYYADSVKG、配列番号: 393)、H-CDR3 (NDDY、配列番号: 394)、L-CDR1 (RASQSVSSYLA、配列番号: 395)、L-CDR2 (DASNRAT、配列番号: 396)、L-CDR3 (QQSSNWPRT、配列番号: 397)) の重鎖または軽鎖にプロテアーゼ切断配列を挿入し、プロテアーゼ切断配列が導入された抗体を作製した

まず、癌特異的に発現しているマトリプターゼ (MT-SP1) で切断されることが報告されているペプチド配列 (配列番号: 299) を前述抗体の重鎖5C4H-G1T4または軽鎖5C4L-KT0に挿入し、表13に示す重鎖改変体と表14に示す軽鎖改変体を作製し、当業者公知の方法で発現させた。

[0260] [表13]

抗ヒトPD1 中和抗体の重鎖改変体

重鎖改変体	配列番号	プロテアーゼ切断配列の挿入位置
5C4HA12aa-G1T4	304	可変領域 113 番 (Kabat ナンバリング) と定常領域 118 番 (EU ナンバリング) の間
5C4HA12aa-G1T4E	305	定常領域 118 番と 119 番の間 (EU ナンバリング)

[0261] [表14]

抗ヒト PD1 中和抗体の軽鎖改変体

軽鎖改変体	配列番号	プロテアーゼ切断配列の挿入位置
5C4LI12aa-KT0	306	可変領域 104 番と 105 番の間 (Kabat ナンバリング)
5C4LC12aa-KT0	307	可変領域 105 番と 106 番の間 (Kabat ナンバリング)
5C4LD12aa-KT0	308	可変領域 106 番と 107 番の間 (Kabat ナンバリング)
5C4LA12aa-KT0	309	可変領域 107 番 (Kabat ナンバリング) と定常領域 108 番 (EU ナンバリング) (定常領域 Kabat ナンバリング 108 番) の間
5C4LE12aa-KT0E	310	定常領域 108 番と 109 番の間 (EU ナンバリング) (定常領域 Kabat ナンバリング 108 番と定常領域 Kabat ナンバリング 109 番の間)
5C4LB12aa-KT0B	311	定常領域 109 番と 110 番の間 (EU ナンバリング) (定常領域 Kabat ナンバリング 109 番と定常領域 Kabat ナンバリング 110 番の間)
5C4LF12aa-KT0F	312	定常領域 110 番と 111 番の間 (EU ナンバリング) (定常領域 Kabat ナンバリング 110 番と定常領域 Kabat ナンバリング 111 番の間)
5C4LG12aa-KT0G	313	定常領域 111 番と 112 番の間 (EU ナンバリング) (定常領域 Kabat ナンバリング 111 番と定常領域 Kabat ナンバリング 112 番の間)
5C4LJ12aa-KT0J	314	定常領域 112 番と 113 番の間 (EU ナンバリング) (定常領域 Kabat ナンバリング 112 番と定常領域 Kabat ナンバリング 113 番の間)
5C4LK12aa-KT0K	315	定常領域 113 番と 114 番の間 (EU ナンバリング) (定常領域 Kabat ナンバリング 113 番と定常領域 Kabat ナンバリング 114 番の間)

[0262] 表 1 3 の重鎖改変体と軽鎖5C4L-KT0、または表 1 4 の軽鎖改変体と重鎖5C4H-G1T4を組み合わせて、プロテアーゼ切断配列が導入されたIgG1抗体 (表 1 5) を当業者公知の方法でExpi293 (Life Technologies)を用いた一過性発現により発現し、プロテインAを用いた当業者公知の方法により精製を行った。なおプロテアーゼ切断配列を含まない対照抗体として5C4H-G1T4/5C4L-KT0 (重鎖配列番号: 297、軽鎖配列番号: 298) を発現および精製した。

[0263]

[表15]

プロテアーゼ切断配列が導入された抗体

プロテアーゼ切断配列が導入された抗体	重鎖配列番号	軽鎖配列番号
5C4HA12aa-G1T4/5C4L-KT0	304	298
5C4HE12aa-G1T4E/5C4L-KT0	305	298
5C4H-G1T4/5C4LI12aa-KT0	297	306
5C4H-G1T4/5C4LC12aa-KT0	297	307
5C4H-G1T4/5C4LD12aa-KT0	297	308
5C4H-G1T4/5C4LA12aa-KT0	297	309
5C4H-G1T4/5C4LE12aa-KT0E	297	310
5C4H-G1T4/5C4LB12aa-KT0B	297	311
5C4H-G1T4/5C4LF12aa-KT0F	297	312
5C4H-G1T4/5C4LG12aa-KT0G	297	313
5C4H-G1T4/5C4LJ12aa-KT0J	297	314
5C4H-G1T4/5C4LK12aa-KT0K	297	315

[0264] 14-2. プロテアーゼ切断配列が導入された抗ヒトPD-1中和抗体のヒトPD-1に対する結合評価

14-2-1 プロテアーゼ処理

プロテアーゼ処理抗体は14-1で調製された抗体（終濃度0.111mg/mL）にPBSで1.8 μ g/mLに調製したRecombinant Human Matriptase/ST14 Catalytic Domain (hMT-SP1, R&D systems 3946-SE-010) を10 μ L加えた。プロテアーゼ未処理抗体は14-1で調製された抗体（終濃度0.111mg/mL）にPBSのみを10 μ L加えた。反応時のサンプル体積は90 μ Lであり、プロテアーゼの終濃度は0.2 μ g/mLであった。各サンプルを37℃で12時間保温した。

[0265] 14-2-2 ビオチン化抗ヒトPD-1中和抗体の調製

5C4H-G1T4/5C4L-KT0と同じ可変領域の配列を有しているビオチン化抗ヒトPD-1中和抗体を調製した。具体的には、重鎖可変領域5C4H（配列番号：300）に抗体の重鎖定常領域とビオチン（AviTag配列、配列番号：316）を付加した5C4VH-G1dGSBAP（配列番号：317）をコードする遺伝子断片を作製し、当業者公知の方法で動物細胞発現用ベクターに導入した。構築された発現ベクター

と軽鎖5C4L-KT0B（配列番号：298）を発現するベクターを293フレクチン（Invitrogen）を用いてFreeStyle293細胞（Invitrogen）に導入した。このときEBNA1（配列番号：318）を発現する遺伝子およびビオチンリガーゼ（BirA、配列番号：319）を発現する遺伝子を同時に導入し、ビオチン標識する目的でビオチンを添加した。遺伝子が導入された細胞を37℃、8% CO₂で培養し、目的のビオチン化抗ヒトPD-1中和抗体（5C4-bio）を培養上清中に分泌させた。培養上清から当業者公知の方法で5C4-bioを精製した。

[0266] 14-2-3 プロテアーゼ処理前後の各抗体のヒトPD-1に対する結合評価

14-2-1で調製されたプロテアーゼ処理抗体／プロテアーゼ未処理抗体80 μLに、終濃度0.67 μMとなるようにヒトPD-1を添加し、30分間室温で結合させ、結合評価用サンプルを調製した。抗体と結合しなかったPD-1の量を評価することで、抗体のプロテアーゼ処理／未処理時のPD-1に対する結合を評価した。

具体的に、抗体と結合しなかったPD-1の量を、実施例14-2-2で調製したビオチン化抗ヒトPD-1中和抗体（5C4-bio）を用いてバイオレイヤー干渉法（BLI法）で評価した。

結合評価用サンプル、5C4-bio、PBSをそれぞれTilted bottom (TW384) Micro plates (ForteBio、18-5076) の異なるウェルに分注した。Streptavidin バイオセンサー (ForteBio、18-0009) をPBSを用いて水和し、30℃の設定でOctet RED 384で測定が行われた。PBSが入ったウェルで30秒間ベースライン測定を実施し、その後200秒間5C4-bioをStreptavidinセンサーに結合させた。再度PBSが入ったウェルで30秒間ベースライン測定を実施し、その後結合評価用サンプルが入ったウェルで180秒間結合を測定し、PBSが入ったウェルで180秒間解離を測定した。結合の様子を示すリアルタイム結合グラフを図26に示す。図26に示す通り、プロテアーゼ切断配列が導入された抗体の場合、プロテアーゼ未処理抗体を含む結合評価用サンプルに比べて、プロテアーゼ処理抗体を含む結合評価用サンプルで測定するときの5C4-bioに結合するヒトPD-1の量が多かった。即ち、プロテアーゼ切断配列が導入された各抗体は、プロ

テアーゼ処理によってPD-1に対する結合活性が減弱し、PD-1が遊離し、5C4-bioに結合した。

[0267] 14-2-4 抗体のプロテアーゼ切断確認 (SDS-PAGE)

14-2-3で用いられた抗体がプロテアーゼ処理で切断されているかSDS-PAGEで確認した。14-2-3で調製されたプロテアーゼ切断抗体／プロテアーゼ未処理抗体のうち、10 μ Lを3.3 μ Lのサンプルバッファーと混合し、95°C5分間保温した。次にMini-PROTEAN TGX gel (4-20% 15well) (Bio-Rad #456-1096)を用いて電気泳動を行い、Sample Blue Safe Stain (novex, LC6065)でタンパク質を染色した。その結果を図27に示す。図27に示すように、プロテアーゼ切断配列を導入した各抗体はプロテアーゼ処理で切断された。

[0268] 14-2-5 プロテアーゼ処理前後の抗体のPD-1結合評価

プロテアーゼ切断配列が導入された各抗体のプロテアーゼ処理前後のPD-1に対する結合活性を別の方法でも測定した。

14-2-1で調製したプロテアーゼ処理抗体またはプロテアーゼ未処理抗体10 μ LをPBS 70 μ Lと混合し、PD-1結合測定サンプルとした。サンプルのPD-1結合評価はバイオレイヤー干渉法 (BLI法) で評価した。14-2-1で調製したプロテアーゼ処理抗体／プロテアーゼ未処理抗体とヒトPD-1 (250nM) をそれぞれ Tilted bottom (TW384) Microplates (ForteBio、18-5076) の異なるウェルに分注した。Protein Gセンサー (ForteBio、18-0022) をPBSを用いて水和し、30°Cの設定でOctet RED 384で測定が行われた。PBSが入ったウェルで30秒間ベースライン測定を実施し、その後200秒間抗体をProtein Gセンサーに結合させた。再度PBSが入ったウェルで30秒間ベースライン測定を実施し、その後ヒトPD-1が入ったウェルで180秒間結合を測定し、PBSが入ったウェルで180秒間解離を測定した。結合の様子を示すリアルタイム結合グラフを図28に示す。図28に示す通り、プロテアーゼ切断配列が導入された各抗体を使用する場合、プロテアーゼ未処理抗体に比べて、プロテアーゼ処理抗体のヒトPD-1結合量が減少した。

[0269] 14-3. プロテアーゼ切断配列を導入した抗ヒトPD-1中和抗体とリガンド(ヒト

PD-1)の複合体における、プロテアーゼによるリガンドリリース評価14-3-1 リガンド存在下のプロテアーゼ処理

14-1で調製された抗体（終濃度0.100mg/mL）にPBSで6.67 μ Mに調製したヒトPD-1を10 μ L添加し、抗体-PD-1複合体液を調製した。プロテアーゼ処理サンプルは、抗体-PD-1複合体液にPBSで5.28 μ g/mLに調製したRecombinant Human Matriptase/ST14 Catalytic Domain (hMT-SP1, R&D systems 3946-SE-010)を10 μ L加え、プロテアーゼ非処理サンプルはPBSのみを10 μ L加えた。反応時のプロテアーゼの終濃度は0.528 μ g/mLであった。各サンプルを37°Cで12時間保温した。

[0270] 14-3-2 プロテアーゼ処理後のPD-1リリースの評価

抗体と複合体を形成していないPD-1の量を実施例14-2-2で調製したビオチン化抗ヒトPD-1中和抗体（5C4-bio）を用いてバイオレイヤー干渉法（BLI法）で評価した。

14-3-1で調製された各サンプル、5C4-bio、PBSをそれぞれTilted bottom (TW384) Micro plates (ForteBio, 18-5076)の異なるウェルに分注した。Streptavidinバイオセンサー (ForteBio, 18-0009)をPBSを用いて水和し、30°Cの設定でOctet RED 384で測定が行われた。PBSが入ったウェルで30秒間ベースライン測定を実施し、その後200秒間5C4-bioをStreptavidinセンサーに結合させた。再度PBSが入ったウェルで30秒間ベースライン測定を実施し、プロテアーゼ処理サンプルまたはプロテアーゼ未処理サンプルが入ったウェルで180秒間結合を測定し、PBSが入ったウェルで180秒間解離を測定した。結合の様子を示すリアルタイム結合グラフを図29に示す。図29に示す通り、プロテアーゼ切断配列が導入された各抗体の場合、プロテアーゼ未処理サンプルに比べ、プロテアーゼ処理サンプルの方では5C4-bioに結合するヒトPD-1の量が増加した。即ち、プロテアーゼ処理により各抗体のPD-1に対する結合活性が減弱し、抗体-PD-1複合体からPD-1が遊離し、リリースされた。

[0271] 実施例15 プロテアーゼ切断配列が導入された抗ヒトPD-1中和抗体とヒトPD-1の融合タンパク質（抗PD-1中和抗体 - PD-1融合タンパク質）の作製及び評価

15-1. 抗ヒトPD-1中和抗体とヒトPD-1の融合タンパク質の作製

実施例14-1で作製された抗体の重鎖または重鎖改変体のN末端に、グリシン-セリンポリマー（配列番号：321）からなる可動リンカーを介してヒトPD-1配列（配列番号：320）を接続し、PD-1融合重鎖を作製した（表16）。

[0272] [表16]

PD1 融合重鎖

重鎖／重鎖改変体	プロテアーゼ 切断配列挿入有無	PD1 融合重鎖
5C4HA12aa-G1T4 （配列番号：304）	有り	hPD15C4HA12aa-G1T4（配列番号：323）
5C4HE12aa-G1T4E （重鎖配列番号：305）	有り	hPD15C4HE12aa-G1T4E（配列番号：324）

[0273] また、実施例14-1で作製された抗体の軽鎖または軽鎖改変体のN末端に、グリシン-セリンポリマー（配列番号：321）からなる可動リンカーを介してヒトPD-1配列（配列番号：320）を接続し、PD-1融合軽鎖を作製した（表17）。

。

[0274]

[表17]

PD1 融合軽鎖

軽鎖／軽鎖改変体	プロテアーゼ切断 配列挿入有無	PD1 融合軽鎖
5C4LH12aa-KT0 (配列番号：322)	無し	hPD15C4LH12aa-KT0 (配列番号：325)
5C4LI12aa-KT0 (配列番号：306)	有り	hPD15C4LI12aa-KT0 (配列番号：326)
5C4LC12aa-KT0 (配列番号：307)	有り	hPD15C4LC12aa-KT0 (配列番号：327)
5C4LD12aa-KT0 (配列番号：308)	有り	hPD15C4LD12aa-KT0 (配列番号：328)
5C4LE12aa-KT0E (配列番号：310)	有り	hPD15C4LE12aa-KT0E (配列番号：329)
5C4LB12aa-KT0B (配列番号：311)	有り	hPD15C4LB12aa-KT0B (配列番号：330)
5C4LF12aa-KT0F (配列番号：312)	有り	hPD15C4LF12aa-KT0F (配列番号：331)
5C4LG12aa-KT0G (配列番号：313)	有り	hPD15C4LG12aa-KT0G (配列番号：332)
5C4LJ12aa-KT0J (配列番号：314)	有り	hPD15C4LJ12aa-KT0J (配列番号：333)
5C4LK12aa-KT0K (配列番号：315)	有り	hPD15C4LK12aa-KT0K (配列番号：334)

- [0275] 表 1 6 のPD-1融合重鎖と軽鎖5C4L-KT0、または表 1 7 のPD-1融合軽鎖と重鎖5C4H-G1T4を組み合わせた以下の抗PD-1中和抗体-PD-1融合タンパク質：
- hPD15C4HA12aa-G1T4/5C4L-KT0 (PD-1融合重鎖配列番号：323、軽鎖配列番号：298)
- hPD15C4HE12aa-G1T4E/5C4L-KT0 (PD-1融合重鎖配列番号：324、軽鎖配列番号：298)
- 5C4H-G1T4/hPD15C4LH12aa-KT0 (重鎖配列番号：297、PD-1融合軽鎖配列番号：325)
- 5C4H-G1T4/hPD15C4LI12aa-KT0 (重鎖配列番号：297、PD-1融合軽鎖配列番号

: 326)

5C4H-G1T4/hPD15C4LC12aa-KT0 (重鎖配列番号 : 297、PD-1融合軽鎖配列番号

: 327)

5C4H-G1T4/hPD15C4LD12aa-KT0 (重鎖配列番号 : 297、PD-1融合軽鎖配列番号

: 328)

5C4H-G1T4/hPD15C4LE12aa-KT0E (重鎖配列番号 : 297、PD-1融合軽鎖配列番号

: 329)

5C4H-G1T4/hPD15C4LB12aa-KT0B (重鎖配列番号 : 297、PD-1融合軽鎖配列番号

: 330)

5C4H-G1T4/hPD15C4LF12aa-KT0F (重鎖配列番号 : 297、PD-1融合軽鎖配列番号

: 331)

5C4H-G1T4/hPD15C4LG12aa-KT0G (重鎖配列番号 : 297、PD-1融合軽鎖配列番号

: 332)

5C4H-G1T4/hPD15C4LJ12aa-KT0J (重鎖配列番号 : 297、PD-1融合軽鎖配列番号

: 333)

5C4H-G1T4/hPD15C4LK12aa-KT0K (重鎖配列番号 : 297、PD-1融合軽鎖配列番号

: 334)

を当業者公知の方法でExpi293 (Life Technologies)を用いた一過性発現により発現し、プロテインAを用いた当業者公知の方法により精製を行った。なおプロテアーゼ切断配列を含まない対照抗体として5C4H-G1T4/5C4L-KT0 (重鎖配列番号 : 297、軽鎖配列番号 : 298)) を同様に発現および精製した。

[0276] 15-2. 抗PD-1中和抗体 - PD-1融合タンパク質のプロテアーゼによる切断評価

15-2-1 プロテアーゼ処理

プロテアーゼ処理融合タンパク質は15-1で調製された融合タンパク質30 μ gにPBSで16.7 μ g/mLに調製したRecombinant Human Matriptase/ST14 Catalytic Domain (hMT-SP1, R&D systems 3946-SE-010) を4.9 μ L加えた。プロテアーゼ未処理融合タンパク質は15-1で調製された融合タンパク質30 μ gにPBSのみを4.9 μ L加えた。プロテアーゼ処理融合タンパク質またはプロテアーゼ未

処理融合タンパク質を37℃で12時間保温した。

[0277] 15-2-2 プロテアーゼ処理によるPD-1の遊離評価

プロテアーゼ処理によるPD-1遊離を実施例14-2-2で調製したビオチン化抗ヒトPD-1中和抗体 (5C4-bio) を用いてバイオレイヤー干渉法 (BLI法) で評価した。

15-2-1で調製したプロテアーゼ処理融合タンパク質、プロテアーゼ未処理融合タンパク質、5C4-bio、PBSをそれぞれTilted bottom (TW384) Micro plates (ForteBio、18-5076) の異なるウェルに分注した。Streptavidinバイオセンサー (ForteBio、18-0009) をPBSを用いて水和し、30℃の設定でOctet R ED 384で測定が行われた。PBSが入ったウェルで30秒間ベースライン測定を実施し、その後200秒間5C4-bioをStreptavidinセンサーに結合させた。再度PBSが入ったウェルで30秒間ベースライン測定を実施しその後プロテアーゼ処理融合タンパク質またはプロテアーゼ未処理融合タンパク質が入ったウェルで180秒間結合を測定し、PBSが入ったウェルで180秒間解離を測定した。結合の様子を示すリアルタイム結合グラフを図30に示す。図30に示す通り、プロテアーゼ切断配列が導入された抗体を含む抗体-PD-1融合タンパク質の場合、プロテアーゼ未処理サンプルに比べて、プロテアーゼ処理サンプルの方では5C4-bioに結合するヒトPD-1の量が増加した。即ち、プロテアーゼ処理により融合タンパク質中の抗体のPD-1に対する結合活性が減弱し、PD-1が融合タンパク質から遊離した。

[0278] 15-2-3 抗PD-1中和抗体-PD-1融合タンパク質の切断の確認 (SDS-PAGE)

15-2-1で調製されたプロテアーゼ処理融合タンパク質がプロテアーゼ処理で切断されているかSDS-PAGEで確認した。15-2-1で調製されたプロテアーゼ処理融合タンパク質またはプロテアーゼ未処理融合タンパク質のうち、10 μ Lを3.3 μ Lのサンプルバッファーと混合し、95℃5分間保温した。次にMini-PROTEAN TGX gel(4-20% 15well) (Bio-Rad #456-1096)を用いて電気泳動を行い、Sample Blue Safe Stain(novex, LC6065)でタンパク質を染色した。その結果を図31に示す。図31に示すように、プロテアーゼ切断配列を導入した抗体

を含む融合タンパク質はプロテアーゼ処理で切断された。

[0279] 実施例16 抗ヒトCXCL10中和抗体に各種プロテアーゼ切断配列を導入した抗体の評価

16-1 各種プロテアーゼ切断配列を導入した抗体改変体の作成

ヒトCXCL10を中和する抗体であるMabCXCL10_G7（重鎖：G7H-G1T4（配列番号：368）、軽鎖：G7L-LT0（配列番号：369））の軽鎖可変領域と定常領域の境界付近に表18中に示すプロテアーゼ切断配列を挿入し、異なるプロテアーゼ切断配列を有するMabCXCL10_G7の軽鎖改変体を作製した（表19）。

上記で作成したプロテアーゼ切断配列を有する軽鎖改変体と重鎖を組み合わせて、表20)に示すMabCXCL10_G7改変体を当業者公知の方法でExpi293細胞（Life technologies）を用いた一過性発現により発現し、プロテインAを用いた当業者公知の方法により精製を行った。

[0280] [表18]

プロテアーゼ切断配列

配列番号	切断配列
818	TSTSGRSANPRG
819	TSYTGRSAVPRG
820	TSYSGRSAVYRG
821	TSYSGRSAVVVG
822	TSYSGRSAVHRG
823	TSYTGRSAVYRG
824	TSYTGRSAVVVG
830	TSYTGRSAVHRG
831	TSYTGRSAVPGG
832	TSYSGRSAVYGG
833	TSYSGRSAVVGG
834	TSYSGRSAVHGG
835	TSYTGRSAVYGG
836	TSYTGRSAVVGG
818	TSYTGRSAVHGG

[0281]

[表19]

MabCXCL10_G7 軽鎖改変体

配列番号	軽鎖改変体名
1146	G7L.106a.12aa-LT0
1147	G7L.12aa0089.001-LT0
1148	G7L.12aa0089.002-LT0
1149	G7L.12aa0089.003-LT0
1150	G7L.12aa0089.004-LT0
1151	G7L.12aa0089.005-LT0
1152	G7L.12aa0089.006-LT0
1153	G7L.12aa0089.007-LT0
1154	G7L.12aa0089.001.R11G-LT0
1155	G7L.12aa0089.002.R11G-LT0
1156	G7L.12aa0089.003.R11G-LT0
1157	G7L.12aa0089.004.R11G-LT0
1158	G7L.12aa0089.005.R11G-LT0
1159	G7L.12aa0089.006.R11G-LT0
1160	G7L.12aa0089.007.R11G-LT0

[0282] [表20]

MabCXCL10_G7 改変体

抗体改変体名	重鎖配列番号	軽鎖配列番号
G7L.106a.12aa	368	1146
G7L.12aa0089.001	368	1147
G7L.12aa0089.002	368	1148
G7L.12aa0089.003	368	1149
G7L.12aa0089.004	368	1150
G7L.12aa0089.005	368	1151
G7L.12aa0089.006	368	1152
G7L.12aa0089.007	368	1153
G7L.12aa0089.001.R11G	368	1154
G7L.12aa0089.002.R11G	368	1155
G7L.12aa0089.003.R11G	368	1156
G7L.12aa0089.004.R11G	368	1157
G7L.12aa0089.005.R11G	368	1158
G7L.12aa0089.006.R11G	368	1159
G7L.12aa0089.007.R11G	368	1160

[0283] 16-2 プロテアーゼ切断配列が導入され抗体改変体のプロテアーゼによる切断の評価

16-1で調製した抗体改変体がプロテアーゼ処理により切断されるかSDS-PAGE

Eで検証した。プロテアーゼとしてリコンビナントヒトu-Plasminogen Activator/Urokinase (human uPA, huPA) (R&D Systems, 1310-SE-010) を用い、プロテアーゼ 40 nM、抗体改変体 100 μ g/mL、PBS、37°Cの条件下で1時間反応させたのちに、還元SDS-PAGEに供した。その結果、プロテアーゼ切断配列が導入された各抗体改変体はいずれもプロテアーゼ処理で切断されることを確認した。即ち、表18中のプロテアーゼ切断配列がプロテアーゼにより切断可能であることが示された。また、G7L.106a.12aa以外の抗体改変体のいずれも、G7L.106a.12aaより効率よく切断された。

[0284] 実施例17 抗ヒトCXCL10中和抗体に導入する各種プロテアーゼ切断配列の検討、および切断配列を導入した抗体の評価

17-1 プロテアーゼ切断配列を導入した抗体改変体の作製

実施例16で見出したプロテアーゼ切断配列に加えて、切断効率の向上とプロテアーゼに対する選択性向上を目的に更なるプロテアーゼ切断配列の検討を実施した。ヒトCXCL10を中和する抗体であるMabCXCL10_G7（重鎖：G7H-G1T4（配列番号：1181）、軽鎖：G7L-LT0（配列番号：1182））の軽鎖可変領域と定常領域の境界付近に表GT1中に示すプロテアーゼ切断配列を挿入し、異なるプロテアーゼ切断配列を有するMabCXCL10_G7の軽鎖改変体を作製した（表22）。

上記で作製したプロテアーゼ切断配列を有する軽鎖改変体と重鎖を組み合わせて、表23に示すMabCXCL10_G7改変体を実施例16に記載した同様の方法により作製した。

[0285]

[表21]

プロテアーゼ切断配列

配列番号	切断配列
1183	TSTSGRSANPRG
1184	TSTSGRSANPAG
1185	TSTSGRSANPHG
1186	TSTSGRSANPIG
1187	TSTSGRSANPLG
1188	TSTSGRSANPSG
1189	ISTSGRSANPIG
1190	YSTSGRSANPIG
1191	TSYSGRSAPVAG
1192	TSPSGRSANIAG
1193	TSPSGRSANFAG
1194	TSPTGRSANPAG
1195	TSPSGRSAIPAG
1196	TSYTGRSANPAG
1197	TSYSGRSAIPAG
1198	TSISGRSANYAG
1199	TSPSGRSAGPAG
1200	TSYTGRSAVPAG
1201	TSYTGRSAVYAG
1202	TSYTGRSAVVAG
1203	TSYTGRSAVHAG
1204	TSYSGRSAPVPHG
1205	TSPSGRSANIHG
1206	TSPSGRSANFHG
1207	TSPTGRSANPHG
1208	TSPSGRSAIPHG
1209	TSYTGRSANPHG
1210	TSYSGRSAIPHG
1211	TSISGRSANYHG
1212	TSPSGRSAGPHG
1213	TSYTGRSAVPHG
1214	TSYTGRSAVYHG
1215	TSYTGRSAVVHG
1216	TSYTGRSAVHHG
1217	TSYSGRSAPVIG
1218	TSPSGRSANIIG
1219	TSPSGRSANFIG
1220	TSPTGRSANPIG
1221	TSPSGRSAPIG
1222	TSYTGRSANPIG

1223	TSYSGRSAIPIG
1224	TSISGRSANYIG
1225	TSPSGRSAGPIG
1226	TSYTGRSAVPIG
1227	TSYTGRSAVYIG
1228	TSYTGRSAVVIG
1229	TSYTGRSAVHIG
1230	TSYSGRSAVPLG
1231	TSPSGRSANILG
1232	TSPSGRSANFLG
1233	TSPTGRSANPLG
1234	TSPSGRSAIPLG
1235	TSYTGRSANPLG
1236	TSYSGRSAIPLG
1237	TSISGRSANYLG
1238	TSPSGRSAGPLG
1239	TSYTGRSAVPLG
1240	TSYTGRSAVYLG
1241	TSYTGRSAVVLG
1242	TSYTGRSAVHLG
1243	TSYSGRSAVPSG
1244	TSPSGRSANISG
1245	TSPSGRSANFSG
1246	TSPTGRSANPSG
1247	TSPSGRSAIPSG
1248	TSYTGRSANPSG
1249	TSYSGRSAIPSG
1250	TSISGRSANYSG
1251	TSPSGRSAGPSG
1252	TSYTGRSAVPSG
1253	TSYTGRSAVYSG
1254	TSYTGRSAVVSG
1255	TSYTGRSAVHSG
1256	ISYSGRSAVPIG
1257	ISPSGRSANIIG
1258	ISPSGRSANFIG
1259	ISPTGRSANPIG
1260	ISPSGRSAIPIG
1261	ISYTGRSANPIG
1262	ISYSGRSAIPIG

1263	ISISGRSANYIG
1264	ISPSGRSAGPIG
1265	ISYTGRSAVPIG
1266	ISYTGRSAVYIG
1267	ISYTGRSAVVIG
1268	ISYTGRSAVHIG
1269	YSYSGRSAPVIG
1270	YSPSGRSANIIG
1271	YSPSGRSANFIG
1272	YSPTGRSANPIG
1273	YSPSGRSAIPIG
1274	YSYTGRSANPIG
1275	YSYSGRSAIPIG
1276	YSISGRSANYIG
1277	YSPSGRSAGPIG
1278	YSYTGRSAVPIG
1279	YSYTGRSAVYIG
1280	YSYTGRSAVVIG
1281	YSYTGRSAVHIG

[0286]

[表22]

MabCXCL10_G7 の軽鎖改変体

配列番号	改変軽鎖名
1282	G7L.106a.12aa-LT0
1283	G7L.12aa.0177-LT0
1284	G7L.12aa.0180-LT0
1285	G7L.12aa.0181-LT0
1286	G7L.12aa.0182-LT0
1287	G7L.12aa.0185-LT0
1288	G7L.12aa0163-LT0
1289	G7L.12aa0166-LT0
1290	G7L.12aa0089.0177-LT0
1291	G7L.12aa0019.0177-LT0
1292	G7L.12aa0020.0177-LT0
1293	G7L.12aa0069.0177-LT0
1294	G7L.12aa0071.0177-LT0
1295	G7L.12aa0087.0177-LT0
1296	G7L.12aa0090.0177-LT0
1297	G7L.12aa0120.0177-LT0
1298	G7L.12aa0157.0177-LT0
1299	G7L.12aa0089.001.0177-LT0
1300	G7L.12aa0089.005.0177-LT0
1301	G7L.12aa0089.006.0177-LT0
1302	G7L.12aa0089.007.0177-LT0
1303	G7L.12aa0089.0180-LT0
1304	G7L.12aa0019.0180-LT0
1305	G7L.12aa0020.0180-LT0
1306	G7L.12aa0069.0180-LT0
1307	G7L.12aa0071.0180-LT0
1308	G7L.12aa0087.0180-LT0
1309	G7L.12aa0090.0180-LT0
1310	G7L.12aa0120.0180-LT0
1311	G7L.12aa0157.0180-LT0
1312	G7L.12aa0089.001.0180-LT0
1313	G7L.12aa0089.005.0180-LT0
1314	G7L.12aa0089.006.0180-LT0
1315	G7L.12aa0089.007.0180-LT0
1316	G7L.12aa0089.0181-LT0
1317	G7L.12aa0019.0181-LT0
1318	G7L.12aa0020.0181-LT0
1319	G7L.12aa0069.0181-LT0
1320	G7L.12aa0071.0181-LT0
1321	G7L.12aa0087.0181-LT0

1322	G7L.12aa0090.0181-LT0
1323	G7L.12aa0120.0181-LT0
1324	G7L.12aa0157.0181-LT0
1325	G7L.12aa0089.001.0181-LT0
1326	G7L.12aa0089.005.0181-LT0
1327	G7L.12aa0089.006.0181-LT0
1328	G7L.12aa0089.007.0181-LT0
1329	G7L.12aa0089.0182-LT0
1330	G7L.12aa0019.0182-LT0
1331	G7L.12aa0020.0182-LT0
1332	G7L.12aa0069.0182-LT0
1333	G7L.12aa0071.0182-LT0
1334	G7L.12aa0087.0182-LT0
1335	G7L.12aa0090.0182-LT0
1336	G7L.12aa0120.0182-LT0
1337	G7L.12aa0157.0182-LT0
1338	G7L.12aa0089.001.0182-LT0
1339	G7L.12aa0089.005.0182-LT0
1340	G7L.12aa0089.006.0182-LT0
1341	G7L.12aa0089.007.0182-LT0
1342	G7L.12aa0089.0185-LT0
1343	G7L.12aa0019.0185-LT0
1344	G7L.12aa0020.0185-LT0
1345	G7L.12aa0069.0185-LT0
1346	G7L.12aa0071.0185-LT0
1347	G7L.12aa0087.0185-LT0
1348	G7L.12aa0090.0185-LT0
1349	G7L.12aa0120.0185-LT0
1350	G7L.12aa0157.0185-LT0
1351	G7L.12aa0089.001.0185-LT0
1352	G7L.12aa0089.005.0185-LT0
1353	G7L.12aa0089.006.0185-LT0
1354	G7L.12aa0089.007.0185-LT0
1355	G7L.12aa0089.0200-LT0
1356	G7L.12aa0019.0200-LT0
1357	G7L.12aa0020.0200-LT0
1358	G7L.12aa0069.0200-LT0
1359	G7L.12aa0071.0200-LT0
1360	G7L.12aa0087.0200-LT0
1361	G7L.12aa0090.0200-LT0

1362	G7L.12aa0120.0200-LT0
1363	G7L.12aa0157.0200-LT0
1364	G7L.12aa0089.001.0200-LT0
1365	G7L.12aa0089.005.0200-LT0
1366	G7L.12aa0089.006.0200-LT0
1367	G7L.12aa0089.007.0200-LT0
1368	G7L.12aa0089.0203-LT0
1369	G7L.12aa0019.0203-LT0
1370	G7L.12aa0020.0203-LT0
1371	G7L.12aa0069.0203-LT0
1372	G7L.12aa0071.0203-LT0
1373	G7L.12aa0087.0203-LT0
1374	G7L.12aa0090.0203-LT0
1375	G7L.12aa0120.0203-LT0
1376	G7L.12aa0157.0203-LT0
1377	G7L.12aa0089.001.0203-LT0
1378	G7L.12aa0089.005.0203-LT0
1379	G7L.12aa0089.006.0203-LT0
1380	G7L.12aa0089.007.0203-LT0

[0287]

[表23]

MabCXCL10_G7 改变体

抗体改变体名	重鎖配列番号	軽鎖配列番号
G7L.106a.12aa	1181	1282
G7L.12aa.0177	1181	1283
G7L.12aa.0180	1181	1284
G7L.12aa.0181	1181	1285
G7L.12aa.0182	1181	1286
G7L.12aa.0185	1181	1287
G7L.12aa0163	1181	1288
G7L.12aa0166	1181	1289
G7L.12aa0089.0177	1181	1290
G7L.12aa0019.0177	1181	1291
G7L.12aa0020.0177	1181	1292
G7L.12aa0069.0177	1181	1293
G7L.12aa0071.0177	1181	1294
G7L.12aa0087.0177	1181	1295
G7L.12aa0090.0177	1181	1296
G7L.12aa0120.0177	1181	1297
G7L.12aa0157.0177	1181	1298
G7L.12aa0089.001.0177	1181	1299
G7L.12aa0089.005.0177	1181	1300
G7L.12aa0089.006.0177	1181	1301
G7L.12aa0089.007.0177	1181	1302
G7L.12aa0089.0180	1181	1303
G7L.12aa0019.0180	1181	1304
G7L.12aa0020.0180	1181	1305
G7L.12aa0069.0180	1181	1306
G7L.12aa0071.0180	1181	1307
G7L.12aa0087.0180	1181	1308
G7L.12aa0090.0180	1181	1309
G7L.12aa0120.0180	1181	1310
G7L.12aa0157.0180	1181	1311
G7L.12aa0089.001.0180	1181	1312
G7L.12aa0089.005.0180	1181	1313
G7L.12aa0089.006.0180	1181	1314
G7L.12aa0089.007.0180	1181	1315
G7L.12aa0089.0181	1181	1316
G7L.12aa0019.0181	1181	1317
G7L.12aa0020.0181	1181	1318
G7L.12aa0069.0181	1181	1319
G7L.12aa0071.0181	1181	1320
G7L.12aa0087.0181	1181	1321

G7L.12aa0090.0181	1181	1322
G7L.12aa0120.0181	1181	1323
G7L.12aa0157.0181	1181	1324
G7L.12aa0089.001.0181	1181	1325
G7L.12aa0089.005.0181	1181	1326
G7L.12aa0089.006.0181	1181	1327
G7L.12aa0089.007.0181	1181	1328
G7L.12aa0089.0182	1181	1329
G7L.12aa0019.0182	1181	1330
G7L.12aa0020.0182	1181	1331
G7L.12aa0069.0182	1181	1332
G7L.12aa0071.0182	1181	1333
G7L.12aa0087.0182	1181	1334
G7L.12aa0090.0182	1181	1335
G7L.12aa0120.0182	1181	1336
G7L.12aa0157.0182	1181	1337
G7L.12aa0089.001.0182	1181	1338
G7L.12aa0089.005.0182	1181	1339
G7L.12aa0089.006.0182	1181	1340
G7L.12aa0089.007.0182	1181	1341
G7L.12aa0089.0185	1181	1342
G7L.12aa0019.0185	1181	1343
G7L.12aa0020.0185	1181	1344
G7L.12aa0069.0185	1181	1345
G7L.12aa0071.0185	1181	1346
G7L.12aa0087.0185	1181	1347
G7L.12aa0090.0185	1181	1348
G7L.12aa0120.0185	1181	1349
G7L.12aa0157.0185	1181	1350
G7L.12aa0089.001.0185	1181	1351
G7L.12aa0089.005.0185	1181	1352
G7L.12aa0089.006.0185	1181	1353
G7L.12aa0089.007.0185	1181	1354
G7L.12aa0089.0200	1181	1355
G7L.12aa0019.0200	1181	1356
G7L.12aa0020.0200	1181	1357
G7L.12aa0069.0200	1181	1358
G7L.12aa0071.0200	1181	1359
G7L.12aa0087.0200	1181	1360
G7L.12aa0090.0200	1181	1361

G7L.12aa0120.0200	1181	1362
G7L.12aa0157.0200	1181	1363
G7L.12aa0089.001.0200	1181	1364
G7L.12aa0089.005.0200	1181	1365
G7L.12aa0089.006.0200	1181	1366
G7L.12aa0089.007.0200	1181	1367
G7L.12aa0089.0203	1181	1368
G7L.12aa0019.0203	1181	1369
G7L.12aa0020.0203	1181	1370
G7L.12aa0069.0203	1181	1371
G7L.12aa0071.0203	1181	1372
G7L.12aa0087.0203	1181	1373
G7L.12aa0090.0203	1181	1374
G7L.12aa0120.0203	1181	1375
G7L.12aa0157.0203	1181	1376
G7L.12aa0089.001.0203	1181	1377
G7L.12aa0089.005.0203	1181	1378
G7L.12aa0089.006.0203	1181	1379
G7L.12aa0089.007.0203	1181	1380

[0288] 17-2 プロテアーゼ切断配列が導入された抗体改変体のプロテアーゼによる切断の評価

17-1で調製した抗体改変体がプロテアーゼ処理により切断されるかどうかを検証した。プロテアーゼとしてリコンビナントヒトu-Plasminogen Activator/Urokinase (human uPA, huPA) (R&D Systems;1310-SE-010)もしくはリコンビナントヒトMatriptase/ST14 Catalytic Domain (human MT-SP1, hMT-SP1) (R&D Systems; 3946-SE-010)を用い、huPA 40 nMもしくはhMT-SP1 3 nM、抗体改変体 100 μ g/mL、PBS、37℃の条件下で1時間反応させたのちに、キャピラリー電気泳動イムノアッセイに供した。キャピラリー電気泳動イムノアッセイにはWes (Protein Simple) を使用し、切断前後の軽鎖の検出には抗ヒトlambda鎖HRP標識抗体 (abcam; ab9007) を使用した。その結果、プロテアーゼ処理前に確認された36kDa付近のピークが消失し、20kDa付近に新たにピークが出現した。即ち、36kDa付近のピークが抗体改変体の未切断軽鎖であり、20kDa付近のピークが切断軽鎖と考えられた。プロテアーゼ処理後に得られた各ピークの面積をWes専用のソフトウェア (Compass for SW; Protein Simp

le) を用いて出力し、抗体改変体の切断率 (%) は (切断軽鎖ピーク面積) *100 / (切断軽鎖ピーク面積 + 未切断軽鎖ピーク面積) の式により算出した。huPA処理による抗体改変体の切断率 (%) を表 2 4、hMT-SP1処理による抗体改変体の切断率 (%) を表 2 5 に示した。前記表 2 4 および表 2 5 に示した抗体改変体の中で、G7L.106a.12aa (重鎖 : G7H-G1T4 (配列番号 : 1181)、軽鎖 : G7L.106a.12aa-LT0 (配列番号 : 1282)) と比較してhuPAによる切断率が高くhMT-SP1における切断率が低い、即ちhuPAへより選択性の高い抗体改変体を表 2 6 に示した。

[0289]

[表24]

抗体改変体の切断率 (huPA)

抗体改変体名	切断率 (%)
G7L.106a.12aa	86.82
G7L.12aa.0177	85.50
G7L.12aa.0180	85.66
G7L.12aa.0181	84.87
G7L.12aa.0182	83.98
G7L.12aa.0185	82.91
G7L.12aa0163	88.58
G7L.12aa0166	88.12
G7L.12aa0089.0177	79.35
G7L.12aa0019.0177	91.10
G7L.12aa0020.0177	88.82
G7L.12aa0069.0177	88.84
G7L.12aa0071.0177	71.65
G7L.12aa0087.0177	88.64
G7L.12aa0090.0177	82.65
G7L.12aa0120.0177	90.00
G7L.12aa0157.0177	77.63
G7L.12aa0089.001.0177	79.68
G7L.12aa0089.005.0177	91.36
G7L.12aa0089.006.0177	88.39
G7L.12aa0089.007.0177	86.52
G7L.12aa0089.0180	82.10
G7L.12aa0019.0180	82.83
G7L.12aa0020.0180	89.09
G7L.12aa0069.0180	85.85
G7L.12aa0071.0180	85.87
G7L.12aa0087.0180	87.87
G7L.12aa0090.0180	87.52
G7L.12aa0120.0180	83.14
G7L.12aa0157.0180	87.37
G7L.12aa0089.001.0180	78.29
G7L.12aa0089.005.0180	85.47
G7L.12aa0089.006.0180	87.50
G7L.12aa0089.007.0180	90.07
G7L.12aa0089.0181	82.88
G7L.12aa0019.0181	89.53
G7L.12aa0020.0181	88.63
G7L.12aa0069.0181	84.37
G7L.12aa0071.0181	87.39

G7L.12aa0087.0181	88.12
G7L.12aa0090.0181	78.62
G7L.12aa0120.0181	77.98
G7L.12aa0157.0181	79.61
G7L.12aa0089.001.0181	89.18
G7L.12aa0089.005.0181	90.12
G7L.12aa0089.006.0181	89.92
G7L.12aa0089.007.0181	91.27
G7L.12aa0089.0182	no data
G7L.12aa0019.0182	87.05
G7L.12aa0020.0182	90.72
G7L.12aa0069.0182	89.73
G7L.12aa0071.0182	82.75
G7L.12aa0087.0182	85.02
G7L.12aa0090.0182	81.94
G7L.12aa0120.0182	80.22
G7L.12aa0157.0182	78.22
G7L.12aa0089.001.0182	83.32
G7L.12aa0089.005.0182	84.25
G7L.12aa0089.006.0182	86.29
G7L.12aa0089.007.0182	90.06
G7L.12aa0089.0185	78.36
G7L.12aa0019.0185	no data
G7L.12aa0020.0185	no data
G7L.12aa0069.0185	75.99
G7L.12aa0071.0185	82.77
G7L.12aa0087.0185	72.78
G7L.12aa0090.0185	82.67
G7L.12aa0120.0185	no data
G7L.12aa0157.0185	65.10
G7L.12aa0089.001.0185	84.78
G7L.12aa0089.005.0185	89.84
G7L.12aa0089.006.0185	88.54
G7L.12aa0089.007.0185	84.01
G7L.12aa0089.0200	85.19
G7L.12aa0019.0200	89.15
G7L.12aa0020.0200	62.65
G7L.12aa0069.0200	63.60
G7L.12aa0071.0200	65.05
G7L.12aa0087.0200	78.18

G7L.12aa0090.0200	76.34
G7L.12aa0120.0200	55.63
G7L.12aa0157.0200	51.04
G7L.12aa0089.001.0200	86.49
G7L.12aa0089.005.0200	36.47
G7L.12aa0089.006.0200	47.77
G7L.12aa0089.007.0200	20.50
G7L.12aa0089.0203	25.62
G7L.12aa0019.0203	26.52
G7L.12aa0020.0203	17.24
G7L.12aa0069.0203	28.03
G7L.12aa0071.0203	9.75
G7L.12aa0087.0203	78.63
G7L.12aa0090.0203	71.98
G7L.12aa0120.0203	55.44
G7L.12aa0157.0203	40.79
G7L.12aa0089.001.0203	60.70
G7L.12aa0089.005.0203	67.48
G7L.12aa0089.006.0203	60.67
G7L.12aa0089.007.0203	71.65

[0290]

[表25]

抗体改変体の切断率 (hMT-SP1)

抗体改変体名	切断率 (%)
G7L.106a.12aa	65.07
G7L.12aa.0177	21.86
G7L.12aa.0180	28.97
G7L.12aa.0181	21.72
G7L.12aa.0182	28.23
G7L.12aa.0185	26.51
G7L.12aa0163	25.57
G7L.12aa0166	25.26
G7L.12aa0089.0177	32.38
G7L.12aa0019.0177	28.38
G7L.12aa0020.0177	28.29
G7L.12aa0069.0177	29.21
G7L.12aa0071.0177	34.08
G7L.12aa0087.0177	23.11
G7L.12aa0090.0177	29.23
G7L.12aa0120.0177	46.73
G7L.12aa0157.0177	20.36
G7L.12aa0089.001.0177	25.70
G7L.12aa0089.005.0177	24.04
G7L.12aa0089.006.0177	22.70
G7L.12aa0089.007.0177	36.20
G7L.12aa0089.0180	45.07
G7L.12aa0019.0180	32.04
G7L.12aa0020.0180	41.31
G7L.12aa0069.0180	40.60
G7L.12aa0071.0180	45.66
G7L.12aa0087.0180	25.55
G7L.12aa0090.0180	35.34
G7L.12aa0120.0180	53.56
G7L.12aa0157.0180	22.47
G7L.12aa0089.001.0180	39.90
G7L.12aa0089.005.0180	33.85
G7L.12aa0089.006.0180	30.45
G7L.12aa0089.007.0180	37.62
G7L.12aa0089.0181	26.58
G7L.12aa0019.0181	22.14
G7L.12aa0020.0181	32.03
G7L.12aa0069.0181	32.43
G7L.12aa0071.0181	32.62

G7L.12aa0087.0181	21.48
G7L.12aa0090.0181	16.56
G7L.12aa0120.0181	39.48
G7L.12aa0157.0181	19.49
G7L.12aa0089.001.0181	24.62
G7L.12aa0089.005.0181	25.49
G7L.12aa0089.006.0181	23.08
G7L.12aa0089.007.0181	31.00
G7L.12aa0089.0182	no data
G7L.12aa0019.0182	22.43
G7L.12aa0020.0182	26.16
G7L.12aa0069.0182	29.41
G7L.12aa0071.0182	25.14
G7L.12aa0087.0182	19.97
G7L.12aa0090.0182	29.72
G7L.12aa0120.0182	36.65
G7L.12aa0157.0182	19.55
G7L.12aa0089.001.0182	26.63
G7L.12aa0089.005.0182	23.62
G7L.12aa0089.006.0182	21.62
G7L.12aa0089.007.0182	19.79
G7L.12aa0089.0185	25.62
G7L.12aa0019.0185	no data
G7L.12aa0020.0185	no data
G7L.12aa0069.0185	24.64
G7L.12aa0071.0185	27.25
G7L.12aa0087.0185	17.84
G7L.12aa0090.0185	27.39
G7L.12aa0120.0185	no data
G7L.12aa0157.0185	12.68
G7L.12aa0089.001.0185	17.98
G7L.12aa0089.005.0185	14.92
G7L.12aa0089.006.0185	15.74
G7L.12aa0089.007.0185	21.98
G7L.12aa0089.0200	26.28
G7L.12aa0019.0200	9.02
G7L.12aa0020.0200	12.71
G7L.12aa0069.0200	14.34
G7L.12aa0071.0200	15.10
G7L.12aa0087.0200	14.19

G7L.12aa0090.0200	21.19
G7L.12aa0120.0200	23.78
G7L.12aa0157.0200	8.25
G7L.12aa0089.001.0200	21.45
G7L.12aa0089.005.0200	16.97
G7L.12aa0089.006.0200	12.93
G7L.12aa0089.007.0200	17.33
G7L.12aa0089.0203	10.82
G7L.12aa0019.0203	0.21
G7L.12aa0020.0203	6.37
G7L.12aa0069.0203	11.43
G7L.12aa0071.0203	0.61
G7L.12aa0087.0203	11.18
G7L.12aa0090.0203	8.63
G7L.12aa0120.0203	22.68
G7L.12aa0157.0203	7.00
G7L.12aa0089.001.0203	16.46
G7L.12aa0089.005.0203	14.89
G7L.12aa0089.006.0203	13.98
G7L.12aa0089.007.0203	19.83

[0291]

[表26]

抗体改変体

抗体改変体名	重鎖配列番号	軽鎖配列番号
G7L.12aa0163	1181	1288
G7L.12aa0166	1181	1289
G7L.12aa0019.0177	1181	1291
G7L.12aa0020.0177	1181	1292
G7L.12aa0069.0177	1181	1293
G7L.12aa0087.0177	1181	1295
G7L.12aa0120.0177	1181	1297
G7L.12aa0089.005.0177	1181	1300
G7L.12aa0089.006.0177	1181	1301
G7L.12aa0020.0180	1181	1305
G7L.12aa0087.0180	1181	1308
G7L.12aa0090.0180	1181	1309
G7L.12aa0157.0180	1181	1311
G7L.12aa0089.006.0180	1181	1314
G7L.12aa0089.007.0180	1181	1315
G7L.12aa0019.0181	1181	1317
G7L.12aa0020.0181	1181	1318
G7L.12aa0071.0181	1181	1320
G7L.12aa0087.0181	1181	1321
G7L.12aa0089.001.0181	1181	1325
G7L.12aa0089.005.0181	1181	1326
G7L.12aa0089.006.0181	1181	1327
G7L.12aa0089.007.0181	1181	1328
G7L.12aa0019.0182	1181	1330
G7L.12aa0020.0182	1181	1331
G7L.12aa0069.0182	1181	1332
G7L.12aa0089.007.0182	1181	1341
G7L.12aa0089.005.0185	1181	1352
G7L.12aa0089.006.0185	1181	1353

[0292] 実施例18 抗ヒトCXCL10中和抗体に各種プロテアーゼ切断配列を導入した抗体のin vivo切断評価

18-1 プロテアーゼ切断配列を導入した二重特異性抗体の作製

ヒトCXCL10を中和する抗体であるMabCXCL10_G7p（重鎖：G7H-F760mnP17（配列番号:1381）、軽鎖：G7L-LT0（配列番号：1182））の軽鎖可変領域と定常領域の境界付近に表27中に示すプロテアーゼ切断配列を挿入し、異なるプロテアーゼ切断配列を有するMabCXCL10_G7pの軽鎖改変体を作製した（表28

）。

MabCXCL10_G7pの軽鎖や上記で作製したプロテアーゼ切断配列を有する軽鎖改変体と重鎖を組み合わせて、表29に示すMabCXCL10_G7pおよびMabCXCL10_G7p改変体を当業者公知の方法でExpi293細胞（Life technologies）を用いた一過性発現により発現し、プロテインAを用いた当業者公知の方法により精製を行った。

また、キーホールリンペットヘモシアニン（KLH）に対する抗体であるMabKLHn（重鎖：IC17HdK-F760mnN17（配列番号：1390）、軽鎖：IC17L-k0（配列番号：1391））も当業者公知の方法でExpi293細胞（Life technologies）を用いた一過性発現により発現し、プロテインAを用いた当業者公知の方法により精製を行った。

上記のMabCXCL10_G7p改変体とMabKLHnを混合し、W02015046467に記載の方法で表30に示すヒトCXCL10とKLHに対する二重特異性抗体を作製した。

[0293] [表27]

プロテアーゼ切断配列

配列番号	切断配列
1382	TSYTGRSAVPRG
1383	TSYSGRSAVVRG
1384	TSYTGRSAVYRG
1385	TSYTGRSAVHRG

[0294] [表28]

MabCXCL10_G7pの軽鎖改変体

配列番号	改変軽鎖名
1386	G7L.12aa0089.001-LT0
1387	G7L.12aa0089.003-LT0
1388	G7L.12aa0089.005-LT0
1389	G7L.12aa0089.007-LT0

[0295]

[表29]

MabCXCL10_G7p 改変体

抗体改変体名	重鎖配列番号	軽鎖配列番号
G7	1381	1182
G7L.12aa0089.001	1381	1386
G7L.12aa0089.003	1381	1387
G7L.12aa0089.005	1381	1388
G7L.12aa0089.007	1381	1389

[0296] [表30]

MabCXCL10_G7p 改変体と MabKLHn の二重特異性抗体

抗体改変体名	抗 CXCL10 改変抗体		抗 KLH 抗体	
	重鎖配列番号	軽鎖配列番号	重鎖配列番号	軽鎖配列番号
G7//KLH	1381	1182	1390	1391
G7L.12aa0089.001//KLH	1381	1386	1390	1391
G7L.12aa0089.003//KLH	1381	1387	1390	1391
G7L.12aa0089.005//KLH	1381	1388	1390	1391
G7L.12aa0089.007//KLH	1381	1389	1390	1391

[0297] 18-2 プロテアーゼ安定発現細胞株の作製

マウスに移植するプロテアーゼ安定発現細胞株としてB16F10/chGPC3/muPA細胞を用いた。この細胞株は、マウスメラノーマ株B16F10細胞に、改変したマウスの chimeric Glypican 3 (chGPC3) 遺伝子と、mouse uPA (muPA: NM_008873) 遺伝子を導入し、安定発現株を樹立後にクローン化した細胞株である。B16F10/chGPC3/muPA細胞は10% FBS (SIGMA社製)、0.5 mg/mL Geneticin (gibco社製)、および1.5 μ g/mL Puromycin (gibco社製) を含むRPMI1640培地 (ナカライテスク社製) にて培養した。

[0298] 18-3 同系腫瘍株移植マウスモデルの作製

移植動物としてチャールズリバー社から購入したC57BL/6NCrlマウス (6週齢、♀) を用いた。C57BL/6NCrlマウスの皮下にB16F10/chGPC3/muPA細胞を移植 (一匹あたり1E6細胞数) し、移植腫瘍体積の平均がおよそ200 mm³から300 mm³になったマウスを改変抗体投与モデルマウスとして用いた。

移植腫瘍体積は以下の式にて算出した。

$$\text{腫瘍体積} = \text{長径} \times \text{短径} \times \text{短径} / 2$$

[0299] 18-4 投与薬剤の調整

B16F10/chGPC3/muPA細胞移植モデルマウスへの投与薬剤は、実施例18-1で作製された表29に示す各種プロテアーゼ切断配列を導入した抗体改変体を用いた。投与薬剤は、改変抗体濃度が0.1 mg/mLになるようにPBST-buffer (PBS +0.05% Tween20 buffer)を用いて調製した。

[0300] 18-5 プロテアーゼ切断評価を目的とした抗体改変体の投与試験

B16F10/chGPC3/muPA細胞移植マウスに、移植後11日目に各種プロテアーゼ切断配列を導入した抗体改変体5検体をそれぞれ投与量1 mg/kg (マウス体重1 kgあたりの投与抗体量 mg) にて尾静脈より投与した。投与試験における抗体改変体名、投与量、また投与方法等の詳細を表31に示した。

[0301] [表31]

マウス投与試験概要

群	匹数	薬剤	用量	投与法	投与日
1	3	G7//KLH	1mg/kg	尾静脈	移植後 11 日
2	3	G7L12aa0089.001//KLH	1mg/kg	尾静脈	移植後 11 日
3	3	G7L12aa0089.003//KLH	1mg/kg	尾静脈	移植後 11 日
4	3	G7L12aa0089.005//KLH	1mg/kg	尾静脈	移植後 11 日
5	3	G7L12aa0089.007//KLH	1mg/kg	尾静脈	移植後 11 日

[0302] 18-6 B16F10/chGPC3/muPA細胞移植モデルマウスからの眼窩採血

抗体改変体投与後1日目および3日目に、B16F10/chGPC3/muPA細胞移植モデルマウスから眼窩採血により血液を採取した。採血はイソフルラン麻酔下で実施した。採取した血液を1,900×g、4℃で10分遠心した後、遠心後の上清を血漿成分として取得し、-30℃で保管した。

[0303] 18-7 マウスから回収した投与抗体の切断評価

実施例18-6で回収した血漿からDynabeads Protein A (Thermo; 10001D)を用いて当業者公知の方法で抗体を精製し、抗体改変体のプロテアーゼ切断効率を評価するためキャピラリー電気泳動イムノアッセイに供した。キャピラリー電気泳動イムノアッセイにはWes (Protein Simple) を使用し、抗体軽鎖の検出には抗ヒトlambda鎖HRP標識抗体 (abcam; ab9007)を使用し、抗体重鎖の検出には抗ヒト重鎖HRP標識抗体 (Protein Simple; 043-491)を使用した。その結果、抗ヒトlambda鎖抗体では36kDa付近に未切断の全長軽鎖のピークが

検出され、抗ヒト重鎖抗体では56kDa付近に全長重鎖のピークが検出された。なお、MabKLHnの軽鎖はkappa鎖であるため抗ヒトlambda鎖抗体では検出されないため、抗ヒトlambda鎖抗体を用いることでプロテアーゼ切断配列を導入した軽鎖の切断効率の評価が可能である。キャピラリー電気泳動イムノアッセイにより得られた各ピークの面積をWes専用のソフトウェア（Compass for SW; Protein Simple）で出力し、軽鎖残存比として（軽鎖ピーク面積）/（重鎖ピーク面積）を計算することで、マウス体内で切断されずに残った全長軽鎖の割合を求めた。マウス投与後1日後および3日後に回収した抗体の軽鎖残存比を図32に示した。その結果、腫瘍移植マウスの体内において、プロテアーゼ切断配列を導入したMabCXCL10_G7p改変体はMabCXCL10_G7pよりも軽鎖残存比が低下していることが確認された。即ち、プロテアーゼ切断配列を導入した軽鎖が腫瘍移植マウス体内で効率良く切断されたことが示された。

[0304] 前述の発明は、明確な理解を助ける目的のもと、実例および例示を用いて詳細に記載したが、本明細書における記載および例示は、本発明の範囲を限定するものと解釈されるべきではない。本明細書で引用したすべての特許文献および科学文献の開示は、その全体にわたって、参照により明示的に本明細書に組み入れられる。

産業上の利用可能性

[0305] 本発明のリガンド結合分子は、リガンドを結合したまま生体内で運搬され、疾患組織において切断されてリガンドへの結合が弱まり、リガンドを疾患組織特異的にリリースできるので、疾患組織を特異的にリガンドに暴露することができる。また、当該リガンド結合分子は運搬時にリガンドの生物活性を抑制していることから、リガンドが全身的に作用してしまう恐れが減少し、疾患の治療に極めて有用である。

請求の範囲

- [請求項1] リガンド結合分子であって、当該リガンド結合分子はリガンドに結合可能であり、当該分子は配列番号：１１６１～１１８０、１３９２～１４１１で示す配列、または表１に記載の配列から選ばれる一つまたは複数の配列を含むプロテアーゼ切断配列を少なくとも一つ含むポリペプチドであり、前記プロテアーゼ切断配列が切断された状態における当該リガンド結合分子のリガンドに対する結合が、前記プロテアーゼ切断配列が未切断の状態における当該リガンド結合分子のリガンドに対する結合より弱い、リガンド結合分子。
- [請求項2] 前記プロテアーゼ切断配列が切断された状態では、前記リガンドが前記リガンド結合分子から遊離する、請求項１に記載のリガンド結合分子。
- [請求項3] 前記プロテアーゼは、癌組織特異的プロテアーゼまたは炎症組織特異的プロテアーゼである、請求項１または請求項２に記載のリガンド結合分子。
- [請求項4] 前記リガンド結合分子は抗体VHと、抗体VLと、抗体定常領域を含む、請求項１から請求項３のいずれか一項に記載のリガンド結合分子。
- [請求項5] 前記プロテアーゼ切断配列は、前記抗体定常領域と前記抗体VHの境界付近、または／および前記抗体定常領域と前記抗体VLとの境界付近に位置する、請求項４に記載のリガンド結合分子。
- [請求項6] 前記リガンド結合分子中の前記抗体VLと前記抗体VHは会合しており、当該会合は前記プロテアーゼ切断配列がプロテアーゼで切断されることにより解消される、請求項４または請求項５に記載のリガンド結合分子。
- [請求項7] 前記リガンドは生物活性を有する分子であり、前記リガンド結合分子は前記リガンドとの結合で前記リガンドの生物活性を阻害する、請求項１から請求項６のいずれか一項に記載のリガンド結合分子。
- [請求項8] 前記リガンドはサイトカインまたはケモカインである、請求項１か

ら請求項7のいずれか一項に記載のリガンド結合分子。

- [請求項9] 前記リガンド結合分子はIgG抗体である、請求項1から請求項8のいずれか一項に記載のリガンド結合分子。
- [請求項10] 前記リガンドと、前記リガンドと結合している請求項1から請求項8のいずれか一項に記載のリガンド結合分子とで形成されている複合体。
- [請求項11] 前記リガンドと請求項1から請求項8のいずれか一項に記載のリガンド結合分子が融合されている融合タンパク質。
- [請求項12] 請求項1から請求項8のいずれか一項に記載のリガンド結合分子、または請求項10に記載の複合体、または請求項11に記載の融合タンパク質を含む医薬組成物。
- [請求項13] 請求項1から請求項8のいずれか一項に記載のリガンド結合分子、または請求項10に記載の複合体、または請求項11に記載の融合タンパク質の製造方法。
- [請求項14] 配列番号：1161～1180、1392～1411で示す配列、表1に記載の配列から選ばれる配列を含む、プロテアーゼ基質。
- [請求項15] 配列番号：1161～1180、1392～1411で示す配列、表1に記載の配列から選ばれる一つまたは複数の配列を含む、ポリペプチド。