

明 細 書

発明の名称： プロテアーゼ分解性マスク抗体

技術分野

[0001] 本発明は、プロテアーゼの作用により活性化されるプロテアーゼ分解性マスク抗体に関する。

背景技術

[0002] 抗体は抗原すなわち標的分子への認識特異性や結合活性が非常に高く、低分子化合物、ペプチド、蛋白質など多様な分子が抗原になり得る。また、抗体医薬品は生産性や生体内での安定性も高く、癌、免疫疾患、感染症など様々な疾患を対象に開発が進められている。近年では、より薬効の優れた抗体医薬品として、細胞毒性のある薬剤を抗体に結合させたAntibody Drug Conjugate (ADC) や、標的細胞と細胞傷害性T細胞を架橋し、標的細胞を攻撃可能な二重特異性抗体 (T-Cell Engaging (TCE)) などの研究開発が進められている。ADCやTCEなどは強力な抗腫瘍活性を示す一方で、標的分子が正常組織に発現する場合、標的分子を介した正常組織への毒性が課題となっている (非特許文献1)。

[0003] 腫瘍微小環境の性質 (腫瘍組織におけるプロテアーゼ活性の亢進など) を利用し、腫瘍組織で特異的に作用する改変抗体としてマスク抗体が知られている。マスク抗体は、正常組織中での結合活性が抑制されているため、標的分子を介した正常組織への毒性が低く、安全性の高い抗体医薬品として期待されている (非特許文献2)。マスク抗体は、抗体本体、抗体の結合を阻害するマスキングドメイン、抗体とマスキングドメインをつなぎプロテアーゼにより切断可能な切断リンカーから構成される (特許文献1)。マスキングドメインとしては、抗体の相補性決定領域 (CDR: Complementarity determining region) に結合するミモトープペプチドの他、抗体とは直接相互作用しないコイルドコイルドメインなどが知られている (非特許文献3)。また切断リンカーには、マトリクスメタロ

プロテアーゼ（MMP）やウロキナーゼ型プラスミノゲンアクチベータ（uPA）など、腫瘍組織で活性が亢進している細胞外プロテアーゼの基質が搭載され、腫瘍組織選択的な抗体の活性化を可能にしている（特許文献2）。例えば、抗EGFR抗体（Cetuximab）をマスク化した先行研究では、腫瘍組織におけるマスク抗体の活性化や、EGFRが発現する皮膚への暴露量低下、血中半減期の延長、安全性の改善などが報告されている（非特許文献4）。その他、二重特異性抗体やサイトカインなど多様なバイオリグクス分子に対してマスク化技術が適用されている（特許文献3、4）。

[0004] マスク抗体は細胞外（膜型、分泌型）に局在するプロテアーゼによって活性化される。腫瘍組織ではマトリクスメタロプロテアーゼ（MMP）やウロキナーゼ型プラスミノゲンアクチベータ（uPA）の他、マトリプターゼ（MTSP1）やカテプシン（CTS）など様々な細胞外プロテアーゼの活性が亢進していることが知られている（非特許文献5）。また、細胞内のリソソームに局在が知られているレグメイン（LGMN）は、腫瘍環境中では細胞外に存在していることが報告されている（非特許文献6）。これらプロテアーゼはがん細胞や、がん細胞周辺に存在する間質細胞から細胞外へ分泌され、がん細胞の生存、増殖、浸潤、転移など様々なプロセスに関与していることが分かっている。マスク抗体は、細胞外に存在するこれらのプロテアーゼによって活性化され、腫瘍組織選択的に作用している。

[0005] 蛋白質を分解するプロテアーゼは細胞内（細胞質）にも存在し、ユビキチン・プロテアソーム系やオートファジー・リソソーム系と同様に、アミノ酸の代謝、シグナル伝達、免疫、アポトーシスなど様々な生物プロセスに関与している。また、細胞質内のプロテアーゼは、細胞死や細胞膜へのダメージに伴い、細胞外に漏出することが報告されている（非特許文献7）。

先行技術文献

特許文献

[0006] 特許文献1：国際公開WO2009/025846号

特許文献2：国際公開WO2010/081173号

特許文献3：国際公開WO2016/014974号

特許文献4：国際公開WO2020/069398号

非特許文献

[0007] 非特許文献1：Nature Review Drug Discovery
. ; 17 : 197-223 (2018) .

非特許文献2：Expert Opin Biol Ther. ; 14 (8)
: 1049-53 (2014) .

非特許文献3：ACS Cent. Sci. ; 7 : 724-38 (2021)
).

非特許文献4：Sci Transl Med. ; 5 (207) : 1-10 (2013) .

非特許文献5：Annual Review of Cancer Biology. ; 2 : 353-76 (2018) .

非特許文献6：Scientific Reports. ; 5 (16599)
: 1-9 (2015) .

非特許文献7：Anal Biochem. ; 366 (2) : 197-206
(2007) .

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0008] 従来のマスク抗体より優れた性能を有するマスク抗体を提供する。

課題を解決するための手段

[0009] 本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意研究を行い、蛋白質を分解するプロテアーゼが細胞質内に存在し、細胞死や細胞膜へのダメージに伴って腫瘍細胞から漏出する細胞質内プロテアーゼを利用して、マスク抗体を改良することにより、本発明を完成した。

[0010] すなわち、本発明は以下の発明を包含する。

[1] 下記 [a] 部分、[b] 部分及び [c] 部分を含んでなり、標的抗原

に結合する分子：

[a] 部分 標的抗原に結合する部分；

[b] 部分 [a] 部分に含まれる標的抗原結合部位を認識する第1ペプチド；

[c] 部分 細胞質内に局在するプロテアーゼにより切断されるアミノ酸配列を含む第2ペプチド。

[2] 第2ペプチドが細胞質内に局在するプロテアーゼにより切断された後には、切断前と比較して、標的抗原に対しより高い結合親和性を有することを特徴とする、[1]の分子。

[3] [c] 部分の第2ペプチドが、さらに、細胞外プロテアーゼにより切断されるアミノ酸配列を含む、[1]又は[2]の分子。

[4] 第1ペプチド、第2ペプチド、標的抗原に結合する部分の順に連結してなる、[1]～[3]のいずれかの分子。

[5] 標的抗原に結合する部分が、第1ペプチド及び第2ペプチドには含まれないアミノ酸配列からなるポリペプチドである、[1]～[4]のいずれかの分子。

[6] ポリペプチドからなる、[1]～[5]のいずれかの分子。

[7] アミノ末端からカルボキシル末端に向かって、第1ペプチド、第2ペプチド、標的抗原に結合する部分の順、又は、標的抗原に結合する部分、第2ペプチド、第1ペプチドの順に結合してなる、[6]の分子。

[8] 第1ペプチド、第2ペプチド及び標的抗原に結合する部分からなる群より選択されるいずれか1つが、他の2つのうち1つ又は両方とリンカーを介して結合している、[1]～[7]のいずれか1つの分子。

[9] 該細胞質内に局在するプロテアーゼが、細胞死や細胞膜へのダメージにより、細胞外に漏出することを特徴とする、[1]～[8]のいずれかの分子。

[10] 該細胞質内に局在するプロテアーゼが、カルパイン、カスパーゼ及びトリペプチジルペプチダーゼから選択され、好適には、カルパインがカル

パイン 1 又はカルパイン 2 であり、カスパーゼが、カスパーゼ 1、カスパーゼ 8、カスパーゼ 3 又はカスパーゼ 7 であり、トリペプチジルペプチダーゼがトリペプチジルペプチダーゼ 1 又はトリペプチジルペプチダーゼ 2 である、[1]~[9]のいずれか 1 つの分子。

[11] 該細胞質内に局在するプロテアーゼが、カルシウム依存性又はカルシウム要求性である、[1]~[10]のいずれか 1 つに記載の分子。

[12] 該細胞質内に局在するプロテアーゼが、カルパイン 1 又はカルパイン 2 である、[1]~[11]のいずれか 1 つの分子。

[13] 該細胞外プロテアーゼが、正常な組織に比して、異常な組織においてより高発現しているか、より多量に存在するか又はより触媒活性が高いことを特徴とする、[3]~[12]のいずれかの分子。

[14] 該異常な組織が、腫瘍組織及び／又は間質組織である、[13]の分子。

[15] 該細胞外プロテアーゼが、マトリックスメタロプロテアーゼ、ウロキナーゼ型プラスミノゲンアクチベータ、マトリプターゼ、レグマイン及びカテプシンよりなる群から選択され、マトリックスメタロプロテアーゼは好適には MMP 1、MMP 2、MMP 3、MMP 7、MMP 9、MMP 12 及び MMP 14 の 1 つ又は 2 つ以上であり、カテプシンは好適にはカテプシン B、カテプシン D、カテプシン S 及びカテプシン L の 1 つ又は 2 つ以上である、[3]~[14]のいずれか 1 つに記載の分子。

[16] 第 2 ペプチドにおいて、アミノ末端からカルボキシル末端に向かって、該細胞外プロテアーゼにより切断されるアミノ酸配列、該細胞質内に局在するプロテアーゼにより切断されるアミノ酸配列の順、又は、該細胞質内に局在するプロテアーゼにより切断されるアミノ酸配列、該細胞外プロテアーゼにより切断されるアミノ酸配列の順に配置されてなり、好適には、該細胞外プロテアーゼにより切断されるアミノ酸配列、該細胞質内に局在するプロテアーゼにより切断されるアミノ酸配列の順に配置されてなる、[1]~[15]のいずれか 1 つに記載の分子。

[17] 該細胞質内に局在するプロテアーゼにより切断されるアミノ酸配列が、配列番号12、44～53のいずれか1つ又は2つ以上を含む、[1]～[16]のいずれか1つに記載の分子。

[18] 標的抗原が腫瘍抗原である、[1]～[17]のいずれか1つの分子。

[19] 標的抗原に結合する部分に、他の部分である[d]部分が結合してなり、[d]部分が第1ペプチド及び第2ペプチドを含まない、[1]～[18]のいずれか1つの分子。

[20] [d]部分が、標的抗原結合部分ではない抗体若しくはその抗原結合断片、第1ペプチド及び第2ペプチドに含まれないアミノ酸配列を含むペプチド、サイトカイン、毒素、放射性同位元素、標識分子、光感受性物質、免疫賦活物質、抗腫瘍性化合物、薬物、ペイロード、並びにポリマーからなる群より選択される1つ又は2つ以上である、[19]の分子。

[21] 抗腫瘍性化合物が、カンプトテシン誘導体又はpyrrolone benzodiazepine誘導体であり、好適には、カンプトテシン誘導体がN-[(1S, 9S)-9-ethyl-5-fluoro-9-hydroxy-4-methyl-10, 13-dioxo-2, 3, 9, 10, 13, 15-hexahydro-1H, 12H-benzo[de]pyrano[3', 4':6, 7]indolizino[1, 2-b]quinolin-1-yl]-2-hydroxyacetamideである、[20]の分子。

[22] 免疫賦活物質が環状ジヌクレオチド誘導体である、[20]の分子。

[23] ポリペプチドからなるか、又は[d]部分及びポリペプチドからなる、[19]～[22]のいずれか1つの分子。

[24] 下記工程(i)及び(ii)を含む、抗体又は抗体の抗原結合断片に含まれる相補性決定領域(CDR)に結合するペプチドを同定する方法：
(i) 芳香族性アミノ酸とProの繰返し配列を含むペプチドライブラリーを該CDRに接触させる工程；及び

(i i) 該 C D R に結合するペプチドを回収する工程。

[2 5] 芳香族性アミノ酸と P r o の繰返し配列が Z P Z P モチーフ[Z は、ヒスチジン (H i s) 、フェニルアラニン (P h e) 、チロシン (T y r) 、トリプトファン (T r p) のいずれかの芳香族アミノ酸を表し、P はプロリンを表す]である、[2 4]の方法。

[2 6] 該ペプチドを組換え、インビトロ翻訳、化学合成又はペプチド合成により調製する工程をさらに含む、[2 4]又は[2 5]の方法。

[2 7] 該 C D R が[1]記載の標的抗原結合部分に含まれ、第 1 ペプチドが[2 6]に記載の方法により得られる、標的抗原に結合する分子。

[2 8] 第 1 ペプチドに含まれるアミノ酸配列及び／又は第 2 ペプチドに含まれるアミノ酸配列を含んでなるペプチドを組換え、インビトロ翻訳、化学合成又はペプチド合成により調製する工程を含む、[1]～[2 3]のいずれか 1 つの分子の製造方法。

[2 9] [2 8]の方法により得られる、標的抗原に結合する分子。

[3 0] 下記 (i i i) 記載の工程を含む、[6]、[7]又は[2 3]記載の分子の製造方法：

(i i i) 標的抗原結合部分に含まれるアミノ酸配列、並びに、任意で (o p t i o n a l l y) 、第 1 ペプチドに含まれるアミノ酸配列、及び／又は、第 2 ペプチドに含まれるアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を含んでなるポリヌクレオチドを細胞に導入し、該細胞を培養し、該培養物から該標的抗原に結合するポリペプチドを回収する工程。

[3 1] [3 0]の方法により得られる、標的抗原に結合する分子。

[3 2] [1]～[2 3]、[2 7]、[2 9]及び[3 1]のいずれか 1 つの分子、その塩又はそれらの水和物を含む、医薬組成物。

[3 3] 抗がん剤である、[3 2]の医薬組成物。

[3 4] 芳香族性アミノ酸と P r o の繰返し配列を含むペプチドライブラリ。

[3 5] 芳香族性アミノ酸と P r o の繰返し配列が Z P Z P モチーフ[Z は、

ヒスチジン (H i s)、フェニルアラニン (P h e)、チロシン (T y r)、トリプトファン (T r p) のいずれかの芳香族アミノ酸を表し、Pはプロリンを表す]である、[34]のペプチドライブラリー。

本明細書は本願の優先権の基礎となる日本国特許出願番号2021-194701号の開示内容を包含する。

発明の効果

[0011] 本発明によれば、マスク抗体は、腫瘍環境中のプロテアーゼの作用により活性化され、腫瘍特異性が向上することにより、抗腫瘍剤として優れた効果を発揮する。

図面の簡単な説明

[0012] [図1]図1は、本発明のコンセプトを示している。(A)細胞外プロテアーゼおよび細胞内プロテアーゼで活性化可能なマスク抗体のフォーマットを一例として示す。抗体の可変領域(白)に結合するマスキングドメイン(格子)が切断リンカーで抗体重鎖の可変領域に融合されている。リンカーには細胞外プロテアーゼの基質配列(灰塗り)と細胞内プロテアーゼの基質配列(黒塗り)が含まれている。抗体の可変領域は定常領域(横線)に融合している。(B)細胞内プロテアーゼを利用したマスク抗体の活性化を示している。(1)ー(4)は細胞外プロテアーゼにより活性化したマスク抗体の作用で細胞死が誘導されること、死細胞から細胞内プロテアーゼが細胞外へ漏出すること、細胞内プロテアーゼによりマスク抗体が活性化されること、細胞内プロテアーゼにより活性化したマスク抗体が殺細胞活性を示すこと、をそれぞれ示している。

[図2]図2は、WO2015/098099号に記載の公知の抗TROP2抗体HT1-11とヒトTROP2抗原の相互作用をELISAで評価した結果を示している。HT1-11は濃度依存的に抗原に結合した。

[図3]図3は、抗TROP2抗体HT1-11に対するパニング後のペプチドバインダーの濃縮度合いをプルダウン実験で評価した際のoutput/input比を示している。ヒト血清由来IgG(IgG mixture)

よりもHT1-11で値が高く、HT1-11特異的に結合するペプチドの濃縮が示唆された。

[図4-1]図4-1は、scFv型の抗TROP2抗体とヒトTROP2抗原の相互作用をELISAで評価した結果を示している。結合活性はMMP非添加条件（実線）およびMMP1添加条件（点線）で評価した。（A）HT1-11-scFv-HLはMMP添加条件に関わらず同様の結合活性を示した。（B）HT1-11-scFv-LHはMMP添加条件に関わらず同様の結合活性を示した。

[図4-2]図4-2は、scFv型の抗TROP2抗体とヒトTROP2抗原の相互作用をELISAで評価した結果を示している。結合活性はMMP非添加条件（実線）およびMMP1添加条件（点線）で評価した。（C）MHT1001はMMP1添加条件においてMMP1非添加条件よりも強い結合活性を示した。（D）MHT1002はMMP1添加条件においてMMP1非添加条件よりも強い結合活性を示した。

[図5-1]図5-1は、IgG型の抗TROP2マスク抗体とヒトTROP2抗原の相互作用をELISAで評価した結果を示している。結合活性はプロテアーゼ非添加条件（実線）およびプロテアーゼ添加条件（点線）で評価した。（A）HT1-11はMMP添加条件に関わらず同様の結合活性を示した。（B）MHT1007はMMP1添加条件においてMMP1非添加条件よりも強い結合活性を示した。

[図5-2]図5-2は、IgG型の抗TROP2マスク抗体とヒトTROP2抗原の相互作用をELISAで評価した結果を示している。結合活性はプロテアーゼ非添加条件（実線）およびプロテアーゼ添加条件（点線）で評価した。（C）MHT1008はMMP添加条件に関わらず同様の結合活性を示した。（D）MHT1009はuPA添加条件においてuPA非添加条件よりも強い結合活性を示した。

[図6]図6は、CAPN基質を搭載した抗TROP2マスク抗体とヒトTROP2抗原の相互作用をELISAで評価した結果を示している。（A）MH

T3002はuPAまたはCAPN1添加条件において、プロテアーゼ非添加条件よりも強い結合活性を示した。MHT3201はCAPN1添加条件においてのみプロテアーゼ非添加条件よりも強い結合活性を示した。(B) MHT1713は各種MMP添加条件においてMMP非添加条件よりも強い結合活性を示した。MHT3202はいずれの条件においてもMMP非添加条件と同様の結合活性を示した。

[図7-1]図7-1は、uPA基質やCAPN1基質を搭載した抗TROP2マウス抗体とヒトTROP2抗原の相互作用をELISAで評価した結果を示している。結合活性はプロテアーゼ非添加条件（実線）、uPA添加条件（点線）および、CAPN1添加条件（破線）で評価した。(A) MHT3423はuPA添加条件においてのみプロテアーゼ非添加条件よりも強い結合活性を示した。(B) MHT3201はCAPN1添加条件においてのみプロテアーゼ非添加条件よりも強い結合活性を示した。

[図7-2]図7-2は、uPA基質やCAPN1基質を搭載した抗TROP2マウス抗体とヒトTROP2抗原の相互作用をELISAで評価した結果を示している。結合活性はプロテアーゼ非添加条件（実線）、uPA添加条件（点線）および、CAPN1添加条件（破線）で評価した。(C) MHT3202はuPAおよびCAPN1添加条件においてプロテアーゼ非添加条件よりも強い結合活性を示した。(D) MHT3203はuPAおよびCAPN1添加条件においてプロテアーゼ非添加条件よりも強い結合活性を示した。

[図8]図8は、糖鎖改変抗体のN297糖鎖（非還元末端のシアル酸にアジド基を導入したMSG1型糖鎖（WO2019/065964号））を示している。

[図9]図9は、(A) TROP2陽性ヒト肺粘液性類表皮癌細胞株NCI-H292または(B) TROP2陽性ヒト咽頭癌細胞株FaDuを移植したマウスモデルにおけるMHT1008-PBD-ADC（四角）、MHT3423-PBD-ADC（黒四角）、MHT3201-PBD-ADC（上向き黒三角）、MHT3202-PBD-ADC（黒丸）、MHT3203-

PBD-ADC（黒ひし形）、Vehicle（ABS）（丸）の抗腫瘍活性を示している。図中のエラーバーは標準誤差（ $n=6$ ）を示す。

[図10]図10は、WO2015/146132号に記載の公知の抗CD98抗体hM23H1L1とヒトCD98抗原の相互作用をELISAで評価した結果を示している。hM23H1L1は濃度依存的に抗原に結合した。

[図11]図11は、（A）ペプチドライブラリーの種類および、（B）抗CD98抗体hM23H1L1に対するパニング後のペプチドバインドーの濃度合いをプルダウン実験で評価した際のoutput/input比を示している。ヒト血清由来IgG（IgG mixture）よりもhM23H1L1で値が高く、hM23H1L1特異的に結合するペプチドの濃縮が示唆された。

[図12-1]図12-1は、IgG型の抗CD98マスク抗体とヒトCD98抗原の相互作用をELISAで評価した結果を示している。結合活性はプロテアーゼ非添加条件（実線）およびプロテアーゼ添加条件（点線）で評価した。（A）hM23H1L1はMMP1添加条件においても濃度依存的な結合活性を示した。（B）MhM1008はMMP1添加条件においてMMP1非添加条件よりも強い結合活性を示した。

[図12-2]図12-2は、IgG型の抗CD98マスク抗体とヒトCD98抗原の相互作用をELISAで評価した結果を示している。結合活性はプロテアーゼ非添加条件（実線）およびプロテアーゼ添加条件（点線）で評価した。（C）MhM1013はMMP1添加条件においてMMP1非添加条件よりも強い結合活性を示した。

[図13]図13は、（A）hM23H1L1重鎖可変領域内のCDR1に点変異を導入したhM23-M1のヒトCD98抗原に対する結合活性をSPR（Surface plasmon resonance）で評価した結果および、（B）MhM1013に上記変異を導入したMhM1013-M1のヒトCD98抗原に対する結合活性をELISAで評価した結果を示している。MhM1013-M1（灰色）はMhM1013（黒色）と同等以上

のマスク効果を示した。

[図14-1]図14-1は、プロテアーゼ基質の異なる切断リンカーを搭載した抗CD98マスク抗体とヒトCD98抗原の相互作用をELISAで評価した結果を示している。結合活性はプロテアーゼ非添加条件（実線）、uPAまたはMMP9添加条件（点線）および、CAPN1添加条件（破線）で評価した。（A）MhM1018-M1はいずれの条件においても同様の結合活性を示した。（B）MhM1019-M1はuPA添加条件においてのみプロテアーゼ非添加条件よりも強い結合活性を示した。

[図14-2]図14-2は、プロテアーゼ基質の異なる切断リンカーを搭載した抗CD98マスク抗体とヒトCD98抗原の相互作用をELISAで評価した結果を示している。結合活性はプロテアーゼ非添加条件（実線）、uPAまたはMMP9添加条件（点線）および、CAPN1添加条件（破線）で評価した。（C）MhM1020-M1はCAPN1添加条件においてのみプロテアーゼ非添加条件よりも強い結合活性を示した。（D）MhM1021-M1はuPAおよびCAPN1添加条件においてプロテアーゼ非添加条件よりも強い結合活性を示した。

[図14-3]図14-3は、プロテアーゼ基質の異なる切断リンカーを搭載した抗CD98マスク抗体とヒトCD98抗原の相互作用をELISAで評価した結果を示している。結合活性はプロテアーゼ非添加条件（実線）、uPAまたはMMP9添加条件（点線）および、CAPN1添加条件（破線）で評価した。（E）MhM1018-M1はMMP9添加条件でわずかに結合活性が向上したが、その他の条件では同様の結合活性を示した。（F）MhM1022-M1はMMP9添加条件においてプロテアーゼ非添加条件よりも強い結合活性を示した。CAPN1添加条件においてもわずかに結合活性が向上した。

[図14-4]図14-4は、プロテアーゼ基質の異なる切断リンカーを搭載した抗CD98マスク抗体とヒトCD98抗原の相互作用をELISAで評価した結果を示している。結合活性はプロテアーゼ非添加条件（実線）、uPA

またはMMP 9添加条件（点線）および、CAPN 1添加条件（破線）で評価した。（G）MhM1023-M1はMMP 9およびCAPN 1添加条件においてプロテアーゼ非添加条件よりも強い結合活性を示した。

[図15]図15は、CD98陽性ヒト咽頭癌細胞株FaDuを移植したマウスモデルにおけるMhM1018-M1-DXd-ADC（四角）、MhM1022-M1-DXd-ADC（黒四角）、MhM1020-M1-DXd-ADC（上向き黒三角）、MhM1023-M1-DXd-ADC（黒丸）、Vehicle（ABS）（丸）の抗腫瘍活性を示している。図中のエラーバーは標準誤差（ $n=6$ ）を示す。

[図16]図16は、（A）公知の抗EGFR抗体CetuximabとヒトEGFRの相互作用をELISAで評価した結果および、（B）WO2018/147245号に記載の公知の抗GPCR5D抗体C3022とヒトGPCR5D抗原の相互作用をELISAで評価した結果をそれぞれ示している。抗体は濃度依存的に抗原に結合した。

[図17]図17は、（A）抗EGFR抗体Cetuximabまたは、（B）抗GPCR5D抗体C3022に対するパニング後のペプチドバインドアの濃縮度合いをプルダウン実験で評価した際のoutput/input比を示している。ヒト血清由来IgG（IgG mixture）よりも標的抗体で値が高く、標的抗体特異的なペプチドの濃縮が示唆された。

[図18]図18は、uPA基質とCAPN基質の両方を搭載した（A）抗EGFRマスク抗体とヒトEGFR抗原の相互作用をELISAで評価した結果または、（B）抗GPCR5Dマスク抗体とヒトGPCR5D抗原の相互作用をELISAで評価した結果をそれぞれ示している。結合活性はプロテアーゼ非添加条件（実線）、uPA添加条件（点線）および、CAPN 1添加条件（破線）で評価した。マスク抗体はuPAおよびCAPN 1添加条件においてプロテアーゼ非添加条件よりも強い結合活性を示した。

[図19]図19は、CD98陽性ヒト肺扁平上皮癌細胞株EBC-1を移植したマウスモデル（（A）用量3mg/kg、（B）用量1mg/kg）にお

ける (A) MhM1018-M1-DXd-ADC (四角)、MhM1019-M1-DXd-ADC (黒四角)、MhM1020-M1-DXd-ADC (上向き黒三角)、MhM1021-M1-DXd-ADC (黒丸)、Vehicle (ABS) (丸) および (B) MhM1018-M1-DXd-ADC (四角)、MhM1022-M1-DXd-ADC (黒四角)、MhM1020-M1-DXd-ADC (上向き黒三角)、MhM1023-M1-DXd-ADC (黒丸)、Vehicle (ABS) (丸) の抗腫瘍活性を示している。図中のエラーバーは標準誤差 ($n=6$) を示す。

[図20] 図20は、抗TROP2マスク抗体MHT3203またはMHT1903の (A) 塩化カルシウムを含むセルライゼート (黒色)、塩化カルシウムを含まないセルライゼート (灰色)、ライゼートを含まないバッファー (斜線) と反応させた際の結合活性、および (B) 塩化カルシウムを含むセルライゼート (黒色)、塩化カルシウムとCAPN阻害剤PD150606を含むセルライゼート (灰色)、ライゼートを含まないバッファー (斜線) と反応させた際の結合活性をそれぞれ示している。図中のエラーバーは標準偏差 ($n=3$) を示す。また、バッファー条件は平均値 ($n=2$) を示す。

[図21] 図21は、1種類のプロテアーゼまたは2種類のプロテアーゼと反応させた際の抗TROP2マスク抗体MHT3202の結合活性を示している。図中のエラーバーは標準偏差 ($n=3$)、**は有意差 (有意水準1%) を示す。

[図22] 図22は、uPA基質とCAPN基質を搭載した抗TROP2マスク抗体とヒトTROP2抗原の相互作用をELISAで評価した結果を示している。結合活性はプロテアーゼ非添加条件 (実線)、uPA添加条件 (点線) および、CAPN1添加条件 (破線) で評価した。(A) MHT3203はuPAおよびCAPN1添加条件においてプロテアーゼ非添加条件よりも強い結合活性を示した。(B) MHT3219はuPAおよびCAPN1添加条件においてプロテアーゼ非添加条件よりも強い結合活性を示した。

[図23] 図23は、(A) TROP2陽性ヒト肺粘液性類表皮癌細胞株NCI

ーH292または(B)TROP2陽性ヒト咽頭癌細胞株FaDuを移植したマウスモデルにおけるMHT3203-PBD-ADC(四角)および、MHT3219-PBD-ADC(黒四角)、Vehicle(ABS)(丸)の抗腫瘍活性を示している。図中のエラーバーは標準誤差(n=6)を示す。

[図24]図24は、プロテアーゼ基質の異なる切断リンカーを搭載した抗TROP2マウス抗体をバッファー(斜線)、CAPN1(黒色)、CAPN2(灰色)、uPA(白色)と反応させた際の結合活性を示している。結合活性(Binding Intensity)はuPAと反応させた際の値を100%として表示している。

[図25]図25は、(A)TROP2陽性ヒト肺粘液性類表皮癌細胞株NCI-H292または(B)TROP2陽性ヒト咽頭癌細胞株FaDuを移植したマウスモデルにおけるMHT3203-PBD-ADC(四角)、MHT5082-PBD-ADC(黒四角)、MHT5085-PBD-ADC(上向き黒三角)、MHT5086-PBD-ADC(黒丸)、MHT5093-PBD-ADC(黒ひし形)、MHT5094-PBD-ADC(下向き黒三角)、MHT5095-PBD-ADC(ひし形)、Vehicle(ABS)(丸)の抗腫瘍活性を示している。図中のエラーバーは標準誤差(n=5又は6)を示す。

[図26]HT1-11 H鎖全長のアミノ酸配列(配列番号1)

[図27]HT1-11 L鎖全長のアミノ酸配列(配列番号2)

[図28]MHT1001全長のアミノ酸配列(配列番号3)

[図29]MHT1002全長のアミノ酸配列(配列番号4)

[図30]HT1-11-scFv-HL全長のアミノ酸配列(配列番号5)

[図31]HT1-11-scFv-LH全長のアミノ酸配列(配列番号6)

[図32]MHT1007 H鎖全長のアミノ酸配列(配列番号7)

[図33]MHT1008 H鎖全長のアミノ酸配列(配列番号8)

[図34]MHT1009 H鎖全長のアミノ酸配列(配列番号9)

- [図35] M H T 3 0 0 2 H鎖全長のアミノ酸配列（配列番号10）
- [図36] h u m a n C A P N 1 全長のアミノ酸配列（配列番号11）
- [図37] 新規 C A P N 基質のアミノ酸配列（配列番号12）
- [図38] M H T 3 2 0 1 H鎖全長のアミノ酸配列（配列番号13）
- [図39] M H T 3 2 0 2 H鎖全長のアミノ酸配列（配列番号14）
- [図40] M H T 1 7 1 3 H鎖全長のアミノ酸配列（配列番号15）
- [図41] M H T 3 4 2 3 H鎖全長のアミノ酸配列（配列番号16）
- [図42] M H T 3 2 0 3 H鎖全長のアミノ酸配列（配列番号17）
- [図43] h M 2 3 H 1 L 1 H鎖全長のアミノ酸配列（配列番号18）
- [図44] h M 2 3 H 1 L 1 L鎖全長のアミノ酸配列（配列番号19）
- [図45] M h M 1 0 0 8 L鎖全長のアミノ酸配列（配列番号20）
- [図46] M h M 1 0 1 3 L鎖全長のアミノ酸配列（配列番号21）
- [図47] h M 2 3 - M 1 H鎖全長のアミノ酸配列（配列番号22）
- [図48] h M 2 3 - M 1 L鎖全長のアミノ酸配列（配列番号23）
- [図49] M h M 1 0 1 8 - M 1 L鎖全長のアミノ酸配列（配列番号24）
- [図50] M h M 1 0 1 9 - M 1 L鎖全長のアミノ酸配列（配列番号25）
- [図51] M h M 1 0 2 0 - M 1 L鎖全長のアミノ酸配列（配列番号26）
- [図52] M h M 1 0 2 1 - M 1 L鎖全長のアミノ酸配列（配列番号27）
- [図53] M h M 1 0 2 2 - M 1 L鎖全長のアミノ酸配列（配列番号28）
- [図54] M h M 1 0 2 3 - M 1 L鎖全長のアミノ酸配列（配列番号29）
- [図55] C e t u x i m a b H鎖全長のアミノ酸配列（配列番号30）
- [図56] C e t u x i m a b L鎖全長のアミノ酸配列（配列番号31）
- [図57] C 3 0 2 2 H鎖全長のアミノ酸配列（配列番号32）
- [図58] C 3 0 2 2 L鎖全長のアミノ酸配列（配列番号33）
- [図59] M C E - 2 1 0 5 L鎖全長のアミノ酸配列（配列番号34）
- [図60] M C 3 - 9 0 0 3 H鎖全長のアミノ酸配列（配列番号35）
- [図61] ヒト u P A が認識し、その基質となるアミノ酸配列及びヒト M M P 1
またはヒト M M P 9 が認識し、その基質となるアミノ酸配列（配列番号36）

～41)

[図62]MHT1903のH鎖全長のアミノ酸配列(配列番号42)

[図63]MHT3219のH鎖全長のアミノ酸配列(配列番号43)

[図64]新規CAPN基質のアミノ酸配列(配列番号44～53)

[図65]MHT5082のH鎖全長のアミノ酸配列(配列番号54)

[図66]MHT5084のH鎖全長のアミノ酸配列(配列番号55)

[図67]MHT5085のH鎖全長のアミノ酸配列(配列番号56)

[図68]MHT5086のH鎖全長のアミノ酸配列(配列番号57)

[図69]MHT5090のH鎖全長のアミノ酸配列(配列番号58)

[図70]MHT5091のH鎖全長のアミノ酸配列(配列番号59)

[図71]MHT5092のH鎖全長のアミノ酸配列(配列番号60)

[図72]MHT5093のH鎖全長のアミノ酸配列(配列番号61)

[図73]MHT5094のH鎖全長のアミノ酸配列(配列番号62)

[図74]MHT5095のH鎖全長のアミノ酸配列(配列番号63)

[図75]MMPリンカーのアミノ酸配列(配列番号64)

発明を実施するための形態

[0013] 以下、本発明を詳細に説明する。

[0014] 1. 定義

本発明において「DXd」とは、「N-[(1S, 9S)-9-Ethyl-5-fluoro-9-hydroxy-4-methyl-10, 13-dioxo-2, 3, 9, 10, 13, 15-hexahydro-1H, 12H-benzo[de]pyrano[3', 4':6, 7]indolizino[1, 2-b]quinolin-1-yl]-2-hydroxyacetamide」を意味する。

[0015] 本発明において「PBD」とは、「pyrrol benzodiazepine」を意味する。

[0016] 本発明において「ミモトープ」とは、「抗体の相補性決定領域(CDR: Complementarity determining region)

に結合するペプチド」を意味する。ミモトープのアミノ酸配列は抗体が認識する抗原のアミノ酸配列（エピトープ）とは必ずしも一致しない特徴をもつ（Molecular Immunology. ; 23（7）：709－715（1986））。

- [0017] 本発明において、「抗体」は、定常領域と可変領域とを有する免疫グロブリンの意味で用いる。抗体は、天然のものであるか、又は、部分的若しくは完全合成により製造された免疫グロブリンであるかは特に限定されない。
- [0018] 基本的な4鎖抗体の構造は、2つの同一な軽鎖（L鎖）、及び、2つの同一な重鎖（H鎖）から構成される。軽鎖は1つの共有ジスルフィド結合により重鎖に結合する。2つの重鎖は、重鎖のアイソタイプに応じて1つ又は複数のジスルフィド結合により互いに結合している。それぞれの軽鎖、重鎖は規則的な間隔を持つ鎖内ジスルフィド結合を持つ。重鎖と軽鎖には、アミノ酸配列が非常に高い類似性を示す定常領域とアミノ酸配列の類似性が低い可変領域とが存在する。軽鎖は、定常領域（CL）が続く可変領域（VL）をアミノ末端に有する。重鎖は3つの定常領域（CH1／CH2／CH3）が続く可変領域（VH）をアミノ末端に有する。VLとVHは対となり、CLは重鎖の第一定常領域（CH1）と並んでいる。VLとVHは対となって、単一の抗原結合部位を形成する。
- [0019] 本発明の抗体の定常領域としては、特に限定されるものではないが、ヒトの疾患を治療又は予防するための本発明の抗体としては、好適にはヒト抗体の定常領域が使用される。ヒト抗体の重鎖定常領域としては、例えば、C γ 1、C γ 2、C γ 3、C γ 4、C μ 、C δ 、C α 1、C α 2、C ϵ 等を挙げることができる。ヒト抗体の軽鎖定常領域としては、例えば、C κ 、C λ 等を挙げることができる。
- [0020] Fabは、重鎖のVHとそれに続くCH1、及び、軽鎖のVLとそれに続くCLからなる。VHとVLは、相補性決定領域（CDR）を含む。VHとCH1及びVLとCLの間にはリンカー又は連結部が在ってもよい。
- [0021] Fc（Fc領域ともいう）は、重鎖の定常領域のカルボキシル末端領域で

あって、CH₂とCH₃を含み、二量体である。本発明のFcは、天然（野生型）の配列のFcであっても、天然の配列に変異がなされた変異型のFc（「変異型Fc」という）であってもよく、本発明の多重特異性分子及び二重特異性分子において、好適なFc領域は変異型Fcであり、より好適にはヘテロ二量体を形成し得る1組のFcである。1組のFcとしては、後述の、第1ポリペプチドに含まれるFc（i）及び第2ポリペプチドに含まれるFc（ii）の組合せをあげることができるが、1組のFcが会合（ヘテロ二量体形成）することができれば、それらに限定されるものではない。

[0022] 変異型Fcとしては、WO2013/063702号に開示される、向上した安定性を有するヘテロ多量体に含まれる改変Fc領域（ヘテロ二量体Fc領域を含む）、WO96/27011号に開示される、異種多量体に含まれる、「突起」及び「空隙」を有するIgG抗体から誘導されるイムノグロブリンのCH₃領域を含むFc、WO2009/089004号に開示される、1以上のアミノ酸残基を荷電アミノ酸に置換することで静電的に有利であるヘテロ二量体に含まれるCH₃ドメインを含むFc、WO2014/110601号に開示される、立体構造変異及び／又はpI（等電点）変異を用いた異種二量体に含まれる異種二量体Fc領域、WO2010/151792号に開示される、プロテインAへの結合を無くすか又は減少させる改変を含むCH₃ドメインを含む、ヘテロ二量体のFc等が例示されるが、これらに限定されるものではない。

[0023] 可変領域は、超可変領域（HVR：hypervariable region）と称される極度の可変性を有する領域と、その領域により分離されたフレームワーク領域（FR：Framework region）と呼ばれる比較的不变の領域からなる。天然の重鎖と軽鎖の可変領域は、3つの超可変領域により接続される4つのFRを含み、各鎖の超可変領域はFRにより他の鎖の超可変領域とともに極近傍に保持され、抗体の抗原結合部位の形成に寄与している。

[0024] 抗体分子の重鎖及び軽鎖にはそれぞれ3箇所の相補性決定領域（CDR：

Complementarity determining region) があることが知られている。相補性決定領域は、超可変領域とも呼ばれ、抗体の重鎖及び軽鎖の可変領域内にあって、一次構造の変異性が特に高い部位であり、重鎖及び軽鎖のポリペプチド鎖の一次構造上において、通常、それぞれ3ヶ所に分離している。本発明においては、抗体の相補性決定領域について、重鎖の相補性決定領域を重鎖アミノ酸配列のアミノ末端側からCDRH1、CDRH2、CDRH3と表記し、軽鎖の相補性決定領域を軽鎖アミノ酸配列のアミノ末端側からCDRL1、CDRL2、CDRL3と表記する。これらの部位は立体構造の上で相互に近接し、結合する抗原に対する特異性を決定している。

- [0025] 本発明において、CDRの位置と長さは、IMGTの定義 (Developmental and Comparative Immunology 27 (2003) 55-77) により決定した。
- [0026] FRは、可変領域のCDR以外の部分である。可変領域は、一般にFR1、FR2、FR3、FR4の4つのFRを持つ。
- [0027] 重鎖並びに軽鎖に含まれるCDRとFRは、アミノ末端からカルボキシル末端に向かって、FRH1-CDRH1-FRH2-CDRH2-FRH3-CDRH3-FRH4、並びに、FRL1-CDRL1-FRL2-CDRL2-FRL3-CDRL3-FRL4、の順にそれぞれ配置される。
- [0028] CDRとFRの位置は、当技術分野で周知の様々な定義、例えば、IMGT以外にも、Kabat、Chothia、AbM、contact等の定義により決定することもできる。
- [0029] 本発明において、抗体が結合する「部位」、すなわち抗体が認識する「部位」とは、抗体が結合又は認識する抗原上の部分ペプチド又は部分高次構造を意味する。
- [0030] 本発明においては、かかる部位のことをエピトープ、抗体の結合部位とも呼ぶ。本発明において、「変異抗体」とは、元の抗体が有するアミノ酸配列においてアミノ酸が置換、欠失、付加（付加には挿入が含まれる）（以下、

「変異」と総称する)してなるアミノ酸配列を有し、且つ本発明の標的とする抗原に結合するポリペプチドを意味する。かかる変異抗体における変異アミノ酸の数は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、15、20、25、30、40又は50個である。かかる変異抗体も本発明の「抗体」に包含される。

[0031] 本発明において、「1又は数個」における「数個」とは、2～10個を指す。

本発明において、「分子」は、上述の抗体、抗体の抗原結合断片を含む分子であり、さらに抗体又はそれらに由来する複数の抗原結合断片より形成された多重特異的である分子を含む。

[0032] 本発明において「AがBを搭載する」とは「AがBを含む」又は「AにBが結合、付加もしくは融合している」ことを意味する。例えば、「基質を搭載する抗体」は、「基質を含む抗体」、「基質が結合した抗体」、「基質が付加した抗体」又は「基質が融合した抗体」と解することができる。

[0033] 2. 標的抗原に結合する分子

本発明は、標的抗原に結合する分子であって、特定の環境で前記標的抗原に特異的に結合する分子である。

[0034] 特定の環境とは、特定の組織における環境をいい、例えば、癌微小環境が挙げられる。癌微小環境とは、癌組織内における環境をいい、例えば、プロテアーゼが存在する環境である。

[0035] 本発明の標的抗原に結合する分子は、標的抗原に結合する部分、該部分に含まれる標的抗原結合部位を認識する第1ペプチド及び細胞質内に局在するプロテアーゼにより切断されるアミノ酸配列を含む第2ペプチドを含み、第1ペプチド、第2ペプチド及び標的抗原結合部分の順に連結している。標的抗原に結合する部分を標的抗原結合部分 (a moiety that binds to a target antigen)ともいう。本発明において、標的抗原結合部分を[a]部分、第1ペプチドを[b]部分、第2ペプチドを[c]部分と呼ぶことがある。

[0036] 標的抗原に結合する部分は、好ましくは、ポリペプチドである。該部分は

、抗体抗原反応又はタンパク質（例えば、受容体）ーリガンド結合により、標的抗原に結合する。標的抗原に結合する部分は、より好ましくは、抗体抗原反応により標的抗原に結合する抗体又は抗体の抗原結合断片である。

[0037] 抗体

本発明の抗体としては、非ヒト動物由来の抗体（非ヒト動物抗体）、ヒト抗体、キメラ化抗体（「キメラ抗体」ともいう）、ヒト化抗体などを挙げることができ、好ましくはヒト抗体又はヒト化抗体を用いることができる。本発明の抗体の範囲には、抗体の変異体（後述の「変異抗体」）も含まれ、例えば、ヒト抗体の範囲には、ヒト変異抗体も含まれ、ヒト化抗体の範囲には、ヒト化変異抗体も含まれる。

[0038] 非ヒト動物抗体としては、哺乳類、鳥類等の脊椎動物に由来する抗体などを挙げることができる。哺乳類由来の抗体としては、マウス抗体、ラット抗体などのげっ歯類、又はラクダ由来の抗体などを挙げることができる。鳥類由来の抗体としては、ニワトリ抗体等を挙げることができる。

[0039] キメラ化抗体としては、非ヒト動物抗体由来の可変領域とヒト抗体（ヒト免疫グロブリン）定常領域とを結合してなる抗体などを挙げることができるが、それらに限定されるものではない。

[0040] ヒト化抗体としては、非ヒト動物抗体の可変領域中のCDRをヒト抗体（ヒト免疫グロブリンの可変領域）に移植したもの、CDRに加え非ヒト動物抗体のフレームワーク領域の配列も一部ヒト抗体に移植したもの、それらのいずれかの非ヒト動物抗体由来の1つ又は2つ以上のアミノ酸をヒト型のアミノ酸で置換したものなどを挙げることができるが、それらに限定されるものではない。

[0041] 抗体は、公知の種々の方法で作製することができる。公知の方法として、ハイブリドーマを用いる方法や細胞免疫法等により作製し、遺伝子組換えの手法により作製することができる。また、ヒト抗体ライブラリーより選別したファージディスプレイ由来のヒト抗体を取得する方法も知られている。例えば、ヒト抗体の可変領域をscFvとしてファージ表面に発現させて、抗

原に結合するファージを選択するファージディスプレイ法を用いることができる。抗原に結合することで選択されたファージの遺伝子を解析することによって、抗原に結合するヒト抗体の可変領域をコードするDNA配列を決定することができる。抗原に結合するscFvのDNA配列が明らかになれば、当該配列を有する発現ベクターを作製し、適当な宿主に導入して発現させることによりヒト抗体を取得することができる（WO92/01047号、WO92/20791号、WO93/06213号、WO93/11236号、WO93/19172号、WO95/01438号、WO95/15388号、Annu. Rev. Immunol (1994) 12, 433-455）。また、ヒト抗体は、ヒト抗体の重鎖と軽鎖の遺伝子を含むヒトゲノムDNA断片を有するヒト抗体産生マウスを用いた方法（Tomizuka, K. et al., Nature Genetics (1997) 16, p. 133-143, ; Kuroiwa, Y. et al., Nuc. Acids Res. (1998) 26, p. 3447-3448; Yoshida, H. et al., Animal Cell Technology: Basic and Applied Aspects vol. 10, p. 69-73 (Kitagawa, Y., Matuda, T. and Iijima, S. eds.), Kluwer Academic Publishers, 1999. ; Tomizuka, K. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (2000) 97, p. 722-727等を参照。）によっても取得することができるが、それらに限定されない。ヒト治療用又は予防用抗体の定常領域としては、好適には、ヒト抗体のものが使用される。ヒト抗体の重鎖定常領域としては、例えば、C γ 1、C γ 2、C γ 3、C γ 4、C μ 、C δ 、C α 1、C α 2、C ϵ 等をあげることができる。ヒト抗体の軽鎖定常領域としては、例えば、C κ 、C λ 等をあげることができる。

[0042] 抗体の抗原結合断片とは、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域から構成される、抗原との結合活性を有する抗体の部分断片を意味する。抗体の抗原結合断

片としては、例えば、Fab、F(ab')₂、scFv、Fab'、Fv、single-domain antibody (sdAb) 等の抗原結合断片を挙げることができるが、それらに限定されるものではない。かかる抗体の抗原結合断片は、抗体蛋白質の全長分子をパパイン、ペプシン等の酵素で処理することによって得られたものに加え、組換え遺伝子を用いて適当な宿主細胞において産生された組換え蛋白質であってもよい。

[0043] 抗体又はその結合断片の変異体

本発明の抗体又はその抗原結合断片の変異体には、好適には、蛋白質の分解若しくは酸化に対する感受性の低下、生物活性や機能の維持、改善若しくは低下や変化の抑制、抗原結合能の改善若しくは調節、又は理化学的性質若しくは機能的性質の付与等がなされ得る。蛋白質は、その表面にある特定のアミノ酸側鎖が変化して当該蛋白質の機能や活性が変化することが知られ、そのような例には、アスパラギン側鎖の脱アミド化、アスパラギン酸側鎖の異性化等が含まれる。そのようなアミノ酸側鎖の変化を防ぐために別のアミノ酸に置き換えたものも、本発明の変異体の範囲に含まれる。

[0044] 本発明の変異体の例として、抗体又はその抗原結合断片の有するアミノ酸配列において保存的アミノ酸置換されてなるアミノ酸配列を有する抗体又はその抗原結合断片を挙げることができる。保存的アミノ酸置換とは、アミノ酸側鎖に関連のあるアミノ酸グループ内で生じる置換である。

[0045] 好適なアミノ酸グループは、以下の通りである：酸性グループ＝アスパラギン酸、グルタミン酸；塩基性グループ＝リジン、アルギニン、ヒスチジン；非極性グループ＝アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン；及び非常電極性ファミリー＝グリシン、アスパラギン、グルタミン、システイン、セリン、スレオニン、チロシン。他の好適なアミノ酸グループは次のとおりである：脂肪族ヒドロキシグループ＝セリン及びスレオニン；アミド含有グループ＝アスパラギン及びグルタミン；脂肪族グループ＝アラニン、バリン、ロイシン及びイソロイシン；並びに芳香族グループ＝フェニルアラニン、トリプトファン

及びチロシン。かかる変異抗体におけるアミノ酸置換は、元の抗体が有する抗原結合活性を低下させない範囲で行うのが好ましい。

[0046] 抗体又はその結合断片の修飾体、複合体

本発明は、抗体又はその結合断片の修飾体を提供する。本発明の抗体又はその結合断片の修飾体とは、本発明の抗体又はその結合断片に化学的又は生物学的な修飾が施されてなるものを意味する。化学的な修飾体には、アミノ酸骨格への化学部分の結合、N-結合又はO-結合炭水化物鎖の化学修飾体等が含まれる。生物学的な修飾体には、翻訳後修飾（例えば、N-結合又はO-結合への糖鎖付加、糖鎖リモデリング、アミノ末端領域又はカルボキシル末端領域のプロセッシング、脱アミド化、アスパラギン酸の異性化、メチオニンの酸化）されたもの、原核生物宿主細胞を用いて発現させることによりアミノ末端にメチオニン残基が付加したもの等が含まれる。また、本発明の抗体又は抗原の検出又は単離を可能にするために標識されたもの、例えば、酵素標識体、蛍光標識体、アフィニティー標識体もかかる修飾物の意味に含まれる。このような本発明の抗体又はその結合断片の修飾物は、元の本発明の抗体又はその結合断片の安定性及び血中滞留性の改善、抗原性の低減、かかる抗体又は抗原の検出又は単離等に有用である。

[0047] 化学的修飾体に含まれる化学部分としては、ポリエチレングリコール（PEG）、エチレングリコール／プロピレングリコールコポリマー、カルボキシメチルセルロース、デキストラン、ポリビニルアルコール等の水溶性ポリマーを例示することができる。

[0048] 生物学的な修飾物としては、酵素処理や細胞処理等により修飾が施されたもの、遺伝子組換えによりタグ等他のペプチドが付加された融合体、並びに内因性又は外来性の糖鎖修飾酵素を発現する細胞を宿主として調製されたものの等を挙げることができる。

[0049] かかる修飾は、抗体又はその結合断片における任意の位置に、又は所望の位置において施されてもよく、1つ又は2つ以上の位置に同一又は2種以上の異なる修飾がなされてもよい。

- [0050] しかし、これらの重鎖配列の欠失、あるいは、重鎖又は軽鎖配列の修飾は、抗体の抗原結合能及びエフェクター機能（補体の活性化や抗体依存性細胞傷害作用など）には、あまり影響を及ぼさず、好適には、有意に影響を及ぼさない。
- [0051] 従って、本発明には当該欠失又は修飾を受けた抗体も含まれる。例えば、重鎖カルボキシル末端において1又は2つのアミノ酸が欠失した欠失体（*Journal of Chromatography A*; 705; 129-134（1995））、重鎖カルボキシル末端のグリシン、リジンの2アミノ酸残基が欠失し、新たにカルボキシル末端に位置するプロリン残基がアミド化された当該欠失体（*Analytical Biochemistry*, 360: 75-83（2007））、抗体の重鎖又は軽鎖のアミノ末端のグルタミン又はグルタミン酸残基がピログルタミル化修飾された抗体（WO2013/147153号）等を挙げることができる（それらをまとめて「欠失体」と呼ぶ）。ただし、抗原結合能及びエフェクター機能が保たれている限り、本発明に係る抗体の重鎖及び軽鎖のカルボキシル末端の欠失体は上記の種類に限定されない。本発明に係る抗体が2本以上の鎖（例えば重鎖）を含む場合、当該2本以上の鎖（例えば重鎖）は、完全長及び上記の欠失体からなる群から選択される重鎖のいずれか一種であっても良いし、いずれか二種を組合せたものであっても良い。各欠失体の量比又は分子数比は本発明に係る抗体を産生する哺乳類培養細胞の種類及び培養条件に影響を受け得るが、本発明に係る抗体の主成分としては2本の重鎖の少なくとも片方、好ましくは双方でカルボキシル末端の1つ、2つ又は数個のアミノ酸残基が欠失している場合を挙げることができる。
- [0052] さらに、本発明の抗体又はその抗原結合断片（本発明の分子、多重特異的分子、二重特異的分子等に含まれるもの等）に、発現ベクター及び／又はシグナル配列等に由来する1乃至数個のアミノ酸がアミノ末端及び／又はカルボキシル末端に付加され（且つその一部又は全部が前記のように修飾され）ていても、所望の抗原結合活性が維持されていれば、本発明の抗体の修飾体

又はその抗原結合断片の修飾体の範囲に包含され、そのような抗体又は抗原結合断片の修飾体を含む分子も本発明の分子の範囲に包含される。

[0053] 本発明において「抗体又はその結合断片」は「抗体又はその抗原結合断片の修飾体」もその意味に含むものである。また、本発明の分子、多重特異的な分子、二重特異的な分子等に含まれる「抗体又はその抗原結合断片」はかかる「抗体又はその抗原結合断片の修飾体」もその意味に含むものである。

[0054] また、本発明の抗体に結合している糖鎖修飾を調節すること（グリコシル化、脱フコース化等）によって、抗体依存性細胞傷害活性を増強することが可能である。抗体の糖鎖修飾の調節技術としては、国際特許公開WO 99/54342号、WO 00/61739号、WO 02/31140号等が知られているが、これらに限定されるものではない。

[0055] 標的抗原に結合する部分：[a] 部分

標的抗原とは、特定の疾患に関連した分子をいう。特定の疾患に関連した分子とは、該疾患の原因となっている抗原や分子の疾患に罹患した場合に、該疾患において出現する異常細胞において、発現するか、又は発現が亢進する分子をいう。該分子に上記の標的抗原に結合する部分が結合することにより、異常細胞を攻撃し、疾患の症状を軽減し、又は疾患を治療し得る分子をいう。前記異常細胞は、好ましくは腫瘍細胞や間質細胞であり、標的抗原は、腫瘍細胞については、腫瘍抗原であり、間質細胞については、間質細胞上に発現している分子である。間質細胞は、腫瘍細胞と相互作用を行い、がんの増殖及び進行に大きな役割を果たす。腫瘍抗原は、腫瘍細胞に発現している抗原又は正常細胞ががん化した腫瘍細胞に発現する抗原であり、上記の標的抗原に結合する部分が腫瘍抗原に結合することにより、腫瘍細胞の増殖を阻害し、腫瘍細胞を傷害し、又は腫瘍細胞を死滅（アポトーシス又はネクローシス）させる。

[0056] 腫瘍抗原として、CD98、TROP2、EGFR、GPCR5D、CD33、CD37、DR5、EPHA2、FGFR2、FGFR4、FOLR1、VEGF、CD20、CD22、CD70、PD-L1、CTLA-4

、CD166、CD71、CD47、CDH6、CD147、Mesothelin、A33、CanAg、G250、MUC1、GPNMB、Integrin、Tenascin-C、CLDN6、DLL-3、SLC44A4等が挙げられる。

[0057] また、上記腫瘍抗原に対する抗体として、抗CD98抗体（特開2017-114763、WO2007/114496、WO2008/017828、WO2009/043922、WO2009/090553、特開2012-092068、WO2011/118804及びWO2013/078377等に記載されている。）、抗TROP2抗体（Linnenbach A J他 Proc. Natl. Acad. Sci. 86巻（1号）， pp27-31（1989）、WO2008/144891、WO2011/145744、WO2011/155579、WO2013/077458、WO2003/074566、WO2011/068845、WO2013/068946、US7999083及びWO2015/098099等に記載されている。）、panitumumab、nimotuzumab、cetuximab、ametumumab（SY-101）、SYN-004、SCT-200、tomuzotuximab、GC-1118、GR-1401、depatuxizumab（ABT-806）、Serclutamab、AMG595及びmatuzumab等の抗EGFR抗体、抗GPC5D抗体（WO2018/147245及びWO2016/090329等に記載されている。）等が挙げられる。本発明の標的抗原に結合する部分は、これらの抗体に由来するか又は含んでよい。

[0058] 間質細胞に発現している分子として、例えば、FAP（fibroblast activation protein）等が挙げられる。

[0059] 標的抗原に結合する部分は、好適には、第1ペプチド及び第2ペプチドには含まれないアミノ酸配列を含んでなり、より好適には該アミノ酸配列からなるポリペプチドである。

[0060] 標的抗原及び該標的抗原に結合する部分は、抗原及び該抗原に結合する抗

体又は抗体の抗原結合断片であってもよいが、その組み合わせに限定されるものではなく、リガンド及び該リガンドに結合する受容体（又はその逆）、サイトカイン及び該サイトカインが結合する受容体（又はその逆）を例示することができる。また、抗体等以外の分子として、標的抗原に結合する非免疫グロブリンタンパク質、核酸アプタマー等の核酸分子、低分子化合物も例示することができる。

[0061] 第1ペプチド：[b]部分

標的抗原に結合する部分（[a]部分）に含まれる該標的抗原結合部位を認識する第1ペプチドは、標的抗原に結合する部分に含まれる該標的抗原結合部位を認識することにより、該部位をマスクし、標的抗原に結合する部分が標的抗原に結合できなくする、結合し難くする、又は、結合するのを阻害もしくは妨害するペプチドである。標的抗原に結合する部分が抗体又は抗体の抗原結合断片（以下「抗体等」という。）である場合、第1ペプチドは抗体等の抗原との結合領域に結合するペプチドである。抗体等の抗原との結合領域は、抗体等の可変領域、特に相補性決定領域（CDR）に存在する。抗体等は抗原のエピトープ（抗原決定基）と結合するので、第1ペプチドはエピトープを模倣したペプチドである。抗原のエピトープを模倣（mimic）したペプチドをミモトープ（Mimotope）といい、本発明において、前記第1ペプチドは、好ましくはCDRに結合するミモトープである。ミモトープは、6～30個、好ましくは10～20個、さらに好ましくは13～17個、特に好ましくは15個のアミノ酸からなるペプチドである。ミモトープは、例えば、上記のアミノ酸数からなる各種ディスプレイ（ファージディスプレイ、リボソームディスプレイ、核酸ディスプレイ、細菌ディスプレイ等）・ライブラリーを作製し、パニングによりスクリーニングを行うことにより、標的抗原に結合する部分に含まれる該標的抗原結合部位を認識するペプチドを提示するファージ粒子を選別し、該ファージ粒子からミモトープをコードするDNA及びそのヌクレオチド配列を得て製造することができる。ペプチドがミモトープであること（抗体のCDRに結合していること）

は、例えば、マスク抗体、又は抗体と当該ペプチドの複合体を結晶化して、X線結晶構造解析を行うことにより確認できる。また、ペプチドが抗体に対し抗原と（競合的に）結合することをSPR等により確認できれば、当該ペプチドは当該抗体のCDRに結合するミモトープであることが強く示唆される（実施例4参照）。

[0062] 前述の通り、標的抗原に結合する部分は、抗体又は抗体の抗原結合断片（以下「抗体等」という。）以外の分子であってもよく、ミモトープ以外の第1ペプチドとして、標的抗原がリガンドの場合、該リガンドが結合する受容体に含まれる該リガンド結合部位を認識するペプチドを、標的抗原がサイトカインの場合、該サイトカインが結合する受容体に含まれる該サイトカイン結合部位を認識するペプチドを、それぞれ例示することができる。標的抗原に結合する部分が非免疫グロブリンタンパク質の場合、第1ペプチドは該タンパク質に含まれる該標的抗原部位を認識するペプチドであり、標的抗原に結合する部分が核酸分子の場合、第1ペプチドは該核酸分子に含まれる該標的抗原部位を認識するペプチドであり、標的抗原に結合する部分が低分子化合物の場合、第1ペプチドは該低分子化合物に含まれる該標的抗原部位を認識するペプチドである。

[0063] 第2ペプチド：[c]部分

細胞質内に局在するプロテアーゼにより切断されるアミノ酸配列を含む第2ペプチドは、細胞質内に局在するプロテアーゼの基質となり、該プロテアーゼにより切断されるアミノ酸配列を含む。該プロテアーゼは、第2ペプチドに含まれるアミノ酸配列を認識して切断する。本発明においては「細胞質内に局在するプロテアーゼ」を「細胞内プロテアーゼ」とも呼び、2つの用語は互換性がある。第2ペプチドを「切断リンカー」とも呼ぶ。

[0064] 本発明において、第2ペプチドは、好適には、さらに細胞外プロテアーゼの基質となり、該プロテアーゼにより切断されるアミノ酸配列（単に「基質」ともいう。あるプロテアーゼにより切断される基質を「当該プロテアーゼ基質」ともいう。）を含む。この場合、細胞内プロテアーゼの基質となるア

ミノ酸配列を第1切断アミノ酸配列と呼び、細胞外プロテアーゼの基質となるアミノ酸配列を第2切断アミノ酸配列と呼ぶことができる。本発明においては、第2ペプチドに、第1切断アミノ酸配列と第2切断アミノ酸配列を含ませることを、第2ペプチドにおいて、プロテアーゼ切断配列として、第1切断アミノ酸配列と第2切断アミノ酸配列を組合わせるともいう。

[0065] 細胞内プロテアーゼは、「細胞内作用型プロテアーゼ」ともいい、細胞内で発現した後、細胞外に分泌されることなく、細胞内で作用し、細胞のアポトーシスに関連する。細胞内プロテアーゼとして、細胞質性システインプロテアーゼであるカスパーゼ、カルパイン（「CAPN」ともいう。）、トリペプチジルペプチダーゼ等が挙げられる。カルパインは、CAPN1（ μ -カルパイン）、CAPN2（m-カルパイン）、CAPN3、CAPN4、CAPN5、CAPN6、CAPN7、CAPN8、CAPN9、CAPN10、CAPN11、CAPN12、CAPN13、CAPN14、CAPN15、CAPN16、CAPN17等のアイソフォームが存在するが、本発明においては、いずれのアイソフォームも利用することができ、好ましくは、CAPN1（カルパイン1）又はCAPN2（カルパイン2）を利用する。トリペプチジルペプチダーゼは、トリペプチジルペプチダーゼ1、トリペプチジルペプチダーゼ2等のアイソフォームが存在するが、本発明においては、いずれのアイソフォームも利用することができ、好ましくは、トリペプチジルペプチダーゼ2を利用する。従って、第2ペプチド中の第1切断アミノ酸配列としては、上記の細胞内プロテアーゼの基質となるアミノ酸配列であれば、すなわち、該プロテアーゼが認識し、切断するアミノ酸配列であれば特に限定されないが、好ましくは、ヒトCAPN1が認識し、その基質となるアミノ酸配列（「CAPN1基質」又は「CAPN基質」ともいう）を、CAPN基質としては、PLFAAP（図30、配列番号12）を、それぞれ好適な例としてあげることができる。

[0066] 細胞外プロテアーゼは、「細胞外作用型プロテアーゼ」ともいい、シグナル配列を有した状態で発現され、細胞外へ分泌され、細胞外で作用する。細

胞外プロテアーゼとして、ウロキナーゼ型プラスミノゲンアクチベータ（uPA）、マトリクスメタロプロテアーゼ（MMP）、プラスミン、カテプシン、マトリプターゼ、レグメイン等が挙げられる。MMPは、MMP 1、MMP 2、MMP 3、MMP 7、MMP 8、MMP 9、MMP 10、MMP 11、MMP 12、MMP 13、MMP 14、MMP 15、MMP 16、MMP 17、MMP 18、MMP 19、MMP 20、MMP 21、MMP 23A、MMP 23B、MMP 24、MMP 25、MMP 26、MMP 27、MMP 28等のアイソフォームが存在するが、本発明においては、いずれのアイソフォームも利用することができる。カテプシンとしては、カテプシンA、カテプシンB、カテプシンC、カテプシンD、カテプシンE、カテプシンF、カテプシンG、カテプシンH、カテプシンK、カテプシンL1、カテプシンL2、カテプシンO、カテプシンS、カテプシンW、カテプシンX/Z等のアイソフォームが存在するが、本発明においてはいずれのアイソフォームも利用することができる。従って、第2ペプチド中の第2切断アミノ酸配列としては、上記の細胞外プロテアーゼの基質となるアミノ酸配列であれば、すなわち、該プロテアーゼが認識し、切断するアミノ酸配列であれば特に限定されないが、好ましくは、ヒトuPAが認識し、その基質となるアミノ酸配列（「uPA基質」ともいう。）を、uPA基質としては、SGRSA NAILE（配列番号36、図61）、SGRSANA（配列番号37、図61）及びSGRSA（配列番号38、図61）を、また、ヒトMMP1が認識し、その基質となるアミノ酸配列（「MMP1基質」又は「MMP基質」ともいう。）を、MMP1基質としては、VLVPMAMMAS（配列番号39、図61）及びPLGLWA（配列番号40、図61）を、さらに、ヒトMMP9が認識し、その基質となるアミノ酸配列（「MMP9基質」ともいう。）を、MMP9基質としては、PLGLAG（配列番号41、図61）を、それぞれ好適な例としてあげることができる。

[0067] 第2ペプチドに、細胞内プロテアーゼの基質である第1切断アミノ酸配列と細胞外プロテアーゼの基質である第2切断アミノ酸配列の両方が含まれる

場合、その順序は限定されないが、例えば、第1ペプチド、第2ペプチド、標的抗原に結合する部分の順に連結している標的抗原に結合する分子において、第1ペプチド側に細胞外プロテアーゼの基質である第2切断アミノ酸配列が含まれ、標的結合部分側に細胞内プロテアーゼの基質である第1切断アミノ酸配列が含まれていてもよく、第1ペプチド、第2ペプチド、標的抗原に結合する部分の順に連結している標的抗原に結合する分子において、第1ペプチド側に細胞内プロテアーゼの基質である第1切断アミノ酸配列が含まれ、標的結合部分側に細胞外プロテアーゼの基質である第2切断アミノ酸配列が含まれていてもよいが、好適には、アミノ末端かカルボキシル末端に向かって、第2切断アミノ酸配列、第1切断アミノ酸配列の順に配置され、より好適には、好適な細胞外プロテアーゼであるuPAにより切断されるアミノ酸配列（uPA基質）又はMMPにより切断されるアミノ酸配列（MMP基質）が好適な細胞内プロテアーゼであるCAPNにより切断されるアミノ酸配列（CAPN基質）よりアミノ末端側に配置されてなる。従って、標的抗原に結合する分子においては、好適には、第1ペプチド、第2切断アミノ酸配列、第1切断アミノ酸配列、標的抗原結合部分の順に連結していてもよく、第1ペプチド、第1切断アミノ酸配列、第2切断アミノ酸配列、標的抗原結合部分の順に連結していてもよいが、より好適には、第1ペプチド、第2切断アミノ酸配列、第1切断アミノ酸配列、標的抗原結合部分の順に配置され、より一層好適には、第1ペプチド、uPA基質又はMMP基質、CAPN基質、標的抗原結合部分の順に配置されてなる。

[0068] 前数段落は、専ら第2切断アミノ酸配列が第2ペプチドに含まれる場合について記載しているが、第2切断アミノ酸配列は、本発明の標的抗原に結合する分子に含まれていれば、第2ペプチド以外に含まれてもよく、例えば、第1ペプチドの末端、第2ペプチドと標的抗原結合部分の間に挿入された第3のペプチドに含まれてもよい。

[0069] 第1ペプチド、第2ペプチド及び標的抗原結合部分はリンカー（2つのものをつなぐ部分であり、好適には、アミノ酸配列又は該アミノ酸配列からな

るペプチドである。)と結合していてもよい。すなわち、第1ペプチド、第2ペプチド及び標的抗原結合部分のいずれか1つが、他の2つのうち1つ又は両方とリンカーを介して結合していてもよい。ここで、リンカーは、アミノ酸1〜30個、好ましくは2〜20個、より好ましくは2〜10個からなるペプチドである。標的抗原結合部分が抗体又はその抗原結合断片である場合、当該部分のうち第1ペプチド又は第2ペプチドに結合するのは該抗体の重鎖若しくは軽鎖又はそれらの抗原結合断片のいずれでもよく、またそれらのアミノ末端、カルボキシル末端、末端以外の部位、又はそれらを修飾する部分(糖鎖、ポリマー等)のいずれでもよい。

[0070] 標的抗原に結合する分子

本発明の標的抗原に結合する分子は、標的抗原に結合する部分(〔a〕部分)、該部分に含まれる該標的抗原結合部位を認識する第1ペプチド(〔b〕部分)、及び、細胞質内に局在するプロテアーゼにより切断されるアミノ酸配列を含む第2ペプチド(〔c〕部分)を含み、好ましくはそれらが直接又は間接的に連結した状態で存在し、第1ペプチドが、標的抗原に結合する部分中の標的抗原結合部位に結合することにより、該標的抗原結合部位をマスクする。この結果、該標的抗原結合部位は、標的抗原に結合することができないか又は結合し難い。図1Aは、標的抗原に結合する部分が2価の抗体(IgG)であり、第2ペプチドが細胞外プロテアーゼ用基質(第2切断アミノ酸配列、図1Aの灰塗り部分)及び細胞内プロテアーゼ用基質(第1切断アミノ酸配列、図1Aの黒塗り部分)が連結したペプチドである分子であり、図1Aの格子柄で示された第1ペプチドが抗体の抗原との結合部位に結合し該部位をマスクしている。第1ペプチドは、標的抗原結合部位を認識し結合し得るが、第2ペプチドが切断され、第1ペプチド単独で存在する場合、物理化学的条件により、結合、解離するので、永続的に結合していることはできないと考えられる。例えば、本発明の標的抗原に結合する分子においては、第1ペプチドは、第2ペプチドを介して標的抗原に結合する部分に結合しているので、標的抗原に結合する分子は、第1ペプチドの位置が標的抗

原に結合する部分に含まれる該標的抗原結合部位の近傍に位置するようなコンフォメーションをとり、第1ペプチドは、分子のコンフォメーションが変化しない限り、平衡条件では標的抗原結合部位の大部分がマスクされているといった作用機序をとると想定することができるが、かかる機序はそれに限定されない。

[0071] プロテアーゼにより、第2ペプチドに含まれるプロテアーゼの基質となるアミノ酸配列が切断されると、第1ペプチドが標的抗原に結合する分子から解離し、第1ペプチドは、標的抗原結合部位に結合し続けることはできなくなり、この結果、標的抗原に結合する部分に含まれる該標的抗原結合部位が標的抗原に結合し得るようになり、切断前と比較して、該標的抗原に対しより高い結合親和性を有するようになると考えられる。

[0072] すなわち、本発明の標的抗原に結合する分子は、プロテアーゼが存在する環境下で、該プロテアーゼが存在しない環境下に比して、標的抗原により高い親和性をもって結合し得るようになる。

[0073] 本発明において利用する細胞内プロテアーゼは、好ましくは、正常な細胞に比して、異常な細胞においてより高発現しているか、より多量に存在するか又はより触媒活性が高いプロテアーゼであってもよい。そのような好適な細胞内プロテアーゼの場合、異常な細胞が存在する環境下において該細胞内プロテアーゼの総活性が多くなり、第2ペプチド（の第1切断アミノ酸配列）が切断されやすくなる。

[0074] 細胞内プロテアーゼは、通常では、細胞外に分泌されないが、細胞死や細胞膜の傷害により細胞が壊れると、細胞外に漏出し、細胞外で作用し得る。本発明の標的抗原に結合する分子は、細胞内プロテアーゼが細胞外に漏出した場合、細胞内プロテアーゼの作用により、第2ペプチド中の細胞内プロテアーゼの基質となるアミノ酸配列が切断され、標的抗原結合部分に含まれる標的抗体結合部位を認識してマスクする第1ペプチドが解離し、標的抗原に結合する部分がより高い親和性をもって標的抗原に結合し得るようになると推測され得る。

- [0075] 上記のように、本発明における標的抗原は、特定の疾患に関連した抗原であれば特に限定されないが、好ましくは腫瘍細胞及び／又は間質細胞等の異常細胞に存在し、異常の原因となる抗原である。
- [0076] 本発明の標的抗原に結合する分子中の第2ペプチド中の細胞内プロテアーゼの基質となるアミノ酸配列が、異常な細胞から漏出した細胞内プロテアーゼの作用により切断されることにより、標的抗原に結合する部分がより高い親和性をもって異常な細胞の標的抗原に結合し、異常な細胞への細胞死誘導を促進し、異常細胞による疾患の原因をより高度に除去すると考えられる。
- [0077] 第2ペプチド中に細胞内プロテアーゼの他に細胞外プロテアーゼの基質となるアミノ酸配列が存在する場合、異常細胞又はその周辺の細胞から細胞外に分泌された細胞外プロテアーゼの作用により、第2ペプチド中の細胞外プロテアーゼの基質となるアミノ酸配列が切断され、標的抗原に結合する部分の標的抗体結合部位を認識してマスクする第1ペプチドが解離し、標的抗原結合部分がより一層高い親和性をもって標的抗原に結合することができる。本発明の標的抗原に結合する分子中の第2ペプチド中の細胞外プロテアーゼの基質となるアミノ酸配列が、異常な細胞から漏出した細胞外プロテアーゼの作用により切断された場合に、標的抗原に結合する部分がより一層高い親和性をもって異常な細胞の標的抗原に結合し、異常な細胞の細胞死（アポトーシス）の誘導をさらに促進すれば、細胞が破壊され、細胞から細胞内プロテアーゼが細胞外に漏出すると推測される。また、細胞膜に傷害を来した細胞、例えば、腫瘍組織内で細胞膜が破壊または壊死（ネクローシス）した細胞から細胞内プロテアーゼが細胞外に漏出する。その結果、本発明の標的抗原に結合する分子中の第2ペプチド中の細胞内プロテアーゼの基質となるアミノ酸配列が、異常な細胞から漏出した細胞内プロテアーゼの作用により切断され、標的抗原に結合する部分が異常な細胞の標的抗原に結合し、異常な細胞を死滅させる等により、異常細胞による疾患の原因をより一層高度に除去すると考えられる。すなわち、本発明の標的抗原に結合する分子中、例えば、第2ペプチド中に細胞内プロテアーゼの他に細胞外プロテアーゼの基質

となるアミノ酸配列（第2切断アミノ酸配列）が存在する場合、細胞外プロテアーゼ及び細胞内プロテアーゼの両方により、順次細胞外プロテアーゼの基質となるアミノ酸配列及び細胞内プロテアーゼの基質となるアミノ酸配列が切断され、標的抗原結合部分の標的抗体結合部位に結合してマスクする第1ペプチドが解離するにつれて、標的抗原結合部分が標的抗原に結合し易くなり、本発明の標的抗原に結合する分子の標的抗原に対する結合親和性が高まると推測される。

[0078] 例えば、腫瘍細胞を標的とする場合、本発明の標的抗原に結合する分子が腫瘍組織に到達すると、腫瘍組織近傍の腫瘍環境中に存在する細胞外プロテアーゼにより、第2ペプチド中の細胞外プロテアーゼの基質となるアミノ酸配列が、細胞外プロテアーゼの作用により切断され、標的抗原結合部位をマスクしている第1ペプチドが解離し、分子中の標的抗原に結合する部分がより高い親和性をもって腫瘍細胞の標的抗原に結合し、腫瘍細胞の細胞死誘導を促進する。その結果、腫瘍細胞が破壊され、細胞内から細胞内プロテアーゼが細胞外に漏出し、腫瘍環境中に細胞内プロテアーゼが供給される。次いで、第2ペプチド中の細胞内プロテアーゼの基質となるアミノ酸配列が、腫瘍細胞から漏出した細胞内プロテアーゼの作用により切断される。細胞外プロテアーゼの作用のみでは切断されないで残っていた標的抗原結合部位をマスクしている第1ペプチドが解離する。その結果、標的抗原に結合する分子の標的抗原に対する結合親和性が、切断前に比してより一層高くなり、標的抗原に結合する部分がより一層高い親和性をもって腫瘍細胞の標的抗原に結合する。その後、腫瘍細胞の細胞死を誘導し、腫瘍を治療することができる。すなわち、細胞外プロテアーゼと細胞内プロテアーゼの両方の作用により、第2ペプチドが切断され、標的抗原に結合する部分に含まれる標的抗原結合部位を認識し結合しマスクしていた第1ペプチドが標的抗原結合部位から解離することにより、標的抗原に結合する分子が標的抗原に強く結合するようになる。第2ペプチドの切断は、細胞外プロテアーゼのみ、又は細胞内プロテアーゼのみでも部分的に起こるが、両プロテアーゼの作用により、より

多くの第2ペプチドが切断され、第1ペプチドが標的抗原結合部位から解離し得る。本発明の標的抗原に結合する分子は、主として上述の様な機序によりその効果を発揮し得ると推測され得るが、かかる機序はそれに限定されず、他のメカニズムにより、又は他のメカニズムと併せて、その効果を発揮してもよい。

[0079] 他の部分

本発明の標的抗原に結合する分子は、さらに他の部分を含んでいてもよい。本発明においては、かかる他の部分のことを「[d]部分」ともいう。[d]部分は、前記分子の標的抗原結合部分に結合する。[d]部分は、該標的抗原結合部分ではない抗体若しくはその抗原結合断片、第1ペプチド及び第2ペプチドに含まれないアミノ酸配列を含むペプチド、サイトカイン、毒素、放射性同位元素、標識分子、光感受性物質（photosensitizer：「光増感剤」ともいう）、免疫賦活化物質、抗腫瘍性化合物、薬物、ペイロード並びにポリマーからなる群より選択される1つ又は2つ以上の化合物からなる。

[0080] ここで、第1ペプチド及び第2ペプチドに含まれないアミノ酸配列を含むペプチドとしては、抗体、抗体の抗原結合断片、天然に存在する非免疫グロブリン性タンパク質、人工的に創出されたタンパク質、受容体タンパク質又はそのリガンド結合断片、リガンドタンパク質、血中動態を調節するタンパク（例えば、抗体のFc、アルブミン）等、抗体としては、標的抗原に結合する分子ではない抗体、標的抗原に結合する分子中の標的結合標的部位以外の部位に結合する抗体、標的抗原に結合する分子と結合することにより多重特異性分子（例えば、二重特異性抗体）として機能する抗体等を、サイトカインとしては、インターロイキン、インターフェロン、ケモカイン、コロニー刺激因子、腫瘍壊死因子、増殖因子等を、毒素としては、シアノトキシン、ヘモトキシン、ネクروتキシン、神経毒、細胞毒素等の生物毒素、環境毒素等を、放射性同位元素としては、 ^{131}I 、 ^{211}At 、 ^{89}Sr 等を、標識分子としては、FITC、PE等の蛍光物質、HRP、AP等の酵素、ビオチン

等を、光感受性物質としては、フタロシアニン誘導体、クロリン誘導体、バクテリオクロリン誘導体等を、免疫賦活化物質としては、アジュバント等を、ポリマーとしては、天然又は人工糖鎖、合成樹脂、ポリエチレングリコール等を、抗腫瘍性化合物としては、トポイソメラーゼ阻害剤、有糸分裂阻害剤、細胞分裂阻害剤、微小管重合／脱重合阻害剤、グルココルチコイド受容体調節剤、DNA結合剤、アルキル化剤、放射性同位元素、s i R N A、抗体又はその抗原結合断片等を、薬物としては、抗腫瘍剤、前述の免疫賦活化物質及びサイトカイン、下に述べるADCに含まれる抗腫瘍性化合物、薬物、ペイロード等をそれぞれ例示することができるが、それらに限定されるものではない。

[0081] [d] 部分がポリペプチドである場合、本発明の標的抗原に結合する分子はポリペプチドからなっており、[d] 部分がポリペプチド以外の化合物である場合、本発明の標的抗原に結合する分子は[d] 部分及びポリペプチドからなり得る。

[0082] [d] 部分は、本発明の標的抗原に結合する分子とリンカーで連結されている。

[0083] [d] 部分が抗腫瘍性化合物、薬物又はペイロードであり、標的抗原に結合する分子が抗体又はその抗原結合部分（抗体等）である場合、[d] 部分を含む標的抗原に結合する分子をADC（Antibody-Drug Conjugate；抗体-薬物複合体）とすることができる。ADCについては、[Methods Mol Biol. (2013) 1045:1-27; Nature Biotechnology (2005) 23, p. 1137-1146等]に記載されている。抗腫瘍性化合物としては、抗体等が結合することにより薬理的な効果を奏し得る物質であれば特に限定されず、抗腫瘍剤である場合に使用し得る抗腫瘍性化合物として、エムタンシン（4-（{3-[(3-{[(1S)-2-{[(1S, 2R, 3S, 5S, 6S, 16E, 18E, 20R, 21S)-11-クロロ-21-ヒドロキシ-12, 20-ジメトキシ-2, 5, 9, 16-テトラメチル-8, 23

ージオキソ-4, 24-ジオキサ-9, 22-ジアザテトラシクロ [19, 3, 1, 110, 14, 03, 5] ヘキサコサ-10, 12, 14 (26), 16, 18-ペンタエン-6-イル] オキシ} -1-メチル-2-オキソエチル] メチルアミノ} -3-オキソプロピル) スルファニル] -2, 5-ジオキソピロリジン-1-イル} メチル) シクロヘキシルカルボニル基) (例えば、WO2001/000244、WO2001/000245)、トポイソメラーゼ阻害剤 (例えば、Liang, X. 他、Eur. J. Med. Chem. 171 巻、2019 年、129-168 頁)、好適には、トポイソメラーゼ I 阻害剤、例えば、カンプトテシン誘導体、好適には、イリノテカン及びその活性代謝産物である SN-38 (例えば、EP 137145A1、US4604463A、)、エキサテカン (例えば、EP 495432A1、US5637770A)、エキサテカン誘導体 (例えば、WO2014/057687) 等をあげることができる。好適なエキサテカン誘導体として、N-[(1S, 9S)-9-Ethyl-5-fluoro-9-hydroxy-4-methyl-10, 13-dioxo-2, 3, 9, 10, 13, 15-hexahydro-1H, 12H-benzo [de] pyrano [3', 4': 6, 7] indolizino [1, 2-b] quinolin-1-yl]-2-hydroxyacetamide (例えば、WO2014/057687、WO2014/061277、WO2015/146132、WO2020/100954、WO2015/098099) を例示することができる。他の抗腫瘍性化合物として、pyrrolobenzodiazepine 誘導体 (例えば、WO2019/065964、WO2013/173496、WO2014/130879、WO2017/004330、WO2017/004025、WO2017/020972、WO2016/036804、WO2015/095124、WO2015/052322、WO2015/052534、WO2016/115191、WO2015/052321、WO2015/031693、WO2011/130613) も例示することができ、好適

な pyrrol benzodiazepine 誘導体としては、(11a' S) - 7' - メトキシ - 8' - [(5 - { [(11a S) - 7 - メトキシ - 2 - (4 - メトキシフェニル) - 5 - オキソ - 5, 10, 11, 11a - テトラヒドロ - 1H - ピロロ [2, 1 - c] [1, 4] ベンゾジアゼピン - 8 - イル] オキシ} ペンチル) オキシ] - 1' , 11a' - ジヒドロ - 5' H - スピロ [シクロプロパン - 1, 2' - ピロロ [2, 1 - c] [1, 4] ベンゾジアゼピン] - 5' - オン、(11a' S) - 7' - メトキシ - 8' - [(5 - { [(11a' S) - 7' - メトキシ - 5' - オキソ - 5' , 11a' - ジヒドロ - 1' H - スピロ [シクロプロパン - 1, 2' - ピロロ [2, 1 - c] [1, 4] ベンゾジアゼピン] - 8' - イル] オキシ} ペンチル) オキシ] - 1' , 10' , 11' , 11a' - テトラヒドロ - 5' H - スピロ [シクロプロパン - 1, 2' - ピロロ [2, 1 - c] [1, 4] ベンゾジアゼピン] - 5' - オン、(11a' S, 11a' ' ' ' S) - 8' , 8' ' - [1, 5 - ペンタンジイルビス (オキシ)] ビス (7' - メトキシ - 1' , 11a' - ジヒドロ - 5' H - スピロ [シクロプロパン - 1, 2' - ピロロ [2, 1 - c] [1, 4] ベンゾジアゼピン] - 5' - オン) 及び (11a' S) - 7' - メトキシ - 8' - (3 - { [(11a S) - 7 - メトキシ - 2 - (4 - メトキシフェニル) - 5 - オキソ - 5, 10, 11, 11a - テトラヒドロ - 1H - ピロロ [2, 1 - c] [1, 4] ベンゾジアゼピン - 8 - イル] オキシ} プロボキシ) - 1' , 11a' - ジヒドロ - 5' H - スピロ [シクロプロパン - 1, 2' - ピロロ [2, 1 - c] [1, 4] ベンゾジアゼピン] - 5' - オン等 (WO 2019/065964) を例示することができる。薬物としては、STING アゴニスト (例えば、WO 2021/202984、WO 2020/229982、WO 2020/050406、WO 2021/177438)、TLR 7/8 アゴニスト又は TLR 8 アゴニスト (例えば、WO 2018/009916、WO 2019/084060) 等の免疫賦活物質でもよい。好適な STING アゴニストとしては、環状ジヌクレオチド誘導体を例示することができる。環状ジヌクレ

オチド誘導体としては、(5 R, 7 R, 8 R, 12 a R, 14 R, 15 R, 15 a S, 16 R) - 15, 16 - ジヒドロキシ - 7 - [1 - (2 - ヒドロキシエチル) - 6 - オキソ - 1, 6 - ジヒドロ - 9 H - プリン - 9 - イル] - 2, 10 - ビス (スルファニル) - 14 - (6, 7, 8, 9 - テトラヒドロ - 2 H - 2, 3, 5, 6 - テトラアザベンゾ [c d] アズレン - 2 - イル) オクタヒドロ - 2 H, 10 H, 12 H - 5, 8 - メタノ - 2 λ^5 , 10 λ^5 - フロ [3, 2 - l] [1, 3, 6, 9, 11, 2, 10] ペンタオキサジホスファシクロテトラデシン - 2, 10 - ジオン、(5 R, 7 R, 8 R, 12 a R, 14 R, 15 R, 15 a R, 16 R) - 15 - フルオロ - 16 - ヒドロキシ - 7 - [1 - (2 - ヒドロキシエチル) - 6 - オキソ - 1, 6 - ジヒドロ - 9 H - プリン - 9 - イル] - 2, 10 - ビス (スルファニル) - 14 - (6, 7, 8, 9 - テトラヒドロ - 2 H - 2, 3, 5, 6 - テトラアザベンゾ [c d] アズレン - 2 - イル) オクタヒドロ - 2 H, 10 H, 12 H - 5, 8 - メタノ - 2 λ^5 , 10 λ^5 - フロ [3, 2 - l] [1, 3, 6, 9, 11, 2, 10] ペンタオキサジホスファシクロテトラデシン - 2, 10 - ジオン、(5 R, 7 R, 8 R, 12 a R, 14 R, 15 R, 15 a R, 16 R) - 7 - [1 - (2 - アミノエチル) - 6 - オキソ - 1, 6 - ジヒドロ - 9 H - プリン - 9 - イル] - 14 - (8, 9 - ジヒドロ - 6 - チア - 2, 3, 5 - トリアザベンゾ [c d] アズレン - 2 (7 H) - イル) - 15 - フルオロ - 16 - ヒドロキシ - 2, 10 - ビス (スルファニル) オクタヒドロ - 2 H, 10 H, 12 H - 5, 8 - メタノ - 2 λ^5 , 10 λ^5 - フロ [3, 2 - l] [1, 3, 6, 9, 11, 2, 10] ペンタオキサジホスファシクロテトラデシン - 2, 10 - ジオン、N - (2 - {9 - [(5 R, 7 R, 8 R, 12 a R, 14 R, 15 R, 15 a R, 16 R) - 14 - (8, 9 - ジヒドロ - 6 - チア - 2, 3, 5 - トリアザベンゾ [c d] アズレン - 2 (7 H) - イル) - 15 - フルオロ - 16 - ヒドロキシ - 2, 10 - ジオキソ - 2, 10 - ビス (スルファニル) オクタヒドロ - 2 H, 10 H, 12 H - 5, 8 - メタノ - 2 λ^5 , 10 λ^5 - フロ [3, 2 - l] [1, 3, 6, 9, 11

， 2， 10] ペンタオキサジホスファシクロテトラデシンー7-イル] -6-オキソ-6， 9-ジヒドロ-1H-プリン-1-イル} エチル) -2-ヒドロキシアセトアミドを例示することができる (WO 2021/177438)。本発明において、[d] 部分は標的抗原結合部分に結合する。標的抗原結合部分が抗体又はその抗原結合断片である場合、[d] 部分は、公知の方法により抗体又はその抗原結合断片に結合させることができる。治療又は予防用の抗体又はそのFc領域を含む糖タンパク質分子の製造において、糖鎖を均一化させる技術が開発されている。糖タンパク質に付加する糖鎖を均一にする方法として、酵素を使った糖鎖転移反応が知られている。これは、*in vitro* 環境での糖鎖の切断 (加水分解反応) と別の糖鎖の縮合 (糖鎖転移反応) からなる、多段階プロセスである。特にN型糖鎖の変換を目的とする場合、エンド-β-N-アセチルグルコサミニダーゼ (ENGase) と呼ばれる一群の酵素ファミリーが用いられる。この酵素の特性として、1) 基質特異性として複合型糖鎖に対する加水分解反応を行う能力を持つこと、及び、2) 特定の構造に対する糖鎖転移反応を行う能力を持つことが要求される。糖鎖転移反応では、単独のENGaseを用いて還元末端が活性化された糖鎖である、例えば還元末端をオキサゾリン化した糖鎖をGlcNAc (N-アセチルグルコサミン) アクセプターに転移するオキサゾリン法と、2種類のENGaseを使用して還元末端が活性化されていない糖鎖をGlcNAc アクセプターに直接転移するワンポット法が知られている (WO 2022/050300、WO 2018/003983)。本発明において、抗腫瘍性化合物、薬物、ペイロード等の[d] 部分を抗体又はその抗原結合断片に直接又はリンカー等を介して結合させるために、例えば、それらの方法による糖鎖転移反応を使用することができる。[d] 部分が光感受性物質であり、標的抗原に結合する部分が抗体又はその抗原結合部分 (抗体等) であるか又はそれらを含む場合、[d] 部分を含む標的抗原に結合する分子は、光線力学的療法 (Photodynamic Therapy; PDT) に用いることができ、当該分子はADP (Antibody-Dir

ected Phototherapy) 分子とすることができる。ADP 分子については、Antibodies (2013) 2, p. 270-305 等に記載されている。光感受性物質としては、抗体等が結合した部位に光照射することで薬理的な効果を奏し得る物質であれば特に限定されず、光感受性物質として、(2S)-2-[[2-[(2S, 3S)-7-カルボキシ-3-(2-カルボキシエチル)-17-エテニル-12-エチル-2, 8, 13, 18-テトラメチル-2, 3, 23, 24-テトラヒドロボルフィリン-5-イル] アセチル] アミノ] ブタン二酸 (例えば、米国特許第 5633275 号、米国特許第 RE37180 号)、IR700 (IRDye (登録商標) 700DX) (例えば、WO2013/009475、WO2004/038378、WO2015/187677、WO2017/031363、WO2017/031367、WO2018/156815、WO2019/232478、WO202020/5623)、2, 4-ジフルオロ-N-メチル-3-[10, 15, 20-トリス[2, 6-ジフルオロ-3-(メチルスルファモイル) フェニル]-2, 3, 12, 13, 22, 24-ヘキサヒドロボルフィリン-5-イル] ベンゼンスルホンアミド (例えば、WO2016/151458) 等を例示することができる。

[0084] 標的抗原を有する細胞を含む組織又はその近傍において、標的抗原に結合する分子に含まれる切断リンカー (第2ペプチド) が切断され、標的抗原に結合する分子に含まれる有効成分 (例えば、薬物) が効果を発揮する。

[0085] 3. 標的抗原に結合する分子の製造方法

(1) 第1ペプチドに含まれるミモトープの同定方法

任意の抗体又はその抗原結合断片に含まれる相補性決定領域 (CDR) に結合するペプチドを、ペプチドライブラリーを利用して同定することができる。ペプチドライブラリーは公知の方法で構築すればよい。例えば、完全ランダムなアミノ酸から構成されるリボソーム等の各種ディスプレイ用のペプチドライブラリーを構築し、前記 CDR に親和性の大きいペプチドを選択すればよい。また、中央付近に芳香族性アミノ酸と Pro の繰り返しモチーフ

(Z P Z Pモチーフ)をもつ各種ディスプレイ用のペプチドライブラリー (Z P Z P l i b) を構築し、前記C D Rに親和性の大きいペプチドを選択すればよい。ここで、Zはヒスチジン (H i s)、フェニルアラニン (P h e)、チロシン (T y r)、トリプトファン (T r p) のいずれかの芳香族アミノ酸を表し、Pはプロリンを表す。

[0086] 第1ペプチドに含まれるミモトープも上記方法で同定することができる。

抗体のC D Rループは、芳香族アミノ酸が多く含まれる。芳香族アミノ酸同士は相互作用しやすいため、ペプチドの中央付近に芳香族アミノ酸が存在していることが好ましい。

[0087] 本発明は、上記方法により得られた第1ペプチドや、ミモトープその他抗体以外の分子(サイトカイン等)に結合するペプチドを同定するための各種ディスプレイ用のペプチドライブラリーをも包含する。

[0088] (2) 標的抗原に結合する分子の製造方法

本発明の標的抗原に結合する分子であり、第1ペプチドに含まれるアミノ酸配列及び／又は第2ペプチドに含まれるアミノ酸配列を含んでなるペプチドは、組換え、インビトロ翻訳、化学合成、ペプチド合成等により調製することができる。

[0089] 例えば、標的抗原結合部分に含まれるアミノ酸配列、並びに、任意で、第1ペプチドに含まれるアミノ酸配列、及び／又は、第2ペプチドに含まれるアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を含んでなるポリヌクレオチドを細胞に導入し、該細胞を培養し、該培養物から該標的抗原に結合するポリペプチドを回収することにより、本発明の標的抗原に結合する分子を製造することができる。

[0090] 標的抗原結合部分に含まれるアミノ酸配列、並びに、任意で、第1ペプチドに含まれるアミノ酸配列、及び／又は、第2ペプチドに含まれるアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を含んでなるポリヌクレオチドは、それぞれのペプチドをコードするDNAを連結し、さらに、プロモータ、エンハンサー、ポリアデニル化シグナル等のエレメントと機能的に連結してもよい

。ここで機能的に連結とは、エレメントがその機能を果たすように連結することをいう。これらのDNAを発現ベクターに挿入し、宿主細胞を該ベクターで形質転換し、該宿主細胞を培養して産生させ、回収すればよい。該ベクターは宿主細胞からの標的抗原に結合する分子の分泌を促進するシグナルペプチドをコードするDNAを含んでいてもよい、この場合、シグナルペプチドをコードするDNAと標的抗原に結合する分子をコードするDNAをインフレームで連結しておく。標的抗原に結合する分子が産生された後にシグナルペプチドを除去することにより、標的抗原に結合する分子を成熟タンパク質として得ることができる。

[0091] 発現ベクターは、動物細胞、細菌、酵母等の宿主中で複製可能なものであれば特に限定されず、例えば、公知のプラスミド、ファージ等が挙げられる。発現ベクターの構築に用いられるベクターとしては、例えば、p cDNA (商標) (ThermoFisher Scientific社)、Flexi (登録商標) ベクター (プロメガ社)、pUC19、pUEX2 (アマシャム社製)、pGEX-4T、pKK233-2 (ファルマシア社製)、pMAM-neo (クロンテック社製) 等が挙げられる。宿主細胞としては、大腸菌、枯草菌等の原核細胞も酵母、動物細胞等の真核細胞も用いることができるが、真核細胞を用いることが好ましい。例えば、動物細胞として、ヒト胎児腎細胞株であるHEK293細胞、チャイニーズ・ハムスター・卵巣 (CHO) 細胞等を用いればよい。発現ベクターは公知の方法で宿主細胞に導入し、宿主細胞を形質転換すればよい。例えば、エレクトロポレーション法、リン酸カルシウム沈殿法、DEAE-デキストラントランスフェクション法等が挙げられる。産生された抗体は、通常のタンパク質で使用されている分離、精製方法を使用して精製することができる。例えば、アフィニティー・クロマトグラフィー、その他のクロマトグラフィー、フィルター、限外濾過、塩析、透析等を適宜選択し、組合せればよい。

[0092] 4. 本発明の標的抗原に結合する分子の利用

本発明の標的抗原に結合する分子、その塩又はそれらの水和物 (以下「本

発明の標的抗原に結合する分子等」という。)は、異常細胞に起因する疾患の予防又は治療薬として用いることができる。

[0093] 異常細胞が腫瘍細胞である場合、本発明の標的抗原に結合する分子は、抗がん剤として用いることができる。

[0094] 該抗がん剤は、がん腫、肉腫、リンパ腫、白血病、骨髄腫、胚細胞腫、脳腫瘍、カルチノイド、神経芽腫、網膜芽細胞腫、腎芽腫から選択される一種又は複数種に対して使用することができる。具体的には、がん腫では、腎がん、メラノーマ、有棘細胞がん、基底細胞がん、結膜がん、口腔がん、喉頭がん、咽頭がん、甲状腺がん、肺がん、乳がん、食道がん、胃がん、十二指腸がん、小腸がん、大腸がん、直腸がん、虫垂がん、肛門がん、肝がん、胆嚢がん、胆管がん、膵がん、副腎がん、膀胱がん、前立腺がん、子宮がん、膣がんなどが挙げられ、肉腫では、脂肪肉腫、血管肉腫、軟骨肉腫、横紋筋肉腫、ユーイング肉腫、骨肉腫、未分化多型肉腫、粘液型線維肉腫、悪性末梢性神経鞘腫、後腹膜肉腫、滑膜肉腫、子宮肉腫、消化管間質腫瘍、平滑筋肉腫、類上皮肉腫などが挙げられ、リンパ腫では、B細胞リンパ腫、T・NK細胞リンパ腫、ホジキンリンパ腫などが挙げられ、白血病では、骨髄性白血病、リンパ性白血病、骨髄増殖性疾患、骨髄異形成症候群などが挙げられ、骨髄腫では、多発性骨髄腫などが挙げられ、胚細胞腫では、精巣がん、卵巣がんなどが挙げられ、脳腫瘍では、神経膠腫、髄膜腫などが挙げられる。

[0095] 本発明の抗腫瘍剤は、治療に有効量の本発明の標的抗原に結合する分子と薬学上許容可能な担体、希釈剤、可溶化剤、乳化剤、保存剤、補助剤等を含めることができる。「薬学上許容可能な担体」等は、対象疾患の種類や薬剤の投与形態に応じて広い範囲から適宜選択することができる。本発明の抗腫瘍剤の投与方法は適宜選択することができるが、例えば注射投与ことができ、局所注入、腹腔内投与、選択的静脈内注入、静脈注射、皮下注射、臓器灌流液注入等を採用することができる。また、注射用の溶液は、塩溶液、グルコース溶液、又は塩水とグルコース溶液の混合物、各種の緩衝液等からなる担体を用いて製剤化することができる。また粉末状態で製剤化し、使用

時に前記液体担体と混合して注射液を調整するようにしてもよい。

- [0096] 他の投与方法についても、製剤の開発と共に適宜選択することができる。
- 例えば経口投与の場合には、経口服液剤や散剤、丸剤、カプセル剤及び錠剤等を適用することができる。経口服液剤の場合には、懸濁剤及びシロップ剤等のような経口液体調整物として、水、シュクロース、ソルビトール、フラクトース等の糖類、ポリエチレングリコール等のグリコール類、ごま油、大豆油等の油類、アルキルパラヒドロキシベンゾエート等の防腐剤、ストロベリー・フレーバー、ペパーミント等のフレーバー類等を使用して製造することができる。散剤、丸剤、カプセル剤及び錠剤は、ラクトース、グルコース、シュクロース、マンニトール等の賦形剤、デンプン、アルギニン酸ソーダ等の崩壊剤、マグネシウムステアレート、タルク等の滑沢剤、ポリビニルアルコール、ヒドロキシプロピルセルロース、ゼラチン等の結合剤、脂肪酸エステル等の表面活性剤、グリセリン等の可塑剤等を用いて製剤化することができる。錠剤及びカプセル剤は、投与が容易であるという点において、この発明の組成物における好ましい単位投与形態である。錠剤やカプセル剤を製造する際には、固体の製造担体が用いられる。
- [0097] 治療に用いるに有効な本発明の標的抗原に結合する分子等の量は、治療する病状の性質、患者の年齢や状態により変更され、最終的には医師が決めればよい。例えば、1回体重1kg当たり0.0001mg～100mgである。所定の投与量は1～180日に1回投与してもよいし、1日当たり2回、3回、4回又はそれ以上の分割投与とし適当な間隔で投与してもよい。
- [0098] 本発明の標的抗原に結合する分子等は、他の薬剤と組み合わせても、異常細胞に起因する疾患の予防薬又は治療薬として用いられ得る。本発明の標的抗原に結合する分子等は、他の薬剤を投与する前に、他の薬剤と同時に、又は、他の薬剤を投与した後に、異常細胞に起因する疾患しているか又はそのおそれのある者等に投与され得る。本発明の標的抗原に結合する分子等を他の薬剤の同時に投与する場合、それらの配合剤（それら両方を含む製剤）及び各単剤（それぞれ一方だけを含む製剤）のいずれでもよい。

実施例

[0099] 以下、実施例において本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されない。

[0100] なお、下記実施例において遺伝子操作に関する各操作は特に明示がない限り、「モレキュラークローニング (Molecular Cloning)」(Sambrook, J., Fritsch, E. F. 及び Maniatis, T. 著, Cold Spring Harbor Laboratory Press より 1989 年発行) に記載の方法及びその他の当業者が使用する実験書に記載の方法により行うか、又は、市販の試薬やキットを用いる場合には市販品の指示書に従って行った。遺伝子やベクター構築のために必要なプライマーは、必要に応じて合成委託 (株式会社 FASMAC、および Thermo Fisher Scientific 社) した。

[0101] (実施例 1) 抗 TROP2 抗体 HT1-11 の調製

1) -1 抗 TROP2 抗体 HT1-11 の発現・精製

WO2015/098099号に記載の公知の抗 TROP2 抗体の重鎖 (図 26、配列番号 1) または軽鎖 (図 27、配列番号 2) をコードする DNA がクローニングされた pcDNA3.3 (Thermo Fisher Scientific 社) を骨格とした哺乳動物細胞用発現ベクターを Expi293F 細胞に導入し、一過性発現させた培養上清より抗体分子を精製した。Expi293F 細胞 (Thermo Fisher Scientific 社) はマニュアルに従い、継代、培養を行った。対数増殖期にある Expi293F 細胞培養液を 2.5×10^6 cells/mL になるよう Expi293 Expression medium (Thermo Fisher Scientific 社) で希釈し、Opti-Pro SFM 培地 (Thermo Fisher Scientific 社) に重鎖、軽鎖それぞれの発現ベクターと Polyethyleneimine (Polyscience 社) を加えて反応後、Expi293F 細胞へ添加した。37℃、8%CO₂ インキュベーターで 5 日間、135 rpm で振とう培養し

た。遠心分離後の培養上清に対してPBS pH7.4で平衡化したMab Select Sure (Cytiva社)を添加し、目的の抗体分子を吸着させた。非吸着成分をPBSで除去した後、pH3.5の酢酸バッファーで吸着成分を溶出した。溶出画分はpH9.0のTrisバッファーでpHを中性に調製し、限外ろ過膜を用いて25mM Histidine、5 (w/v) % Sorbitol、pH6.0にバッファー置換した。必要に応じて濃縮後、予め25mM Histidine、300mM NaCl、5 (w/v) % Sorbitol、pH5.5で平衡化したゲルろ過カラムSuperdex 200 Increase (Cytiva社)に供し、モノマー画分を回収した。精製サンプルは、SDS-ポリアクリルアミド電気泳動 (SDS-PAGE) と分析用サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) に供し、モノマー純度を評価した。精製抗体の濃度は、分光光度計の280nmの吸光度と、PACE法で算出した吸光係数を用いて当業者公知の方法で決定した (Protein Science. ; 4 (11) : 2411-2423 (1995))。

[0102] 1) - 2 ELISAによる抗TROP2抗体HT1-11と抗TROP2抗原の結合活性評価

96ウェルMaxisorp plate (Black、Nunc社) にPBSで1 μ g/mLに希釈したNeutrAvidin (Thermo Fisher Scientific社) を50 μ Lずつ添加し、4℃で一晩固相化した。Tween-20 (Bio-Rad社) を0.05 (w/v) %含むPBS (ELISAバッファー) で洗浄後、Blocker Casein (Thermo Fisher Scientific社) でブロッキングした。ELISAバッファーで洗浄後、PBSで1 μ g/mLに希釈したビオチン化ヒトTROP2抗原 (アクセション番号: P09758。細胞外ドメインを当業者公知の手法で精製後、C末端Aviタグ配列をビオチン化した。) を50 μ Lずつ添加して30分室温で振とうした。ELISAバッファーで洗浄後、ELISAバッファーで濃度調整した実施例1)

ー1の抗体を50 μ Lずつ添加して30分室温で振とうした。ELISAバッファーで洗浄後、ELISAバッファーで2500倍に希釈したHorse radish peroxidase (HRP) 標識抗ヒトIgG抗体 (Jackson Immuno Research Laboratories社) を50 μ L添加し、30分室温で振とうした。ELISAバッファーで洗浄後、SuperSignal Pico ELISA Chemiluminescent substrate (Thermo Fisher Scientific社) を添加し、10分後の化学発光をプレートリーダーで測定した。図2に示すように、HT1-11は濃度依存的にヒトTROP2抗原に結合した。

[0103] (実施例2) 抗TROP2抗体HT1-11に結合するミモトープペプチドの濃縮

完全ランダムな15アミノ酸から構成されるリボソームディスプレイ用のペプチドライブラリー (Linear 15mer lib) を構築し、当業者公知の方法でHT1-11へ結合可能なペプチドを濃縮した。最初に、EZ-Link NHS-PEG4-Bioin (Thermo Fisher Scientific社) でビオチン化したヒト血清由来IgG (Sigma-Aldrich社) またはHT1-11をDynabeads Streptavidin M-280 (Thermo Fisher Scientific社) に固相化し、ペプチドを提示しているリボソーム (ribosome displaying peptide: 以下「RD」という。) をヒト血清由来IgG結合ビーズと反応させた。結合しなかったRDをマグネットスタンド (DynaMag-2、Thermo Fisher Scientific社) を用いて回収後、HT1-11結合ビーズと反応させた。マグネットスタンドを用いた洗浄操作によりHT1-11に結合しなかったRDを除去し、HT1-11に結合したRDからmRNAを精製した。その後、RT-PCRおよびインビトロ翻訳によりRDを再度調製した。このパニング操作を3回実施した。

[0104] パニング3ラウンド後のmRNAをインビトロ翻訳しRDを調製後、ビオチン化したHT1-11またはヒト血清由来IgGが固相化されたDynabeads Streptavidin M-280とそれぞれ反応させた（インプット量： 6×10^{11} ）。マグネットスタンドを用いた洗浄操作により結合しなかったRDを除去後、結合したRDからmRNAを回収し、RT-qPCRにより回収量（アウトプット）を定量評価した。図3に示すように、HT1-11を固相した条件では、ヒト血清IgGを固相した条件と比較して2624倍多くmRNAが回収された。この結果から、HT1-11に特異的に結合するペプチドの濃縮が示唆された。

[0105] （実施例3） 抗TROP2抗体に結合するミモトープペプチドのスクリーニング

3) -1 パニング由来のペプチドを融合したHT1-11 scFvの調製

パニング3ラウンド後のDNAフラグメントに制限酵素を添加し、ランダムペプチド部分をコードするDNAフラグメントを当業者公知の方法で精製した。pelBシグナル配列、DNAフラグメント、MMP切断リンカー（公知のMMP基質含む（Journal of Controlled Release. ; 161:804-812 (2012).）：配列番号3及び図28に示されるアミノ酸配列のアミノ酸番号41～60）、HT1-11 scFv（VH-VLの順または、VL-VHの順）、FLAGタグ、Hisタグの順で翻訳されるように、当業者公知の方法でDNAフラグメントを大腸菌発現ベクターにライゲーションし、大腸菌XL-1 Blue（Agilent Technologies社）を形質転換した。IPTG（Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside）（Sigma-Aldrich社）存在下で大腸菌を培養し、ペプチド融合scFvを含む培養上清を回収した。

[0106] 3) -2 ミモトープペプチドの取得

実施例1) -2と同様の方法でヒトTROP2抗原に対する結合活性をE

ELISAで評価した。ペプチド融合 scFv を含む培養上清は、2 mM の塩化カルシウムを含む TBS (MMP バッファー) で 10 倍希釈し、100 nM の活性型ヒト MMP 1 (アクセション番号: P03956) と 37℃ で 15 分反応させ、MMP 切断リンカーを切断した。その後、ヒト TROP 2 抗原を固相化したプレートに 50 μ L ずつ添加した。結合した scFv は ELISA バッファーで 5000 倍に希釈した HRP 標識抗 FLAG 抗体 (Sigma-Aldrich 社) で検出した。また、MMP 1 非添加条件でも同様の操作を行い、結合強度比 (MMP 1 添加条件 / MMP 1 非添加条件) が大きい値を示すクローンを陽性クローンとして選抜した。陽性クローンの発現ベクターを精製後、当業者公知の方法で翻訳領域の配列を解析し、ユニーククローンとして MHT1001 (図 28、配列番号 3) および MHT1002 (図 29、配列番号 4) を得た。

[0107] 3) - 3 陽性クローンの結合活性評価

HT1-11-scFv-HL (図 30、配列番号 5)、HT1-11-scFv-LH (図 31、配列番号 6) および実施例 3) - 2 で同定した陽性クローン MHT1001、MHT1002 を大腸菌 XL-1 Blue で発現させ、培養上清より Ni Sepharose excel (Cytiva 社) で精製し、TBS に置換した。精製抗体の濃度は、分光光度計の 280 nm の吸光度と、PACE 法で算出した吸光係数を用いて当業者公知の方法で決定した (Protein Science, ; 4 (11): 2411-2423 (1995))。精製サンプルを用いて実施例 3) - 2 と同様の方法で MMP 1 添加条件、MMP 1 非添加条件におけるヒト TROP 2 抗原に対する結合活性を ELISA で評価した。MMP バッファーで抗体を 1 μ M に調製し、終濃度 1 μ M または 0 μ M になるよう MMP 1 を添加し、37℃ で 15 分反応させた。その後、ELISA バッファーで濃度調整した抗体を各ウェルに添加した。

[0108] 図 4-1 (A)、図 4-1 (B) に示すように、ミモトープペプチドを融合していない HT1-11-scFv-HL および HT1-11-scFv

－L HはMMP 1の添加に寄らず同様の結合活性を示した。また、ミモトープペプチドを融合したMHT 1 0 0 1およびMHT 1 0 0 2は、MMP 1添加条件においてMMP 1非添加条件よりも強い結合活性を示しており、結合のEC₅₀比（MMP 1非添加条件／MMP 1添加条件）はそれぞれ7. 9、4. 3だった（図4－2（C）、図4－2（D））。

[0109] （実施例4） 抗TROP 2マスク抗体の調製・結合活性評価

当業者公知の手法で、MHT 1 0 0 1のミモトープペプチドおよびMMP切断リンカー（実施例3）－1参照）を融合した抗TROP 2マスク抗体MHT 1 0 0 7（表1、図3 2、配列番号7）の重鎖発現ベクターを構築した。同様に、MMP切断リンカーの部分をプロテアーゼで切断できない非切断リンカーに改変したMHT 1 0 0 8（表1、図3 3、配列番号8）およびuPAの切断リンカー（公知のuPA基質含む（Journal of Biological Chemistry. ; 272（33）：20456－20462（1997）.）：図3 4及び配列番号9で示されるアミノ酸配列のアミノ酸番号36～55）に改変したMHT 1 0 0 9（表1、図3 4、配列番号9）の重鎖発現ベクターをそれぞれ構築した。各抗体の重鎖発現ベクターをHT 1－1 1の軽鎖発現ベクターを組合せ、実施例1）－1と同様の方法でExp i 2 9 3 F細胞の培養上清より各マスク抗体を精製し、蛋白質濃度を決定した。調製したマスク抗体は重鎖発現ベクター名と対応させ、MHT 1 0 0 7、MHT 1 0 0 8、MHT 1 0 0 9と命名した（表1）。

[0110]

[表1]

抗TROP2マスク抗体とアミノ酸配列情報

マスク抗体名	重鎖配列	軽鎖配列
MHT1007	MHT1007 (配列番号7)	HT1-11 (配列番号2)
MHT1008	MHT1008 (配列番号8)	HT1-11 (配列番号2)
MHT1009	MHT1009 (配列番号9)	HT1-11 (配列番号2)
MHT3002	MHT3002 (配列番号10)	HT1-11 (配列番号2)
MHT3201	MHT3201 (配列番号13)	HT1-11 (配列番号2)
MHT3202	MHT3202 (配列番号14)	HT1-11 (配列番号2)
MHT1713	MHT1713 (配列番号15)	HT1-11 (配列番号2)
MHT3423	MHT3423 (配列番号16)	HT1-11 (配列番号2)
MHT3203	MHT3203 (配列番号17)	HT1-11 (配列番号2)

[0111] 以下に記載する部分を除き、実施例1)－2、実施例3)－2と同様の方法でプロテアーゼ添加条件、非添加条件におけるヒトTROP2抗原に対する結合活性をELISAで評価した。プロテアーゼ添加条件では、3 μ Mの抗体に対して終濃度300 nMのMMP1または、活性型ヒトuPA（アクセション番号：P00749）を添加し、37℃で反応後、ELISAバッファーで濃度調整した抗体をヒトTROP2抗原の固定されたウェルに添加した。

[0112] 図5－1（A）に示すように、ミモトープペプチドを融合していないHT1-11はMMP1添加条件においても非添加条件と同様の結合活性を示した。また、プロテアーゼ非添加条件において、ミモトープペプチドを融合したMHT1007の結合活性はHT1-11よりも低下しており、s c F v

時と同様にマスク効果が示された。また、MMP 1 添加条件においてMMP 1 非添加条件よりも強い結合活性を示しており、結合の EC_{50} 比（MMP 1 非添加条件／MMP 1 添加条件）は104だった（図5-1（B））。非切断リンカーを搭載したMHT 1008では、MMP 1 添加条件でも非添加条件と同様に結合活性が低下していた（図5-2（C））。uPA切断リンカーを搭載したMHT 1009では、uPA添加条件においてuPA非添加条件よりも強い結合活性を示しており、結合の EC_{50} 比（uPA非添加条件／uPA添加条件）は83だった（図5-2（D））。上記結果から、実施例3で取得したミモトープはscFvの状態だけでなくIgGの状態でもマスクングドメインとして機能すること、切断リンカー配列はマスク効果を維持した状態で改変可能であることが示された。

[0113] 取得したペプチドがミモトープであることを確認するために、マスクペプチドとMMP切断リンカー（実施例3）-1参照）を含むMHT 1007のFab領域を当業者公知の方法で調製し、当該Fab領域の結晶化およびX線結晶構造解析を行った。その結果、該ペプチドはHT 1-11のCDR領域に結合していることが示された（データ示さず）。また、化学合成したマスクペプチドがTROP 2抗原と競合的にHT 1-11に結合することをSPRで確認した（データ示さず）。

[0114] （実施例5） 抗TROP 2マスク抗体を利用したカルパイン（CAPN）切断配列の選定

5)-1 CAPN切断配列の改変

細胞質に局在するCAPNは、細胞死に伴い細胞外へ漏出することが示唆されている（非特許文献7）。細胞内プロテアーゼであるCAPNの基質配列と、細胞外プロテアーゼであるuPAの基質配列を組合せることで、uPA基質のみを搭載した場合と比較して、マスク抗体の結合活性を向上させられるか検証するために、適切なCAPNの基質配列を設計した。アミノ酸配列PLFAAR（配列番号10、図35のアミノ酸番号47～52）で構成される公知のCAPN基質（Biochimica et Biophys

ica Acta. ; 1794 (10) : 1505-1509 (2009).) を切断リンカー内に搭載した抗TROP2マスク抗体MHT3002 (表1、図35、配列番号10) を調製し、以下に記載する部分を除き、実施例4と同様の方法でプロテアーゼ添加条件、非添加条件におけるヒトTROP2抗原に対する結合活性をELISAで評価した。MMPバッファーでマスク抗体を10nMに希釈後、200nMのuPAまたはCAPN1 (Novus Biologicals社 (図36、配列番号11)) を添加し、37℃で反応後、ヒトTROP2抗原の固定されたウェルに添加した。

[0115] 図6 (A) に示すように、uPAおよびCAPN1添加条件においてMHT3002の結合活性は向上しており、MHT3002は両プロテアーゼで活性化されることが示された。

[0116] uPAはArgの直後を切断することが知られている。uPAでの切断されないCAPN基質の取得を目的に、CAPN基質配列 (PLFAAR) のRをPに改変した新規CAPN基質 (PLFAAP (図37、配列番号12)) を設計した。この配列を切断リンカーに搭載した抗TROP2マスク抗体MHT3201 (表1、図38、配列番号13) を調製し、上記方法でuPAおよびCAPN1に対する感受性をELISAで評価した。

[0117] 図6 (A) に示すように、抗TROP2マスク抗体MHT3201の結合活性はCAPN1添加条件においてのみ向上しており、uPAによる活性化は生じなかった。

[0118] 5) - 2 新規CAPN基質 (PLFAAP) のMMPに対する反応性

公知のuPA基質 (Journal of Biological Chemistry. ; 272 (33) : 20456-20462 (1997).) と新規CAPN基質 (PLFAAP) の両方を切断リンカー内に搭載したMHT3202 (表1、図39、配列番号14) と、上記uPA基質とPLGLWAで構成される公知のMMP基質 (Biopolymers. ; 40 (4) : 399-416 (1996).) を搭載したMHT1713 (表1、図40、配列番号15) を調製し、ヒトMMP1 (アクセション番号:

P 0 3 9 5 6)、ヒトMMP 2 (アクセション番号: P 0 8 2 5 3)、ヒトMMP 3 (アクセション番号: P 0 8 2 5 4)、ヒトMMP 7 (アクセション番号: P 0 9 2 3 7)、ヒトMMP 9 (アクセション番号: P 1 4 7 8 0)、ヒトMMP 1 2 (アクセション番号: P 3 9 9 0 0)、ヒトMMP 1 4 (アクセション番号: P 5 0 2 8 1) で活性化されるかどうか、以下に記載する部分を除き、実施例 5) - 1 と同様に E L I S A で評価した。MMP バッファーで抗体を 2 0 n M に希釈し、5 0 n M になるよう上記プロテアーゼをそれぞれ添加し、3 7 °C で反応後、ヒト T R O P 2 抗原の固定されたウェルに添加した。

[0119] 図 6 (B) に示すように、MMP 添加条件で M H T 1 7 1 3 の結合活性は向上したが、MMP 添加条件でも M H T 3 2 0 2 の結合活性は向上しなかった。以上の結果から、新規 C A P N 基質 (P L F A A P) は上記 MMP では切断されないことが示された。

[0120] (実施例 6) A D C 化に供される抗 T R O P 2 マスク抗体の調製・結合活性評価

細胞内プロテアーゼである C A P N の基質配列と、細胞外プロテアーゼである u P A の基質配列を組合せることで、u P A 基質のみを搭載した場合と比較して、マスク抗体の結合活性を向上させられるか検証することを目的に、u P A 基質のみを搭載した M H T 3 4 2 3 (表 1、図 4 1、配列番号 1 6)、C A P N 基質のみを搭載した M H T 3 2 0 1、u P A と C A P N 基質の両方を搭載した M H T 3 2 0 2 および、公知の u P A 基質の部分配列 (J o u r n a l o f B i o l o g i c a l C h e m i s t r y. ; 2 7 2 (3 3) : 2 0 4 5 6 - 2 0 4 6 2 (1 9 9 7).) と C A P N 基質の両方を搭載した M H T 3 2 0 3 (表 1、図 4 2、配列番号 1 7) を設計した。実施例 1) - 1 と同様の方法で各抗体を調製し、以下に記載する部分を除き、実施例 4 と同様の方法でプロテアーゼ添加条件、非添加条件におけるヒト T R O P 2 抗原に対する結合活性を E L I S A で評価した。プロテアーゼ添加条件では、MMP バッファーで抗体を 2 0 0 0 n M に希釈後、2 0 0 n M の

u P A または C A P N 1 を添加し、37℃で反応後、MMPバッファーで濃度調整した抗体をヒト T R O P 2 抗原の固定されたウェルに添加した。プロテアーゼ非添加条件でも同様に、MMPバッファーで調製した抗体を各ウェルに添加した。

[0121] 図7-1(A)に示すように、酵素非添加条件と比較してu P A 添加条件でM H T 3 4 2 3 の結合活性が向上し、C A P N 1 添加条件では結合活性が向上しなかった。同様に、M H T 3 2 0 1 の結合活性はC A P N 1 添加条件でのみ向上した(図7-1(B))。u P A 基質とC A P N 基質の両方を搭載したM H T 3 2 0 2 およびM H T 3 2 0 3 の結合活性はu P A 添加条件とC A P N 1 添加条件の両方で向上した(図7-2(C)、図7-2(D))。以上の結果から、設計したマスク抗体が目的のプロテアーゼ感受性をもつことが示された。

[0122] (実施例7) 抗体-薬物コンジュゲートの製造

抗体-薬物コンジュゲートを製造するための薬物リンカーは、N-[6-(2,5-ジオキソ-2,5-ジヒドロ-1H-ピロール-1-イル)ヘキサノイル]グリシルグリシル-L-フェニルアラニル-N-[(2-{[(1S,9S)-9-エチル-5-フルオロ-9-ヒドロキシ-4-メチル-10,13-ジオキソ-2,3,9,10,13,15-ヘキサヒドロ-1H,12H-ベンゾ[d,e]ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-1-イル]アミノ}-2-オキソエトキシ)メチル]グリシンアミド(実施例58 工程8 WO2014/057687号、以下「リンカー1」と称する)および、N-[4-(11,12-ジデヒドロジベンゾ[b,f]アゾシン-5(6H)-イル)-4-オキソブタノイル]グリシルグリシル-L-バリル-N-{4-[(11'S,11a'S)-11'-ヒドロキシ-7'-メトキシ-8'-[(5-{[(11aS)-7-メトキシ-2-(4-メトキシフェニル)-5-オキソ-5,10,11,11a-テトラヒドロ-1H-ピロロ[2,1-c][1,4]ベンゾジアゼピン-8-イル]オキシ}ペンチル)オキシ]-5'-オ

キソー11', 11a' -ジヒドロ-1' H-スプロ [シクロプロパン-1, 2' -スピロ [2, 1-c] [1, 4] ベンゾジアゼピン] -10' (5' H) -イル] カルボニル} オキシ) メチル] フェニル} -L-アラニンアミド (実施例2-1 WO2020/196474号、以下「リンカー2」と称する) を使用した。

[0123] 抗体-薬物コンジュゲートの製造および同定に使用する共通操作

共通操作A: 抗体および抗体-薬物コンジュゲート水溶液の濃縮

Amicon Ultra (50, 000 MWCO, Millipore Corporation) および遠心機Allegra X-15R Centrifuge (Beckman Coulter) (SX4750 A) にて濃縮した (4000g)。

[0124] 共通操作B: 抗体の濃度測定

UV測定器 (Nanodrop 1000, Thermo Fisher Scientific Inc.) を用いて、メーカー規定の方法に従い測定を使用した。

[0125] 共通操作C: 抗体のバッファー交換

C-1: NaCl (50mM) 及びEDTA (5mM) を含むリン酸バッファー (50mM, pH6.0) (以下PBS6.0/EDTAと称する。) へのバッファー交換

NAP-25カラム (Cat. No. 17085202, Cytiva, NAP-25 Columns Sephadex、以下NAP-25と称する) を用いてメーカー規定の方法に従い、NaCl (50mM) 及びEDTA (5mM) を含むリン酸バッファー (50mM, pH6.0) (以下PBS6.0/EDTAと称する。) にて平衡化させた。このNAP-25カラム一本につき、抗体水溶液2.5mLをのせたのち、PBS6.0/EDTA3.5mLで溶出させた画分 (3.5mL) を分取した。この画分を共通操作A、Bにて濃縮、濃度測定を行ったのちに、PBS6.0/EDTAを用いて10mg/mLに調整した。

[0126] C-2：リン酸バッファー（50 mM, pH 6.0）（以下、PB 6.0 と称する）へのバッファー交換

抗体水溶液にPB 6.0を加え共通操作Aを用いて濃縮した。この操作を数回行った後、濃度測定（共通操作B）を行い、PB 6.0を用いて10 mg/mLに調整した。

[0127] 共通操作D：抗体-薬物コンジュゲートの精製

NAP-25を用いてメーカー規定操作に従い、抗体画分を溶出させた。カラムの平衡化および溶出溶液に5（w/v）% Sorbitol-10 mM 酢酸バッファー（以下、ABSと称する）を使用し、

共通操作E：抗体-薬物コンジュゲートにおける抗体濃度の測定

抗体-薬物コンジュゲートの濃度C'（mg/mL）は、ランベルト・ベールの法則、吸光度A₂₈₀=モル吸光係数ε₂₈₀（L・mol⁻¹・cm⁻¹）×モル濃度C（mol・L⁻¹）×セル光路長l（cm）より導ける式（I）で算出した。

[0128]

$$C'(\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}) = \text{MW}(\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}) \cdot C(\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}) = \frac{A_{280} \cdot \text{MW}(\text{g} \cdot \text{mol}^{-1})}{\epsilon_{280}(\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}) \cdot l(\text{cm})} \quad \text{式(I)}$$

[0129] C'（mg/mL）の算出に使用した各値は以下によって得た。

・吸光度A₂₈₀：抗体-薬物コンジュゲート水溶液の280 nm UV吸光度の実測値

Lambda 25（PerkinElmer）にて計測

・モル質量MW（g・mol⁻¹）：抗体のアミノ酸配列からより求められる抗体分子量の計算推定値（抗体-薬物コンジュゲートのモル質量の近似値として使用）。

・光路長l（cm）：1 cm

・抗体薬物コンジュゲートのモル吸光係数ε₂₈₀：下記の式（II）より算出

$$\epsilon_{280} = \text{抗体モル吸光係数 } \epsilon_{\text{Ab}, 280} + \text{薬物モル吸光係数 } \epsilon_{\text{DL}, 280} \times \text{薬物結合数} \quad \text{式(II)}$$

ε_{Ab, 280}：280 nmにおける抗体のモル吸光係数

$\varepsilon_{DL, 280}$: 280 nmにおける薬物リンカーのモル吸光係数

薬物結合数 : 共通操作 F にて算出 (下記参照)

$\varepsilon_{Ab, 280}$ は抗体のアミノ酸配列から、既知の計算方法 (Protein Science, 1995, vol. 4, 2411-2423) で算出した値を使用した (下記表 2 参照)。

[0130] $\varepsilon_{DL, 280}$ はリンカー 1 ではメルカプトエタノール又は N-アセチルシステインで反応させ、マレイミド基をサクシニイミドチオエーテルに変換した化合物の実測のモル吸光係数 (280 nm)、リンカー 2 では実測のモル吸光係数 (280 nm) を使用した。

[0131] 共通操作 F : 抗体-薬物コンジュゲートにおける抗体一分子あたりの薬物平均結合数の測定

抗体-薬物コンジュゲートにおける抗体一分子あたりの薬物平均結合数は、reversed-phase chromatography (RPC) を用いて測定した。

[0132] F-1. サンプル調製 (抗体分子間ジスルフィドの還元)

抗体-薬物コンジュゲート溶液 (約 1 mg/mL、60 μ L) にジチオトレイトール (DTT) 水溶液 (100 mM、15 μ L) を添加した後、混合物を 37°C で 30 分インキュベートし、軽鎖及び重鎖間のジスルフィド結合を切断した。

[0133] F-2. HPLC 分析

HPLC 分析は下記の測定条件にて行った。

- ・ HPLC システム : Agilent 1290 HPLC システム (Agilent Technologies)
- ・ 検出器 : 紫外吸光度計 (測定波長 : 280 nm)
- ・ カラム : ACQUITY UPLC BEH Phenyl (2.1 $\times$ 50 mm、1.7 μ m、130 Å ; Waters、P/N186002884)
- ・ カラム温度 : 75°C

- ・移動相 A : 0.10 (w/v) %トリフルオロ酢酸 (TFA)、15 (w/v) %2-プロパノール水溶液
- ・移動相 B : 0.075 (w/v) %TFA、15 (w/v) %2-プロパノール、アセトニトリル溶液
- ・グラジエントプログラム : (min, B%) : (0, 14) - (15, 36) - (17, 80) - (17.01, 14) - (25, 14)
- ・サンプル注入量 : 10 μ L

[0134] F-3. データ解析

F-3-1 薬物の結合していない抗体の軽鎖 (L0) 及び重鎖 (H0) に対して、薬物の結合した軽鎖 (薬物が i 個結合した軽鎖 : Li) 及び重鎖 (薬物が i 個結合した重鎖 : Hi) は、結合した薬物の数に比例して疎水性が増し保持時間が大きくなることから、L0、L0 及び H0 との保持時間比較により検出ピークを L0、L1、H0、H1、H2、H3 のいずれかに割り当てることができる。

[0135] F-3-2 薬物リンカーに UV 吸収があるため、薬物リンカーの結合数に応じて、軽鎖、重鎖及び薬物リンカーのモル吸光係数を用いて下式に従ってピーク面積値の補正を行う。

薬物が i 個結合した軽鎖ピーク面積補正值 (A_{Li})

$$= \text{ピーク面積} \times \frac{\text{軽鎖のモル吸光係数}}{\text{軽鎖のモル吸光係数} + \text{結合薬物数 (i)} \times \text{薬物リンカーのモル吸光係数}}$$

薬物が i 個結合した重鎖ピーク面積補正值 (A_{Hi})

$$= \text{ピーク面積} \times \frac{\text{重鎖のモル吸光係数}}{\text{重鎖のモル吸光係数} + \text{結合薬物数 (i)} \times \text{薬物リンカーのモル吸光係数}}$$

[0136] ここで、各抗体における軽鎖及び重鎖のモル吸光係数 (280 nm) は、既知の計算方法 (Protein Science, 1995, vol. 4, 2411-2423) によって、各抗体の軽鎖及び重鎖のアミノ酸配列から推定される値を使用した (下記表 2 参照)。

[0137] F-3-3 ピーク面積補正值合計に対する各鎖ピーク面積比 (%) を下式

に従って計算した。

$$\begin{aligned} \text{薬物が } i \text{ 個結合した軽鎖ピーク面積比} &= \frac{A_{Li}}{A_{L0} + A_{L1}} \times 100 \\ \text{薬物が } i \text{ 個結合した重鎖ピーク面積比} &= \frac{A_{Hi}}{A_{H0} + A_{H1} + A_{H2} + A_{H3}} \times 100 \\ A_{Li}, \quad A_{Hi} : L_i, \quad H_i &\text{ 各々のピーク面積補正值} \end{aligned}$$

[0138] F-3-4 抗体-薬物コンジュゲートにおける抗体一分子あたりの薬物平均結合数を、下式に従って計算した。

$$\begin{aligned} \text{薬物平均結合数} &= (L_0 \text{ ピーク面積比} \times 0 + L_1 \text{ ピーク面積比} \times 1 + H_0 \\ &\text{ピーク面積比} \times 0 + H_1 \text{ ピーク面積比} \times 1 + H_2 \text{ ピーク面積比} \times 2 + H_3 \text{ ピーク面積比} \times 3) / 100 \times 2 \end{aligned}$$

[0139]

[表2]

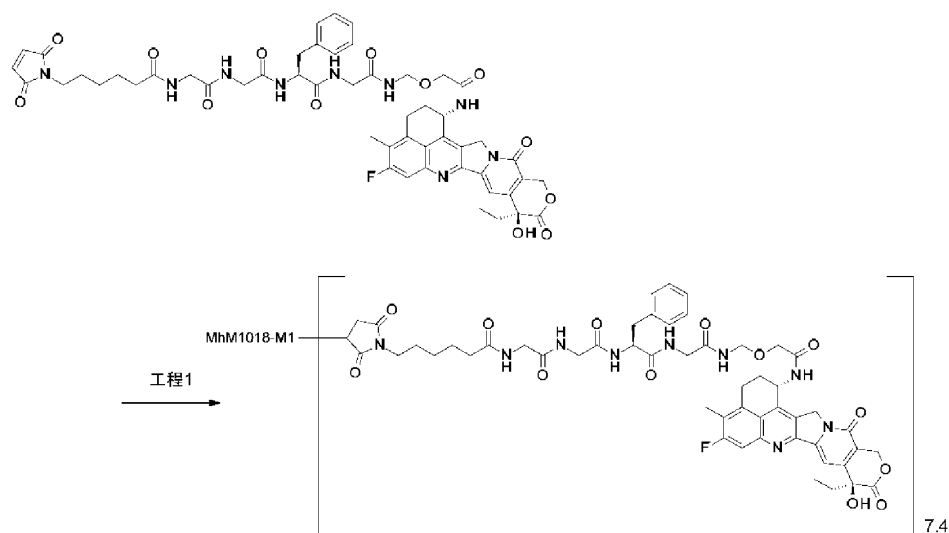
各抗体のモル吸光係数、吸光係数、抗体分子量

抗体	280 nmモル吸光係数 ($\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)			吸光係数 ($\text{L} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)	抗体 分子量
	Whole	重鎖	軽鎖		
MhM1018-M1	254340	77008	50162	1.67	152093
MhM1019-M1	254340	77008	50162	1.67	152689
MhM1020-M1	254340	77008	50162	1.67	152710
MhM1021-M1	254340	77008	50162	1.66	153078
MhM1022-M1	254340	77008	50162	1.67	152594
MhM1023-M1	254340	77008	50162	1.66	152982
MHIT3423	237380	90988	27702	1.56	152399
MHIT3201	237380	90988	27702	1.57	151360
MHIT3202	237380	90988	27702	1.57	151587
MHIT3203	237380	90988	27702	1.56	151957
MHIT1008	237380	90988	27702	1.57	151086

薬物リンカー	280 nmモル吸光係数($\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)
リンカー1	5440
リンカー2	23155

[0140] 7) -1 MhM1018-M1-DXd-ADCの合成

[化1]



[0141] 工程1：抗体－薬物コンジュゲート（1）

抗体の還元：実施例13にて作製したMhM1018-M1を、共通操作B及びC-1を用いて、PBS 6.0/EDTAにて10mg/mLに調製した。本溶液（1.45mL）に1Mリン酸水素二カリウム水溶液（Nacalai Tesque, Inc.；0.0218mL）及び、10mM TCEP（東京化成工業株式会社）水溶液（0.0581mL；抗体一分子に対して6.0当量）を加えた。37℃で2時間インキュベートすることによって、抗体内鎖間部のジスルフィド結合を還元した。

[0142] 抗体と薬物リンカーのコンジュゲーション：上記溶液を15℃で10分間インキュベートした。次いでリンカー1の10mM ジメチルスルホキシド溶液（0.0969mL；抗体一分子に対して10当量）を加え、15℃で1時間インキュベートし、薬物リンカーを抗体へ結合させた。次に、100mM NAC（Sigma-Aldrich Co. LLC）水溶液（0.0097mL；抗体一分子に対して10当量）を加え攪拌後、さらに室温にて20分間静置し、薬物リンカーの反応を停止させた。

[0143] 精製：上記溶液を、共通操作Dによる精製を行い、標記抗体－薬物コンジュゲート「MhM1018-M1-DXd-ADC」を含有する溶液を7m

L 得た。

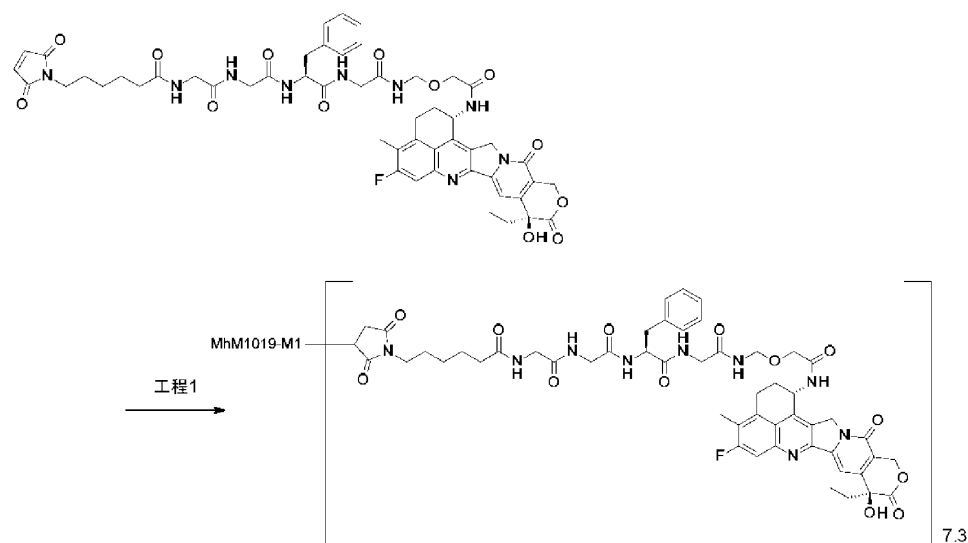
[0144] 特性評価：共通操作 E 及び F を使用して、下記の特性値を得た。

抗体濃度：1.75 mg/mL, 抗体収量：12.27 mg (83%)

抗体一分子あたりの薬物平均結合数 (n)：7.4。

[0145] 7) - 2 MhM1019-M1-DXd-ADC の合成

[化2]



[0146] 工程 1：抗体-薬物コンジュゲート (2)

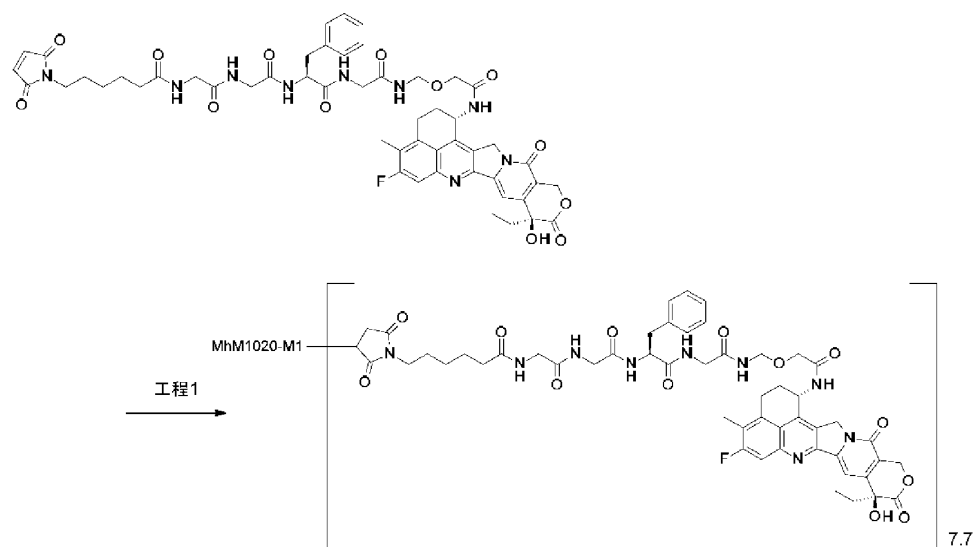
実施例 13 にて作製した MhM1019-M1 (280 nm 吸光係数として 1.66 mL mg⁻¹ cm⁻¹ を使用) を 1.50 mL 用いて、実施例 7) - 1 工程 1 と同様の方法により、標記抗体-薬物コンジュゲート「MhM1019-M1-DXd-ADC」を得た。

[0147] 特性評価：共通操作 E 及び F を使用して、下記の特性値を得た。

抗体濃度：1.85 mg/mL, 抗体収量：12.94 mg (87%) 抗体一分子あたりの薬物平均結合数 (n)：7.3。

[0148] 7) - 3 MhM1020-M1-DXd-ADC の合成

[化3]



[0149] 工程 1 : 抗体-薬物コンジュゲート (3)

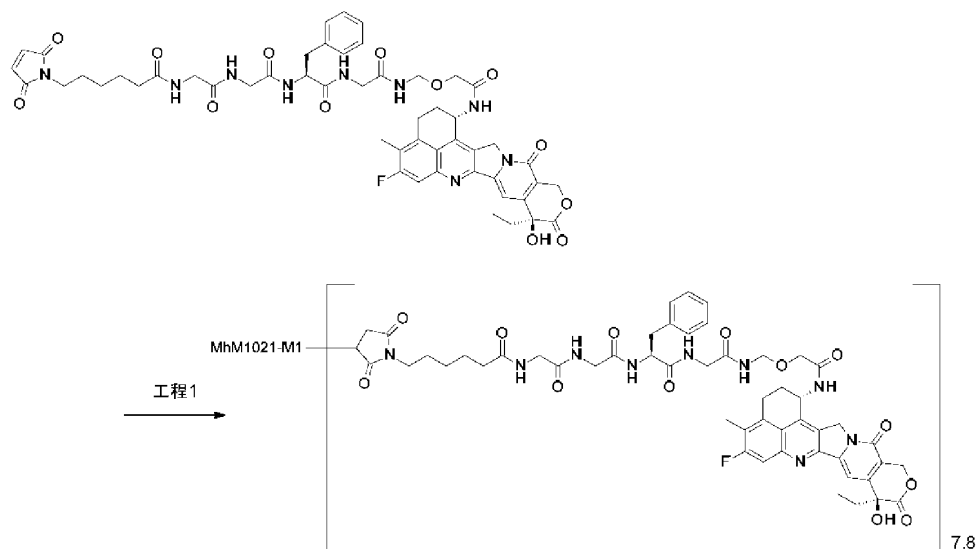
実施例 13 にて作製した MhM1020-M1 (280 nm 吸光係数として $1.66 \text{ mL mg}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ を使用) を 1.44 mL 用いて、実施例 7) - 1 工程 1 と同様の方法により、標記抗体-薬物コンジュゲート「MhM1020-M1-DXd-ADC」を得た。

[0150] 特性評価：共通操作 E 及び F を使用して、下記の特性値を得た。

抗体濃度： 1.40 mg/mL ，抗体収量： 9.79 mg (67%)，抗体一分子あたりの薬物平均結合数 (n)： 7.7 。

[0151] 7) - 4 MhM1021-M1-DXd-ADC の合成

[化4]



[0152] 工程 1 : 抗体－薬物コンジュゲート (4)

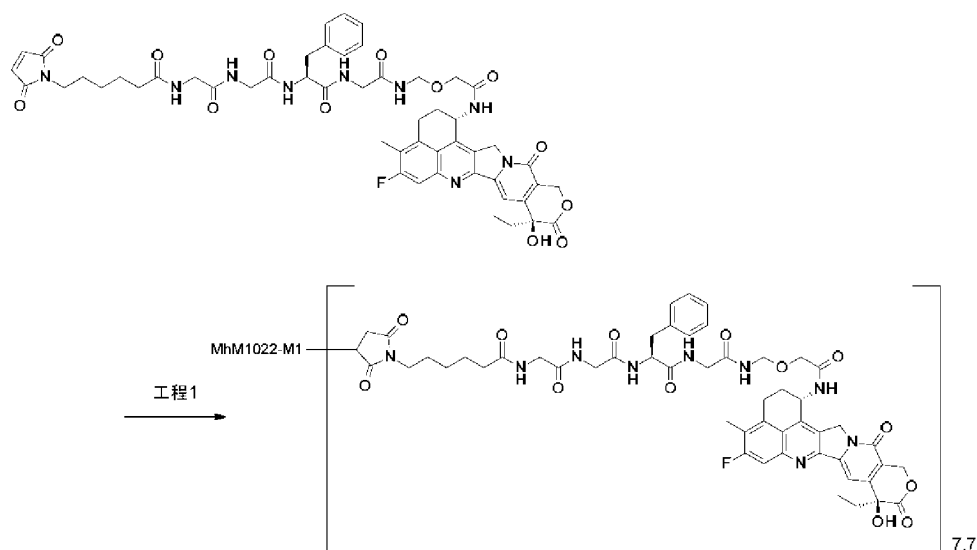
実施例 13 にて作製した MhM1021-M1 (280nm 吸光係数として $1.66 \text{ mL mg}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ を使用) を 1.43 mL 用いて、実施例 7) - 1 工程 1 と同様の方法により、標記抗体－薬物コンジュゲート「MhM1021-M1-DXd-ADC」を得た。

[0153] 特性評価：共通操作 E 及び F を使用して、下記の特性値を得た。

抗体濃度： 1.44 mg/mL 、抗体収量： 10.10 mg (69%)、
抗体一分子あたりの薬物平均結合数 (n) : 7.8。

[0154] 7) - 5 MhM1022-M1-DXd-ADC の合成

[化5]



[0155] 工程 1 : 抗体－薬物コンジュゲート (5)

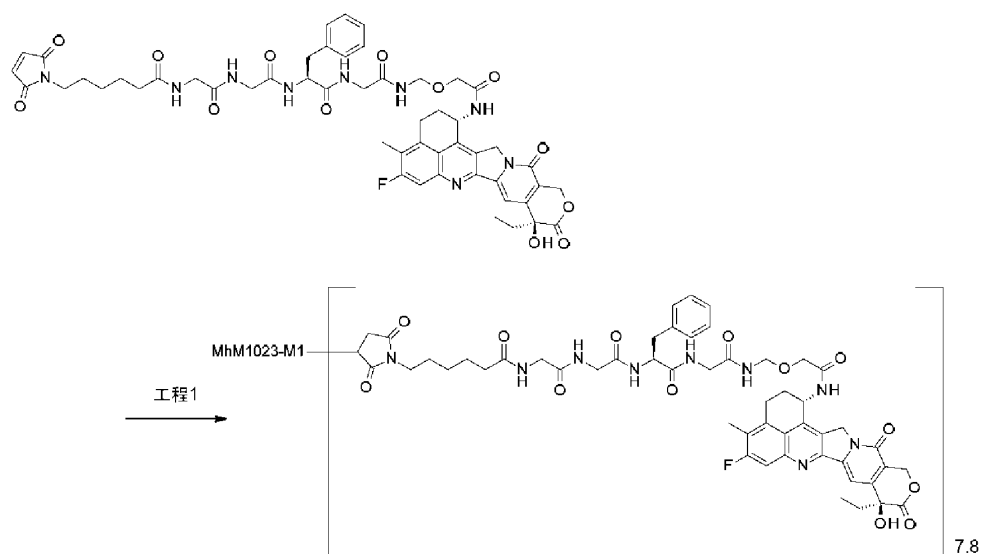
実施例 13 にて作製した MhM1022-M1 (280 nm 吸光係数として 1.66 mL mg⁻¹ cm⁻¹ を使用) を 1.51 mL 用いて、実施例 7) - 1 工程 1 と同様の方法により、標記抗体－薬物コンジュゲート「MhM1022-M1-DXd-ADC」を得た。

[0156] 特性評価：共通操作 E 及び F を使用して、下記の特性値を得た。

抗体濃度：1.52 mg/mL，抗体収量：10.62 mg (69%)、抗体一分子あたりの薬物平均結合数 (n)：7.7。

[0157] 7) - 6 MhM1023-M1-DXd-ADC の合成

[化6]



[0158] 工程 1 : 抗体－薬物コンジュゲート (6)

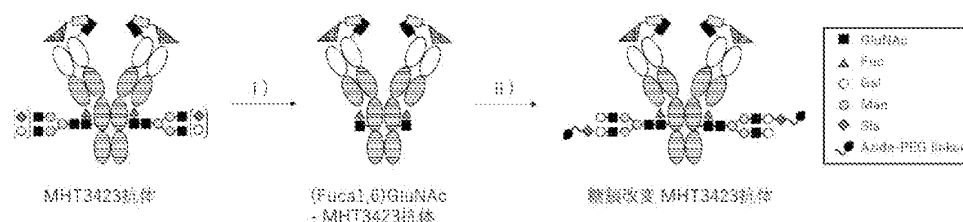
実施例 13 にて作製した MhM1023-M1 (280 nm 吸光係数として $1.66 \text{ mL mg}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ を使用) を 1.36 mL 用いて、実施例 7) - 1 工程 1 と同様の方法により、標記抗体－薬物コンジュゲート「MhM1023-M1-DXd-ADC」を得た。

[0159] 特性評価：共通操作 E 及び F を使用して、下記の特性値を得た。

抗体濃度： 1.76 mg/mL ，抗体収量： 12.32 mg (89%)，
抗体一分子あたりの薬物平均結合数 (n)：7.8。

[0160] 7) - 7 MHT3423-PBD-ADC の合成

[化7]



i) EndoS 酵素

ii) EndoS (D233Q/Q303L) 酵素，糖鎖オキサゾリン

[0161] 上記糖鎖改変抗体のN297糖鎖は、非還元末端のシアル酸にアジド基を導入したMSG1型糖鎖(WO2019/065964号)を示す(図8)。

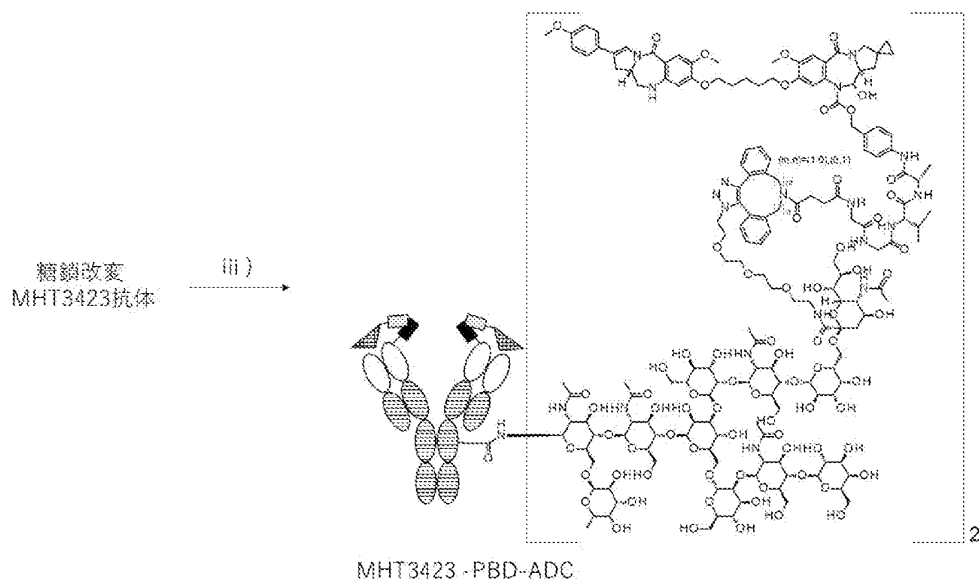
[0162] 工程1: (Fuca1, 6) GlucNAc-MHT3423抗体の調製
 実施例6で調製したMHT3423抗体溶液を、共通操作C-2に従いリン酸緩衝溶液(50mM, pH6.0)(以下PB6.0)にバッファー交換し、19.4mg/mL(1.15mL)に調製した。この溶液にEndoS溶液(PBS、7.52mg/mL)を0.0148mL加え、37℃で2時間インキュベートした。Agilent 2100 バイオアナライザを用いて糖鎖が切断されたことを確認した後、GSTおよびProteinAカラム(AKTA)で精製した。目的物のフラクションをPB6.0に置換し、(Fuca1, 6) GlucNAc-MHT3423抗体(19.3mg/mL, 0.995mL)を得た。

[0163] 工程2: 糖鎖改変MHT3423抗体の調製

上記工程1にて得られた(Fuca1, 6) GlucNAc-MHT3423抗体(PB6.0)(19.3mg/mL, 0.995mL)に、糖鎖オキサゾリン(3aR, 5R, 6S, 7R, 7aR)-3a, 6, 7, 7a-Tetrahydro-7-hydroxy-5-(hydroxymethyl)-2-methyl-5H-pyrano[3,2-d]oxazol-6-yl O-[N5-acetyl-N1-[2-[2-(2-azidoethoxy)ethoxy]ethoxy]ethyl]- α -neuraminidosyl]-(2 $\rightarrow$ 6)-O- β -D-galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-O-2-(acetyl amino)-2-deoxy- β -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)-O- α -D-mannopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)-O-[O- β -D-galactopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-O-2-(acetyl amino)-2-deoxy- β -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- α -D-mannopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)]- β -D-mannopyranoside (WO2019

／065964号 実施例56、以下[N3-PEG(3)]-MSG1-Ox) (図8) 溶液(PB6.0) (50.0mg/mL, 0.0578mL) と、GST-EndoS D233Q/Q303L溶液(WO2017/010559号) (PBS) (4.80mg/mL, 0.0800mL) を加え、30℃で3時間インキュベートした。Agilent 2100 バイオアナライザで糖鎖の転移を確認後、GSTおよびCHTカラム(AKTA) にて精製した。目的物を含むフラクションを10mM酢酸緩衝溶液、5(w/v)%ソルビトールpH5.5(以下ABS) に置換し、糖鎖改変MHT3423抗体(9.99mg/mL, 1.56mL) を得た。

[0164] [化8]



iii) リンカー2

[0165] 工程3：抗体と薬物リンカーのコンジュゲーション

上記工程2にて得られた糖鎖改変MHT3423(ABS) (9.99mg/mL, 0.500mL) に、室温にて1,2-プロパンジオール(0.480mL)、リンカー2の10mMジメチルスルホキシド溶液(0.0197mL；抗体1分子に対して6当量)を加え、チューブローテーター(MTR-103、アズワン株式会社)を用いて、室温にて48時間反応させた。

。

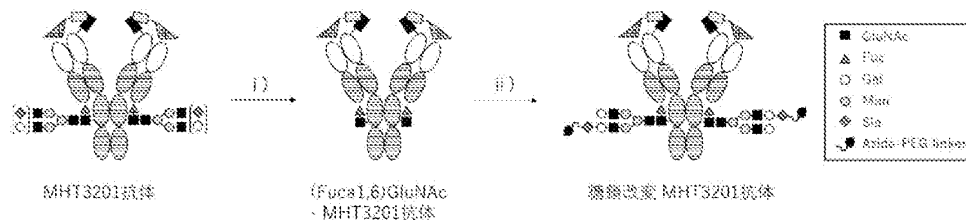
[0166] 精製操作：上記溶液を共通操作Dで2回精製し、MHT3423-PBD-ADC溶液を2.50 mL得た。

特性評価：共通操作E, Fを用いて下記特性値を得た。

抗体濃度：1.59 mg/mL, 抗体収量：3.97 mg (79%), 抗体一分子あたりの薬物平均結合数 (n)：1.8

[0167] 7) -8 MHT3201-PBD-ADCの合成

[化9]



i) EndoS酵素

ii) EndoS (D233Q/Q303L) 酵素, 糖鎖オキサゾリン

[0168] 上記糖鎖改変抗体のN297糖鎖は、非還元末端のシアル酸にアジド基を導入したMSG1型糖鎖 (WO2019/065964号) を示す (図8)。

[0169] 工程1：(Fucα1, 6)GlcNAc-MHT3201抗体の調製

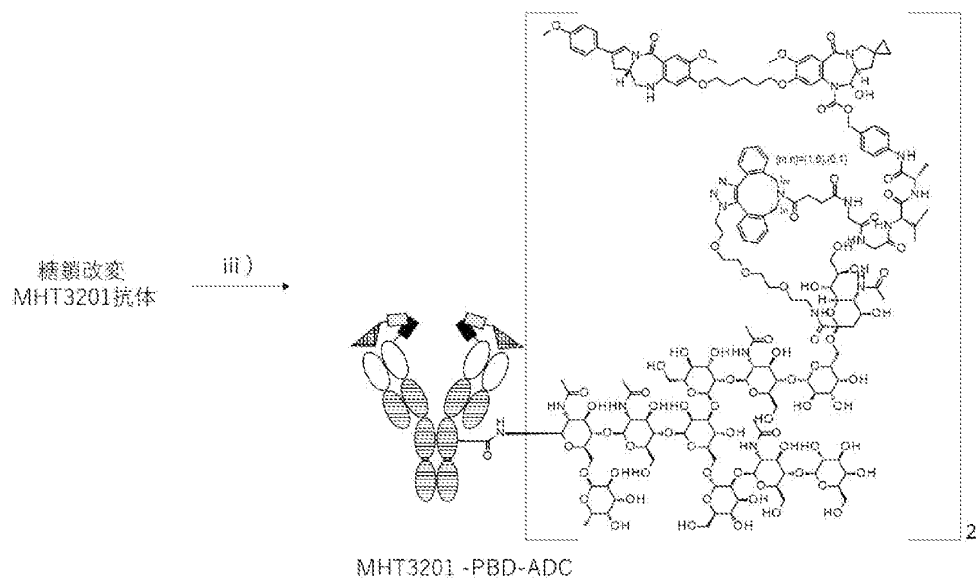
実施例6で調製したMHT3201抗体溶液をPB6.0でバッファー交換し、ca. 20.2 mg/mL (1.43 mL) に調製した。上記実施例7) -7工程1と同様の操作を行い、(Fucα1, 6)GlcNAc-MHT3201抗体溶液 (PB6.0) (19.4 mg/mL, 1.27 mL) を得た。

[0170] 工程2：糖鎖改変MHT3201の調製

上記工程1で得られた (Fucα1, 6)GlcNAc-MHT3201抗体溶液 (PB6.0) (19.4 mg/mL, 1.27 mL) を用いて、実施例7) -7工程2と同様の操作を行うことによって、糖鎖改変MHT3201抗体 (ABS) (9.96 mg/mL, 1.72 mL) を得た。

。

[0171] [化10]



i i i) リンカー2

[0172] 工程3：抗体と薬物リンカーのコンジュゲーション

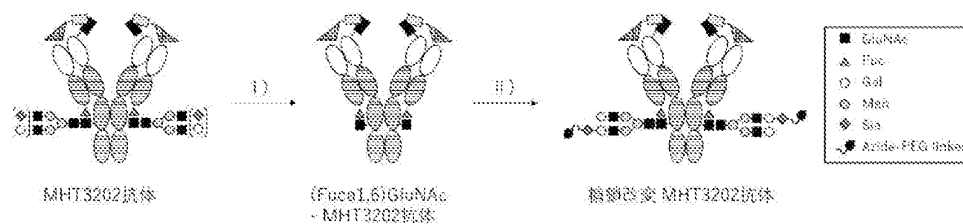
上記工程2で得られた糖鎖改変MHT3201 (ABS) (9.96 mg/mL, 0.500 mL)を用いて、実施例7)－7工程3と同様の操作によりMHT3201-PBD-ADC溶液溶液 (ABS)を2.50 mL得た。

特性評価：共通操作E、Fを用いて下記の特性値を得た。

[0173] 抗体濃度：1.41 mg/mL, 抗体収量：3.52 mg (71%), 抗体一分子あたりの薬物平均結合数 (n)：1.9

[0174] 7)－9 MHT3202-PBD-ADCの合成

[化11]



[0179] 工程3：抗体と薬物リンカーのコンジュゲーション

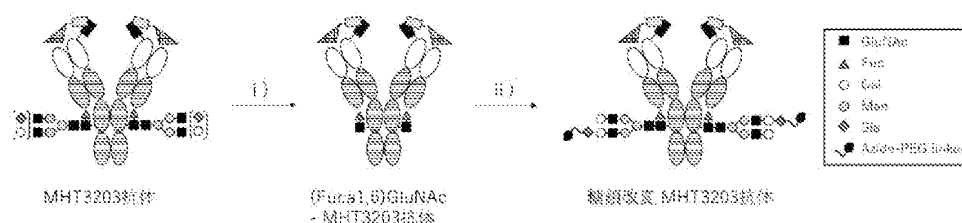
上記工程2で得られた糖鎖改変MHT3202 (ABS) (9.93 mg/mL, 0.500 mL) を用いて、実施例7) - 7工程3と同様の操作を行うことによって、MHT3202-PBD-ADC溶液 (ABS) を2.50 mL 得た。

特性評価：共通操作E, Fを用いて下記の特性値を得た。

[0180] 抗体濃度：1.51 mg/mL, 抗体収量：3.77 mg (76%), 抗体一分子あたりの薬物平均結合数 (n)：1.8

[0181] 7) - 10 MHT3203-PBD-ADCの合成

[化13]



i) EndoS酵素

ii) EndoS (D233Q/Q303L) 酵素, 糖鎖オキサゾリン

[0182] 上記糖鎖改変抗体のN297糖鎖は、非還元末端のシアル酸にアジド基を導入したMSG1型糖鎖 (WO2019/065964号) を示す (図8)。

[0183] 工程1：(Fuc α 1,6)GlcNAc-MHT3203抗体の調製

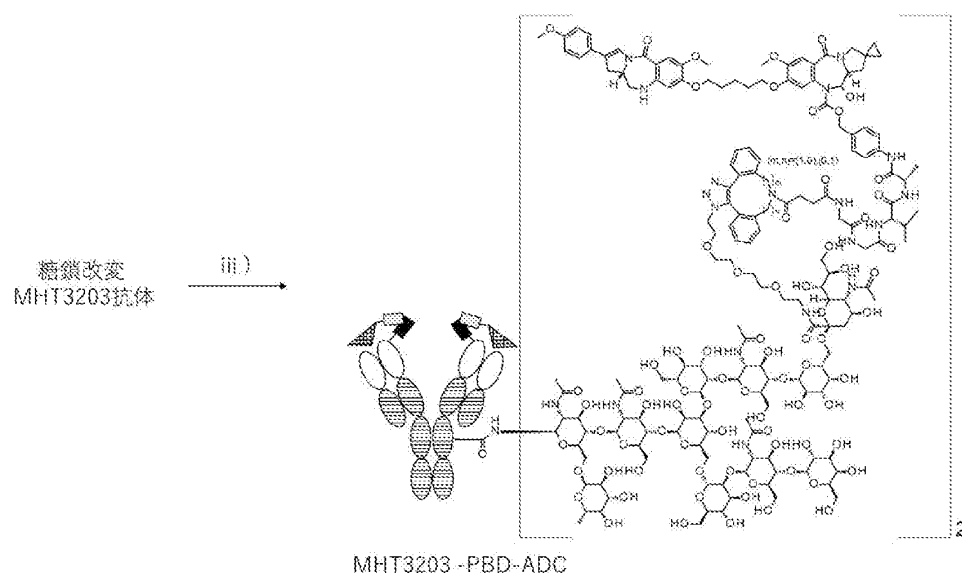
実施例6で調製したMHT3203抗体溶液をPB6.0でバッファー交換し、ca. 19.1 mg/mL (1.29 mL) に調製した。上記実施例7) - 7工程1と同様の操作を行い、(Fuc α 1,6)GlcNAc-MHT3203抗体溶液 (PB6.0) (19.8 mg/mL, 0.969 mL) を得た。

[0184] 工程2：糖鎖改変MHT3203抗体の調製

上記工程1で得られた (Fuc α 1,6)GlcNAc-MHT3203抗体溶液 (PB6.0) (19.8 mg/mL, 0.969 mL) を用いて

、実施例 7) - 7 工程 2 と同様の操作を行うことによって、糖鎖改変 MHT 3203 抗体 (P B 6. 0) (9. 77 mg/mL, 1. 77 mL) を得た。

[0185] [化14]



iii) リンカー 2

[0186] 工程 3 : 抗体と薬物リンカーのコンジュゲーション

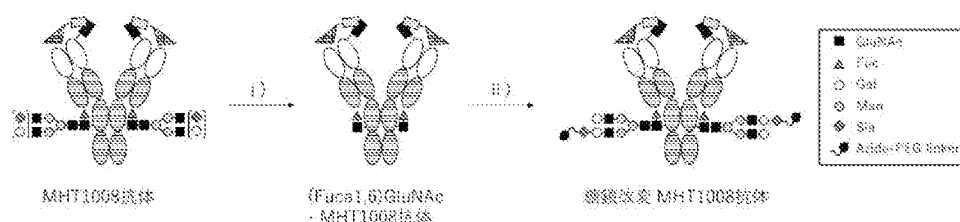
上記工程 2 で得られた糖鎖改変 MHT 3203 (ABS) (9. 77 mg/mL, 0. 500 mL) を用いて、実施例 7) - 7 工程 3 と同様の操作を行うことによって、MHT 3203-PBD-ADC の溶液 (ABS) を 2. 50 mL 得た。

特性評価 : 共通操作 E, F を用いて下記の特性値を得た。

[0187] 抗体濃度 : 1. 49 mg/mL, 抗体収量 : 3. 73 mg (76%), 抗体一分子あたりの薬物平均結合数 (n) : 1. 8

[0188] 7) - 11 MHT 1008-PBD-ADC の合成

[化15]



i) EndoS酵素

ii) EndoS (D233Q/Q303L) 酵素, 糖鎖オキサゾリン

[0189] 上記糖鎖改変抗体のN297糖鎖は、非還元末端のシアル酸にアジド基を導入したMSG1型糖鎖 (WO2019/065964号) を示す (図8)。

[0190] 工程1: (Fucα1, 6)GlcNAc-MHT1008抗体の調製

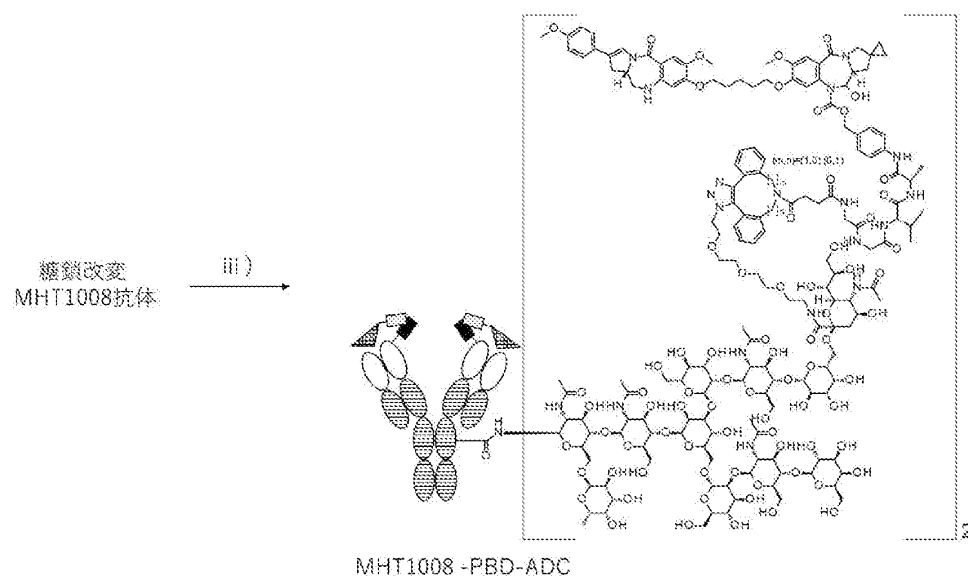
実施例4で調製したMHT1008抗体溶液をPB6.0でバッファー交換し、ca. 16.6mg/mL (0.880mL) に調製した。上記実施例7) - 7工程1と同様の操作を行い、(Fucα1, 6)GlcNAc-MHT1008抗体溶液 (PB6.0) (16.8mg/mL、0.800mL) を得た。

[0191] 工程2: 糖鎖改変MHT1008抗体の調製

上記工程1で得られた16.8mg/mL (Fucα1, 6)GlcNAc-MHT1008抗体溶液 (PB6.0) (0.800mL) を用いて、実施例7) - 7工程2と同様の操作を行うことによって、糖鎖改変MHT1008抗体 (ABS) (11.4mg/mL, 1.00mL) を得た。

[0192]

[化16]



i i i) リンカー2

[0193] 工程3：抗体と薬物リンカーのコンジュゲーション

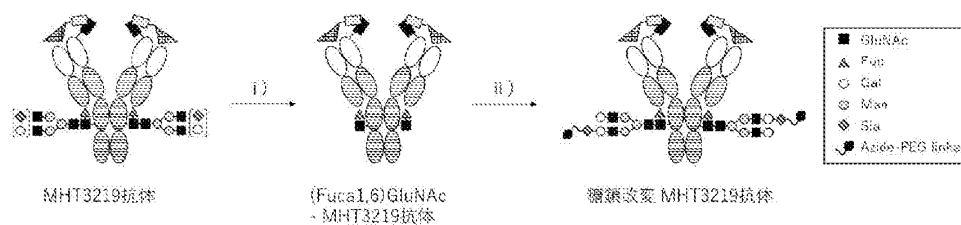
上記工程2で得られた糖鎖改変MHT1008抗体（ABS）（11.4 mg/mL, 0.450 mL）を用いて、実施例7）－7工程3と同様の操作を行うことによって、MHT1008-PBD-ADCの溶液（ABS）を2.50 mL得た。

[0194] 特性評価：共通操作E, Fを用いて下記の特性値を得た。

抗体濃度：1.55 mg/mL, 抗体収量：3.87 mg（77%），抗体一分子あたりの薬物平均結合数（n）：1.9

7）－12 MHT3219-PBD-ADCの合成

[化17]



i) Endo S酵素

i i) EndoS (D233Q/Q303L) 酵素, 糖鎖オキサゾリン

[0195] 上記糖鎖改変抗体のN297糖鎖は、非還元末端のシアル酸にアジド基を導入したMSG1型糖鎖 (WO2019/065964号) を示す (図8)。

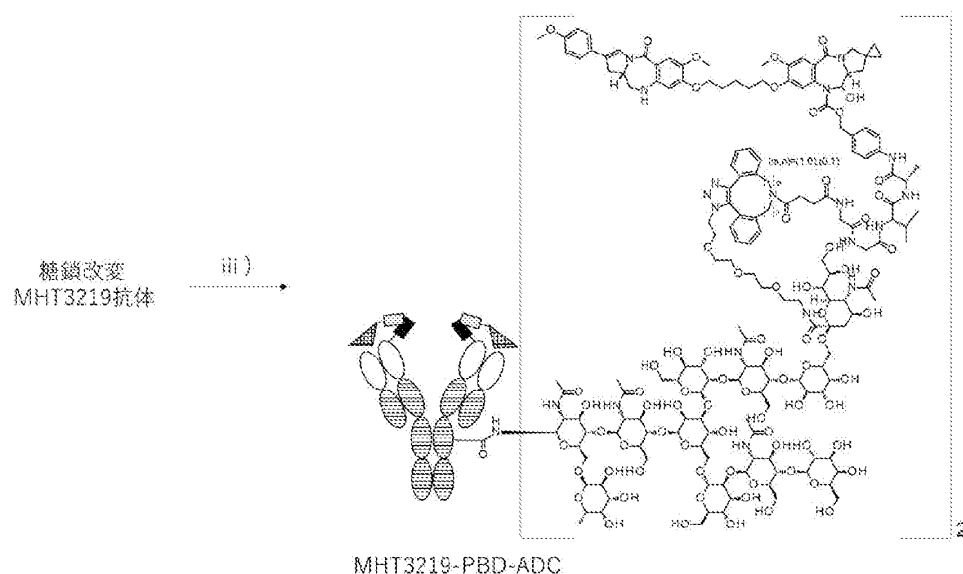
[0196] 工程1: (Fuc α 1, 6) GlcNAc-MHT3219抗体の調製

実施例21で調製したMHT3219抗体溶液をPB6.0でバッファー交換し、ca. 15.0mg/mL (1.70mL) に調製した。上記実施例7) - 7工程1と同様の操作を行い、(Fuc α 1, 6) GlcNAc-MHT3219抗体溶液 (PB6.0) (17.9mg/mL、1.30mL) を得た。

[0197] 工程2: 糖鎖改変MHT3219抗体の調製

上記工程1で得られた17.9mg/mL (Fuc α 1, 6) GlcNAc-MHT3219抗体溶液 (PB6.0) (1.30mL) を用いて、実施例7) - 7工程2と同様の操作を行うことによって、糖鎖改変MHT3219抗体 (ABS) (9.90mg/mL、2.10mL) を得た。

[0198] [化18]



iii) リンカー2

[0199] 工程3: 抗体と薬物リンカーのコンジュゲーション

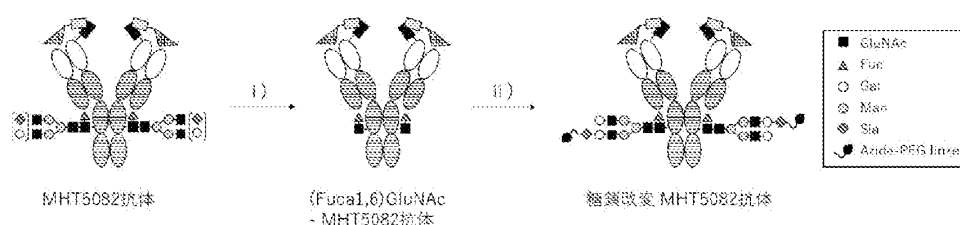
上記工程2で得られた糖鎖改変MHT3219抗体(ABS)(9.90 mg/mL, 0.50 mL)を用いて、実施例7)－7工程3と同様の操作を行うことによって、MHT3219-PBD-ADCの溶液(ABS)を3.50 mL得た。

[0200] 特性評価：共通操作E, Fを用いて下記の特性値を得た。

抗体濃度：0.90 mg/mL, 抗体収量：3.13 mg (63%), 抗体一分子あたりの薬物平均結合数(n)：1.9

7)－13 MHT5082-PBD-ADCの合成

[化19]



i) EndoS酵素

ii) EndoS (D233Q/Q303L) 酵素, 糖鎖オキサゾリン

[0201] 上記糖鎖改変抗体のN297糖鎖は、非還元末端のシアル酸にアジド基を導入したMSG1型糖鎖(WO2019/065964号)を示す(図8)。

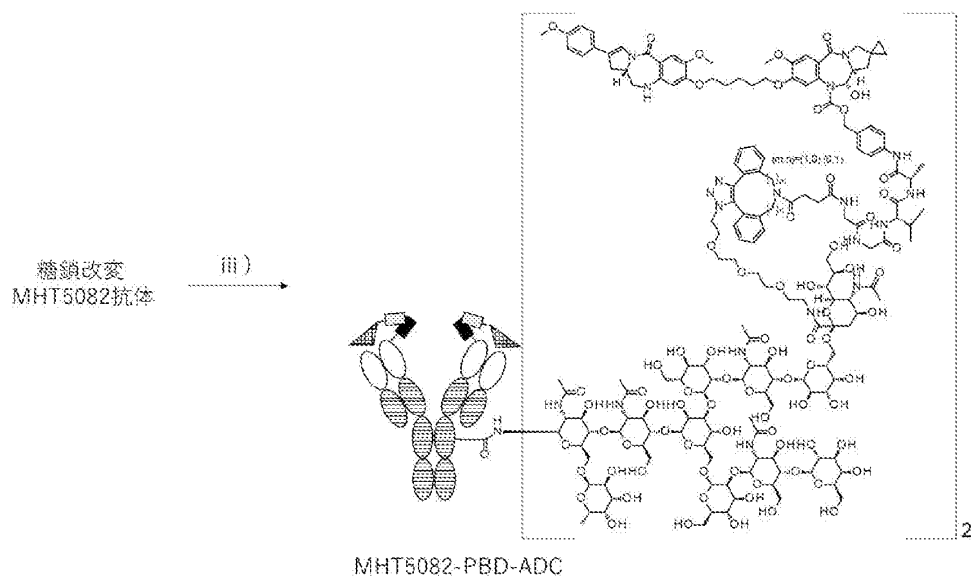
[0202] 工程1：(Fucα1,6)GlcNAc-MHT5082抗体の調製

実施例22で調製したMHT5082抗体溶液をPB6.0でバッファー交換し、ca. 15.8 mg/mL (1.50 mL)に調製した。上記実施例7)－7工程1と同様の操作を行い、(Fucα1,6)GlcNAc-MHT5082抗体溶液(PB6.0)(12.5 mg/mL, 1.4 mL)を得た。

[0203] 工程2：糖鎖改変MHT5082抗体の調製

上記工程1で得られた12.5 mg/mL (Fucα1,6)GlcNAc-MHT5082抗体溶液(PB6.0)(1.40 mL)を用いて、実施例7)－7工程2と同様の操作を行うことによって、糖鎖改変MHT5082抗体(ABS)(9.10 mg/mL, 1.20 mL)を得た。

[0204] [化20]



i i i) リンカー2

[0205] 工程3：抗体と薬物リンカーのコンジュゲーション

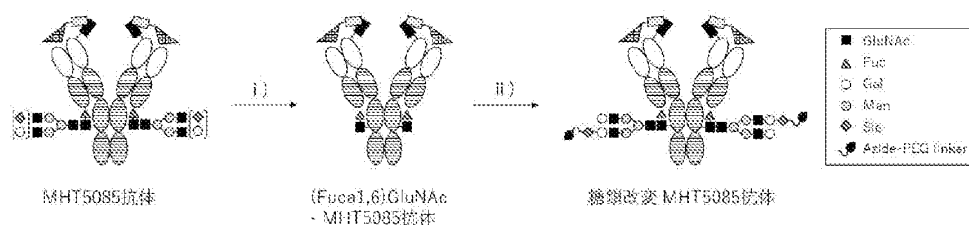
上記工程2で得られた糖鎖改変MHT5082抗体（ABS）（9.10 mg/mL, 0.60 mL）を用いて、実施例7）－7工程3と同様の操作を行うことによって、MHT5082-PBD-ADCの溶液（ABS）を3.0 mL得た。

[0206] 特性評価：共通操作E、Fを用いて下記の特性値を得た。

抗体濃度：0.57 mg/mL, 抗体収量：2.00 mg（37%），抗体一分子あたりの薬物平均結合数（n）：1.8

7）－14 MHT5085-PBD-ADCの合成

[化21]



i) EndoS酵素

ii) EndoS (D233Q/Q303L) 酵素, 糖鎖オキサゾリン

[0207] 上記糖鎖改変抗体のN297糖鎖は、非還元末端のシアル酸にアジド基を導入したMSG1型糖鎖 (WO2019/065964号) を示す (図8)。

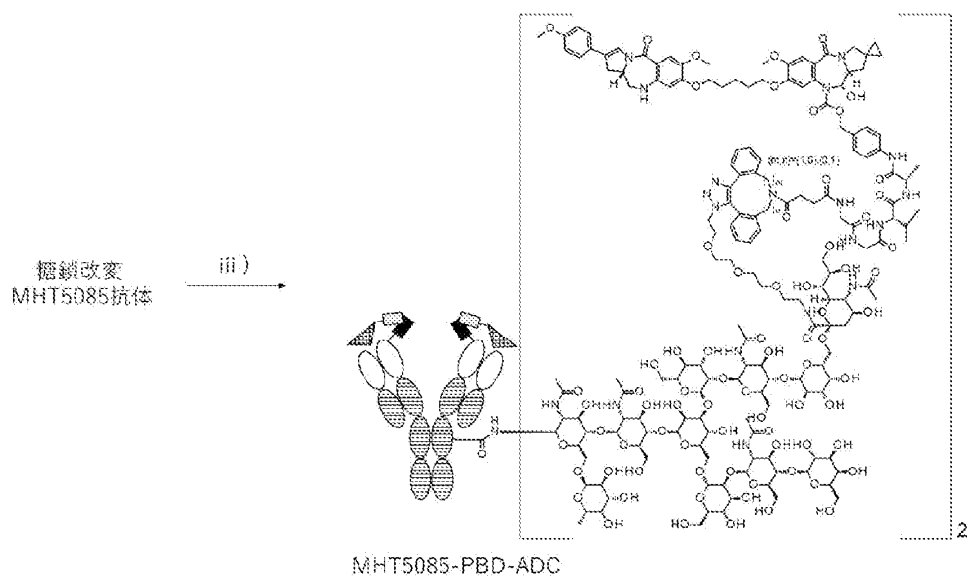
[0208] 工程1: (Fuc α 1, 6) GlcNAc-MHT5085抗体の調製

実施例22で調製したMHT5085抗体溶液をPB6.0でバッファー交換し、ca. 15.3 mg/mL (1.50 mL) に調製した。上記実施例7) - 7工程1と同様の操作を行い、(Fuc α 1, 6) GlcNAc-MHT5085抗体溶液 (PB6.0) (11.0 mg/mL、1.40 mL) を得た。

[0209] 工程2: 糖鎖改変MHT5085抗体の調製

上記工程1で得られた11.0 mg/mL (Fuc α 1, 6) GlcNAc-MHT5085抗体溶液 (PB6.0) (1.40 mL) を用いて、実施例7) - 7工程2と同様の操作を行うことによって、糖鎖改変MHT5085抗体 (ABS) (9.20 mg/mL、1.20 mL) を得た。

[0210] [化22]



iii) リンカー2

[0211] 工程3：抗体と薬物リンカーのコンジュゲーション

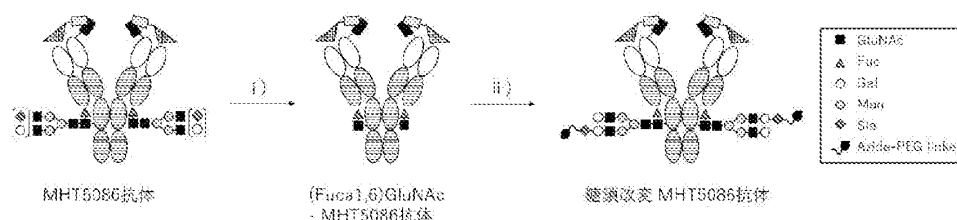
上記工程2で得られた糖鎖改変MHT5085抗体（ABS）（9.20 mg/mL, 0.60 mL）を用いて、実施例7）－7工程3と同様の操作を行うことによって、MHT5085－PBD－ADCの溶液（ABS）を3.50 mL得た。

[0212] 特性評価：共通操作E, Fを用いて下記の特性値を得た。

抗体濃度：1.38 mg/mL, 抗体収量：4.90 mg（89%）, 抗体一分子あたりの薬物平均結合数（n）：1.8

7）－15 MHT5086－PBD－ADCの合成

[化23]



i) EndoS酵素

ii) EndoS (D233Q/Q303L) 酵素, 糖鎖オキサゾリン

[0213] 上記糖鎖改変抗体のN297糖鎖は、非還元末端のシアル酸にアジド基を導入したMSG1型糖鎖（WO2019/065964号）を示す（図8）。

[0214] 工程1：(Fucα1,6)GlcNAc－MHT5086抗体の調製

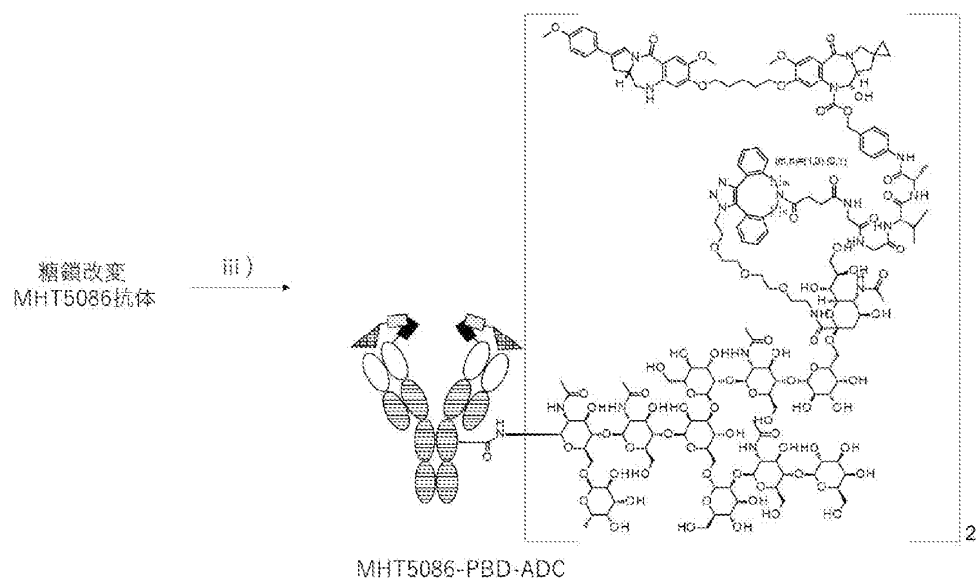
実施例22で調製したMHT5086抗体溶液をPB6.0でバッファー交換し、ca. 15.7 mg/mL（1.50 mL）に調製した。上記実施例7）－7工程1と同様の操作を行い、(Fucα1,6)GlcNAc－MHT5086抗体溶液（PB6.0）（15.0 mg/mL, 1.20 mL）を得た。

[0215] 工程2：糖鎖改変MHT5086抗体の調製

上記工程1で得られた15.0 mg/mL (Fucα1,6)GlcNAc－MHT5086抗体溶液（PB6.0）（1.20 mL）を用いて、実施例7）－7工程2と同様の操作を行うことによって、糖鎖改変MHT50

86抗体（ABS）（10.5mg/mL, 1.20mL）を得た。

[0216] [化24]



iii) リンカー2

[0217] 工程3：抗体と薬物リンカーのコンジュゲーション

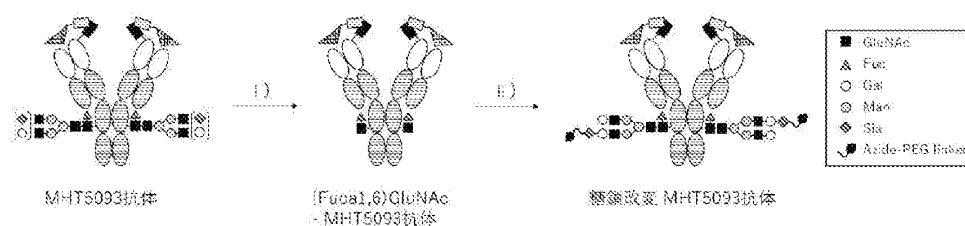
上記工程2で得られた糖鎖改変MHT5086抗体（ABS）（10.5mg/mL, 0.60mL）を用いて、実施例7）－7工程3と同様の操作を行うことによって、MHT5086-PBD-ADCの溶液（ABS）を3.50mL得た。

[0218] 特性評価：共通操作E，Fを用いて下記の特性値を得た。

抗体濃度：1.55mg/mL, 抗体収量：5.11mg（81%），抗体一分子あたりの薬物平均結合数（n）：1.8

7）－16 MHT5093-PBD-ADCの合成

[化25]



i) EndoS酵素

ii) EndoS (D233Q/Q303L) 酵素, 糖鎖オキサゾリン

[0219] 上記糖鎖改変抗体のN297糖鎖は、非還元末端のシアル酸にアジド基を導入したMSG1型糖鎖 (WO2019/065964号) を示す (図8)。

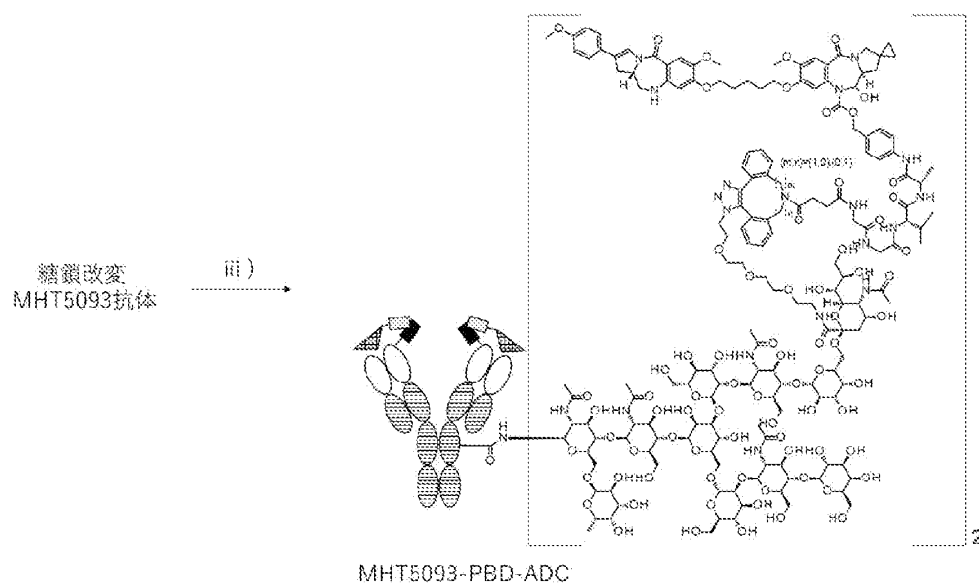
[0220] 工程1: (Fuc α 1, 6) GlcNAc-MHT5093抗体の調製

実施例22で調製したMHT5093抗体溶液をPB6.0でバッファー交換し、ca. 13.4 mg/mL (1.50 mL) に調製した。上記実施例7) - 7工程1と同様の操作を行い、(Fuc α 1, 6) GlcNAc-MHT5093抗体溶液 (PB6.0) (15.3 mg/mL、1.10 mL) を得た。

[0221] 工程2: 糖鎖改変MHT5093抗体の調製

上記工程1で得られた15.3 mg/mL (Fuc α 1, 6) GlcNAc-MHT5093抗体溶液 (PB6.0) (1.10 mL) を用いて、実施例7) - 7工程2と同様の操作を行うことによって、糖鎖改変MHT5093抗体 (ABS) (10.9 mg/mL、1.20 mL) を得た。

[0222] [化26]



iii) リンカー2

[0223] 工程3：抗体と薬物リンカーのコンジュゲーション

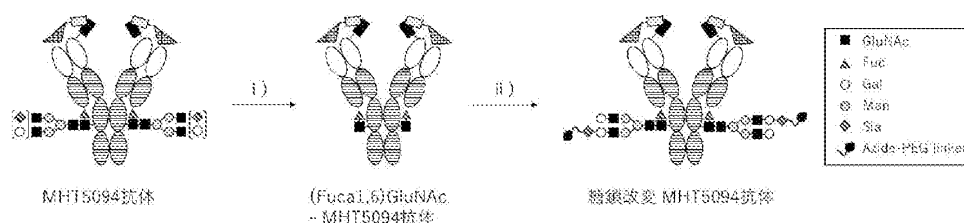
上記工程2で得られた糖鎖改変MHT5093抗体（ABS）（10.9 mg/mL, 0.60 mL）を用いて、実施例7）－7工程3と同様の操作を行うことによって、MHT5093-PBD-ADCの溶液（ABS）を3.50 mL得た。

[0224] 特性評価：共通操作E, Fを用いて下記の特性値を得た。

抗体濃度：1.56 mg/mL, 抗体収量：5.32 mg（81%）, 抗体一分子あたりの薬物平均結合数（n）：1.9

7）－17 MHT5094-PBD-ADCの合成

[化27]



i) Endo S 酵素

ii) Endo S (D233Q/Q303L) 酵素, 糖鎖オキサゾリン

[0225] 上記糖鎖改変抗体のN297糖鎖は、非還元末端のシアル酸にアジド基を導入したMSG1型糖鎖（WO2019/065964号）を示す（図8）。

[0226] 工程1：(Fuc α 1,6)GlcNAc-MHT5094抗体の調製

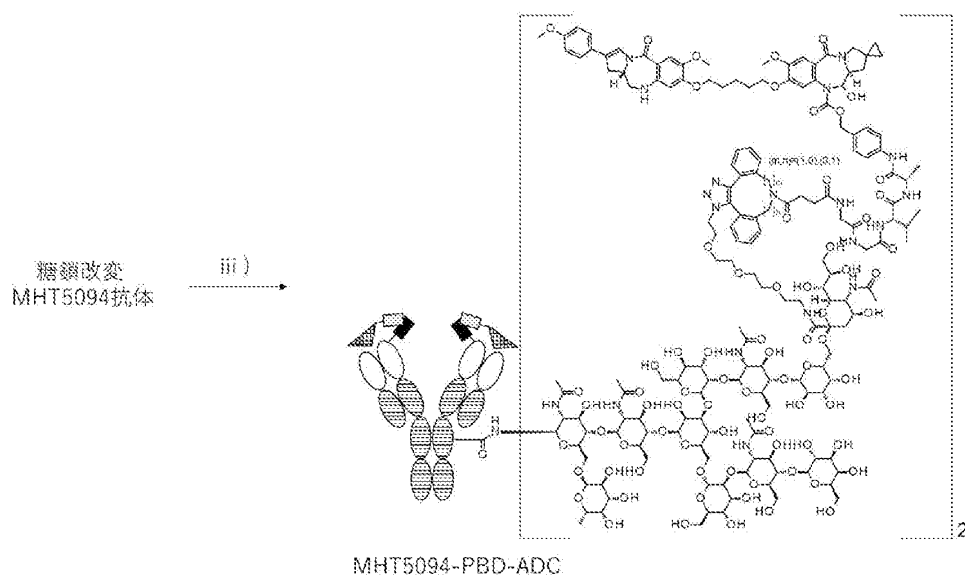
実施例22で調製したMHT5094抗体溶液をPB6.0でバッファー交換し、ca. 13.9 mg/mL（1.50 mL）に調製した。上記実施例7）－7工程1と同様の操作を行い、(Fuc α 1,6)GlcNAc-MHT5094抗体溶液（PB6.0）（15.8 mg/mL, 1.10 mL）を得た。

[0227] 工程2：糖鎖改変MHT5094抗体の調製

上記工程1で得られた15.8 mg/mL (Fuc α 1,6)GlcNAc-MHT5094抗体溶液（PB6.0）（1.10 mL）を用いて、実

施例 7) - 7 工程 2 と同様の操作を行うことによって、糖鎖改変 MHT 5 0 9 4 抗体 (A B S) (9. 1 0 m g / m L, 1. 2 0 m L) を得た。

[0228] [化28]



i i i) リンカー 2

[0229] 工程 3 : 抗体と薬物リンカーのコンジュゲーション

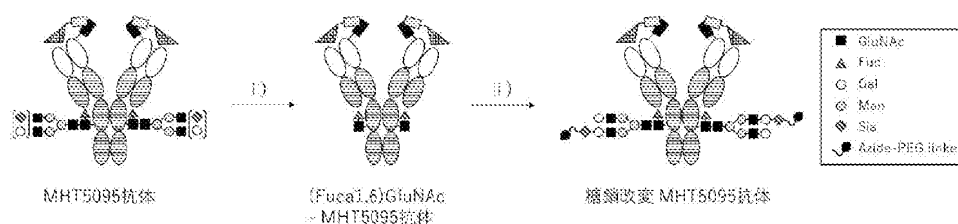
上記工程 2 で得られた糖鎖改変 MHT 5 0 9 4 抗体 (A B S) (9. 1 0 m g / m L, 0. 6 0 m L) を用いて、実施例 7) - 7 工程 3 と同様の操作を行うことによって、MHT 5 0 9 4 - P B D - A D C の溶液 (A B S) を 3. 5 0 m L 得た。

[0230] 特性評価 : 共通操作 E, F を用いて下記の特性値を得た。

抗体濃度 : 1. 3 7 m g / m L, 抗体収量 : 4. 4 1 m g (81%), 抗体一分子あたりの薬物平均結合数 (n) : 1. 9

7) - 1 8 MHT 5 0 9 5 - P B D - A D C の合成

[化29]



i) EndoS 酵素

ii) EndoS (D233Q/Q303L) 酵素, 糖鎖オキサゾリン

[0231] 上記糖鎖改変抗体のN297糖鎖は、非還元末端のシアル酸にアジド基を導入したMSG1型糖鎖 (WO2019/065964号) を示す (図8)。

[0232] 工程1: (Fucα1, 6) GlcNAc-MHT5095抗体の調製

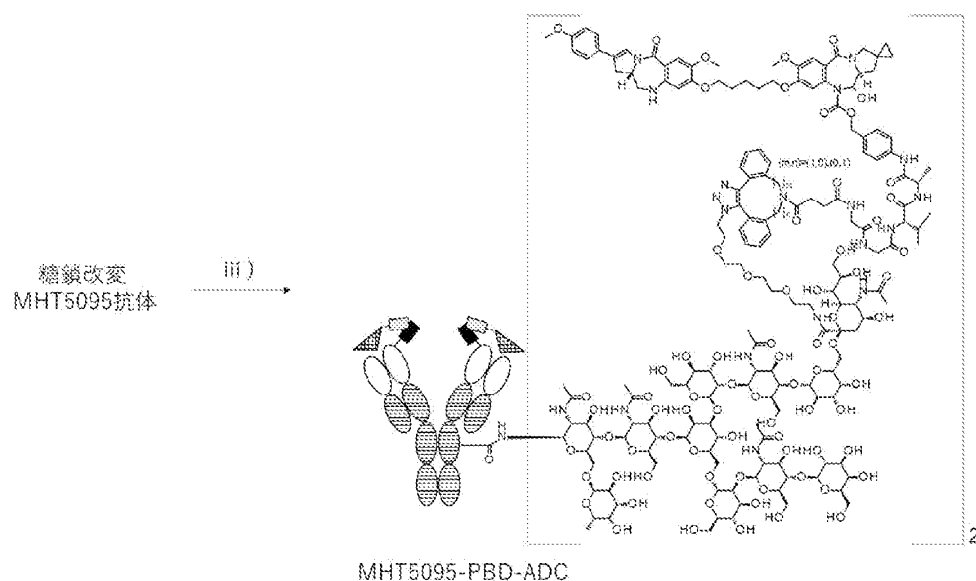
実施例22で調製したMHT5095抗体溶液をPB6.0でバッファー交換し、ca. 12.4 mg/mL (1.50 mL) に調製した。上記実施例7) - 7工程1と同様の操作を行い、(Fucα1, 6) GlcNAc-MHT5095抗体溶液 (PB6.0) (15.6 mg/mL、1.10 mL) を得た。

[0233] 工程2: 糖鎖改変MHT5095抗体の調製

上記工程1で得られた15.6 mg/mL (Fucα1, 6) GlcNAc-MHT5095抗体溶液 (PB6.0) (1.10 mL) を用いて、実施例7) - 7工程2と同様の操作を行うことによって、糖鎖改変MHT5095抗体 (ABS) (10.5 mg/mL、1.20 mL) を得た。

[0234]

[化30]



iii) リンカー2

[0235] 工程3：抗体と薬物リンカーのコンジュゲーション

上記工程2で得られた糖鎖改変MHT5095抗体（ABS）（10.5 mg/mL, 0.60 mL）を用いて、実施例7）－7工程3と同様の操作を行うことによって、MHT5095－PBD－ADCの溶液（ABS）を3.50 mL得た。

[0236] 特性評価：共通操作E，Fを用いて下記の特性値を得た。

抗体濃度：1.52 mg/mL，抗体収量：5.18 mg（82%），抗体一分子あたりの薬物平均結合数（n）：1.9

[0237] （実施例8） 抗TROP2マスク抗体－薬物コンジュゲートのin vivo薬効試験

抗体－薬物コンジュゲートの抗腫瘍効果は、TROP2陽性ヒト腫瘍細胞株の細胞を免疫不全マウスに移植した動物モデルを用いて評価した。4－5週齢のBALB/cヌードマウス（CAnN. Cg-Foxn1[nu]/CrjCrj[Foxn1nu/Foxn1nu]、日本チャールス・リバー）を実験使用前にSPF条件化で3日間以上馴化した。マウスには滅

菌した固形飼料（FR-2, Funabashi Farms Co., Ltd）を給餌し、滅菌した水道水（5-15 ppm次亜塩素酸ナトリウム溶液を添加して調製）を与えた。移植した腫瘍の長径及び短径を電子式デジタルノギス（CD-15CX, Mitutoyo Corp.）で1週間に2回測定し、以下に示す計算式により腫瘍体積を算出した。

$$\text{腫瘍体積 (mm}^3\text{)} = 1/2 \times \text{長径 (mm)} \times [\text{短径 (mm)}]^2$$

[0238] 抗体-薬物コンジュゲートは全てABSバッファー（10 mM-Acetate Buffer, 5 (w/v) % Sorbitol, pH 5.5）（NACALAI）で希釈し、10 mL/kgの液量を尾静脈内投与した。また、コントロール群（Vehicle群）としてABSバッファーを同様に投与した。1群あたり6匹のマウスを実験に用いた。

[0239] 8) - 1 抗腫瘍効果 (1)

TROP2陽性ヒト肺粘液性類表皮癌細胞株NCI-H292（ATCC）を生理食塩水に懸濁、 5×10^6 cellsを雌ヌードマウスの右側腹部に皮下移植し（Day 0）、Day 11に無作為に群分けを実施した。群分け実施日に、実施例7で作製した抗体-薬物コンジュゲート5種（クローン名は、MHT1008-PBD-ADC、MHT3423-PBD-ADC、MHT3201-PBD-ADC、MHT3202-PBD-ADC、MHT3203-PBD-ADC）を0.4 mg/kgの用量で尾静脈内投与した。結果を図9（A）に示す。横軸は日数、縦軸は腫瘍体積、誤差範囲はSE値を示す。

[0240] uPA基質とCAPN基質の両方を搭載したMHT3202-PBD-ADC及びMHT3203-PBD-ADCはuPA基質のみを搭載したMHT3423-PBD-ADC及びCAPN基質のみを搭載したMHT3201-PBD-ADCよりも強い抗腫瘍効果を発揮した。

[0241] 8) - 2 抗腫瘍効果 (2)

TROP2陽性ヒト咽頭癌細胞株Fadu（ATCC）を生理食塩水に懸濁、 3×10^6 cellsを雌ヌードマウスの右側腹部に皮下移植し（Day

0)、Day 10に無作為に群分けを実施した。群分け実施日に、実施例7で作製した抗体-薬物コンジュゲート5種(クローン名は、MHT1008-PBD-ADC、MHT3423-PBD-ADC、MHT3201-PBD-ADC、MHT3202-PBD-ADC、MHT3203-PBD-ADC)を0.4mg/kgの用量で尾静脈内投与した。結果を図9(B)に示す。横軸は日数、縦軸は腫瘍体積、誤差範囲はSE値を示す。

[0242] uPA基質とCAPN基質の両方を搭載したMHT3202-PBD-ADC及びMHT3203-PBD-ADCはuPA基質のみを搭載したMHT3423-PBD-ADC及びCAPN基質のみを搭載したMHT3201-PBD-ADCよりも強い抗腫瘍効果を発揮した。

[0243] (実施例9) 抗CD98抗体hM23H1L1の結合活性評価

WO2015/146132号に記載の公知の抗CD98抗体hM23H1L1(重鎖配列(図43、配列番号18)、軽鎖配列(図44、配列番号19))を実施例1)-1と同様の方法で調製し、ヒトCD98抗原に対する結合活性をELISAで評価した。

[0244] 96ウェルMaxisorp plate(Black、Nunc社)にPBSで1µg/mLに希釈したNeutrAvidin(Thermo Fisher Scientific社)を50µLずつ添加し、4℃で一晩固相化した。Tween-20(バイオ・ラッド社)を0.05(w/v)%含むPBS(ELISAバッファー)で3回洗浄後、Blocker Casein(Thermo Fisher Scientific社)でブロッキングした。ELISAバッファーで洗浄後、PBSで1µg/mLに希釈したビオチン化ヒトCD98抗原(アクセション番号:P08195。細胞外ドメインを当業者公知の手法で精製後、EZ-Link NHS-PEG4-Bioin(Thermo Fisher Scientific社)でビオチン化した。)を50µLずつ添加して30分室温で振とうした。ELISAバッファーで洗浄後、ELISAバッファーで調製した抗CD98抗体hM23H1L1を50µLずつ添加して30分室温で振とう

した。ELISAバッファーで洗浄後、ELISAバッファーで2500倍に希釈したHorseradish peroxidase (HRP) 標識抗ヒトIgG抗体 (Jackson Immuno Research Laboratories社) を50 μ L添加し、30分室温で振とうした。ELISAバッファーで洗浄後、SuperSignal Pico ELISA Chemiluminescent substrate (Thermo Fisher Scientific社) を添加し、10分後の化学発光をプレートリーダーで測定した。図10に示すように、hM23H1L1は濃度依存的にヒトCD98抗原に結合した。

[0245] (実施例10) 抗CD98抗体hM23H1L1に結合するミモトープペプチドの濃縮

完全ランダムな15アミノ酸から構成されるペプチドライブラリー (Linear 15mer lib) または、中央付近に芳香族性アミノ酸とProの繰り返しモチーフをもつリボソームディスプレイ用のペプチドライブラリー (ZPZP lib) を構築し、hM23H1L1へ結合可能なペプチドを濃縮した (図11 (A))。最初に、EZ-Link NHS-PEG4-Bioin (Thermo Fisher Scientific社) でビオチン化したヒト血清由来IgG (Sigma-Aldrich社) を固相化したDynabeads Streptavidin M-280 (Thermo Fisher Scientific社) およびDynabeads Protein A (Thermo Fisher Scientific社) に対してRDを添加し、ヒト血清由来IgGやProtein Aと反応させた。結合しなかったRDをマグネットスタンド (DynaMag-2、Thermo Fisher Scientific社) を用いて回収後、hM23H1L1を結合させたDynabeads Protein Aと反応させた。マグネットスタンドを用いた洗浄操作によりhM23H1L1に結合しなかったRDを除去し、hM23H1L1に結合したRDからmRNAを精製した。その後、RT-PCRおよびインビトロ翻訳

によりRDを再度調製した。このパニング操作を3回実施した。

[0246] パニング3ラウンド後のmRNAをインビトロ翻訳してRDを調製後、hM23H1L1またはヒト血清由来IgGが固相化されたDynabeads Protein Aとそれぞれ反応させた（インプット量： 6×10^{11} ）。マグネットスタンドを用いた洗浄操作により結合しなかったRDを除去後、結合したRDからmRNAを回収し、RT-qPCRにより、回収量（アウトプット）を定量評価した。図11（B）に示すように、Linear 15mer libおよびZPP libの両ペプチドライブラリーに関して、hM23H1L1を固相した条件では、ヒト血清IgGを固相した条件と比較して約200倍多くmRNAが回収された。この結果から、hM23H1L1に特異的に結合するペプチドの濃縮が示唆された。

[0247] （実施例11） 抗CD98マスク抗体の調製・結合活性評価

実施例3と同様にパニング由来のランダムペプチドを抗CD98 scFvに融合し、抗CD98抗体の結合を阻害可能なミモトープペプチドを選抜した。Linear 15mer libおよびZPP libからそれぞれ選抜したミモトープペプチドおよびMMP切断リンカー（実施例3）－1参照）を融合した抗CD98マスク抗体MhM1008（表3、図45、配列番号20）、MhM1013（表3、図46、配列番号21）の発現ベクターを当業者公知の方法で構築し、各抗体の軽鎖発現ベクターをhM23H1L1の重鎖発現ベクターと組合せ実施例1）－1と同様の方法でExp i293F細胞の培養上清よりマスク抗体を精製し、蛋白質濃度を決定した。調製したマスク抗体は軽鎖発現ベクター名と対応させ、MhM1008、MhM1013と命名した（表3）。

[0248] 以下に記載する部分を除き、実施例4、実施例9と同様の方法でMMP1添加条件、非添加条件におけるヒトCD98抗原に対する結合活性をELISAで評価した。プロテアーゼ添加条件では、 $3 \mu\text{M}$ の抗体に対して500 nMのMMP1を添加し、 37°C で反応後、ELISAバッファーで濃度調整した抗体をヒトCD98抗原の固定されたウェルに添加した。プロテアー

ぜ非添加条件でも同様に、ELISAバッファーで調製した抗体を各ウェルに添加した。

[0249] 図12-1(A)に示すように、ミモトープペプチドを融合していないhM23H1L1はMMP1添加条件において濃度依存的にヒトCD98抗原に結合した。また、ミモトープペプチドを融合したMhM1008およびMhM1013は、MMP1添加条件においてhM23H1L1と同様の結合活性を示した。その一方で、MMP1非添加条件におけるMhM1008およびMhM1013の結合活性は、MMP1添加条件における結合活性よりもそれぞれ低下しており、マスク効果が示された(図12-1(B)、図12-2(C))。MhM1008およびMhM1013の結合のEC₅₀比(MMP1非添加条件/MMP1添加条件)はそれぞれ132、326だった。

[0250] 取得したペプチドがミモトープであることを確認するために、マスクペプチドとMMP切断リンカー(実施例3)-1参照)を含むMhM1013のFab領域を当業者公知の方法で調製し、当該Fab領域の結晶化およびX線結晶構造解析を行った。その結果、該ペプチドはhM23H1L1のCDR領域に結合していることが示された(データ示さず)。

[0251]

[表3]

抗CD98抗体とアミノ酸配列情報

マスク抗体名	重鎖配列	軽鎖配列
MhM1008	hM23H1L1 (配列番号18)	MhM1008 (配列番号20)
MhM1013	hM23H1L1 (配列番号18)	MhM1013 (配列番号21)
hM23-M1	hM23-M1 (配列番号22)	hM23-M1 (配列番号23)
MhM1013-M1	hM23-M1 (配列番号22)	MhM1013 (配列番号21)
MhM1018-M1	hM23-M1 (配列番号22)	MhM1018 (配列番号24)
MhM1019-M1	hM23-M1 (配列番号22)	MhM1019 (配列番号25)
MhM1020-M1	hM23-M1 (配列番号22)	MhM1020 (配列番号26)
MhM1021-M1	hM23-M1 (配列番号22)	MhM1021 (配列番号27)
MhM1022-M1	hM23-M1 (配列番号22)	MhM1022 (配列番号28)
MhM1023-M1	hM23-M1 (配列番号22)	MhM1023 (配列番号29)

[0252] (実施例12) 異なる親和性を有する抗CD98抗体のマスキング効果

12) - 1 抗CD98マスク抗体の結合親和性評価

Biacore T200を用い、固定化した抗Human IgG (Fc) 抗体へ抗CD98抗体 (hM23H1L1または、H鎖CDR1に点変異を導入したhM23-M1 (表3、重鎖配列 (図47、配列番号22)、軽鎖配列 (図48、配列番号23)) をリガンドとして捕捉 (キャプチャー) し、CD98抗原をアナライトとして測定した。抗Human IgG (Fc) 抗体 (Human antibody Capture kit、Cytiva社) はSensor Chip CM5 (Cytiva社) へ、キット説明書に従い固定化させた。HBS-EP+ (Cytiva社) で2

$\mu\text{g}/\text{mL}$ に希釈した評価する各抗CD98抗体を $5\mu\text{L}/\text{min}$ で60秒間接触させて固定化した。その後、HBS-E P+で希釈した複数濃度のCD98抗原をアナライトとして各サンプルを流速 $30\mu\text{L}/\text{min}$ で90秒間添加し、250秒間乖離を測定するマルチサイクルキネティクス解析により K_D を算出した。図13(A)に示すように、hM23H1L1およびhM23-M1の結合親和性(K_D)はそれぞれ0.58 nM、10.3 nMだった。

[0253] 12) - 2 抗CD98マスク抗体のマスキング効果評価

MhM1013および、hM23-M1の重鎖とMhM1013の軽鎖をもつMhM1013-M1(表3)を調製し、以下に記載する部分を除き、実施例11と同様の方法でMMP1添加条件、非添加条件におけるヒトCD98抗原に対する結合活性をELISAで評価した。プロテアーゼ添加条件では、 $2\mu\text{M}$ の抗体に対して200 nMのMMP1を添加し、 37°C で反応後、MMPバッファーで濃度調整した抗体をヒトCD98抗原の固定されたウェルに添加した。プロテアーゼ非添加条件でも同様に、MMPバッファーで調製した抗体を各ウェルに添加した。

[0254] 図13(B)に示すように、ミモトープペプチドを融合したMhM1013およびMhM1013-M1は、MMP1添加条件でMMP1非添加条件よりも強い結合活性を示した。MhM1013およびMhM1013-M1の結合の EC_{50} 比(MMP1非添加条件/MMP1添加条件)はそれぞれ239、552だった。

[0255] (実施例13) ADC化に供される抗CD98抗体の調製・結合活性評価

細胞内プロテアーゼであるCAPNの基質配列と、細胞外プロテアーゼであるuPAの基質配列を組合せることで、uPA基質のみを搭載した場合と比較して、マスク抗体の結合活性を向上させられるか検証することを目的に、抗CD98抗体hM23-M1の重鎖とリンカー配列の異なる軽鎖で構成される各種マスク抗体を調製した(表3)。プロテアーゼ基質を搭載していないMhM1018-M1(表3、図49、配列番号24)、uPA基質の

みを搭載したM1019-M1（表3、図50、配列番号25）、CAPN基質のみを搭載したM1020-M1（表3、図51、配列番号26）、uPAとCAPN基質の両方を搭載したM1021-M1（表3、図52、配列番号27）、PLGLAGで構成される公知のMMP9基質（Biopolymers. ; 40（4）：399-416（1996）.）のみを搭載したM1022-M1（表3、図53、配列番号28）および、MMP9とCAPN基質の両方を搭載したM1023-M1（表3、図54、配列番号29）に関して、以下に記載する部分を除き、実施例6、実施例11と同様の方法でプロテアーゼ添加条件、非添加条件におけるヒトCD98抗原に対する結合活性をELISAで評価した。MMPバッファーで抗体を2000nMに希釈後、200nMのuPAまたはCAPN1またはMMP9を添加し、37℃で反応後、MMPバッファー濃度調整した抗体をヒトCD98抗原の固定されたウェルに添加した。プロテアーゼ非添加条件でも同様に、MMPバッファーで調製した抗体を各ウェルに添加した。

[0256] MhM1018-M1は酵素非添加条件およびuPAまたはCAPN1添加条件で同様の結合活性を示した（図14-1（A））。MhM1019-M1は酵素非添加条件と比較しuPA添加条件で結合活性が向上し、CAPN1添加条件では結合活性が向上しなかった（図14-1（B））。同様に、MhM1020-M1の結合活性はCAPN1添加条件でのみ向上した（図14-2（C））。uPA基質とCAPN基質の両方を搭載したMhM1021-M1の結合活性はuPA添加条件とCAPN1添加条件の両方で向上した（図14-2（D））。MhM1018-M1は酵素非添加条件およびMMP9またはCAPN1添加条件で同様の結合活性を示したが、MMP9添加条件でわずかに結合活性が向上した（図14-3（E））。MhM1022-M1は酵素非添加条件と比較しMMP9添加条件で結合活性が向上し、CAPN1添加条件でもわずかに結合活性が向上した（図14-3（F））。MMP9基質とCAPN基質の両方を搭載したMhM1023-M1の結合活性はMMP9添加条件とCAPN1添加条件の両方で向上した（図

14-4 (G))。以上の結果から、設計したマスク抗体が目的のプロテアーゼ感受性をもつことが示された。

[0257] (実施例14) 抗CD98マスク抗体-薬物コンジュゲートの *in vivo* 薬効試験

抗体-薬物コンジュゲートの抗腫瘍効果は、CD98陽性ヒト腫瘍細胞株の細胞を免疫不全マウスに移植した動物モデルを用いて評価した。4-5週齢のBALB/cヌードマウス(CAnN, Cg-Foxn1[nu]/Cr1Cr1j[Foxn1nu/Foxn1nu]、日本チャールス・リバー)を実験使用前にSPF条件化で3日間以上馴化した。マウスには滅菌した固形飼料(FR-2, Funabashi Farms Co., Ltd)を給餌し、滅菌した水道水(5-15ppm次亜塩素酸ナトリウム溶液を添加して調製)を与えた。移植した腫瘍の長径及び短径を電子式デジタルノギス(CD-15CX, Mitutoyo Corp.)で1週間に2回測定し、以下に示す計算式により腫瘍体積を算出した。

$$\text{腫瘍体積 (mm}^3\text{)} = 1/2 \times \text{長径 (mm)} \times [\text{短径 (mm)}]^2$$

[0258] 抗体-薬物コンジュゲートは全てABSバッファー(10mM-Acetate Buffer, 5(w/v)% Sorbitol, pH5.5)(NACALAI)で希釈し、10mL/kgの液量を尾静脈内投与した。また、コントロール群(Vehicle群)としてABSバッファーを同様に投与した。1群あたり6匹のマウスを実験に用いた。

[0259] CD98陽性ヒト咽頭癌細胞株FaDu(ATCC)を生理食塩水に懸濁、 3×10^6 cellsを雌ヌードマウスの右側腹部に皮下移植し(Day0)、Day10に無作為に群分けを実施した。群分け実施日に、実施例7で作製した抗体-薬物コンジュゲート4種(クローン名は、MhM1018-M1-DXd-ADC、MhM1020-M1-DXd-ADC、MhM1022-M1-DXd-ADC、MhM1023-M1-DXd-ADC)を1mg/kgの用量で尾静脈内投与した。結果を図15に示す。横軸は日数、縦軸は腫瘍体積、誤差範囲はSE値を示す。

[0260] MMP 9 基質とCAPN 基質の両方を搭載したMhM1023-M1-DXd-ADCはMMP 9 基質のみを搭載したMhM1022-M1-DXd-ADC及びCAPN 基質のみを搭載したMhM1020-M1-DXd-ADCよりも強い抗腫瘍効果を発揮した。

[0261] (実施例 15) 抗EGFR抗体、抗GPCR5D抗体の調製・結合活性評価

15) - 1 抗EGFR抗体の調製・結合活性評価

公知の抗EGFR抗体Cetuximab (表4、重鎖配列 (図55、配列番号30)、軽鎖配列 (図56、配列番号31)) を実施例1) - 1と同様に調製し、ヒトEGFRに対する結合活性をELISAで評価した。

[0262] 96ウェルMaxisorp plate (Black、Nunc社) にPBSで0.2 μ g/mLに希釈したヒトEGFR-Fc (ヒトEGFR (アクセッション番号: P00533) の細胞外ドメインと、ヒトIgG1 Fc領域 (アクセッション番号: P01857) の融合蛋白質を当業者公知の方法で精製した。) を50 μ Lずつ添加し、4°Cで一晩固相化した。Tween-20 (バイオ・ラッド社) を0.05 (w/v) %含むPBS (ELISAバッファー) で洗浄後、Blocker Casein (Thermo Fisher Scientific社) でブロッキングした。ELISAバッファーで洗浄後、MMPバッファーで調製したCetuximabを50 μ Lずつ添加して30分室温で振とうした。ELISAバッファーで洗浄後、ELISAバッファーで2500倍に希釈したHorseradish peroxidase (HRP) 標識抗ヒトIgG抗体 (Jackson Immuno Research Laboratories社) を50 μ L添加し、30分室温で振とうした。ELISAバッファーで洗浄後、SuperSignal Pico ELISA Chemiluminescent substrate (Thermo Fisher Scientific社) を添加し、10分後の化学発光をプレートリーダーで測定した。図16 (A) に示すように、Cetuximabは濃度依存的にヒ

トEGFR抗原に結合した。

[0263] 15) - 2 抗GPCR5D抗体の調製・結合活性評価

WO2018/147245号に記載の公知の抗GPCR5D抗体C3022(表4、重鎖配列(図57、配列番号32)、軽鎖配列(図58、配列番号33))を実施例1)-1と同様に調製し、ヒトGPCR5D抗原に対する結合活性をELISAで評価した。

[0264] 96ウェルMaxisorp plate(Black、Nunc社)にPBSで1 μ g/mLに希釈したNeutrAvidin(Thermo Fisher Scientific社)を50 μ Lずつ添加し、4℃で一晩固相化した。Tween-20(バイオ・ラッド社)を0.05(w/v)%含むPBS(ELISAバッファー)で洗浄後、Blocker Casein(Thermo Fisher Scientific社)でブロッキングした。ELISAバッファーで洗浄後、PBSで1 μ g/mLに希釈したビオチン化ヒトGPCR5Dアミノ末端ペプチド(MYKDCIESTGDYFLLCDAEGPWGIIIE-K(Biotin)-NH₂(ペプチド研究所))を50 μ Lずつ添加して30分室温で振とうした。ELISAバッファーで洗浄後、MMPバッファーで調製した抗体を50 μ Lずつ添加して30分室温で振とうした。ELISAバッファーで洗浄後、ELISAバッファーで2500倍に希釈したHorseradish peroxidase(HRP)標識抗ヒトIgG抗体(Jackson Immuno Research Laboratories社)を50 μ L添加し、30分室温で振とうした。ELISAバッファーで洗浄後、Super Signal Pico ELISA Chemiluminescent substrate(Thermo Fisher Scientific社)を添加し、10分後の化学発光をプレートリーダーで測定した。図16(B)に示すように、C3022は濃度依存的にヒトGPCR5D抗原に結合した。

[0265]

[表4]

抗EGFR抗体と抗GPCR5D抗体のアミノ酸配列情報

マスク抗体名	重鎖配列	軽鎖配列
Cetuximab	Cetuximab (配列番号30)	Cetuximab (配列番号31)
C3022	C3022 (配列番号32)	C3022 (配列番号33)
MCE-2105	Cetuximab (配列番号30)	MCE-2105 (配列番号34)
MC3-9003	MC3-9003 (配列番号35)	C3022 (配列番号33)

[0266] (実施例16) 抗EGFR抗体Cetuximabおよび抗GPCR5D抗体C3022に対するミモトープペプチドの濃縮

16) -1 Cetuximabに対するミモトープペプチドの濃縮

完全ランダムな15アミノ酸から構成されるリボソームディスプレイ用のペプチドライブラリー (Linear 15mer lib) を用いて、Cetuximabへ結合可能なペプチドを濃縮した。最初に、Dynabeads Protein A (Thermo Fisher Scientific社) および、ヒト血清由来IgG (Sigma-Aldrich社) を固相化したDynabeads Protein A (Thermo Fisher Scientific社) に対してRDを添加し、Protein Aやヒト血清由来IgGと反応させた。結合しなかったRDをマグネットスタンド (DynaMag-2、Thermo Fisher Scientific社) を用いて回収後、Cetuximabを結合させたDynabeads Protein Aと反応させた。マグネットスタンドを用いた洗浄操作によりCetuximabに結合しなかったRDを除去し、Cetuximabに結合したRDからmRNAを精製した。その後、RT-PCRおよびインビトロ翻訳によりRDを再度調製した。このパニング操作を4回実施した。

[0267] パニング4ラウンド後のmRNAをインビトロ翻訳しRDを調製後、Ce

t u x i m a b またはヒト血清由来 I g G が固相化された D y n a b e a d s P r o t e i n A とそれぞれ反応させた（インプット量： 6×10^{11} ）。マグネットスタンドを用いた洗浄操作により結合しなかった R D を除去後、結合した R D から m R N A を回収し、R T - q P C R により、回収量（アウトプット）を定量評価した。図 17（A）に示すように、C e t u x i m a b を固相した条件では、ヒト血清 I g G を固相した条件と比較して 276 倍多く m R N A が回収された。この結果から、C e t u x i m a b に特異的に結合するペプチドの濃縮が示された。

[0268] 16) -2 抗 G P R C 5 D 抗体 C 3 0 2 2 に対するミモトープペプチドの濃縮

完全ランダムな 15 アミノ酸から構成されるリボソームディスプレイ用のペプチドライブラリー（L i n e a r 15 m e r l i b）を用いて、C 3 0 2 2 へ結合可能なペプチドを濃縮した。最初に、D y n a b e a d s P r o t e i n A（T h e r m o F i s h e r S c i e n t i f i c 社）および、ヒト血清由来 I g G（S i g m a - A l d r i c h 社）を固相化した D y n a b e a d s P r o t e i n A（T h e r m o F i s h e r S c i e n t i f i c 社）に対して R D を添加し、P r o t e i n A やヒト血清由来 I g G と反応させた。結合しなかった R D をマグネットスタンド（D y n a M a g - 2、T h e r m o F i s h e r S c i e n t i f i c 社）を用いて回収後、C 3 0 2 2 を結合させた D y n a b e a d s P r o t e i n A と反応させた。マグネットスタンドを用いた洗浄操作により C 3 0 2 2 に結合しなかった R D を除去し、C 3 0 2 2 に結合した R D から m R N A を精製した。その後、R T - P C R およびインビトロ翻訳により R D を再度調製した。このパニング操作を 3 回実施した。

[0269] パニング 3 ラウンド後の m R N A をインビトロ翻訳し R D を調製後、C 3 0 2 2 またはヒト血清由来 I g G が固相化された D y n a b e a d s P r o t e i n A とそれぞれ反応させた（インプット量： 6×10^{11} ）。マグネットスタンドを用いた洗浄操作により結合しなかった R D を除去後、結合

したRDからmRNAを回収し、RT-qPCRにより、回収量（アウトプット）を定量評価した。図17（B）に示すように、C3022を固相した条件では、ヒト血清IgGを固相した条件と比較して503倍多くmRNAが回収された。この結果から、C3022に特異的に結合するペプチドの濃縮が示された。

[0270] （実施例17）uPA基質とCAPN基質を搭載した切断リンカーの適用汎用性

実施例3と同様の方法で抗GPCR5D抗体の結合を阻害可能なミモトープペプチドを選抜した。抗EGFR抗体Cetuximabに関しては、scFvの状態ではなくIgGの状態でミモトープを選抜した。実施例3と同様に、ランダムペプチド部分をコードするDNAフラグメントを制限酵素消化後に精製し、分泌シグナル配列、DNAフラグメント、MMP切断リンカー（配列番号64：図75）、Cetuximab（重鎖または軽鎖）の順で翻訳されるように、DNAフラグメントを哺乳動物細胞発現用ベクターに挿入した。ペプチドおよびMMP切断リンカーが重鎖または軽鎖のN末端に融合したCetuximabはExp1293F細胞で発現させ、実施例3と同様の方法でCetuximabの結合を阻害可能なミモトープペプチドを選抜した。

[0271] uPA基質とCAPN基質を含む切断リンカーが汎用的にマスク抗体に適用できることを確認するために、スクリーニングより同定したミモトープを搭載した抗EGFRマスク抗体MCE-2105（表4、図59、配列番号34）および、抗GPCR5Dマスク抗体MC3-9003（表4、図60、配列番号35）を設計した。以下に記載する部分を除き、実施例1）-1と同様に調製し、実施例15と同様に、ELISAで抗原への結合を評価した。MMPバッファーで抗体を2000nMに希釈後、200nMのuPAまたはCAPN1を添加し、37℃で反応後、MMPバッファーで濃度調整しヒトEGFR抗原またはヒトGPCR5D抗原の固定されたウェルに添加した。

[0272] MCE-2105は酵素非添加条件と比較しuPAおよびCAPN1添加条件で結合活性が向上した(図18(A))。同様に、MC3-9003も酵素非添加条件と比較しuPAおよびCAPN1添加条件で結合活性が向上した(図18(B))。これらの結果から、uPA基質とCAPN1基質を含む切断リンカーが汎用的にマスク抗体に適用できることが示された。

[0273] (実施例18)抗CD98マスク抗体-薬物コンジュゲートの*in vivo* 薬効試験

抗体-薬物コンジュゲートの抗腫瘍効果は、CD98陽性ヒト腫瘍細胞株の細胞を免疫不全マウスに移植した動物モデルを用いて評価した。4-5週齢のBALB/cヌードマウス(CAnN.Cg-Foxn1[nu]/Cr1Cr1j[Foxn1nu/Foxn1nu]、日本チャールス・リバー)を実験使用前にSPF条件化で3日間以上馴化した。マウスには滅菌した固形飼料(FR-2, Funabashi Farms Co., Ltd)を給餌し、滅菌した水道水(5-15ppm次亜塩素酸ナトリウム溶液を添加して調製)を与えた。移植した腫瘍の長径及び短径を電子式デジタルノギス(CD-15CX, Mitutoyo Corp.)で1週間に2回測定し、以下に示す計算式により腫瘍体積を算出した。

$$\text{腫瘍体積 (mm}^3\text{)} = 1/2 \times \text{長径 (mm)} \times [\text{短径 (mm)}]^2$$

[0274] 抗体-薬物コンジュゲートは全てABSバッファー(10mM-Acetate Buffer, 5(w/v)% Sorbitol, pH5.5)(NACALAI)で希釈し、10mL/kgの液量を尾静脈内投与した。また、コントロール群(Vehicle群)としてABSバッファーを同様に投与した。1群あたり6匹のマウスを実験に用いた。

[0275] 18)-1 抗腫瘍効果(1)

CD98陽性肺扁平上皮癌細胞株EBC-1(JCRB)を生理食塩水/50%Matrigelに懸濁、 1×10^6 cellsを雌ヌードマウスの右側腹部に皮下移植し(Day0)、Day10に無作為に群分けを実施した。群分け実施日に、実施例7で作製した抗体-薬物コンジュゲート4種(ク

クローン名は、MhM1018-M1-DXd-ADC、MhM1019-M1-DXd-ADC、MhM1020-M1-DXd-ADC、MhM1021-M1-DXd-ADC)を3mg/kgの用量で尾静脈内投与した。結果を図19(A)に示す。横軸は日数、縦軸は腫瘍体積、誤差範囲はSE値を示す。

[0276] uPA基質とCAPN基質の両方を搭載したMhM1021-M1-DXd-ADCはuPA基質のみを搭載したMhM1019-M1-DXd-ADC及びCAPN基質のみを搭載したMhM1020-M1-DXd-ADCよりも強い抗腫瘍効果を発揮した。

[0277] 18) - 2 抗腫瘍効果(2)

同様にEBC-1を生理食塩水/50%Matrigelに懸濁、 1×10^6 cellsを雌ヌードマウスの右側腹部に皮下移植し(Day 0)、Day 9に無作為に群分けを実施した。群分け実施日に、実施例7で作製した抗体-薬物コンジュゲート4種(クローン名は、MhM1018-M1-DXd-ADC、MhM1020-M1-DXd-ADC、MhM1022-M1-DXd-ADC、MhM1023-M1-DXd-ADC)を1mg/kgの用量で尾静脈内投与した結果を図19(B)に示す。

[0278] MMP9基質とCAPN基質の両方を搭載したMhM1023-M1-DXd-ADCはMMP9基質のみを搭載したMhM1022-M1-DXd-ADC及びCAPN基質のみを搭載したMhM1020-M1-DXd-ADCよりも強い抗腫瘍効果を発揮した。

[0279] (実施例19) 細胞内CAPNによる抗TROP2マスク抗体の活性化

19) - 1 セルライセートの調製

ヒト頭頸部癌株FaDu(ATCC)を、10%のウシ胎児血清(Hyclone)を含むE-MEM medium(Wako:以下、E-MEM培地)で培養した。培養したFaDuをトリプシン処理で回収し、PBSで洗浄後、 1.0×10^7 細胞あたり1mLのLysis Buffer(25mM Tris-HCl (pH 7.5), 1mM EDTA)で懸濁

した。超音波破碎を行った後、13000 rpm、4℃で15分間遠心した。遠心後の上清を回収し、タンパク質濃度を測定するとともに、上清に終濃度が1 mMとなるようにDTTを添加した。DTT添加済みの上清は使用時まで-80℃で保存し、細胞内CAPNを含むセルライセートとして使用した。

[0280] 19) - 2 セルライセートと反応させた抗TROP2マスク抗体の結合活性

CAPNの活性化に必要な塩化カルシウム添加条件、および塩化カルシウム非添加条件のセルライセートとCAPN基質を搭載した抗TROP2マスク抗体を反応させ、ヒトTROP2抗原に対する結合活性をELISAで評価した。セルライセート中のCAPNによるマスク抗体活性化を確認する目的で、CAPN特異的阻害剤PD150606 (Proc Natl Acad Sci USA, ; 93 (13) : 6687-6692 (1996))を用いた阻害実験も行った。セルライセートはタンパク質濃度が終濃度0.01 μg/mLとなるように調整し、塩化カルシウム添加条件では終濃度2 mMとなるように塩化カルシウムを添加して使用した。抗体は終濃度20 nMとなるようにMilliQで希釈して添加した。阻害実験では塩化カルシウム添加セルライセートにPD150606を終濃度100 μMとなるように加えた。反応は96ウェルV底plate (Greiner社)内で75 μLの反応系で行い、37℃で1時間反応させた。比較対照には、セルライセートの代わりにLysis Bufferを用いて反応を行った。

[0281] 抗体の結合活性は実施例1) - 1と同様にELISAで評価した。図20 (A)に示すように、uPA基質とCAPN基質の両方を搭載した抗TROP2マスク抗体MHT3203は塩化カルシウムを添加したセルライセートと反応させることで、ヒトTROP2抗原への結合活性が上昇した。一方で、uPA基質のみを搭載したMHT1903 (表5、図62、配列番号42)では結合活性の上昇はみられなかった。また、図20 (B)に示すように、塩化カルシウムを添加したセルライセートによるMHT3203のヒトT

ROP2抗原への結合活性の上昇は、CAPN阻害剤PD150606によって阻害された。これらの結果から、CAPN基質を搭載した抗TROP2マスク抗体MHT3203は細胞内のCAPNによって活性化されることが示された。

[0282] (実施例20) 2種類の酵素による抗TROP2マスク抗体の活性化

uPA基質とCAPN基質の両方を搭載した抗TROP2マスク抗体MHT3202を用いて、マスク抗体と反応させる酵素の種類と、活性化したマスク抗体の結合活性の関係を解析した。抗体をMMPバッファーで1000nMに調製し、20nMのuPAと100nMのCAPN1をそれぞれ単独または同時に添加した。37℃で30分反応させた後に、実施例1) -1と同様にELISAでヒトTROP2抗原への結合を評価した。結合活性は3回評価し、結合活性の平均値とSD値を算出後、t検定(有意水準1%)により有意差を評価した。

[0283] 図21に示すように、uPAまたはCAPN1を単独で加えた条件と比較して、両方の酵素を同時に加えた条件では、MHT3202の結合活性がさらに向上した($p < 0.01$)。この結果から、細胞外プロテアーゼと細胞内プロテアーゼの2種の酵素と反応させる場合の方が、それぞれ単独のプロテアーゼと反応させる場合よりマスク抗体の結合活性を向上できることが示された。同様に、細胞外プロテアーゼと細胞内プロテアーゼの2種の酵素で活性化可能なマスク抗体は、それぞれ単独のプロテアーゼで活性化可能なマスク抗体よりも腫瘍環境中での結合活性が強い可能性が示唆された。

[0284] (実施例21) 抗TROP2マスク抗体を利用したuPA基質とCAPN基質の配置検討

21) -1 uPAとCAPN1によるマスク抗体の活性化

uPA基質とCAPN基質の両方を搭載した抗TROP2マスク抗体MHT3203および、切断リンカー中のuPA基質とCAPN基質の配置を入れ替えたMHT3219(表5、図63、配列番号43)を実施例1-1)と同様に調製し、uPAおよびCAPN1によるマスク抗体の活性化を実施

例6と同様にELISAで評価した。

MHT3203はuPAとCAPN1でそれぞれ活性化され（図22（A））、MHT3219もMHT3203と同様にuPAとCAPN1で活性化された（図22（B））。

[0285] [表5]

抗TROP2マスク抗体とアミノ酸配列情報

マスク抗体名	重鎖配列	軽鎖配列
MHT1903	MHT1903 (配列番号42)	HT1-11 (配列番号2)
MHT3219	MHT3219 (配列番号43)	HT1-11 (配列番号2)
MHT5082	MHT5082 (配列番号54)	HT1-11 (配列番号2)
MHT5084	MHT5084 (配列番号55)	HT1-11 (配列番号2)
MHT5085	MHT5085 (配列番号56)	HT1-11 (配列番号2)
MHT5086	MHT5086 (配列番号57)	HT1-11 (配列番号2)
MHT5090	MHT5090 (配列番号58)	HT1-11 (配列番号2)
MHT5091	MHT5091 (配列番号59)	HT1-11 (配列番号2)
MHT5092	MHT5092 (配列番号60)	HT1-11 (配列番号2)
MHT5093	MHT5093 (配列番号61)	HT1-11 (配列番号2)
MHT5094	MHT5094 (配列番号62)	HT1-11 (配列番号2)
MHT5095	MHT5095 (配列番号63)	HT1-11 (配列番号2)

[0286] 21) - 2 抗TROP2マスク抗体-薬物コンジュゲートの抗腫瘍効果（1）

抗体-薬物コンジュゲートの抗腫瘍効果評価は実施例8と同様に実施した

。TROP2陽性ヒト肺粘液性類表皮癌細胞株NCI-H292(ATCC)を生理食塩水に懸濁、 5×10^6 cellsを雌ヌードマウスの右側腹部に皮下移植し(Day 0)、Day 12に無作為に群分けを実施した。群分け実施日に、実施例7で作製した抗体-薬物コンジュゲート2種(クローン名は、MHT3219-PBD-ADC、MHT3203-PBD-ADC)を 0.4 mg/kg の用量で尾静脈内投与した。結果を図23(A)に示す。横軸は日数、縦軸は腫瘍体積、誤差範囲はSE値を示す。

uPA基質とCAPN基質の両方を搭載したMHT3203-PBD-ADCは基質の配置を入れ替えたMHT3219-PBD-ADCよりも強い抗腫瘍効果を発揮した。よって、uPA基質がCAPN基質よりアミノ末端側に配置されてなる切断リンカーは、その逆に配置されてなる切断リンカーよりも好適であることが示された。

[0287] 21)-3 抗TROP2抗体-薬物コンジュゲートの抗腫瘍効果(2)

TROP2陽性ヒト咽頭癌細胞株Fadu(ATCC)を生理食塩水に懸濁、 3×10^6 cellsを雌ヌードマウスの右側腹部に皮下移植し(Day 0)、Day 12に無作為に群分けを実施した。群分け実施日に、実施例7で作製した抗体-薬物コンジュゲート2種(クローン名は、MHT3219-PBD-ADC、MHT3203-PBD-ADC)を 0.4 mg/kg の用量で尾静脈内投与した。結果を図23(B)に示す。横軸は日数、縦軸は腫瘍体積、誤差範囲はSE値を示す。

uPA基質とCAPN基質の両方を搭載したMHT3203-PBD-ADCは基質の配置を入れ替えたMHT3219-PBD-ADCよりも強い抗腫瘍効果を発揮した。

[0288] (実施例22)CAPN基質配列の検討

uPA基質とCAPN基質の両方を搭載した抗TROP2マスク抗体MHT5082(表5、図65、配列番号54)、MHT5084(表5、図66、配列番号55)、MHT5085(表5、図67、配列番号56)、MHT5086(表5、図68、配列番号57)、MHT5090(表5、図

69、配列番号58)、MHT5091(表5、図70、配列番号59)、MHT5092(表5、図71、配列番号60)、MHT5093(表5、図72、配列番号61)、MHT5094(表5、図73、配列番号62)、MHT5095(表5、図74、配列番号63)、MHT3203および、uPA基質のみを搭載したMHT1903を実施例1-1)と同様に調製し、uPA、CAPN1、CAPN2(アクセション番号:P17655)による活性化を以下に記載する部分を除き、実施例5)-1と同様にELISAで評価した。MMPバッファーで抗体を20nMに希釈し、50nMのuPAまたは、100nMのCAPN1または、100nMのCAPN2をそれぞれ添加し、37℃で反応後、ヒトTROP2抗原の固定されたウェルに添加した。uPAと反応させた際の結合活性を100%として各クローンのプロテアーゼ感受性を比較した。

[0289] 図24に示すように、MHT1903の結合活性はuPA添加条件で向上したが、CAPN1またはCAPN2添加条件では向上しなかった。その一方で、uPA基質とCAPN基質の両方を搭載した抗TROP2マスク抗体の結合活性はuPA添加条件およびCAPN(CAPN1またはCAPN2)添加条件で向上した。

[0290] (実施例23)異なるCAPN基質配列を搭載したPBD-ADCのin vivo薬効

23)-1 抗TROP2抗体-薬物コンジュゲートの抗腫瘍効果(1)

抗体-薬物コンジュゲートの抗腫瘍効果評価は実施例8と同様に実施した。TROP2陽性ヒト肺粘液性類表皮癌細胞株NCI-H292(ATCC)を生理食塩水に懸濁、 5×10^6 cellsを雌ヌードマウスの右側腹部に皮下移植し(Day 0)、Day 10に無作為に群分けを実施した。群分け実施日に、実施例7で作製した抗体-薬物コンジュゲート7種(クローン名は、MHT3203-PBD-ADC、MHT5082-PBD-ADC、MHT5085-PBD-ADC、MHT5086-PBD-ADC、MHT5093-PBD-ADC、MHT5094-PBD-ADC、MHT5

095-PBD-ADC)を0.4mg/kgの用量で尾静脈内投与した。結果を図25(A)に示す。横軸は日数、縦軸は腫瘍体積、誤差範囲はSE値を示す。

uPA基質とCAPN基質の両方を搭載したMHT3203-PBD-ADCと同様にMHT5082-PBD-ADC、MHT5085-PBD-ADC、MHT5086-PBD-ADC、MHT5093-PBD-ADC、MHT5094-PBD-ADC、MHT5095-PBD-ADCも強い抗腫瘍効果を発揮した。

[0291] 23)-2 抗TROP2抗体-薬物コンジュゲートの抗腫瘍効果(2)

TROP2陽性ヒト咽頭癌細胞株Fadu(ATCC)を生理食塩水に懸濁、 3×10^6 cellsを雌ヌードマウスの右側腹部に皮下移植し(Day 0)、Day 13に無作為に群分けを実施した。群分け実施日に、実施例7で作製した抗体-薬物コンジュゲート7種(クローン名は、MHT3203-PBD-ADC、MHT5082-PBD-ADC、MHT5085-PBD-ADC、MHT5086-PBD-ADC、MHT5093-PBD-ADC、MHT5094-PBD-ADC、MHT5095-PBD-ADC)を0.4mg/kgの用量で尾静脈内投与した。結果を図25(B)に示す。横軸は日数、縦軸は腫瘍体積、誤差範囲はSE値を示す。

[0292] uPA基質とCAPN基質の両方を搭載したMHT3203-PBD-ADCと同様にMHT5082-PBD-ADC、MHT5085-PBD-ADC、MHT5086-PBD-ADC、MHT5093-PBD-ADC、MHT5094-PBD-ADC、MHT5095-PBD-ADCも強い抗腫瘍効果を発揮した。

産業上の利用可能性

[0293] 本発明の改良型マスク抗体は各種がんの治療に使用することができる。

配列表フリーテキスト

[0294] 配列番号1: 抗TROP2抗体の重鎖アミノ酸配列(図26)

配列番号2: 抗TROP2抗体の軽鎖アミノ酸配列(図27)

- 配列番号3 : MHT1001のアミノ酸配列 (図28)
- 配列番号4 : MHT1002のアミノ酸配列 (図29)
- 配列番号5 : HT1-11-scFv-HLのアミノ酸配列 (図30)
- 配列番号6 : HT1-11-scFv-LHのアミノ酸配列 (図31)
- 配列番号7 : MHT1007の重鎖アミノ酸配列 (図32)
- 配列番号8 : MHT1008の重鎖アミノ酸配列 (図33)
- 配列番号9 : MHT1009の重鎖アミノ酸配列 (図34)
- 配列番号10 : MHT3002の重鎖アミノ酸配列 (図35)
- 配列番号11 : CAPN1のアミノ酸配列 (図36)
- 配列番号12 : 新規CAPN基質のアミノ酸配列 (図37)
- 配列番号13 : MHT3201の重鎖アミノ酸配列 (図38)
- 配列番号14 : MHT3202の重鎖アミノ酸配列 (図39)
- 配列番号15 : MHT1713の重鎖アミノ酸配列 (図40)
- 配列番号16 : HMT3423の重鎖アミノ酸配列 (図41)
- 配列番号17 : MHT3203の重鎖アミノ酸配列 (図42)
- 配列番号18 : 抗CD98抗体hM23H1L1の重鎖アミノ酸配列 (図43)
- 配列番号19 : 抗CD98抗体hM23H1L1の軽鎖アミノ酸配列 (図44)
- 配列番号20 : MhM1008の軽鎖アミノ酸配列 (図45)
- 配列番号21 : MhM1013の軽鎖アミノ酸配列 (図46)
- 配列番号22 : hM23-M1の重鎖アミノ酸配列 (図47)
- 配列番号23 : hM23-M1の軽鎖アミノ酸配列 (図48)
- 配列番号24 : MhM1018の軽鎖アミノ酸配列 (図49)
- 配列番号25 : MhM1019の軽鎖アミノ酸配列 (図50)
- 配列番号26 : MhM1020の軽鎖アミノ酸配列 (図51)
- 配列番号27 : MhM1021の軽鎖アミノ酸配列 (図52)
- 配列番号28 : MhM1022の軽鎖アミノ酸配列 (図53)

配列番号29 : M h M 1 0 2 3 の軽鎖アミノ酸配列 (図54)

配列番号30 : 抗EGFR抗体cetuximabの重鎖アミノ酸配列 (図55)

配列番号31 : 抗EGFR抗体cetuximabの軽鎖アミノ酸配列 (図56)

配列番号32 : 抗GPCR5D抗体C3022の重鎖アミノ酸配列 (図57)

配列番号33 : 抗GPCR5D抗体C3022の軽鎖アミノ酸配列 (図58)

配列番号34 : M C E - 2 1 0 5 の軽鎖アミノ酸配列 (図59)

配列番号35 : M C 3 - 9 0 0 3 の重鎖アミノ酸配列 (図60)

配列番号36 : ヒトuPAが認識し、その基質となるアミノ酸配列 (図61)

配列番号37 : ヒトuPAが認識し、その基質となるアミノ酸配列 (図61)

配列番号38 : ヒトuPAが認識し、その基質となるアミノ酸配列 (図61)

配列番号39 : ヒトMMP1が認識し、その基質となるアミノ酸配列 (図61)

配列番号40 : ヒトMMP1が認識し、その基質となるアミノ酸配列 (図61)

配列番号41 : ヒトMMP9が認識し、その基質となるアミノ酸配列 (図61)

配列番号42 : M H T 1 9 0 3 の重鎖アミノ酸配列 (図62)

配列番号43 : M H T 3 2 1 9 の重鎖アミノ酸配列 (図63)

配列番号44 : 新規CAPN基質のアミノ酸配列 (図64)

配列番号45 : 新規CAPN基質のアミノ酸配列 (図64)

配列番号46 : 新規CAPN基質のアミノ酸配列 (図64)

配列番号47：新規CAPN基質のアミノ酸配列（図64）
配列番号48：新規CAPN基質のアミノ酸配列（図64）
配列番号49：新規CAPN基質のアミノ酸配列（図64）
配列番号50：新規CAPN基質のアミノ酸配列（図64）
配列番号51：新規CAPN基質のアミノ酸配列（図64）
配列番号52：新規CAPN基質のアミノ酸配列（図64）
配列番号53：新規CAPN基質のアミノ酸配列（図64）
配列番号54：MHT5082の重鎖アミノ酸配列（図65）
配列番号55：MHT5084の重鎖アミノ酸配列（図66）
配列番号56：MHT5085の重鎖アミノ酸配列（図67）
配列番号57：MHT5086の重鎖アミノ酸配列（図68）
配列番号58：MHT5090の重鎖アミノ酸配列（図69）
配列番号59：MHT5091の重鎖アミノ酸配列（図70）
配列番号60：MHT5092の重鎖アミノ酸配列（図71）
配列番号61：MHT5093の重鎖アミノ酸配列（図72）
配列番号62：MHT5094の重鎖アミノ酸配列（図73）
配列番号63：MHT5095の重鎖アミノ酸配列（図74）
配列番号64：MMPリンカーのアミノ酸配列（図75）

本明細書で引用した全ての刊行物、特許及び特許出願はそのまま引用により本明細書に組み入れられるものとする。

請求の範囲

- [請求項1] 下記〔a〕部分、〔b〕部分及び〔c〕部分を含んでなり標的抗原に結合する分子：
- 〔a〕部分 標的抗原に結合する部分；
- 〔b〕部分 〔a〕部分に含まれる標的抗原結合部位を認識する第1ペプチド；
- 〔c〕部分 細胞質内に局在するプロテアーゼにより切断されるアミノ酸配列を含む第2ペプチド。
- [請求項2] 第2ペプチドが細胞質内に局在するプロテアーゼにより切断された後には、切断前と比較して、標的抗原に対しより高い結合親和性を有することを特徴とする、請求項1記載の分子。
- [請求項3] 〔c〕部分の第2ペプチドが、さらに、細胞外プロテアーゼにより切断されるアミノ酸配列を含む、請求項1又は2に記載の分子。
- [請求項4] 第1ペプチド、第2ペプチド、標的抗原に結合する部分の順に連結してなる、請求項1～3のいずれか1つに記載の分子。
- [請求項5] 標的抗原に結合する部分が、第1ペプチド及び第2ペプチドには含まれないアミノ酸配列からなるポリペプチドである、請求項1～4のいずれか1つに記載の分子。
- [請求項6] ポリペプチドからなる、請求項1～5のいずれか1つに記載の分子。
- [請求項7] アミノ末端からカルボキシル末端に向かって、第1ペプチド、第2ペプチド、標的抗原に結合する部分の順、又は、標的抗原に結合する部分、第2ペプチド、第1ペプチドの順に結合してなる、請求項6記載の分子。
- [請求項8] 第1ペプチド、第2ペプチド及び標的抗原に結合する部分からなる群より選択されるいずれか1つが、他の2つのうち1つ又は両方とリンカーを介して結合している、請求項1～7のいずれか1つに記載の分子。

- [請求項9] 該細胞質内に局在するプロテアーゼが、細胞死や細胞膜へのダメージにより、細胞外に漏出することを特徴とする、請求項1～8のいずれか1つに記載の分子。
- [請求項10] 該細胞質内に局在するプロテアーゼが、カルパイン、カスパーゼ及びトリペプチジルペプチダーゼから選択され、好適には、カルパインがカルパイン1又はカルパイン2であり、カスパーゼが、カスパーゼ1、カスパーゼ8、カスパーゼ3又はカスパーゼ7であり、トリペプチジルペプチダーゼがトリペプチジルペプチダーゼ1又はトリペプチジルペプチダーゼ2である、請求項1～9のいずれか1つに記載の分子。
- [請求項11] 該細胞質内に局在するプロテアーゼが、カルシウム依存性又はカルシウム要求性である、請求項1～10のいずれか1つに記載の分子。
- [請求項12] 該細胞質内に局在するプロテアーゼが、カルパイン1又はカルパイン2である、請求項1～11のいずれか1つに記載の分子。
- [請求項13] 該細胞外プロテアーゼが、正常な組織に比して、異常な組織においてより高発現しているか、より多量に存在するか又はより触媒活性が高いことを特徴とする、請求項3～12のいずれか1つに記載の分子。
- [請求項14] 該異常な組織が、腫瘍組織及び／又は間質組織である、請求項13に記載の分子。
- [請求項15] 該細胞外プロテアーゼが、マトリックスメタロプロテアーゼ、ウロキナーゼ型プラスミノゲンアクチベータ、マトリプターゼ、レグマイン及びカテプシンよりなる群から選択され、マトリックスメタロプロテアーゼは好適にはMMP1、MMP2、MMP3、MMP7、MMP9、MMP12及びMMP14の1つ又は2つ以上であり、カテプシンは好適にはカテプシンB、カテプシンD、カテプシンS及びカテプシンLの1つ又は2つ以上である、請求項3～14のいずれか1つに記載の分子。

- [請求項16] 第2ペプチドにおいて、アミノ末端からカルボキシル末端に向かって、該細胞外プロテアーゼにより切断されるアミノ酸配列、該細胞質内に局在するプロテアーゼにより切断されるアミノ酸配列の順、又は、該細胞質内に局在するプロテアーゼにより切断されるアミノ酸配列、該細胞外プロテアーゼにより切断されるアミノ酸配列の順に配置されてなり、好適には、該細胞外プロテアーゼにより切断されるアミノ酸配列、該細胞質内に局在するプロテアーゼにより切断されるアミノ酸配列の順に配置されてなる、請求項1～15のいずれか1つに記載の分子。
- [請求項17] 該細胞質内に局在するプロテアーゼにより切断されるアミノ酸配列が、配列番号12、37～46のいずれか1つ又は2つ以上を含む、請求項1～16のいずれか1つに記載の分子。
- [請求項18] 標的抗原が腫瘍抗原である、請求項1～17のいずれか1つに記載の分子。
- [請求項19] 標的抗原に結合する部分に、他の部分である[d]部分が結合してなり、[d]部分が第1ペプチド及び第2ペプチドを含まない、請求項1～18のいずれか1つに記載の分子。
- [請求項20] [d]部分が、標的抗原結合部分ではない抗体若しくはその抗原結合断片、第1ペプチド及び第2ペプチドに含まれないアミノ酸配列を含むペプチド、サイトカイン、毒素、放射性同位元素、標識分子、光感受性物質、免疫賦活化物質、抗腫瘍性化合物、薬物、ペイロード、並びにポリマーからなる群より選択される1つ又は2つ以上である、請求項19記載の分子。
- [請求項21] 抗腫瘍性化合物が、カンプトテシン誘導体又はもしくはpyrrol benzodiazepine誘導体であり、好適には、カンプトテシン誘導体がN-[(1S, 9S)-9-ethyl-5-fluoro-9-hydroxy-4-methyl-10, 13-dioxo-2, 3, 9, 10, 13, 15-hexahydro-1

H, 12H-benzo[de]pyrano[3', 4': 6, 7]indolizino[1, 2-b]quinolin-1-yl]-2-hydroxyacetamideである、請求項20記載の分子。

[請求項22] 免疫賦活化物質が環状ジヌクレオチド誘導体である請求項20記載の分子。

[請求項23] ポリペプチドからなるか、又は[d]部分及びポリペプチドからなる、請求項19～22のいずれか1つに記載の分子。

[請求項24] 下記工程(i)及び(ii)を含む、抗体又は抗体の抗原結合断片に含まれる相補性決定領域(CDR)に結合するペプチドを同定する方法：

(i) 芳香族性アミノ酸とProの繰返し配列を含むペプチドライブラリーを該CDRに接触させる工程；及び

(ii) 該CDRに結合するペプチドを回収する工程。

[請求項25] 芳香族性アミノ酸とProの繰返し配列がZPZPモチーフ[Zは、ヒスチジン(His)、フェニルアラニン(Phe)、チロシン(Tyr)、トリプトファン(Trp)のいずれかの芳香族アミノ酸を表し、Pはプロリンを表す]である、請求項24記載の方法。

[請求項26] 該ペプチドを組換え、化学合成又はペプチド合成により調製する工程をさらに含む、請求項24又は25に記載の方法。

[請求項27] 該CDRが請求項1記載の標的抗原結合部分に含まれ、第1ペプチドが請求項26に記載の方法により得られる、標的抗原に結合する分子。

[請求項28] 第1ペプチドに含まれるアミノ酸配列及び／又は第2ペプチドに含まれるアミノ酸配列を含んでなるペプチドを組換え、インビトロ翻訳、化学合成又はペプチド合成により調製する工程を含む、請求項1～23のいずれか1つに記載の分子の製造方法。

[請求項29] 請求項28記載の方法により得られる、標的抗原に結合する分子。

- [請求項30] 下記 (i i i) 記載の工程を含む、請求項 6、7 又は 2 3 記載の分子の製造方法：
- (i i i) 標的抗原結合部分に含まれるアミノ酸配列、並びに、任意で (o p t i o n a l l y)、第 1 ペプチドに含まれるアミノ酸配列、及び／又は、第 2 ペプチドに含まれるアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を含んでなるポリヌクレオチドを細胞に導入し、該細胞を培養し、該培養物から該標的抗原に結合するポリペプチドを回収する工程。
- [請求項31] 請求項 3 0 記載の方法により得られる、標的抗原に結合する分子。
- [請求項32] 請求項 1 ～ 2 3、2 7、2 9 及び 3 1 のいずれか 1 つに記載の分子、その塩又はそれらの水和物を含む、医薬組成物。
- [請求項33] 抗がん剤である、請求項 3 2 記載の医薬組成物。
- [請求項34] 芳香族性アミノ酸と P r o の繰返し配列を含むペプチドライブラリー。
- [請求項35] 芳香族性アミノ酸と P r o の繰返し配列が Z P Z P モチーフ [Z は、ヒスチジン (H i s)、フェニルアラニン (P h e)、チロシン (T y r)、トリプトファン (T r p) のいずれかの芳香族アミノ酸を表し、P はプロリンを表す] である、請求項 3 4 記載のペプチドライブラリー。