

明 細 書

発明の名称：環境応答性マスク抗体及びその利用

技術分野

[0001] 本発明は、特定の環境に置かれることにより活性化される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、二重特異性抗体によって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ジ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] 腫瘍微小環境の特徴としては、亢進したプロテアーゼ活性以外にも、細胞外pH（pHe）の酸性化が知られている。腫瘍組織の酸性化は、癌細胞の糖代謝系に依存した乳酸の蓄積が原因であると考えられており、細胞外へのプロトン放出には、 Na^+/H^+ exchanger (NHE)、モノカルボン酸トランスポーター、 H^+ -ATPaseなど各種トランスポーターが関与していることが報告されている。腫瘍組織のpHe低下は、分泌されたリソソームプロテアーゼの活性化に関与しており、癌細胞の転移や浸潤プロセスを助けている他、がん細胞の薬剤耐性や免疫逃避などにも影響を与えている（非特許文献5）。

[0005] 腫瘍微小環境のpHe低下を利用し、腫瘍組織特異性を向上させる抗体技術として、抗体のCDR領域に変異を導入し低pH環境で抗原への結合活性を向上させる手法や（特許文献5、非特許文献6）、pH依存的に抗体に結合するマスキングドメインをもつマスク抗体技術が知られている（特許文献6）。後者では、抗CTLA-4抗体に対して中性pH条件では結合するが、酸性pH条件では結合しないマスキングペプチドの取得例が報告されている。

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

特許文献5：国際公開WO2010/104821号

特許文献6：国際公開WO2018/218076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：Cancer Cell International. ; 13 (89) : 1-8 (2013) .

非特許文献6：Proc. Natl. Acad. Sci. ; 118 (9)
: 1-10 (2021) .

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、腫瘍環境のpHeが酸性化していることに着目し、マスク抗体のマスクペプチドと抗体を連結するリンカー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]部分を含んでなる、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 pH 7.5以下の範囲でpHが中性条件から酸性条件に変化することに応じて電荷が無電荷から正電荷に変化するアミノ酸を含むアミノ酸配列からなる第2ペプチド。

〔2〕 酸性条件下において、中性条件下と比較して、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〕 〔a〕部分、〔b〕部分及び〔c〕部分をそれぞれ1つ又は2つ以上含む、〔1〕又は〔2〕の分子。

〔4〕 〔a〕部分、〔b〕部分及び〔c〕部分をそれぞれ1つ又は2つ以上含む、〔a〕部分、〔b〕部分及び〔c〕部分のそれぞれの数が互いに同一である、〔1〕～〔3〕のいずれか1つの分子。

〔5〕 〔a〕部分、〔b〕部分及び〔c〕部分をそれぞれ2つずつ含む、〔1〕又は〔2〕の分子。

〔6〕 第2ペプチドが、pH 7.5以下の範囲でpHが中性条件から酸性条件に変化することに応じて電荷が無電荷から正電荷に変化するアミノ酸を4つ以上含む、且つ第2ペプチドのpI値が6.4を超えるアミノ酸配列からなる、〔1〕～〔5〕のいずれか1つの分子。

〔7〕 第2ペプチドが、pH 7.5以下の範囲でpHが中性条件から酸性条件に変化することに応じて電荷が無電荷から正電荷に変化するアミノ酸を4つ以上含む、且つ第2ペプチドのpI値が6.8以上であるアミノ酸配列からなる、〔1〕～〔6〕のいずれか1つの分子。

〔8〕 第2ペプチドが、pH 7.5以下の範囲でpHが中性条件から酸性条件に変化することに応じて電荷が無電荷から正電荷に変化するアミノ酸を4つ以上含む、且つ第2ペプチドのpI値が7.2以上であるアミノ酸配列からなる、〔1〕～〔7〕のいずれか1つの分子。

[9] 第2ペプチドが、pH 7.5以下の範囲でpHが中性条件から酸性条件に変化することに応じて電荷が無電荷から正電荷に変化するアミノ酸を4つ以上含み、且つ第2ペプチドのpI値が7.6以上であるアミノ酸配列からなる、[1] ~ [8] のいずれか1つの分子。

[1 0] 第2ペプチドが、pHが酸性条件において負電荷を有するアミノ酸を含まないアミノ酸配列からなる、[1] ~ [9] のいずれか1つの分子。

[1 1] 第2ペプチドが、アスパラギン酸及び／又はグルタミン酸を含まないアミノ酸配列からなる、[1] ~ [1 0] のいずれか1つの分子。

[1 2] 第2ペプチドが、以下の(1)及び(2)の構造を有するアミノ酸配列からなる、[1] ~ [1 1] のいずれか1つの分子：

(1) (a) 2つ以上の連続するpKaが7以下の塩基性官能基を側鎖に有するアミノ酸からなるアミノ酸配列、又は(b) (a)のアミノ酸配列の任意の位置(アミノ末端又はカルボキシル末端を含む)に1つのアルギニン若しくはリシンが挿入若しくは付加されたアミノ酸配列((a)のアミノ酸配列及び(b)のアミノ酸配列を塩基性アミノ酸クラスターという。)を1つ以上含み、且つ、

(2) 前記のpKaが7以下の塩基性官能基を側鎖に有するアミノ酸を計4つ以上含む。

[1 3] 第2ペプチドが、以下の(1)及び(2)の構造を有するアミノ酸配列からなる、[1] ~ [1 2] のいずれか1つの分子：

(1) 2つ以上の連続するpKaが7以下の塩基性官能基を側鎖に有するアミノ酸からなるアミノ酸配列の任意の位置(アミノ末端又はカルボキシル末端を含む)に1つのアルギニンが挿入若しくは付加されたアミノ酸配列を1つ以上含み、且つ、

(2) 前記のpKaが7以下の塩基性官能基を側鎖に有するアミノ酸を計4つ以上含む。

[1 4] 第2ペプチドが、以下の(1)及び(2)の構造を有するアミノ

酸配列からなる、[1]～[13]のいずれか1つの分子：

(1) 2つ以上の連続するpKaが7以下の塩基性官能基を側鎖に有するアミノ酸からなるアミノ酸配列の任意の位置（アミノ末端又はカルボキシル末端を含む）に1つのアルギニンが挿入若しくは付加されたアミノ酸配列を1つ含み、且つ、

(2) 前記のpKaが7以下の塩基性官能基を側鎖に有するアミノ酸を計4つ以上含む。

[15] 第2ペプチドが、以下の(1)及び(2)の構造を有するアミノ酸配列からなる、[1]～[14]のいずれか1つの分子：

(1) RHHHで表されるアミノ酸配列を1つ含み、且つ、

(2) 前記のpKaが7以下の塩基性官能基を側鎖に有するアミノ酸を計4つ以上含む。

[16] 第2ペプチドが、2つ以上の連続するpKaが7以下の塩基性官能基を側鎖に有するアミノ酸を1つ以上含み、且つ該pKaが7以下の塩基性官能基を側鎖に有するアミノ酸を計4つ以上含むアミノ酸配列からなる、[1]～[12]のいずれか1つの分子。

[17] 第2ペプチドが、pKaが7以下の塩基性官能基を側鎖に有するアミノ酸を1つ置きに有するアミノ酸配列を含むアミノ酸配列で表される構造からなる、[1]～[11]のいずれか1つの分子。

[18] 塩基性官能基のpKaが5.0～7.0である、[12]～[17]のいずれか1つの分子。

[19] 塩基性官能基のpKaが5.5～6.5である、[12]～[18]のいずれか1つの分子。

[20] pKaが7以下の塩基性官能基を側鎖に有するアミノ酸が天然アミノ酸である、[12]～[19]のいずれか1つの分子。

[21] pKaが7以下の塩基性官能基を側鎖に有するアミノ酸が非天然アミノ酸である、[12]～[19]のいずれか1つの分子。

[22] pKaが7以下の塩基性官能基を側鎖に有するアミノ酸がヒスチ

ジンである、[12]～[20]のいずれか1つの分子。

[23] 第2ペプチドが塩基性アミノ酸クラスターを1～4個含むアミノ酸配列からなる、[1]～[22]のいずれか1つの分子。

[24] 第2ペプチドが10～60個のアミノ酸からなる、[1]～[23]のいずれか1つの分子。

[25] 第2ペプチドが12～50個のアミノ酸からなる、[1]～[24]のいずれか1つの分子。

[26] 第2ペプチドが15～40個のアミノ酸からなる、[1]～[25]のいずれか1つの分子。

[27] 第2ペプチドが20～35個のアミノ酸からなる、[1]～[26]のいずれか1つの分子。

[28] 第2ペプチドが配列番号49乃至53、55、59乃至61、65、66、75乃至81（図54及び64）のいずれか一つで示されるアミノ酸配列を含む、[1]～[16]及び[18]～[27]のいずれか1つの分子。

[29] 第2ペプチドが配列番号54（図54）で示されるアミノ酸配列を含む、[17]～[27]のいずれか1つの分子。

[30] EC_{50} 比が3以上である[1]～[29]のいずれか1つの分子。

[31] EC_{50} 比が10以上である[1]～[30]のいずれか1つの分子。

[32] EC_{50} 比が30以上である[1]～[31]のいずれか1つの分子。

[33] 第2ペプチドが10個以下の pK_a が7以下の塩基性官能基を側鎖に有するアミノ酸を含むアミノ酸配列からなる、[1]～[32]のいずれか1つの分子。

[34] 第2ペプチドのアミノ酸配列に2つ以上の塩基性アミノ酸クラスターが含まれ、1つの塩基性アミノ酸クラスターが該アミノ酸配列のアミノ

末端又はカルボキシル末端に位置し、且つ他のいずれの塩基性アミノ酸クラスターも該アミノ酸配列のアミノ末端又はカルボキシル末端に位置しない、
[1] ~ [33] のいずれか1つの分子。

[35] 第2ペプチドのアミノ酸配列に2つ以上の塩基性アミノ酸クラスターが含まれ、1つの塩基性アミノ酸クラスターが該アミノ酸配列のアミノ末端に位置し、且つ他の1つの塩基性アミノ酸クラスターがカルボキシル末端に位置する、[1] ~ [33] のいずれか1つの分子。

[36] 第2ペプチドのアミノ酸配列に含まれるいずれの塩基性アミノ酸クラスターも、該アミノ酸配列のアミノ末端に位置せず且つカルボキシル末端に位置しない、[1] ~ [33] のいずれか1つの分子。

[37] 第2ペプチドのアミノ酸配列に細胞内及び／又は細胞外のプロテアーゼにより切断されるアミノ酸配列及び塩基性アミノ酸クラスターを含むアミノ酸配列を含み、該アミノ酸配列が、

(1) アミノ末端からカルボキシル末端に向かって、塩基性アミノ酸クラスターを含むアミノ酸配列、細胞内及び／又は細胞外のプロテアーゼにより切断されるアミノ酸配列の順に連結してなる、又は

(2) カルボキシル末端からアミノ末端に向かって、細胞内及び／又は細胞外のプロテアーゼにより切断されるアミノ酸配列、塩基性アミノ酸クラスターを含むアミノ酸配列の順に連結してなる、

[1] ~ [34] 又は [36] のいずれか1つの分子。

[38] 第2ペプチドのアミノ酸配列に含まれる pK_a が7以下の塩基性官能基を側鎖に有するアミノ酸数が、該アミノ酸配列に含まれる全アミノ酸数の5%以上、30%以下である、[12] ~ [37] のいずれか1つの分子。

[39] 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] ~ [38] のいずれか1つの分子。

[40] 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] ~ [39] の

いずれか1つの分子。

[41] ポリペプチドからなる、[1]～[40]のいずれか1つの分子。

[42] 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に結合してなる、[41]の分子。

[43] 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又はスペーサーを介して結合している、[1]～[42]のいずれか1つの分子。

[44] 酸性条件がpH6.5以下である、[1]～[43]のいずれか1つの分子。

[45] 酸性条件がpH6.0以下である、[1]～[44]のいずれか1つの分子。

[46] 酸性条件がpH5.5以下である、[1]～[45]のいずれか1つの分子。

[47] 標的抗原が腫瘍組織、エンドソーム又はリソソームに存在する抗原である、[1]～[46]のいずれか1つの分子。

[48] 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]～[47]のいずれか1つの分子。

[49] [d]部分が、標的抗原に結合する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、[48]の分子。

[50] 抗腫瘍性化合物が、カンプトテシン誘導体又はpyrrollobenzodiazepine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-hy

droxy-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、[49]の分子。

[51] 免疫賦活化物質が環状ジヌクレオチド誘導体である[49]の分子。

[52] 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、[48]～[51]のいずれか1つの分子。

[53] 第1ペプチドが、下記工程(i)～(iii)を含む方法により得られる、[1]～[52]のいずれか1つの分子：

(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[1]の標的抗原に結合する部分に接触させる工程；

(ii) 該標的抗原に結合する部分に結合するペプチドを回収する工程；及び

(iii) 得られたペプチドを組換え、化学合成又はペプチド合成により調製する工程。

[54] 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]～[52]のいずれか1つの分子の製造方法。

[55] [54]の方法により得られる、標的抗原に結合する分子。

[56] 下記(iv)記載の工程を含む、[41]、[42]又は[52]のいずれか1つの分子の製造方法。

(iv) 標的抗原に結合する部分に含まれるアミノ酸配列、並びに、任意で(optionally)、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。

[57] [56]の方法により得られる、標的抗原に結合する分子。

[58] [1]～[53]、[55]及び[57]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。

[59] 抗がん剤である、[58]の医薬組成物。

[60] 標的抗原に結合する分子の中性pH条件における抗原結合活性を酸性pH条件における抗原結合活性より弱くすることにより、第2ペプチドがpH7.5以下の範囲でpHの中性条件から酸性条件に変化することに応じて電荷が無電荷から正電荷に変化するアミノ酸を含まない分子と比較して、被投与者に対する標的抗原に結合する分子の毒性が低減されている[58]又は[59]の医薬組成物。

[61] 標的抗原に結合する分子の中性pH条件における抗原結合活性を酸性pH条件における抗原結合活性より弱くすることにより、第2ペプチドがpH7.5以下の範囲でpHの中性条件から酸性条件に変化することに応じて電荷が無電荷から正電荷に変化するアミノ酸を含まない分子と比較して、被投与者に対する標的抗原に結合する分子の血中濃度が向上されている[58]又は[59]の医薬組成物。

[62] [1]～[53]、[55]及び[57]のいずれか1つの分子又は[58]の医薬組成物を含む検査薬、診断薬又は試薬。

[63] [41]又は[52]の分子のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド。

[64] [63]のポリヌクレオチドを含むベクター。

[65] [63]のポリヌクレオチド若しくは[64]のベクターを含むか又は[41]又は[52]の分子を産生する細胞。

[0011] さらに、本発明は以下の発明も包含する。

[i] [1]の第2ペプチドのアミノ酸配列を含む、pH応答性を有するペプチドリンカー。

[ii] 配列番号49乃至55、59乃至61、65、66、75乃至8

1 (図54及び64)のいずれか一つで示されるアミノ酸配列を含む、[i]のペプチドリンカー。

[i i i] [i]又は[i i]のペプチドリンカーのアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド。

[i v] [i i i]のポリヌクレオチドを含むベクター。

[v] [i i i]のポリヌクレオチド若しくは[i v]のベクターを含むか又は[i]又は[i i]のペプチドリンカーを産生する細胞。

[0012] 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2022-19125号及び日本国特許出願番号2022-196524号開示内容を包含する。

図面の簡単な説明

[0013] [図1]図1は、本発明のコンセプトを示している。pH変化に応答して活性化される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pH応答性を示すヒスチジン残基のクラスター(Hisクラスター(黒塗り))が存在しており、中性pHの状態ではマスキングドメインが抗体の可変領域と結合している。その一方、酸性pH条件ではHisクラスター内部のヒスチジン残基が正に帯電し、リンカーの構造変化が誘起され、マスキングドメインが抗体から離れた状態、すなわち抗体が抗原に結合可能な状態になる。

[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、s c F v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）及びMMP1添加条件（点線）で評価した。（A）HT1-11-s c F v-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-s c F v-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、s c F v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）及び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、I g G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）及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、I g G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）及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6-1]図6-1は、Hisクラスターを搭載した抗TROP2マスク抗体とヒトTROP2抗原の中性pH条件（pH7.5、実線）又は酸性pH条件（pH5.5、点線）における相互作用をELISAで評価した結果を示している。（A）MHT1008は両pH条件で同様の結合活性を示した。（

B) MHT1803は中性pH条件より酸性pH条件で強い結合活性を示した。

[図6-2]図6-2は、Hisクラスターを搭載した抗TROP2マスク抗体とヒトTROP2抗原の中性pH条件（pH7.5、実線）又は酸性pH条件（pH5.5、点線）における相互作用をELISAで評価した結果を示している。（C）MHT1804は中性pH条件より酸性pH条件で強い結合活性を示した。（D）MHT1805は中性pH条件より酸性pH条件で強い結合活性を示した。

[図6-3]図6-3は、Hisクラスターを搭載した抗TROP2マスク抗体とヒトTROP2抗原の中性pH条件（pH7.5、実線）又は酸性pH条件（pH5.5、点線）における相互作用をELISAで評価した結果を示している。（E）MHT1806は中性pH条件より酸性pH条件で強い結合活性を示した。（F）MHT1808は中性pH条件より酸性pH条件で強い結合活性を示した。

[図6-4]図6-4は、Hisクラスターを搭載した抗TROP2マスク抗体とヒトTROP2抗原の中性pH条件（pH7.5、実線）又は酸性pH条件（pH5.5、点線）における相互作用をELISAで評価した結果を示している。（G）MHT1809は中性pH条件より酸性pH条件で強い結合活性を示した。（H）MHT1810は中性pH条件より酸性pH条件で強い結合活性を示した。

[図6-5]図6-5は、Hisクラスターを搭載した抗TROP2マスク抗体とヒトTROP2抗原の中性pH条件（pH7.5、実線）、MMP1と反応させた条件（（I）において破線）、酸性pH条件（pH6.5、（J）において破線）又は酸性pH条件（pH5.5、点線）における相互作用をELISAで評価した結果を示している。（I）HisクラスターとMMP基質をリンカーに搭載したMHT1811は中性pH条件よりも酸性pH条件で強い結合活性を示した。また、MMP1と反応させた条件（破線）でも強い結合活性を示した。（J）MHT1806は中性pH条件よりpH6.5

以下の酸性pH条件（破線）で強い結合活性を示した。

[図6-6]図6-6は、Hisクラスターを搭載した抗TROP2マスク抗体とヒトTROP2抗原の中性pH条件（pH7.5、実線）、酸性pH条件（pH6.0、破線）又は酸性pH条件（pH5.5、点線）における相互作用をELISAで評価した結果を示している。（K）MHT1808は中性pH条件よりもpH6.0以下の酸性pH条件（破線）で強い結合活性を示した。

[図7]図7は、pH7.5（黒色）、pH6.5（灰色）、pH6.0（白色）におけるMHT1808、MHT1817、MHT1818、MHT1819の結合活性を示している。

[図8-1]図8-1は、（A）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、及び（B）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8-2]図8-2は、（C）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で評価した結果を示している。抗体は濃度依存的に抗原に結合した。

[図9-1]図9-1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9-2]図9-2は、図9-1（A）ペプチドライブラリーを使用した（C）抗EGFR抗体Cetuximab、又は（D）抗GPCR5D抗体C3022に対するパニング後のペプチドバインド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10-1]図10-1は、共通のpH応答性リンカーを搭載した（A）抗CD98マスク抗体MhM8001とヒトCD98抗原の相互作用、及び（B）抗EGFRマスク抗体MCE-2101とヒトEGFRの相互作用をELISAで評価した結果をそれぞれ示している。結合は中性pH条件（pH7.5、実線）又は酸性pH条件（pH5.5、点線）で評価した。いずれの抗体も中性pH条件より酸性pH条件で強い結合活性を示した。

[図10-2]図10-2は、共通のpH応答性リンカーを搭載した（C）抗GPCR5Dマスク抗体MC3-9001とヒトGPCR5D抗原の相互作用をELISAで評価した結果を示している。結合は中性pH条件（pH7.5、実線）又は酸性pH条件（pH5.5、点線）で評価した。いずれの抗体も中性pH条件より酸性pH条件で強い結合活性を示した。

[図11]図11は、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。結合は中性pH条件（pH7.5、黒色シンボル）又は酸性pH条件（pH5.5、白色シンボル）で評価した。MHT1808（黒丸及び白丸）は中性pH条件より酸性pH条件で強い結合活性を示した。MHT1221（黒四角及び白四角）及びMHT1008（黒三角及び白三角）は中性pH条件と酸性pH条件で同等の結合活性を示した。

[図12]図12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）で評価した結果及び、（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]図14は、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。結合は中性pH条件（pH7.5、黒色シンボル）又は酸性pH条件（pH5.5、白色シンボル）で評価した。MhM1018-M1（黒丸及び白丸）は中性pH条件と酸性pH条件で同等の結合活性を示した。MhM1024-M1（黒四角及び白四角）は中性pH条件より酸性pH条件で強い結合活性を示した。

[図15-1]図15-1は、マスク抗体ADCのpH7.4（白丸、灰色実線）、pH6.5（四角、灰色点線）、pH6.0（黒丸、黒色点線）、pH5.5（黒四角、黒色実線）における*in vitro*増殖阻害活性を示している。（A）MHT1808-PBD-ADCはpH低下依存的に強い増殖阻害活性を示した。（B）MHT1221-PBD-ADCはいずれの条件でも同等の増殖阻害活性を示した。図中のエラーバーは標準偏差（ $n=3$ ）を示す。

[図15-2]図15-2は、マスク抗体ADCのpH7.4（白丸、灰色実線）、pH6.5（四角、灰色点線）、pH6.0（黒丸、黒色点線）、pH5.5（黒四角、黒色実線）における*in vitro*増殖阻害活性を示している。（C）MhM1024-M1-DXd-ADCはpH低下依存的に強い増殖阻害活性を示した。（D）MhM1018-M1-DXd-ADCはいずれの条件でも同等の増殖阻害活性を示した。図中のエラーバーは標準偏差（ $n=3$ ）を示す。

[図16]HT1-11 H鎖全長のアミノ酸配列（配列番号1）

[図17]HT1-11 L鎖全長のアミノ酸配列（配列番号2）

[図18]MHT1001全長のアミノ酸配列（配列番号3）

[図19]MHT1002全長のアミノ酸配列（配列番号4）

[図20]HT1-11-scFv-HL全長のアミノ酸配列（配列番号5）

[図21]HT1-11-scFv-LH全長のアミノ酸配列（配列番号6）

[図22]MHT1007 H鎖全長のアミノ酸配列（配列番号7）

- [図23] M H T 1 0 0 8 H鎖全長のアミノ酸配列（配列番号8）
- [図24] M H T 1 0 0 9 H鎖全長のアミノ酸配列（配列番号9）
- [図25] M H T 1 8 0 3 H鎖全長のアミノ酸配列（配列番号10）
- [図26] M H T 1 8 0 4 H鎖全長のアミノ酸配列（配列番号11）
- [図27] M H T 1 8 0 5 H鎖全長のアミノ酸配列（配列番号12）
- [図28] M H T 1 8 0 6 H鎖全長のアミノ酸配列（配列番号13）
- [図29] M H T 1 8 0 8 H鎖全長のアミノ酸配列（配列番号14）
- [図30] M H T 1 8 0 9 H鎖全長のアミノ酸配列（配列番号15）
- [図31] M H T 1 8 1 0 H鎖全長のアミノ酸配列（配列番号16）
- [図32] M H T 1 8 1 1 H鎖全長のアミノ酸配列（配列番号17）
- [図33] M H T 1 8 1 7 H鎖全長のアミノ酸配列（配列番号18）
- [図34] M H T 1 8 1 8 H鎖全長のアミノ酸配列（配列番号19）
- [図35] M H T 1 8 1 9 H鎖全長のアミノ酸配列（配列番号20）
- [図36] h M 2 3 H 1 L 1 H鎖全長のアミノ酸配列（配列番号21）
- [図37] h M 2 3 H 1 L 1 L鎖全長のアミノ酸配列（配列番号22）
- [図38] C e t u x i m a b H鎖全長のアミノ酸配列（配列番号23）
- [図39] C e t u x i m a b L鎖全長のアミノ酸配列（配列番号24）
- [図40] C 3 0 2 2 H鎖全長のアミノ酸配列（配列番号25）
- [図41] C 3 0 2 2 L鎖全長のアミノ酸配列（配列番号26）
- [図42] M h M 8 0 0 1 L鎖全長のアミノ酸配列（配列番号27）
- [図43] M C E - 2 1 0 1 L鎖全長のアミノ酸配列（配列番号28）
- [図44] M C 3 - 9 0 0 1 H鎖全長のアミノ酸配列（配列番号29）
- [図45] M H T 1 2 2 1 H鎖全長のアミノ酸配列（配列番号30）
- [図46] h M 2 3 - M 1 H鎖全長のアミノ酸配列（配列番号31）
- [図47] h M 2 3 - M 1 L鎖全長のアミノ酸配列（配列番号32）
- [図48] M h M 1 0 1 3 L鎖全長のアミノ酸配列（配列番号33）
- [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34）
- [図50] M h M 1 0 2 4 - M 1 L鎖全長のアミノ酸配列（配列番号35）

[図51]ヒトuPAが認識し、その基質となるアミノ酸配列及びヒトMMP 1
またはヒトMMP 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52]第2ペプチドのアミノ酸配列（配列番号42～44）

[図53]ヒトGPCR5Dアミノ末端ペプチドのアミノ酸配列（配列番号45
）

[図54]第2ペプチドのアミノ酸配列（配列番号46～66）

[図55]ヒトCAPN1が認識し、その基質となるアミノ酸配列（配列番号6
7）

[図56-1]図56-1は、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。（A）、（B）はpH7.5、pH5.5の条件におけるMhM1026-M1（黒丸）、MhM1028-M1（黒四角）、MhM1042-M1（丸）、MhM1043-M1（四角）の結合活性をそれぞれ示している。

[図56-2]図56-2は、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。（C）、（D）はpH7.5、pH5.5の条件におけるMhM1026-M1（黒丸）、MhM1044-M1（黒四角）、MhM1045-M1（丸）、MhM1046-M1（四角）の結合活性をそれぞれ示している。

[図57]MhM1026-M1 L鎖全長のアミノ酸配列（配列番号68）

[図58]MhM1028-M1 L鎖全長のアミノ酸配列（配列番号69）

[図59]MhM1042-M1 L鎖全長のアミノ酸配列（配列番号70）

[図60]MhM1043-M1 L鎖全長のアミノ酸配列（配列番号71）

[図61]MhM1044-M1 L鎖全長のアミノ酸配列（配列番号72）

[図62]MhM1045-M1 L鎖全長のアミノ酸配列（配列番号73）

[図63]MhM1046-M1 L鎖全長のアミノ酸配列（配列番号74）

[図64]第2ペプチドのアミノ酸配列（配列番号75～81）

発明を実施するための形態

[0014] 以下、本発明を詳細に説明する。

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、「pyrrolobenzodiazepine」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「アミノ酸」とは、天然アミノ酸及び非天然アミノ酸のことをいう。

[0018] 天然アミノ酸は、20の共通アミノ酸、ピロリジン及びセレノシステインである。上記20の共通アミノ酸は、アラニン、アルギニン、アスパラギン、アスパラギン酸、システイン、グルタミン、グルタミン酸、グリシン、ヒスチジン、イソロイシン、ロイシン、リジン、メチオニン、フェニルアラニン、プロリン、セリン、トレオニン、トリプトファン、チロシン及びバリンである。

[0019] 非天然アミノ酸は、20の共通アミノ酸、ピロリジン又はセレノシステインのいずれでもないアミノ酸をいう。非天然アミノ酸と同義語として使用され得る他の用語は、「天然にコードされていないアミノ酸」、「非天然型アミノ酸」、「天然に存在しないアミノ酸」等である。非天然アミノ酸は、天

然アミノ酸の修飾によって天然に存在するが翻訳複合体によって成長するポリペプチド鎖にはそれら自身は組み込まれないアミノ酸を含む。さらに、非天然アミノ酸は、天然に存在せず合成的に得ることができるか、又は天然アミノ酸の修飾によって得ることができるアミノ酸を含むが、これに限定されない。

[0020] 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。

[0021] 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。

[0022] 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。

[0023] 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。

- [0024] F_c (F_c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F_cは、天然(野生型)の配列のF_cであっても、天然の配列に変異がなされた変異型のF_c(「変異型F_c」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F_c領域は変異型F_cであり、より好適にはヘテロ二量体を形成し得る1組のF_cである。1組のF_cとしては、後述の、第1ポリペプチドに含まれるF_c(i)及び第2ポリペプチドに含まれるF_c(ii)の組合せをあげることができるが、1組のF_c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。
- [0025] 変異型F_c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F_c領域(ヘテロ二量体F_c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F_c、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F_c、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F_c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F_c等が例示されるが、これらに限定されるものではない。
- [0026] 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。

- [0027] 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。
- [0028] 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。
- [0029] 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。
- [0030] 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。
- [0031] 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。
- [0032] 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。
- [0033] 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個以下である。かかる変異抗体も本発明の「抗体」に包含される。

[0034] 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。

[0035] 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。

[0036] 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。

[0037] 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。

[0038] 特定の環境とは、特定の組織又は細胞内小器官における環境をいい、例えば、癌微小環境、エンドソーム中の環境又はリソソーム中の環境が挙げられる。

[0039] 癌微小環境とは、癌組織内における環境をいい、例えば、酸性pHの環境やプロテアーゼが存在する環境である。正常組織におけるpHが中性条件、例えば、pH7.0～7.5であるのに対して、癌組織内におけるpHは、7.0以下、好ましくは6.5以下、さらに好ましくは6.0以下である。

[0040] 本発明の標的抗原に結合する分子は、特定の環境で応答性を獲得するため、環境応答性分子と呼ぶことがあり、分子が抗体の場合、環境応答性マスク

抗体と呼ぶ。

[0041] 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、pH 7.5以下の範囲でpHが中性条件から酸性条件に変化することに応じて電荷が無電荷から正電荷に変化するアミノ酸を含む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する。ここで、「間接的に連結した状態」とは、リンカー等を介して連結した状態をいう。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、抗原抗体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、抗原抗体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。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くなる。

[0042] 本発明の標的抗原に結合する分子に含まれる〔a〕部分、〔b〕部分及び〔c〕部分の数は特に限定されないが、〔a〕部分、〔b〕部分及び〔c〕部分をそれぞれ1つ又は2つ以上含むことが好ましく、〔a〕部分、〔b〕部分及び〔c〕部分をそれぞれ1つ又は2つ以上含み、〔a〕部分、〔b〕部分及び〔c〕部分のそれぞれの数が互いに同一であることがより好ましく、〔a〕部分、〔b〕部分及び〔c〕部分をそれぞれ2つずつ含むことがさらに好ましい。図1に、本発明のコンセプトとしてpH変化に応答して活性化されるマスク抗体のフォーマットを一例として示すが、本発明はこれに限定されない。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pH応答性を示すヒスチジン残基のクラスター（ヒスチジンクラスター（Hisクラスター）、図1の黒塗り四角部分）を含むペプチドである分子であり、図1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2ペプチドは、第1ペプチドと

標的抗原に結合する部分を連結しており、pH応答性を示すので、pH応答性リンカーとも呼ぶ。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（図1の左）、かかる機序はこれに限定されない。酸性pH条件により、第2ペプチドのHisクラスター内部のヒスチジン残基が正に帯電し、ヒスチジン残基どうしの斥力によりリンカーである第2ペプチドの構造変化が誘起され、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（図1の右、図中の「+」は正に帯電していることを示す）、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、第2ペプチドの構造変化が誘起される前と比較して、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。すなわち、本発明の標的抗原に結合する分子は、酸性pH条件下で、中性pH条件下に比して、標的抗原に対してより高い親和性をもって結合し得るようになる。このようなヒスチジン残基どうしの斥力による第2ペプチドの構造変化は、pH変化により生じる可逆的な現象である。従って、標的抗原に結合する分子が、酸性pH条件下から中性pH条件下に移行することで、中性pH条件下から酸性pH条件下に移行した際に生じる構造変化とは逆の構造変化が誘起され、第1ペプチドが標的抗原結合部位に結合することで、標的抗原に結合する分子の標的抗原に対する親和性は低下すると考えられる。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。

[0043] 本発明において、「酸性pH条件下で、中性pH条件下に比して、標的抗原に対してより高い親和性をもって結合する」という表現は、標的抗原に結合する分子の中性pH条件での標的抗原への親和性を、酸性pH条件での標的抗原への親和性よりも弱くすると表現することもできる。つまり、本発明においては、標的抗原に結合する分子の酸性pH条件における標的抗原への親和性と中性pH条件における標的抗原への親和性の差を大きくすればよい（例えば、後述のようにEC₅₀比（中性pH条件／酸性pH条件）の値を大きくすればよい）。標的抗原に結合する分子の酸性pH条件における標的抗原への親和性と中性pH条件における標的抗原への親和性の差を大きくするためには、例えば、酸性pH条件における標的抗原への親和性を高くしてもよいし、中性pH条件における標的抗原への親和性を低くしてもよいし、又は、その両方でもよい。

[0044] 本発明においては、第2ペプチドに塩基性アミノ酸クラスターを導入することでリンカー部分にpH応答性を持たせる構成としている。マスクペプチド部分（本発明においては第1ペプチド）にpH応答性を持たせる構成も考えられるが、そのような構成とした場合には、標的抗原に結合する部分毎に異なる配列のpH応答性ペプチドを取得する必要がある。一方で、本発明の構成における、第2ペプチドの共通の配列モチーフ（塩基性アミノ酸クラスター）を有するリンカー部分は、異なる標的抗原に結合する部分においても汎用的に用いることができ、標的抗原に結合する部分毎に異なる配列のpH応答性ペプチドを取得する必要があるという有利な効果がある。

[0045] 標的抗原に結合する分子は、酸性pH条件下で、中性pH条件下に比して、標的抗原に対してより高い親和性をもって結合することにより、標的抗原に結合する分子が正常組織において抗原に結合するのを防止し、その毒性を低減することができる。「毒性を低減する」とは、標的抗原に結合する分子

がヒト、マウス、ラット、サル、ウサギ、イヌなどの動物に投与されたときの、期待する薬効以外の望まない効果を低減することをいう。例えば、毒性には薬剤投与後の死亡・瀕死、体重減少、臓器毒性（皮膚、肝臓等）等を含む。「毒性が低減した」か否かは、標的抗原に結合する分子投与後における、被験者の体重測定、病理データの確認等の当業者に公知の方法を用いて判断することが可能である。

[0046] 標的抗原に結合する分子は、酸性pH条件下で、中性pH条件下に比して、標的抗原に対してより高い親和性をもって結合することにより、正常組織において発現する抗原への結合が抑えられ、その血中濃度を向上させることができる」と推測される。「血中濃度を向上させる」とは、標的抗原に結合する分子がヒト、マウス、ラット、サル、ウサギ、イヌなどの動物に投与されたとき、血中濃度が最大値に達した時の濃度（ C_{max} ）が高くなること、血中から消失するまでの時間が延長されることを含む。血中における標的抗原に結合する分子は、標的抗原に結合する部分がマスクされている状態であってもされていない状態であってもよく、特定の環境において標的抗原に結合する分子として働くことができればよい。「血中濃度が向上した」か否かは、例えば、標的抗原に結合する分子が投与されてから血中濃度が最大値に達した時の濃度（ C_{max} ）が高くなったか否か、又は、標的抗原に結合する分子が投与されてから血中から消失するまでの時間が延長されたか否かにより判断することが可能であり、それらは標的抗原に結合する分子投与後における、血中薬物濃度、又は、標的抗原に結合する分子の血漿中半減期、平均血漿中滞留時間、血漿中クリアランス等のパラメーターを当業者に公知の方法を用いて測定することができる。

[0047] 本発明において、酸性pHにおける標的抗原への親和性が中性pHにおける標的抗原への親和性よりも強い限り、酸性pHにおける標的抗原への親和性と中性pHにおける標的抗原への親和性の差は特に限定されないが、例えば、 EC_{50} 比（中性pH条件／酸性pH条件）が大きいものが好ましい実施態様である。ここで、 EC_{50} とは50%効果濃度又は半数効果濃度のことで

あり、薬物や抗体等の分子が最低値からの最大反応の50%を示す濃度のことを指す。EC₅₀比（中性pH条件／酸性pH条件）とは、中性pH条件における標的抗原に結合する分子のEC₅₀と、酸性pH条件における標的抗原に結合する分子のEC₅₀との比である。従って、標的抗原に結合する分子のEC₅₀比（中性pH条件／酸性pH条件）が大きい値であるほど、すなわち中性pH条件におけるEC₅₀よりも酸性pH条件におけるEC₅₀が小さい値であるほど、該分子の酸性pHにおける標的抗原への親和性は中性pHと比較して高い。標的抗原に結合する分子のEC₅₀比（中性pH条件／酸性pH条件）が小さい値であるほど、すなわち中性pH条件におけるEC₅₀よりも酸性pH条件におけるEC₅₀が大きい値であるほど、該分子の酸性pHにおける標的抗原への親和性は中性pHと比較して低い。標的抗原に結合する分子のEC₅₀比（中性pH条件／酸性pH条件）の値は、好ましくは3以上であり、より好ましくはEC₅₀比（中性pH条件／酸性pH条件）の値が10以上であり、さらに好ましくはEC₅₀比（中性pH条件／酸性pH条件）の値が30以上である。EC₅₀比（中性pH条件／酸性pH条件）の値の上限は特に限定されず、当業者の技術において作製可能な限り、100、400、1000、10000等、いかなる値でもよい。すなわち、標的抗原に結合する分子のEC₅₀比（中性pH条件／酸性pH条件）の値は、3以上100以下、3以上400以下、3以上1000以下又は3以上10000以下であることが好ましく、10以上100以下、10以上400以下、10以上1000以下又は10以上10000以下であることがより好ましく、30以上100以下、30以上400以下、30以上1000以下又は30以上10000以下であることがさらに好ましい。

[0048] 標的抗原への親和性の値として抗原が可溶型抗原の場合はKD（解離定数）を用いることが可能であるが、抗原が膜型抗原の場合は見かけのKD（Apparent dissociation constant：見かけの解離定数）を用いることが可能である。KD（解離定数）、及び、見かけのKD（見かけの解離定数）は、当業者公知の方法で測定することが可能であ

り、例えばBiacore (GE healthcare)、ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay)、FACS等を用いることが可能である。

[0049] 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る。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。

[0050] 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。

[0051] 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。

[0052] 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。

[0053] 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

例えば、ヒト抗体の可変領域を $s c F v$ 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 $s c F v$ 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 (WO 1992/01047 号、WO 1992/20791 号、WO 1993/06213 号、WO 1993/11236 号、WO 1993/19172 号、WO 1995/01438 号、WO 1995/15388 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. U S A (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、 $C \gamma 1$ 、 $C \gamma 2$ 、 $C \gamma 3$ 、 $C \gamma 4$ 、 $C \mu$ 、 $C \delta$ 、 $C \alpha 1$ 、 $C \alpha 2$ 、 $C \epsilon$ 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、 $C \kappa$ 、 $C \lambda$ 等をあげることができる。

[0054] 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。

[0055] 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。

[0056] 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。

[0057] 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。上記アミノ酸の内、その側鎖に酸性官能基又は塩基性官能基を有するアミノ酸における、 α 位アミノ基及び α 位カルボキシ基以外の基の解離定数の負の対数は、アルギニン：12.48、アスパラギン酸：3.65、システイン：8.18、グルタミン酸：4.25、ヒスチジン：6.00、リシン：10.53、チロシン10.07であることが知られている（D. R. Lide, Handbook of Chemistry and Physics, 72nd Edition, CRC Press, Boca Raton, FL, 1991.）。

[0058] 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。

- [0059] 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。
- [0060] 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等を挙げることができる。
- [0061] 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。
- [0062] 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。
- [0063] 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。

[0064] 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～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。

[0065] 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。

[0066] 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 1999/54342号、WO 2000/61739号、WO 2002/31140号、WO 2007/133855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。

[0067] 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。

[0068] 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。

[0069] 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号公報、WO2007/114496号、WO2008/017828号、WO2009/043922号、WO2009/090553号、特開2012-092068号公報、WO2011/118804号及びWO2013/078377号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）、pp2731（1989）、WO2008/144891号、WO2011/145744号、WO2011/155579号、WO2013/077458号、WO2003/074566号、WO2011/068845号、WO2013/068946号、US7999083号及びWO2015/098099号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GPCR5D抗体 (WO2018/147245号及びWO2016/090329号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。

[0070] 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。

[0071] 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。

[0072] 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。

[0073] 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。ここで、標的抗原結合部位を「認識する」とは、標的抗原結合部位に「結合する」、標的抗原結合部位に「親和性を有する」等と同義である。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した（mimic）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、マスク抗体を結晶化して、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）。

[0074] 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。

[0075] 第2ペプチド：[c]部分

第2ペプチドは、pH 7.5以下の範囲でpHが中性条件から酸性条件に変化することに応じて電荷が無電荷から正電荷に変化するアミノ酸を含み、酸性pH条件では該アミノ酸残基が正に帯電し、リンカーの構造変化が誘起される。ここで、「pH 7.5以下の範囲」は、pH 1.0以上7.5以下、pH 2.0以上pH 7.5以下、pH 3.0以上pH 7.5以下、pH 4.0以上pH 7.5以下、pH 5.0以上pH 7.5以下、pH 6.0以上pH 7.5以下及びpH 7.0以上7.5以下のいずれの範囲も含む。さらに、「pH 7.5以下の範囲」は、pH 7.5以下の全域でなくてもよく（全域であってもよいが）、pH 7.5以下の範囲にそっくり含まれる任意の範囲で、pHに応じて電荷が無電荷から正電荷に変化することを意味する。例えば、pHが5.5～7.5の範囲でpHが中性条件から酸性条件に変化することに応じてアミノ酸の電荷が変化する場合が「pH 7.5以下の範囲」に含まれることは言うまでもない。さらに、pHが4.5～6.5の範囲でpHが中性条件から酸性条件に変化することに応じてアミノ酸の電荷が変化する場合、4.5～6.5の範囲は7.5以下の範囲にそっくり含まれるので、「pH 7.5以下の範囲」に該当する。ここで、中性pH条件とは、pHが約7の条件をいい、例えば、pH 7.0以上7.5以下の条件をいう。また、酸性pH条件とは、pHが7未満の条件をいい、例えば、pHが7.0未満、好ましくは6.5以下、さらに好ましくは6.0以下の条件をいう。酸性pH条件の下限は特に限定されず、当業者の技術において実現可能な限り、1.0、2.0、3.0等、いかなる低い値でもよい。すなわち、

酸性pH条件は、pH 1.0以上7.0未満、pH 2.0以上7.0未満、pH 3.0以上7.0未満、好ましくはpH 1.0以上6.5以下、pH 2.0以上6.5以下、pH 3.0以上6.5以下、さらに好ましくはpH 1.0以上6.0以下、pH 2.0以上6.0以下、pH 3.0以上6.0以下である。また、アミノ酸における電荷の変化はpH変化により生じる可逆的な現象であることから、pH 7.5以下の範囲でpHが「中性条件から酸性条件」に変化することに応じて電荷が無電荷から正電荷に変化するアミノ酸は、当然にpH 7.5以下の範囲でpHが「酸性条件から中性条件」に変化することによっても電荷が変化すると考えられる。pH 7.5以下の範囲でpHが中性条件から酸性条件に変化することに応じて電荷が無電荷から正電荷に変化するアミノ酸は、天然アミノ酸であっても非天然アミノ酸であってもよい。非天然アミノ酸である場合には、本願の出願時点で公開されているWO 2006/132969号、WO 2008/030612号、WO 2008/030613号、WO 2008/030614号、WO 2010/037062号、WO 2018/223108号等に記載の非天然アミノ酸から適宜選択して用いることができる。第2ペプチドをpH応答性リンカーとも呼ぶ。第2ペプチドは、pH 7.5以下の範囲でpHが中性条件から酸性条件に変化することに応じて電荷が無電荷から正電荷に変化するアミノ酸として、pKaが7以下の塩基性官能基を側鎖に有するアミノ酸を含む。pKaは、酸性化合物又は酸性官能基における、酸の強さを定量的に表すための指標の1つであり、水素イオンが放出される解離反応における平衡定数Kaの負の常用対数pKa ($pKa = -\log_{10} Ka$) によって表される。pKaは酸解離定数とも呼ばれ、25℃、水中における数値であり、化学便覧基礎編改訂5版11-331~11-343（日本化学会編、丸善出版株式会社）に記載の方法によって算出することができる。pKaは文献等（例えば理科年表平成25年（机上版）、丸善出版株式会社）で公知の数値を用いることもできる。pKaは、塩基性化合物又は塩基性官能基において、塩基の強さを定量的に表す指標としても用いられる。すなわち、塩基性化合物

又は塩基性官能基にプロトンを付加させた共役酸にして、その共役酸の酸の強さによって元の塩基性化合物の塩基性の強さを考えることができる。

[0076] 第2ペプチドに含まれるアミノ酸残基が酸性pH条件で正電荷を帯びることがpH応答性リンカーとして求められる性質であるため、pHが酸性条件において負電荷を有するアミノ酸を含まないことが好ましい。pHが酸性条件における該アミノ酸の負電荷が、酸性pH条件で正電荷を帯びるアミノ酸の正電荷を中和したり弱めたりすることにより、リンカーの構造変化が誘起されなくなるためであると推測される。本発明におけるpHが酸性条件において負電荷を有するアミノ酸は特に限定されないが、第2ペプチドが天然アミノ酸から構成される場合には、pHが酸性条件において負電荷を有するアミノ酸としてグルタミン酸、アスパラギン酸が挙げられる。すなわち、第2ペプチドは、グルタミン酸及び／又はアスパラギン酸を含まないことが好ましい。

[0077] 本発明は第2ペプチドの等電点を表す「pI値」を用いて記述することもできる。分子の「pI値」(pH(I)又はIEP値とも略記する)という用語は、本明細書で使用される場合、分子の等電点、特にアミノ酸、ペプチド又はタンパク質の等電点を指すものとし、これは、特定の分子が正味の電荷を持たないpH値である。分子のpI値が高い値であるほど、すなわち特定の分子が正味の電荷を持たないpH値が高い値(塩基性側)であるほど、該分子は酸性条件では正電荷を帯びやすい。分子のpI値が低い値であるほど、すなわち特定の分子が正味の電荷を持たないpH値が低い値(酸性側)であるほど、該分子は酸性条件では正電荷を帯びにくい。実験的pI値及び計算されたpI値はわずかに異なる可能性があるため、本明細書における用語「pI値」は、計算されたpI値を指す。pI値は、例えばA. Sillero and J. M. Ribeiro, *Analytical Biochem.*, 179(2), 1989, 319-325に従い、計算しようとするペプチドを構成する各アミノ酸残基のpKa並びにアミノ末端のアミノ基及びカルボキシル末端のカルボキシル基のpKaから計算することが

できる。

[0078] 第2ペプチドに含まれるアミノ酸残基が酸性pH条件で正電荷を帯びることがpH応答性リンカーとして求められる性質であるため、酸性条件での電荷の計算値が正であり、中性条件での電荷の計算値よりも大きければよく、その条件を満たすpI値であれば特に限定されない。リンカーの構造変化を誘起させるためには、例えば、pH3.0以上6.5以下の酸性条件における第2ペプチドの電荷の計算値が、pH7.0以上7.5以下の中性条件における第2ペプチドの電荷の計算値よりも大きい値をとっていればよい。従って、第2ペプチドのpI値は、6.4以上であることが好ましく、6.8以上であることがより好ましく、7.2以上であることがさらに好ましく、7.6以上であることが最も好ましい。pI値の上限は特に限定されず、当業者の技術において作製可能な限り、12、13、14等、いかなる値でもよい。すなわち、第2ペプチドのpI値が、6.4以上12以下、6.4以上13以下又は6.4以上14以下であることが好ましく、6.8以上12以下、6.8以上13以下又は6.8以上14以下であることがより好ましく、7.2以上12以下、7.2以上13以下又は7.2以上14以下であることがさらに好ましく、7.6以上12以下、7.6以上13以下又は7.6以上14以下であることが最も好ましい。

[0079] 例えば、本発明の実施例で用いた第2ペプチドについて、A. Sillero and J. M. Ribeiro, *Analytical Biochem.*, 179 (2), 1989, 319-325に従い算出したpI値を表1に示す。表1中、「pH応答性」は、酸性条件下における、構造変化の有無を示す。表1において、「pH応答性」は、「有」、「弱」、「無」の3通りで表している。後記の実施例5の方法でELISAにより結合活性の変化を目視により判断しており、明確に結合活性の変化が認められた場合を「有」とし、結合活性の変化が認められない場合を「無」とし、若干の変化が認められた場合を「弱」とした。

[0080]

[表1]

名称	pH応答性	アミノ酸配列	配列番号	残基数	pI
MHT1007	無	GSGGGGSVLVPMAMMASGGS	配列番号 4 6	20	5.7
MHT1008	無	GSGGGSGGGSGGGSGGS	配列番号 4 7	20	5.7
MHT1009	無	GSGSGGSGRSANAILEGGS	配列番号 4 8	20	6.36
MHT1803	有	HHHSGGGSGGGSGGGSHHH	配列番号 4 9	22	7.74
MHT1804	有	GSGHHHSGGGSHHHGSGGS	配列番号 5 0	20	7.74
MHT1805	有	GSGGGSHHHSGGGSGGS	配列番号 5 1	20	7.64
MHT1806	有	HHHSGGGSHHHSGGGSHHH	配列番号 5 2	22	7.88
MHT1808	有	GGGSGHHHGHHGGHHGGS	配列番号 5 3	22	7.85
MHT1809	有	GGGSHHHGGHHGGHHGGS	配列番号 4 2	22	7.82
MHT1810	有	GGGGHGGHGGHGGHGGHGGGS	配列番号 5 4	22	7.82
MHT1811	有	GGGSGGGSGHHHGHHGGHHGSPGLWAGGS	配列番号 5 5	34	7.85
MHT1817	弱	GGGSGHHHGHDHGGHHGGS	配列番号 5 6	22	7.2
MHT1818	弱	GGGSGHDHGGHHGGHDHGGGS	配列番号 5 7	22	6.79
MHT1819	無	GGGSGHDHGGHDHGGHDHGGGS	配列番号 5 8	22	6.4
MhM8001	有	GGGSGHHHGHHGGHHGGS	配列番号 5 9	22	7.85
MCE-2101	有	GGGSGHHHGHHGGHHGGS	配列番号 6 0	22	7.85
MC3-9001	有	GGGSGHHHGHHGGHHGGS	配列番号 6 1	22	7.85
MHT1221	無	GSGGGSGGGSGGGSGGS	配列番号 6 2	20	5.7
MhM1013	無	GSGSGGGSVLPAMMASGGS	配列番号 6 3	22	5.7
MhM1018-M1	無	GSGSGGGSGGGSGGGSGGS	配列番号 6 4	22	5.7
MhM1024-M1	有	GSGGGSGHHHGHHGGHHGGS	配列番号 6 5	24	7.85
MHT1814	有	GGGSGHHHGHRHGGHHGGS	配列番号 6 6	22	10.13
MhM1026-M1	有	GGGSGGGHHHGHHGGHHGGS	配列番号 7 5	24	7.85
MhM1028-M1	有	GGGSGGGHHGRRHHGGHHGGS	配列番号 7 6	24	10.13
MhM1042-M1	有	GGGSGGRHHHGHHGGHHGGS	配列番号 7 7	24	10.13
MhM1043-M1	有	GGGSGGGHHHGHHGRRHHGGS	配列番号 7 8	24	10.13
MhM1044-M1	有	GGGSGGGHHGKHHGGHHGGS	配列番号 7 9	24	9.33
MhM1045-M1	有	GGGSGGKHHHGHHGGHHGGS	配列番号 8 0	24	9.33
MhM1046-M1	有	GGGSGGGHHHGHHGKHHGGS	配列番号 8 1	24	9.33

[0081] 第2ペプチドは、以下の（1）及び（2）の構造を有するアミノ酸配列からなることが好ましい。

（1）（a）2つ以上の連続するpKaが7以下の塩基性官能基を側鎖に有するアミノ酸からなるアミノ酸配列、又は

（b）（a）のアミノ酸配列の任意の位置（アミノ末端又はカルボキシル末端を含む）に1つのアルギニン若しくはリシンが挿入若しくは付加されたアミノ酸配列を1つ以上含み、且つ、

（2）前記のpKaが7以下の塩基性官能基を側鎖に有するアミノ酸を計4つ以上含む。

[0082] ここで、（a）のアミノ酸配列又は（b）のアミノ酸配列を、「塩基性ア

ミノ酸クラスター」という。2つ以上の連続するpKaが7以下の塩基性官能基を側鎖に有するアミノ酸からなるアミノ酸配列は、好ましくは2～4個の連続するpKaが7以下の塩基性官能基を側鎖に有するアミノ酸からなるアミノ酸配列、さらに好ましくは2～3個の連続するpKaが7以下の塩基性官能基を側鎖に有するアミノ酸からなるアミノ酸配列である。また、「pKaが7以下の塩基性官能基を側鎖に有するアミノ酸」の数の上限は限定されないが、好ましくは20個以下、さらに好ましくは15個以下、さらに好ましくは12個以下である。

[0083] 上記のように、本発明において、「塩基性アミノ酸クラスター」とは、2つ以上の連続するpKaが7以下の塩基性官能基を側鎖に有するアミノ酸からなるアミノ酸配列及び該アミノ酸配列の任意の位置（アミノ末端又はカルボキシル末端を含む）に1つのアルギニン若しくはリシンが挿入又は付加されたアミノ酸配列のことをいう。また、pKaが7以下の塩基性官能基を側鎖に有するアミノ酸として、特定のアミノ酸を選択した場合には、該アミノ酸の種類名に「クラスター」の語を付加して称することがある。例えば、pKaが7以下の塩基性官能基を側鎖に有するアミノ酸としてヒスチジンが選択された場合には、2つ以上の連続するヒスチジンからなるアミノ酸配列及び該アミノ酸配列の任意の位置（アミノ末端又はカルボキシル末端を含む）に1つのアルギニン若しくはリシンが挿入又は付加されたアミノ酸配列は「ヒスチジんクラスター（Hisクラスター）」という。

[0084] 第2ペプチドにおいて、塩基性アミノ酸クラスター部分以外のアミノ酸は、pKaが7以下の塩基性官能基を側鎖に有するアミノ酸、アルギニン及びリシン、酸性pH条件において負電荷を有するアミノ酸以外のアミノ酸であれば、特に限定されない。このようなアミノ酸として、天然アミノ酸では、グリシン、セリン、アラニン、プロリン、スレオニンが挙げられる。好ましくは、グリシン及び／若しくはセリンから構成されるアミノ酸配列（いわゆるGSリンカー）又はプロテアーゼ基質配列を構成するアミノ酸配列である。このようなアミノ酸は、塩基性アミノ酸クラスターのアミノ末端側及びカ

ルボキシル末端側の一方又は両方に1～30個、好ましくは1～20個、さらに好ましくは1～10個含まれていてもよい。

[0085] 天然アミノ酸の中でpKaが7以下の塩基性官能基を側鎖に有するアミノ酸は、ヒスチジンのみであり、天然アミノ酸で構成される第2ペプチド中の塩基性アミノ酸クラスターの数进行数える場合には、ヒスチジんクラスターの数进行数えればよい。例えば、第2ペプチドが「GGGSHHGGHHGGHHGGHHGGSS」（配列番号42、図52）というアミノ酸配列からなる場合、連続する2つのヒスチジンからなるアミノ酸配列を4つ含むことから、塩基性アミノ酸クラスターを4つ含むと数えることができる。別の例として、第2ペプチドが「GGGSHHGGHRHGGHHKGGHHGGSS」（配列番号43、図52）というアミノ酸配列からなる場合、連続する2つのヒスチジンからなるアミノ酸配列を2つ、連続する2つのヒスチジンからなるアミノ酸配列の間にアルギニンが挿入されたアミノ酸配列を1つ、連続する2つのヒスチジンからなるアミノ酸配列にリシンが付加されたアミノ酸配列を1つ含むことから、塩基性アミノ酸クラスターを4つ含むと数えることができる。なお、2つ以上の連続するヒスチジンからなるアミノ酸配列の任意の位置（アミノ末端又はカルボキシル末端を含む）に1つのアルギニン若しくはリシンが挿入又は付加されたアミノ酸配列としては、例えば、HRH、RHH、HHR、HRHH、HHRH、RHHH、HHHR、HKH、KHH、HHK、HKHH、HHKH、KHHH、HHHK等が挙げられる。これは、pKaが7以下の塩基性官能基を側鎖に有するアミノ酸がヒスチジンの場合の例示であり、Hで表されるアミノ酸は、ヒスチジン以外のpKaが7以下の塩基性官能基を側鎖に有するアミノ酸であってもよい。

[0086] 第2ペプチド中の塩基性アミノ酸クラスターは、標的抗原に結合する分子の酸性pHにおける標的抗原に対する親和性を高めるために、2つ以上の連続するpKaが7以下の塩基性官能基を側鎖に有するアミノ酸からなるアミノ酸配列の任意の位置（アミノ末端又はカルボキシル末端を含む）に1つ以上のアルギニンが挿入又は付加されたアミノ酸配列を含むことが好ましく、

2つ以上の連続する pK_a が7以下の塩基性官能基を側鎖に有するアミノ酸からなるアミノ酸配列の任意の位置（アミノ末端又はカルボキシル末端を含む）に1つのアルギニンが挿入又は付加されたアミノ酸配列を1つ含むことがより好ましく、「RHHH」で表されるアミノ酸配列を有する塩基性アミノ酸クラスターを1つ含むことがさらに好ましい。

[0087] アルギニンは側鎖に塩基性官能基であるグアニジノ基を有するアミノ酸であり、その pK_a は12.48である。リシンは側鎖に塩基性官能基であるアミノ基を有するアミノ酸であり、その pK_a は10.53である。従って、両アミノ酸は中性条件下においても側鎖の塩基性官能基が正電荷を帯びていると考えられる。従って、当該アルギニン又はリシンは、第2ペプチドの pH 変化に応じた構造変化を増強させることができる。この効果により、アルギニン又はリシンが挿入又は付加された塩基性アミノ酸クラスターを含む第2ペプチドは、酸性条件が穏やかな環境（例えば、 pH 6.5以上7.0未満）においても、構造変化を誘起させることができると考えられる。

[0088] 本発明においては、2つ以上の連続する pK_a が7以下の塩基性官能基を側鎖に有するアミノ酸からなるアミノ酸配列の任意の位置（アミノ末端又はカルボキシル末端を含む）に1つ以上のアルギニンが挿入又は付加されていないアミノ酸配列の EC_{50} 比（中性 pH 条件／酸性 pH 条件）と、2つ以上の連続する pK_a が7以下の塩基性官能基を側鎖に有するアミノ酸からなるアミノ酸配列の任意の位置（アミノ末端又はカルボキシル末端を含む）に1つ以上のアルギニンが挿入又は付加されたアミノ酸配列の EC_{50} 比（中性 pH 条件／酸性 pH 条件）とを比較することにより、アルギニンの挿入又は付加による pH 応答性の増強効果を定量することができる。すなわち、 EC_{50} 比の比較は、（後者の EC_{50} 比）／（前者の EC_{50} 比）により算出することができ、その比は4.0以上であることが好ましい。

[0089] 塩基性アミノ酸クラスターに含まれる、塩基性官能基を側鎖に有するアミノ酸における塩基性官能基の pK_a は、好ましくは、5.0～7.0の範囲、より好ましくは、5.5～6.5の範囲である。塩基性官能基を側鎖に有

するアミノ酸として塩基性官能基の pK_a が6.00であるヒスチジンを含むことが最も好ましい。

[0090] 第2ペプチドに含まれる塩基性アミノ酸クラスターの数、該クラスターが酸性 pH 条件において正に帯電することでリンカーの構造変化を誘起させることができれば特に限定されないが、好ましくは1～4個、さらに好ましくは2～4個、さらに好ましくは3若しくは4個含む。

[0091] 第2ペプチドに含まれる基性官能基を側鎖に有するアミノ酸の数は、該クラスターが酸性 pH 条件において正に帯電することでリンカーの構造変化を誘起させることができれば特に限定されないが、好ましくは、10個以下であり、より好ましくは、第2ペプチドのアミノ酸配列に含まれる全アミノ酸数の5%以上、30%以下である。

[0092] 第2ペプチドが、(a) 2つ以上の連続する pK_a が7以下の塩基性官能基を側鎖に有するアミノ酸からなるアミノ酸配列、又は(b) アミノ酸配列の任意の位置(アミノ末端又はカルボキシル末端を含む)に1つのアルギニン若しくはリシンが挿入若しくは付加されたアミノ酸配列を1つ以上含み、且つ、(2) 前記の pK_a が7以下の塩基性官能基を側鎖に有するアミノ酸を計4つ以上含むアミノ酸配列からなる場合、第2ペプチドに含まれるアミノ酸の数は、10～60個、好ましくは12～50個、さらに好ましくは15～40個、さらに好ましくは20～35個である。

[0093] 第2ペプチドに含まれる塩基性アミノ酸クラスターの位置は特に限定されない。すなわち、第2ペプチドのアミノ酸配列に2つ以上の塩基性アミノ酸クラスターが含まれる場合、(1) 1つの塩基性アミノ酸クラスターのみが該アミノ酸配列のアミノ末端又はカルボキシル末端に位置してもよく、(2) 1つの塩基性アミノ酸クラスターが該アミノ酸配列のアミノ末端に位置し且つ他の1つの塩基性アミノ酸クラスターが該アミノ酸配列のカルボキシル末端に位置してもよく、(3) いずれの塩基性アミノ酸クラスターも、該アミノ酸配列のアミノ末端に位置せず且つカルボキシル末端に位置しなくてもよい。本発明において、第2ペプチドは、さらに細胞内外のプロテアーゼの

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（以下単に「基質」ともいう。）を含んでいてもよい。第2ペプチドのアミノ酸配列に細胞内外のプロテアーゼにより切断されるアミノ酸配列をさらに含む場合、該アミノ酸配列がアミノ末端からカルボキシル末端に向かって又はカルボキシル末端からアミノ末端に向かって、塩基性アミノ酸クラスター、細胞内外のプロテアーゼにより切断されるアミノ酸配列、標的抗原に結合する部分（〔a〕部分）のアミノ酸配列の順に連結することが好ましい。

[0094] さらに、第2ペプチドは、 pK_a が7以下の塩基性官能基を側鎖に有するアミノ酸を1つ置きに有するアミノ酸配列を含むアミノ酸配列で表される構造からなるものを含んでいてもよい。ここで、 pK_a が7以下の塩基性官能基を側鎖に有するアミノ酸の数は、4～15個、好ましくは5～12個、さらに好ましくは6～10個である。このような配列として、例えば、「GGGGSHGHHGHHGHHGHHGHHGHHGGS」（配列番号44、図52）が挙げられる。

[0095] pK_a が7以下の塩基性官能基を側鎖に有するアミノ酸を1つ置きに有するアミノ酸配列と、（a）2つ以上の連続する pK_a が7以下の塩基性官能基を側鎖に有するアミノ酸からなるアミノ酸配列、又は（b）アミノ酸配列の任意の位置（アミノ末端又はカルボキシル末端を含む）に1つのアルギニン若しくはリシンが挿入若しくは付加されたアミノ酸配列の両方を含んでいてもよい。

[0096] 酸性pH条件は、第2ペプチドの塩基性官能基を側鎖に有するアミノ酸の電荷が変化すれば、pH7.5以下の範囲であればよい。従って酸性pH条件は、好ましくは、pH6.5以下の範囲、より好ましくは、pH6.0以下の範囲、さらに好ましくは、pH5.5以下の範囲である。

[0097] 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はリンカー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に結合する部分のいずれか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2～30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。

[0098] 第2ペプチドは、細胞内プロテアーゼ又は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んでいてもよい。第2ペプチドが、細胞内及び／又は細胞外の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。）を含んでいる場合、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み合わせるともいう。

[0099] 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る。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（配列番号67、図55）を、それぞれ好適な例としてあげることができる。

[0100] 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、MMP1、MMP2、MMP3、MMP7、MMP8、MMP9、MMP10、MMP11、MMP12、MMP13、MMP14、MMP15、MMP16、MMP17、MMP18、MMP19、MMP20、MMP21、MMP23A、MMP23B、MMP24、MMP25、MMP26、MMP27、MMP28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、SGRSANAILE（配列番号36、図51）、SGRSANA（配列番号37、図51）、SGRSA（配列番号38、図51）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。)としては、VLVPMAMMAS (配列番号39、図51) 及びPLGLWA (配列番号40、図51) 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51) を、それぞれ好適な例としてあげることができる。

[0101] 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。従って、標的抗原に結合する分子においては、好ましくは、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、標的抗原に結合する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、標的抗原に結合する部分の順に連結していてもよい。

[0102] 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に結合する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。

[0103] また、第1ペプチドと第2ペプチドは部分的に重複してもよい。例えば、配列番号13、図28(MHT1806H鎖の全長アミノ酸配列)において、ミモトープペプチド(アミノ酸20~35)のC末端(HH)は、ヒスチジ

ンクラスターの一部になっており、第1ペプチドの一部と第2ペプチドの一部が重複している。

[0104] 第2ペプチドに、(a) 2つ以上の連続するpKaが7以下の塩基性官能基を側鎖に有するアミノ酸からなるアミノ酸配列、又は(b) アミノ酸配列の任意の位置(アミノ末端又はカルボキシル末端を含む)に1つのアルギニン若しくはリシンが挿入若しくは付加されたアミノ酸配列を1つ以上含み、且つ、(2) 前記のpKaが7以下の塩基性官能基を側鎖に有するアミノ酸を計4つ以上含むアミノ酸配列、並びに上記の第1切断アミノ酸配列及び/又は第2切断アミノ酸配列であるプロテアーゼにより切断されるアミノ酸配列の両方が含まれる場合、プロテアーゼによりアミノ酸配列が切断された場合に、標的抗原に結合する分子に、(a) 2つ以上の連続するpKaが7以下の塩基性官能基を側鎖に有するアミノ酸からなるアミノ酸配列、又は(b) アミノ酸配列の任意の位置(アミノ末端又はカルボキシル末端を含む)に1つのアルギニン若しくはリシンが挿入若しくは付加されたアミノ酸配列を1つ以上含み、且つ、(2) 前記のpKaが7以下の塩基性官能基を側鎖に有するアミノ酸を計4つ以上含むアミノ酸配列が含まれないことが好ましい。

[0105] 第2ペプチドが、(a) 2つ以上の連続するpKaが7以下の塩基性官能基を側鎖に有するアミノ酸からなるアミノ酸配列、又は(b) アミノ酸配列の任意の位置(アミノ末端又はカルボキシル末端を含む)に1つのアルギニン若しくはリシンが挿入若しくは付加されたアミノ酸配列を1つ以上含み、且つ、(2) 前記のpKaが7以下の塩基性官能基を側鎖に有するアミノ酸を計4つ以上含むアミノ酸配列、並びに上記の第1切断アミノ酸配列及び/又は第2切断アミノ酸配列であるプロテアーゼにより切断されるアミノ酸配列の両方が含まれる場合、第2ペプチドに含まれるアミノ酸の数は、15～150個、好ましくは15～120個、さらに好ましくは15～70個、さらに好ましくは15～50個である。

[0106] 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に結合する部分に結合する。[d]部分は、該標的抗原に結合する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。

[0107] 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、ネクロトキシン、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、siRNA、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。

[0108] [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。

[0109] [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てもよい。

[0110] [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) ということができる。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学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-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-benz o[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、pyrrol benzodiazepine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-{ [(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]-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 (WO2019/065964) 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、WO2020/229982、WO2020/0
 50406、WO2021/177438)、TLR7/8アゴニスト又はT
 LR8アゴニスト (例えば、WO2018/009916、WO2019/
 084060) 等の免疫賦活化物質でもよい。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、(5R, 7R, 8R, 12aR, 14R, 15R
 , 15aS, 16R) -15, 16-ジヒドロキシー-7-[1-(2-ヒド
 ロキシエチル) -6-オキソ-1, 6-ジヒドロ-9H-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-2H-2, 3, 5, 6-テトラアザベンゾ [cd] アズレン-2-イ
 ル) オクタヒドロ-2H, 10H, 12H-5, 8-メタノ-2λ5, 10

λ 5-フル[3, 2-1][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、(5R, 7R, 8R, 12aR, 14R, 15R, 15aR, 16R)-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-9H-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-2H-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-2H, 10H, 12H-5, 8-メタノ-2 λ 5, 10 λ 5-フル[3, 2-1][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、(5R, 7R, 8R, 12aR, 14R, 15R, 15aR, 16R)-7-[1-(2-アミノエチル)-6-オキソ-1, 6-ジヒドロ-9H-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(7H)-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-2H, 10H, 12H-5, 8-メタノ-2 λ 5, 10 λ 5-フル[3, 2-1][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-[(5R, 7R, 8R, 12aR, 14R, 15R, 15aR, 16R)-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(7H)-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-2H, 10H, 12H-5, 8-メタノ-2 λ 5, 10 λ 5-フル[3, 2-1][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-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(WO2021/177438)。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（WO2022/050300、WO2018/003983）。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-Directed Phototherapy*）分子といえることができる。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学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-テトラヒドロポリフィリン-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-ヘキサヒドロポリフィリン-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。

[0111] 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、抗腫瘍性化合物、免疫賦活化物質等）が効果を発揮する。

[0112] 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（ZPZP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（ZPZP lib）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。ここで、Zはヒスチジン（His）、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。

- [0113] 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。
- [0114] 抗体のCDR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。
- [0115] 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。

(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。

- [0116] 例えば、標的抗原に結合する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。
- [0117] 標的抗原に結合する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。

[0118] 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。

(3) 第2ペプチドのアミノ酸配列を含むアミノ酸配列からなるペプチドの製造方法

本発明の第2ペプチドのアミノ酸配列を含むアミノ酸配列からなるペプチドは、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。

- [0119] 例えば、第2ペプチドのアミノ酸配列を含むアミノ酸配列からなるペプチドをコードするポリヌクレオチドを細胞に導入し、該細胞を培養し、該培養物から目的のペプチドを回収することにより、本発明の第2ペプチドのアミノ酸配列を含むアミノ酸配列からなるペプチドを製造することができる。
- [0120] 第2ペプチドのアミノ酸配列を含むアミノ酸配列からなるペプチドをコードす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第2ペプチドのアミノ酸配列を含むアミノ酸配列からなるペプチド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と第2ペプチドのアミノ酸配列を含むアミノ酸配列からなるペプチドをコードするDNAをインフレームで連結しておく。第2ペプチドのアミノ酸配列を含むアミノ酸配列からなるペプチド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、第2ペプチドのアミノ酸配列を含むアミノ酸配列からなるペプチドを成熟タンパク質として得ることができる。
- [0121] 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H E K 2 9 3細胞、チャイニーズ・ハムスター・卵巣（C H O）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、D E A Eー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。

[0122] 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及び／又は治療薬として用いることができる。

[0123] 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等は抗がん剤として用いることができる。

[0124] 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。

[0125] 本発明の抗がん剤は、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、例えば注射投与することができ、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。

[0126] 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。

[0127] 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。

[0128] 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。

[0129] 5. 検査薬、診断薬及び試薬

本発明の標的抗原に結合する分子等は、検査薬、診断薬又は試薬等として使用することができる。本発明の標的抗原に結合する分子等は、酸性pH条件下で、中性pH条件下に比して、標的抗原に対してより高い親和性をもって結合するため、標的抗原への抗体の結合量から、標的抗原近傍のpHの変化を調べることができる。従って、本発明の標的抗原に結合する分子等を、例えば、検体に使用する又は対象に投与する等により、標的抗原近傍のpHの変化を病因とする疾患又は表現型とする疾患等についての検査薬、診断薬又は試薬等として使用することができる。好適には、本発明の標的抗原に結合する分子等は、癌微小環境、エンドソーム中の環境又はリソソーム中の環境に存在する標的抗原近傍における、pHの変化を病因とする疾患又は表現型とする疾患等についての検査薬、診断薬又は試薬等として使用することができる。検査薬、診断薬又は試薬としては、例えば、罹患リスクの判定又は測定、罹患の有無の判定、進行や増悪化の程度の測定、標的抗原に結合する分子を含む医薬組成物による薬物治療の効果の測定又は判定、薬物治療以外の治療の効果の測定又は判定、再発リスクの測定、再発の有無の判定等に用

いられるものが含まれるが、検査薬、診断薬又は試薬としての使用であればそれらに限定されるものではない。本発明は、本発明の標的抗原に結合する分子等を含む検査、診断又は試薬等組成物（以下、「検査等用組成物」という。）を提供する。かかる検査等用組成物には、pH緩衝剤、浸透圧調節剤、塩類、安定化剤、防腐剤、顕色剤、増感剤、凝集防止剤等を含有させることができる。

実施例

[0130] 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。

[0131] 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、及びThermo Fisher Scientific社）した。

[0132] （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（配列番号1、図16）又は軽鎖（配列番号2、図17）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Exp293F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。Exp293F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E

xpi293F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 (Poly science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MabSelect 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))。

[0133] 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) -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。

[0134] (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-Biotin (Thermo Fisher Scientific社) でビオチン化したヒト血清由来IgG (Sigma-Aldrich社) 又はHT1-11をDynabeads Streptavidin M-280 (Thermo Fisher Sc

ientific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及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。

[0135] 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又はヒト血清由来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。

[0136] (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18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の順又は、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。

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ELISAで評価した。ペプチド融合scFvを含む培養上清は、2mMの塩化カルシウムを含むTBS (MMPバッファー)で10倍希釈し、100nMの活性型ヒトMMP1 (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TROP2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、MMP1非添加条件でも同様の操作を行い、結合強度比 (MMP1添加条件/MMP1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 (配列番号3、図18)及びMHT1002 (配列番号4、図19)を得た。

3) -3 陽性クローンの結合活性評価

HT1-11-scFv-HL (配列番号5、図20)、HT1-11-scFv-LH (配列番号6、図21)及び実施例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28

0 nmの吸光度と、P A C E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 (P r o t e i n S c i e n c e . ; 4 (1 1) : 2 4 1 1 - 2 4 2 3 (1 9 9 5)) 。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 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。MMPバッファーで抗体を1 μ Mに調製し、終濃度1 μ M又は0 μ MになるようMMP 1 を添加し、3 7 °Cで1 5 分反応させた。その後、E L I S Aバッファーで濃度調整した抗体を各ウェルに添加した。

[0137] 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H T 1 - 1 1 - s c F v - H L 及びH T 1 - 1 1 - s c F v - 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M H T 1 0 0 1 及びM H T 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E C ₅₀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)) 。

[0138] (実施例 4) 抗 T R O P 2 マスク抗体の調製・結合活性評価

当業者公知の手法で、M H T 1 0 0 1 のミモトープペプチド及びMMP切断リンカー (実施例 3) - 1 参照) を融合した抗 T R O P 2 マスク抗体M H T 1 0 0 7 (表 2 、配列番号 7 、図 2 2) の重鎖発現ベクターを構築した。同様に、MMP切断リンカー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M H T 1 0 0 8 (表 2 、配列番号 8 、図 2 3) 及びu P A の切断リンカー (公知のu P A 基質含む (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) .) : 図 2 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 3 6 ~ 5 5) に改変したM H T 1 0 0 9 (表 2 、配列番号 9 、図 2 4) 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H T 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E x p 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、M H T 1 0 0 7、M H T 1 0 0 8、M H T 1 0 0 9と命名した（表2）。表2の各マスク抗体の重鎖配列の配列中の「p H応答性リンカー」は本発明の標的抗原に結合する分子の第2ペプチドに相当する。

[0139]

[表2]

表2 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、図22)	HT1-11 (配列番号2、図17)
MHT1008	MHT1008 (配列番号8、図23)	HT1-11 (配列番号2、図17)
MHT1009	MHT1009 (配列番号9、図24)	HT1-11 (配列番号2、図17)
MHT1803	MHT1803 (配列番号10、図25)	HT1-11 (配列番号2、図17)
MHT1804	MHT1804 (配列番号11、図26)	HT1-11 (配列番号2、図17)
MHT1805	MHT1805 (配列番号12、図27)	HT1-11 (配列番号2、図17)
MHT1806	MHT1806 (配列番号13、図28)	HT1-11 (配列番号2、図17)
MHT1808	MHT1808 (配列番号14、図29)	HT1-11 (配列番号2、図17)
MHT1809	MHT1809 (配列番号15、図30)	HT1-11 (配列番号2、図17)
MHT1810	MHT1810 (配列番号16、図31)	HT1-11 (配列番号2、図17)
MHT1811	MHT1811 (配列番号17、図32)	HT1-11 (配列番号2、図17)
MHT1817	MHT1817 (配列番号18、図33)	HT1-11 (配列番号2、図17)
MHT1818	MHT1818 (配列番号19、図34)	HT1-11 (配列番号2、図17)
MHT1819	MHT1819 (配列番号20、図35)	HT1-11 (配列番号2、図17)
MHT1221	MHT1221 (配列番号30、図45)	HT1-11 (配列番号2、図17)

[0140] 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、 $3\mu\text{M}$ の抗体に対して終濃度 300nM のMMP1又は、活性型ヒトuPA（アクセション番号：P00749）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TROP2抗原の固定されたウェルに添加した。

[0141] 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、scFv時と同様にマスク効果が示された。また、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ており、結合の EC_{50} 比（MMP1非添加条件／MMP1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MHT1008では、MMP1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MHT1009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。

[0142] 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MHT1007のFab領域を当業者公知の方法で調製し、当該Fab領域の結晶化及びX線結晶構造解析を行った。その結果、該ペプチドはHT1-11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TROP2抗原と競合的にHT1-11に結合することをSPRで確認した（データ示さず）。

[0143] （実施例5） Hisクラスター搭載リンカーの設計と結合のpH応答性評

価

側鎖の pK_a が6.0であるHisはpHeが低下する腫瘍微小環境でプロトン化しやすいアミノ酸である。リンカー内に複数のHisを搭載した抗TROP2マスキング抗体を設計し、ヒトTROP2抗原との相互作用を以下に記載する部分を除き、実施例1)〜2と同様にELISAで評価した。抗体を中性バッファー(50mM TRIS又は50mM HEPES、150mM NaCl、0.05% Tween-20、pH7.5)又は酸性バッファー(50mM Bis-TRIS、150mM NaCl、0.05% Tween-20、pH6.5〜5.5)で2000nMに希釈し、37℃で反応後、各バッファーで濃度を調整しヒトTROP2抗原の固定されたウェルに添加した。洗浄及びHorseradish peroxidase (HRP) 標識抗ヒトIgG抗体(Jackson Immuno Research Laboratories社)の希釈も各pH条件にそって実施した。

[0144] 図6-1(A)に示すようにHisを搭載していないMHT1008は、中性pH条件(pH7.5)及び酸性pH条件(pH5.5)で同様の結合活性を示した。その一方で、連続したHis(Hisクラスター)をリンカー内に1つ又は2つ搭載したMHT1803(表2、配列番号10、図25)、MHT1804(表2、配列番号11、図26)及びMHT1805(表2、配列番号12、図27)は中性pH条件よりも酸性pH条件で強い結合を示した(図6-1(B)、図6-2(C)、図6-2(D))。MHT1803、MHT1804、MHT1805の結合の EC_{50} 比(中性pH条件/酸性pH条件)はそれぞれ3.9、3.6、2.3だった。また、Hisクラスター数を3つ搭載したMHT1806(表2、配列番号13、図28)も同様に酸性pH条件で強い結合活性を示し(図6-3(E))、 EC_{50} 比(中性pH条件/酸性pH条件)は38.8だった。

[0145] Hisクラスターを形成する連続したHisの数を検討するために、MHT1808(表2、配列番号14、図29)、MHT1809(表2、配列

番号15、図30)及び、MHT1810(表2、配列番号16、図31)の結合活性を評価した。いずれのクローンも中性pH条件よりも酸性pH条件で強い結合を示し(図6-3(F)、図6-4(G)、図6-4(H))、 EC_{50} 比(中性pH条件/酸性pH条件)はそれぞれ24.4、11.4、7.8だった。

[0146] HisクラスターとPLGLWA(配列番号40、図51)で構成される公知のMMP基質(Biopolymers.; 40(4):399-416(1996).)を搭載したMHT1811(表2、配列番号17、図32)の結合活性を評価した。プロテアーゼ基質を含む場合も、MHT1811は中性pH条件よりも酸性pH条件で強い結合を示し(図6-5(I))、 EC_{50} 比(中性pH条件/酸性pH条件)は28.1だった。また、MMP1添加条件でも強い結合活性を示し、 EC_{50} 比(MMP1非添加条件/MMP1添加条件)は48.4だった。

[0147] 結合活性が向上する酸性pH条件を解析した。図6-5(J)に示すように、MHT1806はpH6.5以下の酸性pH条件で中性pH条件(pH7.5)よりも結合活性が向上した。また、MHT1808はpH6.0以下の酸性pH条件で中性pH条件(pH7.5)よりも結合活性が向上した(図6-6(K))。

[0148] His残基のプロトネーションがpH低下依存的な結合活性の向上に寄与するか検証するために、Hisクラスター内に負電荷のAsp残基を配置したMHT1817(表2、配列番号18、図33)、MHT1818(表2、配列番号19、図34)、MHT1819(表2、配列番号20、図35)を設計、調製した。pH7.5、pH6.5、pH6.0のバッファーで各抗体を20nMに希釈し、37℃で30分反応後、ヒトTROP2抗原に対する結合活性をELISAで評価した。MHT1808はpH低下依存的に結合活性が向上したが、pH6.5、pH6.0のいずれの条件においてもMHT1817、MHT1818、MHT1819の結合活性はMHT1808程向上しなかった(図7)。また、Hisクラスター内部のAsp残

基数が増える程、pH変化に伴う結合活性の変化は小さくなった。この結果は、pH応答性リンカー中にAsp残基が含まれない方が好ましいことを示す。

[0149] (実施例6) 抗CD98抗体、抗EGFR抗体、抗GPCR5D抗体の結合活性評価

6) - 1 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(表3、配列番号21、図36)、軽鎖配列(表3、配列番号22、図37))のヒトCD98抗原に対する結合活性をELISAで評価した。

[0150] 96ウェルMaxisorplate(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%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1 μ g/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バッファーで調製した抗CD98抗体hM23H1L1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8-1 (A) に示すように、hM23H1L1は濃度依存的にヒトCD98抗原に結合した。

[0151] 6) - 2 抗EGFR抗体Cetuximabの調製・結合活性評価

公知の抗EGFR抗体Cetuximab (表3、重鎖配列 (配列番号23、図38)、軽鎖配列 (配列番号24、図39)) 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。

[0152] 96ウェルMaxisorp plate (Black、Nunc社) にPBSで0.2 $\mu\text{g/mL}$ 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 μL 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%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 μL 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 μL 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8-1 (B) に示すように、Cetuximabは濃度依存的にヒトEGF

R抗原に結合した。

[0153] 6) - 3 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3、重鎖配列(配列番号25、図40)、軽鎖配列(配列番号26、図41))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。

[0154] 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%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 (MYKDCIESTGDYFLLCDAEGPWGIILE (配列番号45、図53)-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、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8-2 (C) に示すように、C3022は濃度依存的にヒトGPCR5D抗原に結合した。表3の各マスク抗体の重鎖配列又は軽鎖配列の

配列中の「pH応答性リンカー」は本発明の標的抗原に結合する分子の第2ペプチドに相当する。

[0155] [表3]

表3 抗CD98抗体、抗EGFR抗体、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
hM23H1L1	hM23H1L1 (配列番号21、図36)	hM23H1L1 (配列番号22、図37)
Cetuximab	Cetuximab (配列番号23、図38)	Cetuximab (配列番号24、図39)
C3022	C3022 (配列番号25、図40)	C3022 (配列番号26、図41)
MhM8001	hM23H1L1 (配列番号21、図36)	MhM8001 (配列番号27、図42)
MCE-2101	Cetuximab (配列番号23、図38)	MCE-2101 (配列番号28、図43)
MC3-9001	MC3-9001 (配列番号29、図44)	C3022 (配列番号26、図41)
hM23-M1	hM23-M1 (配列番号31、図46)	hM23-M1 (配列番号32、図47)
MhM1013	hM23H1L1 (配列番号21、図36)	MhM1013 (配列番号33、図48)
MhM1013-M1	hM23-M1 (配列番号31、図46)	MhM1013 (配列番号33、図48)
MhM1018-M1	hM23-M1 (配列番号31、図46)	MhM1018 (配列番号34、図49)
MhM1024-M1	hM23-M1 (配列番号31、図46)	MhM1024 (配列番号35、図50)

[0156] (実施例7) hM23H1L1、Cetuximab、C3022に対するミモトープペプチドの濃縮

7) -1 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) 又は、中央付近に芳香族性アミノ酸とProの繰り返しモチーフ (ZPZP 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9-1 (A))。最初に、E-Z-

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) 及び 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 及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。

[0157] 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 又はヒト血清由来 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 9-1 (B) に示すように、Linear 15mer lib 及び ZPZP 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。

[0158]

7) -2 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、C

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) 及び、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及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。

[0159] 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、Cetuximab又はヒト血清由来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9-2 (C) に示すように、Cetuximab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276倍多くmRNAが回収された。この結果から、Cetuximabに特異的に結合するペプチドの濃縮が示された。

[0160] 7) -3 C3022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、C3022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) 及び、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、C3022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C3022に結合しなかったRDを除去し、C3022に結合したRDからmRNAを精製した。その後、RT-PCR及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。

[0161] 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、C3022又はヒト血清由来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9-2 (D) 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。

[0162] (実施例8) pH応答性リンカーの適用汎用性

実施例3と同様の方法で抗CD98抗体、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、Cetuximab (重鎖又は軽鎖) 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。ペプチド及びMMP切断リンカーが重鎖又は軽鎖のN末端に融合したCetux

x i m a bはE x p i 2 9 3 F細胞で発現させ、実施例3と同様の方法でC e t u x i m a bの結合を阻害可能なミモトープペプチドを選抜した。

[0163] H i sクラスターを3つ搭載したpH応答性リンカーを使用し、酸性pH条件において汎用的にマスク抗体が活性化するかどうか検証した。上記スクリーニングで同定したミモトープを搭載した抗CD98マスク抗体M h M 8 0 0 1（表3、配列番号27、図42）、抗EGFRマスク抗体M C E - 2 1 0 1（表3、配列番号28、図43）及び、抗GPCR5Dマスク抗体M C 3 - 9 0 0 1（表3、配列番号29、図44）を設計した。実施例1）-1と同様にマスク抗体を調製し、実施例5、実施例6と同様に、中性pH条件、酸性pH条件での結合活性をE L I S Aで評価した。

[0164] M h M 8 0 0 1、M C E - 2 1 0 1及び、M C 3 - 9 0 0 1は全て中性pH条件（pH7.5）よりも酸性pH条件（pH5.5）で強い結合を示し、E C₅₀比（中性pH条件／酸性pH条件）はそれぞれ13.1、39.0、40.4だった（図10-1（A）、図10-1（B）、図10-2（C））。これらの結果から、H i sクラスターを搭載したマスク抗体は汎用的に酸性pH条件で活性化することが示唆された。

[0165]（実施例9）ADC化する抗TROP2マスク抗体の調製・結合活性評価
H i sクラスターをリンカー部分に搭載することで、pH低下依存的にマスク抗体の殺細胞活性が向上するか検証することを目的に、H i sクラスターを搭載した抗TROP2マスク抗体M H T 1 8 0 8、H i sクラスターを搭載していないM H T 1 2 2 1（表2、配列番号30、図45）及び、M H T 1 0 0 8を設計した。実施例1）-1と同様の方法で各抗体を調製し、実施例5と同様の方法で中性pH条件（pH7.5）、酸性pH条件（pH5.5）におけるヒトTROP2抗原に対する結合活性をE L I S Aで評価した。

[0166] 図11に示すように、M H T 1 8 0 8は中性pH条件よりも酸性pH条件で強い結合を示し、E C₅₀比（中性pH条件／酸性pH条件）は25.4だ

った。一方で、MHT1221及びMHT1008は両pH条件で同等の結合活性を示し、EC₅₀比（中性pH条件／酸性pH条件）はそれぞれ1.7、1.2だった。

[0167]（実施例10） 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[de]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）及び、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－{[（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]－5'－オキソ－11'，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]－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。

[0168] 抗体－薬物コンジュゲートの製造及び同定に使用する共通操作

共通操作A：抗体及び抗体－薬物コンジュゲート水溶液の濃縮

Amicon Ultra (50,000 MWCO, Millipore Corporation) 及び遠心機 Allegra X-15R Centrifuge (Beckman Coulter) (SX4750A) にて濃縮した (4000g)。

[0169] 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。

[0170] 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。

[0171] C-2：リン酸バッファー (50mM, pH6.0) (以下、PB6.0と称する) へのバッファー交換

抗体水溶液にPB6.0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、PB6.0を用いて10m

g / m L に調整した。

[0172] 共通操作D：抗体－薬物コンジュゲートの精製

N A P－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。
カラムの平衡化及び溶出溶液に5 (w / v) % S o r b i t o l－10 mM
酢酸バッファー（以下、A B S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' (m g / m L) は、ランベルト・ベールの法則、吸光度A 280 = モル吸光係数 ϵ_{280} (L · m o l⁻¹ · c m⁻¹) × モル濃度C (m o l · L⁻¹) × セル光路長l (c m) より導ける式 (I) で算出した。

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

[0173] C' (m g / m L) の算出に使用した各値は以下によって得た。

・ 吸光度A 280：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

L a m b a 25 (P e r k i n E l m e r) にて計測

・ モル質量MW (g · m o l⁻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 (c m)：1 c m

・ 抗体薬物コンジュゲートのモル吸光係数 ϵ_{280} ：下記の式 (II) より算出

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

[0174] $\epsilon_{Ab, 280}$ ：280 nmにおける抗体のモル吸光係数

$\epsilon_{DL, 280}$ ：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 4 参照）。

[0175] $\varepsilon_{DL, 280}$ 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。

[0176] 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。

[0177] 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。

[0178] 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℃
- ・ 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 μL

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。

[0179] 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。

[0180] 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})

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

[0181] ここで、各抗体における軽鎖及び重鎖のモル吸光係数（280nm）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4参照）。

[0182] 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。

$$\text{薬物が } i \text{ 個結合した軽鎖ピーク面積比} = \frac{A_{Li}}{A_{L0} + A_{L1}} \times 100$$

$$\text{薬物が } i \text{ 個結合した重鎖ピーク面積比} = \frac{A_{Hi}}{A_{H0} + A_{H1} + A_{H2} + A_{H3}} \times 100$$

A_{Li} , A_{Hi} : L_i , H_i 各々のピーク面積補正值

[0183] 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。

[0184] 薬物平均結合数 = (L0ピーク面積比 × 0 + L1ピーク面積比 × 1 + H0ピーク面積比 × 0 + H1ピーク面積比 × 1 + H2ピーク面積比 × 2 + H3ピーク面積比 × 3) / 100 × 2

[0185]

[表4]

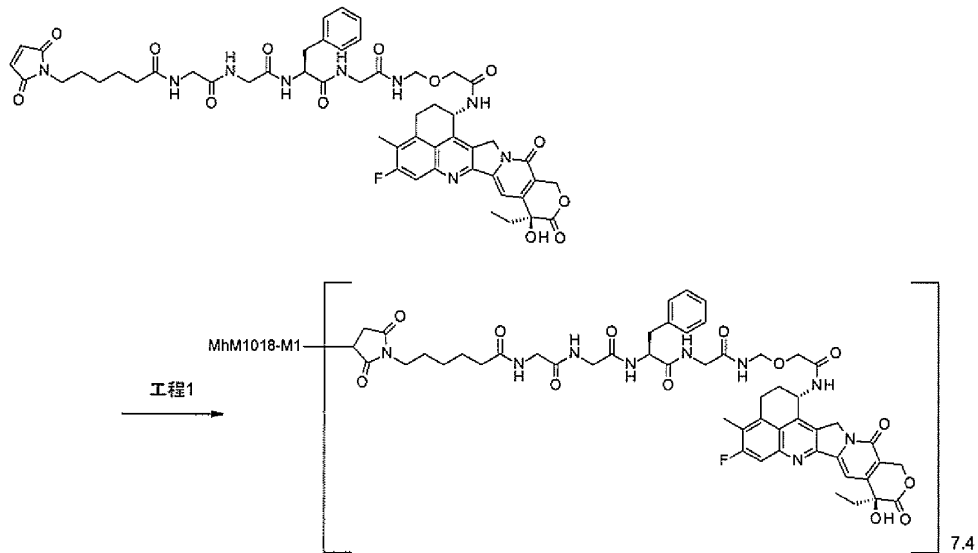
表 4 各抗体のモル吸光係数、吸光係数、抗体分子量

抗体	280nmモル吸光係数 ($L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$)			吸光係数 ($L \cdot g^{-1} \cdot cm^{-1}$)	抗体 分子量
	Whole	重鎖	軽鎖		
MhM1018-M1	254340	77008	50162	1.67	152093
MhM1024-M1	254340	77008	50162	1.66	153582
MHT1808	237380	90988	27702	1.56	152575
MHT1221	237380	90988	27702	1.57	150888
MHT1008	237380	90988	27702	1.57	151086

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

[0186] 10) -1 MhM1018-M1-DXd-ADCの合成

[0187] [化1]



[0188] 工程 1：抗体－薬物コンジュゲート（1）

抗体の還元：実施例12にて作製したMhM1018-M1を、共通操作B及びC-1を用いて、PBS6.0/EDTAにて10mg/mLに調製し

た。本溶液（1.45 mL）に1 Mリン酸水素二カリウム水溶液（Nacalai Tesque, Inc. ; 0.0218 mL）及び、10 mM TCEP（東京化成工業株式会社）水溶液（0.0581 mL ; 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。

[0189] 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10 mM ジメチルスルホキシド溶液（0.0969 mL ; 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、100 mM NAC（Sigma-Aldrich Co. LLC）水溶液（0.0097 mL ; 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。

[0190] 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7 mL得た。

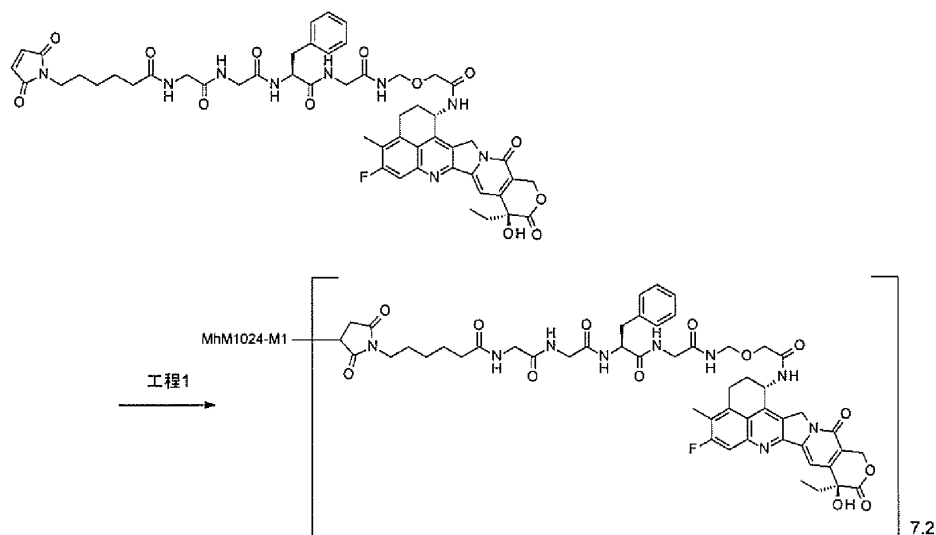
[0191] 特性評価：共通操作E及びFを使用して、下記の特性値を得た。

[0192] 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。

[0193] 10) - 2 MhM1024-M1-DXd-ADCの合成

[0194]

[化2]



[0195] 工程 1 : 抗体-薬物コンジュゲート (2)

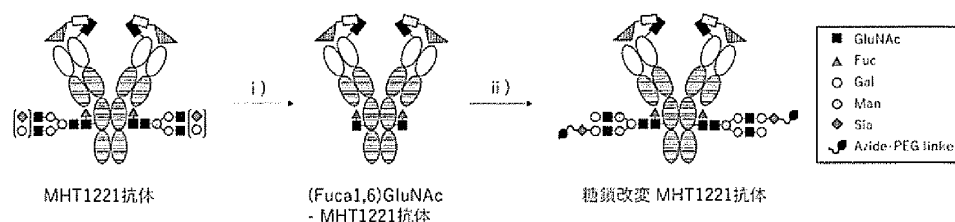
実施例 12 にて作製した MhM1024-M1 (280 nm 吸光係数として 1.66 mL mg⁻¹ cm⁻¹ を使用) を 1.53 mL 用いて、実施例 10) - 1 の工程 1 と同様の方法により、標記抗体-薬物コンジュゲート「MhM1024-M1-DXd-ADC」を得た。

[0196] 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。

[0197] 抗体濃度：1.91 mg/mL, 抗体収量：13.38 mg (87%), 抗体一分子あたりの薬物平均結合数 (n)：7.2。

[0198] 10) - 3 MHT1221-PBD-ADC の合成

[0199] [化3]



[0200] i) Endo S 酵素

i i) EndoS (D233Q/Q303L) 酵素, 糖鎖オキサゾリン

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12)。

[0201] 工程1: (Fuc α 1, 6) GlcNAc-MHT1221抗体の調製

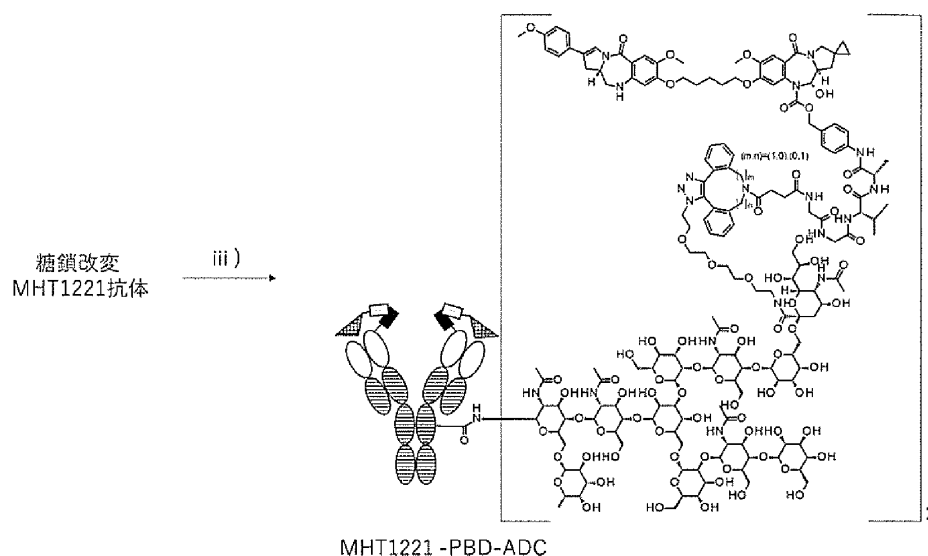
実施例9で調製したMHT1221抗体溶液を、共通操作C-2に従いリン酸緩衝溶液 (50mM, pH6.0) (以下PB6.0) にバッファー交換し、19.3mg/mL (0.970mL) に調製した。この溶液にEndoS溶液 (PBS、7.52mg/mL) を0.0124mL加え、37℃で2時間インキュベートした。Agilent 2100 バイオアナライザを用いて糖鎖が切断されたことを確認した後、GST及びProtein Aカラム (AKTA) で精製した。目的物のフラクションをPB6.0に置換し、(Fuc α 1, 6) GlcNAc-MHT1221抗体 (20.0mg/mL, 0.921mL) を得た。

[0202] 工程2: 糖鎖改変MHT1221抗体の調製

上記工程1にて得られた (Fuc α 1, 6) GlcNAc-MHT1221抗体 (PB6.0) (20.0mg/mL, 0.921mL) 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-(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12) 溶液 (PB6.0) (50.0mg/mL, 0.0561 mL) と、GST-EndoS D233Q/Q303L溶液 (WO2017/010559号) (PBS) (5.00mg/mL, 0.0738 mL) 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及びCHTカラム (AKTA) にて精製した。目的物を含むフラクションを 10 mM酢酸緩衝溶液、5%ソルビトール pH5.5 (以下ABS) に置換し、糖鎖改変MHT1221抗体 (10.6mg/mL, 1.50 mL) を得た。

[0203] [化4]



[0204] iii) リンカー2

構造式中の (m, n) が (1, 0) 及び/又は (0, 1) の成分を含む。

[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にて得られた糖鎖改変MHT1221 (ABS) (10.6 mg/mL, 0.500 mL) に、室温にて1, 2-プロパンジオール (0.479 mL)、リンカー2の10 mMジメチルスルホキシド溶液 (0.0210 mL; 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。

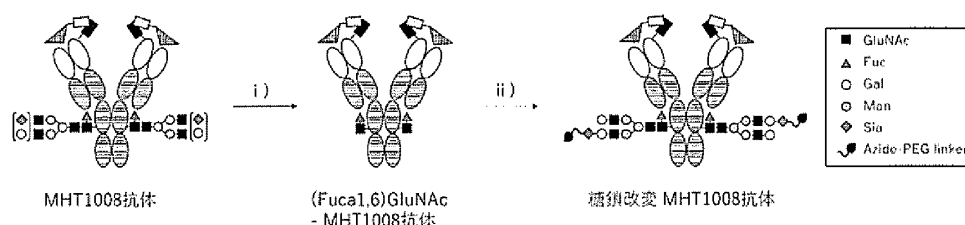
[0206] 精製操作：上記溶液を共通操作Dで2回精製し、MHT1221-PBD-ADC溶液を2.50 mL得た。

特性評価：共通操作E, Fを用いて下記の特性値を得た。

[0207] 抗体濃度：1.62 mg/mL, 抗体収量：4.06 mg (77%), 抗体一分子あたりの薬物平均結合数 (n) : 1.9。

[0208] 10) -4 MHT1008-PBD-ADCの合成

[0209] [化5]



[0210] i) EndoS酵素

ii) EndoS (D233Q/Q303L) 酵素, 糖鎖オキサゾリン

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12)。

[0211] 工程1: (Fuc α 1, 6)GlcNAc-MHT1008抗体の調製

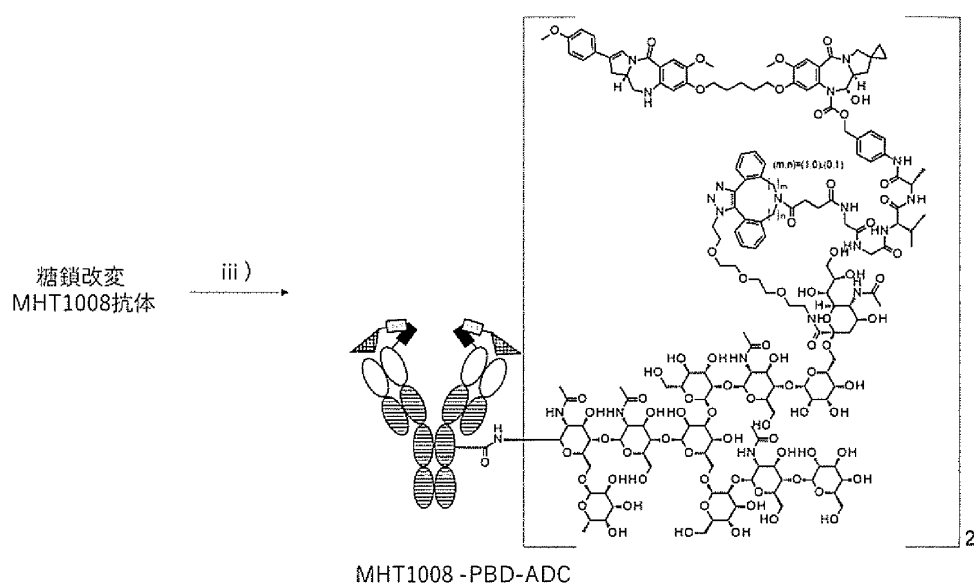
実施例4で調製したMHT1008抗体溶液をPB6.0でバッファー交

換し、 $ca. 16.6 \text{ mg/mL}$ (0.880 mL) に調製した。上記実施例 10) - 3 の工程 1 と同様の操作を行い、 $(\text{Fuc}\alpha 1, 6) \text{ GlcNAc-MHT1008}$ 抗体溶液 (PB6.0) (16.8 mg/mL , 0.800 mL) を得た。

[0212] 工程 2 : 糖鎖改変 MHT1008 抗体の調製

上記工程 1 で得られた 16.8 mg/mL $(\text{Fuc}\alpha 1, 6) \text{ GlcNAc-MHT1008}$ 抗体溶液 (PB6.0) (0.800 mL) を用いて、実施例 10) - 3 の工程 2 と同様の操作を行うことによって、糖鎖改変 MHT1008 抗体 (ABS) (11.4 mg/mL , 1.00 mL) を得た。

[0213] [化6]



[0214] iii) リンカー 2

構造式中の (m, n) が $(1, 0)$ 及び/又は $(0, 1)$ の成分を含む。

[0215] 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

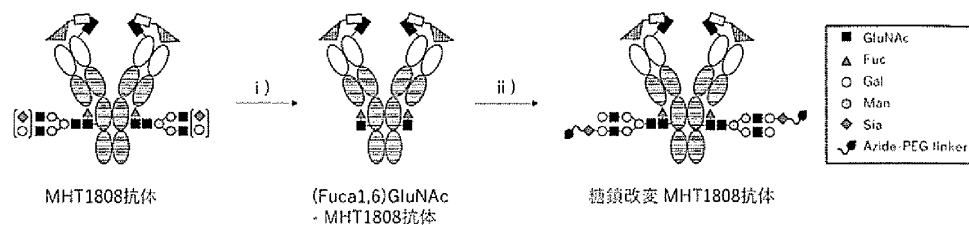
mg/mL, 0.450 mL) を用いて、実施例 10) - 3 の工程 3 と同様の操作を行うことによって、MHT1008-PBD-ADC の溶液 (ABS) を 2.50 mL 得た。

特性評価：共通操作 E, F を用いて下記の特性値を得た。

[0216] 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。

[0217] 10) - 5 MHT1808-PBD-ADC の合成

[0218] [化7]



[0219] i) EndoS 酵素

ii) EndoS (D233Q/Q303L) 酵素, 糖鎖オキサゾリン

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 12)。

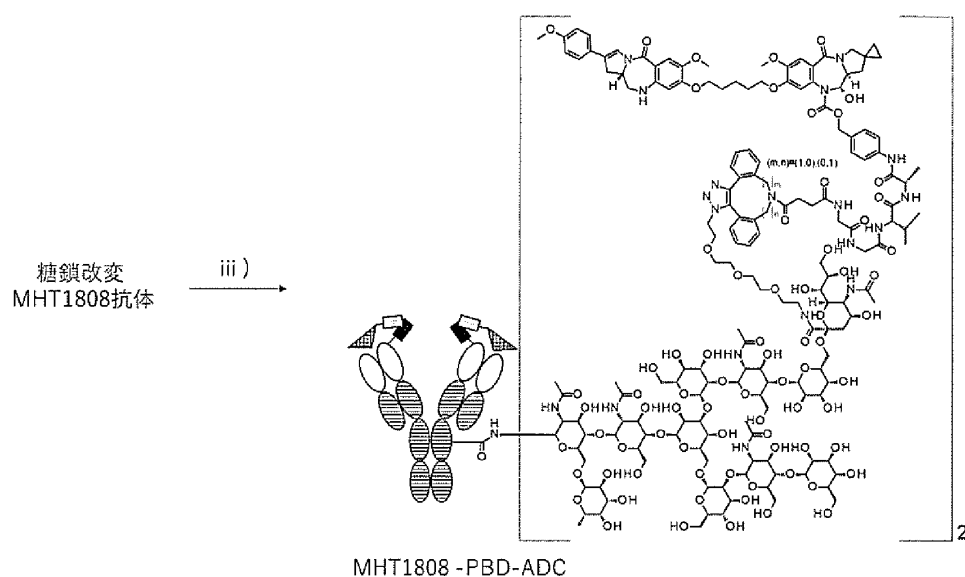
[0220] 工程 1：(Fuca1,6)GluNAc-MHT1808 抗体の調製

実施例 9 で調製した MHT1808 抗体溶液を、PB6.0 でバッファー交換し、ca. 19.1 mg/mL (1.00 mL) に調製した。上記実施例 10) - 3 の工程 1 と同様の操作を行い、(Fuca1,6)GluNAc-MHT1808 抗体溶液 (PB6.0) (17.1 mg/mL, 1.0 mL) を得た。

[0221] 工程 2：糖鎖改変 MHT1808 抗体の調製

上記工程 1 で得られた 17.1 mg/mL (Fuc α 1,6)GlcNAc-MHT1008 抗体溶液 (PB6.0) (1.00 mL) を用いて、実施例 10) - 3 工程 2 と同様の操作を行うことによって、糖鎖改変 MHT1808 抗体 (PBS7.4) (7.0 mg/mL, 1.60 mL) を得た。

[0222] [化8]



[0223] iii) リンカー 2

構造式中の (m, n) が (1, 0) 及び/又は (0, 1) の成分を含む。

[0224] 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 MHT1808 抗体 (PBS7.4) (7.00 mg/mL, 0.450 mL) を用いて、実施例 10) - 3 の工程 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。

特性評価 : 共通操作 E, F を用いて下記の特性値を得た。

[0225] 抗体濃度 : 1.24 mg/mL, 抗体収量 : 4.35 mg (86%), 抗体一分子あたりの薬物平均結合数 (n) : 1.9。

[0226] (実施例 11) 異なる親和性を有する抗CD98抗体のマスク効果

11) - 1 抗CD98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又は、H鎖CDR1に点変異を導入したhM23-M1 (表3、重鎖配列 (配列番号31、図46)、軽鎖配列 (配列番号32、図47)) 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 $2 \mu\text{g/mL}$ に希釈した評価する各抗CD98抗体を $5 \mu\text{L/min}$ で60秒間接触させて固定化した。その後、HBS-EP+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 $30 \mu\text{L/min}$ で90秒間添加し、250秒間乖離を測定するマルチサイクルカインेटクス解析により K_D を算出した。図13 (A) に示すように、hM23H1L1及びhM23-M1の結合親和性 (K_D) はそれぞれ 0.58 nM 、 10.3 nM だった。

11) - 2 抗CD98マスク抗体のマスク効果評価

実施例3と同様の方法でZPZP Lib由来のミモトープを同定し、抗CD98マスク抗体MhM1013 (表3、配列番号33、図48) 及び、hM23-M1の重鎖とMhM1013の軽鎖をもつMhM1013-M1 (表3) を調製した。以下に記載する部分を除き、実施例4、実施例6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。

[0227] 図13(B)に示すように、ミモトープペプチドを融合したMhM1013及び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及び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。

[0228] (実施例12) ADC化する抗CD98マスキ抗体の調製・結合活性評価
Hisクラスターを搭載することで、pH低下依存的にマスキ抗体の殺細胞活性が向上するか検証することを目的に、Hisクラスターを搭載していない抗CD98マスキ抗体MhM1018-M1(表3、配列番号34、図49)及びHisクラスターを搭載したMhM1024-M1(表3、配列番号35、図50)を設計した。実施例1)と同様の方法で各抗体を調製し、実施例8と同様の方法で中性pH条件(pH7.5)、酸性pH条件(pH5.5)におけるヒトCD98抗原に対する結合活性をELISAで評価した。

[0229] 図14に示すように、MhM1018-M1は両pH条件で同等の結合活性を示し、 EC_{50} 比(中性pH条件/酸性pH条件)はそれぞれ1.7だった。一方で、MhM1024-M1は中性pH条件よりも酸性pH条件で強い結合を示し、 EC_{50} 比(中性pH条件/酸性pH条件)は19.2だった。

[0230] (実施例13) ADCの増殖阻害活性評価

TROP2及びCD98陽性細胞のヒト頭頸部癌株であるFaDu(ATCC)は、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。FaDuをE-MEM培地で 2.0×10^4 Cells/mLになるように調整し、96穴用細胞培養用プレートに100 μ Lずつ添加した。細胞添加後、FaDuは37℃、5%CO₂下で一晩培養した。

[0231] 翌日、培養プレートからE-MEM培地を除去し、各pH（7.4、6.5、6.0、5.5）になるように調整したE-MEM培地で300nM、100nM、33.3nM、11.1nM、3.7nM、1.2nM、0.4nMに希釈した抗TROP2マスクPBD-ADCあるいは抗CD98マスクDXd-ADCを100μL添加した。37℃、5%CO₂下で1時間培養した後、抗体を含む培地を除去し、pH7.4に調整したE-MEM培地を100μL添加した。37℃、5%CO₂下で6日間培養した。培養後、培養液と等量のCellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay（Promega）を添加してプレートミキサーで攪拌した。室温で10分間静置後にプレートリーダー（PerkinElmer）で発光量を計測した。

生細胞率は次式で算出した。

$$\text{生細胞率 (\%)} = a \div b \times 100$$

a：被験物質添加ウェルの発光量の平均値

b：培地添加ウェルの発光量の平均値

13) -1 抗TROP2マスクPBD-ADCの殺細胞活性

図15-1（A）に示すように、Hisクラスターを搭載したMHT1808-PBD-ADCは、pH低下依存的に強い増殖阻害活性を示し、EC₅₀比（pH7.4／pH5.5）は10.7だった。また、Hisクラスターを搭載していないMHT1221-PBD-ADCは、いずれの条件でも同等の増殖阻害活性を示し、EC₅₀比（pH7.4／pH5.5）は1.9だった（図15-1（B））。

13) -2 抗CD98マスクDXd-ADCの殺細胞活性

図15-2（C）に示すように、Hisクラスターを搭載したMhM1024-M1-DXd-ADCは、pH低下依存的に強い増殖阻害活性を示し、EC₅₀比（pH7.4／pH5.5）は10.9だった。また、Hisクラスターを搭載していないMhM1018-M1-DXd-ADCは、いずれの条件でも同等の増殖阻害活性を示し、EC₅₀比（pH7.4／pH5.5）は1.9だった（図15-2（D））。

5) は 2.8 だった (図 15-2 (D))。

[0232] (実施例 14) pH 応答性の向上

pH 応答性の向上を目的に、His クラスター近傍に正電荷アミノ酸 (Arg または Lys) を配置した抗 CD98 マスク抗体 MhM1026-M1 (表 5、配列番号 68、図 57)、MhM1028-M1 (表 5、配列番号 69、図 58)、MhM1042-M1 (表 5、配列番号 70、図 59)、MhM1043-M1 (表 5、配列番号 71、図 60)、MhM1044-M1 (表 5、配列番号 72、図 61)、MhM1045-M1 (表 5、配列番号 73、図 62)、MhM1046-M1 (表 5、配列番号 74、図 63) をそれぞれ設計した。実施例 1 の 1) - 1 と同様にマスク抗体を調製し、実施例 5、6 と同様に、中性 pH 条件、酸性 pH 条件での結合活性を ELISA で評価した。

[0233] 図 56-1 (A) に示すように、pH 7.5 の条件では MhM1026-M1、MhM1028-M1、MhM1042-M1、MhM1043-M1 は同様の結合活性を示した。その一方 pH 5.5 の条件では、MhM1028-M1、MhM1042-M1、MhM1043-M1 が MhM1026-M1 よりも強い結合活性を示した (図 56-1 (B))。MhM1026-M1 の値を 1 として EC₅₀ 比 (中性 pH 条件 / 酸性 pH 条件) を比較した結果、His クラスター近傍に Arg を配置することで、4.0 - 5.2 倍 pH 応答性が向上することが示された (表 5)。

[0234] 同様に、His クラスター近傍に Lys を配置した MhM1044-M1、MhM1045-M1、MhM1046-M1 の結合活性を MhM1026-M1 と比較した結果、図 56-2 (C)、(D) に示すように、pH 条件によらず全てのクローンは同様の結合活性を示した。また、MhM1026-M1 の値を 1 として EC₅₀ 比を比較した結果、クローン間で変化が無かった (表 5)。

[0235]

[表5]

表5 抗CD98マスク抗体のアミノ酸配列情報とE C₅₀比の比較

マスク抗体名	重鎖配列	軽鎖配列	E C ₅₀ 比 の比較
MhM1026-M1	hM23-M1 (配列番号31、図46)	MhM1026 (配列番号68、図57)	1
MhM1028-M1	hM23-M1 (配列番号31、図46)	MhM1028 (配列番号69、図58)	5.2
MhM1042-M1	hM23-M1 (配列番号31、図46)	MhM1042 (配列番号70、図59)	4.3
MhM1043-M1	hM23-M1 (配列番号31、図46)	MhM1043 (配列番号71、図60)	4.0
MhM1044-M1	hM23-M1 (配列番号31、図46)	MhM1044 (配列番号72、図61)	1.1
MhM1045-M1	hM23-M1 (配列番号31、図46)	MhM1045 (配列番号73、図62)	1.0
MhM1046-M1	hM23-M1 (配列番号31、図46)	MhM1046 (配列番号74、図63)	1.1

産業上の利用可能性

[0236] 本発明の環境応答性マスク抗体は各種がんの治療等に使用することができる。

配列表フリーテキスト

[0237] 配列番号1：抗TROP2抗体の重鎖アミノ酸配列（図16）

配列番号2：抗TROP2抗体の軽鎖アミノ酸配列（図17）

配列番号3：MHT1001のアミノ酸配列（図18）

配列番号4：MHT1002のアミノ酸配列（図19）

配列番号5：HT1-11-scFv-HLのアミノ酸配列（図20）

配列番号6：HT1-11-scFv-LHのアミノ酸配列（図21）

配列番号7：MHT1007の重鎖アミノ酸配列（図22）

配列番号8：MHT1008の重鎖アミノ酸配列（図23）

配列番号9：MHT1009の重鎖アミノ酸配列（図24）

配列番号10：MHT1803の重鎖アミノ酸配列（図25）

- 配列番号 11 : M H T 1 8 0 4 の重鎖アミノ酸配列 (図 2 6)
- 配列番号 12 : M H T 1 8 0 5 の重鎖アミノ酸配列 (図 2 7)
- 配列番号 13 : M H T 1 8 0 6 の重鎖アミノ酸配列 (図 2 8)
- 配列番号 14 : M H T 1 8 0 8 の重鎖アミノ酸配列 (図 2 9)
- 配列番号 15 : M H T 1 8 0 9 の重鎖アミノ酸配列 (図 3 0)
- 配列番号 16 : H M T 1 8 1 0 の重鎖アミノ酸配列 (図 3 1)
- 配列番号 17 : M H T 1 8 1 1 の重鎖アミノ酸配列 (図 3 2)
- 配列番号 18 : M H T 1 8 1 7 の重鎖アミノ酸配列 (図 3 3)
- 配列番号 19 : M H T 1 8 1 8 の重鎖アミノ酸配列 (図 3 4)
- 配列番号 20 : M H T 1 8 1 9 の重鎖アミノ酸配列 (図 3 5)
- 配列番号 21 : 抗 C D 9 8 抗体 h M 2 3 H 1 L 1 の重鎖アミノ酸配列 (図 3 6)
- 配列番号 22 : 抗 C D 9 8 抗体 h M 2 3 H 1 L 1 の軽鎖アミノ酸配列 (図 3 7)
- 配列番号 23 : 抗 E G F R 抗体 c e t u x i m a b の重鎖アミノ酸配列 (図 3 8)
- 配列番号 24 : 抗 E G F R 抗体 c e t u x i m a b の軽鎖アミノ酸配列 (図 3 9)
- 配列番号 25 : 抗 G P R C 5 D 抗体 C 3 0 2 2 の重鎖アミノ酸配列 (図 4 0)
- 配列番号 26 : 抗 G P R C 5 D 抗体 C 3 0 2 2 の軽鎖アミノ酸配列 (図 4 1)
- 配列番号 27 : M h M 8 0 0 1 の軽鎖アミノ酸配列 (図 4 2)
- 配列番号 28 : M C E - 2 1 0 1 の軽鎖アミノ酸配列 (図 4 3)
- 配列番号 29 : M C 3 - 9 0 0 1 の重鎖アミノ酸配列 (図 4 4)
- 配列番号 30 : M H T 1 2 2 1 の重鎖アミノ酸配列 (図 4 5)
- 配列番号 31 : h M 2 3 - M 1 の重鎖アミノ酸配列 (図 4 6)
- 配列番号 32 : h M 2 3 - M 1 の軽鎖アミノ酸配列 (図 4 7)

配列番号33 : M h M 1 O 1 3 の軽鎖アミノ酸配列 (図48)

配列番号34 : M h M 1 O 1 8 - M 1 の軽鎖アミノ酸配列 (図49)

配列番号35 : M h M 1 O 2 4 - M 1 の軽鎖アミノ酸配列 (図50)

配列番号36 : ヒト u P A が認識し、その基質となるアミノ酸配列 (図51)

配列番号37 : ヒト u P A が認識し、その基質となるアミノ酸配列 (図51)

配列番号38 : ヒト u P A が認識し、その基質となるアミノ酸配列 (図51)

配列番号39 : ヒト M M P 1 が認識し、その基質となるアミノ酸配列 (図51)

配列番号40 : ヒト M M P 1 が認識し、その基質となるアミノ酸配列 (図51)

配列番号41 : ヒト M M P 9 が認識し、その基質となるアミノ酸配列 (図51)

配列番号42 : 第2ペプチドのアミノ酸配列 (図52)

配列番号43 : 第2ペプチドのアミノ酸配列 (図52)

配列番号44 : 第2ペプチドのアミノ酸配列 (図52)

配列番号45 : ヒト G P R C 5 D アミノ末端ペプチドのアミノ酸配列 (図53)

配列番号46 : 第2ペプチドのアミノ酸配列 (図54)

配列番号47 : 第2ペプチドのアミノ酸配列 (図54)

配列番号48 : 第2ペプチドのアミノ酸配列 (図54)

配列番号49 : 第2ペプチドのアミノ酸配列 (図54)

配列番号50 : 第2ペプチドのアミノ酸配列 (図54)

配列番号51 : 第2ペプチドのアミノ酸配列 (図54)

配列番号52 : 第2ペプチドのアミノ酸配列 (図54)

配列番号53 : 第2ペプチドのアミノ酸配列 (図54)

- 配列番号 54 : 第2ペプチドのアミノ酸配列 (図54)
- 配列番号 55 : 第2ペプチドのアミノ酸配列 (図54)
- 配列番号 56 : 第2ペプチドのアミノ酸配列 (図54)
- 配列番号 57 : 第2ペプチドのアミノ酸配列 (図54)
- 配列番号 58 : 第2ペプチドのアミノ酸配列 (図54)
- 配列番号 59 : 第2ペプチドのアミノ酸配列 (図54)
- 配列番号 60 : 第2ペプチドのアミノ酸配列 (図54)
- 配列番号 61 : 第2ペプチドのアミノ酸配列 (図54)
- 配列番号 62 : 第2ペプチドのアミノ酸配列 (図54)
- 配列番号 63 : 第2ペプチドのアミノ酸配列 (図54)
- 配列番号 64 : 第2ペプチドのアミノ酸配列 (図54)
- 配列番号 65 : 第2ペプチドのアミノ酸配列 (図54)
- 配列番号 66 : 第2ペプチドのアミノ酸配列 (図54)
- 配列番号 67 : ヒトCAPN1が認識し、その基質となるアミノ酸配列 (図55)
- 配列番号 68 : MhM1026-M1の軽鎖アミノ酸配列 (図57)
- 配列番号 69 : MhM1028-M1の軽鎖アミノ酸配列 (図58)
- 配列番号 70 : MhM1042-M1の軽鎖アミノ酸配列 (図59)
- 配列番号 71 : MhM1043-M1の軽鎖アミノ酸配列 (図60)
- 配列番号 72 : MhM1044-M1の軽鎖アミノ酸配列 (図61)
- 配列番号 73 : MhM1045-M1の軽鎖アミノ酸配列 (図62)
- 配列番号 74 : MhM1046-M1の軽鎖アミノ酸配列 (図63)
- 配列番号 75 : 第2ペプチドのアミノ酸配列 (図64)
- 配列番号 76 : 第2ペプチドのアミノ酸配列 (図64)
- 配列番号 77 : 第2ペプチドのアミノ酸配列 (図64)
- 配列番号 78 : 第2ペプチドのアミノ酸配列 (図64)
- 配列番号 79 : 第2ペプチドのアミノ酸配列 (図64)
- 配列番号 80 : 第2ペプチドのアミノ酸配列 (図64)

配列番号 8 1 : 第 2 ペプチドのアミノ酸配列 (図 6 4)

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〕部分を含んでなる、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 pH 7.5以下の範囲でpHが中性条件から酸性条件に変化することに応じて電荷が無電荷から正電荷に変化するアミノ酸を含むアミノ酸配列からなる第2ペプチド。
- [請求項2] 酸性条件下において、中性条件下と比較して、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に記載の分子。
- [請求項3] 〔a〕部分、〔b〕部分及び〔c〕部分をそれぞれ1つ又は2つ以上含む、請求項1又は2に記載の分子。
- [請求項4] 〔a〕部分、〔b〕部分及び〔c〕部分をそれぞれ1つ又は2つ以上含む、〔a〕部分、〔b〕部分及び〔c〕部分のそれぞれの数が互いに同一である、請求項1～3のいずれか1つに記載の分子。
- [請求項5] 〔a〕部分、〔b〕部分及び〔c〕部分をそれぞれ2つずつ含む、請求項1又は2に記載の分子。
- [請求項6] 第2ペプチドが、pH 7.5以下の範囲でpHが中性条件から酸性条件に変化することに応じて電荷が無電荷から正電荷に変化するアミノ酸を4つ以上含む、且つ第2ペプチドのpI値が6.4を超えるアミノ酸配列からなる、請求項1～5のいずれか1つに記載の分子。
- [請求項7] 第2ペプチドが、pH 7.5以下の範囲でpHが中性条件から酸性条件に変化することに応じて電荷が無電荷から正電荷に変化するアミノ酸を4つ以上含む、且つ第2ペプチドのpI値が6.8以上であるアミノ酸配列からなる、請求項1～6のいずれか1つに記載の分子。
- [請求項8] 第2ペプチドが、pH 7.5以下の範囲でpHが中性条件から酸性条件に変化することに応じて電荷が無電荷から正電荷に変化するアミ

ノ酸を4つ以上含み、且つ第2ペプチドのpI値が7.2以上であるアミノ酸配列からなる、請求項1～7のいずれか1つに記載の分子。

[請求項9] 第2ペプチドが、pH7.5以下の範囲でpHが中性条件から酸性条件に変化することに応じて電荷が無電荷から正電荷に変化するアミノ酸を4つ以上含み、且つ第2ペプチドのpI値が7.6以上であるアミノ酸配列からなる、請求項1～8のいずれか1つに記載の分子。

[請求項10] 第2ペプチドが、pHが酸性条件において負電荷を有するアミノ酸を含まないアミノ酸配列からなる、請求項1～9のいずれか1つに記載の分子。

[請求項11] 第2ペプチドが、アスパラギン酸及び／又はグルタミン酸を含まないアミノ酸配列からなる、請求項1～10のいずれか1つに記載の分子。

[請求項12] 第2ペプチドが、以下の(1)及び(2)の構造を有するアミノ酸配列からなる、請求項1～11のいずれか1つに記載の分子：

(1) (a) 2つ以上の連続するpKaが7以下の塩基性官能基を側鎖に有するアミノ酸からなるアミノ酸配列、又は(b) (a)のアミノ酸配列の任意の位置(アミノ末端又はカルボキシル末端を含む)に1つのアルギニン若しくはリシンが挿入若しくは付加されたアミノ酸配列((a)のアミノ酸配列及び(b)のアミノ酸配列を塩基性アミノ酸クラスターという。)を1つ以上含み、且つ、

(2) 前記のpKaが7以下の塩基性官能基を側鎖に有するアミノ酸を計4つ以上含む。

[請求項13] 第2ペプチドが、以下の(1)及び(2)の構造を有するアミノ酸配列からなる、請求項1～12のいずれか1つに記載の分子：

(1) 2つ以上の連続するpKaが7以下の塩基性官能基を側鎖に有するアミノ酸からなるアミノ酸配列の任意の位置(アミノ末端又はカルボキシル末端を含む)に1つのアルギニンが挿入若しくは付加されたアミノ酸配列を1つ以上含み、且つ、

(2) 前記の pK_a が 7 以下の塩基性官能基を側鎖に有するアミノ酸を計 4 つ以上含む。

[請求項14] 第2ペプチドが、以下の(1)及び(2)の構造を有するアミノ酸配列からなる、請求項1～13のいずれか1つに記載の分子：

(1) 2つ以上の連続する pK_a が 7 以下の塩基性官能基を側鎖に有するアミノ酸からなるアミノ酸配列の任意の位置（アミノ末端又はカルボキシル末端を含む）に1つのアルギニンが挿入若しくは付加されたアミノ酸配列を1つ含み、且つ、

(2) 前記の pK_a が 7 以下の塩基性官能基を側鎖に有するアミノ酸を計 4 つ以上含む。

[請求項15] 第2ペプチドが、以下の(1)及び(2)の構造を有するアミノ酸配列からなる、請求項1～14のいずれか1つに記載の分子：

(1) RHHHで表されるアミノ酸配列を1つ含み、且つ、

(2) 前記の pK_a が 7 以下の塩基性官能基を側鎖に有するアミノ酸を計 4 つ以上含む。

[請求項16] 第2ペプチドが、2つ以上の連続する pK_a が 7 以下の塩基性官能基を側鎖に有するアミノ酸を1つ以上含み、且つ該 pK_a が 7 以下の塩基性官能基を側鎖に有するアミノ酸を計 4 つ以上含むアミノ酸配列からなる、請求項1～12のいずれか1つに記載の分子。

[請求項17] 第2ペプチドが、 pK_a が 7 以下の塩基性官能基を側鎖に有するアミノ酸を1つ置きに有するアミノ酸配列を含むアミノ酸配列で表される構造からなる、請求項1～11のいずれか1つに記載の分子。

[請求項18] 塩基性官能基の pK_a が 5.0～7.0である、請求項12～17のいずれか1つに記載の分子。

[請求項19] 塩基性官能基の pK_a が 5.5～6.5である、請求項12～18のいずれか1つに記載の分子。

[請求項20] pK_a が 7 以下の塩基性官能基を側鎖に有するアミノ酸が天然アミノ酸である、請求項12～19のいずれか1つに記載の分子。

- [請求項21] p K a が 7 以下の塩基性官能基を側鎖に有するアミノ酸が非天然アミノ酸である、請求項 1 2 ～ 1 9 のいずれか 1 つに記載の分子。
- [請求項22] p K a が 7 以下の塩基性官能基を側鎖に有するアミノ酸がヒスチジンである、請求項 1 2 ～ 2 0 のいずれか 1 つに記載の分子。
- [請求項23] 第 2 ペプチドが塩基性アミノ酸クラスターを 1 ～ 4 個含むアミノ酸配列からなる、請求項 1 ～ 2 2 のいずれか 1 つに記載の分子。
- [請求項24] 第 2 ペプチドが 1 0 ～ 6 0 個のアミノ酸からなる、請求項 1 ～ 2 3 のいずれか 1 つに記載の分子。
- [請求項25] 第 2 ペプチドが 1 2 ～ 5 0 個のアミノ酸からなる、請求項 1 ～ 2 4 のいずれか 1 つに記載の分子。
- [請求項26] 第 2 ペプチドが 1 5 ～ 4 0 個のアミノ酸からなる、請求項 1 ～ 2 5 のいずれか 1 つに記載の分子。
- [請求項27] 第 2 ペプチドが 2 0 ～ 3 5 個のアミノ酸からなる、請求項 1 ～ 2 6 のいずれか 1 つに記載の分子。
- [請求項28] 第 2 ペプチドが配列番号 4 9 乃至 5 3、5 5、5 9 乃至 6 1、6 5、6 6、7 5 乃至 8 1 (図 5 4 及び 6 4) のいずれか一つで示されるアミノ酸配列を含む、請求項 1 ～ 1 6 及び 1 8 ～ 2 7 のいずれか 1 つに記載の分子。
- [請求項29] 第 2 ペプチドが配列番号 5 4 (図 5 4) で示されるアミノ酸配列を含む、請求項 1 7 ～ 2 7 のいずれか 1 つに記載の分子。
- [請求項30] E C₅₀ 比が 3 以上である請求項 1 ～ 2 9 のいずれか 1 つに記載の分子。
- [請求項31] E C₅₀ 比が 1 0 以上である請求項 1 ～ 3 0 のいずれか 1 つに記載の分子。
- [請求項32] E C₅₀ 比が 3 0 以上である請求項 1 ～ 3 1 のいずれか 1 つに記載の分子。
- [請求項33] 第 2 ペプチドが 1 0 個以下の p K a が 7 以下の塩基性官能基を側鎖に有するアミノ酸を含むアミノ酸配列からなる、請求項 1 ～ 3 2 のい

ずれか 1 つに記載の分子。

[請求項34] 第2ペプチドのアミノ酸配列に2つ以上の塩基性アミノ酸クラスターが含まれ、1つの塩基性アミノ酸クラスターが該アミノ酸配列のアミノ末端又はカルボキシル末端に位置し、且つ他のいずれの塩基性アミノ酸クラスターも該アミノ酸配列のアミノ末端又はカルボキシル末端に位置しない、請求項1～33のいずれか1つに記載の分子。

[請求項35] 第2ペプチドのアミノ酸配列に2つ以上の塩基性アミノ酸クラスターが含まれ、1つの塩基性アミノ酸クラスターが該アミノ酸配列のアミノ末端に位置し、且つ他の1つの塩基性アミノ酸クラスターがカルボキシル末端に位置する、請求項1～33のいずれか1つに記載の分子。

[請求項36] 第2ペプチドのアミノ酸配列に含まれるいずれの塩基性アミノ酸クラスターも、該アミノ酸配列のアミノ末端に位置せず且つカルボキシル末端に位置しない、請求項1～33のいずれか1つに記載の分子。

[請求項37] 第2ペプチドのアミノ酸配列に細胞内及び／又は細胞外のプロテアーゼにより切断されるアミノ酸配列及び塩基性アミノ酸クラスターを含むアミノ酸配列を含み、該アミノ酸配列が、

(1) アミノ末端からカルボキシル末端に向かって、塩基性アミノ酸クラスターを含むアミノ酸配列、細胞内及び／又は細胞外のプロテアーゼにより切断されるアミノ酸配列の順に連結してなる、又は

(2) カルボキシル末端からアミノ末端に向かって、細胞内及び／又は細胞外のプロテアーゼにより切断されるアミノ酸配列、塩基性アミノ酸クラスターを含むアミノ酸配列の順に連結してなる、

請求項1～34又は36のいずれか1つに記載の分子。

[請求項38] 第2ペプチドのアミノ酸配列に含まれる pK_a が7以下の塩基性官能基を側鎖に有するアミノ酸数が、該アミノ酸配列に含まれる全アミノ酸数の5%以上、30%以下である、請求項12～37のいずれか1つに記載の分子。

- [請求項39] 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1～38のいずれか1つに記載の分子。
- [請求項40] 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1～39のいずれか1つに記載の分子。
- [請求項41] ポリペプチドからなる、請求項1～40のいずれか1つに記載の分子。
- [請求項42] 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に結合してなる、請求項41に記載の分子。
- [請求項43] 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又はスペーサーを介して結合している、請求項1～42のいずれか1つに記載の分子。
- [請求項44] 酸性条件がpH6.5以下である、請求項1～43のいずれか1つに記載の分子。
- [請求項45] 酸性条件がpH6.0以下である、請求項1～44のいずれか1つに記載の分子。
- [請求項46] 酸性条件がpH5.5以下である、請求項1～45のいずれか1つに記載の分子。
- [請求項47] 標的抗原が腫瘍組織、エンドソーム又はリソソームに存在する抗原である、請求項1～46のいずれか1つに記載の分子。
- [請求項48] 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1～47のいずれか1つに記載の分子。
- [請求項49] 〔d〕部分が、標的抗原に結合する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48に記載の分子。

[請求項50] 抗腫瘍性化合物が、カンプトテシン誘導体又はpyrrollobenzodiazepine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、請求項49に記載の分子。

[請求項51] 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49に記載の分子。

[請求項52] 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48～51のいずれか1つに記載の分子。

[請求項53] 第1ペプチドが、下記工程(i)～(iii)を含む方法により得られる、請求項1～52のいずれか1つに記載の分子：

(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請求項1記載の標的抗原に結合する部分に接触させる工程；

(ii) 該標的抗原に結合する部分に結合するペプチドを回収する工程；及び

(iii) 得られたペプチドを組換え、化学合成又はペプチド合成により調製する工程。

[請求項54] 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1～52のいずれか1つに記載の分子の製造方法。

[請求項55] 請求項54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56] 下記 (i v) 記載の工程を含む、請求項41、42又は52のいずれか1つに記載の分子の製造方法。
- (i v) 標的抗原に結合する部分に含まれるアミノ酸配列、並びに、任意で (optionally)、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57] 請求項56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58] 請求項1～53、55及び57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59] 抗がん剤である、請求項58に記載の医薬組成物。
- [請求項60] 標的抗原に結合する分子の中性pH条件における抗原結合活性を酸性pH条件における抗原結合活性より弱くすることにより、第2ペプチドがpH7.5以下の範囲でpHの中性条件から酸性条件に変化することに応じて電荷が無電荷から正電荷に変化するアミノ酸を含まない分子と比較して、被投与者に対する標的抗原に結合する分子の毒性が低減されている請求項58又は59に記載の医薬組成物。
- [請求項61] 標的抗原に結合する分子の中性pH条件における抗原結合活性を酸性pH条件における抗原結合活性より弱くすることにより、第2ペプチドがpH7.5以下の範囲でpHの中性条件から酸性条件に変化することに応じて電荷が無電荷から正電荷に変化するアミノ酸を含まない分子と比較して、被投与者に対する標的抗原に結合する分子の血中濃度が向上されている請求項58又は59に記載の医薬組成物。
- [請求項62] 請求項1～53、55及び57のいずれか1つに記載の分子又は請求項58に記載の医薬組成物を含む検査薬、診断薬又は試薬。

- [請求項63] 請求項4 1 又は5 2 に記載の分子のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド。
- [請求項64] 請求項6 3 に記載のポリヌクレオチドを含むベクター。
- [請求項65] 請求項6 3 に記載のポリヌクレオチド若しくは請求項6 4 に記載のベクターを含むか又は請求項4 1 又は5 2 に記載の分子を産生する細胞。