

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2025-512798
(P2025-512798A)

(43)公表日 令和7年4月22日(2025.4.22)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
C 0 7 K	19/00 (2006.01)	C 0 7 K	19/00	Z N A	4 B 0 6 4
C 0 7 K	16/00 (2006.01)	C 0 7 K	16/00		4 B 0 6 5
C 0 7 K	16/46 (2006.01)	C 0 7 K	16/46		4 C 0 7 6
C 1 2 N	15/62 (2006.01)	C 1 2 N	15/62	Z	4 C 0 8 4
C 1 2 N	15/13 (2006.01)	C 1 2 N	15/13		4 C 0 8 5
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全95頁) 最終頁に続く
(21)出願番号	特願2024-556449(P2024-556449)			(71)出願人	510046457
(86)(22)出願日	令和5年3月24日(2023.3.24)				サイトムエックス セラピューティクス
(85)翻訳文提出日	令和6年11月11日(2024.11.11)				, インク.
(86)国際出願番号	PCT/US2023/064937				C y t o m X T h e r a p e u t i c
(87)国際公開番号	WO2023/183923				s , I n c .
(87)国際公開日	令和5年9月28日(2023.9.28)				アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 4
(31)優先権主張番号	63/323,718				0 8 0 , サウス サンフランシスコ, オ
(32)優先日	令和4年3月25日(2022.3.25)				イスター ポイント ブールバード 1 5
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)				1 , スイート 4 0 0
(81)指定国・地域	AP(BW,CV,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ				1 5 1 O y s t e r P o i n t B o
	,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),				u l e v a r d , S u i t e 4 0 0 ,
	EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(				S o u t h S a n F r a n c i s c o
	AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,				, C a l i f o r n i a , 9 4 0 8 0
	FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV				U . S . A .
	最終頁に続く			(74)代理人	100198915
					最終頁に続く

(54)【発明の名称】 活性化可能な二重アンカー型マスク化分子及びその使用方法

(57)【要約】

本明細書では、標的に特異的に結合する標的結合タンパク質（T B）と、T Bに結合されたマスク部分（M M）であって、M MとT Bとが、非アルファ炭素共有結合によってテザリングされており、活性化可能な標的結合タンパク質が不活性状態にあるときに、M MがT Bの標的への結合を阻害する、M Mと、T Bに結合された切断可能な部分（C M）であって、C Mが、プロテアーゼの基質として機能するポリペプチドであり、T BとM Mとの間に位置付けられる、C Mと、を含む活性化可能な標的結合タンパク質が提供される。

【選択図】 図 3 C

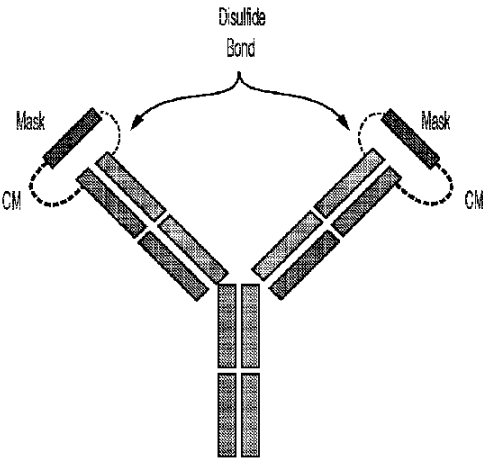


FIG. 3C

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

標的に特異的に結合する標的結合タンパク質（ＴＢ）と、

前記ＴＢに結合されたマスキング部分（ＭＭ）であって、前記ＭＭが前記ＡＢの前記標的への結合を阻害する、前記ＭＭと、

前記ＴＢに結合され、前記ＴＢと前記ＭＭとの間に位置する切断可能な部分（ＣＭ）であって、前記ＣＭが、プロテアーゼの基質として機能するポリペプチドである、前記ＣＭと、

を含む、二重アンカー型の活性化可能な標的結合タンパク質であって、

前記ＭＭと前記ＴＢとをテザリングする非アルファ炭素共有結合をさらに含む、前記活性化可能な標的結合タンパク質。

10

【請求項 2】

前記ＴＢが、抗原結合タンパク質（ＡＢ）である、請求項 1 に記載の活性化可能な標的結合タンパク質。

【請求項 3】

請求項 1 または請求項 2 に記載の活性化可能な標的結合タンパク質であって、前記非アルファ炭素共有結合を欠く単一アンカー型の活性化可能な標的結合タンパク質と比較して低い標的結合活性を有する、前記活性化可能な標的結合タンパク質。

【請求項 4】

前記非アルファ炭素共有結合が、エステル結合またはチオエステル結合である、請求項 1 ～ 3 のいずれか 1 項に記載の活性化可能な標的結合タンパク質。

20

【請求項 5】

前記エステル結合が、スレオニンとグルタミンとの間にある、請求項 4 に記載の活性化可能な標的結合タンパク質。

【請求項 6】

前記チオエステル結合が、システインとグルタミンまたはチロシンとの間にある、請求項 4 に記載の活性化可能な標的結合タンパク質。

【請求項 7】

前記非アルファ炭素共有結合が、ヒスチジンとチロシンとの間の架橋、またはリジンとシステインとの間の架橋である、請求項 1 ～ 3 のいずれか 1 項に記載の活性化可能な標的結合タンパク質。

30

【請求項 8】

前記非アルファ炭素共有結合が、イソペプチド結合である、請求項 1 ～ 3 のいずれか 1 項に記載の活性化可能な標的結合タンパク質。

【請求項 9】

前記イソペプチド結合が、リジンとグルタミン酸残基またはアスパラギン酸残基との間にある、請求項 8 に記載の活性化可能な標的結合タンパク質。

【請求項 10】

前記イソペプチド結合が、グルタミンのガンマカルボキシアミド基とリジン側鎖のイブシロニアミノ基との間にある、請求項 8 に記載の活性化可能な標的結合タンパク質。

40

【請求項 11】

前記非アルファ炭素共有結合が、ジスルフィド結合である、請求項 1 ～ 3 のいずれか 1 項に記載の活性化可能な標的結合タンパク質。

【請求項 12】

前記ジスルフィド結合が、第 1 のシステインと第 2 のシステインとの間に形成され、

前記第 1 のシステインが前記ＭＭ内にあり、前記第 2 のシステインが前記ＴＢ内にある、

、

前記第 1 のシステインが、前記ＭＭに結合されたペプチド内にあり、前記第 2 のシステインが前記ＴＢ内にある、または

前記第 1 のシステインが前記ＭＭ内にあり、前記第 2 のシステインが、前記ＴＢに結合

50

されたペプチド内にある、請求項 11 に記載の活性化可能な標的結合タンパク質。

【請求項 13】

さらに、第 2 の CM を含み、

前記第 2 の CM が前記 MM と前記非アルファ炭素共有結合との間に位置する、

前記第 2 の CM が、前記 MM 内にあり、前記非アルファ炭素共有結合を形成するシステインから最大で 5 アミノ酸離れている、または

前記第 2 の CM が、前記 TB 内にあり、前記非アルファ炭素共有結合を形成するシステインから最大で 5 アミノ酸離れた位置にある、請求項 1～12 のいずれか 1 項に記載の活性化可能な標的結合タンパク質。

【請求項 14】

前記第 1 の CM と前記第 2 の CM とが、異なるプロテアーゼの基質である、請求項 1～13 のいずれか 1 項に記載の活性化可能な標的結合タンパク質。

【請求項 15】

前記第 1 の CM と前記第 2 の CM とが、同じプロテアーゼの基質である、請求項 1～13 のいずれか 1 項に記載の活性化可能な標的結合タンパク質。

【請求項 16】

前記プロテアーゼが、対象の腫瘍によって産生される、請求項 1～12 のいずれか 1 項に記載の活性化可能な標的結合タンパク質。

【請求項 17】

前記 AB が、抗体、Fab 断片、F(ab')₂ 断片、scFv、scAb、dAb、VHH、または単ドメイン抗体である、請求項 2～16 のいずれか 1 項またはいずれかの組み合わせに記載の活性化可能な標的結合タンパク質。

【請求項 18】

前記 AB が、単ドメイン抗体である、請求項 2～17 のいずれか 1 項に記載の活性化可能な標的結合タンパク質。

【請求項 19】

前記 AB が、Fc タグ付き単ドメイン抗体である、請求項 2～18 のいずれか 1 項に記載の活性化可能な標的結合タンパク質。

【請求項 20】

前記 AB が、二重特異性抗体である、請求項 2～17 のいずれか 1 項に記載の活性化可能な標的結合タンパク質。

【請求項 21】

前記二重特異性抗体が、二重特異性 T 細胞エンゲージャー (BiTE) または二重親和性再標的化抗体 (DART) である、請求項 20 に記載の活性化可能な標的結合タンパク質。

【請求項 22】

前記 AB が、多特異性抗体である、請求項 2～17 のいずれか 1 項に記載の活性化可能な標的結合タンパク質。

【請求項 23】

前記非アルファ炭素共有結合が、前記 MM と前記単ドメイン抗体との間にある、請求項 18～19 のいずれか 1 項に記載の活性化可能な標的結合タンパク質。

【請求項 24】

前記非アルファ炭素共有結合が、前記 MM と Fc ドメインとの間にある、請求項 1～22 のいずれか 1 項に記載の活性化可能な標的結合タンパク質。

【請求項 25】

前記 MM が、前記 TB のエピトープを含む、請求項 1～24 のいずれか 1 項に記載の活性化可能な標的結合タンパク質。

【請求項 26】

前記 MM が、前記 TB のエピトープの 4 つ以上の連続したアミノ酸を含まない、請求項 1～24 のいずれか 1 項に記載の活性化可能な標的結合タンパク質。

10

20

30

40

50

【請求項 27】

前記MMが、前記標的に結合するための前記TBの解離定数よりも大きい、前記TBへの結合のための解離定数を有する、請求項1～26のいずれか1項に記載の活性化可能な標的結合タンパク質。

【請求項 28】

前記MMが、2～40アミノ酸長のポリペプチドである、請求項1～27のいずれか1項に記載の活性化可能な標的結合タンパク質。

【請求項 29】

請求項1～28のいずれか1項に記載の活性化可能な標的結合タンパク質であって、前記MMと前記CMとの間にリンカーを含む、前記活性化可能な標的結合タンパク質。

10

【請求項 30】

請求項1～29のいずれか1項に記載の活性化可能な標的結合タンパク質であって、前記CMと前記TBとの間にリンカーを含む、前記活性化可能な標的結合タンパク質。

【請求項 31】

請求項1～29のいずれか1項に記載の活性化可能な標的結合タンパク質であって、前記MMと前記CMとの間の第1のリンカー、及び前記CMと前記TBとの間の第2のリンカーを含む、前記活性化可能な標的結合タンパク質。

【請求項 32】

請求項1～31のいずれか1項に記載の活性化可能な標的結合タンパク質と、担体と、を含む、組成物。

20

【請求項 33】

請求項32に記載の組成物であって、医薬組成物である、前記組成物。

【請求項 34】

請求項32または請求項33に記載の組成物の少なくとも1回の用量を含む、容器、バイアル、シリンジ、注射ペン、またはキット。

【請求項 35】

請求項1～31のいずれか1項に記載の活性化可能な標的結合タンパク質をコードする配列を含む、核酸。

【請求項 36】

請求項35に記載の核酸を含む、ベクター。

30

【請求項 37】

請求項35に記載の核酸、または請求項36に記載のベクターを含む、細胞。

【請求項 38】

薬剤にコンジュゲートされた、請求項1～31のいずれか1項に記載の活性化可能な標的結合タンパク質を含む、コンジュゲートされた活性化可能な標的結合タンパク質。

【請求項 39】

前記薬剤が、治療剤、標的指向性部分、または検出可能部分である、請求項38に記載のコンジュゲートされた活性化可能な標的結合タンパク質。

【請求項 40】

治療を必要とする対象を治療する方法であって、前記対象に、治療有効量の、請求項1～31のいずれか1項に記載の活性化可能な標的結合タンパク質、請求項32または請求項33に記載の組成物、あるいは請求項38または請求項39に記載のコンジュゲートされた活性化可能な標的結合タンパク質を投与することを含む、前記方法。

40

【請求項 41】

前記対象が、がん、炎症状態、障害もしくは疾患、または自己免疫状態、障害もしくは疾患を有すると特定または診断されている、請求項40に記載の方法。

【請求項 42】

活性化可能な標的結合タンパク質を生産する方法であって、

前記活性化可能な標的結合タンパク質を生産するのに十分な条件下で、培養基中で、請求項37に記載の細胞を培養することと、

50

前記細胞または前記培養基から前記活性化可能な標的結合タンパク質を回収することと、を含む、前記方法。

【請求項 4 3】

前記細胞または前記培養基から回収した前記活性化可能な標的結合タンパク質を単離することをさらに含む、請求項 4 2 に記載の方法。

【請求項 4 4】

前記単離することが、タンパク質精製タグ及び／またはサイズ排除クロマトグラフィーを使用して行われる、請求項 4 3 に記載の方法。

【請求項 4 5】

前記活性化可能な標的結合タンパク質を医薬組成物に調合することをさらに含む、請求項 4 3 または請求項 4 4 に記載の方法。

【請求項 4 6】

二重アンカー型の活性化可能な高分子を生産する方法であって、前記二重アンカー型の活性化可能な高分子のマスキング部分（MM）におけるジスルフィド結合部位にあるシステイン残基を操作することと、前記二重アンカー型の活性化可能な高分子の標的結合タンパク質（TB）におけるジスルフィド結合部位にあるシステイン残基を操作することであって、前記 MM と前記 TB とが結合され、切断可能な部分（CM）が前記 MM と前記 TB との間に位置付けられる、前記操作することと、前記二重アンカー型の活性化可能な高分子を発現させることと、前記二重アンカー型の活性化可能な高分子を回収することであって、前記 MM と前記 TB とが、前記回収された二重アンカー型の活性化可能な高分子中のそれらのジスルフィド結合部位でテザリングされている、前記回収することと、を含む、前記方法。

【請求項 4 7】

二重アンカー型の活性化可能な高分子を生産する方法であって、前記二重アンカー型の活性化可能な高分子のマスキング部分（MM）におけるイソペプチド結合部位にあるアルギニン残基またはリジン残基を操作すること、及び／または前記二重アンカー型の活性化可能な高分子の標的結合タンパク質（TB）におけるイソペプチド結合部位にあるアスパラギン酸残基またはグルタミン酸残基を操作することであって、前記 MM と前記 TB とが結合され、切断可能な部分（CM）が前記 MM と前記 TB との間に位置付けられる、前記操作することと、前記二重アンカー型の活性化可能な高分子を発現させることと、前記二重アンカー型の活性化可能な高分子を回収することであって、前記 MM と前記 TB とが、前記回収された二重アンカー型の活性化可能な高分子中のそれらのイソペプチド結合部位でテザリングされている、前記回収することと、を含む、前記方法。

【請求項 4 8】

二重アンカー型の活性化可能な高分子を生産する方法であって、前記二重アンカー型の活性化可能な高分子のマスキング部分（MM）におけるイソペプチド結合部位にあるアスパラギン酸残基またはグルタミン酸残基を操作すること、及び／または前記二重アンカー型の活性化可能な高分子の標的結合タンパク質（TB）におけるイソペプチド結合部位にあるアルギニン残基またはリジン残基を操作することであって、前記 MM と前記 TB とが結合され、切断可能な部分（CM）が前記 MM と前記 TB との間に位置付けられる、前記操作することと、前記二重アンカー型の活性化可能な高分子を発現させることと、前記二重アンカー型の活性化可能な高分子を回収することであって、前記 MM と前記 TB とが、前記回収された二重アンカー型の活性化可能な高分子中のそれらのイソペプチド結合部位でテザリングされている、前記回収することと、を含む、前記方法。

【請求項 4 9】

二重アンカー型の活性化可能な高分子を作製する方法であって、MM に結合された TB 中の非アルファ炭素共有結合形成アミノ酸との非アルファ炭素共有結合を形成するように構成された非アルファ炭素共有結合形成アミノ酸を含む前記 MM を提供すること、を含む、前記方法。

10

20

30

40

50

【請求項 50】

前記MMの前記アルファ炭素共有結合形成アミノ酸が、スレオニンであり、前記TBの前記アルファ炭素共有結合形成アミノ酸が、グルタミンである、請求項49に記載の方法。

【請求項 51】

前記MMの前記アルファ炭素共有結合形成アミノ酸が、グルタミンであり、前記TBの前記アルファ炭素共有結合形成アミノ酸が、スレオニンである、請求項49に記載の方法。

【請求項 52】

前記MMの前記アルファ炭素共有結合形成アミノ酸が、システインであり、前記TBの前記アルファ炭素共有結合形成アミノ酸が、グルタミンまたはチロシンである、請求項49に記載の方法。

10

【請求項 53】

前記MMの前記アルファ炭素共有結合形成アミノ酸が、グルタミンまたはチロシンであり、前記TBの前記アルファ炭素共有結合形成アミノ酸が、システインである、請求項49に記載の方法。

【請求項 54】

前記MMの前記アルファ炭素共有結合形成アミノ酸が、ヒスチジンであり、前記TBの前記アルファ炭素共有結合形成アミノ酸が、チロシンである、請求項49に記載の方法。

【請求項 55】

前記MMの前記アルファ炭素共有結合形成アミノ酸が、チロシンであり、前記TBの前記アルファ炭素共有結合形成アミノ酸が、ヒスチジンである、請求項49に記載の方法。

20

【請求項 56】

前記MMの前記アルファ炭素共有結合形成アミノ酸が、リジンであり、前記TBの前記アルファ炭素共有結合形成アミノ酸が、システイン、グルタミン酸、またはアスパラギン酸である、請求項49に記載の方法。

【請求項 57】

前記MMの前記アルファ炭素共有結合形成アミノ酸が、システイン、グルタミン酸、またはアスパラギン酸であり、前記TBの前記アルファ炭素共有結合形成アミノ酸が、リジンである、請求項49に記載の方法。

30

【請求項 58】

前記MMの前記アルファ炭素共有結合形成アミノ酸が、グルタミンであり、前記TBの前記アルファ炭素共有結合形成アミノ酸が、リジンであり、前記非アルファ炭素共有結合が、前記グルタミンの前記ガンマカルボキシアミド基と前記リジン側鎖の前記イプシロンアミノ基との間のイソペプチド結合である、請求項49に記載の方法。

【請求項 59】

前記MMの前記アルファ炭素共有結合形成アミノ酸が、リジンであり、前記TBの前記アルファ炭素共有結合形成アミノ酸が、グルタミンであり、前記非アルファ炭素共有結合が、前記グルタミンの前記ガンマカルボキシアミド基と前記リジン側鎖の前記イプシロンアミノ基との間のイソペプチド結合である、請求項49に記載の方法。

40

【請求項 60】

二重アンカー型の活性化可能な高分子を作製する方法であって、MMに結合されたTB中の非アルファ炭素共有結合形成アミノ酸との非アルファ炭素共有結合を形成するように構成されたシステインを含む前記MMを提供すること、を含む、前記方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2022年3月25日出願の米国仮出願第63／323，718号の優先権利益を主張するものであり、この米国仮出願を全体として参照により本明細書に組み込む

50

。

【0002】

配列表

EFSによって本出願とともに提出された配列表は、「4862-121PCT.xm l」と題され、2023年3月22日に作成されたものであり、サイズは500,152バイトであり、全体として参照により本明細書に組み込まれる。

【0003】

本開示は、バイオテクノロジー分野に関するものであり、より詳細には、活性化可能な分子に関する。

【背景技術】

10

【0004】

抗体に基づいた治療法は、様々な疾患に対して効果的であることが証明された治療を提供している。しかしながら、症例によっては、広範な標的発現に起因する毒性により、その治療有効性が制限されることがある。さらに、抗体に基づいた治療薬には、投与後の循環からの急速なクリアランスなどの他の制限が見られる。

【0005】

抗体に結合するマスクペプチドを含む活性化可能な抗体は、通常の抗体と比較して毒性が低い治療薬である。マスクは、抗体とその標的分子との結合を妨害することにより、抗体の活性を阻害し得る。活性化環境では（例えば、活性化可能な抗体が腫瘍に送達されたとき）、マスクは除去されるので、抗体がその標的分子に結合して、その機能を取り戻すことができる。しかしながら、活性化可能な抗体の一部がマスクされていない状態にあり、活性化環境の外で標的結合が可能になる場合、毒性が生じ得る。

20

【0006】

したがって、活性化環境の外での標的結合を最小化する活性化可能な分子が継続的に必要とされている。

【発明の概要】

【0007】

本開示は、二重アンカー型の活性化可能な標的結合タンパク質ならびに関連する組成物及び方法を提供する。

【0008】

30

一態様では、本開示は、標的に特異的に結合する標的結合タンパク質（TB）と、TBに結合されたマスキング部分（MM）であって、MMがTBの標的への結合を阻害する、MMと、TBに結合され、TBとMMとの間に位置する切断可能な部分（CM）であって、CMが、プロテアーゼの基質として機能するポリペプチドである、CMと、を含む、二重アンカー型の活性化可能な標的結合タンパク質であって、MMとTBとをテザリングする非アルファ炭素共有結合をさらに含む、活性化可能な標的結合タンパク質を提供する。

【0009】

いくつかの実施形態では、TBは、抗原結合タンパク質（AB）である。いくつかの実施形態では、活性化可能な標的結合タンパク質は、非アルファ炭素共有結合を欠く単一アンカー型の活性化可能な標的結合タンパク質と比較して低い標的結合活性を有する。いくつかの実施形態では、非アルファ炭素共有結合は、イソペプチド結合である。いくつかの実施形態では、イソペプチド結合は、リジンとグルタミン酸残基またはアスパラギン酸残基との間にある。いくつかの実施形態では、非アルファ炭素共有結合は、MM及びABにおいてアルファ炭素に置換された官能基の間にある。いくつかの実施形態では、イソペプチド結合は、グルタミンのガンマカルボキシアミド基とリジン側鎖のイプシロンアミノ基との間にある。いくつかの実施形態では、非アルファ炭素共有結合は、スレオニンとグルタミンとの間のエステル結合である。いくつかの実施形態では、非アルファ炭素共有結合は、システインとグルタミンとの間のチオエステル結合である。いくつかの実施形態では、非アルファ炭素共有結合は、システインとチロシンとの間のチオエーテル結合である。いくつかの実施形態では、非アルファ炭素共有結合は、ヒスチジンとチロシンとの間の架

40

50

橋によって形成される（例えば、このタイプのヒスチジン-チロシン架橋は、シトクロム c オキシダーゼ酵素に存在することが知られている）。いくつかの実施形態では、非アルファ炭素共有結合は、リジンとシステインとの間に形成される窒素-酸素-硫黄（NOS）結合である。いくつかの実施形態では、非アルファ炭素共有結合は、ジスルフィド結合である。いくつかの実施形態では、ジスルフィド結合は、第1のシステインと第2のシステインとの間に形成され、第1のシステインがMM内にあり、第2のシステインがTB内にある、第1のシステインが、MMに結合されたペプチド内にあり、第2のシステインがTB内にある、または第1のシステインがMM内にあり、第2のシステインが、TBに結合されたペプチド内にある。

【0010】

10

いくつかの実施形態では、活性化可能な標的結合タンパク質は、さらに、第2のCMを含み、第2のCMがMMと非アルファ炭素共有結合との間に位置する、第2のCMが、MM内にあり、非アルファ炭素共有結合を形成するシステインから最大で5アミノ酸離れている、または第2のCMが、TB内にあり、非アルファ炭素共有結合を形成するシステインから最大で5アミノ酸離れた位置にある。いくつかの実施形態では、第1のCMと第2のCMとは、異なるプロテアーゼの基質である。いくつかの実施形態では、第1のCMと第2のCMとは、同じプロテアーゼの基質である。

【0011】

いくつかの実施形態では、プロテアーゼは、対象の腫瘍によって産生される。いくつかの実施形態では、ABは、抗体、Fab断片、F(ab')₂断片、scFv、scAb、dAb、または単ドメイン抗体である。いくつかの実施形態では、ABは、単ドメイン抗体である。いくつかの実施形態では、ABは、Fcタグ付き単ドメイン抗体である。いくつかの実施形態では、ABは、二重特異性抗体である。いくつかの実施形態では、二重特異性抗体は、二重特異性T細胞エンゲージャー（BiTE）または二重親和性再標的化抗体（DART）である。いくつかの実施形態では、ABは、多特異性抗体である。いくつかの実施形態では、非アルファ炭素共有結合は、MMと単ドメイン抗体との間にある。本開示は、二重特異性ABまたは多特異性ABを含む二重アンカー型の活性化可能な高分子を含み、二重特異性ABまたは多特異性ABにおける各ABが、二重アンカー型MMを有する。本開示はまた、二重特異性ABまたは多特異性ABを含む二重アンカー型の活性化可能な高分子を含み、二重特異性ABまたは多特異性ABにおける少なくとも1つのABは、二重アンカー型MMを有し、二重特異性ABまたは多特異性ABにおける少なくとも1つのABは、単一アンカー型MMを有する。本開示はまた、二重特異性ABまたは多特異性ABを含む二重アンカー型の活性化可能な高分子を含み、二重特異性ABまたは多特異性ABにおける少なくとも1つのABは、二重アンカー型MMを有し、二重特異性ABまたは多特異性ABにおける少なくとも1つのABは、MMを有しない。

20

30

【0012】

いくつかの実施形態では、非アルファ炭素共有結合は、MMと、TBに結合された結晶化可能断片領域（Fc）の領域またはドメインとの間にある。いくつかの実施形態では、MMは、TBのエピトープを含み得る。いくつかの実施形態では、MMは、未変性TBの4つ以上の連続したアミノ酸残基の部分配列を含まない。いくつかの実施形態では、MMは、TBによって結合される標的の4つ以上の連続したアミノ酸残基の部分配列を含まない。いくつかの実施形態では、MMは、未変性TBの4つ未満の連続したアミノ酸残基の部分配列を含み得る。いくつかの実施形態では、MMは、TBのエピトープを含まない。いくつかの実施形態では、MMは、標的に結合するためのTBの解離定数よりも大きい、TBへの結合のための解離定数を有する。いくつかの実施形態では、MMは、2~40アミノ酸長のポリペプチドである。

40

【0013】

いくつかの実施形態では、活性化可能な標的結合タンパク質は、MMとCMとの間にリンカーを含む。いくつかの実施形態では、活性化可能な標的結合タンパク質は、CMとTBとの間にリンカーを含む。いくつかの実施形態では、活性化可能な標的結合タンパク質

50

は、MMとCMとの間の第1のリンカー、及びCMとTBとの間の第2のリンカーを含む。

【0014】

別の態様では、本開示は、本明細書における活性化可能な標的結合タンパク質を含む組成物を提供する。いくつかの実施形態では、本組成物は、医薬組成物である。

【0015】

別の態様では、本開示は、本明細書における組成物の少なくとも1回の用量を含む、容器、バイアル、シリンジ、注射ペン、またはキットを提供する。

【0016】

別の態様では、本開示は、本明細書における活性化可能な標的結合タンパク質をコードする配列を含む核酸を提供する。

【0017】

別の態様では、本開示は、本明細書における核酸を含むベクターを提供する。

【0018】

別の態様では、本開示は、本明細書における核酸またはベクターを含む細胞を提供する。

【0019】

別の態様では、本開示は、薬剤にコンジュゲートされた本明細書における活性化可能な標的結合タンパク質を含むコンジュゲートされた活性化可能な標的結合タンパク質を提供する。いくつかの実施形態では、薬剤は、治療剤、標的指向性部分、または検出可能部分である。

【0020】

別の態様では、本開示は、治療を必要とする対象を治療する方法であって、対象に、本明細書における治療有効量の活性化可能な標的結合タンパク質、組成物、またはコンジュゲートされた活性化可能な標的結合タンパク質を投与することを含む、方法を提供する。いくつかの実施形態では、対象は、がんを有すると特定または診断されている。

【0021】

別の態様では、本開示は、活性化可能な標的結合タンパク質を生産する方法であって、活性化可能な標的結合タンパク質を生産するのに十分な条件下で、培養基中で細胞を培養することと、活性化可能な標的結合タンパク質を細胞または培養基から回収することと、を含む、方法を提供する。

【0022】

いくつかの実施形態では、本方法は、細胞または培養基から回収した活性化可能な標的結合タンパク質を単離することをさらに含む。いくつかの実施形態では、活性化可能な標的結合タンパク質を単離することは、タンパク質精製タグ及び／またはサイズ排除クロマトグラフィーを使用して行われる。いくつかの実施形態では、本方法は、活性化可能な標的結合タンパク質を医薬組成物に調合することをさらに含む。

【0023】

別の態様では、本開示は、二重アンカー型の活性化可能なタンパク質を生産する方法であって、二重アンカー型の活性化可能なタンパク質のマスキング部分（MM）におけるジスルフィド結合部位にあるシステイン残基を操作することと、二重アンカー型の活性化可能なタンパク質の標的結合タンパク質（TB）におけるジスルフィド結合部位にあるシステイン残基を操作することであって、MMとTBとが結合され、切断可能な部分（CM）がMMとTBとの間に位置付けられる、操作することと、二重アンカー型の活性化可能なタンパク質を発現させることと、二重アンカー型の活性化可能なタンパク質を回収することであって、MMとTBとが、回収された二重アンカー型の活性化可能なタンパク質中のそれらのジスルフィド結合部位でテザリングされている、回収することと、を含む、方法を提供する。本開示では、二重アンカー型の活性化可能なタンパク質と二重アンカー型の活性化可能な高分子という語句は、区別なく用いられている。

【0024】

別の態様では、本開示は、二重アンカー型の活性化可能な高分子を生産する方法であって、二重アンカー型の活性化可能な高分子のマスキング部分（MM）におけるイソペプチド結合部位にあるアルギニン残基またはリジン残基を操作すること、及び／または二重アンカー型の活性化可能な高分子の標的結合タンパク質（TB）におけるイソペプチド結合部位にあるアスパラギン酸残基またはグルタミン酸残基を操作することであって、MMとTBとが結合され、切断可能な部分（CM）がMMとTBとの間に位置付けられる、操作することと、二重アンカー型の活性化可能な高分子を発現させることと、二重アンカー型の活性化可能な高分子を回収することであって、MMとTBとが、回収された二重アンカー型の活性化可能な高分子中のそれらのイソペプチド結合部位でテザリングされている、回収することと、を含む、方法を提供する。別の態様では、本開示は、二重アンカー型の活性化可能な高分子を生産する方法であって、リジン側鎖のイプシロンアミノ基とイソペプチド結合を形成するように、グルタミンのガンマカルボキシアミド基が利用可能であり構成されるように、イソペプチド結合部位を操作すること、を含む、方法を提供する。

10

【0025】

別の態様では、本開示は、二重アンカー型の活性化可能な高分子を生産する方法であって、二重アンカー型の活性化可能な高分子のマスキング部分（MM）におけるイソペプチド結合部位にあるアスパラギン酸残基またはグルタミン酸残基を操作すること、及び／または二重アンカー型の活性化可能な高分子の標的結合タンパク質（TB）におけるイソペプチド結合部位にあるアルギニン残基またはリジン残基を操作することであって、MMとTBとが結合され、切断可能な部分（CM）がMMとTBとの間に位置付けられる、操作することと、二重アンカー型の活性化可能な高分子を発現させることと、二重アンカー型の活性化可能な高分子を回収することであって、MMとTBとが、回収された二重アンカー型の活性化可能な高分子中のそれらのイソペプチド結合部位でテザリングされている、回収することと、を含む、方法を提供する。

20

【0026】

別の態様では、本開示は、二重アンカー型の活性化可能な高分子を作製する方法であって、MMに結合されたTB中の非アルファ炭素共有結合形成アミノ酸との非アルファ炭素共有結合を形成するように構成された非アルファ炭素共有結合形成アミノ酸を含むMMを提供すること、を含む、方法を提供する。

【0027】

30

別の態様では、本開示は、二重アンカー型の活性化可能な高分子を作製する方法であって、MMに結合されたTB中の非アルファ炭素共有結合形成アミノ酸との非アルファ炭素共有結合を形成するように構成されたシステインを含むMMを提供すること、を含む、方法を提供する。

【0028】

本発明の特徴及び利点に対する理解は、本発明の原理が利用され得る例示的な実施形態を示す以下の詳細な説明、及び添付の図面を参照することによって得られるようになる。

【図面の簡単な説明】

【0029】

【図1A】完全にマスクに結合された立体配座状態（左）、1つのマスクが標的結合タンパク質（または抗体）の結合部位から動的に解離されている中間立体配座状態（中央）、及び2つのマスクが標的結合タンパク質（または抗体）の結合部位から動的に解離されている立体配座状態（右）の間の動的平衡状態を概略的に示す。

40

【図1B】例示的な活性化可能な抗体における成分の配置を示す。MMとABとを接続する線は、非アルファ炭素共有結合を示す。ABが例示されているが、本開示は、任意の所望のタンパク質の使用を含み、抗体に限定されず、任意の標的結合タンパク質（TB）を含むことができる。

【図2】A～Dは、例示的な活性化可能な分子の概略図を示す。

【図3A】3種類の例示的な活性化可能な分子を示す。

【図3B】3種類の例示的な活性化可能な分子を示す。

50

【図 3 C】 3 種類の例示的な活性化可能な分子を示す。

【図 4 A】 MM の N 末端が、操作された非アルファ炭素共有結合、例えば、ジスルフィド結合で N b に共有結合され、MM の C 末端が、CM で N b に共有結合されている、例示的な二重アンカー型 B C 2 T - N b の概略図である。

【図 4 B】 単一アンカー型 B C 2 T - N b の概略図である。

【図 4 C】 MM が、操作された非アルファ炭素共有結合、例えば、ジスルフィド結合によって単一アンカー化されることになる、二重アンカー型 B C 2 T - N b の切断反応を図示する。B C 2 T - N b 分子は、非限定的な概念実証の例として例示されており、当業者であれば、本開示に図示され、説明される構造が、必要以上の実験を行うことなく、任意のタイプのマスキング部分及び任意の所望のタンパク質の使用にまで及ぶことを理解するであらう。

10

【図 5 A】 MM の N 末端が、操作された非アルファ炭素共有結合、例えば、ジスルフィド結合で N b に共有結合され、MM の C 末端が、CM で N b に共有結合されている、二重アンカー型 B C 2 T - N b の例示的な二量体 F c タグ付きバージョンの概略図である。

【図 5 B】 二重アンカー型 B C 2 T - N b と単一アンカー型 B C 2 T - N b との結合の違いを示すための、二量体 F c タグ付きコントロール分子（すなわち、MM と N b とが、非アルファ炭素共有結合、例えばジスルフィド結合によってテザリングされていない）の概略図である。

【図 5 C】 F c タグ付き二重アンカー型 B C 2 T - N b の切断反応により、MM が、操作された非アルファ炭素共有結合、例えば、ジスルフィド結合によって単一アンカー化されることになることを図示する。B C 2 T - N b 分子は、非限定的な概念実証の例として例示されており、当業者であれば、本開示に図示され、説明される構造が、必要以上の実験を行うことなく、任意のタイプのマスキング部分及び任意の所望のタンパク質の使用にまで及ぶことを理解するであらう。

20

【図 6】 非還元条件下で実行した S D S - P A G E ゲルの画像である。ゲルを次のようにロードした：（1）MM が結合していない単一ドメイン抗体（P r o C 6 4 9；配列番号 1）；（2）P r o C 6 4 9 と M M P 1 4 との産物（P r o C 6 4 9 + M M P 1 4）；（3）P r o C 6 4 9 と M M P 9 との産物（P r o C 6 4 9 + M M P 9）；（4）MM が C M 1 4 9 0 D N I で結合した単一ドメイン抗体（P r o C 6 5 3；配列番号 2）；（5）P r o C 6 5 3 と M M P 1 4 との産物（P r o C 6 5 3 + M M P 1 4）；（6）MM が C M P L G L A G（配列番号 1 7）で結合した単一ドメイン抗体（P r o C 6 5 4；配列番号 3）；（7）P r o C 6 5 4 と M M P 9 との産物（P r o C 6 5 4 + M M P 9）；（8）M M P 1 4；及び（9）M M P 9。

30

【図 7 - 1】 インタクトな活性化された P r o C 6 5 3 及び P r o C 6 5 4 のセンサーグラムトレース結合を、P r o C 6 4 9 コントロールとともに示す。MM が結合していない P r o C 6 4 9 は、バイオセンサー先端上のビオチン化 B C 2 タグペプチドに結合した。インタクトな P r o C 6 5 3 及び P r o C 6 5 4 はビオチン化 B C 2 タグペプチドへの結合を示さないが、それぞれ M M P 1 4 または M M P 9 のいずれかでの活性化時に結合が回復した。

【図 7 - 2】 インタクトな活性化された P r o C 6 5 3 及び P r o C 6 5 4 のセンサーグラムトレース結合を、P r o C 6 4 9 コントロールとともに示す。MM が結合していない P r o C 6 4 9 は、バイオセンサー先端上のビオチン化 B C 2 タグペプチドに結合した。インタクトな P r o C 6 5 3 及び P r o C 6 5 4 はビオチン化 B C 2 タグペプチドへの結合を示さないが、それぞれ M M P 1 4 または M M P 9 のいずれかでの活性化時に結合が回復した。

40

【図 8】 非還元条件（上）及び還元条件（下）下で実行した S D S - P A G E ゲルの画像である。ゲルを次のようにロードした：（1）MM が結合していない単一ドメイン抗体（P r o C 6 4 9）；（2）MM が C M 1 4 9 0 D N I で結合した単一ドメイン抗体（P r o C 6 5 3）；（3）P r o C 6 5 3 と u P A との産物（P r o C 6 5 3 + u P A）；（4）操作されたシステイン Q 3 C 及び Q 1 5 7 C ならびに C M 1 4 9 0 D N I で MM

50

が二重アンカー化された単ドメイン抗体（ProC994；配列番号4）；（5）ProC994とuPAとの産物（ProC994+uPA）；（6）操作されたシステインQ3C及びW155CならびにCM 1490DNIでMMが二重アンカー化された単ドメイン抗体（ProC995；配列番号5）；（7）ProC995とuPAとの産物（ProC995+uPA）；（8）操作されたシステインD3C及びF154CならびにCM 1490DNIでMMが二重アンカー化された単ドメイン抗体（ProC996；配列番号6）；（9）ProC996とuPAとの産物（ProC996+uPA）。

【図9】非還元条件（上）及び還元条件（下）下で実行したSDS-PAGEゲルの画像である。ゲルを次のようにロードした：（1）MMが結合していないFcタグ付き単ドメイン抗体（ProC1283；配列番号7）；（2）ProC1283とuPAとの産物（ProC1283+uPA）；（3）CM 1490DNIでMMが結合したFcタグ付き単ドメイン抗体（ProC1284；配列番号8）；（4）ProC1284とuPAとの産物（ProC1284+uPA）；（5）操作されたシステインQ3C及びQ157CならびにCM 1490DNIでMMが二重アンカー化されたFcタグ付き単ドメイン抗体（ProC1285；配列番号9）；（6）ProC1285とuPAとの産物（ProC1285+uPA）；（7）操作されたシステインD3C及びF154CならびにCM 1490DNIでMMが二重アンカー化されたFcタグ付き単ドメイン抗体（ProC1287；配列番号11）；（8）ProC1287とuPAとの産物（ProC1287+uPA）；（9）uPA。

【図10】プレートに結合した遊離マスキングペプチドに結合する分子の能力のシフトを決定するためのELISA結合アッセイの結果を提供する：MMが結合していないFcタグ付き単ドメイン抗体（ProC1283）、ProC1283とuPAとの産物（ProC1283+uPA）、CM 1490DNIでMMが結合したFcタグ付き単ドメイン抗体（ProC1284）、ProC1284とuPAとの産物（ProC1284+uPA）、操作されたシステインQ3C及びQ157CならびにCM 1490DNIでMMが二重アンカー化されたFcタグ付き単ドメイン抗体（ProC1285）、ProC1285とuPAとの産物（ProC1285+uPA）、操作されたシステインD3C及びF154CならびにCM 1490DNI（ProC1287）でMMが二重アンカー化されたFcタグ付き単ドメイン抗体、ならびにProC1287とuPAとの産物（ProC1287+uPA）。結果は、二重アンカー型マスクを有する単ドメイン抗体がプレート上のペプチドと結合できなかったことを示す。しかしながら、二重アンカー型分子をプロテアーゼで処理すると、単一アンカー型分子（ProC1283）と同様に分子の結合が回復した。

【図11A】例示的な二重アンカー型の多特異的な活性化可能な抗体を図示する。楕円形はABの成分を示し、これは重鎖可変領域（V_H）、軽鎖可変領域（V_L）、重鎖定常領域（C_H）、軽鎖定常領域（C_L）、重鎖上の単一可変ドメイン（VHH）、または単鎖可変断片（scFv）であり得る。三角形はMMを示す。MMは、CM（任意選択のリンカーを有する）を介してAB成分と結合され、ジスルフィド結合（または非アルファ炭素共有結合）によって（MMと、ABとの非アルファ炭素共有結合を形成する残基との間の任意選択のリンカー（複数可）及び／またはCM（複数可）で）ABとテザリングされる。

【図11B】例示的な二重アンカー型の多特異的な活性化可能な抗体を図示する。楕円形はABの成分を示し、これは重鎖可変領域（V_H）、軽鎖可変領域（V_L）、重鎖定常領域（C_H）、軽鎖定常領域（C_L）、重鎖上の単一可変ドメイン（VHH）、または単鎖可変断片（scFv）であり得る。三角形はMMを示す。MMは、CM（任意選択のリンカーを有する）を介してAB成分と結合され、ジスルフィド結合（または非アルファ炭素共有結合）によって（MMと、ABとの非アルファ炭素共有結合を形成する残基との間の任意選択のリンカー（複数可）及び／またはCM（複数可）で）ABとテザリングされる。

10

20

30

40

50

【図 1 1 C】例示的な二重アンカー型の多特異的な活性化可能な抗体を図示する。楕円形は A B の成分を示し、これは重鎖可変領域 (V_H)、軽鎖可変領域 (V_L)、重鎖定常領域 (C_H)、軽鎖定常領域 (C_L)、重鎖上の単一可変ドメイン (V_HH)、または単鎖可変断片 (s c F v) であり得る。三角形は M M を示す。M M は、C M (任意選択のリンカーを有する) を介して A B 成分と結合され、ジスルフィド結合 (または非アルファ炭素共有結合) によって (M M と、A B との非アルファ炭素共有結合を形成する残基との間の任意選択のリンカー (複数可) 及び / または C M (複数可) で) A B とテザリングされる。

【図 1 1 D】例示的な二重アンカー型の多特異的な活性化可能な抗体を図示する。楕円形は A B の成分を示し、これは重鎖可変領域 (V_H)、軽鎖可変領域 (V_L)、重鎖定常領域 (C_H)、軽鎖定常領域 (C_L)、重鎖上の単一可変ドメイン (V_HH)、または単鎖可変断片 (s c F v) であり得る。三角形は M M を示す。M M は、C M (任意選択のリンカーを有する) を介して A B 成分と結合され、ジスルフィド結合 (または非アルファ炭素共有結合) によって (M M と、A B との非アルファ炭素共有結合を形成する残基との間の任意選択のリンカー (複数可) 及び / または C M (複数可) で) A B とテザリングされる。

【図 1 1 E】例示的な二重アンカー型の多特異的な活性化可能な抗体を図示する。楕円形は A B の成分を示し、これは重鎖可変領域 (V_H)、軽鎖可変領域 (V_L)、重鎖定常領域 (C_H)、軽鎖定常領域 (C_L)、重鎖上の単一可変ドメイン (V_HH)、または単鎖可変断片 (s c F v) であり得る。三角形は M M を示す。M M は、C M (任意選択のリンカーを有する) を介して A B 成分と結合され、ジスルフィド結合 (または非アルファ炭素共有結合) によって (M M と、A B との非アルファ炭素共有結合を形成する残基との間の任意選択のリンカー (複数可) 及び / または C M (複数可) で) A B とテザリングされる。

【図 1 1 F】例示的な二重アンカー型の多特異的な活性化可能な抗体を図示する。楕円形は A B の成分を示し、これは重鎖可変領域 (V_H)、軽鎖可変領域 (V_L)、重鎖定常領域 (C_H)、軽鎖定常領域 (C_L)、重鎖上の単一可変ドメイン (V_HH)、または単鎖可変断片 (s c F v) であり得る。三角形は M M を示す。M M は、C M (任意選択のリンカーを有する) を介して A B 成分と結合され、ジスルフィド結合 (または非アルファ炭素共有結合) によって (M M と、A B との非アルファ炭素共有結合を形成する残基との間の任意選択のリンカー (複数可) 及び / または C M (複数可) で) A B とテザリングされる。

【図 1 1 G】例示的な二重アンカー型の多特異的な活性化可能な抗体を図示する。楕円形は A B の成分を示し、これは重鎖可変領域 (V_H)、軽鎖可変領域 (V_L)、重鎖定常領域 (C_H)、軽鎖定常領域 (C_L)、重鎖上の単一可変ドメイン (V_HH)、または単鎖可変断片 (s c F v) であり得る。三角形は M M を示す。M M は、C M (任意選択のリンカーを有する) を介して A B 成分と結合され、ジスルフィド結合 (または非アルファ炭素共有結合) によって (M M と、A B との非アルファ炭素共有結合を形成する残基との間の任意選択のリンカー (複数可) 及び / または C M (複数可) で) A B とテザリングされる。

【図 1 1 H】例示的な二重アンカー型の多特異的な活性化可能な抗体を図示する。楕円形は A B の成分を示し、これは重鎖可変領域 (V_H)、軽鎖可変領域 (V_L)、重鎖定常領域 (C_H)、軽鎖定常領域 (C_L)、重鎖上の単一可変ドメイン (V_HH)、または単鎖可変断片 (s c F v) であり得る。三角形は M M を示す。M M は、C M (任意選択のリンカーを有する) を介して A B 成分と結合され、ジスルフィド結合 (または非アルファ炭素共有結合) によって (M M と、A B との非アルファ炭素共有結合を形成する残基との間の任意選択のリンカー (複数可) 及び / または C M (複数可) で) A B とテザリングされる。

【図 1 1 I】例示的な二重アンカー型の多特異的な活性化可能な抗体を図示する。楕円形は A B の成分を示し、これは重鎖可変領域 (V_H)、軽鎖可変領域 (V_L)、重鎖定常領域

域 (C_H)、軽鎖定常領域 (C_L)、重鎖上の単一可変ドメイン (V_{HH})、または単鎖可変断片 (scFv) であり得る。三角形はMMを示す。MMは、CM (任意選択のリンカーを有する) を介してAB成分と結合され、ジスルフィド結合 (または非アルファ炭素共有結合) によって (MMと、ABとの非アルファ炭素共有結合を形成する残基との間の任意選択のリンカー (複数可) 及び/またはCM (複数可) で) ABとテザリングされる。

【図12A-1】Dessault SystemesソフトウェアのBIOVIA Discovery Studiosを用いて得られた活性化可能な標的結合タンパク質 (活性化可能な抗PD-L1抗体; 配列番号562~563) の三次元構造を図示する。溶媒にアクセス可能な残基がマスク部分のヘッダー領域またはN末端における残基の2~5オングストローム以内にあり、構造の第2のビューを90度回転させた、構造の拡大された領域を示す。マスクと相互作用する変異誘発によって同定された残基がアスタリスクで示される。

10

【図12A-2】Dessault SystemesソフトウェアのBIOVIA Discovery Studiosを用いて得られた活性化可能な標的結合タンパク質 (活性化可能な抗PD-L1抗体; 配列番号562~563) の三次元構造を図示する。溶媒にアクセス可能な残基がマスク部分のヘッダー領域またはN末端における残基の2~5オングストローム以内にあり、構造の第2のビューを90度回転させた、構造の拡大された領域を示す。マスクと相互作用する変異誘発によって同定された残基がアスタリスクで示される。

20

【図12B】Dessault SystemesソフトウェアのBIOVIA Discovery Studiosを用いて得られた活性化可能な標的結合タンパク質 (活性化可能な抗PD-L1抗体; 配列番号562~563) の三次元構造を図示する。Fab及びプロドメイン (標識されたマスク部分を含む) の三次元構造を示す。Fabドメインは空間充填形態でレンダリングされ、プロドメインはC α 骨格形態でレンダリングされる。

【図13A】J43v2/抗マウスPD-L1 Fab (図13A、配列番号568~569)、抗CD166 (図13B、配列番号572~573)、及び抗PD-L1 (図13C~13D、配列番号570~571) に対応する抗体構造の相同性ベースの三次元モデルを図示する。図13A~13Cは、BIOVIA Discovery Studioを使用してモデル化し、図13Dは、AlphaFold2を使用してモデル化し、BIOVIA Discovery Studioでレンダリングした。CDRは、濃灰色で示される。

30

【図13B】J43v2/抗マウスPD-L1 Fab (図13A、配列番号568~569)、抗CD166 (図13B、配列番号572~573)、及び抗PD-L1 (図13C~13D、配列番号570~571) に対応する抗体構造の相同性ベースの三次元モデルを図示する。図13A~13Cは、BIOVIA Discovery Studioを使用してモデル化し、図13Dは、AlphaFold2を使用してモデル化し、BIOVIA Discovery Studioでレンダリングした。CDRは、濃灰色で示される。

【図13C】J43v2/抗マウスPD-L1 Fab (図13A、配列番号568~569)、抗CD166 (図13B、配列番号572~573)、及び抗PD-L1 (図13C~13D、配列番号570~571) に対応する抗体構造の相同性ベースの三次元モデルを図示する。図13A~13Cは、BIOVIA Discovery Studioを使用してモデル化し、図13Dは、AlphaFold2を使用してモデル化し、BIOVIA Discovery Studioでレンダリングした。CDRは、濃灰色で示される。

40

【図13D】J43v2/抗マウスPD-L1 Fab (図13A、配列番号568~569)、抗CD166 (図13B、配列番号572~573)、及び抗PD-L1 (図13C~13D、配列番号570~571) に対応する抗体構造の相同性ベースの三次元モデルを図示する。図13A~13Cは、BIOVIA Discovery Studioを使用して

50

してモデル化し、図13Dは、AlphaFold2を使用してモデル化し、BIOVIA Discovery Studioでレンダリングした。CDRは、濃灰色で示される。

【0030】

本明細書の図面は、例示のみを目的としており、必ずしも縮尺通りに描かれているわけではない。

【発明を実施するための形態】

【0031】

概要

本明細書では、通常は活性な結合部分の少なくとも1つのポリペプチドに直接または間接的に2点でアンカー化された少なくとも1つのマスクを含む活性化可能な分子（「活性化可能な二重アンカー型のマスク化標的結合タンパク質」または「活性化可能な標的結合タンパク質」）が提供される。本開示に詳細に記載され、図示されるいくつかの態様では、活性化可能な標的結合タンパク質は、複数のポリペプチドの複合体を含む。本開示に詳細に記載され、図示されるいくつかの態様では、マスクは、2つのアンカー位置において活性化可能な標的結合タンパク質の1つのポリペプチドに共有結合している。本開示に詳細に記載され、図示されるいくつかの態様では、マスクは、活性化可能な標的結合タンパク質の2つのポリペプチドに共有結合しており、例えば、1つのアンカー位置で第1のポリペプチドに対してアンカー化され、第2のアンカー位置で第2のポリペプチドに対してアンカー化されている。溶液中で、本明細書に記載の二重アンカー型構造を欠くマスクされた活性化可能な標的結合タンパク質分子は、図1Aに示すように、マスクの1つ以上が標的結合タンパク質の結合部位に能動的に結合している立体配座状態と、マスクの1つ以上が標的結合タンパク質の結合部位に能動的に結合していない立体配座状態との間の動的平衡状態に存在する。この動的平衡状態は、本明細書では、マスクされた活性化可能な標的結合タンパク質分子中の1つ以上の標的結合タンパク質の1つの結合表面または複数の結合表面が、標的または他のエピトープへの結合（活性化環境外での標的結合を含む）のために利用可能になる、マスクされた活性化可能な標的結合タンパク質分子の「呼吸」と呼ばれる場合がある。呼吸は、図1Aに図示されるように、テザリングされたマスクの平衡結合のため、抗原結合部位が、インタクトな分子の一部で短期間曝露されるときに発生する。本明細書に記載の二重アンカー型マスク構造は、マスクと標的結合タンパク質との間の動的解離、すなわち、活性化可能な標的結合タンパク質分子の「呼吸」を低減させるまたは阻害する。二重アンカー型マスクは、本来標的に結合するタンパク質を、マス킹効率の向上及び／または1つ以上のマスクが、その対応する標的結合タンパク質から動的に解離される分子集団の減少によってマス킹すると考えられる。

【0032】

一態様では、活性化可能な分子は、活性化可能な治療用高分子（「活性化可能な標的結合タンパク質」）であり得る。いくつかの態様では、活性化可能な治療用高分子は、活性化可能な抗体または任意の他の所望のタンパク質、例えば治療用タンパク質であり得る。活性化可能な分子は、標的結合タンパク質（TB）、マス킹部分（MM）、及びMMとTBとの間に位置する切断可能な部分（CM）を含み得る。いくつかの態様では、活性化可能な分子は、例えば、図2C及び図2Dに示されるように、複数のCMを含んでもよい。例えば、活性化可能な分子は、第1の切断可能な部分（CM1）及び第2の切断可能な部分（CM2）を含み得る。いくつかの態様では、活性化可能な分子は、MMとTBとの間のCM1、及びMMと、活性化可能な分子と非アルファ炭素共有結合を形成する残基との間のCM2を含む構造を有し得る。したがって、いくつかの態様では、本開示は、TB-CM1-MM-CM2コンストラクトを含み、ここで、CM1及びCM2の切断により、両方の定着部位において、活性化可能な分子からMMが完全に切断される。いくつかの態様では、CM1及びCM2の両方の切断が、活性化可能な標的結合タンパク質の完全な活性化をもたらす。いくつかの態様では、活性化可能な標的結合タンパク質の完全な活性化には、CM1及びCM2の両方の切断が必要である。いくつかの態様では、活性化可

能な標的結合タンパク質の活性化には、CM1及びCM2のうちの一方の切断で十分である。

【0033】

いくつかの態様では、本開示の活性化可能な二重アンカー型マスク化抗体との関連で使用される活性化可能な抗体は、抗原結合タンパク質（AB）、マスクング部分（MM）、及びMMとABとの間に位置する1つ以上の切断可能な部分（CM）を含み得る。一般に、本明細書の活性化可能な分子は二重アンカー型であってよく、すなわち、MMとTB（例えば、AB）とは、CM（またはCM1及びCM2）を介して結合され、また1つ以上の非アルファ炭素共有結合によってテザリングされる。そのような活性化可能な分子は、非アルファ炭素共有結合がない対等な活性化可能な分子（すなわち、「単一アンカー型の活性化可能な分子」または「対等な活性化可能標的結合タンパク質」と比較して低い標的結合活性を有し得る。MMとTBとをテザリングする非アルファ炭素共有結合（例えば、ジスルフィド結合）がない単一アンカー型の活性化可能な分子と比較して、本明細書に記載される二重アンカー型の活性化可能な分子におけるMMの増強されたマスクング効率は、改善された安全性プロファイル、例えば、活性化環境外での毒性の低減及び標的結合の低減をもたらし得る。

10

【0034】

本明細書には、関連する組成物、キット、核酸、ベクター、及び組み換え細胞、ならびに本明細書に記載の活性化可能な分子（例えば、活性化可能な高分子、例えば、抗体及び他のタンパク質）のいずれかを使用する方法及び生産する方法を含む関連する方法もまた提供される。

20

【0035】

定義

別途定義されない限り、本明細書で使用される全ての技術及び科学用語は、本発明が属する当業者により一般に理解されるものと同じ意味を有する。本明細書には、本開示で使用するのための方法及び材料を記載する。当技術分野で知られている他の好適な方法及び材料も使用することができる。材料、方法、及び例は、例示にすぎず、限定的であることは意図されない。本明細書で言及される全ての刊行物、特許出願、特許、配列、データベースエントリ、及び他の参考文献は、参照によってその全体が組み込まれる。矛盾する場合には、定義を含めて本明細書が優先する。

30

【0036】

用語「a」及び「an」は、冠詞の文法上の目的語のうちの1つ以上（すなわち、少なくとも1つ）を指す。一例として、「細胞（a cell）」は、1個以上の細胞を包含する。

【0037】

本明細書で使用される場合、用語「約（about）」及び「およそ（approximately）」は、数値または範囲で明記される量を修飾するために使用されるとき、数値だけでなく、当業者に既知の、その値からの合理的な逸脱も示す。例えば、適切な場合、±20%、±10%または±5%は、詳述された値が意図する意味の範囲内であり得る。

40

【0038】

濃度、量及びその他の数値データは、本明細書において、範囲形式で表されてもよく、または示されてもよい。かかる範囲形式は便宜上及び簡略性のためだけに使用され、したがって範囲の制限として明示的に列举された数値だけでなく、あたかも各数値及び部分的な範囲が明示的に列举されるかのように、その範囲内に包含された全ての個々の数値または部分的な範囲もまた含むと柔軟に解釈されるべきであることを理解されたい。実例として、「約0.01~2.0」の数値の範囲は、約0.01~約2.0という明示的に列举された値だけでなく、示された範囲内の個々の値及び部分的な範囲もまた含むと解釈されるべきである。したがって、この数値の範囲内には、個々の値、例えば0.5、0.7及び1.5など、ならびに部分的な範囲、例えば0.5~1.7、0.7~1.5、及び1

50

． 0 ～ 1 . 5 などが含まれる。さらに、このような解釈は、記載されている範囲の幅または特性に関係なく適用されるべきである。加えて、全ての百分率は、特に明記しない限り、重量に基づいて計算されることを留意されたい。

【 0 0 3 9 】

本開示の範囲を理解する上で、用語「含む (including)」、または「含む (comprising)」及びそれらの派生形は、本明細書で使用する場合、記載された特徴、要素、構成成分、グループ、整数及び／またはステップの存在を規定するが、その他の記載されていない特徴、要素、構成成分、グループ、整数及び／またはステップの存在を排除しない、オープンエンドの用語であることを意図する。上記は、類似の意味を有する単語、例えば用語「含む (including)」、「有する (having)」及びそれらの派生形にも適用される。用語「からなる (consisting)」、及びその派生形は、本明細書で使用する場合、記載された特徴、要素、構成成分、グループ、整数及び／またはステップの存在を規定するが、その他の記載されていない特徴、要素、構成成分、グループ、整数及び／またはステップの存在を排除する、クローズド用語であることを意図する。本明細書で 사용되는場合、「から本質的になる (consisting essentially of)」という用語は、記載された特徴、要素、構成成分、グループ、整数、及び／またはステップの存在ばかりでなく、特徴、要素、構成成分、グループ、整数、及び／またはステップの基本的かつ新規の特性（複数可）に重大な影響を与えないものの存在を指定することを意図している。これらの移行句のいずれか1つ（すなわち、「含む (comprising)」、「からなる (consisting)」または「から本質的になる (consisting essentially)」）への言及は、具体的に用いられていない他の移行句のうちのいずれかへの置き換えに対する直接的な裏付けを提供することが理解される。例えば、用語「含む (comprising)」から「から本質的になる (consisting essentially of)」または「からなる (consisting of)」への修正は、本開示を通して開示される任意の要素に対して、この定義による直接的な裏付けを見いだすことになる。この定義に基づいて、本明細書に開示される、または参照によって組み込まれる任意の要素は、特許請求される発明に含まれてもよく、または除外されてもよい。

10

20

【 0 0 4 0 】

本明細書で使用する場合、便宜上、複数の化合物、要素またはステップが一般的な一覧において提示されてよい。ただし、これらの一覧は、一覧の各メンバーが別個の一意のメンバーとして個別に識別されるかのように解釈されるべきである。したがって、このような一覧の個々のメンバーは、反対の指示がない限り、共通のグループでの提示のみに基づいて、同じ一覧の任意のその他のメンバーと事実上同等であると解釈されるべきでない。

30

【 0 0 4 1 】

さらに、特定の分子、コンストラクト、組成物、要素、部分、賦形剤、疾患、状態、特性、ステップなどは、本開示の特定の実施形態もしくは態様、または別個の段落もしくはセクションの文脈で考察されてよい。これは単に便宜的かつ簡潔にするためのものであり、そのような任意の開示は、本開示及び特許請求の範囲のいずれかの箇所に見いだされる他の任意の実施形態または態様にも同様に適用可能であり、それらと組み合わせることが意図されており、これら全てが、出願日において本出願及び特許請求された発明を形成していることが理解される。例えば、コンストラクト、組成物、または方法に関して記載されたコンストラクト、分子、方法ステップ、キット、または組成物の一覧は、それらの方法ステップ、有効な薬剤、キット、または組成物が、その実施形態または態様の文脈またはセクションにおいて再列挙されていない場合であっても、本開示の他の任意の部分に記載されたコンストラクト、組成物、配合物、及び方法に関連する実施形態に対する直接的な裏付けを見いだすことが意図されており、また確かに見いだす。

40

【 0 0 4 2 】

本明細書では「例示的な」という用語は、例、実例、または説明として役立つという意味で使用される。本明細書で「例示的」として記載された任意の態様または設計は、必ず

50

しも他の態様または設計よりも好ましい、または有利であると解釈されるべきではない。むしろ、例示的という単語の使用は、概念を具象的な態様で提示することを意図したものである。

【0043】

活性化可能な標的結合タンパク質

一態様では、本開示は、活性化可能な標的結合タンパク質（TB）、例えば、活性化可能な二重アンカー型マスク化抗体（「活性化可能な抗体」）、または標的に特異的に結合する別のタンパク質を提供する。いくつかの実施形態では、活性化可能な抗体は、標的に特異的に結合するTBまたは抗原結合タンパク質（AB）と、TB（例えば、AB）に直接または間接的に共有結合（「カップリング」または「融合」とも呼ばれる）した切断可能な部分（CM）であって、CMが、プロテアーゼの基質として機能するポリペプチドであり、TBとマスクング部分（MM）との間に位置する、CMと、を含み、MMとTBとが非アルファ炭素共有結合によってテザリングされており、MMがTBの標的への結合を阻害する。本明細書で使用される「融合」という用語及びその文法的変形は、例えば、組み換え融合による、同じポリペプチドのアルファ炭素骨格の共有結合を指す。本明細書で使用される「テザリングする」という用語及びその文法的変形は、非アルファ炭素共有結合（例えば、MM及びABにおいてアルファ炭素に置換された官能基間のジスルフィド結合、アミド／イソペプチド結合、またはアルファ炭素骨格結合を伴わない他の結合）による2つの部分（例えば、活性化可能な抗体におけるMM及びAB）の結合を指す。本明細書で使用される、「アンカー」という用語及びその文法的変形は、別の部分（例えば、TB及びCM、またはMM及びCM）に直接または間接的に共有結合している部分を含み得る。いくつかの態様では、イソペプチド結合は、リジン残基とアスパラギン酸残基もしくはグルタミン酸残基との間、またはグルタミンのガンマカルボキシアミド基とリジン側鎖のイプシロンアミノ基との間に存在し得る。

【0044】

いくつかの実施形態では、活性化可能な抗体は、TBが標的への結合をマスクするかまたはその他の方法で阻害しなかった場合に、非治療部位でのTB（例えばAB）の結合に起因し得る毒性及び／または副作用の低減を提供する。活性化可能なTBにおいて、MMは、TBのその標的分子への結合を妨げ得る。単一アンカー型の活性化可能な抗体（例えば、MM及びABが非アルファ炭素共有結合によってテザリングされていない単一アンカー型の活性化可能な抗体）では、ABの標的結合表面に対するMMのマスクング効果は動的であり得る。したがって、単一アンカー型の活性化可能なTB分子を含む所与の製剤において、製剤中の活性化可能なTB分子の一部は、呼吸により、短期間であるがマスクされない場合がある。十分に高い濃度の単一アンカー型活性化可能TBでは、そのようなマスクされていない活性化可能なTBの標的分子との結合は大きな影響を与え、活性化環境の外での標的結合によって引き起こされる望ましくない毒性または効果を引き起こし得る。

【0045】

本明細書で使用される場合、「活性化可能な抗体」または「活性化可能な標的結合タンパク質」という用語は、それぞれ、その不活性（切断されていない、または未変性）形態での活性化可能な抗体または活性化可能な標的結合タンパク質を指す。少なくとも1つのプロテアーゼによる活性化可能な抗体または活性化可能な標的結合タンパク質のCMの修飾に続いて、MMがTBまたはABとその標的との間の結合を妨げない切断されたタンパク質がもたらされ得ることは、当業者には明らかであろう。いくつかの実施形態では、プロテアーゼによるCMの切断は、MMの遊離をもたらし得る。「非切断」または「不活性」という用語は、プロテアーゼによるCMの切断がない場合の活性化可能なTB、すなわち、未変性形態の活性化可能なTBを指す。本開示全体を通して使用される場合、活性化可能な抗体に関する説明は、活性化可能な標的結合タンパク質にも適用可能であると解釈されるべきである。したがって、一態様では、本開示の二重アンカー型の活性化可能な標的結合タンパク質は、活性化可能な標的結合タンパク質が不活性状態にあるときに、標的

への A B の結合を阻害する M M を含み得る。

【 0 0 4 6 】

本明細書で使用される場合、少なくとも 1 つのプロテアーゼによる C M の修飾に続いて、活性化可能な T B は「切断」または「活性化」されている。「活性化可能な」という用語は、「タンパク質」という用語と関連して使用される場合、活性化可能なタンパク質を切断因子（例えば、プロテアーゼ）にさらすことによって生成される対応する「活性化された」タンパク質と比較して、標的に対する結合の低下を示すタンパク質を指す。

【 0 0 4 7 】

本明細書で使用される場合、「マスキング部分」及び「M M」という用語は、T B（例えば、A B）の近位に配置された場合に、T B のその標的への結合を妨げるペプチドまたはタンパク質を指すために区別なく使用される。

【 0 0 4 8 】

本明細書では、「切断可能な部分」及び「C M」という用語は、配列特異的なプロテアーゼの基質が含まれるアミノ酸配列のペプチドを指すために区別なく使用される。活性化可能なタンパク質では、C M は、M M 及び T B に対して位置付けられ、その結果、切断により、T B の生物学的標的に結合することができる分子がもたらされる。したがって、活性化可能なタンパク質は、活性化されたタンパク質と比較して、生物学的標的への結合の低減を示す。

【 0 0 4 9 】

いくつかの実施形態では、活性化可能な T B は、目的の T B を選択し、立体配座的に拘束された場合に、M M が T B のマスキングまたは T B のその標的への結合の低減を提供するように、活性化可能な T B の残りの部分を構築することによって設計され得る。この機能的特徴を提供するように、構造設計基準を考慮することができる。

【 0 0 5 0 】

活性化可能な抗体は、様々な構造配置で提供され得る。活性化可能な抗体の例示的な式が下記で提供される。A B、M M、及び C M の N 末端から C 末端への順序は、活性化可能な抗体内で逆であってもよいことが企図されている。C M 及び M M のアミノ酸配列が重複してもよく、例えば、配列特異的なプロテアーゼによって認識される C M 配列が、M M 内に少なくとも部分的に含有されることも企図されている。例えば、活性化可能な抗体は、図 1 B の式（アミノ（N）末端領域からカルボキシル（C）末端領域の順）によって表すことができる。活性化可能な抗体は、M M と C M との間、及び／または C M と A B との間に 1 つ以上のリンカー（L）をさらに含んでもよい。M M と A B とを接続する線は、非アルファ炭素共有結合を示す。

【 0 0 5 1 】

活性化可能な抗体の例示的な構成を図 2 A ～ 図 2 D に示す。図 2 A は、アミノ（N）末端領域からカルボキシル（C）末端領域の順に、M M 2 1 1、任意選択のリンカー 2 1 2、C M 2 1 3、任意選択のリンカー 2 1 2 と同じまたは異なる配列を有する任意選択のリンカー 2 1 4、及び A B 2 1 5 を含む例示的な活性化可能な抗体 2 1 0 を示す。M M 2 1 1 と A B 2 1 5 とは、非アルファ炭素共有結合 2 1 6 によってテザリングされている。図 2 B は、アミノ（N）末端領域からカルボキシル（C）末端領域の順に、A B 2 2 1、任意選択のリンカー 2 2 2、C M 2 2 3、任意選択のリンカー 2 2 2 と同じまたは異なる配列を有する任意選択のリンカー 2 2 4、及び M M 2 2 5 を含む例示的な活性化可能な抗体 2 2 0 を示す。A B 2 2 1 と M M 2 2 5 とは、非アルファ炭素共有結合 2 2 6 によってテザリングされている。図 2 C は、アミノ（N）末端領域からカルボキシル（C）末端領域の順に、任意選択のリンカー 2 3 1、C M 2 3 2、任意選択のリンカー 2 3 3、M M 2 3 4、任意選択のリンカー 2 3 5、C M 2 3 6、任意選択のリンカー 2 3 7、及び A B 2 3 8 を含む例示的な活性化可能な抗体 2 3 0 を示す。M M 2 3 4 と A B 2 3 8 とは、非アルファ炭素共有結合 2 3 9 によってテザリングされている。図 2 D は、アミノ（N）末端領域からカルボキシル（C）末端領域の順に、A B 2 4 1、任意選択のリンカー 2 4 2、C M 2 4 3、任意選択のリンカー 2 4 4、M M 2 4 5、任意選択のリンカー 2 4 6、C M 2

10

20

30

40

50

47、及び任意選択のリンカー248を含む例示的な活性化可能な抗体241を示す。AB241とMM255とは、非アルファ炭素共有結合249によってテザリングされている。

【0052】

いくつかの例では、AB（例えば、図2A～図2DのAB）は、1つのポリペプチドのみを含み得る。そのような場合、MMは、CMを介してポリペプチドに結合され、ポリペプチドにテザリングされ得る。いくつかの態様では、第1のポリペプチドは、MM、CM、ならびに軽鎖可変ドメイン（「LVD」または「VL」）及び重鎖可変ドメイン（「HVD」または「VH」）から選択される群から選択される少なくとも1つの抗体可変ドメインを含む。いくつかの例では、AB（例えば、図2A～図2DのAB）は、複数のポリペプチドを含み得る（例えば、ABは、複数のポリペプチドによって形成される複合体である）。いくつかの態様では、ABは、少なくとも2つのポリペプチド、少なくとも3つのポリペプチド、少なくとも4つのポリペプチド、またはそれ以上を含む。そのような場合、MMは、CMを介してABのポリペプチドに結合され、非アルファ炭素共有結合を介して同じポリペプチドにテザリングされ得る。あるいは、MMは、CMを介してABの第1のポリペプチドに結合され、非アルファ炭素共有結合を介してABの第2のポリペプチドにテザリングされていてもよい。活性化可能な抗体は、MM-CM-HVDまたはMM-CM-LVDまたはMM-CM-scfv、MM-CM-ScFv-Fab、MM-CM-HVD-scfv、MM-CM-LVD-scfv、MM-CM-scfv-HVD、MM-CM-scfv-LVD、HVD-CM-MM、LVD-CM-MM、scfv-CM-MM、HVD-scfv-CM-MM、LVD-scfv-CM-MM、scfv-HVD-CM-MM、MM-CM-VHH、VHH-CM-MM、またはscfv-LVD-CM-MMの配列の1つ以上のポリペプチドを有することができる。本明細書において、特に断りのない限り、ACC成分間のダッシュ（-）は、直接的な連結または1つ以上のリンカーを介した連結のいずれかを表す。

【0053】

いくつかの実施形態では、活性化可能な抗体は、2つのポリペプチドを有し得る。いくつかの例では、活性化可能な抗体は、HVDを含む第1のポリペプチドと、N末端からC末端の方向に向かって、MM-CM-LVD、MM-CM-scfv、MM-CM-LVD-scfv、MM-CM-scfv-LVD、LVD-CM-MM、scfv-CM-MM、LVD-scfv-CM-MM、MM-CM-VHH、VHH-CM-MM、またはscfv-LVD-CM-MMのいずれか1つを含む第2のポリペプチドとを含み得る。いくつかの例では、活性化可能な抗体は、LVDを含む第1のポリペプチドと、N末端からC末端の方向に向かって、MM-CM-HVD、MM-CM-scfv、MM-CM-HVD-scfv、MM-CM-scfv-HVD、HVD-CM-MM、scfv-CM-MM、HVD-scfv-CM-MM、MM-CM-VHH、またはscfv-HVD-CM-MMのいずれか1つを含む第2のポリペプチドとを含み得る。そのような場合、MMは、非アルファ炭素共有結合を介して第2のポリペプチド（すなわち、MMを含むポリペプチド）にテザリングされ得る。代替的にまたは追加的に、MMは、非アルファ炭素共有結合を介して第1のポリペプチド（すなわち、MMを含まないポリペプチド）にテザリングされてもよい。

【0054】

いくつかの実施形態では、活性化可能な抗体は、2つを超えるポリペプチドを有し得る。そのような活性化可能な抗体は、上述のポリペプチドの任意の組み合わせを含み得る。いくつかの実施形態では、活性化可能な抗体は、4つのポリペプチドを含み得る。いくつかの例では、ポリペプチドのうちの2つにおいて、それぞれがHVDを含み得、他の2つのポリペプチドにおいて、それぞれがN末端からC末端の方向に、MM-CM-LVD、MM-CM-scfv、MM-CM-LVD-scfv、MM-CM-scfv-LVD、LVD-CM-MM、scfv-CM-MM、LVD-scfv-CM-MM、MM-CM-VHH、VHH-CM-MM、またはscfv-LVD-CM-MMを含んでいて

10

20

30

40

50

もよい。いくつかの例では、ポリペプチドのうちの2つにおいて、それぞれがLV Dを含み得、他の2つのポリペプチドにおいて、それぞれがN末端からC末端の方向に、MM-CM-HVD、MM-CM-s c F v、MM-CM-HVD-s c F v、MM-CM-s c F v-HVD、HVD-CM-MM、s c F v-CM-MM、HVD-s c F v-CM-MM、s c F v-HVD-CM-MMを含んでいてもよい。これらの場合、MMは、非アルファ炭素共有結合を介して、MMを含むポリペプチドにテザリングされ得る。代替的または追加的に、MMは、非アルファ炭素共有結合を介して、MMを含まないポリペプチドにテザリングされ得る。

【0055】

本明細書に記載される例では、HVD及びLV Dは、抗体またはその断片（例えば、Fab）に含まれ得る。活性化可能な抗体は、例えば、重鎖定常領域（CH）、軽鎖定常領域（CL）、ヒンジ、Fcドメイン、またはそれらの組み合わせなど、抗体の1つ以上のさらなる成分をさらに含んでいてもよい。

【0056】

図3A～図3Cは、活性化可能な抗体の3つの例示的な構成を示す。図3Aは、ナノボディ（すなわち、例示的な抗体またはTBとしての単ドメイン抗体）と、それにCMを介して結合したMMとを含む例示的な活性化可能な抗体を示す。ナノボディ及びMMは、マスクとナノボディとの間の非アルファ炭素共有結合によってテザリングされる。

【0057】

図3Bは、重鎖可変領域（V_H）及び軽鎖可変領域（V_L）を含むs c F vと、CMを介してV_Lと結合したMMとを含む活性化可能な単鎖断片可変部（s c F v）を示す。MM及びs c F vはまた、MMとV_Hとの間の非アルファ炭素共有結合によってもテザリングされている。活性化可能な抗体の例には、図3Bの活性化可能なs c F vのいくつかの代替的な構成も含まれる。一例では、MMは、s c F vのV_LにCMを介して結合される。MM及びs c F vはまた、マスクとV_Lとの間の非アルファ炭素共有結合によってもテザリングされている。別の例では、MMは、s c F vのV_HにCMを介して結合される。MM及びs c F vはまた、MMとV_Hとの間の非アルファ炭素共有結合によってもテザリングされている。別の例では、MMは、s c F vのV_HにCMを介して結合される。MM及びs c F vはまた、MMとV_Lとの間の非アルファ炭素共有結合によってもテザリングされている。

【0058】

図3Cは、二量体を含む活性化可能な完全長抗体を示し、二量体の各単量体は、重鎖、軽鎖、CMを介して軽鎖と結合したMMを含む。MM及び活性化可能な完全長抗体は、MMと重鎖との間の非アルファ炭素共有結合によってもテザリングされている。活性化可能な抗体の例には、図3Cの活性化可能な完全長抗体のいくつかの代替的な構成も含まれる。一例では、MMは、CMを介して軽鎖と結合される。MM及び完全長抗体は、MMと軽鎖との間の非アルファ炭素共有結合によってもテザリングされている。別の例では、MMは、CMを介して重鎖と結合される。MM及び完全長抗体は、MMと軽鎖との間の非アルファ炭素共有結合によってもテザリングされている。別の例では、MMは、CMを介して重鎖と結合される。MM及び完全長抗体は、MMと重鎖との間の非アルファ炭素共有結合によってもテザリングされている。

【0059】

図2A～図2D及び図3A～図3Bの概略図は、非限定的な概念実証の例として例示されている。MMがABと二重アンカー（例えば、非アルファ炭素共有結合だけでなくCMを介して）結合されている活性化可能な抗体には、活性化可能な完全長抗体、活性化可能な多特異性抗体（例えば、二重特異性T細胞エンゲージャー（BiTE）などの2つの細胞を架橋できる多特異性抗体を含む二重特異性抗体及び三重特異性抗体）、及び活性化可能な抗体断片（例えば、s c F v、ダイアボディ、ナノボディ、Fabなど）を含む任意のタイプの活性化可能な抗体が広範に含まれる。二重アンカー型の多特異性活性化可能抗体の例を図11A～図11Iに示す。図11A～図11Iは、全てのマスク位置における

二重アンカーを図示しているが、本開示は、二重アンカーである1つ以上のマスクと、二重アンカーでない（すなわち、CMを介してTBにのみアンカー結合されている（単一アンカー型））1つ以上の他のマスクとを含むコンストラクトも含む。本開示はまた、二重アンカーである1つ以上のマスクと、マスクされていない1つ以上のTBとを含むコンストラクトも含む。図11Aは、例示的な二重特異性ナノボディタンデムを示す。図11Bは、2つのscFvを含む例示的なダイアボディを示す。いくつかの例では、2つのscFvは、ペプチドリンカーによって結合され得る。代替の例では、2つのscFvは、いかなるリンカーによっても結合されない。図11Cは、scFv及びFabを含む例示的な二重特異性抗体を示す。いくつかの例では、二重特異性抗体は、二重特異性T細胞エンゲージャー（BiTE）であり得る。図11Cの抗体は、1つ以上のFcドメインをさらに含み得る。図11Dは、例示的な二重特異性F(ab')₂を示す。図11Dは、例示的な二重特異性抗体を示す。図11E～図11Iは、二重アンカー型の三重特異性及び他の多特異性の活性化可能な抗体のさらなる例を示す。二重アンカー型の多特異性活性化可能抗体では、MMはCMを介してABと結合することができる。MMは、MMと結合したABとの、または活性化可能な抗体の別の成分との、1つ以上の非アルファ炭素共有結合によってテザリングされ得る。多特異性活性化可能抗体のいくつかの例では、MMの全てが二重アンカー型である。ある特定の多特異性活性化可能な例では、全てではないが一部のMMのみが二重アンカー型である。図2A～図2DのTBは、抗体及び下記の標的結合タンパク質のセクションに記載されるものを含む、任意の抗原結合タンパク質であり得る。

10

20

【0060】

いくつかの実施形態では、活性化可能な標的結合タンパク質（例えば、活性化可能な抗体）は、MMが結合していないABの標的結合活性のコントロールレベルと比較して、その標的結合活性の低下によって特徴付けられ得る。例えば、活性化可能なTBは、MMが結合されていないTBの標的結合活性のコントロールレベルと比較して、標的結合活性が少なくとも1分の1、2分の1、4分の1、6分の1、8分の1、10分の1、20分の1、30分の1、40分の1、50分の1、60分の1、70分の1、80分の1、90分の1、100分の1、200分の1、300分の1、400分の1、500分の1、600分の1、700分の1、800分の1、900分の1、1000分の1、2000分の1、5000分の1、または10000分の1に低下することに特徴付けられる。

30

【0061】

いくつかの実施形態では、活性化可能なTB（例えば、活性化可能な抗体）は、MMが結合されたTBの標的結合活性のコントロールレベルと比較して、その標的結合活性が低下することによって特徴付けられ得るが、TB及びMMは、非アルファ炭素共有結合によってテザリングされていない（すなわち、単一アンカー型の活性化可能な抗体）。例えば、いくつかの実施形態では、活性化可能なTBは、MMが結合したTBの標的結合活性のコントロールレベルと比較して、標的結合活性が少なくとも、2分の1、4分の1、6分の1、8分の1、10分の1、20分の1、30分の1、40分の1、50分の1、60分の1、70分の1、80分の1、90分の1、100分の1、200分の1、300分の1、400分の1、500分の1、600分の1、700分の1、800分の1、900分の1、1000分の1、2000分の1、5000分の1、10000分の1、15000分の1、20000分の1、30000分の1、40000分の1、または50000分の1に低下することを特徴とするが、TB及びMMは非アルファ炭素共有結合によってテザリングされていない。いくつかの実施形態では、活性化可能なTBは、標的結合活性の少なくとも2分の1の低下によって特徴付けられる。いくつかの実施形態では、活性化可能なTBは、標的結合活性の少なくとも4分の1の低下によって特徴付けられる。いくつかの実施形態では、活性化可能なTBは、標的結合活性の少なくとも10分の1の低下によって特徴付けられる。いくつかの実施形態では、活性化可能なTBは、標的結合活性の少なくとも500分の1の低下によって特徴付けられる。いくつかの実施形態では、活性化可能なTBは、標的結合活性の少なくとも100分の1の低下によって特徴付け

40

50

られる。いくつかの実施形態では、活性化可能なTBは、標的結合活性の少なくとも200分の1の低下によって特徴付けられる。いくつかの実施形態では、活性化可能なTBは、標的結合活性の少なくとも300分の1の低下によって特徴付けられる。いくつかの実施形態では、活性化可能なTBは、標的結合活性の少なくとも500分の1の低下によって特徴付けられる。いくつかの実施形態では、活性化可能なTBは、標的結合活性の少なくとも1000分の1の低下によって特徴付けられる。いくつかの実施形態では、活性化可能なTBは、標的結合活性の少なくとも5000分の1の低下によって特徴付けられる。いくつかの実施形態では、活性化可能なTBは、標的結合活性の少なくとも10000分の1の低下によって特徴付けられる。いくつかの実施形態では、活性化可能なTBは、標的結合活性の少なくとも15000分の1の低下によって特徴付けられる。いくつかの実施形態では、活性化可能なTBは、標的結合活性の少なくとも20000分の1の低下によって特徴付けられる。いくつかの実施形態では、活性化可能なTBは、標的結合活性の少なくとも30000分の1の低下によって特徴付けられる。

10

20

30

40

50

【0062】

標的結合タンパク質

本明細書で開示される活性化可能な標的結合タンパク質（例えば、活性化可能な抗体）は、1または複数の標的結合タンパク質、すなわち、標的分子に結合することができるタンパク質を含み得る。いくつかの実施形態では、標的結合タンパク質（TB）は、サイトカイン、ホルモン、増殖因子、またはアゴニストであり得る。いくつかの実施形態では、標的結合タンパク質（TB）は、抗原結合タンパク質（AB）であり得る。いくつかの実施形態では、ABは抗体またはその断片、例えばモノクローナル抗体、単鎖抗体、Fab断片、F(ab')₂断片、単鎖可変断片（scFv）、ダイアボディ（scFvの非共有結合二量体）、単鎖抗体（scab）、VHH、ドメイン抗体（dAb）、または単一ドメイン抗体（SDA）（ナノボディ、例えば単一ドメイン重鎖抗体、単一ドメイン軽鎖抗体）であり得る。いくつかの実施形態では、ABは、完全長抗体であり得る。いくつかの実施形態では、ABは、免疫学的に活性な断片であり得る。いくつかの実施形態では、ABは、抗原結合断片（「Fab」）である。いくつかの実施形態では、ABは、マウス、他のげっ歯類、キメラ、ヒト化または完全ヒトモノクローナル抗体であり得る。本開示には、上記に列挙したドメインのいずれか、例えば、SDA、Fv、scFv、Fab、scFab、VHH、及びdAbのうちの1つ以上を含む1つ以上のポリペプチドと、SDA、Fv、scFv、Fab、VHH、scFab、及びdAbから選択される1つ以上との組み合わせを有する構造が含まれる。

【0063】

「抗体」という用語は、本明細書ではその最も広い意味で使用され、抗原またはエピトープに特異的に結合する1または複数の抗原結合ドメインを含むある特定の種類の免疫グロブリン分子を含む。抗体には、例えば、インタクトな抗体（例えば、インタクトな免疫グロブリン）、抗体断片、二重特異性、及び多特異性抗体が具体的に含まれる。抗原結合ドメインの1つの例は、VH-VL二量体によって形成される抗原結合ドメインである。抗体のさらなる例が、本明細書に記載されている。抗体のさらなる例が、当技術分野で既知である。

【0064】

いくつかの例では、ABは、単一ドメイン抗体（ナノボディとも呼ばれる）であり得る。単一ドメイン抗体は、単一の単量体可変抗体ドメインである抗体断片であり得る。単一ドメイン抗体は、対応する完全長抗体と同様の抗原への親和性を有し得る。単一ドメイン抗体は、Fc二量体を含むFcタグ付き単一ドメイン抗体であり得、各Fc単量体が単一ドメイン抗体と結合している。

【0065】

いくつかの実施形態では、ABは、単一特異性であり得、例えば、1つの抗原のみに結合することができる。いくつかの実施形態では、ABは、多特異性（例えば、二重特異性または三重特異性）であり得、例えば、複数の抗原に結合することができる。いくつかの

実施形態では、活性化可能な抗体は、プロ二重特異性T細胞エンゲージャー（*pro-BITE*）分子または二重親和性再標的化抗体（*DART*）の一部として調合され得る。いくつかの実施形態では、活性化可能な抗体は、プロキメラ抗原受容体（*pro-CAR*）改変T細胞、または*CAR*改変NK細胞などの他の操作された受容体もしくは他の免疫エフェクター細胞の一部として調合され得る。いくつかの実施形態では、活性化可能な抗体は、プロキメラ抗原受容体（*CAR*）改変T細胞の一部として調合され得る。いくつかの実施形態では、活性化可能な抗体は、プロキメラ抗原受容体（*CAR*）改変NK細胞の一部として調合され得る。いくつかの実施形態では、活性化可能な抗体は、T細胞二重特異性抗体（*TCB*）の一部として調合され得る。

【0066】

10

「軽鎖」は、1つの可変ドメイン（*VL*）と1つの定常ドメイン（*CL*）とからなる。カッパまたはラムダと呼ばれる2つの異なる軽鎖タイプまたはクラスが存在する。

【0067】

「重鎖」は、1つの可変ドメイン（*VH*）と3つの定常領域ドメイン（*CH1*、*CH2*、*CH3*）とからなる。主要な重鎖クラスまたはアイソタイプは5つあり、そのうちのいくつかはいくつかのサブタイプを有し、これらは抗体分子の機能的活性を決定する。免疫グロブリンの5つの主要なクラスは、免疫グロブリンM（*IgM*）、免疫グロブリンD（*IgD*）、免疫グロブリンG（*IgG*）、免疫グロブリンA（*IgA*）、及び免疫グロブリンE（*IgE*）である。*IgG*は、突出して最も豊富な免疫グロブリンであり、いくつかのサブクラス（ヒトでは*IgG1*、*2*、*3*、及び*4*）を有する。

20

【0068】

「断片抗原結合」（*Fab*）は、重鎖の*VH*ドメイン及び*CH1*ドメインと対になった完全な軽鎖を含有する。

【0069】

*F(ab')₂*断片は、抗体がペプシンによってヒンジ領域の下で切断される場合に形成され、この場合、抗体分子の2つの断片抗原結合ドメイン（*Fab*）は連結されたままである。*F(ab')₂*断片は、ヒンジ領域によって互いに結合された重鎖の*VH*及び*CH1*の2つのドメインと対になった2つの完全な軽鎖を含有する。

【0070】

「断片結晶化可能な」（*Fc*）断片（本明細書では*Fc*ドメインとも呼ばれる）は、対になった*CH2*及び*CH3*ドメインに対応し、エフェクター分子及び細胞と相互作用する抗体分子の部分である。重鎖アイソタイプ間の機能的な差異は、主に*Fc*断片にある。

30

【0071】

「単鎖*Fv*」（*scFv*）は、合成ペプチドの伸長によって重鎖の可変ドメイン（*VH*）に連結された軽鎖の可変ドメイン（*VL*）のみを含む。単鎖*Fv*という名称は、断片可変部に由来する。

【0072】

「ヒンジ領域」または「ドメイン間」は、*Fab*断片を*Fc*ドメインに接合または連結する柔軟なアミノ酸の伸長である。

【0073】

40

「合成ヒンジ領域」は、*Fab*断片を*Fc*ドメインに接合または連結するアミノ酸配列である。

【0074】

「プロドメイン」は、マスキングペプチド（*MM*）と呼ばれる抗原結合を阻害する部分と、切断可能ペプチド（*CM*）と呼ばれるプロテアーゼ切断可能基質を含む部分とを有し、標的結合タンパク質（*TB*）、抗体、その抗原結合断片、または抗原結合ドメイン（*AB*）に連結されると、*TB*または*AB*による抗原結合を阻害するように機能するポリペプチドを指す。プロドメインは、*MM*と*CM*との間にリンカーペプチド（*L1*）を含み得る。プロドメインはまた、抗体へのプロドメインの結合を容易にするために、プロドメインのカルボキシル末端にリンカーペプチド（*L2*）を含んでもよい。ある特定の実施形態で

50

は、プロドメインは、以下の式（下記の式は、N末端からC末端方向のアミノ酸配列を表す）、すなわち、(MM) - (CM)、(MM) - L1 - (CM)、(MM) - (CM) - L2、または (MM) - L1 - (CM) - L2 のうちの1つを含む。

【0075】

TB（例えば、AB）は、標的に特異的に結合する。本明細書で使用される場合、「特異的結合」、「免疫学的結合」、及び「免疫学的結合特性」という用語は、免疫グロブリン分子とその免疫グロブリンが特異的である抗原との間に生じる、その種類の非共有結合的相互作用を指す。免疫学的結合相互作用の強度または親和性は、相互作用の解離定数 (K_d) の単位で表すことができ、より小さな K_d はより大きな親和性を表す。選択されたポリペプチドの免疫学的結合特性は、当技術分野で周知の方法を使用して定量化することができる。1つのそのような方法は、抗原結合部位／抗原複合体形成及び解離の速度の測定を伴い、それらの速度は、複合体パートナーの濃度、相互作用の親和性、及び両方向において速度に等しく影響する幾何的パラメータに依存する。したがって、「オン速度定数」(K_{on}) 及び「オフ速度定数」(K_{off}) の両方は、濃度ならびに会合及び解離の実際の速度を計算することによって決定することができる。(Nature 361: 186-187 (1993) を参照されたい)。 K_{off}/K_{on} の比率は、親和性に関連しない全てのパラメータの解除を可能にし、解離定数 K_d に等しい。(一般に、Davies et al. (1990) Annual Rev Biochem 59: 439-473 を参照されたい)。本開示のTBは、結合定数 (K_d) $\leq 1 \mu M$ で標的に特異的に結合し得る。いくつかの実施形態では、本開示のTBは、結合定数 (K_d) $\leq 100 nM$ で標的に特異的に結合し得る。いくつかの実施形態では、本開示のTBは、結合定数 (K_d) $\leq 10 nM$ で標的に特異的に結合し得る。いくつかの実施形態では、本開示のTBは、放射性リガンド結合アッセイまたは当業者に知られている同様のアッセイなどのアッセイによって測定されるように、結合定数 (K_d) $\leq 100 pM \sim 約 1 pM$ で標的に特異的に結合し得る。

10

20

30

【0076】

TB（例えばAB）の標的は、タンパク質または他のタイプの分子であり得る。TBの標的のクラスの例としては、細胞表面受容体及び分泌結合タンパク質（例えば、増殖因子）、可溶性酵素、構造タンパク質（例えば、コラーゲン、フィブロネクチン）などが挙げられる。いくつかの例では、TBの標的は、対象における疾患（例えば、がん）に関連するタンパク質であり得る。

【0077】

いくつかの実施形態では、活性化可能な標的結合タンパク質または活性化可能な抗体は、血清半減期延長部分（例えば、免疫グロブリン（例えば、IgG）または血清アルブミン（例えば、ヒト血清アルブミン（HSA））などの血清タンパク質に結合するポリペプチド）を含み得る。半減期延長部分は、TBと結合され得る。

【0078】

いくつかの例では、半減期延長部分は、抗体の断片の結晶可能領域 (Fc) 領域であり得る。半減期延長部分の他の例としては、ヘキサ-*hist GST* (グルタチオンS-トランスフェラーゼ) グルタチオンアフィニティー、カルモジュリン結合ペプチド (CBP)、ストレップタグ、セルロース結合ドメイン、マルトース結合タンパク質、S-ペプチドタグ、キチン結合タグ、免疫反応性エピトープ、エピトープタグ、E2Tag、HAエピトープタグ、Mycエピトープ、FLAGエピトープ、AU1及びAU5エピトープ、Glu-Gluエピトープ、KT3エピトープ、IRSエピトープ、Btagエピトープ、プロテインキナーゼ-Cエピトープ、ならびにVSVエピトープが挙げられる。

40

【0079】

いくつかの実施形態では、活性化可能な標的結合タンパク質または活性化可能な抗体の血清半減期は、対応するタンパク質の血清半減期よりも長くてもよく（例えば、活性化可能な抗体は、半減期延長部分を有しない）、例えば、活性化可能な抗体の pK は、対応する抗体の pK よりも長い。いくつかの実施形態では、活性化可能な標的結合タンパク質また

50

は活性化可能な抗体の血清半減期は、対応する抗体の血清半減期と同様である。いくつかの実施形態では、活性化可能な標的結合タンパク質（例えば、活性化可能な抗体）の血清半減期は、生物に投与された場合、少なくとも15日、12日、11日、10日、9日、8日、7日、6日、5日、4日、3日、2日、1日、20、18時間、16時間、14時間、12時間、10時間、8時間、6時間、4時間、3時間、2時間、または1時間である。

【0080】

マスキング部分（MM）

活性化可能な高分子内の「マスキング部分」は、活性化可能な高分子のその標的及び／またはエピトープへの結合を「マスク」し、または弱め、または他の形で阻害する。いくつかの実施形態では、標的結合タンパク質（TB）（例えば、ABまたは他の治療用もしくは診断用タンパク質）とMMとの結合または修飾は、当技術分野で既知の阻害（例えば、限定されないが、抗原結合ドメインの構造変化及び競合）によって、TBがその標的及び／またはエピトープに特異的に結合する能力を阻害し得る。いくつかの実施形態では、TBとMMとの結合または修飾は、TBがその標的及び／またはエピトープに特異的に結合する能力を低減または阻害する構造変化をもたらし得る。いくつかの実施形態では、抗原結合ドメインを含むタンパク質とMMとの結合または修飾は、抗原結合ドメインがその標的及び／またはエピトープに特異的に結合する能力を立体的に遮断、低減、または阻害する。

【0081】

本明細書における活性化可能な標的結合タンパク質（例えば、活性化可能な抗体）は、標的結合タンパク質（例えば、AB）の標的への結合を妨害することができる1つ以上のマスク部分（MM）を含んでもよい。一般に、MMは、本明細書に記載のCM及び任意選択で1つ以上のリンカーによって、標的結合タンパク質（例えば、AB）に結合され得る。さらに、MMは、本明細書に記載の活性化可能な標的結合タンパク質（または抗体）に追加的にテザリングされて、活性化可能な二重アンカー型のマスク化標的結合タンパク質を形成してもよい。いくつかの実施形態では、MMは活性化可能なTBが標的に結合するのを阻止するが、分子が活性化されると（CMがプロテアーゼによって切断されると）、MMは標的結合タンパク質が標的に結合するのを実質的にまたは著しく妨げない。

【0082】

いくつかの実施形態では、MMはAB（または他の所望のタンパク質）と相互作用して、それによって標的結合タンパク質（例えば、AB）とその結合パートナーとの間の相互作用を低減させてもまたは阻害してもよい。いくつかの実施形態では、MMは、標的結合タンパク質の天然に存在する結合パートナー（例えば、AB）の少なくとも部分的または完全なアミノ酸配列を含み得る。例えば、MMは、天然に存在する結合パートナーの断片であってよい。断片は、95%、90%、80%、75%、70%、60%、50%、40%、30%、25%または20%以下の、天然に存在する結合パートナーとの核酸またはアミノ酸配列相同性を保持してよい。いくつかの実施形態では、MMは、標的結合タンパク質（例えば、AB）の同族ペプチドであり得る。例えば、MMは、標的結合タンパク質（例えば、AB）のエピトープの配列またはその断片の配列を含み得る。本明細書で使用される場合、「天然に存在する」という用語は、ある対象に適用される場合、対象を天然に見いだすことができるという事実を指す。例えば、天然の供給源から単離され得、かつ研究室において人間によって意図的に修飾されていないか、または別様に天然に存在する、ある生物（ウイルスを含む）に存在するポリペプチドまたはポリヌクレオチド配列。

【0083】

いくつかの実施形態では、MMは、天然に存在しないアミノ酸配列、または天然に存在する結合パートナーもしくは標的タンパク質のアミノ酸配列を含有しないアミノ酸配列を含み得る。ある特定の実施形態では、MMは、標的結合タンパク質（例えばAB）の天然の結合パートナーではない。MMは、標的結合タンパク質（例えばAB）に対する結合の親和性及び／またはアビディティを低下させるアミノ酸の変化を含む、標的結合タンパ

ク質（例えば A B）に対する修飾された結合パートナーであり得る。いくつかの実施形態では、M M は、A B の天然の結合パートナーとの核酸またはアミノ酸相同性を含有しない場合があり、または実質的に含有しない場合がある。その他の実施形態では、M M は、標的結合タンパク質（例えば、A B）の天然の結合パートナーと、5 %、10 %、15 %、20 %、25 %、30 %、35 %、40 %、45 %、50 %、55 %、60 %、65 %、70 %、75 % または 80 % 以下の類似性を有する。

【0084】

いくつかの実施形態では、M M は A B（または他の活性化可能なタンパク質）に特異的に結合しないが、立体障害などの非特異的相互作用を通じて、標的結合タンパク質（例えば、A B）の結合パートナーへの結合を妨害する場合がある。例えば、活性化可能な標的結合タンパク質内に M M を配置すると、活性化可能な標的結合タンパク質の三次構造または四次構造によって、M M が電荷ベースの相互作用を通じて標的結合タンパク質をマスクできるようになり、それによって M M を所定の位置に保持して、結合パートナーが標的結合タンパク質にアクセスするのを妨害できるようになり得る。

【0085】

いくつかの実施形態では、M M は、標的結合タンパク質（例えば、A B）に結合するための解離定数を有し得、その解離定数は、標的結合タンパク質の標的に対する解離定数以下である。いくつかの実施形態では、M M は、C M の切断後に標的に結合するための標的結合タンパク質を妨げない場合があり、またはそれと競合しない場合がある。

【0086】

M M の構造的特性は、例えば、タンパク質が標的に結合するのを妨げるのに必要となる最少アミノ酸配列、対象である標的タンパク質—タンパク質結合の対、標的結合タンパク質の大きさ、リンカーの有無などの要因に従って選択され得る。

【0087】

いくつかの実施形態では、M M は、結合された標的結合タンパク質に固有であり得る。M M の例には、標的結合タンパク質またはその断片の結合ドメインに結合するように特別にスクリーニングされた M M（例えば、親和性マスクなど）が含まれる。標的結合タンパク質に固有の M M 及び結合パートナー／標的の結合ドメインに特異的及び／または選択的に結合する M M を取得するために M M をスクリーニングする方法が本明細書に提供されており、これにはタンパク質表示方法が含まれ得る。

【0088】

本明細書で使用される場合、「マスキング効率」または「M E」という用語は、活性化可能な標的結合タンパク質（例えば、活性化可能な A B）の活性（例えば E C 50）をコントロール標的結合タンパク質（例えば抗体）の活性で割ったものを指し、コントロール標的結合タンパク質（例えばコントロール抗体）は、活性化可能な標的結合タンパク質（例えば活性化可能な抗体）の切断産物、または活性化可能な標的結合タンパク質の標的結合タンパク質として使用される標的結合タンパク質（例えば抗体）またはその断片のいずれかであり得る。標的化結合（または抗体）活性のレベルが低減している活性化可能な標的結合タンパク質は、10 を超えるマスキング効率を有し得る。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の活性化可能な標的結合タンパク質（例えば、活性化可能な抗体）は、10、100、1000、5000、10,000、または15,000を超えるマスキング効率を有し得る。

【0089】

いくつかの実施形態では、M M は、約 2 ~ 50 アミノ酸長のポリペプチドであり得る。例えば、M M は、2 ~ 40、2 ~ 30、2 ~ 20、2 ~ 10、5 ~ 15、10 ~ 20、15 ~ 25、20 ~ 30、25 ~ 35、30 ~ 40、35 ~ 45、40 ~ 50 のアミノ酸長のポリペプチドであり得る。例えば、M M は、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、または

10

20

30

40

50

50

T B（例えば、A B）がT B（例えば、A B）と結合したMMにテザリングされている場合のT B（例えば、A B）の標的または結合パートナーに対する結合親和性は、T B（例えば、A B）がプロテアーゼによってMMから切断されている場合のT B（例えば、A B）の結合パートナーに対する結合親和性に比べて、少なくとも5分の1、10分の1、25分の1、50分の1、100分の1、250分の1、500分の1、1,000分の1、2,500分の1、5,000分の1、10,000分の1、50,000分の1、100,000分の1、500,000分の1、1,000,000分の1、5,000,000分の1、10,000,000分の1、または50,000,000分の1に低下し得る。

50

T B (例えば、A B) が T B (例えば、A B) と結合した M M にテザリングされている

20

30

40

50

T B 及び M M は、T B と M M との間に非アルファ炭素共有結合（複数可）を形成すること

とができる1つ以上のシステイン残基を含み得る。いくつかの実施形態では、1つ以上の非アルファ炭素共有結合は、システインの硫黄原子間または硫黄原子を含む他のアミノ酸残基間に形成され得る。このような残基は、活性化可能なTB（例えば、TB及びMM）において天然に存在し得るか、または部位特異的変異誘発、化学変換、もしくは非天然アミノ酸の誤組み込みによって活性化可能なTBに組み込まれ得る。

【0098】

いくつかの実施形態では、システイン残基は、立体構造的に拘束された活性化可能なTBを提供する位置にあり得るが、CM切断後、MMは、活性化TBの標的結合を実質的または有意に妨害しない位置にあり得る。

【0099】

活性化可能な標的結合タンパク質におけるシステイン残基の位置は、活性化可能な標的結合タンパク質またはその成分の構造（例えば、結晶構造、またはNMR、分光法、もしくは計算法などの他の技法に基づいた他の構造モデル）に基づいて決定され得る。様々な相同性ベースの計算タンパク質モデルのいずれかを使用して、MMの有無にかかわらず、標的結合タンパク質の三次元構造を生成できる。これには、例えば、Rosetta modeling software (rosettacommons.org)、Discovery Studio (Dassault Systemes BIOVIA)、BioLuminate、PIPER、Prime (Schrodinger, Inc.)、AlphaFold Colab (Google, Inc.)、SWISSMODEL E L E Rなどが含まれる。Discovery Studioソフトウェアを使用して得られた三次元構造の例は、図12A～図12Bに示されている活性化可能な標的結合タンパク質（活性化可能な抗PDL1抗体）の構造である。例えば、MMがTBと相互作用する領域を決定することができ、その領域におけるシステイン残基（天然に存在するまたは導入される）を使用して、TBとMMとをテザリングする非アルファ炭素共有結合を形成することができる。一般に、ジスルフィド結合したシステイン残基のC α 原子は、3.0～7.5 Åの範囲にある。したがって、第一近似として、その範囲内のC α 距離を有するMM及びTB残基が、システイン変異の良好な候補となる。例えば、ジスルフィド結合を形成する可能性が高いMM残基及びTB残基をさらに特定するために、MODIP (Dani, Ramakrishnan, Varadarajan 2003)、Disulfide by Design (Craig & Dombkowski, 2013)、及びSSbondPre (Gao, Dong, Li, Liu & Liu, 2020)を含む様々なジスルフィド予測プログラムを使用できる。

【0100】

いくつかの実施形態では、非アルファ炭素共有結合、例えば、MMとTB（例えば、AB）とをテザリングするジスルフィド結合は、第1のシステイン及び第2のシステインによって形成され得る。一例では、第1のシステインはMM内にあり、第2のシステインはTB内にある。別の例では、第1のシステインは、MMに結合されたペプチド内にあり、第2のシステインはTB内にある。別の例では、第1のシステインがMM内にあり、第2のシステインが、TBに結合されたペプチド内にある。このような例では、MMまたはTBに結合されたペプチドは、リンカーまたはペプチドであり得る。一例では、MMまたはTBに結合されたペプチドは、MMまたはTBの末端（例えば、N末端またはC末端）に隣接するペプチド位置であるリーダーペプチドであり得る。リーダーペプチドは、シグナルペプチドとMMまたはTBとの間に位置付けられ得る。

【0101】

いくつかの実施形態では、MMとのジスルフィド結合を形成する1つ以上のシステイン（複数可）は、活性化可能な標的結合タンパク質中に天然に存在するシステイン（複数可）であり得る。いくつかの実施形態では、ジスルフィド結合を形成するシステインのうちの1つ以上が、活性化可能なTB（例えば、AB）へと操作され得る。

【0102】

好適なMMは、調節可能なMMを有する候補の活性化可能なTBのライブラリからスク

10

20

30

40

50

リーニング手順を通じて特定される、及び／またはさらに最適化され得る。例えば、TB及びCMは、所望の酵素／標的の組み合わせを提供するように選択されることができ、MMのアミノ酸配列は、活性化可能な表現型を提供するMMを特定するための、以下に記載されるスクリーニング手順によって特定できる。例えば、ランダムなペプチドライブラリ（例えば、2～40個以上のアミノ酸を含むペプチドライブラリ）を、本明細書にて開示されるスクリーニング法で使用して、好適なMMを特定してよい。

【0103】

いくつかの実施形態では、TB（例えば、AB）に対する特異的結合親和性を有するMMを、候補MMからなるペプチドスキャフォールドのライブラリであって、各スキャフォールドが膜貫通タンパク質及び候補MMによって構成されるライブラリを提供することを
10
含むスクリーニング手順を介して、特定できる。続いて、ライブラリを、タンパク質の全体または一部、例えば完全長のタンパク質、天然に存在するタンパク質断片、またはタンパク質を含有する非天然の断片（対象である結合パートナーに結合できる）と接触させて、検出可能に結合したタンパク質を有する1種以上の候補MMを特定してよい。スクリーニングは、1回以上の磁気活性化ソーティング（MACS）または蛍光活性化ソーティング（FACS）、ならびに、例えばWO2009025846及びUS20200308243A1（参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）に記載されているような、ABに対するMMの結合親和性の決定及び続くマスキング効率の決定によって行われてよい。

【0104】

いくつかの実施形態では、MMは、特定の抗体または抗体断片とともに使用するために
20
選択され得る。追加の好適なMMは、WO2021207657、WO2021142029、WO2021061867、WO2020252349、WO2020252358、WO2020236679、WO2020176672、WO2020118109、WO2020092881、WO2020086665、WO2019213444、WO2019183218、WO2019173771、WO2019165143、WO2019075405、WO2019046652、WO2019018828、WO2019014586、WO2018222949、WO2018165619、WO2018085555、WO2017011580、WO2016179335、WO2016179285、WO2016179257、WO2016149201、WO2016014974、及びWO2016118629に開示されている。
30

【0105】

切断可能な部分（CM）

活性化可能な標的結合タンパク質は、上記で定義される1つ以上の切断可能な部分（CM）を含み得る。

【0106】

いくつかの実施形態では、活性化可能なTBは、TB（例えば、AB）とMMとの間にCMを含み得る。活性化可能な標的結合タンパク質（例えば、AB）のCM及びTBは、TBが所与の標的に対する結合部分を含み、CMが1つ以上のプロテアーゼに対する基質を含むように選択され得、ここで、1つ以上のプロテアーゼは、組織（例えば、対象の治
40
療部位または診断部位）において標的と共局在される。いくつかの実施形態では、活性化可能なTBは、例えば、CMの部位を切断することができる1つ以上のプロテアーゼが、非治療部位の組織（例えば、健康な組織）よりも、治療部位または診断部位の標的含有組織に比較的高いレベルで存在する場合に特に使用され得る。

【0107】

いくつかの実施形態では、本明細書におけるCMは、がんまたはいくつかのがんにおいて報告されているプロテアーゼの基質を含み得る。例えば、La Rocca et al., British J. Cancer 90 (7): 1414-1421, 2004を参照されたい。本明細書で用いられるCM構成成分での使用に好適な基質としては、がん細胞及び組織中により広く見いだされる基質が挙げられる。したがって、ある特定の実施
50

形態において、CMは、がんに関連する疾患組織中でより広く見いだされるプロテアーゼの基質を含み得る。がんの例としては、胃癌、乳癌、骨肉腫、食道癌、乳癌、HER2陽性癌、カボジ肉腫、毛様細胞性白血病、慢性骨髄性白血病（CML）、濾胞性リンパ腫、腎細胞癌（RCC）、黒色腫、神経芽細胞腫、基底細胞癌、皮膚T細胞リンパ腫、鼻咽頭腺癌、卵巣癌、膀胱癌、BCG耐性筋層非浸潤性膀胱癌（NMIBC）、子宮内膜癌、膵臓癌、非小細胞肺癌（NSCLC）、大腸癌、食道癌、胆嚢癌、神経膠腫、頭頸部癌、子宮癌、子宮頸癌または精巣癌などが挙げられる。いくつかの実施形態では、CM構成成分は、腫瘍組織中により行き渡っているプロテアーゼ（複数可）の基質を含む。例えば、プロテアーゼ（複数可）は、対象における腫瘍によって産生され得る。

【0108】

いくつかの実施形態では、活性化可能なTBは、MMとTB（例えば、AB）との間の第1のCM（CM1）と、CMの切断によってTBからMMを完全に分離できる第2のCM（CM2）とを含み得る。いくつかの例では、第1のCM及び第2のCMは、同じプロテアーゼの基質を含み得る。いくつかの例では、第1のCM及び第2のCMは、異なるプロテアーゼの基質を含み得る。いくつかの例では、第1のCM及び第2のCMは、同じ配列を有し得る。いくつかの例では、第1のCM及び第2のCMは、異なる配列を有し得る。

【0109】

第2のCM（CM2）は、その切断がTBからのMMの解離を促進する活性化可能なTB内の位置にあり得る。いくつかの実施形態では、CM2は、MMと非アルファ炭素共有結合との間に位置し得る。いくつかの実施形態では、第2のCMは、MM内にあり、非アルファ炭素共有結合から最大で10アミノ酸離れている場合がある。いくつかの実施形態では、第2のCMは、TB内にあり、非アルファ炭素共有結合から最大で10アミノ酸離れている場合がある。第2のCMは、非アルファ炭素共有結合を形成するシステインに隣接（例えば、第2のCMとシステインとの間に0個のアミノ酸）して配置されてもよい。あるいは、第2のCMは、非アルファ炭素共有結合、例えば、ジスルフィド結合を形成するシステインから最大で10、9、8、7、6、5、4、3、2、または1アミノ酸（複数可）離れて配置され得る。活性化可能な標的結合タンパク質は、活性化環境外での標的結合によって引き起こされる毒性及び影響を最小限に抑えるために、TBとMMとの間のテザリングに起因して増強されたマスキング効率を有し得、所望の活性（例えば、治療効果、標的検出など）を提供するためにプロテアーゼによって十分に活性化され得る。

【0110】

本明細書の活性化可能なTBに使用するための適切なCMには、当技術分野で知られているプロテアーゼ基質のいずれかが含まれる。いくつかの例では、CMは、セリンプロテアーゼ（例えば、u型プラスミノゲン活性化因子（uPA、ウロキナーゼとも呼ばれる）、マトリブターゼ（本明細書ではMT-SP1またはMTSP1とも呼ばれる）の基質を含み得る。いくつかの例では、CMは、マトリックスメタロプロテアーゼ（MMP）の基質を含み得る。いくつかの例では、CMは、システインプロテアーゼ（CP）の基質（例えば、レグマイン）を含み得る。

【0111】

いくつかの実施形態では、CMは、ディスインテグリン及びメタロプロテアーゼ（ADAM）またはトロンボスポンジンモチーフ（ADAMTS）（例えば、ADAM8、ADAM9、ADAM10、ADAM12、ADAM15、ADAM17／TACE、ADEMDEC1、ADAMTS1、ADAMTS4、ADAMTS5）を有するディスインテグリン及びメタロプロテアーゼ、アスパラギン酸プロテアーゼ（例えば、BACE、レニン）、アスパラギン酸カテプシン（例えば、カテプシンD、カテプシンE）、カスパーゼ（例えば、カスパーゼ1、カスパーゼ2、カスパーゼ3、カスパーゼ4、カスパーゼ5、カスパーゼ6、カスパーゼ7、カスパーゼ8、カスパーゼ9、カスパーゼ10、カスパーゼ14）、システインカテプシン（例えば、カテプシンA、カテプシンB、カテプシンC、カテプシンG、カテプシンK、カテプシンL、カテプシンS、カテプシンV／L2、カ

テブシンX／Z／P)、システインプロテアーゼ(例えば、クルジパイン、レグマイン、オツバイン(Otubain)－2)、キマーゼ、DESC1、DPP－4、FAP、エラスターゼ、FVIIa、FIXa、FXa、FXIa、FXIIa、グランザイムB、グアニジノベンゾアターゼ、ヘブシン、HtrA1、ヒト好中球エラスターゼ、KLK(例えば、KLK4、KLK5、KLK6、KLK7、KLK8、KLK10、KLK11、KLK13、KLK14)、メタロプロテアーゼ(例えば、メプリン、ネプリライシン、PSMA、BMP－1)、ラクトフェリン、マラプシン(Marapsin)、マトリプターゼ－2、MT－SP1／マトリプターゼ、NS3／4A、PACE4、プラスミン、PSA、MMP(例えば、MMP1、MMP2、MMP3、MMP7、MMP8、MMP9、MMP10、MMP11、MMP12、MMP13、MMP14、MMP15、MMP16、MMP17、MMP19、MMP20、MMP23、MMP24、MMP26、MMP27)、TMPRSS2、TMPRSS3、TMPRSS4、tPA、トロンビン、トリプターゼ、及びuPAの基質を含み得る。

10

【0112】

いくつかの実施形態では、CM内のプロテアーゼ基質は、同じプロテアーゼによって自然に切断される任意のポリペプチド配列と実質的に一致していない(例えば、90%、80%、70%、60%、または50%以下で一致している)ポリペプチド配列を含むことができる。

【0113】

いくつかの実施形態では、CMは、LSGRSDNH(配列番号214)の配列またはPLGLAG(配列番号17)の配列であるか、またはそれを含み得る。いくつかの実施形態では、CMは、その全体が参照により本明細書に組み込まれるWO2015048329に開示されている配列番号317～327、329～335、340～347、352～363、371～378、394～401、410～419、425～433、436～449、453～456、458～469、473、475～482、485～495、及びその全体が参照により本明細書に組み込まれるWO2015116933に開示されている配列番号1～162、268～306のいずれか1つのコンセンサス配列に包含される配列であるか、またはそのような配列を含んでもよい。

20

【0114】

いくつかの実施形態では、CMは、WO2015048329に開示されている配列番号14～52、126～154、159、315～316、328、336～339、348～351、364～370、379～393、402～409、420～424、434～435、450～452、457、470～472、474、483、484、WO2015116933に開示されている配列番号163～267、307～384、402～445、665～683、その全体が参照により本明細書に組み込まれるWO2016118629に開示されている配列番号20～21、411、480～482、351～369、18、71、370～380、412～415、468、547～554、319～346、及びその全体が参照により本明細書に組み込まれるWO2020118109に開示されている配列番号1～16、50～56、60～63、20、70～76、78～115、120～128、130～132、135～140、141、152、21～23、17～19、25～43のいずれか1つの配列であるか、またはそれを含むことができる。いくつかの例では、システインプロテアーゼのCMは、AAN、SAN、またはGPTNの配列(配列番号301)であるか、またはそれを含み得る。CMの例としては、WO2010／081173、WO2021207669、WO2021207657、WO2021142029、WO2021061867、WO2020252349、WO2020252358、WO2020236679、WO2020176672、WO2020118109、WO2020092881、WO2020086665、WO2019213444、WO2019183218、WO2019173771、WO2019165143、WO2019075405、WO2019046652、WO2019018828、WO2019014586、WO2018222949、WO

30

40

50

2018165619、WO2018085555、WO2017011580、WO2016179335、WO2016179285、WO2016179257、WO2016149201、WO2016014974に記載されているものも挙げられ、これらは参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0115】

いくつかの実施形態では、CMは、以下の表のいずれか1つの配列であるか、またはその配列を含むか、または以下の表のいずれかの配列のコンセンサス配列に包含され得る。

【表1-1】

配列	配列 番号	配列	配列 番号
AANALAHGLF	32	HMMQYARH	33
AANL	34	HTGRSGAL	35
AANLGSGGSS	36	HVPRQ	37
AAPRS	38	HVPRQV	39
AAPRSF	40	HVPRQVAPRSF	41
AARGPAIH	42	HVPRQVLSGRS	43
AAYHLVSQ	44	HVPRQVLSGRSAN	45
AFPMRSVRS	46	HWHLGPPT	47
AFQALRM	48	IANLLSMV	49
AFRHLR	50	IDGR	51
AGLGISST	52	IEGR	53
AGLGVVER	54	ILNLLSMV	55
AGPR	56	ILPRSPAF	57
AHGL	58	IPFSWSRF	59
AHGLF	60	IQNLLSMV	61
AHQALRM	62	ISSGL	63
AIPRVRLFDV	64	ISSGLL	65
ALAHG	66	ISSGLLS	67
ALAHGL	68	ISSGLLSGRSANI	69
ALAHGLF	70	ISSGLLSGRSANP	71
ALAHGLFAPRSF	72	ISSGLLSGRSANPRG	73
ALAHGLFSGRSAN	74	ISSGLLSGRSDDH	75
ALAHGLPTFVHL	76	ISSGLLSGRSDIH	77
ALGLLRLP	78	ISSGLLSGRSDNH	79
ALPSVKMVE	80	ISSGLLSGRSDNI	16

10

20

30

40

50

【表 1 - 2】

ALRAP	81	ISSGLLSGRSDNP	82
ANQALRM	83	ISSGLLSGRSDQH	84
ANQALRMA	85	ISSGLLSGRSDTH	86
APPLVKSMVV	87	ISSGLLSGRSDYH	88
APPSFKLVNA	89	ISSGLLSGRSGNH	90
APRS	91	ISSGLLSGRSNI	92
APRSALAHGLF	93	ISSGLLSGRSNIG	94
APRSF	95	ISSGLLSGRSNIGS	96
AQFVLTEG	97	ISSGLLSS	98
AQNLLGMV	99	ISSGLLSGGSGGSLSGRSDNH	100
ARGP	101	ISSGLLSGGSGGSLSGRSGNH	102
ARGPS	103	ISSGLSS	104
ARGPSF	105	IVSRSA	106
ARGPSFK	107	KGLTGRSDRHQA	108
ASGLLRFP	109	KGPKVKVVTL	110
ASPTMKTVGL	111	KNLYGRSENNGN	112
AVGLLAPP	113	KRMPVQFL	114
AVGLLAPPGGLSGRSANI	115	LAAPLGLL	116
AVGLLAPPGGLSGRSANP	117	LAHG	118
AVGLLAPPGGLSGRSDDH	119	LAHGL	120
AVGLLAPPGGLSGRSDIH	121	LAHGLF	122
AVGLLAPPGGLSGRSDNH	123	LAPLGLQRR	124
AVGLLAPPGGLSGRSDNI	125	LARAG	126
AVGLLAPPGGLSGRSDNP	127	LARAGI	128
AVGLLAPPGGLSGRSDQH	129	LARAGL	130
AVGLLAPPGGLSGRSDTH	131	LKAAPRWA	132
AVGLLAPPGGLSGRSDYH	133	LKAAPRWF	134
AVGLLAPPGGLSGRSNI	135	LKAAPVWA	136
AVGLLAPPGGLSGRSNIG	137	LKAAPVWF	138

10

20

30

40

50

【表 1 - 3】

AVGLLAPPGGLSGRSNIGS	139	LKGRSYYY	140
AVGLLAPPGGTSTSGRSANPRG	141	LLAPSHRA	142
AVGLLAPPSGRSANPRG	143	LLEALRAL	144
AVGLLAPPTSGRSANPRG	145	LLESLRAL	146
AVPKVRVPE	147	LLLPAHGG	148
CGPPLGR	149	LLPLLGS	150
CSPPLGR	151	LLNALRAL	152
DEVDSGGSS	153	LLNSLRAL	154
DEXXXC (A/S)		LLQALRAL	156
DISHWRRS	157	LLQSLRAL	158
DLAHPLL	159	LLSALRAL	160
DLPLVKSLPS	161	LLSSLRAL	162
DLXXT (A/S)		LNGRSDNH	164
DRLSGRSANHKK	165	LPAGLLL	166
DRLSGRSDNHKK	167	LPAGLLLR	168
DRPEMKSLSG	169	LPAHLVLL	170
DRPKVKTMDF	171	LPAHLVLV	172
DVAQFVLT	173	LPGGLSPW	174
DVPPMKTLRP	175	LPSHLVLL	176
DWLYWMGI	177	LPSHLVLV	178
DWLYWMSI	179	LPTFV	180
DWLYWPGI	181	LPTFVH	182
DWLYWPSI	183	LPTFVHL	184
EAPKVKALPK	185	LRSGW	186
EHPRVKVSE	187	LSGR	188
EKPRMKLFQG	189	LSGRS	190
EPQALAMS	191	LSGRSA	192
EQPEVKMVKG	193	LSGRSALAHGLF	194
ERPGVKSLVL	195	LSGRSAN	196

10

20

30

40

50

【表 1 - 4】

ESLPVVAV	197	LSGRSANI	198
ESPVMKSMAL	199	LSGRSANP	200
ESRRW	201	LSGRSD	202
ESRRWM	203	LSGRSDD	204
ESRRWMP	205	LSGRSDDH	206
ETPSVKTMR	207	LSGRSDI	208
ETPSVKTMRSS	209	LSGRSDIH	210
FPRPLGITGL	211	LSGRSDN	212
FRLLDWQW	213	LSGRSDNH	214
GCGPPLGR	215		
GCSPPLGR	217	LSGRSDNHGGAVGLLAPP	218
GFPHMKTFQH	219	LSGRSDNHGGSGGSISSGLLSS	220
GFPHMKTFQHSS	221	LSGRSDNHGGSGGSQNQALRMA	222
GGGPPLGR	223	LSGRSDNHGGVHMPFLGFLGP	224
GGPPLGR	225	LSGRSDNI	226
GGQPSGMWGW	227	LSGRSDNP	228
GGSIDGR	229	LSGRSDQ	230
GGSPPLGR	231	LSGRSDQH	232
GGWHTGRN	233	LSGRSDT	234
GIAGQ	235	LSGRSDTH	236
GLGTPRGLFA	237	LSGRSDY	238
GLPTFV	239	LSGRSDYH	240
GLPTFVH	241	LSGRSENH	242
GLPTFVHL	243	LSGRSG	244
GLPTFVHLPRQV	245	LSGRSGN	246
GLSGRSDNHGSS	247	LSGRSGNH	248
GPEGLRVG	249	LSGRSGNHGGSGGSISSGLLSS	250
GPLGIAGI	251	LSGRSGNHGGSGGSQNQALRMA	252
GPLNGRSDNHKA	253	LSGRSGNP	254

10

20

30

40

50

【表 1 - 5】

GPLNGRSDNHKK	255	LSGRSVTQ	256
GPLNGRSDNHKR	257	LSQARWRK	258
GPLNGRSDNHQA	259	LTFPTYIF	260
GPLNGRSDNHQK	261	LTFPTYWF	262
GPLNGRSDNHQR	263	LTGRSDRH	264
GPLNGRSDNHRA	265	LTGRSGA	266
GPLNGRSDNHRK	267	LTGRSGA	268
GPLNGRSDNHRR	269	LYAAPRWA	270
GPLSGRSDNHKA	271	LYAAPRWF	272
GPLSGRSDNHKK	273	LYAAPVWA	274
GPLSGRSDNHKR	275	LYAAPVWF	276
GPLSGRSDNHQA	277	LYGRSENN	278
GPLSGRSDNHQK	279	MDAFLESS	280
GPLSGRSDNHQR	281	MGLFSEAG	282
GPLSGRSDNHRA	283	MGPWFM	284
GPLSGRSDNHRK	285	MIAPVAYR	286
GPLSGRSDNHRR	287	MLRSGW	288
GPPLGR	289	MLRSGWR	290
GPQGIAGQ	291	MLRSGWRG	292
GPQGLLGA	293	MLRSGWRL	294
GPRSFG	295	MLRSGWRS	296
GPRSFGL	297	MTFPTYIF	298
GPSHLVLT	299	MTFPTYWF	300
GPTN	301	NHRIGRSDNHRR	302
GPTNALAHGLF	303	NMPSFKLVTG	304
GRSML	305	NTLSGRSENHSG	306
GRSMLL	307	NTLSGRSGNHGS	308
GRSMLLG	309	NZPRVRLVLP	310
GRSMLLGG	311	PAGLWLDP	312

10

20

30

40

50

【表 1 - 6】

GRSMLLGP	313	PAGRR	314
GRSMLLGS	315	PAGRRS	316
GRSMLLP	317	PAGRRL	318
GRSMLLP	319	PASLWYTQ	320
GRSMLLPP	321	PESRRWMP	322
GRSMLLPS	323	PFHLSR	324
GRSMLLS	325	PHGFFQ	326
GRSMLLSG	327	PLARAGI	328
GRSMLLSP	329	PLARAGL	330
GRSMLLSS	331	PLGL	332
GRSMLM	333	PLGLAG	17
GRSMLMG	334	PLGLWA	335
GRSMLMGG	336	PLGVRGK	337
GRSMLMGP	338	PLTGRSGG	339
GRSMLMGS	340	PLTGRSGGGSS	341
GRSMLMP	342	PPLGR	343
GRSMLMPG	344	PPPDMKLFPG	345
GRSMLMPP	346	PPPEVRSFSV	347
GRSMLMPS	348	PPPVKLLEW	349
GRSMLMS	350	PPSIARSDNLAN	351
GRSMLMSG	352	PQHRIVSF	353
GRSMLMSP	354	PRFKIIGG	355
GRSMLMSS	356	PRFRIIGG	357
GSGPPLGR	358	PRPFVKVDQ	359
GSPPLGR	360	PRQV	361
GSSPPLGR	362	PRSF	363
GTGRGPSWVGSS	364	PSPPVKMMPE	365
PTNL	366	PTNGGSGGSS	367
PTNLGSGGSS	368	RVPKVKVMLD	369

10

20

30

40

50

【表 1 - 7】

PVGYTSSL	370	SAGFSLPA	371
PVPRLKLIKD	372	SAPAVESE	373
PVQPIGPQ	374	SAPYFRMMDM	375
QALAMSAT	376	SARGPSRW	377
QFQALRM	378	SCGPPLGR	379
QGPMFKSLWD	380	SCSPPLGR	381
QGRAITFI	382	SGGPLGVR	383
QHQALRM	384	SGGPPLGR	385
QNQALRIA	386	SGPPLGR	387
QNQALRM	388	SGRS	389
QNQALRMA	390	SGRSA	391
QNQALRMAGGSGGSLSGRSDNH	392	SGRSAN	393
QNQALRMAGGSGGSLSGRSGNH	394	SGRSANI	395
QSRRVP	396	SGRSANP	397
QSRRVPL	398	SGRSANPRG	399
QSRRVPV	400	SGRSD	401
QTRRV	402	SGRSDD	403
QTRRVPL	404	SGRSDDH	405
QTRRVPV	406	SGRSDI	407
QYIVSRSA	408	SGRSDIH	409
RALRAP	410	SGRSDN	411
REPFMKSLPW	412	SGRSDNI	413
RFPLKV	414	SGRSDNP	415
RFPSLKSFPL	416	SGRSDQ	417
RFPGVW	418	SGRSDQH	419
RFYRNQFF	420	SGRSDT	421
RGPA	422	SGRSDTH	423
RGPAFNPM	424	SGRSDY	425
RGPATPIM	426	SGRSDYH	427

10

20

30

40

50

【表 1 - 8】

RGPKLYW	428	SGRSG	429
RHLAKL	430	SGRSGN	431
RIGRSDNH	432	SGRSGNH	433
RKMPNITV	434	SGSPPLGR	435
RKSSIIIRMRDVVL	436	SIARSDNL	437
RKTVQHW	438	SISSGLLSGRSDNI	439
RLGRSDNN	440	SNPFKY	441
RMHLRSLG	442	SPLPLRVP	443
RPLARAGI	444	SPLPLRVP	445
RPLARAGL	446	SPLTGRSG	447
RPLNGRSDNHKA	448	SPPLGR	449
RPLNGRSDNHKK	450	SRRVP	451
RPLNGRSDNHKR	452	SRRVPL	453
RPLNGRSDNHQA	454	SRRVPV	455
RPLNGRSDNHQK	456	SSGPPLGR	457
RPLNGRSDNHQR	458	SSPPLGR	459
RPLNGRSDNHRA	460	SSRGPAYL	461
RPLNGRSDNHRK	462	SSRHRRALD	463
RPLNGRSDNHRR	464	SSSFDKGKYKKGDDA	465
RPLSGRSDNHKA	466	SSSFDKGKYKRGDDA	467
RPLSGRSDNHKK	468	SSSPPLGR	469
RPLSGRSDNHKR	470	STFPFGMF	471
RPLSGRSDNHQA	472	STVFHM	473
RPLSGRSDNHQK	474	SVHHLI	475
RPLSGRSDNHQR	476	SVSGLLSH	477
RPLSGRSDNHRA	478	SVSGLLSS	479
RPLSGRSDNHRK	480	SVSGLRSH	481
RPLSGRSDNHRR	482	SVSGLRSS	483
RPSPMWAY	484	TARG	485

10

20

30

40

50

【表 1 - 9】

RRHDGLRA	486	TARGP	487
RRHDGLRS	488	TARGPALAHGLF	489
RSLVFAP	490	TARGPS	491
RSPSRLKC	492	TARGPSF	493
VAGRSMRP	494	TARGPSFK	495
VAPQLKSLVP	496	TARGPSW	497
VAQFVLTE	498	TARGPSW	499
VHMP LGFLGP	500	TARGPVPRQV	501
VHMP LGFLGPGGLSGRSDNH	502	TFVH	503
VHMP LGFLGPGGTSTSGRSANPRG	504	TGLSGRSVTQTS	505
VLPELRSVFS	506	TGRGPSWV	507
VLSKQMSF	508	TLRLGRSDNNKN	509
VPAGRRS	510	TLGLRSP	511
VPAGRRSL	512	TSGRSANP	513
VPRQ	514	TSGRSGNP	515
VPRQV	516	TSLSGRSANPRG	517
VSRSA	518	TSLSGRSGNPRG	519
VVPEGRRS	520	TSSGLRSP	521
WATPRPMR	522	TSTSGRSANPRG	523
WDHPISLL	524	TSTSGRSANPRGGGAVGLLAPP	525
QAR (A/V)		TSTSGRSANPRGGGVHMP LGFLGP	527
YDPZVKVLA	528	TSTSGRSGNPRG	529
YGAGLGVV	530	TVSGLRSP	531
YIVSRSA	532		
YKKFVGSL	533		
YVPRVKALEM	534		

10

20

30

【0 1 1 6】

いくつかの実施形態では、CMは、上述の例示的な配列の組み合わせ、C末端切断バリエーション、もしくはN末端切断バリエーションであるか、またはそれを含み得る。CMにおける使用に好適な上述したアミノ酸配列の切断バリエーションは、対応するプロテアーゼの認識部位を保持する任意のものであってよい。これらには、プロテアーゼの認識部位を保持する、上述したアミノ酸配列の少なくとも3個の連続したアミノ酸、または前述のアミノ酸配列の少なくとも4個、5個、6個、7個、8個、9個、もしくは10個のアミノ酸を含むC末端及び／またはN末端切断バリエーションが含まれる。ある特定の実施形態では、上述したアミノ酸配列の切断バリエーションは、上記のいずれかに対応するが、1～10個のアミノ酸、1～9個のアミノ酸、1～8個のアミノ酸、1～7個のアミノ酸、1～6個のアミノ酸、1～5個のアミノ酸、1～4個のアミノ酸、または1～3個のアミノ酸がC末端及び／またはN末端にて切断されたアミノ酸配列であり得、(1) 少なくとも3個のアミノ酸残基を有し；(2) プロテアーゼの認識部位を保持するものである。前述の実施形態のいくつかでは、切断されたCMは、N末端にて切断されたCMである。いくつかの実施形態では、切断されたCMは、C末端にて切断されたCMである。いくつかの実施形態では、切断されたCは、C末端及びN末端にて切断されたCMである。

40

【0 1 1 7】

いくつかの実施形態では、CMは、合計3個のアミノ酸～25個のアミノ酸を含み得る。いくつかの実施形態では、CMは、合計3～25、3～20、3～15、3～10、3～5、5～25、5～20、5～15、5～10、10～25、10～20、10～15

50

、15～25、15～20、または20～25個のアミノ酸を含み得る。

【0118】

いくつかの実施形態では、CMは、少なくともプロテアーゼによって、約 $0.001 \sim 1500 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ または少なくとも0.001、0.005、0.01、0.05、0.1、0.5、1、2.5、5、7.5、10、15、20、25、50、75、100、125、150、200、250、500、750、1000、1250、もしくは $1500 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ の速度で特異的に切断される。この速度は、WO 2016118629に開示されているように、基質切断速度 (k_{cat}/K_m) として測定することができる。

【0119】

リンカー (L)

活性化可能なTB (例えば、活性化可能な抗体または他の治療用タンパク質) は、1つ以上のリンカー (L) を含み得る。リンカーは、活性化可能なTB内の2つの成分を連結するアミノ酸配列の伸長を含み得る。リンカーは、いかなるプロテアーゼによっても切断され得ない。いくつかの実施形態では、1個以上のリンカー (例えば、柔軟なリンカー) を活性化可能なTBに導入して、ドメイン間の、部分間の、部分とドメインとの間の接合点の1個以上において、またはリンカーが有益であろう任意のその他の接合点において、柔軟性を提供することができる。いくつかの実施形態では、活性化可能なTBが立体構造的に拘束されるコンストラクトとして提供される場合、柔軟なリンカーを挿入して、切断されていない活性化可能なTBにおける構造の構成及び維持を促進することができる。本明細書に記載されるリンカーはいずれも、所望の柔軟性を提供して、標的の結合の阻害を促進する、またはプロテアーゼによるCMの切断を促進することができる。いくつかの実施形態では、活性化可能なTBに含まれるリンカーは、全部または一部が柔軟であり、その結果、リンカーは、柔軟なリンカーに加えて、望ましい活性化可能なTBを提供するために柔軟性の低い構造を与える1つ以上の部分を含むことができる。一部のリンカーはシステイン残基を含有してもよく、このシステイン残基は、非アルファ炭素共有結合を形成し、コンストラクトの柔軟性を低減させてよい。

【0120】

ほとんどの場合、リンカーの長さは、アミノ酸の数を、N末端からC末端の方向に、前の構成成分のC末端アミノ酸に隣接するリンカーのN末端から、次の構成成分のN末端アミノ酸と隣接するリンカーのC末端まで (すなわち、リンカーの長さが、前の構成成分のC末端アミノ酸、または次の構成成分のN末端アミノ酸のいずれも含有しない場所) を数えることによって決定され得る。

【0121】

いくつかの実施形態では、リンカーは、合計1～50、1～40、1～30、1～25個 (例えば、1～24、1～22、1～20、1～18、1～16、1～15、1～14、1～12、1～10、1～8、1～6、1～5、1～4、1～3、1～2、2～25、2～24、2～22、2～20、2～18、2～16、2～15、2～14、2～12、2～10、2～8、2～6、2～5、2～4、2～3、4～25、4～24、4～22、4～20、4～18、4～16、4～15、4～14、4～12、4～10、4～8、4～6、4～5、5～25、5～24、5～22、5～20、5～18、5～16、5～15、5～14、5～12、5～10、5～8、5～6、6～25、6～24、6～22、6～20、6～18、6～16、6～15、6～14、6～12、6～10、6～8、8～25、8～24、8～22、8～20、8～18、8～16、8～15、8～14、8～12、8～10、10～25、10～24、10～22、10～20、10～18、10～16、10～15、10～14、10～12、12～25、12～24、12～22、12～20、12～18、12～16、12～15、12～14、14～25、14～24、14～22、14～20、14～18、14～16、14～15、15～25、15～24、15～22、15～20、15～18、15～16、16～25、16～24、16～22、16～20、16～18、18～25、18～24、18～22、18～

20、20～25、20～24、20～22、22～25、22～24、または24～25個のアミノ酸)を含み得る。いくつかの実施形態では、リンカーは、合計1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、または25個のアミノ酸を含み得る。

【0122】

いくつかの実施形態では、リンカーは、グリシン (Gly または G) 残基が豊富であり得る。いくつかの実施形態では、リンカーは、セリン (Ser または S) 残基が豊富であり得る。いくつかの実施形態では、リンカーは、グリシン及びセリン残基が豊富であり得る。いくつかの実施形態では、リンカーは、1個以上のグリシン-セリン残基対 (GS) (例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9または10個以上のGS対)を有し得る。

10

【0123】

いくつかの実施形態では、リンカーは、1個以上のGly-Gly-Gly-Ser (GGGS) (配列番号18) 配列 (例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9または10個以上のGGGS配列)を有し得る。いくつかの実施形態では、リンカーは、1個以上のGly-Gly-Gly-Gly-Ser (GGGGS) (配列番号535) 配列 (例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9または10個以上のGGGGS配列)を有し得る。いくつかの実施形態では、リンカーは、1個以上のGly-Gly-Ser-Gly (GGS G) (配列番号537) 配列 (例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9または10個以上のGGS G (配列番号537) 配列)を有し得る。リンカーの例としては、グリシンポリマー (G)_n、グリシン-セリンポリマー (例えば、(GS)_n、(GGS)_n、(GSGGS)_n (配列番号536)、及び(GGGGS)_n (配列番号18) などを含む。ここで、nは少なくとも1の整数である)、グリシン-アラニンポリマー、アラニン-セリンポリマー、及び当技術分野で知られているその他の柔軟なリンカーが挙げられ得る。グリシン及びグリシン-セリンポリマーは比較的構造化されていないため、成分間の中立的なリンクとして機能することができる。グリシンはアラニンよりもはるかに広いファイーブサイ空間にアクセスでき、より長い側鎖を持つ残基よりもはるかに制限が少ない (Sch er a g a, Rev. Computational Chem. 11 173-142 (1992)を参照)。例示的な柔軟なリンカーには、GGS G (配列番号537)、GGS GG (配列番号538)、GSGSG (配列番号539)、GSG G (配列番号540)、GGGSG (配列番号541)、GSSSG (配列番号542)、GSSSGSGSGSG (配列番号543)、GGGS (配列番号18)、GGGSGGS (配列番号544)、GGGSGGGSGSGGS (配列番号545)、GGGGS (配列番号546)、GGGGS (配列番号547)、GGGGS (配列番号548)、GGGGS (配列番号535)、GS、GGGGS (配列番号549)、GGGGS (配列番号550)、GGS LDPKGSGGS (配列番号551)、PKSCDKTHTCPPCPAPELLG (配列番号552)、SKYGP C P P C P A P E F L G (配列番号553)、GKSSGSGSESKS (配列番号554)、GSTSGSGKSSSEGKG (配列番号555)、GSTSGSGKSSSEGSGSTKG (配列番号556)、GSTSGSGKPGSGSGEGSTKG (配列番号557)、GSTSGSGKPGSSSEGST (配列番号558)、GSTSGSGKPGSSSEGST (配列番号559)、GGGSSSGGS (配列番号15)、GGGGS (配列番号560)、及びGGGSSSGSGSGSGSGGS (配列番号561)のうちの1つまたは1つ以上の組み合わせが含まれる。リンカーの例には、本明細書に記載のリンカーの例と少なくとも70% (例えば、少なくとも72%、少なくとも74%、少なくとも75%、少なくとも76%、少なくとも78%、少なくとも80%、少なくとも82%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも88%、少なくとも90%、少なくとも92%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%、または100%同一である配

20

30

40

50

列がさらに含まれてもよい。当業者であれば、活性化可能なTBの設計が、所望の活性化可能なTB構造を提供するために、リンカーが、柔軟性リンカーだけでなく、より柔軟性の低い構造を付与する1つ以上の部分を含むことができるように、全てまたは部分的に柔軟性であるリンカーを含むことができることを認識するであろう。

【0124】

いくつかの実施形態では、活性化可能なTBは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10個のリンカー配列（複数可）（例えば、本明細書に記載される、または当技術分野において既知の、例示的なリンカー配列のいずれかと同一または異なるリンカー配列）を含有できる。いくつかの実施形態では、リンカーは、スルホ-SIAB（スルホスクシンイミジル（4-ヨードアセチル）アミノベンゾエート）、SMPB（スクシンイミジル4-（N-マレイミドフェニル）ブチレート）、及びスルホ-SMPB（スルホスクシンイミジル4-（N-マレイミドフェニル）ブチレート）を含み得、リンカーは第一級アミンのスルフヒドリルと反応する。

10

【0125】

コンジュゲーション剤

いくつかの態様では、活性化可能なTB（例えば、活性化可能なAB）は、さらに、1つ以上の追加の薬剤、例えば、対象の細胞または組織への送達を容易にする標的化部分、治療剤（例えば、化学療法剤または抗新生物剤などの抗腫瘍剤）、毒素、またはその断片を含むことができる。追加の薬剤は、活性化可能なTBにコンジュゲートされ得る。「薬剤」という用語は、本明細書において、化学化合物、化学化合物の混合物、生物学的巨大分子、または生物学的材料から抽出された抽出物を示すために使用される。

20

【0126】

いくつかの実施形態では、活性化可能なTBは、細胞毒性剤、例えば毒素（例えば、細菌、真菌、植物、もしくは動物起源の酵素活性毒素、またはその断片）または放射性同位体にコンジュゲートされ得る。

【0127】

活性化可能なTBにコンジュゲート可能な細胞毒性剤の例としては、ドラスタチン及びその誘導体（例えば、アウリスタチンE、AFP、モノメチルアウリスタチンD（MMA D）、モノメチルアウリスタチンF（MMA F）、モノメチルアウリスタチンE（MMA E）、デスメチルアウリスタチンE（DMA E）、アウリスタチンF、デスメチルアウリスタチンF（DMA F）、ドラスタチン16（DmJ）、ドラスタチン16（Dpv）、アウリスタチン誘導体（例えば、アウリスタチンチラミン、アウリスタチンキノロン）、マイタンシノイド（例えば、DM-1、DM-4）、マイタンシノイド誘導体、デュオカルマイシン、アルファ-アマニチン、ターボスタチン（turbostat in）、フェンスタチン（phenstat in）、ヒドロキシフェンスタチン（hydroxyphenstat in）、スポンジスタチン5、スポンジスタチン7、ハリストアチン（halistat in）1、ハリストアチン2、ハリストアチン3、ハロコムスタチン（halocomsstat in）、ピロロベンズイミダゾール（PBI）、シブロスタチン（cibrostat in）6、ドキサリフォーム（doxaliform）、セマドチン類似体（CemCH2-SH）、シュードモナス毒素A（PES8）バリエーション、シュードモナス毒素A（ZZ-PE38）バリエーション、ZJ-101、アントラサイクリン、ドキソルビシン、ダウノルビシン、プリオスタチン、カンプトテシン、7-置換カンポテシン、10,11-ジフルオロメチレンジオキシカンプトテシン、コンプレタスタチン、デブプロモアブリシアトキシシン、カハマイド（Kahamide）-F、ディスコデルモリド、及びエクチナサイジン（Ecteinascidin）が挙げられる。

30

40

【0128】

活性化可能なTBにコンジュゲート可能な酵素活性毒素の例としては、ジフテリア毒素、Pseudomonas aeruginosa由来の外毒素A鎖、リシンA鎖、アブリンA鎖、モデシンA鎖、アルファ-サルシナ（sarcin）、アリウリエスフォルディタンパク質（Aleurisfordii protein）、ダイアンフィン

50

タンパク質 (dianfhin protein)、フィトイアカアメリカナタンパク質 (Phytoiaca Americana protein) (例えば、PAPI、PAPII、及びPAP-8)、モモルディカチャランチア阻害剤 (momordica charantia inhibitor)、クルシン、クロチル (crotirs)、サパオナリアオフィシナリス阻害剤 (sapaonaria officinalis inhibitor)、ゲイオニン (geionin)、ミトゲリイン (mitogelilin)、レストリクトシン、フェノマイシン、ネオマイシン、及びトリコテシンが含まれる。

【0129】

活性化可能なTBにコンジュゲート可能な抗腫瘍薬の例としては、アドリアマイシン、セルビジン、ブレオマイシン、アルケラン、ベルバン (velban)、オンコピン、フルオロウラシル、メトトレキサート、チオテパ、ピサントレン、ノバントロン、チオグアニン、プロカラビジン、及びシタラビンが含まれる。

【0130】

活性化可能なTBとコンジュゲートすることができる抗ウイルス剤の例には、アシクロビル、ピラA、及びシンメトレルが含まれる。活性化可能なTBとコンジュゲートすることができる抗真菌剤の例には、ナイスタチンが含まれる。活性化可能なTBとコンジュゲートすることができる検出試薬の例には、フルオレセイン及びその誘導体、フルオレセインイソチオシアネート (FITC) が含まれる。活性化可能なTBとコンジュゲートすることができる抗菌剤の例には、アミノグリコシド、ストレプトマイシン、ネオマイシン、カナマイシン、アミカシン、ゲンタマイシン、及びトブラマイシンが含まれる。活性化可能なTBとコンジュゲートすることができる3ベータ、16ベータ、17アルファートリヒドロキシコレスト-5-エン-22-オン16-O-(2-O-4-メトキシベンゾイル-ベータ-D-キシロピラノシル)-(1->3)-(2-O-アセチル-アルファ-L-アラビノピラノシド) (OSW-1) の例には、O6-ベンジルグアニンのs-ニトロベンジルオキシカルボニル誘導体、トポイソメラーゼ (topoisomerase) 阻害剤、ヘミアステリン、セファロタキシン、ホモハリンギオニン (homoharringtonine)、ピロールオベンゾジアゼピン二量体 (pyrrollobenzodiazepine dimer) (PBD)、官能化ピロロベンゾジアゼペン、カルシケアミニン (calcicheamicin)、ポドフィイトキシン (podophyllotoxin)、タキサン、及びビンカアルコイド (vincalkoid) が含まれる。活性化可能なTBとコンジュゲートすることができる放射性医薬品の例には、 ^{123}I 、 ^{89}Zr 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 ^{201}Tl 、 ^{62}Cu 、 ^{18}F 、 ^{68}Ga 、 ^{13}N 、 ^{15}O 、 ^{38}K 、 ^{82}Rb 、 ^{111}In 、 ^{133}Xe 、 ^{11}C 、及び $^{99\text{m}}\text{Tc}$ (テクネチウム) が含まれる。活性化可能なTBとコンジュゲートすることができる重金属の例には、バリウム、金、及び白金が含まれる。活性化可能なTBとコンジュゲートすることができる抗マイコプラズマの例には、タイロシン、スペクチノマイシン、ストレプトマイシンB、アンピシリン、スルファニルアミド、ポリミキシン、及びクロラムフェニコールが含まれる。

【0131】

いくつかの実施形態では、活性化可能なTBは、シグナルペプチドを含み得る。シグナルペプチドは、分泌経路に向けて方向付けられる新たに合成されたタンパク質の末端 (例えば、N末端またはC末端) に存在するペプチド (例えば、10~30アミノ酸長) であり得る。いくつかの実施形態では、シグナルペプチドは、スパーサーを介して活性化可能なTBにコンジュゲートされ得る。いくつかの実施形態では、スパーサーは、シグナルペプチドの非存在下で活性化可能なTBにコンジュゲートされ得る。

【0132】

当業者であれば、本明細書に記載の活性化可能なTBのいずれかに、多種多様な可能性がある薬剤をコンジュゲートさせることができることを認識するであろう。薬剤は、コンジュゲート部分によって活性化可能なTBの別の成分にコンジュゲートされてもよい。コ

10

20

30

40

50

ンジュゲートには、活性化可能なTB及びその他の部分がそれぞれの活性を保持する限り、2個の分子を結合する任意の化学反応が含まれ得る。コンジュゲートには、多くの化学的反応機構、例えば共有結合、親和性結合、インターカレーション、配位結合及び錯化が含まれ得る。いくつかの実施形態では、結合は共有結合であり得る。共有結合は、既存の側鎖の直接的な縮合によって、または外部の架橋分子の組み込みによってのいずれかで達成できる。多くの二価または多価の結合剤が、本明細書に記載の活性化可能なTBのいずれかのコンジュゲートに有用であり得る。例えば、コンジュゲートは、有機化合物、例えばチオエステル、カルボジイミド、スクシンイミドエステル、グルタルアルデヒド、ジアゾベンゼン及びヘキサメチレンジアミンを含有できる。いくつかの実施形態では、活性化可能なTBは、1個以上の非天然アミノ酸残基を含んで、またはそれ以外の場合には導入して、コンジュゲートに好適な部位を提供することができる。

10

【0133】

いくつかの実施形態では、薬剤及び／またはコンジュゲートは、非アルファ炭素共有結合（例えば、システイン分子上のジスルフィド結合）によって、抗原結合ドメインに結合され得る。多くのがんは高レベルのグルタチオン、すなわち還元剤を自然に放出するため、がん組織微小環境に存在するグルタチオンは非アルファ炭素共有結合を還元することができ、その後、送達部位で薬剤及び／またはコンジュゲートが放出される。

【0134】

いくつかの実施形態では、コンジュゲートが、標的部位内（例えば、疾患組織（例えば、がん組織））で、補体の存在下で標的に結合すると、リンカーにコンジュゲート及び／または薬剤を付着しているアミドまたはエステル結合は切断され、活性化状態でのコンジュゲート及び／または薬剤の放出がもたらされる。これらのコンジュゲート及び／または薬剤は、対象に投与されると、コンジュゲート及び／または薬剤の標的部位（例えば、疾患組織（例えば、がん組織））での送達及び放出を達成し得る。これらのコンジュゲート及び／または薬剤は、本明細書に記載されるコンジュゲート及び／または薬剤のいずれかのインビボ送達のために有効であり得る。

20

【0135】

いくつかの実施形態では、コンジュゲート部分は、補体系の酵素によって切断可能ではない。例えば、コンジュゲート及び／または薬剤は、補体活性化によって標的細胞が最終的に溶解されるため、補体活性化なしで放出される。そのような実施形態では、コンジュゲート及び／または薬剤は、標的細胞に送達されることになる（例えば、ホルモン、酵素、コルチコステロイド、神経伝達物質または遺伝子）。さらに、コンジュゲート部分は、血清プロテアーゼによって穏やかに切断しやすくなり得、コンジュゲート及び／または薬剤は、標的部位でゆっくりと放出される。

30

【0136】

いずれかのいくつかの実施形態では、コンジュゲート及び／または薬剤は、コンジュゲート及び／または薬剤が標的部位（例えば、疾患組織（例えば、がん組織））に送達されるが、コンジュゲート及び／または薬剤は放出されないように設計され得る。

【0137】

いくつかの実施形態では、コンジュゲート及び／または薬剤は、抗原結合ドメインに直接結合するか、またはアミノ酸（例えば、D-アミノ酸）、ペプチド、チオール含有部分、もしくは本明細書に記載の方法によって抗原結合ドメインへの結合に後で利用できる官能基を含むように改変され得る他の有機化合物を介して結合され得る。

40

【0138】

いくつかの実施形態では、活性化可能なTBは、薬剤の少なくとも1つのコンジュゲーション点を含み得る。いくつかの実施形態では、全ての使用可能なコンジュゲーション点、薬剤へのコンジュゲートに利用できる。いくつかの実施形態では、1つ以上のコンジュゲーション点には、非アルファ炭素共有結合に参与する硫黄原子、鎖間非アルファ炭素共有結合に参与する硫黄原子、鎖間スルフィド結合に参与する鎖内非アルファ炭素共有結合に参与しない硫黄原子、及び／またはシステインもしくは硫黄原子を含む他のアミノ

50

酸残基の硫黄原子が含まれ得る。このような場合、残基は、タンパク質コンストラクト構造中に天然に存在してよく、または部位特異的変異誘発、化学変換、もしくは非天然のアミノ酸の誤組み込みなどの方法を用いて、タンパク質コンストラクトに組み込まれてもよい。

【0139】

本開示はまた、1つ以上のコンジュゲートされた薬剤を用いて活性化可能なTBを調製するための方法及び材料を提供する。いくつかの実施形態では、活性化可能なTBは、1つ以上の鎖間ジスルフィド結合を含むように改変されてもよい。例えば、ジスルフィド結合は、還元剤、例えば限定されることなく、TCEP、DTTまたはβ-メルカプトエタノールなどへの曝露後に、還元されることができる。場合によっては、ジスルフィド結合の還元は部分的でしかない可能性がある。本明細書で使用される場合、部分的還元という用語は、活性化可能なTBが還元剤と接触し、全ての可能なコンジュゲーション部位の一部が還元を受ける（例えば、全てのジスルフィド結合が還元されるわけではない）状況を指す。いくつかの実施形態では、活性化可能なTBは、還元剤との接触後に、コンジュゲートの全ての利用可能な部位が99%未満（例えば、98%未満、97%未満、96%未満、95%未満、90%未満、85%未満、80%未満、75%未満、70%未満、65%未満、60%未満、55%未満、50%未満、45%未満、40%未満、35%未満、30%未満、25%未満、20%未満、15%未満、10%未満または5%未満）還元される場合、部分的に還元され得る。いくつかの実施形態では、1個以上の鎖間ジスルフィド結合における還元を有する活性化可能なTBが、遊離チオールと反応性である薬剤にコンジュゲートされ得る。

10

20

【0140】

本開示は、また、治療薬を活性化可能なTBの特定の位置にコンジュゲートする方法及び材料を提供する。いくつかの実施形態では、活性化可能なTBは、活性化可能なTB上の特定の位置で治療薬を活性化可能なTBにコンジュゲートさせることができるように改変されてもよい。例えば、活性化可能なTBは、活性化可能なTBへのコンジュゲーションを容易にする方法で部分的に還元され得る。このような場合、活性化可能なTBの部分的な還元は、活性化可能なTB内のコンジュゲーション部位が還元されない形で起こり得る。いくつかの実施形態では、活性化可能なTB上のコンジュゲーション部位（複数可）は、タンパク質コンストラクト上の特定の位置における薬剤のコンジュゲートを促進するように選択され得る。還元剤を用いた処置に際し、様々な要因が活性化可能なTBの「還元レベル」に影響し得る。例えば、本明細書に記載される方法及び材料を用いて活性化可能なTBの部分的還元を達成するためには、限定されないが、活性化可能なTBに対する還元剤の比、インキュベートの長さ、インキュベート温度、及び／または還元反応溶液のpHの最適化が必要となり得る。任意の適切な要因の組み合わせ（例えば、活性化可能なTBに対する還元剤の比、還元剤とのインキュベートの長さ及び温度、及び／または還元剤のpH）を用いて、活性化可能なTBの部分的還元を達成できる（例えば、利用可能なコンジュゲーション部位の全体的な還元、または特定のコンジュゲーション部位の還元）。

30

【0141】

活性化可能なTBに対する還元剤の有効な比率は、薬剤へのコンジュゲートを可能にする様式で、活性化可能なTBを少なくとも部分的に還元する（例えば、利用可能なコンジュゲーション部位の全体的な還元、または特定のコンジュゲーション部位の還元）、任意の比率であることができる。いくつかの実施形態では、活性化可能なTBに対する還元剤の比は、約20:1～1:1、10:1～1:1、9:1～1:1、8:1～1:1、7:1～1:1、6:1～1:1、5:1～1:1、4:1～1:1、3:1～1:1、2:1～1:1、20:1～1:1.5、10:1～1:1.5、9:1～1:1.5、8:1～1:1.5、7:1～1:1.5、6:1～1:1.5、5:1～1:1.5、4:1～1:1.5、3:1～1:1.5、2:1～1:1.5、1.5:1～1:1.5、または1:1～1:1.5の範囲であり得る。

40

50

【0142】

還元剤で活性化可能なTBを処置するための有効なインキュベート時間及び温度は、薬剤の活性化可能なTBへのコンジュゲートを可能にする様式で、活性化可能なTBを少なくとも部分的に還元する（例えば、利用可能なコンジュゲーション部位の全体的な還元、または特定のコンジュゲーション部位の還元）、任意の時間及び温度であることができる。いくつかの実施形態では、活性化可能なTBを処置するためのインキュベート時間及び温度は、37℃で約1時間～37℃で約12時間（または、その任意の部分的な範囲）の範囲であり得る。

【0143】

還元剤で活性化可能なTBを処置するための還元反応の有効なpHは、活性化可能なTBの薬剤へのコンジュゲートを可能にする様式で、活性化可能なTBを少なくとも部分的に還元する（例えば、利用可能なコンジュゲーション部位の全体的な還元、または特定のコンジュゲーション部位の還元）、任意のpHであることができる。

10

【0144】

部分的に還元された活性化可能なTBがチオール含有薬剤と接触すると、その薬剤は、活性化可能なTB内の鎖間のチオールにコンジュゲートすることができる。薬剤は、チオール含有試薬（例えば、システインまたはN-アセチルシステイン）を用いて、チオールを含有するように修飾できる。例えば、活性化可能なTBは、約37℃で約1時間、活性化可能なTBに対する還元剤の所望の比率における、還元剤（例えば、TEPC）とのインキュベート後に、部分的に還元され得る。活性化可能なTBに対する還元剤の有効な比率は、チオール含有薬剤のコンジュゲートを可能にする様式で、活性化可能なTB内に位置する少なくとも2個の鎖間ジスルフィド結合を部分的に還元する（例えば、利用可能なコンジュゲーション部位の全体的な還元、または特定のコンジュゲーション部位の還元）、任意の比率であることができる。

20

【0145】

いくつかの実施形態では、活性化可能なTBは、いかなる鎖内ジスルフィド結合の還元も回避する方法で還元剤によって還元され得る。いくつかの実施形態では、活性化可能なTBは、いかなる鎖内ジスルフィド結合の還元も回避し、少なくとも1つの鎖間ジスルフィド結合を還元する方法で、還元剤によって還元され得る。

【0146】

30

いくつかの実施形態では、薬剤（例えば、活性化可能なTBにコンジュゲートされる薬剤）は、例えば、標識または他のマーカーなどの検出可能な部分であり得る。例えば、薬剤は、放射標識アミノ酸、マークされたアビジン（例えば、光学法または熱量測定法によって検出され得る蛍光マーカーまたは酵素活性を含むストレプトアビジン）によって検出され得る1つ以上のビオチニル部分、1つ以上の放射性同位体もしくは放射性核種、1つ以上の蛍光標識、1つ以上の酵素標識、及び／または1つ以上の化学発光剤であり得るか、あるいはこれらを含み得る。いくつかの実施形態では、検出可能な部分は、スペーサー分子によって結合され得る。いくつかの実施形態では、検出可能な標識は、イメージング剤、造影剤、酵素、蛍光標識、発色団、色素、1つ以上の金属イオン、またはリガンド系標識を含み得る。いくつかの実施形態では、イメージング剤は、放射性同位体を含み得る。いくつかの実施形態では、放射性同位体は、インジウムまたはテクネチウムであり得る。いくつかの実施形態では、造影剤は、ヨウ素、ガドリニウム、または酸化鉄を含み得る。いくつかの実施形態では、酵素は、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、またはβ-ガラクトシダーゼを含み得る。いくつかの実施形態では、蛍光標識は、黄色蛍光タンパク質（YFP）、シアン蛍光タンパク質（CFP）、緑色蛍光タンパク質（GFP）、修飾赤色蛍光タンパク質（mRFP）、赤色蛍光タンパク質t二量体2（RFP t二量体2）、HCRED、またはユーロピウム誘導体を含み得る。いくつかの実施形態では、発光標識は、N-メチルアクリジウム誘導体を含み得る。いくつかの実施形態では、標識は、Alexa Fluor（登録商標）680またはAlexa Fluor（登録商標）750などのAlexa Fluor（登録商標）標識を含み得る。いく

40

50

つかの実施形態では、リガンド系標識は、ビオチン、アビジン、ストレプトアビジン、または1つ以上のハプテンを含み得る。

【0147】

いくつかの実施形態では、薬剤は、炭水化物部分、スルフヒドリル基、アミノ基、またはカルボキシレート基を使用して活性化可能なTBにコンジュゲートされ得る。いくつかの実施形態では、薬剤は、本明細書に記載のリンカー及び／またはCMを介して活性化可能なTBにコンジュゲートされ得る。いくつかの実施形態では、薬剤は、活性化可能なTB内のシステインまたはリジンにコンジュゲートされ得る。いくつかの実施形態では、薬剤は、本明細書に開示される残基などの活性化可能なTBの別の残基にコンジュゲートされ得る。

10

【0148】

いくつかの実施形態では、N-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオール)プロピオネート(SPDP)、イミノチオラン(IT)、イミドエステルの二官能性誘導体(例えば、ジメチルアジピミデートHCL)、活性エステル(例えば、ジスクシンイミジルスベレート)、アルデヒド(例えば、グルタルアルデヒド)、ビス-アジド化合物(例えば、ビス(p-アジドベンゾイル)ヘキサンジアミン)、ビス-ジアゾニウム誘導体(例えば、ビズ-(p-ジアゾニウムベンゾイル)エチレンジアミン)、ジイソシアネート(例えば、トルエン2,6-ジイソシアネート)、及びビス-活性フッ素化合物(例えば、1,5-ジフルオロ-2,4-ジニトロベンゼン)を含む薬剤を活性化可能なTBにコンジュゲートさせるように、様々な二官能性タンパク質カップリング剤を使用することができる。例えば、リシン免疫毒素は、Vitetta et al., Science 238:1098 (1987)に記載されているように調製することができる。いくつかの実施形態では、炭素-14-標識1-イソチオシアナトベンジル-3-メチルジエチレントリアミンペンタ酢酸(MX-DTPA)キレート剤を使用して、放射性ヌクレオチドを活性化可能なTBとコンジュゲートすることができる。(例えば、WO94/11026を参照されたい)。

20

【0149】

好適なコンジュゲーション部分には、文献に記載されているものが含まれる。(例えば、MBS(M-マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスクシンイミドエステルの使用について記載しているRamakrishnan, S. et al., Cancer Res. 44:201-208 (1984)を参照されたい)。また、オリゴペプチドを介して活性化可能な抗体と結合したハロゲン化アセチルヒドラジド誘導体の使用について記載している米国特許第5,030,719号も参照されたい。いくつかの実施形態では、好適なコンジュゲーション部分には、(i)EDC(1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミドハイドロクロライド、(ii)SMPT(4-スクシンイミジルオキシカルボニル-アルファ-メチル-アルファ-(2-プリジルジチオ)-トルエン(Pierce Chem. Co., カタログ(21558G)、(iii)SPDP(スクシンイミジル-6[3-(2-ピリジルジチオ)プロピオンアミド]ヘキサノエート(Pierce Chem. Co., カタログ番号21651G)、(iv)スルホ-LC-SPDP(スルホスクシンイミジル6[3-(2-ピリジルジチオ)-プロピオンアミド]ヘキサノエート(Pierce Chem. Co., カタログ番号2165-G)、及び(v)EDCとコンジュゲートしたスルホ-NHS(N-ヒドロキシスルホスクシンイミド:Pierce Chem. Co., カタログ番号24510)が含まれる。追加の例示的なコンジュゲーション部分には、SMCC、スルホ-SMCC(スルホスクシンイミジル4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシレート)、SPDB、及びスルホ-SPDBが含まれる。

30

40

【0150】

上記のコンジュゲーション部分は、異なる属性を有する構成成分を含有し得、したがって、異なる生理化学的特性を有するコンジュゲートがもたらされる。例えば、アルキルカルボキシレートのスルホNHSエステルは、芳香族カルボキシレートのスルホNHSエス

50

テルよりも、より安定している。NHSエステル含有のリンカーは、スルホNHSエステルよりも可溶性が低い。さらに、SMP Tは、立体障害型のジスルフィド結合を含有し、安定性の高いコンジュゲートを形成することができる。ジスルフィド結合は、ジスルフィド結合がインビトロで切断されるため、一般的にその他の結合より安定性が低く、利用可能なコンジュゲートが得られることが少ない。スルホNHSは、特に、カルボジイミドカップリングの安定性を高めることができる。カルボジイミドカップリング（例えば、EDC）をスルホNHSと結合させて用いる場合、カルボジイミドカップリング反応単独よりも、加水分解により抵抗性のあるエステルを形成する。

【0151】

当業者は、多種多様な可能性がある部分を、本開示の活性化可能なTBに連結できることを理解するであろう。（例えば、“Conjugate Vaccines”, Contributions to Microbiology and Immunology, J. M. Cruse and R. E. Lewis, Jr (eds), Carger Press, New York, (1989) 参照。これらの全内容は、参照により本明細書に組み込まれる）。一般に、薬剤（例えば、細胞毒性剤）の、活性化可能なTBへの有効なコンジュゲートは、活性化可能なTBに薬剤をコンジュゲートし、一方で薬剤及び活性化可能なTBが機能性を保持することも可能にする、任意の化学反応によって達成できる。

【0152】

核酸及びペプター

いくつかの態様では、本開示はさらに、活性化可能な標的結合タンパク質（例えば、活性化可能な抗体）、またはその成分もしくは断片をコードする配列を含む核酸を提供する。核酸は、活性化可能なTBにおけるTB、CM、MM、及びリンカーのコード配列を含み得る。活性化可能なTBが複数のペプチドを含む場合、例えば、活性化可能なTBが複数のペプチドを含む場合、核酸は、複数のペプチドのコード配列を含み得る。いくつかの例では、ペプチドのうちの1つのコード配列は、核酸に含まれ、ペプチドの別の1つのコード配列は、別の核酸に含まれる。いくつかの例では、複数のペプチドのうちの2つ以上のコード配列は、同じ核酸に含まれる。

【0153】

別段の指定がない限り、「タンパク質をコードする核酸配列」には、互いに縮重したバージョンであり、したがって同じアミノ酸配列をコードする全てのヌクレオチド配列が含まれる。用語「核酸」は、1本鎖または2本鎖の形態の、デオキシリボ核酸（DNA）、またはリボ核酸（RNA）または、これらの組み合わせを意味する。特に限定されない限り、この用語は、参照のヌクレオチドと類似した結合特性を有する、天然のヌクレオチドの周知の類似体を含む核酸を包含する。特に指定のない限り、特定の核酸配列はまた、明示的に示される配列に加えて相補的配列も暗に包含する。いくつかの実施形態では、核酸はDNAである。いくつかの実施形態では、核酸はRNAである。

【0154】

用語「N末端に置かれる」は、ポリペプチドの一次アミノ酸配列における第1のドメインまたは配列の位置について第2のドメインまたは配列と比較して言及する場合、第1のドメインは、ポリペプチドの一次アミノ酸配列のN末端の近くに位置することを意味する。いくつかの実施形態では、第1のドメインまたは配列と第2のドメインまたは配列との間に、さらなる配列及び／またはドメインがあってもよい。

【0155】

用語「C末端に置かれる」は、ポリペプチドの一次アミノ酸配列における第1のドメインまたは配列の位置について第2のドメインまたは配列と比較して言及する場合、第1のドメインは、ポリペプチドの一次アミノ酸配列のC末端の近くに位置することを意味する。いくつかの実施形態では、第1のドメインまたは配列と第2のドメインまたは配列との間に、さらなる配列及び／またはドメインがあってもよい。

【0156】

当技術分野において既知の、標準的な技術、例えば部位特異的変異誘発及びポリメラーゼ連鎖反応（PCR）媒介変異誘発によって、ヌクレオチド配列への修飾を導入することができる。保存的アミノ酸置換とは、アミノ酸残基が、類似の側鎖を有するアミノ酸残基に置換されている置換である。類似の側鎖を有するアミノ酸残基ファミリーは、当技術分野において定義されている。これらのファミリーとしては、酸性側鎖を有するアミノ酸（例えば、アスパラギン酸及びグルタミン酸）、塩基性側鎖を有するアミノ酸（例えば、リジン、アルギニン及びヒスチジン）、非極性アミノ酸（例えば、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、メチオニン及びトリプトファン）、無電荷極性アミノ酸（例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、システイン、セリン、スレオニン及びチロシン）、親水性アミノ酸（例えば、アルギニン、アスパラギン、アスパラギン酸、グルタミン、グルタミン酸、ヒスチジン、リジン、セリン及びスレオニン）、疎水性アミノ酸（例えば、アラニン、システイン、イソロイシン、ロイシン、メチオニン、フェニルアラニン、プロリン、トリプトファン、チロシン及びバリン）が挙げられる。アミノ酸のその他のファミリーとしては、脂肪族ヒドロキシアミノ酸（例えば、セリン及びスレオニン）、アミドファミリー（例えば、アスパラギン及びグルタミン）、脂肪族ファミリー（例えば、アラニン、バリン、ロイシン及びイソロイシン）、芳香族ファミリー（例えば、フェニルアラニン、トリプトファン及びチロシン）が挙げられる。

10

20

30

40

50

【0157】

本開示は、本明細書に記載の核酸のいずれかを含むベクター及びベクターのセットをさらに提供する。当業者は、本明細書に記載される活性化可能なTBのいずれかを作製するために、好適なベクターまたはベクターのセット（例えば、発現ベクター）を選択すること、及びベクターまたはベクターのセットを使用して、本明細書に記載される活性化可能なTBのいずれかを発現させることができるであろう。例えば、ベクターまたはベクターのセットを選択する場合、ベクター（複数可）が細胞の染色体に組み込まれ、及び／またはその中で複製できることが必要となるような細胞の種類が選択され得る。活性化可能なTBを生成するために使用できるベクターの例についても本明細書に記載されている。本明細書で使用する場合、用語「ベクター」は、細胞内（例えば、本明細書に記載される細胞のいずれか）で、組み換えタンパク質（例えば、第1のまたは第2の単量体）の発現を誘導できるポリヌクレオチドを意味する。「ベクター」は、宿主細胞内に核酸及びそれらの断片を送達することができ、制御配列（例えば、プロモータ、エンハンサ、ポリ（A）シグナル）を含有する。外因性ポリヌクレオチドは、発現させるために、発現ベクターに挿入されてもよい。用語「ベクター」はまた、人工染色体、プラスミド、レトロウイルス及びバキュロウイルスベクターも包含する。

【0158】

本明細書に記載される核酸のいずれかを含有し、細胞（例えば、哺乳動物細胞）を形質転換するのに好適なベクターを作成する方法は、当該技術分野で周知である。例えば、Sambrook et al., Eds., "Molecular Cloning: A Laboratory Manual," 2nd Ed., Cold Spring Harbor Press, 1989及びAusubel et al., Eds., "Current Protocols in Molecular Biology," Current Protocols, 1993を参照されたい。

【0159】

ベクターの例としては、プラスミド、トランスポゾン、コスミド、ならびにウイルスベクター（例えば、任意のアデノウイルスベクター（例えば、pSVまたはpCMVベクター）、アデノ随伴ウイルス（AAV）ベクター、レンチウイルスベクター及びレトロウイルスベクター）、ならびに任意のGateway（登録商標）ベクターが挙げられる。ベクターは、例えば、発現のための十分なシス活性エレメントを含有でき、発現のための他のエレメントは、宿主哺乳動物細胞によって、またはインビトロの発現系において供給され得る。当業者は、本明細書に記載されるいずれかの活性化可能なTBを作製するために好適なベクター及び哺乳動物細胞を選択できるであろう。

【0160】

いくつかの実施形態では、活性化可能なTBは、組み換えDNA技術及び真核生物または原核生物の種における発現を使用して、生合成的に作られてよい。

【0161】

細胞

いくつかの態様では、本開示は、本明細書に記載のベクターまたは核酸のいずれかを含む組み換え宿主細胞を提供する。細胞は、本明細書に記載の活性化可能なTB（例えば、活性化可能な抗体）を産生するために使用され得る。いくつかの実施形態では、細胞は、動物細胞、哺乳動物細胞（例えば、ヒト細胞）、げっ歯類細胞（例えば、マウス細胞、ラット細胞、ハムスター細胞、またはモルモット細胞）、非ヒト霊長類細胞、昆虫細胞、細菌細胞、真菌細胞、または植物細胞であり得る。いくつかの実施形態では、細胞は、真核細胞であり得る。本明細書で使用する場合、用語「真核細胞」は、異なる、膜結合性の核を有する細胞を意味する。このような細胞としては、例えば、哺乳動物（例えば、げっ歯類、非ヒト霊長類もしくはヒト）、昆虫、真菌または植物の細胞が挙げられ得る。いくつかの実施形態では、真核細胞は、酵母細胞、例えば *Saccharomyces cerevisiae* である。いくつかの実施形態では、真核細胞は、より高等な真核生物、例えば哺乳動物、トリ、植物または昆虫の細胞である。哺乳動物細胞の非限定例としては、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞及びヒト胎児腎細胞（例えば、HEK293細胞）が挙げられる。いくつかの実施形態では、細胞は、原核細胞であり得る。

【0162】

核酸及びベクター（例えば、本明細書に記載されるベクターのいずれかまたはベクターのセットのいずれか）を、細胞内に導入する方法は、当該技術分野において既知である。細胞内に核酸を導入するために使用可能な方法の例としては、リポフェクション、形質移入、リン酸カルシウム形質移入、カチオン性ポリマー形質移入、ウイルス性形質導入（例えば、アデノウイルス形質導入、レンチウイルス形質導入）、ナノ粒子形質移入及びエレクトロポレーションが挙げられる。

【0163】

いくつかの実施形態では、導入ステップは、本明細書に記載されるいずれかの活性化可能なTBを構成する単量体をコードする核酸を含有するベクター（例えば、本明細書に記載されるベクターまたはベクターのセットのいずれか）を細胞内に導入することを含む。

【0164】

組成物及びキット

本開示はまた、本明細書に記載されている活性化可能なTBを含む組成物及びキットも提供する。組成物及びキットには、活性化可能なTBの使用に必要な1つ以上の賦形剤、担体、試薬、説明書がさらに含まれていてもよい。

【0165】

いくつかの実施形態では、組成物は、活性化可能なTB、抗体、その誘導体、断片、類似体及び相同体を含む医薬組成物であってもよい。医薬組成物は、活性化可能なTB（例えば、抗体）及び薬学的に許容される担体を含み得る。本明細書に用いる「薬学的に許容される担体」という用語は、薬剤投与に適合する、ありとあらゆる溶媒、分散媒、コーティング、抗細菌剤及び抗真菌薬、等張剤及び吸収遅延剤などを含むことが意図される。適切な担体は、当分野の標準的な参照テキストである Remington's Pharmaceutical Sciences（参照により本明細書に組み込まれる）の最新版に記載されている。このような担体または希釈剤の好適な例としては、水、生理食塩水、リンゲル液、デキストロース溶液、及び5%ヒト血清アルブミンが挙げられる。リポソーム及び不揮発性油などの非水性ビヒクルが用いられてもよい。薬剤的活性物質のためにそのような媒体及び薬剤を使用することは、当技術分野において周知である。従来の任意の媒質または薬剤は、活性化化合物と混合できない場合を除き、組成物中でのその使用が企図される。補足的活性化化合物を組成物に組み込むこともできる。

【0166】

医薬組成物は、意図する投与経路と適合するように調合され得る。投与経路の例としては、非経口（例えば、静脈内、皮内、皮下、経口（例えば、吸入）、経皮（例えば、局所）、経粘膜、及び直腸投与が挙げられる。非経口、皮内、または皮下投与に使用する溶液または懸濁液としては、以下の成分、すなわち、滅菌希釈剤（例えば、注射用水、生理食塩水、不揮発性油、ポリエチレングリコール、グリセリン、プロピレングリコールまたはその他の合成溶媒）、抗菌剤（ベンジルアルコールまたはメチルパラベンなど）、抗酸化剤（アスコルビン酸または亜硫酸水素ナトリウムなど）、キレート剤（エチレンジアミン四酢酸（EDTA）など）、緩衝剤（酢酸塩、クエン酸塩またはリン酸塩など）、及び浸透圧調整剤（塩化ナトリウムまたはデキストロースなど）の1つ以上が含まれ得る。pHは、塩酸または水酸化ナトリウムなどの酸または塩基で調節することができる。非経口調製物は、ガラスまたはプラスチックで作られたアンプル、ディスポーザブルシリンジまたは多用量バイアルに入れることができる。一部では、本明細書に記載される活性化可能なTBのいずれかは、身体からの急速な排除から保護する担体、例えばインプラント及びマイクロカプセル化送達システムなどの徐放性製剤及び制御放出製剤とともに調製される。生分解性、生体適合性のポリマー、例えばエチレン酢酸ビニル、ポリ無水物、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステル、ポリ乳酸、及びポリ乳酸-グリコール酸共重合体を使用することができる。このような医薬組成物及び製剤の調製方法は、当業者にとって明らかである。

10

【0167】

いくつかの実施形態では注射用に適する医薬組成物としては、滅菌した水溶液（水溶性の場合）または分散液、及び滅菌した注射用溶液または注射用分散液を即座に調製するための滅菌粉末が挙げられる。静脈内投与の場合、適切な担体としては、生理食塩水、静菌水、Cremophor EL（商標）（BASF, Parsippany, N. J.）、またはリン酸緩衝生理食塩水（PBS）が挙げられる。組成物は滅菌されていてもよく、液体であり、注射しやすい粘度でなければならない。これは、製造及び保管の条件下で安定であり得、細菌及び真菌などの微生物の混入作用から保護される。その担体は、例えば、水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール及び液体ポリエチレングリコールなど）、ならびにこれらの適切な混合物を含む溶媒または分散媒であることができる。分散粒子組成物の場合、適切な流動性は、例えば、粒子上にレシチンなどのコーティングを使用することによって、また、分散の場合に必要な粒子サイズを維持すること、及び界面活性剤を使用することによって維持することができる。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、さらに、1つ以上の抗菌剤及び／または抗菌抗真菌剤、例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、アスコルビン酸、チメロサルなどを含み得る。いくつかの実施形態では、等張剤、例えば糖類、マンニトール、ソルビトールなどの多価アルコール類、及び例えば塩化ナトリウムなどの塩類が組成物に含まれていてもよい。注射用組成物の吸収の延長は、吸収を遅らせる作用剤、例えば、モノステアリン酸アルミニウム及びゼラチンを組成物に含めることによって実現できる。

20

30

【0168】

いくつかの実施形態では、医薬組成物は、滅菌注射液を含み得る。滅菌注射用溶液は、必要な場合には、上に列挙されている成分の1つまたはそれらを組み合わせたものとともに、活性化合物を所要量で適切な溶媒に組み込んだ後に、濾過滅菌することによって調製できる。一般に、分散液は、活性化合物を、基本的な分散媒及び上で列挙されたものからの必要とされる他の成分を含有する滅菌ビヒクル中に組み込むことによって、調製され得る。滅菌注射剤溶液を調製するための滅菌粉末の場合、調製方法は、事前に滅菌濾過されたその溶液から、活性成分及び任意の追加の所望の成分の粉末を産出する真空乾燥及び凍結乾燥法である。

40

【0169】

いくつかの実施形態では、医薬組成物は、経口組成物を含み得る。経口組成物は、不活性希釈剤または食用担体を含み得る。それらは、ゼラチンカプセルに封入されてもよく、または錠剤に圧縮されてもよい。経口治療投与の目的で、活性化合物は、賦形剤と混合さ

50

れ、錠剤、トローチまたはカプセルの形態で 사용할 수 있는。経口組成物はまた、口腔洗浄剤として 사용할 수 있도록 액체担体を使用して調製할 수 있고、액체担체中の化合物は、経口로 사용될 수 있고, 즉시 토해내어질 수 있고, 또는 삼켜질 수 있다. 약학적으로 적합성 있는 결합제 및/또는 아조반트材를, 그組成物의 일부로 포함할 수 있다. 錠剤、丸剤、カプセル、トローチ剤などは、結合剤（微結晶性セルロース、トラガントガムもしくはゼラチンなど）、賦形剤（デンプンもしくはラクトースなど）、崩壊剤（アルギン酸、Primogelもしくはコーンスターチなど）、滑沢剤（ステアリン酸マグネシウムもしくはSterotesなど）、流動化剤（コロイド状二酸化ケイ素など）、甘味剤（スクロースもしくはサッカリンなど）、または香味剤（ペパーミント、サリチル酸メチルもしくはオレンジフレーバーなど）という成分、または類似の性質の化合物のうちいずれかを 포함할 수 있다.

10

【0170】

いくつかの実施形態では、医薬組成物は、吸入による投与用に製剤化されて도 좋다. 例如、化合物は、二酸化炭素などの가스などの適切な推進제를 포함하는加压容器 또는 디스펜서、あるいは네블라이저에서 에어로졸 스프레이의 형태로 전달されて도 좋다.

【0171】

いくつかの実施形態では、医薬組成物は、全身投与用に製剤化されて도 좋다. 例如、全身投与は、静脈内投与その他、経粘膜または経皮投与によっても行うことができる。経粘膜投与または経皮投与では、透過させるバ리어に適する透過제를 제제에 있어서 사용될 수 있다. 이러한 투과제는 일반적으로, 당 기술 분야에 있어서 알려져 있으며, 例如、経粘膜投与用では、洗浄제、胆汁鹽及びフシジン酸誘導체가挙げられる。経粘膜投与は、点鼻スプレーまたは坐剤の使用を通じて行うことができる。経皮投与では、活性化合物は、概ね当技術分野에 있어서 알려져 있는ような軟膏제 (ointment)、軟膏제 (salve)、ゲル제 또는 크림에調合될 수 있다.

20

【0172】

いくつかの実施形態では、医薬組成物は、坐剤（例如、ココアバター及び他のグリセ리드などの従来の坐剤基劑を使用）または直腸送達用의 停留浣腸의 형태로調製されて도 좋다.

【0173】

一実施形態では、医薬組成物は、インプラント及びマイクロカプセル化送達システム을 포함하는制御放出제제などの、身体からの急速な排除から化合物을保護하는担体とともに調製されて도 좋다. 에틸렌酢산비닐、폴리무수물、폴리글리콜산、콜라겐、폴리오르테스테르、폴리락산、及び폴리락산-글리콜산共重合체などの生分解性で生体適合性인 폴리머를 사용할 수 있다. 이러한 제제를調製하는 방법은、당業者には明らかである。

30

【0174】

投与の容易さと投与量の均一性のために、経口または非経口組成物を投与単位形態で処方할 수 있는 것이有利である可能性がある。本明細書に用いる投与単位形態とは、治療される対象의 単位投薬量として適した物理的に別個의 単位をいう。各単位には、必要とされる医薬担体と共同して、所望의 治療効果を生じさせるように計算された所定量의 活性化合物が含まれる。本開示의 投与単位形態의 仕様は、活性化合物의 固有의 特徴及び達成されるべき特定の治療効果、ならびに個體의 治療のためにかかる活性化合物을調合する技術分野의 固有의 制限によって決定付けられ、またそれに直接依存할 수 있다.

40

【0175】

いくつかの実施形態では、組成物（例如、医薬組成物）は、容器、バイアル、シリンジ、注射ペン、バック、またはディスペンサーに、任意選擇で投与説明書とともに含まれて도 좋다.

【0176】

本明細書においては、本明細書に記載される活性化可能なTBのいずれか、本明細書に記載される活性化可能なTBのいずれかを含有する組成物のうちいずれか、または本明細書に

50

記載される活性化可能なTBのいずれかを含有する医薬組成物のいずれか、を含有するキットもまた提供される。また、本明細書に記載の活性化可能なTBに加えて、1つ以上の第2の治療薬（複数可）を含むキットも提供される。第2の治療薬（複数可）は、活性化可能なTBとは別の用量投与形態で提供されてよい。あるいは、第2の治療薬（複数可）は、活性化可能なTBと一緒に調製されてよい。

【0177】

本明細書に記載されるキットのいずれも、組成物（例えば、医薬組成物）のいずれか、及び／または本明細書に記載される活性化可能なTBのいずれかを使用するための説明書を含むことができる。いくつかの実施形態では、キットは、本明細書に記載の方法のいずれかを実施するための説明書を含むことができる。いくつかの実施形態では、キットは、本明細書に記載される組成物（例えば、医薬組成物）のいずれかの、少なくとも1回の用量を含むことができる。いくつかの実施形態では、キットは、本明細書に記載される医薬組成物のいずれかを投与するためのシリンジを提供できる。

【0178】

本明細書において、本明細書に記載の方法のいずれかで作製した活性化可能なTBも提供される。本明細書に記載の方法のいずれかによって作製した活性化可能なTBのいずれかを含有する組成物（例えば、医薬組成物）もまた提供される。本明細書においては、本明細書に記載される組成物（例えば、医薬組成物）のいずれかの、少なくとも1回の用量を含有するキットもまた提供される。

【0179】

活性化可能な標的結合タンパク質の生産方法

本明細書において、本明細書に記載されるいずれかの活性化可能なTBを作製する方法であって、（a）本明細書に記載される組み換え宿主細胞のいずれかを、液体培地中で、活性化可能なTBを作製するのに十分な条件下にて培養することと、（b）宿主細胞及び／または液体培地から活性化可能なTBを回収することと、を含む、方法が提供される。

【0180】

細胞を培養する方法は、当技術分野において周知である。いくつかの実施形態では、細胞は、インビトロで、細胞増殖、細胞分化及び細胞成長に好都合である条件下にて維持できる。例えば、組み換え細胞は、細胞（例えば、本明細書に記載される細胞のいずれか）を、必要な成長因子及び、細胞生存力及び成長を支援するのに十分な補助剤を含有する細胞培地に接触させることによって培養できる。

【0181】

いくつかの実施形態では、本方法は、回収された活性化可能なTBを単離することをさらに含み得る。活性化可能なTBの単離は、タンパク質種を分離するための任意の分離または精製技術、例えば、アフィニティータグベースのタンパク質精製（例えば、ポリヒスチジン（His）タグ、グルタチオン-S-トランスフェラーゼタグなど）、硫酸アンモニウム沈殿、ポリエチレングリコール沈殿、サイズ排除クロマトグラフィー、リガンドアフィニティークロマトグラフィー（例えば、プロテインAクロマトグラフィー）、イオン交換クロマトグラフィー（例えば、アニオンまたはカチオン）、疎水性相互作用クロマトグラフィーなどを使用して実行できる。

【0182】

本明細書に記載の組成物及び方法は、活性化可能なTBのMMとABとの間のジスルフィド結合などの非アルファ炭素共有結合を形成できる非還元条件または部分還元条件の使用を伴う場合がある。

【0183】

いくつかの実施形態では、本開示の二重アンカー型の活性化可能な高分子（例えば、二重アンカー型活性化可能TBまたは二重アンカー型活性化可能抗体）は、二重アンカー型の活性化可能な高分子のMM内のジスルフィド結合部位でシステイン残基を操作することと、二重アンカー型の活性化可能な高分子のTB内のジスルフィド結合部位でシステイン残基を操作することと、を含み、MMとTBとは結合しており、CMはMMとTBとの間

10

20

30

40

50

に位置付けられている方法によって調製される。いくつかの態様では、本開示は、二重アンカー型の活性化可能な高分子のTB内のジスルフィド結合部位に操作されたシステイン残基を有する活性化可能高分子を発現することと、二重アンカー型の活性化可能な高分子を回収することを含み、MM及びTBは、回収された二重アンカー型の活性化可能な高分子内のジスルフィド結合部位でテザリングされている。

【0184】

いくつかの実施形態では、本開示の二重アンカー型の活性化可能な高分子（例えば、二重アンカー型活性化可能TBまたは二重アンカー型活性化可能抗体）は、システインを含むMMをTBに結合させることを含む方法によって調製され、システインは、TB内の非アルファ炭素共有結合形成アミノ酸と非アルファ炭素共有結合を形成する。

10

【0185】

いくつかの実施形態では、本開示の二重アンカー型の活性化可能な高分子（例えば、二重アンカー型活性化可能TBまたは二重アンカー型活性化可能抗体）は、TBを非アルファ炭素共有結合形成アミノ酸を含むMMに結合させることを含む方法によって調製され、MMはTB内の非アルファ炭素共有結合形成アミノ酸と非アルファ炭素共有結合を形成する。

【0186】

いくつかの態様では、本開示は、二重アンカー型の活性化可能な高分子を作製する方法であって、MMに結合されたTB中の非アルファ炭素共有結合形成アミノ酸との非アルファ炭素共有結合を形成するように構成された非アルファ炭素共有結合形成アミノ酸を含むMMを提供すること、を含む、方法を含む。いくつかの態様では、本開示は、二重アンカー型の活性化可能な高分子を作製する方法であって、MMに結合されたTB中の非アルファ炭素共有結合形成アミノ酸との非アルファ炭素共有結合を形成するように構成されたシステインを含むMMを提供すること、を含む、方法を含む。

20

【0187】

いくつかの態様では、本開示は、二重アンカー型の活性化可能な高分子において非アルファ炭素共有結合形成アミノ酸を挿入するための位置を特定する方法を含む。いくつかの態様では、本方法は、二重アンカー型の活性化可能な高分子におけるTB及びMMの構造配置を分析することと、非アルファ炭素共有結合形成アミノ酸を挿入するためのTB内の位置を特定することを含む。いくつかの態様では、本方法は、二重アンカー型の活性化可能な高分子におけるTB及びMMの構造配置を分析することと、非アルファ炭素共有結合形成アミノ酸を挿入するためのMM内の位置を特定することを含む。いくつかの態様では、本方法は、二重アンカー型の活性化可能な高分子におけるTB及びMMの構造配置を分析することと、非アルファ炭素共有結合形成アミノ酸を挿入するためのTBに結合されたペプチド内の位置を特定することを含む。いくつかの態様では、本方法は、二重アンカー型の活性化可能な高分子におけるTB及びMMの構造配置を分析することと、非アルファ炭素共有結合形成アミノ酸を挿入するためのMMに結合されたペプチド内の位置を特定することを含む。いくつかの態様では、非アルファ炭素共有結合形成アミノ酸の1つ以上は、システインである。

30

【0188】

いくつかの態様において、本開示は、二重アンカー型の活性化可能な高分子において非アルファ炭素共有結合形成アミノ酸を挿入するための位置を特定する方法を含み、この方法は、MMに結合したTBの三次元構造をマッピングすることと、MMの第2のアミノ酸に近接して位置するTBの第1のアミノ酸を特定することとを含み、第1のアミノ酸は、TBにおいて非アルファ炭素共有結合形成アミノ酸を挿入するための位置である。いくつかの態様では、第2のアミノ酸は、MMにおいて非アルファ炭素共有結合形成アミノ酸を挿入するための位置である。いくつかの態様では、第1のアミノ酸のアルファ炭素原子は、MMに結合したTBの三次元構造において、第2のアミノ酸のアルファ炭素原子から、2〜15オングストローム以内に位置している。いくつかの態様では、第1のアミノ酸のアルファ炭素原子は、MMに結合したTBの三次元構造において、第2のアミノ酸のアル

40

50

ファ炭素原子から、15、10、9、8、7、6、5、4、3、または2オングストローム以内に位置している。アミノ酸の一方または両方がフレキシブルループ内にある場合、上記のC α 間の距離は、2つのアミノ酸が互いに最も近い場合に適用される。いくつかの態様では、非アルファ炭素共有結合は、以下を含むが、これに限定されない。

1. 2つのCys残基間のジスルフィド結合。
2. Lysとグルタミン酸またはグルタミン残基との間のイソペプチド結合。
3. Thrとグルタミンとの間のエステル結合。
4. CysとGlnとの間のチオエステル結合。
5. CysとTyrとの間のチオエーテル結合。
6. His-Tyrは、HisとTyrとの間の架橋である（例えば、シトクロムcオキシダーゼ型タンパク質に存在することが知られている）。 10
7. Lys-Cys NOS（窒素-酸素-硫黄）架橋。

【0189】

いくつかの態様において、本開示は、システインを含むMMをTBに結合させることを含む、二重アンカー型の活性化可能な高分子の製造方法を含み、システインは、TB内の非アルファ炭素共有結合形成アミノ酸と非アルファ炭素共有結合を形成する。

【0190】

いくつかの態様において、本開示は、非アルファ炭素共有結合形成アミノ酸を含むMMにTBを結合させることを含む、二重アンカー型の活性化可能な高分子の製造方法を含み、MMはTB内の非アルファ炭素共有結合形成アミノ酸と非アルファ炭素共有結合を形成する。 20

【0191】

いくつかの実施形態では、本方法は、単離した活性化可能なTBを医薬組成物に調合することをさらに含む。様々な製剤が、当技術分野において既知であり、本明細書に記載される。本明細書に記載の単離された活性化可能なTBは、任意の投与経路（例えば、静脈内、腫瘍内、皮下、皮内、経口、吸入、鼻腔内、肺内、髄腔内、注入、経皮、局所、経粘膜、または筋肉内）用に製剤化することができる。

【0192】

治療方法

いくつかの態様では、本開示はさらに、対象における疾患（例えば、がん（例えば、本明細書に記載のがんのうちのいずれか）、炎症性状態、障害もしくは疾患、または自己免疫性状態、障害もしくは疾患）を治療する方法を提供し、本方法は、治療有効量の、本明細書に記載の活性化可能なTBのいずれかを対象に投与することを含む。いくつかの実施形態では、本開示は、本明細書に記載される活性化可能なTBの治療有効量を、それを必要とする対象に投与することによって、対象における疾患を予防し、進行を遅らせ、治療し、症状を緩和し、または他の形で改善する方法を提供する。用語「治療」は、疾患の少なくとも1つの症状を改善することを意味する。いくつかの実施形態では、疾患治療はがんに対して行われ、がんの少なくとも1つの症状を緩和するためのものである。本明細書で使用する場合、用語「対象」は、任意の哺乳動物を意味する。いくつかの実施形態では、対象は、ネコ科動物（例えば、ネコ）、イヌ科動物（例えば、イヌ）、ウマ科動物（例えば、ウマ）、ウサギ、ブタ、げっ歯類（例えば、マウス、ラット、ハムスターもしくはモルモット）、非ヒト霊長類（例えば、真猿類（例えば、サル（例えば、ヒヒ、マーモセット）、もしくは類人猿（例えば、チンパンジー、ゴリラ、オランウータンもしくはテナガザル））、またはヒトである。いくつかの実施形態では、対象はヒトである。対象及び患者という用語は、区別なく使用される。いくつかの実施形態では、対象は、疾患（例えば、がん（例えば、本明細書に記載のがんのいずれか））を有すると、予め特定または診断されている。 30

【0193】

これらの方法及び使用の実施形態のいずれかで使用される活性化可能なTBは、疾患の任意の段階でも投与することができる。例えば、そのような活性化可能なTBは、早期か 40 50

ら転移までのあらゆる段階のがんに罹患している患者に投与することができる。いくつかの実施形態では、活性化可能なTB及びその製剤は、異常な標的発現及び／または活性と関連する疾患または障害に罹患しているかまたはそれに罹患しやすい対象に投与され得る。

【0194】

異常な標的発現及び／または活性に関連する疾患または障害に罹患しているかまたはそれに罹患しやすい対象は、当技術分野で既知の様々な方法のいずれかを使用して特定され得る。例えば、炎症状態、障害もしくは疾患、または自己免疫状態、障害もしくは疾患、がんまたは他の腫瘍状態に罹患している対象は、身体検査、ならびに血液、尿、及び／または便の分析など、健康状態を評価するための様々な臨床検査及び／または実験室検査のいずれかを使用して特定される場合がある。例えば、炎症及び／または炎症性障害に罹患している対象は、身体検査及び／または体液分析（例えば、血液、尿及び／または便の分析）など、健康状態を評価するための様々な臨床及び／または実験室検査のいずれかを使用して特定され得る。

10

【0195】

いくつかの実施形態では、異常な標的発現及び／または活性に関連する疾患または障害に罹患している患者への活性化可能なTBの投与は、様々な実験室または臨床目的のいずれかが達成された場合に成功したとみなされ得る。例えば、異常な標的発現及び／または活性に関連する疾患または障害に罹患している患者への活性化可能なTBの投与は、疾患または障害に関連する症状の1つ以上が緩和、軽減、抑制される場合、またはそれ以上の、すなわちより悪い状態に進行しない場合に、成功したとみなされ得る。異常な標的発現及び／または活性に関連する疾患または障害に罹患している患者への活性化可能なTBの投与は、疾患または障害が寛解するか、またはそれ以上の、すなわちより悪い状態に進行しない場合に成功したとみなされ得る。

20

【0196】

本明細書で使用する場合、用語「治療する」は、対象（例えば、本明細書に記載される対象のいずれか）において、疾患（例えば、がん（例えば、本明細書に記載されるがんのいずれか））の重症度、頻度または、1つ以上（例えば、1、2、3、4または5つ）の症状もしくは兆候の数を低減することを含む。疾患ががんであるいくつかの実施形態では、治療によって、がんを有する対象における、がん増殖の低減、がん進行の阻害、がん転移の阻害、またはがん再発のリスク低減がもたらされる。

30

【0197】

いくつかの実施形態では、疾患は、がんであり得る。いくつかの実施形態では、対象は、がんを有すると特定または診断されている場合がある。がんの例には、固形腫瘍、血液腫瘍、肉腫、骨肉腫、神経膠芽腫、神経芽細胞腫、黒色腫、横紋筋肉腫、ユーイング肉腫、骨肉腫、B細胞新生物、多発性骨髄腫、リンパ腫（例えば、B細胞リンパ腫、B細胞非ホジキンリンパ腫、ホジキンリンパ腫、皮膚T細胞リンパ腫）、白血病（例えば、有毛細胞白血病、慢性リンパ性白血病（CLL）、急性骨髄性白血病（AML）、慢性骨髄性白血病（CML）、急性リンパ性白血病（ALL））、骨髄異形成症候群（MDS）、カポジ肉腫、網膜芽細胞腫、胃癌、尿路上皮癌、肺癌、腎細胞癌、胃及び食道癌、膵臓癌、前立腺癌、脳癌、結腸癌、骨癌、肺癌、乳癌、結腸直腸癌、卵巣癌、鼻咽頭腺癌、非小細胞肺癌（NSCLC）、頭頸部扁平上皮癌、子宮内膜癌、膀胱癌、子宮頸癌、肝臓癌、及び肝細胞癌が含まれる。いくつかの実施形態では、がんは、リンパ腫である。いくつかの実施形態では、リンパ腫は、バーキットリンパ腫である。いくつかの態様では、対象は、家族性癌症候群、例えばリフラウメニ症候群、家族性乳癌－卵巣癌（BRCA1またはBRAC2の変異）症候群などを有すると特定されているか、あるいは診断されている。開示される方法は、非固形癌の治療にも有用である。例示的な固形腫瘍としては、各種の臓器系、例えば肺、乳房、リンパ系、消化管（例えば、結腸）、泌尿生殖器（例えば、腎臓、尿路上皮、または精巣の腫瘍）、咽頭、前立腺、及び卵巣などの悪性腫瘍（例えば、肉腫、腺癌及び癌腫）が挙げられる。例示的な腺癌には、結腸直腸癌、腎細胞癌、肝臓癌、肺

40

50

の非小細胞癌、及び小腸の癌が含まれる。本明細書の組成物及び方法によって治療され得るがんのさらなる例には、急性リンパ性白血病、成人；急性リンパ性白血病、小児；急性骨髄性白血病、成人；副腎皮質癌；副腎皮質癌、小児；AIDS－関連リンパ腫；AIDS－関連悪性腫瘍；肛門癌；星状細胞腫、小児小脳；星状細胞腫、小児大脳；胆管癌、肝臓外；膀胱癌；膀胱癌、小児；骨癌、骨肉腫／悪性線維性組織球腫；脳幹神経膠腫、小児；脳腫瘍、成人；脳腫瘍、脳幹神経膠腫、小児；脳腫瘍、小脳星細胞腫、小児；脳腫瘍、大脳星細胞腫／悪性神経膠腫、小児；脳腫瘍、上衣腫、小児；脳腫瘍、髄芽腫、小児；脳腫瘍、テント上原始神経外胚葉性腫瘍、小児；脳腫瘍、視覚経路及び視床下部神経膠腫、小児；脳腫瘍、小児（他）；乳癌；乳癌及び妊娠；乳癌、小児；乳癌、男性；気管支腺腫／カルチノイド、小児；カルチノイド腫瘍、小児；カルチノイド腫瘍、胃腸；細胞腫、副腎皮質；細胞腫、島細胞；原発不明癌；中枢神経系リンパ腫、原発性；小脳星細胞腫、小児；大脳星細胞腫／悪性神経膠腫、小児；子宮頸癌；小児癌；慢性リンパ性白血病；慢性骨髄性白血病；慢性骨髄増殖性疾患；腱鞘の明細胞肉腫；結腸癌；結腸直腸癌、小児；皮膚T細胞リンパ腫；子宮内膜癌；上衣腫、小児；上皮癌、卵巣；食道癌；食道癌、小児；ユーイング腫瘍ファミリー；頭蓋外胚細胞腫瘍、小児；性腺外胚細胞腫瘍；肝外胆管癌；眼癌、眼内黒色腫；眼癌、網膜芽細胞腫；胆嚢癌；胃（Gastric）（胃（Stomach））癌；胃（胃）癌、小児；消化管カルチノイド腫瘍；胚細胞性腫瘍、頭蓋外、小児；胚細胞腫瘍、性腺外；胚細胞腫瘍、卵巣；妊娠性絨毛性腫瘍；神経膠腫、小児脳幹；神経膠腫、小児視覚経路及び視床下部；ヘアリーセル白血病；頭頸部癌；肝細胞性（肝臓）癌、成人（原発性）；肝細胞性（肝臓）癌、小児（原発性）；ホジキンリンパ腫、成人；ホジキンリンパ腫、小児；妊娠中のホジキンリンパ腫；下咽頭癌；視床下部及び視覚経路神経膠腫、小児；眼球内黒色腫；膵島細胞癌（膵島）；カボジ肉腫；腎癌；喉頭癌；喉頭癌、小児；白血病、急性リンパ性白血病、成人；白血病、急性リンパ性白血病、小児；白血病、急性骨髄性白血病、成人；白血病、急性骨髄性白血病、小児；白血病、慢性リンパ性；白血病、慢性骨髄性；白血病、有毛細胞；口唇及び口腔癌；肝臓癌、成人（原発性）；肝臓癌、小児（原発性）；肺癌、非小細胞；肺癌、小細胞；リンパ性白血病、成人急性；リンパ芽球性白血病、小児急性；リンパ性白血病、慢性；リンパ腫、AIDS－関連；リンパ腫、中枢神経系（原発性）；リンパ腫、皮膚T細胞；リンパ腫、ホジキンリンパ腫、成人；リンパ腫、ホジキンリンパ腫、小児；妊娠中のリンパ腫、ホジキンリンパ腫；リンパ腫、非ホジキンリンパ腫、成人；リンパ腫、非ホジキンリンパ腫、小児；妊娠中のリンパ腫、非ホジキンリンパ腫；リンパ腫、原発性中枢神経系；マクログロブリン血症、ワルデンストレーム病、男性乳癌；悪性中皮腫、成人；悪性中皮腫、小児；悪性胸腺腫；髄芽腫、小児；悪性黒色腫；悪性黒色腫、眼内；メルケル細胞癌；中皮腫、悪性；原発不明の転移性頸部扁平上皮癌；多発性内分泌腫瘍症候群、小児；多発性骨髄腫／形質細胞腫瘍；菌状息肉症；骨髄異形成症候群；骨髄性白血病、慢性；骨髄性白血病、小児急性；骨髄腫、多発性；骨髄増殖性疾患、慢性；鼻腔及び副鼻腔癌；上咽頭癌；上咽頭癌、小児；神経芽細胞腫；非ホジキンリンパ腫、成人；非ホジキンリンパ腫、小児；妊娠中の非ホジキンリンパ腫；非小細胞肺癌；口腔癌、小児；口腔及び口唇癌；中咽頭癌；骨肉腫／骨の悪性線維性組織球腫；卵巣癌、小児；卵巣上皮癌；卵巣胚細胞腫瘍；卵巣低悪性度腫瘍；膵癌；膵癌、小児；膵癌、島細胞；副鼻腔及び鼻腔癌；副甲状腺癌；陰茎癌；褐色細胞腫；松果体及びテント上原始神経外胚葉性腫瘍、小児；下垂体腫瘍；形質細胞腫瘍／多発性骨髄腫；胸膜肺芽腫；妊娠及び乳癌；妊娠及びホジキンリンパ腫；妊娠及び非ホジキンリンパ腫；原発性中枢神経系リンパ腫；原発性肝臓癌、成人；原発性肝臓癌、小児；前立腺癌；直腸癌；腎細胞（腎臓）癌；腎細胞癌、小児；腎盂及び尿管、移行上皮癌；網膜芽細胞腫；横紋筋肉腫、小児；唾液腺癌；唾液腺癌、小児；肉腫、ユーイング腫瘍ファミリー；肉腫、カボジ肉腫；肉腫（骨肉腫）／骨の悪性線維性組織球腫；肉腫、横紋筋肉腫、小児；肉腫、軟部組織、成人；肉腫、軟部組織、小児；セザリー症候群；皮膚癌；皮膚癌、小児；皮膚癌（黒色腫）；皮膚癌、メルケル細胞；小細胞肺癌；小腸癌；軟部組織肉腫、成人；軟部組織肉腫、小児；原発不明の頸部扁平上皮癌、転移性；胃（胃）癌；胃（胃）癌、小児；テント上原始神経外胚葉性腫瘍、小児；T細胞リンパ腫、皮膚；精巣癌；胸腺

10

20

30

40

50

腫、小児；胸腺腫、悪性；甲状腺癌；甲状腺癌、小児；腎盂及び尿管の移行上皮癌；絨毛性腫瘍、妊娠性；原発部位不明、小児がん；小児の珍しいがん；尿管及び腎盂、移行上皮癌；尿道癌；子宮肉腫；腔癌；視覚経路及び視床下部神経膠腫、小児；外陰癌；ワルデンストレーンマクログロブリン血症；ウィルムス腫瘍；びまん性大細胞型B細胞リンパ腫（DLBCL）；ならびにマントル細胞リンパ腫（MCL）が含まれる。前述のがんの転移は、本明細書に記載の方法に従って治療または予防することもできる。

【0198】

いくつかの実施形態では、本明細書の方法は、（例えば、治療前の対象における、がんの1つ以上の症状の数、重症度または頻度と比較して）対象におけるがんの1つ以上の症状の数、重症度、または頻度の低減をもたらすことができる。

【0199】

本方法はさらに、対象に、1つ以上の追加の薬剤を投与することを含み得る。いくつかの実施形態では、活性化可能なTBは、治療中及び／または治療後に、1つ以上の追加の薬剤と組み合わせて投与されてもよい。いくつかの実施形態では、活性化可能なTBは、単一の治療組成物に調合され得、活性化可能なTBと追加の薬剤（複数可）とが同時に投与される場合がある。あるいは、活性化可能なTB及び追加の薬剤（複数可）は互いに別々であってもよく、例えば、それぞれが別の治療組成物に配合され、活性化可能なTB及び追加の薬剤が同時に投与されるか、または活性化可能なTB及び追加の薬剤が治療計画中の異なる時点で投与される。例えば、活性化可能なTBは、追加の薬剤の投与前に投与することも、追加の薬剤の投与後に投与することも、交互に投与することもできる。活性化可能なTB及び追加の薬剤（複数可）は、単回用量または複数回用量で投与されてもよい。

【0200】

本開示はまた、対象またはサンプル中の切断因子及び標的の有無を検出する方法を提供する。このような方法は、（i）対象または生物学的サンプルを活性化可能なTBと接触させることであって、活性化可能なTBには、CMの切断後に放出される活性化可能なTBの一部に位置する検出可能な標識が含まれる、接触させることと、（ii）対象または生物学的サンプル中の活性化（切断）TBのレベルを測定することであって、対象または生物学的サンプル中の活性化TBの検出可能なレベルが、活性化可能なTBの標的結合及び／またはプロテアーゼ切断が対象または生物学的サンプル中で検出され得ないように、切断因子、標的、または切断因子と標的の両方が対象または生物学的サンプル中に存在しない、及び／または十分に存在していないことを示し、対象または生物学的サンプル中の活性化（切断）TBの検出可能なレベルの低下は、切断因子及び標的が対象または生物学的サンプル中に存在することを示す、測定することと、を含む。

【0201】

検出可能な標識のレベルの低減は、例えば、少なくとも5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、もしくは95%の低減、または実質的に100%の低減であり得る。いくつかの実施形態では、検出可能な標識は、活性化可能なTBの成分、例えば、ABにコンジュゲートされ得る。いくつかの実施形態では、対象またはサンプル中の活性化可能なTBのレベルを測定することは、活性化TBに特異的に結合する二次試薬を使用して達成され得、この試薬は検出可能な標識を含む。二次試薬は、検出可能な標識を含むTBであり得る。

【0202】

いくつかの実施形態では、活性化可能なTBはまた、患者のサンプル中の標的の検出にも有用であり得、したがって診断薬として有用である。例えば、活性化可能なTBは、患者のサンプル中の標的レベルを検出するために、インビトロアッセイ、例えば、ELISAで使用され得る。例えば、活性化可能なTBは、固体支持体（例えば、マイクロタイタープレートのウェル（複数可））上に固定化され得る。固定化された活性化可能なTBは、テストサンプル中に存在し得る任意の標的のための捕捉TBとして機能し得る。固定化

10

20

30

40

50

T Bを患者のサンプルと接触させる前に、分析物の非特異的吸着を防止するために、固体支持体をすすぎ、乳タンパク質またはアルブミンなどのブロッキング剤で処理してもよい。

【0203】

いくつかの実施形態では、活性化可能なT Bをインビトロ診断アッセイで使用して得られた結果に基づいて、対象における疾患の段階を、標的抗原（複数可）の発現レベルに基づいて決定することができる。所与の疾患に関して、血液サンプルは、疾患の進行の様々な段階にあると診断された対象から、及び／または疾患の治療的処置の様々な時点で採取され得る。進行または治療の各段階について統計的に有意な結果を提供するサンプルの集団を使用して、各段階の特徴と考えられ得る抗原の濃度の範囲を指定する。

10

【0204】

本明細書の活性化可能なT Bはまた、診断方法及び／またはイメージング方法に使用され得る。いくつかの実施形態では、そのような方法は、インビトロ方法であり得る。いくつかの実施形態では、そのような方法は、インビボ方法であり得る。いくつかの実施形態では、そのような方法は、インサイチュ方法であり得る。いくつかの実施形態では、そのような方法は、エクスピボ方法であり得る。例えば、CMを有する活性化可能なT Bを使用して、CMを切断することができる酵素の有無を検出することが可能である。このような活性化可能なT Bは診断に使用でき、特定の宿主生物の特定の細胞または組織における活性化T B（すなわち、活性化可能なT Bの切断によって生じたT B）の測定された蓄積を通じて、酵素活性（または、いくつかの実施形態では、ジスルフィド結合の還元をもたらすことができるような還元電位の増加した環境）のインビボ検出（例えば、定性的または定量的）を含むことができる。このような活性化T Bの蓄積は、組織が酵素活性（またはCMの性質に応じた還元電位の増加）を発現していることだけでなく、組織が活性化T Bが結合する標的を発現していることも示している。

20

【0205】

例えば、CMは、腫瘍部位、ウイルスまたは細菌感染部位、生物学的に限定された部位（例えば、膿瘍、臓器内など）などで見いだされるプロテアーゼのプロテアーゼ基質になるように選択され得る。ABは、標的抗原に結合するものであり得る。当業者によく知られている方法を使用して、検出可能な標識（例えば、蛍光標識または放射性標識または放射性トレーサー）を、ABまたは活性化可能なT Bの他の領域にコンジュゲートすることができる。適切な検出可能な標識については、上記のスクリーニング方法の関連で考察することができ、追加の具体例を以下に提供する。疾患状態のタンパク質またはペプチドに特異的なT B（例えばAB）を、対象の疾患組織で活性が上昇しているプロテアーゼとともに使用すると、活性化可能なT Bは、CM特異的酵素が検出可能なレベルで存在しないか、疾患組織よりも低いレベルで存在するか、または不活性である（例：例えば、チモーゲン形態または阻害物質との複合体）組織と比較して、疾患組織への結合率が上昇する可能性がある。小さなタンパク質及びペプチドは、腎臓の濾過システムによって血液から急速に除去され、CMに特異的な酵素は検出可能なレベルで存在しない（または非疾患組織ではより低いレベルで存在するか、または不活性な構造で存在する）ため、疾患組織における活性化T Bの蓄積は、非疾患組織と比較して増加する可能性がある。

30

40

【0206】

いくつかの実施形態では、活性化可能なT Bは、対象、例えばヒトを含む哺乳動物における蛍光シグナルの検出によって、疾患部位に標的が含まれており、活性化可能なT BのCMに特異的なプロテアーゼが含まれていることが示されるインビボイメージングに有用であり得る。インビボイメージングは、本開示の活性化可能なT Bによる治療に適した患者集団を特定または絞り込むために使用することができる。例えば、検査対象の活性化可能なT BのCM内の基質を切断するプロテアーゼと標的の両方に対して検査で陽性を示した患者（例えば、疾患部位に活性化T Bを蓄積する）は、そのようなCMを含むかかる活性化可能なT Bによる治療に適した候補者として特定される。同様に、検査で陰性を示した患者は、別の治療に適した候補者（つまり、検査対象の活性化可能なT Bによる治療に

50

は適さない)として特定される可能性がある。いくつかの実施形態では、第1の活性化可能なTBに関して検査で陰性を示した患者は、治療に適した活性化可能なTB(例えば、患者の疾患部位で切断されるCMを含む活性化可能なTB)が特定されるまで、異なるCMを含む他の活性化可能なTBで検査され得る。

【0207】

いくつかの実施形態では、インサイチュイメージングは、どの患者を治療するかを識別する方法において有用であり得る。例えば、インサイチュイメージングでは、活性化可能なTBを使用して患者のサンプルをスクリーニングし、適切な場所、例えば腫瘍部位に適切なプロテアーゼ(複数可)と標的(複数可)とを持つ患者を特定することができる。いくつかの実施形態では、インサイチュイメージングは、本開示の活性化可能なTBによる治療に適した患者集団を特定または絞り込むために使用される。例えば、検査対象の活性化可能なTBのCM内の基質を切断するプロテアーゼと標的の両方に対して検査で陽性を示した患者(例えば、疾患部位に活性化TBを蓄積する)は、そのようなCMを含むかかる活性化可能なTBによる治療に適した候補者として特定される。同様に、これらの方法を用いて検査される活性化可能なTBに使用されるCM内の基質を切断するプロテアーゼ及び標的のいずれかまたは両方に対して検査で陰性を示した患者は、別の治療に適した候補者(つまり、検査対象の活性化可能なTBによる治療には適さない)として特定される。いくつかの実施形態では、第1の活性化可能なTBに関して検査で陰性を示した患者は、治療に適した活性化可能なTB(例えば、患者の疾患部位で切断されるCMを含む活性化可能なTB)が特定されるまで、異なるCMを含む他の活性化可能なTBで検査され得る。

10

20

【0208】

いくつかの実施形態では、本開示は、以下の非限定的な番号の付いた条項のいずれか1項またはいずれかの組み合わせを含む。

【0209】

1. 標的に特異的に結合する標的結合タンパク質(TB)と、
前記TBに結合されたマスキング部分(MM)であって、前記MMが前記ABの前記標的への結合を阻害する、前記MMと、
前記TBに結合され、前記TBと前記MMとの間に位置する切断可能な部分(CM)であって、前記CMが、プロテアーゼの基質として機能するポリペプチドである、前記CMと、を含む、二重アンカー型の活性化可能な標的結合タンパク質であって、
前記MMと前記TBとをテザリングする非アルファ炭素共有結合をさらに含む、前記活性化可能な標的結合タンパク質。

30

【0210】

2. 前記TBが、抗原結合タンパク質(AB)である、条項1に記載の活性化可能な標的結合タンパク質。

【0211】

3. 条項1または条項2に記載の活性化可能な標的結合タンパク質であって、前記非アルファ炭素共有結合を欠く単一アンカー型の活性化可能な標的結合タンパク質と比較して低い標的結合活性を有する、前記活性化可能な標的結合タンパク質。

40

【0212】

4. 前記非アルファ炭素共有結合が、エステル結合またはチオエステル結合である、条項1~3のいずれか1項またはいずれかの組み合わせに記載の活性化可能な標的結合タンパク質。

【0213】

5. 前記エステル結合が、スレオニンとグルタミンとの間にある、条項4に記載の活性化可能な標的結合タンパク質。

【0214】

6. 前記チオエステル結合が、システインとグルタミンまたはチロシンとの間にある、条項4に記載の活性化可能な標的結合タンパク質。

50

【0215】

7. 前記非アルファ炭素共有結合が、ヒスチジンとチロシンとの間の架橋、またはリジンとシステインとの間の架橋である、条項1～3のいずれか1項またはいずれかの組み合わせに記載の活性化可能な標的結合タンパク質。

【0216】

8. 前記非アルファ炭素共有結合が、イソペプチド結合である、条項1～3のいずれか1項またはいずれかの組み合わせに記載の活性化可能な標的結合タンパク質。

【0217】

9. 前記イソペプチド結合が、リジンとグルタミン酸残基またはアスパラギン酸残基との間にある、条項8に記載の活性化可能な標的結合タンパク質。

【0218】

10. 前記イソペプチド結合が、グルタミンのガンマカルボキシアミド基とリジン側鎖のイプシロンアミノ基との間にある、条項8に記載の活性化可能な標的結合タンパク質。

【0219】

11. 前記非アルファ炭素共有結合が、ジスルフィド結合である、条項1～3のいずれか1項またはいずれかの組み合わせに記載の活性化可能な標的結合タンパク質。

【0220】

12. 前記ジスルフィド結合が、第1のシステインと第2のシステインとの間に形成され、

前記第1のシステインが前記MM内にあり、前記第2のシステインが前記TB内にある、

前記第1のシステインが、前記MMに結合されたペプチド内にあり、前記第2のシステインが前記TB内にある、または

前記第1のシステインが前記MM内にあり、前記第2のシステインが、前記TBに結合されたペプチド内にある、条項11に記載の活性化可能な標的結合タンパク質。

【0221】

13. さらに、第2のCMを含み、

前記第2のCMが前記MMと前記非アルファ炭素共有結合との間に位置する、

前記第2のCMが、前記MM内にあり、前記非アルファ炭素共有結合を形成するシステインから最大で5アミノ酸離れている、または

前記第2のCMが、前記TB内にあり、前記非アルファ炭素共有結合を形成するシステインから最大で5アミノ酸離れた位置にある、条項1～12のいずれか1項またはいずれかの組み合わせに記載の活性化可能な標的結合タンパク質。

【0222】

14. 前記第1のCMと前記第2のCMとが、異なるプロテアーゼの基質である、条項1～13のいずれか1項またはいずれかの組み合わせに記載の活性化可能な標的結合タンパク質。

【0223】

15. 前記第1のCMと前記第2のCMとが、同じプロテアーゼの基質である、条項1～13のいずれか1項またはいずれかの組み合わせに記載の活性化可能な標的結合タンパク質。

【0224】

16. 前記プロテアーゼが、対象の腫瘍によって産生される、条項1～12のいずれか1項またはいずれかの組み合わせに記載の活性化可能な標的結合タンパク質。

【0225】

17. 前記ABが、抗体、Fab断片、F(ab')₂断片、scFv、scAb、dAb、VHH、または単ドメイン抗体である、条項2～16のいずれか1項またはいずれかの組み合わせに記載の活性化可能な標的結合タンパク質。

【0226】

10

20

30

40

50

18. 前記 A B が、単ドメイン抗体である、条項 2 ～ 17 のいずれか 1 項またはいずれかの組み合わせに記載の活性化可能な標的結合タンパク質。

【0227】

19. 前記 A B が、Fc タグ付き単ドメイン抗体である、条項 2 ～ 18 のいずれか 1 項またはいずれかの組み合わせに記載の活性化可能な標的結合タンパク質。

【0228】

20. 前記 A B が、二重特異性抗体である、条項 2 ～ 17 のいずれか 1 項またはいずれかの組み合わせに記載の活性化可能な標的結合タンパク質。

【0229】

21. 前記二重特異性抗体が、二重特異性 T 細胞エンゲージャー (BiTE) または二重親和性再標的化抗体 (DART) である、条項 20 に記載の活性化可能な標的結合タンパク質。 10

【0230】

22. 前記 A B が、多特異性抗体である、条項 2 ～ 17 のいずれか 1 項またはいずれかの組み合わせに記載の活性化可能な標的結合タンパク質。

【0231】

23. 前記非アルファ炭素共有結合が、前記 MM と前記単ドメイン抗体との間にある、条項 18 ～ 19 のいずれか 1 項またはいずれかの組み合わせに記載の活性化可能な標的結合タンパク質。

【0232】

24. 前記非アルファ炭素共有結合が、前記 MM と Fc ドメインとの間にある、条項 1 ～ 22 のいずれか 1 項またはいずれかの組み合わせに記載の活性化可能な標的結合タンパク質。 20

【0233】

25. 前記 MM が、前記 T B のエピトープを含む、条項 1 ～ 24 のいずれか 1 項またはいずれかの組み合わせに記載の活性化可能な標的結合タンパク質。

【0234】

26. 前記 MM が、前記 T B のエピトープの 4 つ以上の連続したアミノ酸を含まない、条項 1 ～ 24 のいずれか 1 項またはいずれかの組み合わせに記載の活性化可能な標的結合タンパク質。 30

【0235】

27. 前記 MM が、前記標的に結合するための前記 T B の解離定数よりも大きい、前記 T B への結合のための解離定数を有する、条項 1 ～ 26 のいずれか 1 項またはいずれかの組み合わせに記載の活性化可能な標的結合タンパク質。

【0236】

28. 前記 MM が、2 ～ 40 アミノ酸長のポリペプチドである、条項 1 ～ 27 のいずれか 1 項またはいずれかの組み合わせに記載の活性化可能な標的結合タンパク質。

【0237】

29. 条項 1 ～ 28 のいずれか 1 項またはいずれかの組み合わせに記載の活性化可能な標的結合タンパク質であって、前記 MM と前記 CM との間にリンカーを含む、前記活性化可能な標的結合タンパク質。 40

【0238】

30. 条項 1 ～ 29 のいずれか 1 項またはいずれかの組み合わせに記載の活性化可能な標的結合タンパク質であって、前記 CM と前記 T B との間にリンカーを含む、前記活性化可能な標的結合タンパク質。

【0239】

31. 条項 1 ～ 29 のいずれか 1 項またはいずれかの組み合わせに記載の活性化可能な標的結合タンパク質であって、前記 MM と前記 CM との間の第 1 のリンカー、及び前記 CM と前記 T B との間の第 2 のリンカーを含む、前記活性化可能な標的結合タンパク質。

【0240】

32. 条項1～31のいずれか1項またはいずれかの組み合わせに記載の活性化可能な標的結合タンパク質と、担体と、を含む、組成物。

【0241】

33. 条項32に記載の組成物であって、医薬組成物である、前記組成物。

【0242】

34. 条項32または条項33に記載の組成物の少なくとも1回の用量を含む、容器、バイアル、シリンジ、注射ペン、またはキット。

【0243】

35. 条項1～31のいずれか1項またはいずれかの組み合わせに記載の活性化可能な標的結合タンパク質をコードする配列を含む、核酸。

【0244】

36. 条項35に記載の核酸を含む、ベクター。

【0245】

37. 条項35に記載の核酸、または条項36に記載のベクターを含む、細胞。

【0246】

38. 薬剤にコンジュゲートされた、条項1～31のいずれか1項またはいずれかの組み合わせに記載の活性化可能な標的結合タンパク質を含む、コンジュゲートされた活性化可能な標的結合タンパク質。

【0247】

39. 前記薬剤が、治療剤、標的指向性部分、または検出可能部分である、条項38に記載のコンジュゲートされた活性化可能な標的結合タンパク質。

【0248】

40. 治療を必要とする対象を治療する方法であって、前記対象に、治療有効量の、条項1～31のいずれか1項またはいずれかの組み合わせに記載の活性化可能な標的結合タンパク質、条項32または条項33に記載の組成物、あるいは条項38または条項39に記載のコンジュゲートされた活性化可能な標的結合タンパク質を投与することを含む、前記方法。

【0249】

41. 前記対象が、がん、炎症状態、障害もしくは疾患、または自己免疫状態、障害もしくは疾患を有すると特定または診断されている、条項40に記載の方法。

【0250】

42. 活性化可能な標的結合タンパク質を生産する方法であって、

前記活性化可能な標的結合タンパク質を生産するのに十分な条件下で、培養基中で、条項37に記載の細胞を培養することと、

前記細胞または前記培養基から前記活性化可能な標的結合タンパク質を回収することと、を含む、前記方法。

【0251】

43. 前記細胞または前記培養基から回収した前記活性化可能な標的結合タンパク質を単離することをさらに含む、条項42に記載の方法。

【0252】

44. 前記単離することが、タンパク質精製タグ及び／またはサイズ排除クロマトグラフィーを使用して行われる、条項43に記載の方法。

【0253】

45. 前記活性化可能な標的結合タンパク質を医薬組成物に調合することをさらに含む、条項43または条項44に記載の方法。

【0254】

46. 二重アンカー型の活性化可能な高分子を生産する方法であって、前記二重アンカー型の活性化可能な高分子のマスクング部分（MM）におけるジスルフィド結合部位にあるシステイン残基を操作することと、前記二重アンカー型の活性化可能な高分子の標的

10

20

30

40

50

結合タンパク質（ＴＢ）におけるジスルフィド結合部位にあるシステイン残基を操作することであって、前記ＭＭと前記ＴＢとが結合され、切断可能な部分（ＣＭ）が前記ＭＭと前記ＴＢとの間に位置付けられる、前記操作することと、前記二重アンカー型の活性化可能な高分子を発現させることと、前記二重アンカー型の活性化可能な高分子を回収することであって、前記ＭＭと前記ＴＢとが、前記回収された二重アンカー型の活性化可能な高分子中のそれらのジスルフィド結合部位でテザリングされている、前記回収することと、を含む、前記方法。

【０２５５】

４７． 二重アンカー型の活性化可能な高分子を生産する方法であって、前記二重アンカー型の活性化可能な高分子のマスキング部分（ＭＭ）におけるイソペプチド結合部位にあるアルギニン残基またはリジン残基を操作すること、及び／または前記二重アンカー型の活性化可能な高分子の標的結合タンパク質（ＴＢ）におけるイソペプチド結合部位にあるアスパラギン酸残基またはグルタミン酸残基を操作することであって、前記ＭＭと前記ＴＢとが結合され、切断可能な部分（ＣＭ）が前記ＭＭと前記ＴＢとの間に位置付けられる、前記操作することと、前記二重アンカー型の活性化可能な高分子を発現させることと、前記二重アンカー型の活性化可能な高分子を回収することであって、前記ＭＭと前記ＴＢとが、前記回収された二重アンカー型の活性化可能な高分子中のそれらのイソペプチド結合部位でテザリングされている、前記回収することと、を含む、前記方法。

10

【０２５６】

４８． 二重アンカー型の活性化可能な高分子を生産する方法であって、前記二重アンカー型の活性化可能な高分子のマスキング部分（ＭＭ）におけるイソペプチド結合部位にあるアスパラギン酸残基またはグルタミン酸残基を操作すること、及び／または前記二重アンカー型の活性化可能な高分子の標的結合タンパク質（ＴＢ）におけるイソペプチド結合部位にあるアルギニン残基またはリジン残基を操作することであって、前記ＭＭと前記ＴＢとが結合され、切断可能な部分（ＣＭ）が前記ＭＭと前記ＴＢとの間に位置付けられる、前記操作することと、前記二重アンカー型の活性化可能な高分子を発現させることと、前記二重アンカー型の活性化可能な高分子を回収することであって、前記ＭＭと前記ＴＢとが、前記回収された二重アンカー型の活性化可能な高分子中のそれらのイソペプチド結合部位でテザリングされている、前記回収することと、を含む、前記方法。

20

【０２５７】

４９． 二重アンカー型の活性化可能な高分子を作製する方法であって、ＭＭに結合されたＴＢ中の非アルファ炭素共有結合形成アミノ酸との非アルファ炭素共有結合を形成するように構成された非アルファ炭素共有結合形成アミノ酸を含む前記ＭＭを提供すること、を含む、前記方法。

30

【０２５８】

５０． 前記ＭＭの前記アルファ炭素共有結合形成アミノ酸が、スレオニンであり、前記ＴＢの前記アルファ炭素共有結合形成アミノ酸が、グルタミンである、条項４９に記載の方法。

【０２５９】

５１． 前記ＭＭの前記アルファ炭素共有結合形成アミノ酸が、グルタミンであり、前記ＴＢの前記アルファ炭素共有結合形成アミノ酸が、スレオニンである、条項４９に記載の方法。

40

【０２６０】

５２． 前記ＭＭの前記アルファ炭素共有結合形成アミノ酸が、システインであり、前記ＴＢの前記アルファ炭素共有結合形成アミノ酸が、グルタミンまたはチロシンである、条項４９に記載の方法。

【０２６１】

５３． 前記ＭＭの前記アルファ炭素共有結合形成アミノ酸が、グルタミンまたはチロシンであり、前記ＴＢの前記アルファ炭素共有結合形成アミノ酸が、システインである、条項４９に記載の方法。

50

【0262】

54. 前記MMの前記アルファ炭素共有結合形成アミノ酸が、ヒスチジンであり、前記TBの前記アルファ炭素共有結合形成アミノ酸が、チロシンである、条項49に記載の方法。

【0263】

55. 前記MMの前記アルファ炭素共有結合形成アミノ酸が、チロシンであり、前記TBの前記アルファ炭素共有結合形成アミノ酸が、ヒスチジンである、条項49に記載の方法。

【0264】

56. 前記MMの前記アルファ炭素共有結合形成アミノ酸が、リジンであり、前記TBの前記アルファ炭素共有結合形成アミノ酸が、システイン、グルタミン酸、またはアスパラギン酸である、条項49に記載の方法。

10

【0265】

57. 前記MMの前記アルファ炭素共有結合形成アミノ酸が、システイン、グルタミン酸、またはアスパラギン酸であり、前記TBの前記アルファ炭素共有結合形成アミノ酸が、リジンである、条項49に記載の方法。

【0266】

58. 前記MMの前記アルファ炭素共有結合形成アミノ酸が、グルタミンであり、前記TBの前記アルファ炭素共有結合形成アミノ酸が、リジンであり、前記非アルファ炭素共有結合が、前記グルタミンの前記ガンマカルボキシアミド基と前記リジン側鎖の前記イプシロンアミノ基との間のイソペプチド結合である、条項49に記載の方法。

20

【0267】

59. 前記MMの前記アルファ炭素共有結合形成アミノ酸が、リジンであり、前記TBの前記アルファ炭素共有結合形成アミノ酸が、グルタミンであり、前記非アルファ炭素共有結合が、前記グルタミンの前記ガンマカルボキシアミド基と前記リジン側鎖の前記イプシロンアミノ基との間のイソペプチド結合である、条項49に記載の方法。

【0268】

60. 二重アンカー型の活性化可能な高分子を作製する方法であって、MMに結合されたTB中の非アルファ炭素共有結合形成アミノ酸との非アルファ炭素共有結合を形成するように構成されたシステインを含む前記MMを提供すること、を含む、前記方法。

30

【実施例】

【0269】

本発明は、以下の実施例においてさらに説明されるが、これらの実施例は、請求項に記載された本発明の範囲を限定するものではなく、本開示に記載された活性化可能な高分子の二重アンカー構造の利点の概念実証を示すものである。

【0270】

実施例1：単一アンカー型BC2Tマスク化ナノボディ（BC2T-Nb）の生産

この実施例は、例示的な単一アンカー型の活性化可能な抗体の生産を示す。単一アンカー型の活性化可能な抗体は、ベータカテニンに結合することができるナノボディ（Nb）と、Nbのエピトープであるベータカテニンの配列を含むMM（BC2T）とを含む。MMはNbを用いた単一アンカー型であり、すなわち、MMとNbとはCMを介して結合しているが、ジスルフィド結合によってテザリングされていない。単一アンカー型BC2T-Nb（図4Bに示す）を、組み換え法によって調製した。単一アンカー型BC2T-Nb（配列番号2または3）は、N末端からC末端にかけて、SP5からのシグナルペプチド（配列番号12）、リーダー配列（配列番号13）、BC2T MM（配列番号14）、GSリンカー（配列番号15）、CM（配列番号16または17）、GSリンカー（配列番号18）、Nb（配列番号19）、GGSLリンカー、及び精製用のHisタグ（配列番号21）を含む。ポリペプチドは、配列番号2または3のポリペプチド配列をコードするポリヌクレオチドで宿主細胞を形質転換し、続いて、得られた組み換え宿主細胞を培養し、標準的な固定化金属アフィニティークロマトグラフィー（IMAC）及びサイズ排除

40

50

クロマトグラフィー（SEC）法を使用して上清からタンパク質を精製することによって調製した。得られたタンパク質は単量体（ProC653またはProC654）である。

【0271】

コントロール分子（すなわち、BC2Tが結合していないマスクされていないナノボディ）も、組み換え法によって調製した。ProC649（PP073）（配列番号1）は、N末端からC末端にかけて、SP5からのシグナルペプチド（配列番号12）、Nb（配列番号19）、GGSリンカー、及び精製用のHisタグ（配列番号21）を含む。ポリペプチドは、配列番号1のポリペプチド配列をコードするポリヌクレオチドで宿主細胞を形質転換し、その後、得られた組み換え宿主細胞を培養し、標準的なIMAC法及びSEC法を用いて精製することによって調製した。得られたタンパク質（ProC649）は、単量体である。

10

【0272】

実施例2．単一アンカー型BC2T-Nbのプロテアーゼ処理

MMを遊離させるために、マスクされていないナノボディと単一アンカー型BC2T-Nb分子とを、マトリックスメタロプロテアーゼ（MMP）などの組み換えヒトプロテアーゼを用いて、37℃で一晩処理した。完全なプロテアーゼ処理を、非還元性SDS-PAGEによって試験した。タンパク質アリコート（2μg）をサンプルバッファー（必要に応じて還元剤を添加）中、75℃で10分間変性させ、MOPSバッファー中で4～12%NuPAGE（商標）ビストリスゲル（Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, カタログ番号NP0321）で、175Vで1時間分離し、InstantBlue（商標）で1時間染色した後、水中で少なくとも4時間脱染して可視化した。

20

【0273】

タンパク質は、単量体であり、予測された分子量であることを確認した（図6）。プロテアーゼ処理は、マスクされていない分子の完全性に影響を与えなかった（図6、レーン1、2、3）。BC2Tとナノボディとをポリペプチドとして発現し、CMに連結したコンストラクトでは、分子量にシフトが見られる（図6、レーン4、6）。プロテアーゼ処理後、タンパク質はマスクされていない分子と同じレベルで流動する（図6、レーン5、7）。

30

【0274】

実施例3：BioLayer干渉法（BLI）による単量体単一アンカー型BC2T-Nbの結合

マスクされていないナノボディ及び単一アンカーのBC2T-Nbの遊離BC2Tペプチドへの結合を、ForteBio Octetデバイスを使用してBLIによって評価した。BLIは一般に、結合相互作用の会合及び解離反応速度を計算するために使用されるが、本明細書では、結合を検出するために使用した。以下の配列：QGQSGQPDRKAAVSHWQ（配列番号567）に対応するペプチドを、N末端にビオチンを用いてELIM Bioharmaceuticalsで合成した。ペプチドを、結合バッファー（BB：1XPBS、pH7.2、5%グリセロール、0.1%Tween（登録商標）-20、2%BSA）中に100nMでSSAバイオセンサー先端（Pall/ForteBioカタログ番号18-5117）に10分間ロードした。この捕捉ステップの前後1分間のBB中でのベースラインインキュベーションを行うことでタンパク質の捕捉を確認した。次に、ロードされた先端をBB中の100nM Nbで6分間インキュベートし、続いてBB中で6分間インキュベートした。センサー先端での干渉距離（ナノメートル）の変化を時間に対してプロットし、先端に固定化されたリガンドからの可溶性タンパク質の結合／解離を追跡する（図7）。結果は、ProC653及びProC654が、マスクされていないコントロールProC649と同様に、プロテアーゼ（MMP9またはMMP14）処理後にのみペプチドに結合できるため、効果的にマスクされていることを示している。

40

50

【0275】

実施例4：単量体二重アンカー型BC2T-Nbの生産

この実施例は、例示的な単量体二重アンカー型の活性化可能な抗体の生産を示す。二重アンカー型の活性化可能な抗体は、ベータカテニンに結合することができるナノボディ（Nb）と、Nb（BC2T）のエピトープであるベータカテニンの配列を含むMMとを含む。MMはNbを用いた二重アンカー型であり、すなわち、MMとNbとはCMを介して結合し、ジスルフィド結合によってもテザリングされている。二重アンカーBC2T-Nb（図4Aに示す）を組み換え法によって調製した。Proc994（PP123）（配列番号4）及びProc995（PP124）（配列番号5）は、N末端からC末端にかけて、SP5からのシグナルペプチド（配列番号12）、3番目のアミノ酸がシステインに変異したリーダー配列（配列番号22）、BC2T MM（配列番号14）、GSリンカー（配列番号15）、CM（配列番号16）、GSリンカー（配列番号18）、1つのアミノ酸がシステインに変異したNb（配列番号24または25）、GGSリンカー、及び精製用のHisタグ（配列番号21）を含む。ポリペプチドは、配列番号4または5のポリペプチド配列をコードするポリヌクレオチドで宿主細胞を形質転換し、得られた組み換え宿主細胞を培養することによって調製した。得られたタンパク質（Proc994またはProc995）は、単量体である。

10

【0276】

Proc996（PP125）（配列番号6）は、N末端からC末端にかけて、SP5からのシグナルペプチド（配列番号12）、リーダー配列（配列番号13）、2番目のアミノ酸がシステインに変異したBC2T MM（配列番号23）、GSリンカー（配列番号15）、CM（配列番号16）、GSリンカー（配列番号18）、1つのアミノ酸がシステインに変異したNb（配列番号26）、GGSリンカー、及び精製用のHisタグ（配列番号21）を含む。ポリペプチドは、配列番号6のポリペプチド配列をコードするポリヌクレオチドで宿主細胞を形質転換し、得られた組み換え宿主細胞を培養し、標準的なIMAC法及びSEC法を使用して発現したタンパク質を精製することによって調製した。得られたタンパク質（Proc996）は、単量体である。

20

【0277】

実施例5．単量体二重アンカー型BC2T-Nbのプロテアーゼ処理

MMを遊離させるために（図4Cを参照されたい）、単一アンカー及び二重アンカー型のBC2T-Nb分子を、ウロキナーゼ型プラスミノゲン活性化因子（uPA）などの組み換えヒトプロテアーゼを用いて37℃で一晩処理した。完全なプロテアーゼ処理及びジスルフィド結合の分析を、還元及び非還元SDS-PAGEによって試験した。タンパク質アリコート（2μg）をサンプルバッファー（必要に応じて還元剤を添加）中、75℃で10分間変性させ、MOPSバッファー中で4～12% NuPAGE（商標）ビストリスゲル（Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, カタログ番号NP0321）で、175Vで1時間分離し、InstantBlue（商標）で1時間染色した後、水中で少なくとも4時間脱染して可視化した。

30

【0278】

プロテアーゼ処理の前後で、タンパク質は還元ゲル上で単量体であり、予測された分子量であることを確認した（図8、下パネル）。プロテアーゼ処理前の非還元ゲルでは、操作されたジスルフィド結合が形成されていることを確認しており（図8、上部パネル、レーン4、6、8）、プロテアーゼ処理後は、タンパク質は単一アンカーマスク分子と同じレベルで流動している（図8、上部パネル、レーン2、5、7、9）。プロテアーゼ処理した二重アンカー型マスクタンパク質の非還元ゲルと還元ゲルとでの移動を比較することにより、操作されたジスルフィド結合が形成されたことを確認した。

40

【0279】

実施例6：二量体二重アンカー型高分子の生産

この実施例では、例示的な二量体二重アンカー型活性化可能な抗体の生産を示す。二重アンカー型の活性化可能な分子は、ベータカテニンに結合できる2つのナノボディ（Nb）

50

、それぞれがNbと結合した2つのFcを含むFc二量体、及びNbのエピトープであるベータカテニンの配列を含む2つのMM（この例示的な例ではBC2T）を含む。各MMはNbを用いた二重アンカー型であり、つまりMMとNbとはCMを介して結合し、ジスルフィド結合によってもテザリングされている（図5A）。

【0280】

二量体二重アンカー型BC2T-Nbを組み換え法によって調製した。ProC1285（HC699）（配列番号9）は、N末端からC末端にかけて、SP5由来のシグナルペプチド（配列番号12）、3番目のアミノ酸がシステインに変異したリーダー配列（配列番号22）、BC2T MM（配列番号14）、GSリンカー（配列番号15）、CM（配列番号16）、GSリンカー（配列番号18）、1つのアミノ酸がシステインに変異したNb（配列番号24）、GGGGリンカー（配列番号27）、及びヒトIgG1 Fc（配列番号28）を含む。ポリペプチドは、配列番号9のポリペプチド配列をコードするポリヌクレオチドで宿主細胞を形質転換し、得られた組み換え宿主細胞を培養し、標準的なIMAC法及びSEC法を使用して発現したタンパク質を精製することによって調製した。得られたタンパク質（ProC1285）は二量体である（図5Aに示す）。

10

【0281】

ProC1287（HC701）（配列番号11）は、N末端からC末端にかけて、SP5からのシグナルペプチド（配列番号12）、リーダー配列（配列番号13）、2番目のアミノ酸がシステインに変異したBC2T MM（配列番号23）、GSリンカー（配列番号15）、CM（配列番号16）、GSリンカー（配列番号18）、1つのアミノ酸がシステインに変異したNb（配列番号26）、GGGGリンカー（配列番号27）、及びヒトIgG1 Fc（配列番号28）を含む。ポリペプチドは、配列番号11のポリペプチド配列をコードするポリヌクレオチドで宿主細胞を形質転換し、得られた組み換え宿主細胞を培養し、標準的なIMAC法及びSEC法を使用して発現したタンパク質を精製することによって調製した。得られたタンパク質（ProC1287）は二量体である（図5Aに示す）。

20

【0282】

単一アンカー型BC2T-Nb-IgG1（すなわち、MMとNbとはジスルフィド結合によってテザリングされていない、図5Bに示す）も、組み換え法によって調製した。ProC1284（HC698）（配列番号8）は、N末端からC末端にかけて、SP5からのシグナルペプチド（配列番号12）、リーダー配列（配列番号13）、BC2T MM（配列番号14）、GSリンカー（配列番号15）、CM（配列番号16）、別のGSリンカー（配列番号18）、Nb（配列番号19）、GGGGリンカー（配列番号27）、及びヒトIgG1 Fc（配列番号28）を含む。ポリペプチドは、配列番号8のポリペプチド配列をコードするポリヌクレオチドで宿主細胞を形質転換し、得られた組み換え宿主細胞を培養し、標準的なIMAC法及びSEC法を使用して発現したタンパク質を精製することによって調製した。得られたタンパク質（ProC1284）は二量体である。

30

【0283】

実施例7：実施例6の二量体二重アンカー型BC2T-Nbのプロテアーゼ処理

40

実施例6の分子中のMMを遊離させるために、図5Cに概略的に示すように、単一アンカー及び二重アンカー型のBC2T-Nb分子を、ウロキナーゼ型プラスミノゲン活性化因子（uPA）などの組み換えヒトプロテアーゼとともに37℃で一晩処理した。完全なプロテアーゼ処理及びジスルフィド結合の分析を、還元及び非還元SDS-PAGEによって試験した。タンパク質アリコート（2μg）をサンプルバッファー（必要に応じて還元剤を添加）中、75℃で10分間変性させ、MOPSバッファー中で4～12% NuPAGE（商標）ビストリスゲル（Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, カタログ番号NP0321）で、175Vで1時間分離し、Instant Blue（商標）で1時間染色した後、水中で少なくとも4時間脱染して可視化した。

50

【0284】

プロテアーゼ処理の前後で、タンパク質は還元ゲル上で予測された分子量の単量体であることを確認し、それぞれ約19 kDa及び約16 kDaであった（図9、下パネル）。プロテアーゼ処理前の非還元ゲルでは、操作されたジスルフィド結合が形成されていることを確認しており（図9、上部パネル、レーン4、6、及び8）、プロテアーゼ処理後は、タンパク質は単一アンカーマスク分子と同じレベルで流動している（図9、上部パネル、レーン2、5、7、9）。プロテアーゼ処理した二重アンカー型マスクタンパク質の非還元ゲルと還元ゲルとの移動を比較することにより、操作されたジスルフィド結合が形成されたことを確認した。

【0285】

実施例8：ペプチド結合ELISA

BC2TペプチドをELIM Bioharmaceuticalsで合成した。ペプチド配列は、N末端からC末端にかけて、リーダー配列（配列番号13）とBC2T MM（配列番号14）を含む。

【0286】

0.05 Mの炭酸-重炭酸バッファーに溶解した5 μ MのBC2Tペプチドを、96ウェルマイクロタイタープレートのウェルに4℃で一晩吸着させた。プレートを洗浄し、ブロッキングバッファー（1X PBS、pH 7.4、0.05% Tween（登録商標）-20、1% BSA）でブロックした。プロテアーゼ処理の有無にかかわらず、二量体二重アンカー型マスク分子（ProC1285及びProC1287）とマスクされていないコントロールタンパク質（ProC1283）、及び二量体単一アンカー型BC2T-Nb（ProC1284）の3倍連続希釈液を作製し、ペプチドコーティングプレートに適用した。ペプチドに結合したタンパク質の程度を、抗ヒトIgG免疫検出によって測定した。A450吸光度をプレートリーダーで測定した。Graph Pad Prismソフトウェアを用いたシグモイドフィット非線形回帰によって、用量反応曲線を作成し、EC50値を得た。結果を図10に示す。図10に示すように、二量体二重アンカー型マスク分子（ProC1285及びProC1287）は、比較対象となる二量体単一アンカー型BC2T-Nb（ProC1284）と比較して、はるかに高いマスキングを示し、また、陽性コントロールProC1283（マスクされていない抗体）が示した回復と比較して、切断時の結合活性の回復度が驚くほど高いことも示した。したがって、切断後に一端がマスクにテザリングされているにもかかわらず、抗体は、実質的な結合活性の回復を示した。

【0287】

実施例9：ジスルフィドベースの二重アンカー型マスク化抗体の設計：

この実施例では、活性化可能な抗PDL1抗体を例として用いて、プロドメイン（マスクペプチドのN末端）内の残基と抗体可変ドメイン内の残基との間に、システイン-ジスルフィド結合などの非アルファ炭素結合を操作する方法を説明する。活性化可能な抗PDL1抗体の配列（配列番号562及び563）は、標準的な抗体の軽鎖に接続されたプロドメインからなる。抗体の一次配列は、Discovery Studioなどのソフトウェアを使用して、抗体の相同性ベースの三次元モデルを生成するように使用した（図12A～図12B）。プロドメインからのマスク配列を使用して、マスクの相同性ベースのモデルを生成し、抗体の構造にドッキングさせた（図12A～図12B）。図12Aは、Dassault SystemsソフトウェアのBIOVIA Discovery Studioを使用して得られた活性化可能な抗PDL1抗体の三次元構造を示しており、マスク部分のヘッダー領域またはN末端の残基から2～5オングストローム以内の溶媒にアクセス可能な残基を示している。図12Bは、活性化可能な抗PDL1抗体のFabドメイン（空間充填形式）とマスク部分（C α バックボーンとして示される）を備えたプロドメインとの間の界面を示す。

【0288】

構造モデルを確認するために、突然変異誘発、水素重水素交換（HDX）、及びXL-

10

20

30

40

50

MS（クロスリンカーMS）などの様々な実験技術を任意選択で使用できる。TBに結合したMMの三次元モデルを取得した後、エネルギー最小化アルゴリズムを使用して、プロドメインのヘッダー領域及びリンカー領域（CMを含む）の位置に関する情報を提供する。次に、ユーザは、BIOVIA Discovery Studioなどのソフトウェアを使用して、残基のペア（1つはプロドメインのヘッダー領域にあり、もう1つは抗体可変ドメインにあり、そのC α 原子が標準的なジスルフィド結合システインの3～7.5 Åの範囲（つまり、第1のアミノ酸のC α と第2のアミノ酸のC α との間の距離）内にある）を特定できる。SSBondPreなどのソフトウェアアプリケーションを使用すると、このリストを、設計されたジスルフィド結合を形成する可能性が高い残基のより小さなリストに絞り込むことができる。次に、残基を個別に、及びペアでシステイン残基に変異させて、個別には抗体またはマスクの結合に影響を与えないが、一緒に存在するとジスルフィド結合を形成し、マスキングを改善する残基のペアを特定する。正しく形成されたジスルフィドの存在は、ジスルフィドマッピングなどの質量分析技法によって確認することができる。

10

【0289】

実施例10：ジスルフィドベースの二重アンカー型マスク化抗体または他のTBの設計：

この実施例では、プロドメイン（マスクペプチドのN末端）の残基と抗体可変ドメインの残基との間のシステイン-ジスルフィド結合などの非アルファ炭素結合を操作するために、抗体構造の相同性ベースの三次元モデルを調製して使用方法のさらなる例を示す。

20

【0290】

BIOVIA Discovery Studioを使用して、J43v2／抗マウスPD1（図13A、配列番号568～569）、抗CD166（図13B、配列番号572～573）、及びヒト抗PD1（図13C、配列番号570～571）の配列に対応する抗体構造の相同性ベースの三次元モデルを作成した。抗PD1ヒト抗PD1（配列番号570～571）は、図13Dに示すように、AlphaFold2でさらにモデル化され、BIOVIA Discovery Studioでレンダリングした。

【0291】

構造モデルを確認するために、突然変異誘発、水素重水素交換（HDX）、XL-MS（クロスリンカーMS）などの様々な実験技術を任意選択で使用できる。モデル化されたヒト抗PD1のMMはWO2017／011580に開示されており、モデル化された抗CD166のMMはWO2016／179285に開示されており、どちらも参照により本明細書に組み込まれる。それぞれのTBに結合したそれぞれのMMの三次元モデルを取得し、BIOVIA Discovery Studioなどのソフトウェアを使用して、残基のペア（1つはプロドメインのヘッダー領域にあり、もう1つは抗体可変ドメインにあり、そのC α 原子が3～7.5 Åの範囲（つまり、第1のアミノ酸のC α と第2のアミノ酸のC α との間の距離）内にある）を特定できる。SSBondPreなどのソフトウェアアプリケーションを使用すると、このリストを、所望の結合を形成する可能性が高い残基のより小さなリストに絞り込むことができる。次に、残基を個別に、及びペアで、所望の結合を形成するために所望の残基に変異させ、個々には抗体またはマスクの結合に影響を与えないが、一緒に存在すると、本明細書に記載のようにマスキングを改善する結合を形成する残基のペアを特定する。正しく形成された結合（例えばジスルフィド結合）の存在を、ジスルフィドマッピングなどの質量分析技法によって確認することができる。

30

40

【0292】

実施例における分子の配列を以下の表4に列挙する。

50

【表 4 - 1】

表 4

配列 番号	名称/注釈	配列
1	ProC649/PP073 ナノボディ(His タグ付き)	QVQLVESGGGLVQPGGSLTLSTASGFTLDHYDIGWFRQAPGKEREGVSCINN SDDDTYYADSVKGRFTIFMNNAKDTVYLMNSLKPEDTAIYYCAEARGCKRGR YEYDFWGQGTQVTVSSGGSHHHHHHHHHH
2	ProC653/PP077 BC2 タグ-1490DNI- ナノボディ	QQQSGQPDRKAAVSHWQQGGGSSGGSISSGLLSGRSDNIGGGSQVQLVESGGG LVQPGGSLTLSTASGFTLDHYDIGWFRQAPGKEREGVSCINNSDDDTYYADS VKGRFTIFMNNAKDTVYLMNSLKPEDTAIYYCAEARGCKRGRYEYDFWGQGT QVTVSSGGSHHHHHHHHHH
3	ProC654/PP078 BC2 タグ-PLGLAG- ナノボディ	QQQSGQPDRKAAVSHWQQGGGSSGGSPGLLAGGGGSQVQLVESGGGLVQPGGG LTLSTASGFTLDHYDIGWFRQAPGKEREGVSCINNSDDDTYYADSVKGRFTI FMNNAKDTVYLMNSLKPEDTAIYYCAEARGCKRGRYEYDFWGQGTQVTVSSG GSHHHHHHHHHH
4	ProC994/ PP123 Q3C Q157C BC2 タ グ-1490DNI-ナノボ ディ	QGC SGQPDRKAAVSHWQQGGGSSGGSISSGLLSGRSDNIGGGSQVQLVESGGG LVQPGGSLTLSTASGFTLDHYDIGWFRQAPGKEREGVSCINNSDDDTYYADS VKGRFTIFMNNAKDTVYLMNSLKPEDTAIYYCAEARGCKRGRYEYDFWGCGT QVTVSSGGSHHHHHHHHHH
5	ProC995/PP124 Q3C W155C BC2 タ グ-1490DNI-ナノボ ディ	QGC SGQPDRKAAVSHWQQGGGSSGGSISSGLLSGRSDNIGGGSQVQLVESGGG LVQPGGSLTLSTASGFTLDHYDIGWFRQAPGKEREGVSCINNSDDDTYYADS VKGRFTIFMNNAKDTVYLMNSLKPEDTAIYYCAEARGCKRGRYEYDFCGQGT QVTVSSGGSHHHHHHHHHH
6	ProC996/PP125 D8C F154C BC2 タ グ-1490DNI-ナノボ ディ	QQQSGQPCRKAAVSHWQQGGGSSGGSISSGLLSGRSDNIGGGSQVQLVESGGG LVQPGGSLTLSTASGFTLDHYDIGWFRQAPGKEREGVSCINNSDDDTYYADS VKGRFTIFMNNAKDTVYLMNSLKPEDTAIYYCAEARGCKRGRYEYDCWGQGT QVTVSSGGSHHHHHHHHHH

10

20

30

40

50

【表 4 - 2】

7	ProC1283/HC697 ナ ノボディ-IgG1	QVQLVESGGGLVQPGGSLTLSTASGFTLDHYDIGWFRQAPGKEREGVSCINN SDDDTYYADSVKGRFTIFMNNAKDTVYLQMNSLKPEDTAIYYCAEARGCKRGR YEYDFWGQGTQVTVSSGGGGDKHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
8	ProC1284/HC698 BC2 タグ-1490DNI- ナノボディ-IgG1	QGQSGQPDRKAAVSHWQQGGGSSGGSISSGLLSGRSDNIGGGSQVQLVESGGG LVQPGGSLTLSTASGFTLDHYDIGWFRQAPGKEREGVSCINN SDDDTYYADS VKGRFTIFMNNAKDTVYLQMNSLKPEDTAIYYCAEARGCKRGRYEYDFWGQGT QVTVSSGGGGDKHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
9	ProC1285/HC699 Q3C Q157C BC2 タ グ-1490DNI-Nb- IgG1	QGC SGQPDRKAAVSHWQQGGGSSGGSISSGLLSGRSDNIGGGSQVQLVESGGG LVQPGGSLTLSTASGFTLDHYDIGWFRQAPGKEREGVSCINN SDDDTYYADS VKGRFTIFMNNAKDTVYLQMNSLKPEDTAIYYCAEARGCKRGRYEYDFWGCGT QVTVSSGGGGDKHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

10

20

30

40

50

【表 4 - 3】

10	ProC1286/HC700 Q3C W155C BC2 タ グ-1490DNI-Nb- IgG1	QGCSSGQPDRAAVSHWQQGGSSGGSISSGLLSGRSDNIGGGSQVQLVESGGG LVQPGGSLTLSTASGFTLDHYDIGWFRQAPGKEREGVSCINNSDDDTYYADS VKGRFTIFMNAKDTVYLQMNSLKPEDTAIYYCAEARGCKRGRYEYDFCGQGT QVTVSSGGGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
11	ProC1287/HC701 D8C F154C BC2 タ グ-1490DNI-Nb- IgG1	QGCSSGQPCRKAASVSHWQQGGSSGGSISSGLLSGRSDNIGGGSQVQLVESGGG LVQPGGSLTLSTASGFTLDHYDIGWFRQAPGKEREGVSCINNSDDDTYYADS VKGRFTIFMNAKDTVYLQMNSLKPEDTAIYYCAEARGCKRGRYEYDCWQGT QVTVSSGGGDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
12	SP5 シグナルペプ チド	MRWIFFLLCLAGRALA
13	ヘッダー配列	QGCSSGQ
14	BC2T	PDRKAASVSHWQQ
15	リンカー 1	GGSSGGS
16	1490DNI	ISSGLLSGRSDNI
17	MMP-切断可能な部 分	PLGLAG
18	リンカー2	GGGS
19	ナノボディ	QVQLVESGGGLVQPGGSLTLSTASGFTLDHYDIGWFRQAPGKEREGVSCINN SDDDTYYADSVKGRFTIFMNAKDTVYLQMNSLKPEDTAIYYCAEARGCKRGR YEYDFWQGQTQVIVSS
	リンカー3	GGG
21	His タグ	HHHHHHHHHH
22	Q3C	QGCSSGQ

10

20

30

40

50

【表 4 - 4】

23	D8C	PCRKA AVSHWQQ
24	Q157C ナノボディ	QVQLVESGGGLVQPGGSLTLSTASGFTLDHYDIGWFRQAPGKEREGVSCINN SDDDTYYADSVKGRFTIFMNNAKDTVYLMNSLKPEDTAIYYCAEARGCKRGR YEYDFWCGGTQVTVSS
25	W155C ナノボディ	QVQLVESGGGLVQPGGSLTLSTASGFTLDHYDIGWFRQAPGKEREGVSCINN SDDDTYYADSVKGRFTIFMNNAKDTVYLMNSLKPEDTAIYYCAEARGCKRGR YEYDFCGGTQVTVSS
26	F154C ナノボディ	QVQLVESGGGLVQPGGSLTLSTASGFTLDHYDIGWFRQAPGKEREGVSCINN SDDDTYYADSVKGRFTIFMNNAKDTVYLMNSLKPEDTAIYYCAEARGCKRGR YEYDCWGGGTQVTVSS
27	リンカー4	GGGG
28	ヒト IgG1 Fc	DKTHTCPPCPAPELLGGSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMEAL HNHYTQKSLSLSPGK
29	ProC650/PP074 BC2 タグ-10mr-ナ ノボディ	GGSPDRKA AVSHWQQGGGGSGGGSGVQLVESGGGLVQPGGSLTLSTASGFT LDHYDIGWFRQAPGKEREGVSCINNSDDDTYYADSVKGRFTIFMNNAKDTVYL QMNSLKPEDTAIYYCAEARGCKRGRYEYDFWCGGTQVTVSSGGSHHHHHHHH H
30	ProC651/PP075 BC2 タグ-15mr-ナ ノボディ	GGSPDRKA AVSHWQQGGGGSGGGSGGGSGVQLVESGGGLVQPGGSLTLST ASGFTLDHYDIGWFRQAPGKEREGVSCINNSDDDTYYADSVKGRFTIFMNNAK DTVYLMNSLKPEDTAIYYCAEARGCKRGRYEYDFWCGGTQVTVSSGGSHHHH HHHHHH
31	ProC652/PP076 BC2 タグ-20mr-ナ ノボディ	GGSPDRKA AVSHWQQGGGGSGGGSGGGSGGGSGVQLVESGGGLVQPGGSL TLSTASGFTLDHYDIGWFRQAPGKEREGVSCINNSDDDTYYADSVKGRFTIF MNNAKDTVYLMNSLKPEDTAIYYCAEARGCKRGRYEYDFWCGGTQVTVSSGG SHHHHHHHHHH

10

20

30

40

50

【表 4 - 5】

562	重鎖(活性化可能な抗 PDL1 抗体)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWYSSIWRNGIVT VYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKWSAAFDYWGQGLTVTVSS ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSVVTPSSSLGTKTYTCNV DHKPSNTKVDKRVESKYGPCCPAPAEFLG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLP PSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRL TVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSL SLG
563	活性化可能な抗 PDL1 抗体(マスク+基質+抗 PDL1 抗体軽鎖及び重鎖)	QQQSGSGIALCPSHFCQLPQTGGGSSGGSGSGGSSGLLSGRSDNHGGSIDIQMTQSP SSLSASVGDRVTTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFGSGG SGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQDNGYPSTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQ LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSTYLSSTLTLS KADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
564	抗 PDL1 抗体軽鎖	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGV PSRFGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQDNGYPSTFGGGTKVEIKRTVAAPSVF IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSTY LSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
565	活性化可能な抗 PDL1 抗体マスク	GIALCPSHFCQLPQT
79	活性化可能な抗 PDL1 抗体 CM	ISSGLLSGRSDNH
566	活性化可能な抗 PDL1 抗体スペーサー	QQQSGS
568	J43v2 マウス抗 PDL1 抗体軽鎖	YELTQPPSASVNVGETVKITCSGDQLPKYFADWFHQSDQITILQVIYDDNKRPSGIPE RISGSSSGTTATLTIRDVRAEDEGDYICFSGYVDSKLYVFGSGTQLTVLGGPKSSP KVTVPFPPSPEELRTNKATLVCLVNDFYPGSATVTWKANGATINDGVKTTKPSKQQQNY MTSSYLSLTADQWKSHNRVSCQVTHEGETVEKSLSPAEC

10

20

30

40

50

【表 4 - 6】

569	J43v2 マウス抗 PDL1 抗体重鎖	EVRLLESGGGLVKPEGSLKLSCLVASGFTTFSDYFMSWVRQAPGKGLEWVAHIYTKS YNYATYYSGSVKGRFTISRDDSRSMVYLQMNLRTEDTATYYCTRDGSGYPSLDF WGQGTQVTVSSAKTTAPSVYPLAPVCGDITGSSSVTLGCLVKGYFPEPVTLTWNSG SLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVTSSTWPSQITCNVAHPASSTKVDDKI
570	ヒト抗 PD1 軽鎖	DIQLTQSPSSLASVGDRTITCRASESVDAYGISFMNWFQKPGKAPKLLIYAA SNQGSVPSPRFSGSGSGTDFTLTISSMQPEDFATYYCQSKDVPWTFGQGTLEI KRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE SVTEQDSKSDSTYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
571	ヒト抗 PD1 重鎖	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTTFSGYAMSWVRQAPGKGLEWVAIYISNSG GNAHYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTREDYGTSPFVYWG QGTLLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTITYTCNVDHKPSNTKVDDKRV
572	ヒトアルファ CD166 重鎖	QITLKESGPTLVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTYGMGVGWIRQPPGKALEWLANIWW SEDKHYSPSLKSRLTITKDTSKNQVVLTIITNVPVDTATYYCVQIDYGNDYAFTY WGQGTLLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSKVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTITYICNVNHPKPSNTKVDDKVE PKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYCKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHY TQKSLSLSPG
573	ヒトアルファ CD166 軽鎖	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSKSLHSNGITYLYWYLQKPGQSPQLLIYQ MSNLASGVPRDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGYYCAQNLLEPYTFGGQGTKE IKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ ESVTEQDSKSDSTYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

10

20

30

【0293】

他の実施形態

本発明を上記の発明を実施するための形態に関連して説明してきたが、前述の説明は例示を意図しており、本発明の範囲を限定するものではなく、本発明の範囲は、添付の特許請求の範囲によって定義されることを理解されたい。他の態様、利点及び修正は、以下の特許請求の範囲に含まれる。

【0294】

本明細書で言及される全ての刊行物、特許出願、特許、及び他の参考文献は、参照によりその全体が援用される。矛盾する場合には、定義を含めて本明細書が優先する。加えて、セクションの見出し、材料、方法、及び例は例示的なものにすぎず、限定するものであることは意図されない。

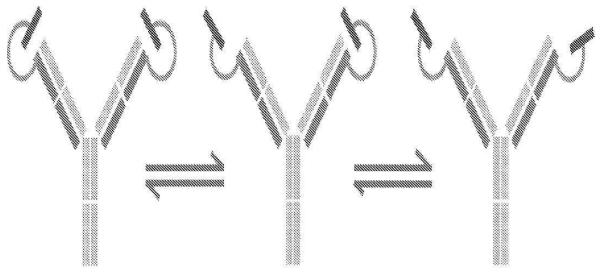
40

50

【図面】

【図 1 A】

【図 1 A】



【図 1 B】

【図 1 B】

MM-CM-AB

AB-CM-MM

MM-L-CM-AB

AB-L-CM-MM

MM-CM-L-AB

AB-CM-L-MM

MM-L-CM-L-AB

AB-L-CM-L-MM

10

20

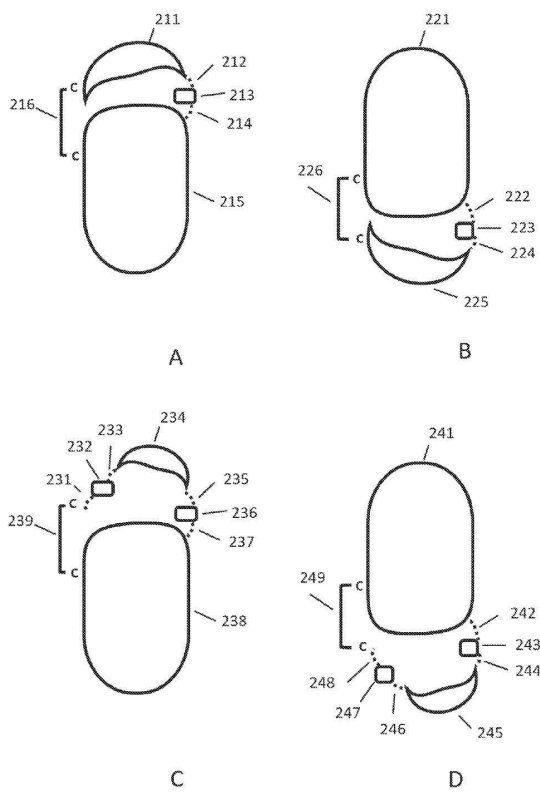
30

40

50

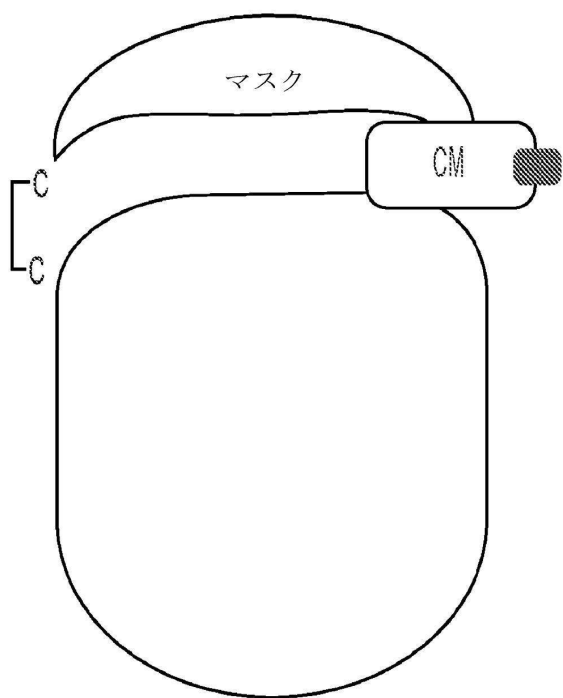
【図 2】

【図 2】



【図 3 A】

【図 3 A】

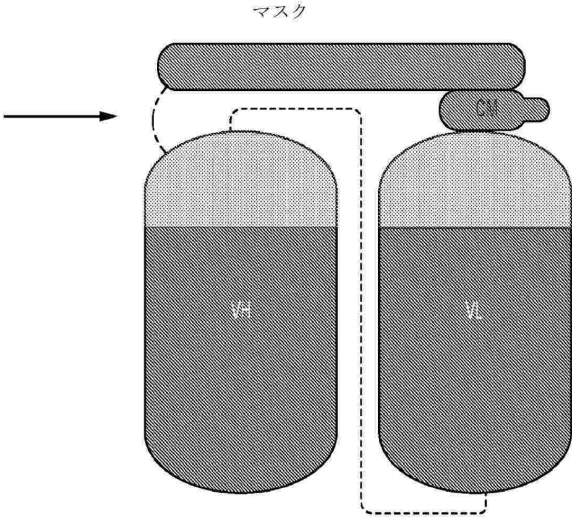


10

20

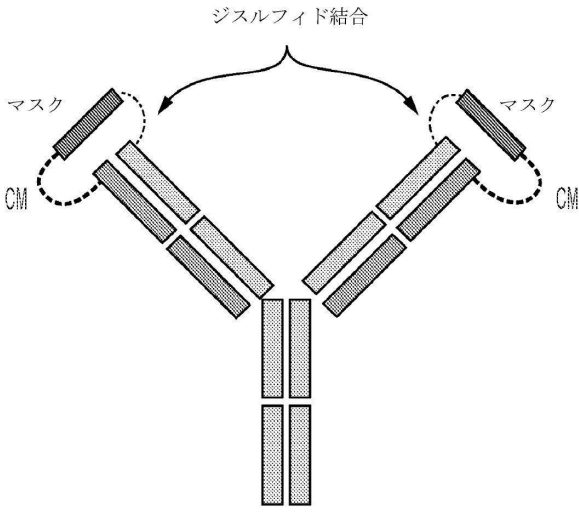
【図 3 B】

【図 3 B】



【図 3 C】

【図 3 C】



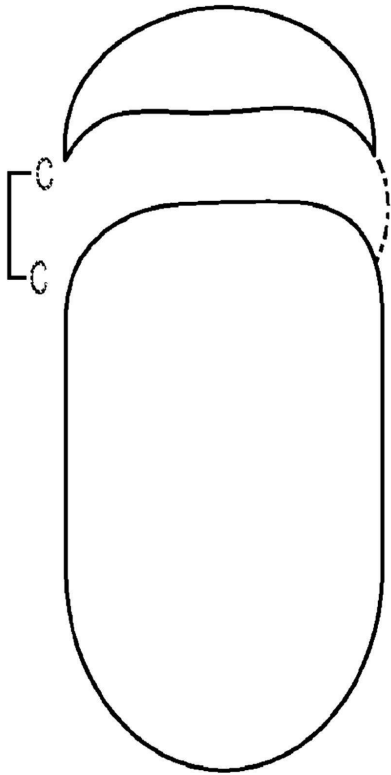
30

40

50

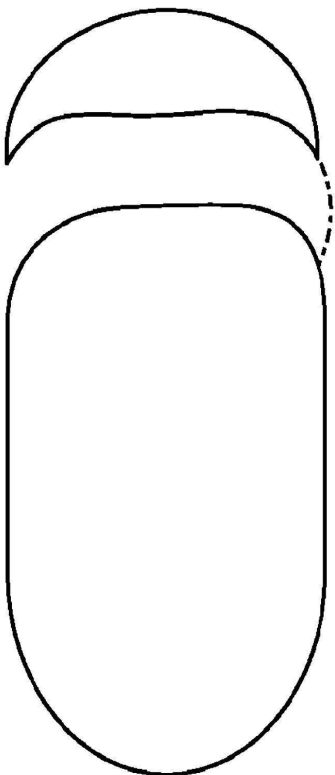
【図 4 A】

【図 4 A】



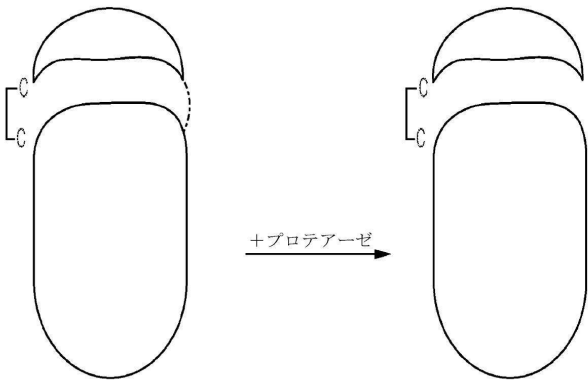
【図 4 B】

【図 4 B】



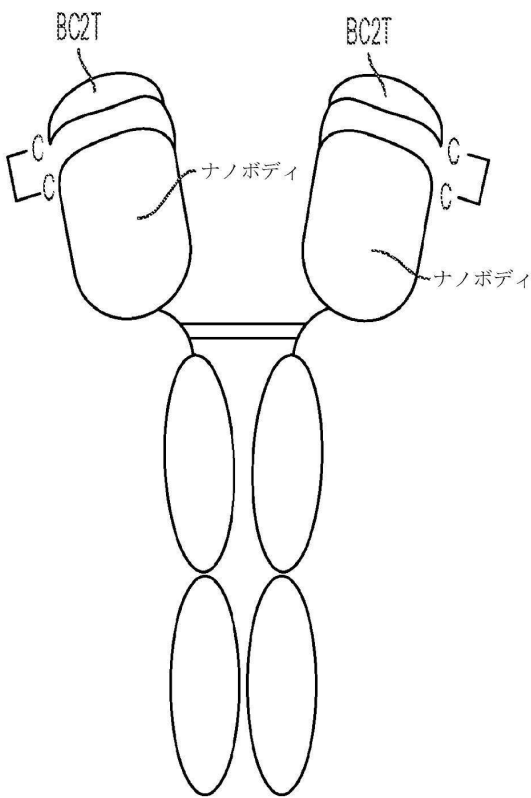
【図 4 C】

【図 4 C】



【図 5 A】

【図 5 A】



10

20

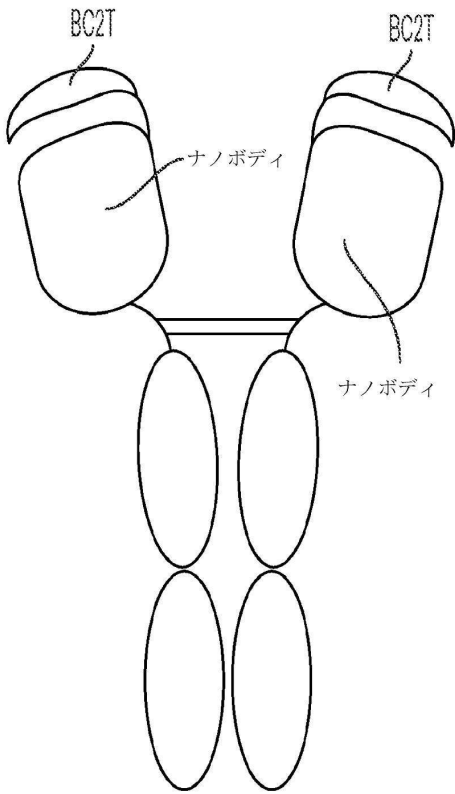
30

40

50

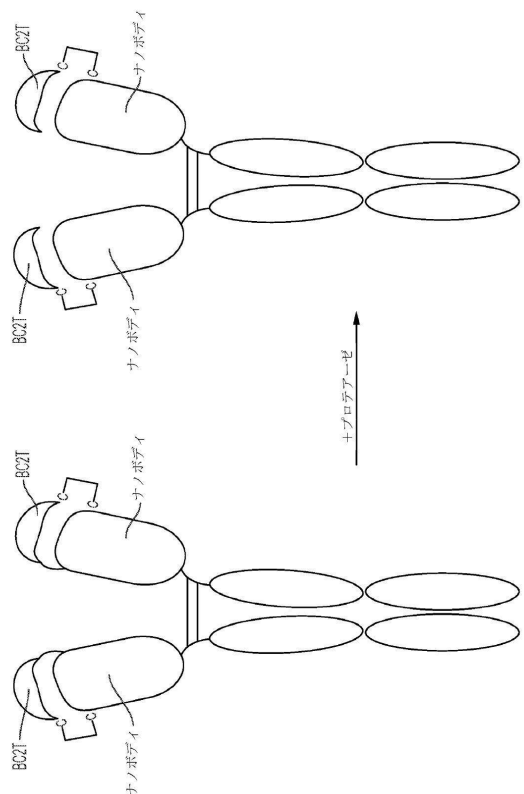
【図 5 B】

【図 5 B】



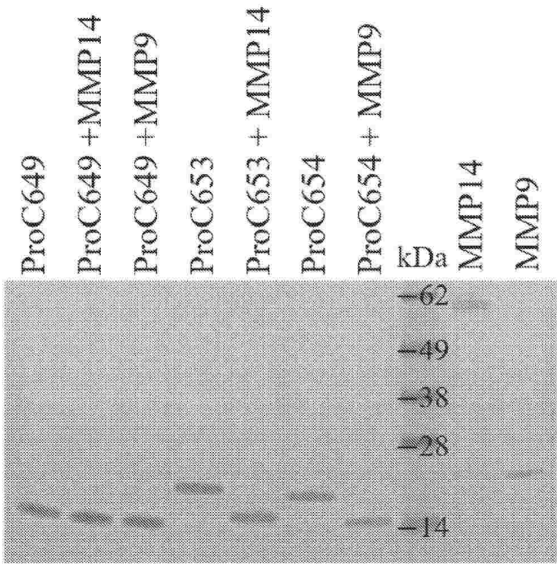
【図 5 C】

【図 5 C】



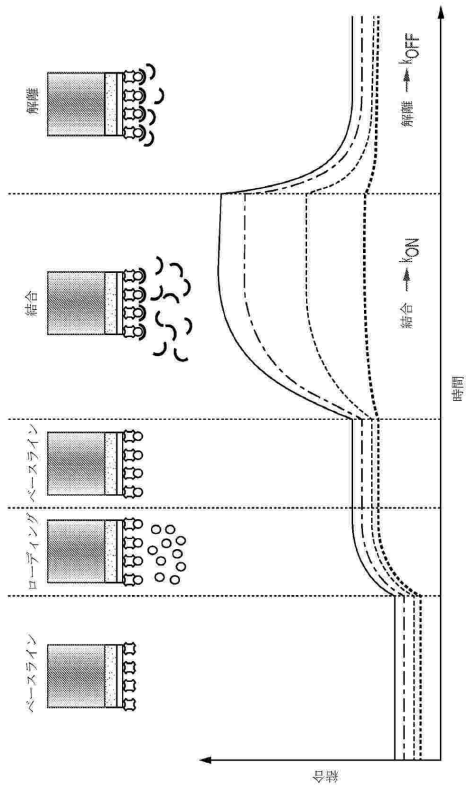
【図 6】

【図 6】



【図 7 - 1】

【図 7 - 1】



10

20

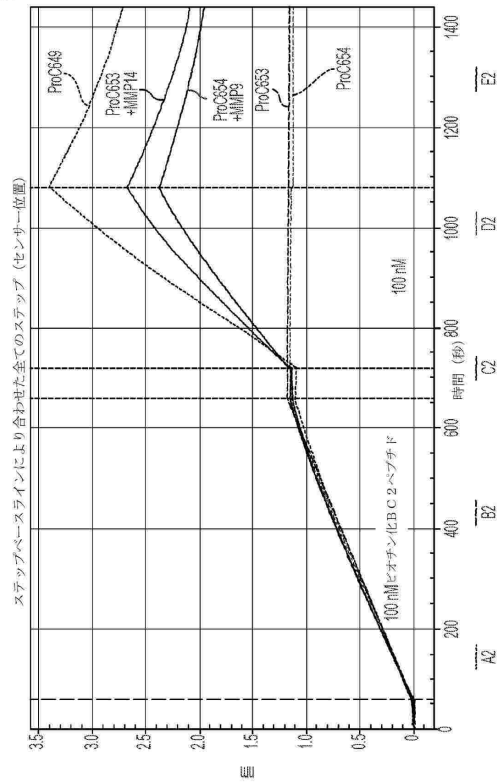
30

40

50

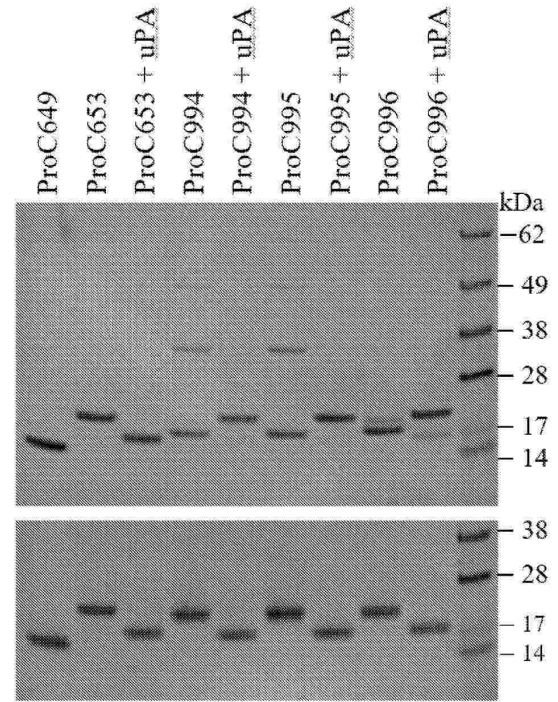
【図 7 - 2】

【図 7 - 2】
(続き)



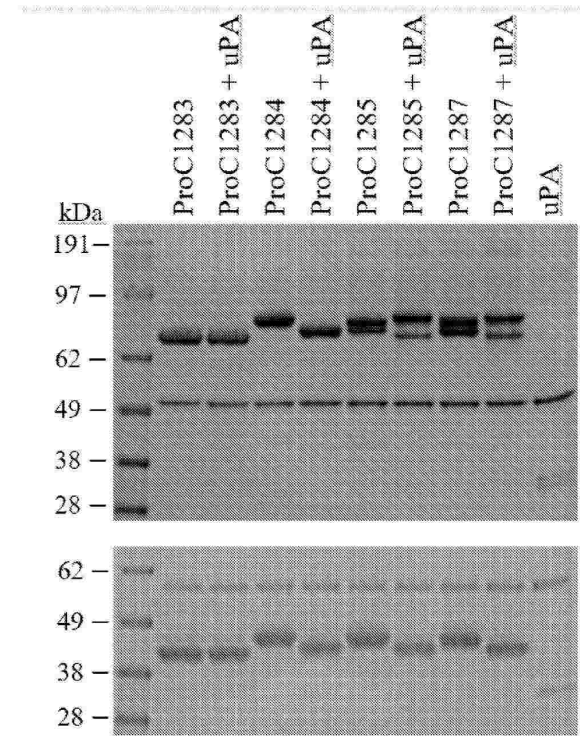
【図 8】

【図 8】



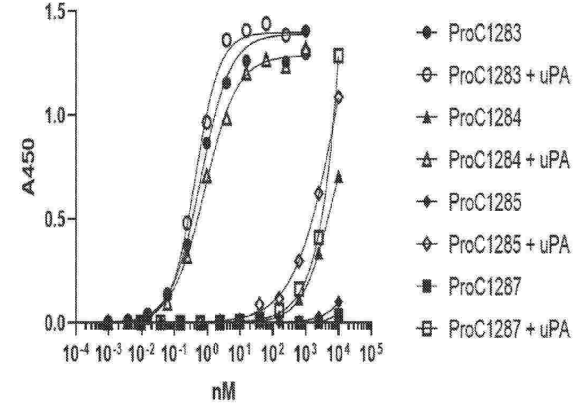
【図 9】

【図 9】



【図 10】

【図 10】



コンストラクト	EC50 (nM)	ME
ProC1283	0.6425	1
ProC1283+uPA	0.4365	1
ProC1284	6176	9612
ProC1284+uPA	0.8538	1
ProC1285	N/A	
ProC1285+uPA	10764	16753
ProC1287	N/A	
ProC1287+uPA	N/A	>10000*

* 推定ME

10

20

30

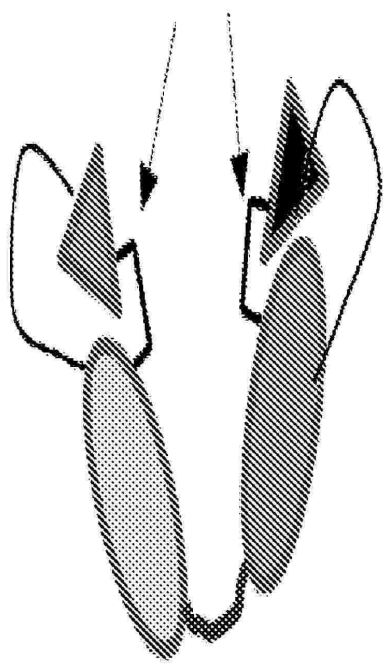
40

50

【図 1 1 A】

【図 1 1 A】

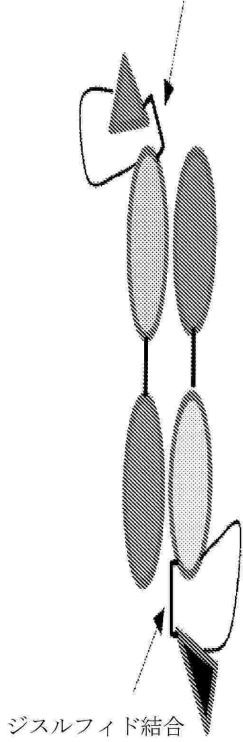
ジスルフィド結合



【図 1 1 B】

【図 1 1 B】

ジスルフィド結合



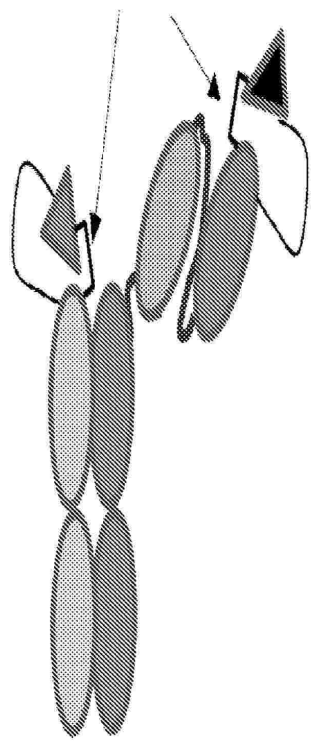
10

20

【図 1 1 C】

【図 1 1 C】

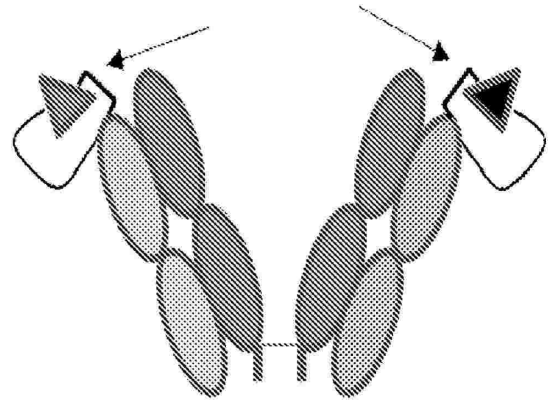
ジスルフィド結合



【図 1 1 D】

【図 1 1 D】

ジスルフィド結合



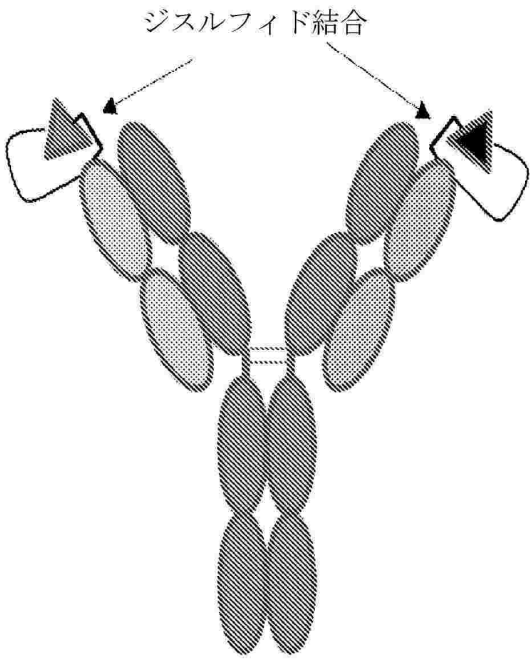
30

40

50

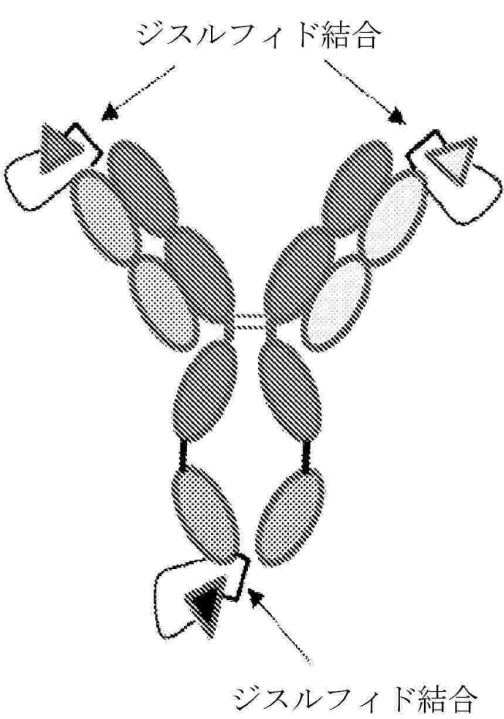
【図 1 1 E】

【図 1 1 E】



【図 1 1 F】

【図 1 1 F】

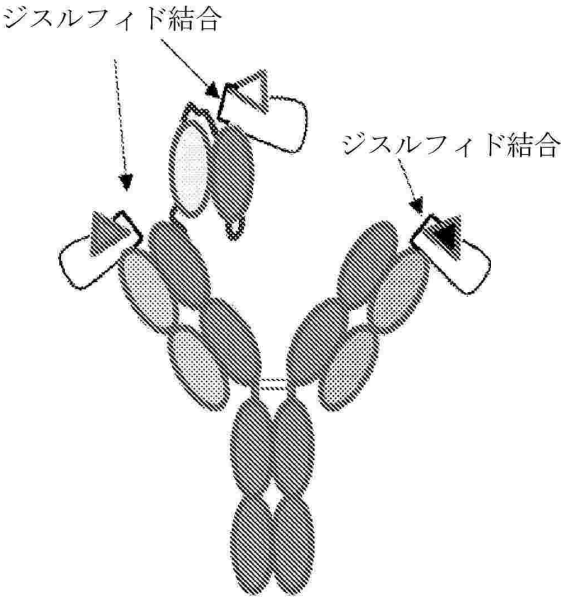


10

20

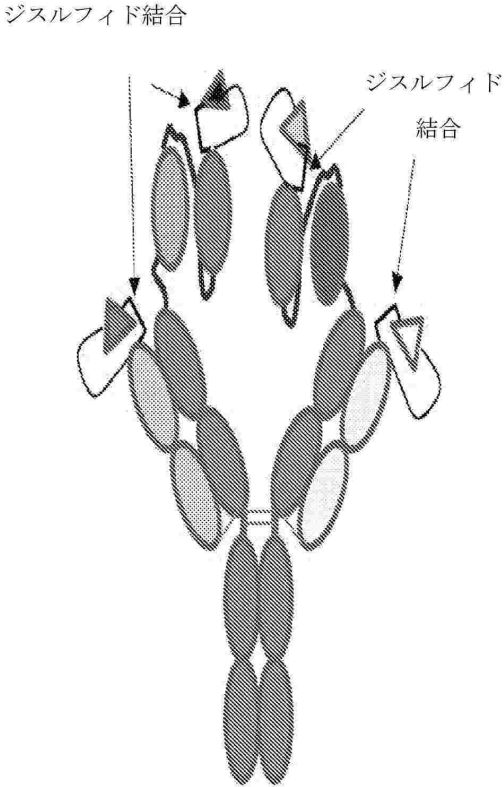
【図 1 1 G】

【図 1 1 G】



【図 1 1 H】

【図 1 1 H】



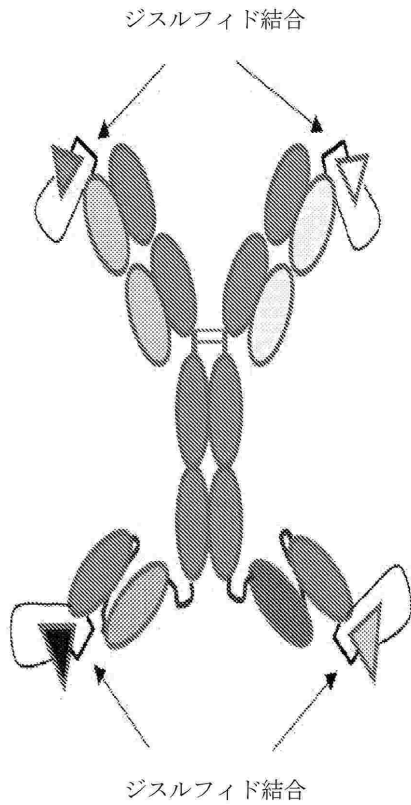
30

40

50

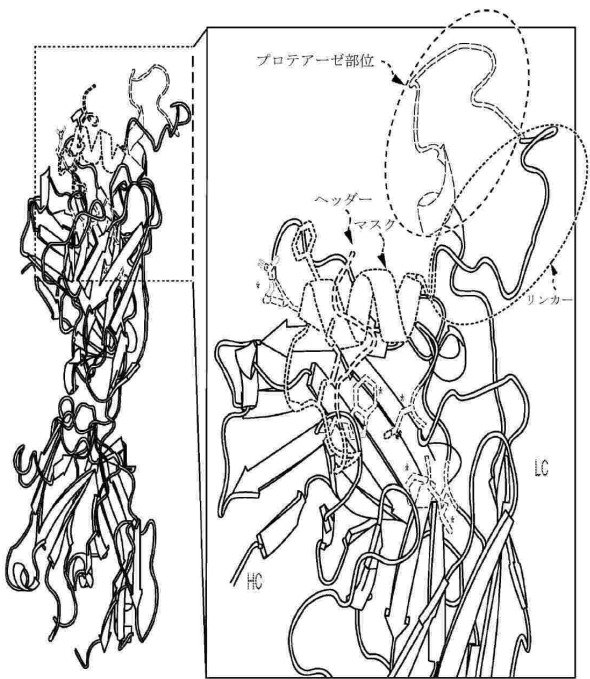
【図 1 1 I】

【図 1 1 I】



【図 1 2 A - 1】

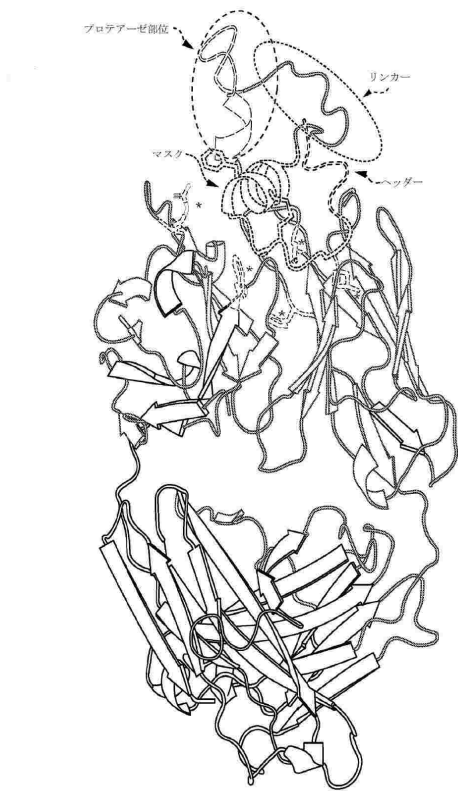
【図 1 2 A - 1】



【図 1 2 A - 2】

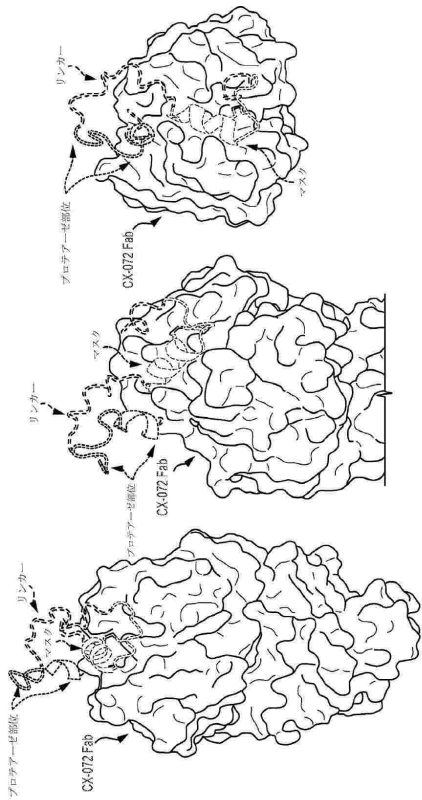
【図 1 2 A - 2】

(続き)



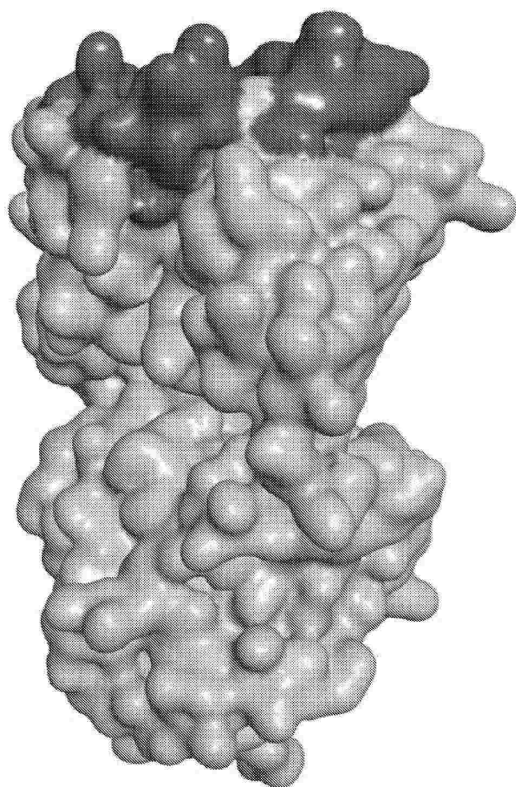
【図 1 2 B】

【図 1 2 B】



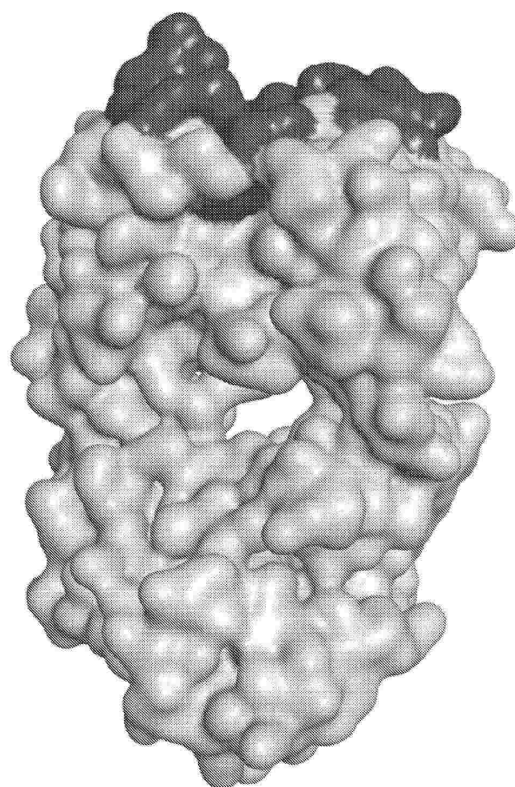
【図 13 A】

【図 13 A】



【図 13 B】

【図 13 B】

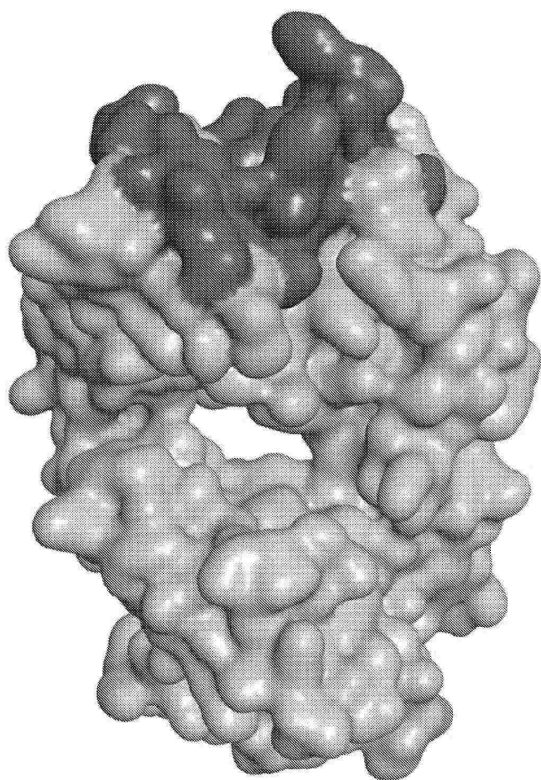


10

20

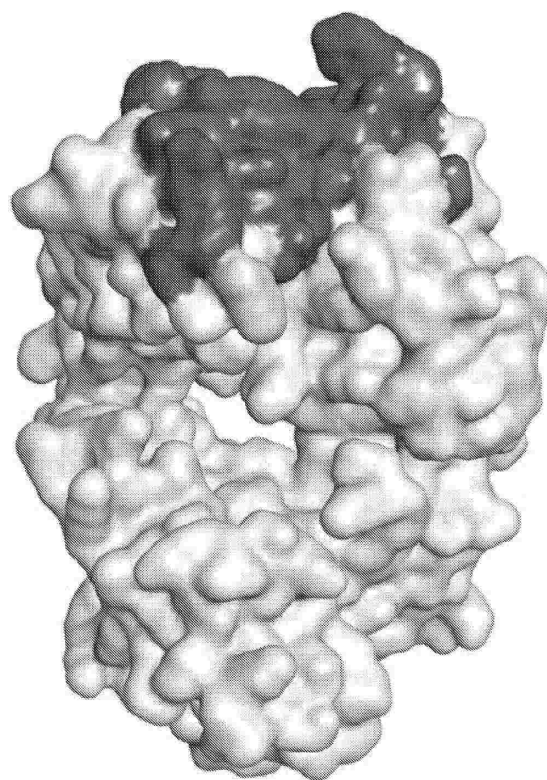
【図 13 C】

【図 13 C】



【図 13 D】

【図 13 D】



30

40

50

【配列表】

2025512798000001.xml

10

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2023/064937

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

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
- a. ☒ forming part of the international application as filed.
- b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)).
- ☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3. Additional comments:

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2023/064937

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C07K16/18 C07K16/28 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data, Sequence Search		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2013/309230 A1 (STAGLIANO NANCY E [US] ET AL) 21 November 2013 (2013-11-21) paragraphs [0007] - [0009], [0122], [0182], [0339]; figure 1 -----	1-60
A	WO 2015/066279 A2 (CYTOMX THERAPEUTICS INC [US]) 7 May 2015 (2015-05-07) paragraph [0144] -----	1-60
A	WO 2016/179003 A1 (GENENTECH INC [US]) 10 November 2016 (2016-11-10) sequences 428,432 ----- -/--	1-60
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 30 June 2023		Date of mailing of the international search report 11/07/2023
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5618 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Cilensek, Zoran

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2023/064937

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	LUCCHI ROBERTA ET AL: "The Masking Game: Design of Activatable Antibodies and Mimetics for Selective Therapeutics and Cell Control", ACS CENTRAL SCIENCE, vol. 7, no. 5, 26 April 2021 (2021-04-26), pages 724-738, XP055827094, ISSN: 2374-7943, DOI: 10.1021/acscentsci.0c01448 Retrieved from the Internet: URL:https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/acscentsci.0c01448> the whole document -----	1-60
A	WO 2014/081301 A1 (TAGWORKS PHARMACEUTICALS B V [NL]) 30 May 2014 (2014-05-30) the whole document -----	1-60

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2023/064937

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2013309230 A1	21-11-2013	AU 2010203353 A1	11-08-2011
		AU 2016225810 A1	22-09-2016
		AU 2018214147 A1	30-08-2018
		AU 2020203143 A1	04-06-2020
		BR PI1006141 A2	23-02-2016
		CA 2749339 A1	15-07-2010
		CN 102482347 A	30-05-2012
		CN 106995495 A	01-08-2017
		EP 2385955 A2	16-11-2011
		EP 3543256 A1	25-09-2019
		JP 5851842 B2	03-02-2016
		JP 6271476 B2	31-01-2018
		JP 6571730 B2	04-09-2019
		JP 6860601 B2	14-04-2021
		JP 7221259 B2	13-02-2023
		JP 2012514982 A	05-07-2012
		JP 2015193654 A	05-11-2015
		JP 2017200955 A	09-11-2017
		JP 2019077731 A	23-05-2019
		JP 2021004250 A	14-01-2021
		RU 2011133819 A	20-02-2013
		RU 2017136814 A	08-02-2019
		US 2010189651 A1	29-07-2010
		US 2012149061 A1	14-06-2012
		US 2012207756 A1	16-08-2012
		US 2013309230 A1	21-11-2013
		US 2014024810 A1	23-01-2014
		US 2016228546 A1	11-08-2016
		US 2017081397 A1	23-03-2017
		US 2019119370 A1	25-04-2019
		US 2021284721 A1	16-09-2021
		WO 2010081173 A2	15-07-2010
WO 2015066279 A2	07-05-2015	US 2015118254 A1	30-04-2015
		US 2017096489 A1	06-04-2017
		US 2020270350 A1	27-08-2020
		US 2022289853 A1	15-09-2022
		WO 2015066279 A2	07-05-2015
WO 2016179003 A1	10-11-2016	CN 107709363 A	16-02-2018
		EP 3288981 A1	07-03-2018
		EP 3778640 A1	17-02-2021
		HK 1250997 A1	18-01-2019
		HK 1252158 A1	17-05-2019
		JP 2018520642 A	02-08-2018
		JP 2022023031 A	07-02-2022
		US 2018057593 A1	01-03-2018
		WO 2016179003 A1	10-11-2016
WO 2014081301 A1	30-05-2014	US 2015297741 A1	22-10-2015
		WO 2014081301 A1	30-05-2014

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

テーマコード (参考)

C 1 2 N 15/63 (2006.01)
 C 1 2 N 1/15 (2006.01)
 C 1 2 N 1/19 (2006.01)
 C 1 2 N 1/21 (2006.01)
 C 1 2 N 5/10 (2006.01)
 C 1 2 P 21/02 (2006.01)
 C 1 2 P 21/08 (2006.01)
 A 6 1 K 39/395 (2006.01)
 A 6 1 K 40/33 (2025.01)
 A 6 1 P 35/00 (2006.01)
 A 6 1 K 47/68 (2017.01)
 A 6 1 K 45/00 (2006.01)
 A 6 1 P 29/00 (2006.01)
 A 6 1 P 37/02 (2006.01)
 A 6 1 K 35/12 (2015.01)
 A 6 1 K 35/17 (2025.01)

C 1 2 N 15/63 Z
 C 1 2 N 1/15
 C 1 2 N 1/19
 C 1 2 N 1/21
 C 1 2 N 5/10
 C 1 2 P 21/02 C
 C 1 2 P 21/08
 A 6 1 K 39/395 N
 A 6 1 K 39/395 D
 A 6 1 K 40/33
 A 6 1 P 35/00
 A 6 1 K 47/68
 A 6 1 K 45/00
 A 6 1 P 29/00
 A 6 1 P 37/02
 A 6 1 K 39/395 L
 A 6 1 K 39/395 C
 A 6 1 K 35/12
 A 6 1 K 35/17
 A 6 1 K 39/395 T
 A 6 1 K 39/395 E

4 C 0 8 7
 4 H 0 4 5

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

弁理士 富樫 征也

(72)発明者 フォックス, エレイン アン マリアーノ

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 8 0, サウス サンフランシスコ, オイスター ポイント
 ブールバード 1 5 1, スイート 4 0 0, サイトムエックス セラピューティクス, インコー
 ポレイテッド 気付

(72)発明者 ペイドウンガット, マダン エム.

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 8 0, サウス サンフランシスコ, オイスター ポイント
 ブールバード 1 5 1, スイート 4 0 0, サイトムエックス セラピューティクス, インコー
 ポレイテッド 気付

(72)発明者 カバノー, ダブリュー. マイケル

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 8 0, サウス サンフランシスコ, オイスター ポイント
 ブールバード 1 5 1, スイート 4 0 0, サイトムエックス セラピューティクス, インコー
 ポレイテッド 気付

(72)発明者 ランガン, バングラム エス.

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 8 0, サウス サンフランシスコ, オイスター ポイント
 ブールバード 1 5 1, スイート 4 0 0, サイトムエックス セラピューティクス, インコー
 ポレイテッド 気付

(72)発明者 ジャン, アンドリュー

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 8 0, サウス サンフランシスコ, オイスター ポイント
 ブールバード 1 5 1, スイート 4 0 0, サイトムエックス セラピューティクス, インコー
 ポレイテッド 気付

(72)発明者 グエン, アンナ フェイス

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 8 0, サウス サンフランシスコ, オイスター ポイント
 ブールバード 1 5 1, スイート 4 0 0, サイトムエックス セラピューティクス, インコー

ボレイテッド 気付

F ターム (参考) 4B064 AG27 CA19 CC24 CE12 DA01
 4B065 AB01 AC14 BA02 CA24 CA25 CA44 CA46
 4C076 AA93 AA95 BB01 BB11 BB13 BB15 BB16 BB21 BB25 BB27
 BB31 CC04 CC07 CC27 CC41 EE41 EE59 FF67
 4C084 AA17 MA52 MA56 MA59 MA63 MA66 NA06 NA13 NA14 ZB07
 ZB11 ZB26
 4C085 AA13 AA14 AA25 AA26 BB31 BB41 BB43 BB44 CC22 CC23
 EE01 GG01 GG02 GG03 GG04 GG05 GG08 GG10
 4C087 AA01 AA03 BB37 BB65 CA16 MA52 MA56 MA59 MA63 MA66
 NA05 NA13 NA14 ZB07 ZB11 ZB26
 4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA41 CA40 DA76 EA20 FA74 GA26