

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6835586号  
(P6835586)

(45) 発行日 令和3年2月24日 (2021.2.24)

(24) 登録日 令和3年2月8日 (2021.2.8)

(51) Int. Cl.

F I

C O 7 K 19/00 (2006.01)

C O 7 K 19/00 Z N A

C 1 2 N 15/62 (2006.01)

C 1 2 N 15/62 Z

C O 7 K 16/00 (2006.01)

C O 7 K 16/00

C 1 2 N 15/13 (2006.01)

C 1 2 N 15/13

C 1 2 P 21/02 (2006.01)

C 1 2 P 21/02 C

請求項の数 29 (全 168 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2016-549123 (P2016-549123)  
 (86) (22) 出願日 平成27年1月30日 (2015.1.30)  
 (65) 公表番号 特表2017-509594 (P2017-509594A)  
 (43) 公表日 平成29年4月6日 (2017.4.6)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2015/013776  
 (87) 国際公開番号 W02015/116933  
 (87) 国際公開日 平成27年8月6日 (2015.8.6)  
 審査請求日 平成30年1月25日 (2018.1.25)  
 (31) 優先権主張番号 61/934, 619  
 (32) 優先日 平成26年1月31日 (2014.1.31)  
 (33) 優先権主張国・地域又は機関  
 米国 (US)  
 (31) 優先権主張番号 61/971, 009  
 (32) 優先日 平成26年3月27日 (2014.3.27)  
 (33) 優先権主張国・地域又は機関  
 米国 (US)

(73) 特許権者 514270641  
 シトムクス セラピューティクス, インコ  
 ーポレイティド  
 アメリカ合衆国, カリフォルニア 940  
 80, 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 151,  
 スイート 400  
 (74) 代理人 100099759  
 弁理士 青木 篤  
 (74) 代理人 100077517  
 弁理士 石田 敬  
 (74) 代理人 100087871  
 弁理士 福本 積  
 (74) 代理人 100087413  
 弁理士 古賀 哲次

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 マトリプターゼ及びu-プラスミノゲン活性化因子の基質及び他の切断可能部分、並びにその  
 使用方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(a) 配列番号 305、306、361、362、及び363；

(b) 配列番号 365、366、367、及び368；並びに

(c) 配列番号 361、362、363、及び364

から成る群から選択されるアミノ酸配列を含んでいる切断可能部分 (C M)、並びに C M  
 に対してアミノ (N) 末端近くに位置している部分 (M<sub>N</sub>)、C M に対してカルボキシル  
 (C) 末端に位置している部分 (M<sub>C</sub>)、及びその組み合わせから成る群から選択される  
 少なくとも1つの追加部分 (M) を含む、プロテアーゼのための基質である単離ポリペプ  
 チドであって、

該切断可能部分が、少なくともマトリプターゼプロテアーゼ又はu-プラスミノゲン  
 活性化因子 (u P A) プロテアーゼのための基質であり、前記ポリペプチドが、標的に結  
 合する抗体又はその抗原結合フラグメント (A B) を含み、更に、前記 A B の抗原への結  
 合能力を阻害するマスキング部分 (M M) を含み、前記 M M のアミノ酸配列が前記抗原の  
 アミノ酸配列と異なる、単離ポリペプチド。

【請求項 2】

前記単離ポリペプチドが、少なくとも1つの M<sub>N</sub> 及び少なくとも1つの M<sub>C</sub> を含む、請  
 求項 1 に記載の単離ポリペプチド。

【請求項 3】

前記 M<sub>N</sub> 及び/又は M<sub>C</sub> が、M M、抗体、タンパク質、治療薬、抗悪性腫瘍薬、毒性剤

、薬剤、検出可能部分、診断剤、及び親和性タグから成る群より選択され、前記MMが前記ABの抗原への結合能力を阻害する、請求項1または2に記載の単離ポリペプチド。

【請求項4】

前記抗原結合フラグメントが、Fabフラグメント、F(ab')<sub>2</sub>フラグメント、scFv、scAb、dAb、単ドメイン重鎖抗体、及び単ドメイン軽鎖抗体から成る群から選択される、請求項1～3のいずれか1項に記載の単離ポリペプチド。

【請求項5】

前記CMが、組織内で標的と共局在しているプロテアーゼのための基質である、請求項1～4のいずれか1項に記載の単離ポリペプチド。

【請求項6】

前記ABがCMに直接連結される、請求項1～5のいずれか1項に記載の単離ポリペプチド。

【請求項7】

前記ABが連結ペプチドを介してCMに連結される、請求項1～6のいずれか1項に記載の単離ポリペプチド。

【請求項8】

前記単離ポリペプチドが、前記ABの抗原への結合能力を阻害するマスキング部分(MM)を含み、前記MMが40アミノ酸長以下のポリペプチドである、請求項1～7のいずれか1項に記載の単離ポリペプチド。

【請求項9】

前記MMが、標的への結合に関するABの平衡解離定数より高いABへの結合に関する平行解離定数を有する、請求項1～8のいずれか1項に記載の単離ポリペプチド。

【請求項10】

前記MMがCMに連結され、その結果、未切断状態において、単離ポリペプチドが次のようなN末端からC末端への構造配置：MM-CM-AB又はAB-CM-MMを含む、請求項8又は9に記載の単離ポリペプチド。

【請求項11】

前記単離ポリペプチドが、MMとCMとの間の連結ペプチドを含み、CMとABとの間の連結ペプチドを含む、請求項10に記載の単離ポリペプチド。

【請求項12】

前記単離ポリペプチドが、第1連結ペプチド(LP1)及び第2連結ペプチド(LP2)を含み、ここで、該単離ポリペプチドが、未切断状態で、次のようなN末端からC末端への構造配置：MM-LP1-CM-LP2-AB又はAB-LP2-CM-LP1-MMを有する、請求項11に記載の単離ポリペプチド。

【請求項13】

前記2つの連結ポリペプチドは互いに同一か又は同一でない、請求項12に記載の単離ポリペプチド。

【請求項14】

LP1及びLP2の各々は、2～約20のアミノ酸長のペプチドである、請求項12に記載の単離ポリペプチド。

【請求項15】

前記MMは、切断された状態でABの抗原への結合と干渉しないか又は競合しない、請求項8～14のいずれか1項に記載の単離ポリペプチド。

【請求項16】

前記ABに連結したT細胞動員scFvを含む、請求項1～14のいずれか1項に記載の単離ポリペプチド。

【請求項17】

前記T細胞動員scFvがマスキング部分を含む、請求項16に記載の単離ポリペプチド。

【請求項18】

10

20

30

40

50

前記ポリペプチドが、剤に結合される、請求項 1 ~ 1 7 のいずれか 1 項に記載の単離ポリペプチド。

【請求項 1 9】

前記ポリペプチドが、剤に結合され、当該剤が毒素及びその断片から成る群より選択される、請求項 1 ~ 1 8 のいずれか 1 項に記載の単離ポリペプチド。

【請求項 2 0】

前記ポリペプチドが、剤に結合され、当該剤が検出可能部分から成る群より選択される、請求項 1 ~ 1 8 のいずれか 1 項に記載の単離ポリペプチド。

【請求項 2 1】

前記検出可能部分は診断剤である、請求項 2 0 に記載の単離ポリペプチド。

10

【請求項 2 2】

前記剤が、ドラスタチン又はその誘導体、オーリスタチン又はその誘導体、メイタンシノイド又はその誘導体、デュオカルマイシン又はその誘導体、カリキアマイシン又は、オーリスタチン E 又はその誘導体、モノメチルオーリスタチン E ( M M A E ) 又はその誘導体、モノメチルオーリスタチン D ( M M A E ) 又はその誘導体、D M 1 又はその誘導体、及び、D M 4 又はその誘導体から成る群より選択される、請求項 1 8 に記載の単離ポリペプチド。

【請求項 2 3】

前記剤が、リンカーを介してポリペプチドに結合される、請求項 1 9 ~ 2 2 のいずれか 1 項に記載の単離ポリペプチド。

20

【請求項 2 4】

前記リンカーが切断可能リンカーである、請求項 2 3 に記載の単離ポリペプチド。

【請求項 2 5】

請求項 1 ~ 2 4 のいずれか 1 項に記載の単離ポリペプチドをコードする単離核酸分子。

【請求項 2 6】

請求項 2 5 に記載の単離核酸分子を含んでいるベクター。

【請求項 2 7】

請求項 1 ~ 2 4 のいずれか 1 項に記載の単離ポリペプチドを製造する方法であって、  
該ポリペプチドの発現につながる条件下で細胞を培養し、ここで前記細胞が請求項 2 6  
に記載のベクターを含み、

30

当該ポリペプチドを回収すること、  
を含む、方法。

【請求項 2 8】

請求項 1 に記載の単離ポリペプチドを含む活性化可能抗体 ( A A ) であって、

当該活性化可能抗体 ( A A ) は、

配列番号 3 0 5、3 0 6、及び 3 6 1 ~ 3 6 8 から成る群から選択されるアミノ酸配列を含んでいる切断可能部分 ( C M )、ここで、該切断可能部分は、少なくともマトリプターゼプロテアーゼ又は u プラスミノゲン活性化因子 ( u P A ) プロテアーゼのための基質であり；

抗原に結合する抗体、又はその抗原結合フラグメント ( A B )；及び

40

マスキング部分 ( M M )、ここで、当該 M M は前記 A B の抗原への結合能力を阻害する、  
を含む、

前記活性化可能抗体 ( A A ) は、未切断状態において、次のような N 末端から C 末端への構造配置：M M C M A B 又は A B C M M M を含む、活性化可能抗体。

【請求項 2 9】

前記 C M は、配列番号 3 6 1 及び 3 6 5 から成るからなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、請求項 2 8 に記載の活性化可能抗体。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

50

## 【 0 0 0 1 】

## 関連出願

本出願は、2014年1月31日に出願された米国特許仮出願第61/934,619号及び2014年3月27日に出願された米国特許仮出願第61/971,009号の利益を主張する。これらの出願のそれぞれの内容を、それらの全体として参照により本明細書中に援用する。

## 【 0 0 0 2 】

## 発明の分野

本発明は概して、マトリプターゼ及びu プラスミノゲン活性化因子(uPA)から選択される少なくとも1つのプロテアーゼのための基質である切断可能部分を含んでいるポリペプチド、マトリプターゼ及びuPAから選択される少なくとも1つのプロテアーゼのための基質である切断可能部分を含んでいる活性化可能抗体及び他の大型分子、並びにマトリプターゼ及びuPAから選択される少なくとも1つのプロテアーゼのための基質である切断可能部分を含んでいるこれらのポリペプチドの作製方法、及びさまざまな治療適応、診断適応及び予防適応における使用方法に関する。

## 【 背景技術 】

## 【 0 0 0 3 】

プロテアーゼは、アミノ酸残基間のペプチド結合を切断する酵素である。一部のプロテアーゼは、タンパク質内の特定のアミノ酸配列の存在に基づいて特定のペプチド結合を壊すことが知られている。プロテアーゼは、すべての生物体内で自然に生じ、簡単な分解から高度に調整された経路までさまざまな生理的反応に関与している。しかしながら、多くの病的状態が、調節を逸脱したプロテアーゼの発現及び/又は活性に関連している。このように、不適切なタンパク質分解が、癌、並びに心臓血管疾患、炎症性疾患、神経変性疾患、真核生物性疾患、細菌性疾患、ウイルス性疾患、及び寄生虫性疾患の発生及び進行において主要な役割を担っている可能性がある。

## 【 0 0 0 4 】

従って、プロテアーゼのための新しい基質を同定する必要性、並びにさまざまな治療的、診断的、及び予防的適応においてこれらの基質を使用する必要性が存在する。

## 【 発明の概要 】

## 【 0 0 0 5 】

本開示では、マトリプターゼ(本明細書中ではMTSP1、マトリプターゼ1、及びマトリプターゼを意味する類似語でも呼ばれる)及びu プラスミノゲン活性化因子(本明細書中ではuPA、ウロキナーゼ、ウロキナーゼ型プラスミノゲン活性化因子、及びuPAを意味する類似語でも呼ばれる)から選択される少なくとも1つのプロテアーゼのための基質である切断可能部分(CM)を含んでいるアミノ酸配列を提供する。これらのCMはさまざまな治療的、診断的、及び予防的適応において有用である。

## 【 0 0 0 6 】

いくつかの実施形態において、CMは、抗体に連結されているか又は別の方法で取り付けられている。例えば、CMは、プロテアーゼ、すなわち、マトリプターゼ及び/又はuPAに晒されると、CMが切断され、そして剤が抗体又はその抗原結合フラグメントから放出されるように、所定の標的に結合する抗体又はその抗原結合フラグメントに1若しくは複数の剤を連結するのに使用される。代表的な標的としては、これだけに限定されるものではないが、表1に示した標的が挙げられる。代表的な抗体又はその抗原結合フラグメントとしては、これだけに限定されるものではないが、表2に示した標的が挙げられる。いくつかの実施形態において、未切断状態の抗体は、以下のようなN末端からC末端への構造配置: 剤 CM (抗体又は抗原結合フラグメント) 又は (抗体又は抗原結合フラグメント) CM 剤を有する。いくつかの実施形態において、抗体は、抗体又は抗原結合フラグメントとCMとの間に連結ペプチドを含む。いくつかの実施形態において、抗体又は抗原結合フラグメントは、CMと複合化剤との間に連結ペプチドを含む。

## 【 0 0 0 7 】

【 0 0 0 8 】

10

【 0 0 1 0 】

20

いくつかの実施形態において、L P 2 は、アミノ酸配列 G S S、G G S、G G G S（配列番号 3 9 9）、G S S G T（配列番号 4 0 0）又は G S S G（配列番号 4 0 1）を含む。

いくつかの実施形態において、抗体又はその抗原結合フラグメントは、標的への結合に関して約  $100\text{ nM}$  以下の平衡解離定数を有する。

30

40

いくつかの実施形態において、CMは長さが最大15アミノ酸のポリペプチドである。

いくつかの実施形態において、CMは少なくともマトリプターゼのための基質である。いくつかの実施形態において、CMは少なくともuPAのための基質である。いくつかの実施形態において、CMは少なくともマトリプターゼ及びuPAのための基質である。

50

少なくともプラスミンによる切断に対して抵抗性の基質である。いくつかの実施形態において、CMはマトリプターゼ及び/又はuPAのための基質であり、少なくとも組織プラスミノゲン活性化因子(tPA)による切断に対して抵抗性の基質である。

#### 【0018】

いくつかの実施形態において、CMはマトリプターゼ及び/又はuPAのための基質であり、マトリプターゼ及び/又はuPAによって認識されるモチーフ配列を含んでいるが、但し、本開示の任意のモチーフ配列に関して：

(i) CMは、以下のアミノ酸配列TGRGPSWV(配列番号402)、SARGPSRW(配列番号403)、又はTARGPSFK(配列番号404)のいずれも含まず；且つ、CMは、例えば、TARGPSW(配列番号405)などのこれらのアミノ酸配列に基づくコンセンサスアミノ酸配列を含まず；

(ii) CMは、以下のアミノ酸配列LSGRSDNH(配列番号406)、GGWHTGRN(配列番号407)、HTGRSGAL(配列番号408)、又はPLTGRSGG(配列番号409)のいずれも含まず；且つ、CMは、例えば、LTGRSGA(配列番号410)などのこれらのアミノ酸配列に基づくコンセンサスアミノ酸配列を含まず；及び/又は

(iii) CMは、以下のアミノ酸配列AARGPAIH(配列番号411)、RGPAFNPM(配列番号412)、SSRGPAYL(配列番号413)、又はRGPATPIIM(配列番号414)のいずれも含まず；且つ、CMは、例えば、RGPA(配列番号415)などのこれらのアミノ酸配列に基づくコンセンサスアミノ酸配列を含まない。

#### 【0019】

いくつかの実施形態において、モチーフ配列は、少なくともマトリプターゼのための基質であり、且つ、以下の表8A～8Jに示すコアCMコンセンサス配列を含む。いくつかの実施形態において、モチーフ配列は、以下の表8A～8Jに示すコアCMコンセンサス配列の亜属(subgenus)、すなわち、亜群(subset)を含む。

#### 【0020】

#### 【表1】

表8A. マトリプターゼ切断可能コアCMコンセンサス配列1

コアCMコンセンサス 1	コアCMコンセンサス 1の亜属
$X_1X_2X_3X_4X_5$ (配列番号 1), 式中, $X_1$ はA, G, H, K, L, N, P, R, S, 又はVであり; $X_2$ はA, H, L, M, P, Q, R, S, 又はVであり; $X_3$ はA, E, F, G, I, L, P, R, S, T, 又はVであり; $X_4$ はA, I, K, N, R, T, 又はWであり; 及び $X_5$ はA, G, I, L, M, Q, R, S, 又はVである	$X_1X_2X_3X_4X_5$ (配列番号 2), 式中, $X_1$ はA, G, P, R, S, 又はVであり; $X_2$ はA, L, M, P, S, 又はVであり; $X_3$ はG, L, 又はPであり; $X_4$ はRであり; 及び $X_5$ はA, G, R, S, 又はVである
	$X_1X_2X_3X_4X_5$ (配列番号 3), 式中, $X_1$ はA, P, R, S, 又はVであり; $X_2$ はA, L, M, S, 又はVであり; $X_3$ はPであり; $X_4$ はRであり; 及び $X_5$ はA, G, S, 又はVである
	$X_1X_2X_3X_4X_5$ (配列番号 4), 式中, $X_1$ はA, P, 又はRであり; $X_2$ はA, S, 又はVであり; $X_3$ はPであり; $X_4$ はRであり; 及び $X_5$ はS 又はVである
	$X_1X_2X_3X_4X_5$ (配列番号 5), 式中, $X_1$ はA, P, 又はRであり; $X_2$ はA 又はSであり; $X_3$ はPであり; $X_4$ はRであり; 及び $X_5$ はSである

#### 【0021】

## 【表 2】

表 8 B. マトリプターゼ切断可能コア CM コンセンサス配列 2

コア CM コンセンサス 2	コア CM コンセンサス 2 の亜属
$X_{10}X_{11}X_{12}X_{13}X_{14}$ (配列番号 6), 式中, $X_{10}$ は A, L, P, R, S, T, 又は V であり; $X_{11}$ は K 又は R であり; $X_{12}$ は D 又は R であり; $X_{13}$ は A, G, L, M, S, T, V, 又は W であり; 及び $X_{14}$ は F, G, M, P, 又は V である	$X_{10}X_{11}X_{12}X_{13}X_{14}$ (配列番号 7), 式中, $X_{10}$ は A, R, S, 又は T であり; $X_{11}$ は K 又は R であり; $X_{12}$ は D 又は R であり; $X_{13}$ は L 又は V であり; 及び $X_{14}$ は F 又は P である
	$X_{10}X_{11}X_{12}X_{13}X_{14}$ (配列番号 8), 式中, $X_{10}$ は A, S, 又は T であり; $X_{11}$ は K 又は R であり; $X_{12}$ は R であり; $X_{13}$ は L 又は V であり; 及び $X_{14}$ は F 又は P である
	$X_{10}X_{11}X_{12}X_{13}X_{14}$ (配列番号 9), 式中, $X_{10}$ は S 又は T であり; $X_{11}$ は R であり; $X_{12}$ は R であり; $X_{13}$ は L 又は V であり; 及び $X_{14}$ は P である

10

## 【 0 0 2 2 】

## 【表 3】

20

表 8 C. マトリプターゼ切断可能コア CM コンセンサス配列 3

コア CM コンセンサス 3	コア CM コンセンサス 3 の亜属
$X_{20}X_{21}X_{22}X_{23}X_{24}$ (配列番号 10), 式中, $X_{20}$ は E, G, P, R, S, V, 又は W であり; $X_{21}$ は A, G, L, M, P, S, 又は V であり; $X_{22}$ は A, I, L, 又は R であり; $X_{23}$ は A, G, I, 又は P であり; 及び $X_{24}$ は G 又は R である	$X_{20}X_{21}X_{22}X_{23}X_{24}$ (配列番号 11), 式中, $X_{20}$ は G, P, R, S, 又は V であり; $X_{21}$ は P 又は V であり; $X_{22}$ は L 又は R であり; $X_{23}$ は G であり; 及び $X_{24}$ は G 又は R である
	$X_{20}X_{21}X_{22}X_{23}X_{24}$ (配列番号 12), 式中, $X_{20}$ は P 又は R であり; $X_{21}$ は P であり; $X_{22}$ は L であり; $X_{23}$ は G であり; 及び $X_{24}$ は R である

30

## 【 0 0 2 3 】

【表 4】

表 8 D. マトリプターゼ切断可能コア CM コンセンサス配列 4

コア CM コンセンサス 4	コア CM コンセンサス 4 の亜属
$X_{26}X_{27}X_{28}X_{29}X_{30}$ (配列番号 13), 式中, $X_{26}$ は A, G, H, L, R, 又は S であり; $X_{27}$ は D, H, N, R, S, T, 又は W であり; $X_{28}$ は A, N, P, R, S, T, 又は V であり; $X_{29}$ は F, G, L, M, P, Q, R, S, 又は Y であり; 及び $X_{30}$ は I, G, L, P, S, V, 又は W である	$X_{26}X_{27}X_{28}X_{29}X_{30}$ (配列番号 14), 式中, $X_{26}$ は A, G, H, L, R, 又は S であり; $X_{27}$ は D, H, R, 又は T であり; $X_{28}$ は A, P, R, S, T, 又は V であり; $X_{29}$ は F, G, L, M, P, 又は S であり; 及び $X_{30}$ は G, L, P, S, V, 又は W である
	$X_{26}X_{27}X_{28}X_{29}X_{30}$ (配列番号 15), 式中, $X_{26}$ は G, L, 又は S であり; $X_{27}$ は R 又は T であり; $X_{28}$ は A, P, 又は S であり; $X_{29}$ は F, G, M, 又は S であり; 及び $X_{30}$ は G, P, S, V, 又は W である
	$X_{26}X_{27}X_{28}X_{29}X_{30}$ (配列番号 16), 式中, $X_{26}$ は G, L, 又は S であり; $X_{27}$ は R であり; $X_{28}$ は A 又は S であり; $X_{29}$ は G 又は M であり; 及び $X_{30}$ は G, P, S, 又は W である
	$X_{26}X_{27}X_{28}X_{29}X_{30}$ (配列番号 17), 式中, $X_{26}$ は L であり; $X_{27}$ は R であり; $X_{28}$ は A 又は S であり; $X_{29}$ は G であり; 及び $X_{30}$ は W である

10

20

【 0 0 2 4 】

【表 5】

表 8 E. マトリプターゼ切断可能コア CM コンセンサス配列 5

コア CM コンセンサス 5	コア CM コンセンサス 5 の亜属
$X_{36}X_{37}X_{38}X_{39}X_{40}$ (配列番号 18), 式中, $X_{36}$ は G, K, L, S, V, 又は W であり; $X_{37}$ は G, I, P, Q, R, 又は S であり; $X_{38}$ は R であり; $X_{39}$ は G, K, R, S, 又は V であり; 及び $X_{40}$ は A, C, G, L, M, P, S, V, 又は Y である	$X_{36}X_{37}X_{38}X_{39}X_{40}$ (配列番号 19), 式中, $X_{36}$ は G, L, S, V, 又は W であり; $X_{37}$ は G, Q, R, 又は S であり; $X_{38}$ は R であり; $X_{39}$ は G, S, 又は V であり; 及び $X_{40}$ は A, G, L, S, 又は V である
	$X_{36}X_{37}X_{38}X_{39}X_{40}$ (配列番号 20), 式中, $X_{36}$ は V であり; $X_{37}$ は S であり; $X_{38}$ は R であり; $X_{39}$ は S であり; 及び $X_{40}$ は A 又は V である

30

【 0 0 2 5 】



【表 6】

表 8 F. マトリプターゼ切断可能コア CM コンセンサス配列 6

コア CM コンセンサス 6	コア CM コンセンサス 6 の垂属
$X_{42}X_{43}X_{44}X_{45}X_{46}$ (配列番号 21), 式中, $X_{42}$ は A, E, G, I, L, M, R, 又は S であり; $X_{43}$ は A, G, K, L, N, R, S, 又は V であり; $X_{44}$ は F, H, L, R, 又は Y であり; $X_{45}$ は A, F, G, H, P, 又は S であり; 及び $X_{46}$ は F, G, M, N, P, R, S, 又は V である	$X_{42}X_{43}X_{44}X_{45}X_{46}$ (配列番号 22), 式中, $X_{42}$ は A, E, G, L, M, R, 又は S であり; $X_{43}$ は G, K, L, N, R, S, 又は V であり; $X_{44}$ は R 又は Y であり; $X_{45}$ は A, F, G, P, 又は S であり; 及び $X_{46}$ は F, G, M, P, R, S, 又は V である
	$X_{42}X_{43}X_{44}X_{45}X_{46}$ (配列番号 23), 式中, $X_{42}$ は A, E, G, M, 又は S であり; $X_{43}$ は G, L, S, 又は V であり; $X_{44}$ は R 又は Y であり; $X_{45}$ は A, G, P, 又は S であり; 及び $X_{46}$ は F, G, M, P, R, S, 又は V である
	$X_{42}X_{43}X_{44}X_{45}X_{46}$ (配列番号 24), 式中, $X_{42}$ は A, G, 又は S であり; $X_{43}$ は L, S, 又は V であり; $X_{44}$ は R であり; $X_{45}$ は A であり; 及び $X_{46}$ は M 又は P である
	$X_{42}X_{43}X_{44}X_{45}X_{46}$ (配列番号 25), 式中, $X_{42}$ は A であり; $X_{43}$ は L, S 又は V であり; $X_{44}$ は R であり; $X_{45}$ は A であり; 及び $X_{46}$ は M 又は P である

10

20

【 0 0 2 6 】

【表 7】

表 8 G. マトリプターゼ切断可能コア CM コンセンサス配列 7

コア CM コンセンサス 7	コア CM コンセンサス 7 の垂属
$X_{50}X_{51}X_{52}X_{53}X_{54}$ (配列番号 26), 式中, $X_{50}$ は A, E, K, L, P, S, T, V, W, 又は Y であり; $X_{51}$ は A, I, L, P, R, S, V, 又は Y であり; $X_{52}$ は E, G, H, L, P, 又は V であり; $X_{53}$ は G, K, L, 又は R であり; 及び $X_{54}$ は Q 又は R である	$X_{50}X_{51}X_{52}X_{53}X_{54}$ (配列番号 27), 式中, $X_{50}$ は E, P, S, V, 又は W であり; $X_{51}$ は A, P, R, S, V, 又は Y であり; $X_{52}$ は E, G, H, L, P, 又は V であり; $X_{53}$ は G, K, L, 又は R であり; 及び $X_{54}$ は Q 又は R である
	$X_{50}X_{51}X_{52}X_{53}X_{54}$ (配列番号 28), 式中, $X_{50}$ は P 又は V であり; $X_{51}$ は A, P, 又は R であり; $X_{52}$ は E, G, P, 又は V であり; $X_{53}$ は G 又は R であり; 及び $X_{54}$ は R である
	$X_{50}X_{51}X_{52}X_{53}X_{54}$ (配列番号 29), 式中, $X_{50}$ は P 又は V であり; $X_{51}$ は A 又は R であり; $X_{52}$ は G 又は V であり; $X_{53}$ は G 又は R であり; 及び $X_{54}$ は R である
	$X_{50}X_{51}X_{52}X_{53}X_{54}$ (配列番号 30), 式中, $X_{50}$ は P 又は V であり; $X_{51}$ は A であり; $X_{52}$ は G 又は V であり; $X_{53}$ は R であり; 及び $X_{54}$ は R である

30

40

【 0 0 2 7 】

## 【表 8】

表 8 H. マトリプターゼ切断可能コア CM コンセンサス配列 8

コア CM コンセンサス 8	コア CM コンセンサス 8 の亜属
$X_{57}X_{58}X_{59}X_{60}X_{61}$ (配列番号 31), 式中, $X_{57}$ は A, G, I, K, P, S, 又は T であり; $X_{58}$ は R 又は T であり; $X_{59}$ は H, M, 又は S であり; $X_{60}$ は F, M, 又は R であり; 及び $X_{61}$ は A, G, I, L, P, Q, R, S, V, 又は W である	$X_{57}X_{58}X_{59}X_{60}X_{61}$ (配列番号 32), 式中, $X_{57}$ は A, G, I, K, S, 又は T であり; $X_{58}$ は R であり; $X_{59}$ は S であり; $X_{60}$ は F, M, 又は R であり; 及び $X_{61}$ は A, I, L, R, 又は W である
	$X_{57}X_{58}X_{59}X_{60}X_{61}$ (配列番号 33), 式中, $X_{57}$ は G 又は K であり; $X_{58}$ は R であり; $X_{59}$ は S であり; $X_{60}$ は M であり; 及び $X_{61}$ は A, L, R, 又は W である
	$X_{57}X_{58}X_{59}X_{60}X_{61}$ (配列番号 34), 式中, $X_{57}$ は G であり; $X_{58}$ は R であり; $X_{59}$ は S であり; $X_{60}$ は M であり; 及び $X_{61}$ は A 又は L である

10

【 0 0 2 8 】

## 【表 9】

表 8 I. マトリプターゼ切断可能コア CM コンセンサス配列 9

コア CM コンセンサス 9	コア CM コンセンサス 9 の亜属
$X_{67}X_{68}X_{69}X_{70}X_{71}$ (配列番号 35), 式中, $X_{67}$ は I, L, 又は S であり; $X_{68}$ は A, G, K, P, R, 又は V であり; $X_{69}$ は L, R 又は S であり; $X_{70}$ は A, K, M, P, R, S, 又は T であり; 及び $X_{71}$ は F, G, H, I, K, L, M, P, R, S, 又は V である	$X_{67}X_{68}X_{69}X_{70}X_{71}$ (配列番号 36), 式中, $X_{67}$ は I 又は L であり; $X_{68}$ は A, G, P, 又は V であり; $X_{69}$ は R であり; $X_{70}$ は A, M, P, R, S, 又は T であり; 及び $X_{71}$ は G, K, L, R, S, 又は V である
	$X_{67}X_{68}X_{69}X_{70}X_{71}$ (配列番号 37), 式中, $X_{67}$ は L であり; $X_{68}$ は A, G, P, 又は V であり; $X_{69}$ は R であり; $X_{70}$ は A, M, P, R, 又は S であり; 及び $X_{71}$ は G, K, L, S, 又は V である
	$X_{67}X_{68}X_{69}X_{70}X_{71}$ (配列番号 38), 式中, $X_{67}$ は L であり; $X_{68}$ は A, G, 又は P であり; $X_{69}$ は R であり; $X_{70}$ は A 又は S であり; 及び $X_{71}$ は G 又は L である
	$X_{67}X_{68}X_{69}X_{70}X_{71}$ (配列番号 39), 式中, $X_{67}$ は L であり; $X_{68}$ は A 又は P であり; $X_{69}$ は R であり; $X_{70}$ は A であり; 及び $X_{71}$ は G 又は L である

20

30

【 0 0 2 9 】

## 【表 10】

表 8 J. マトリプターゼ切断可能コア CM コンセンサス配列 10

コア CM コンセンサス 10	コア CM コンセンサス 10 の亜属
$X_{74}X_{75}X_{76}X_{77}X_{78}$ (配列番号 40), 式中, $X_{74}$ は E, L, Q, S, T 又は V であり; $X_{75}$ は L, R, 又は S であり; $X_{76}$ は H, K, 又は R であり; $X_{77}$ は A, M, R, 又は S であり; 及び $X_{78}$ は G, L, M, R, S, 又は W である	$X_{74}X_{75}X_{76}X_{77}X_{78}$ (配列番号 41), 式中, $X_{74}$ は E, L, T 又は V であり; $X_{75}$ は R 又は S であり; $X_{76}$ は K 又は R であり; $X_{77}$ は M, R, 又は S であり; 及び $X_{78}$ は G, L, M, S, 又は W である
	$X_{74}X_{75}X_{76}X_{77}X_{78}$ (配列番号 42), 式中, $X_{74}$ は E, T 又は V であり; $X_{75}$ は R 又は S であり; $X_{76}$ は K 又は R であり; $X_{77}$ は M 又は R であり; 及び $X_{78}$ は G, L, M, S, 又は W である
	$X_{74}X_{75}X_{76}X_{77}X_{78}$ (配列番号 43), 式中, $X_{74}$ は E 又は V であり; $X_{75}$ は S であり; $X_{76}$ は K 又は R であり; $X_{77}$ は R であり; 及び $X_{78}$ は L, S, 又は W である
	$X_{74}X_{75}X_{76}X_{77}X_{78}$ (配列番号 44), 式中, $X_{74}$ は E であり; $X_{75}$ は S であり; $X_{76}$ は K 又は R であり; $X_{77}$ は R であり; 及び $X_{78}$ は L 又は W である

10

20

## 【0030】

いくつかの実施形態において、モチーフ配列は、少なくともマトリプターゼのための基質であり、且つ、表 8 A ~ 8 J に示すコア CM コンセンサス配列の 1 つに基づく拡張コンセンサス配列を含む。いくつかの実施形態において、拡張コンセンサス配列は、以下の表 9 A ~ 9 J に示すコンセンサス配列である。

## 【0031】

## 【表 11】

表 9 A. マトリプターゼ切断可能な拡張コア CM コンセンサス配列 1

拡張コア CM コンセンサス 1	拡張コア CM コンセンサス 1 の亜属
$X_1X_2X_3X_4X_5X_6$ (配列番号 45), 式中, $X_1$ は A, G, H, K, L, N, P, R, S, 又は V であり; $X_2$ は A, H, L, M, P, Q, R, S, 又は V であり; $X_3$ は A, E, F, G, I, L, P, R, S, T, 又は V であり; $X_4$ は A, I, K, N, R, T, 又は W であり; $X_5$ は A, G, I, L, M, Q, R, S, 又は V であり; 及び $X_6$ は F, G, H, L, M, R, S, 又は W である	$X_1X_2X_3X_4X_5X_6$ (配列番号 46), 式中, $X_1$ は A, G, P, R, S, 又は V であり; $X_2$ は A, L, M, P, S, 又は V であり; $X_3$ は G, L, 又は P であり; $X_4$ は R であり; $X_5$ は A, G, R, S, 又は V であり; 及び $X_6$ は F, G, H, L, M, S, 又は W である
	$X_1X_2X_3X_4X_5X_6$ (配列番号 47), 式中, $X_1$ は A, P, R, S, 又は V であり; $X_2$ は A, L, M, S, 又は V であり; $X_3$ は P であり; $X_4$ は R であり; $X_5$ は A, G, S, 又は V であり; 及び $X_6$ は F, G, H, M, S, 又は W である
	$X_1X_2X_3X_4X_5X_6$ (配列番号 48), 式中, $X_1$ は A, P, 又は R であり; $X_2$ は A, S, 又は V であり; $X_3$ は P であり; $X_4$ は R であり; $X_5$ は S 又は V であり; 及び $X_6$ は F, G, H, M, 又は S である
	$X_1X_2X_3X_4X_5X_6$ (配列番号 49), 式中, $X_1$ は A, P, 又は R であり; $X_2$ は A 又は S であり; $X_3$ は P であり; $X_4$ は R であり; $X_5$ は S であり; 及び $X_6$ は F, G, H, 又は S である

30

40

50

【 0 0 3 2 】

【 表 1 2 】

表 9 B - 1. マトリプターゼ切断可能な拡張コア CM コンセンサス配列 2 A

拡張コア CM コンセンサス 2A	拡張コア CM コンセンサス 2Aの垂属
$X_9X_{10}X_{11}X_{12}X_{13}X_{14}$ (配列番号 50), 式中, $X_9$ はA, E, G, L, P, Q, S, T 又はVで あり; $X_{10}$ はA, L, P, R, S, T, 又はVであり; $X_{11}$ はK 又はRであり; $X_{12}$ はD 又はRであり; $X_{13}$ はA, G, L, M, S, T, V, 又はWであ り; 及び $X_{14}$ はF, G, M, P, 又はVである	$X_9X_{10}X_{11}X_{12}X_{13}X_{14}$ (配列番号 51), 式中, $X_9$ はE, G , L, P, Q 又はSであり; $X_{10}$ はA, R, S, 又はT であり; $X_{11}$ はK 又はRであり; $X_{12}$ はD 又はRであ り; $X_{13}$ はL 又はVであり; 及び $X_{14}$ はF 又はPであ る
	$X_9X_{10}X_{11}X_{12}X_{13}X_{14}$ (配列番号 52), 式中, $X_9$ はE, L , P 又はQであり; $X_{10}$ はA, S, 又はTであり; $X_{11}$ はK 又はRであり; $X_{12}$ はRであり; $X_{13}$ はL 又はV であり; 及び $X_{14}$ はF 又はPである
	$X_9X_{10}X_{11}X_{12}X_{13}X_{14}$ (配列番号 53), 式中, $X_9$ はE, P 又はQであり; $X_{10}$ はS 又はTであり; $X_{11}$ はRであ り; $X_{12}$ はRであり; $X_{13}$ はL 又はVであり; 及び $X_{14}$ はPである

10

20

【 0 0 3 3 】

【 表 1 3 】

表 9 B - 2. マトリプターゼ切断可能な拡張コア CM コンセンサス配列 2 B

拡張コア CM コンセンサス 2B	拡張コア CM コンセンサス 2Bの垂属
$X_{10}X_{11}X_{12}X_{13}X_{14}X_{15}$ (配列番号 54), 式中, $X_{10}$ はA, L, P, R, S, T, 又はVであり; $X_{11}$ はK 又はRであり; $X_{12}$ はD 又はRであり; $X_{13}$ はA, G, L, M, S, T, V, 又はWであ り; $X_{14}$ はF, G, M, P, 又はVであり; 及び $X_{15}$ はG, L, M, N, P, S, V, 又はYであ る	$X_{10}X_{11}X_{12}X_{13}X_{14}X_{15}$ (配列番号 55), 式中, $X_{10}$ はA, R, S, 又はTであり; $X_{11}$ はK 又はRであり; $X_{12}$ は D 又はRであり; $X_{13}$ はL 又はVであり; $X_{14}$ はF 又 はPであり; 及び $X_{15}$ はG, L, S 又はVである
	$X_{10}X_{11}X_{12}X_{13}X_{14}X_{15}$ (配列番号 56), 式中, $X_{10}$ はA, S, 又はTであり; $X_{11}$ はK 又はRであり; $X_{12}$ はRで あり; $X_{13}$ はL 又はVであり; $X_{14}$ はF 又はPであり ; 及び $X_{15}$ はG, L, S 又はVである
	$X_{10}X_{11}X_{12}X_{13}X_{14}X_{15}$ (配列番号 57), 式中, $X_{10}$ はS 又はTであり; $X_{11}$ はRであり; $X_{12}$ はRであり; $X_{13}$ はL 又はVであり; $X_{14}$ はPであり; 及び $X_{15}$ はL 又 はVである

30

40

【 0 0 3 4 】

## 【表 1 4】

表 9 B - 3. マトリプターゼ切断可能な拡張コア CM コンセンサス配列 2 C

拡張コア CM コンセンサス 2C	拡張コア CM コンセンサス 2Cの垂属
$X_9X_{10}X_{11}X_{12}X_{13}X_{14}X_{15}$ (配列番号 58), 式中, $X_9$ はA, E, G, L, P, Q, S, T 又はVで あり; $X_{10}$ はA, L, P, R, S, T, 又はVであり; $X_{11}$ はK 又はRであり; $X_{12}$ はD 又はRであり; $X_{13}$ はA, G, L, M, S, T, V, 又はWであ り; $X_{14}$ はF, G, M, P, 又はVであり; 及び $X_{15}$ はG, L, M, N, P, S, V, 又はYであ る	$X_9X_{10}X_{11}X_{12}X_{13}X_{14}X_{15}$ (配列番号 59), 式中, $X_9$ はE, G, L, P, Q 又はSであり; $X_{10}$ はA, R, S, 又は Tであり; $X_{11}$ はK 又はRであり; $X_{12}$ はD 又はRで あり; $X_{13}$ はL 又はVであり; $X_{14}$ はF 又はPであり ; 及び $X_{15}$ はG, L, S 又はVである
	$X_9X_{10}X_{11}X_{12}X_{13}X_{14}X_{15}$ (配列番号 60), 式中, $X_9$ はE, L, P 又はQであり; $X_{10}$ はA, S, 又はTであり; $X_{11}$ はK 又はRであり; $X_{12}$ はRであり; $X_{13}$ はL 又は Vであり; $X_{14}$ はF 又はPであり; 及び $X_{15}$ はG, L, S 又はVである
	$X_9X_{10}X_{11}X_{12}X_{13}X_{14}X_{15}$ (配列番号 61), 式中, $X_9$ はE, P 又はQであり; $X_{10}$ はS 又はTであり; $X_{11}$ はRで あり; $X_{12}$ はRであり; $X_{13}$ はL 又はVであり; $X_{14}$ は Pであり; 及び $X_{15}$ はL 又はVである

10

20

【 0 0 3 5 】

## 【表 1 5】

表 9 C - 1. マトリプターゼ切断可能な拡張コア CM コンセンサス配列 3 A

拡張コア CM コンセンサス 3A	拡張コア CM コンセンサス 3Aの垂属
$X_{19}X_{20}X_{21}X_{22}X_{23}X_{24}$ (配列番号 62), 式中, $X_{19}$ はD, G, K, S, T, 又はVであり; $X_{20}$ はE, G, P, R, S, V, 又はWであり; $X_{21}$ はA, G, L, M, P, S, 又はVであり; $X_{22}$ はA, I, L, 又はRであり; $X_{23}$ はA, G, I, 又はPであり; 及び $X_{24}$ はG 又はRである	$X_{19}X_{20}X_{21}X_{22}X_{23}X_{24}$ (配列番号 63), 式中, $X_{19}$ はG, K, 又はSであり; $X_{20}$ はG, P, R, S, 又はVであ り; $X_{21}$ はP 又はVであり; $X_{22}$ はL 又はRであり; $X_{23}$ はGであり; 及び $X_{24}$ はG 又はRである
	$X_{19}X_{20}X_{21}X_{22}X_{23}X_{24}$ (配列番号 64), 式中, $X_{19}$ はG 又はSであり; $X_{20}$ はP 又はRであり; $X_{21}$ はPであ り; $X_{22}$ はLであり; $X_{23}$ はGであり; $X_{24}$ はRである

30

【 0 0 3 6 】

## 【表 1 6】

表 9 C - 2. マトリプターゼ切断可能な拡張コア CM コンセンサス配列 3 B

拡張コア CM コンセンサス 3B	拡張コア CM コンセンサス 3Bの垂属
$X_{18}X_{19}X_{20}X_{21}X_{22}X_{23}X_{24}$ (配列番号 65), 式中, $X_{18}$ はC, G, I, L 又はSであり; $X_{19}$ はD, G, K, S, T, 又はVであり; $X_{20}$ はE, G, P, R, S, V, 又はWであり; $X_{21}$ はA, G, L, M, P, S, 又はVであり; $X_{22}$ はA, I, L, 又はRであり; $X_{23}$ はA, G, I, 又はPであり; 及び $X_{24}$ はG 又はRである	$X_{18}X_{19}X_{20}X_{21}X_{22}X_{23}X_{24}$ (配列番号 66), 式中, $X_{18}$ はC, G, 又はSであり; $X_{19}$ はG, K, 又はSであり; $X_{20}$ はG, P, R, S, 又はVであり; $X_{21}$ はP 又はVであり; $X_{22}$ はL 又はRであり; $X_{23}$ はGであり; 及び $X_{24}$ はG 又はRである $X_{18}X_{19}X_{20}X_{21}X_{22}X_{23}X_{24}$ (配列番号 67), 式中, $X_{18}$ はC, G, 又はSであり; $X_{19}$ はG 又はSであり; $X_{20}$ はP 又はRであり; $X_{21}$ はPであり; $X_{22}$ はLであり; $X_{23}$ はGであり; $X_{24}$ はRである

10

【 0 0 3 7】

## 【表 1 7】

表 9 C - 3. マトリプターゼ切断可能な拡張コア CM コンセンサス配列 3 C

拡張コア CM コンセンサス 3C	拡張コア CM コンセンサス 3Cの垂属
$X_{17}X_{18}X_{19}X_{20}X_{21}X_{22}X_{23}X_{24}$ (配列番号 68), 式中, $X_{17}$ はG 又はSであり; $X_{18}$ はC, G, I, L 又はSであり; $X_{19}$ はD, G, K, S, T, 又はVであり; $X_{20}$ はE, G, P, R, S, V, 又はWであり; $X_{21}$ はA, G, L, M, P, S, 又はVであり; $X_{22}$ はA, I, L, 又はRであり; $X_{23}$ はA, G, I, 又はPであり; 及び $X_{24}$ はG 又はRである	$X_{17}X_{18}X_{19}X_{20}X_{21}X_{22}X_{23}X_{24}$ (配列番号 69), 式中, $X_{17}$ はG 又はSであり; $X_{18}$ はC, G, 又はSであり; $X_{19}$ はG, K, 又はSであり; $X_{20}$ はG, P, R, S, 又はVであり; $X_{21}$ はP 又はVであり; $X_{22}$ はL 又はRであり; $X_{23}$ はGであり; 及び $X_{24}$ はG 又はRである $X_{17}X_{18}X_{19}X_{20}X_{21}X_{22}X_{23}X_{24}$ (配列番号 70), 式中, $X_{17}$ はG 又はSであり; $X_{18}$ はC, G, 又はSであり; $X_{19}$ はG 又はSであり; $X_{20}$ はP 又はRであり; $X_{21}$ はPであり; $X_{22}$ はLであり; $X_{23}$ はGであり; $X_{24}$ はRである

20

30

【 0 0 3 8】

## 【表 18】

表9D - 1. マトリプターゼ切断可能な拡張コアCMコンセンサス配列 4A

拡張コアCMコンセンサス 4A	拡張コアCM コンセンサス 4Aの垂属
$X_{25}X_{26}X_{27}X_{28}X_{29}X_{30}$ (配列番号 71), 式中, $X_{25}$ はG, M, R, 又はSであり; $X_{26}$ はA, G, H, L, R, 又はSであり; $X_{27}$ はD, H, N, R, S, T, 又はWであり; $X_{28}$ はA, N, P, R, S, T, 又はVであり; $X_{29}$ はF, G, L, M, P, Q, R, S, 又はY であり; 及び $X_{30}$ はI, G, L, P, S, V, 又はWである	$X_{25}X_{26}X_{27}X_{28}X_{29}X_{30}$ (配列番号 72), 式中, $X_{25}$ はG, M, R, 又はSであり; $X_{26}$ はA, G, H, L, R, 又は Sであり; $X_{27}$ はD, H, R, 又はTであり; $X_{28}$ はA, P, R, S, T, 又はVであり; $X_{29}$ はF, G, L, M, P , 又はSであり; 及び $X_{30}$ はG, L, P, S, V, 又は Wである
	$X_{25}X_{26}X_{27}X_{28}X_{29}X_{30}$ (配列番号 73), 式中, $X_{25}$ はG, M, R, 又はSであり; $X_{26}$ はG, L, 又はSであり; $X_{27}$ はR 又はTであり; $X_{28}$ はA, P, 又はSであり; $X_{29}$ はF, G, M, 又はSであり; 及び $X_{30}$ はG, P, S, V, 又はWである
	$X_{25}X_{26}X_{27}X_{28}X_{29}X_{30}$ (配列番号 74), 式中, $X_{25}$ はG, M, R, 又はSであり; $X_{26}$ はG, L, 又はSであり; $X_{27}$ はRであり; $X_{28}$ はA 又はSであり; $X_{29}$ はG 又は Mであり; 及び $X_{30}$ はG, P, S, 又はWである
	$X_{25}X_{26}X_{27}X_{28}X_{29}X_{30}$ (配列番号 75), 式中, $X_{25}$ はMで あり; $X_{26}$ はLであり; $X_{27}$ はRであり; $X_{28}$ はA 又は Sであり; $X_{29}$ はGであり; 及び $X_{30}$ はWである

10

20

【0039】

【表 19】

表9D - 2. マトリプターゼ切断可能な拡張コアCMコンセンサス配列4B

拡張コアCMコンセンサス 4B	拡張コアCM コンセンサス 4Bの垂属
$X_{25}X_{26}X_{27}X_{28}X_{29}X_{30}X_{31}$ (配列番号 76), 式中, $X_{25}$ はG, M, R, 又はSであり; $X_{26}$ はA, G, H, L, R, 又はSであり; $X_{27}$ はD, H, N, R, S, T, 又はWであり; $X_{28}$ はA, N, P, R, S, T, 又はVであり; $X_{29}$ はF, G, L, M, P, Q, R, S, 又はY であり; $X_{30}$ はI, G, L, P, S, V, 又はWであり; 及び $X_{31}$ はG, P, R, 又はSである	$X_{25}X_{26}X_{27}X_{28}X_{29}X_{30}X_{31}$ (配列番号 77), 式中, $X_{25}$ はG, M, R, 又はSであり; $X_{26}$ はA, G, H, L, R, 又はSであり; $X_{27}$ はD, H, R, 又はTであり; $X_{28}$ はA, P, R, S, T, 又はVであり; $X_{29}$ はF, G, L, M, P, 又はSであり; $X_{30}$ はG, L, P, S, V, 又はWであり; 及び $X_{31}$ はG, P, R, 又はSである
	$X_{25}X_{26}X_{27}X_{28}X_{29}X_{30}X_{31}$ (配列番号 78), 式中, $X_{25}$ はG, M, R, 又はSであり; $X_{26}$ はG, L, 又はSであり; $X_{27}$ はR 又はTであり; $X_{28}$ はA, P, 又はSであり; $X_{29}$ はF, G, M, 又はSであり; $X_{30}$ はG, P, S, V, 又はWであり; 及び $X_{31}$ はG, R, 又はSである
	$X_{25}X_{26}X_{27}X_{28}X_{29}X_{30}X_{31}$ (配列番号 79), 式中, $X_{25}$ はG, M, R, 又はSであり; $X_{26}$ はG, L, 又はSであり; $X_{27}$ はRであり; $X_{28}$ はA 又はSであり; $X_{29}$ はG 又はMであり; $X_{30}$ はG, P, S, 又はWであり; 及び $X_{31}$ はG, R, 又はSである
	$X_{25}X_{26}X_{27}X_{28}X_{29}X_{30}X_{31}$ (配列番号 80), 式中, $X_{25}$ はMであり; $X_{26}$ はLであり; $X_{27}$ はRであり; $X_{28}$ はA 又はSであり; $X_{29}$ はGであり; $X_{30}$ はWであり; 及び $X_{31}$ はRである

10

20

【0040】



## 【表 20】

表9D - 3. マトリプターゼ切断可能な拡張コアCMコンセンサス配列4C

拡張コアCMコンセンサス 4C	拡張コアCM コンセンサス 4Cの垂属
$X_{25}X_{26}X_{27}X_{28}X_{29}X_{30}X_{31}X_{32}$ (配列番号 81), 式中, $X_{25}$ はG, M, R, 又はSであり; $X_{26}$ はA, G, H, L, R, 又はSであり; $X_{27}$ はD, H, N, R, S, T, 又はWであり; $X_{28}$ はA, N, P, R, S, T, 又はVであり; $X_{29}$ はF, G, L, M, P, Q, R, S, 又はYであり; $X_{30}$ はI, G, L, P, S, V, 又はWであり; $X_{31}$ はG, P, R, 又はSであり; 及び $X_{32}$ はG, L, R, S, 又はVである	$X_{25}X_{26}X_{27}X_{28}X_{29}X_{30}X_{31}X_{32}$ (配列番号 82), 式中, $X_{25}$ はG, M, R, 又はSであり; $X_{26}$ はA, G, H, L, R, 又はSであり; $X_{27}$ はD, H, R, 又はTであり; $X_{28}$ はA, P, R, S, T, 又はVであり; $X_{29}$ はF, G, L, M, P, 又はSであり; $X_{30}$ はG, L, P, S, V, 又はWであり; $X_{31}$ はG, P, R, 又はSであり; 及び $X_{32}$ はG, L, R, S, 又はVである
	$X_{25}X_{26}X_{27}X_{28}X_{29}X_{30}X_{31}X_{32}$ (配列番号 83), 式中, $X_{25}$ はG, M, R, 又はSであり; $X_{26}$ はG, L, 又はSであり; $X_{27}$ はR 又はTであり; $X_{28}$ はA, P, 又はSであり; $X_{29}$ はF, G, M, 又はSであり; $X_{30}$ はG, P, S, V, 又はWであり; $X_{31}$ はG, R, 又はSであり; 及び $X_{32}$ はG, L, S, 又はVである
	$X_{25}X_{26}X_{27}X_{28}X_{29}X_{30}X_{31}X_{32}$ (配列番号 84), 式中, $X_{25}$ はG, M, R, 又はSであり; $X_{26}$ はG, L, 又はSであり; $X_{27}$ はRであり; $X_{28}$ はA 又はSであり; $X_{29}$ はG 又はMであり; $X_{30}$ はG, P, S, 又はWであり; $X_{31}$ はG, R, 又はSであり; 及び $X_{32}$ はG, L, S, 又はVである
	$X_{25}X_{26}X_{27}X_{28}X_{29}X_{30}X_{31}X_{32}$ (配列番号 85), 式中, $X_{25}$ はMであり; $X_{26}$ はLであり; $X_{27}$ はRであり; $X_{28}$ はA 又はSであり; $X_{29}$ はGであり; $X_{30}$ はWであり; $X_{31}$ はRであり; 及び $X_{32}$ はG, L, 又はSである

【0041】

## 【表 21】

表9E - 1. マトリプターゼ切断可能な拡張コアCMコンセンサス配列5A

拡張コアCMコンセンサス 5A	拡張コアCM コンセンサス 5Aの垂属
$X_{35}X_{36}X_{37}X_{38}X_{39}X_{40}$ (配列番号 86), 式中, $X_{35}$ はA, E, G, H, I, L, N, P, S, 又はVであり; $X_{36}$ はG, K, L, S, V, 又はWであり; $X_{37}$ はG, I, P, Q, R, 又はSであり; $X_{38}$ はRであり; $X_{39}$ はG, K, R, S, 又はVであり; 及び $X_{40}$ はA, C, G, L, M, P, S, V, 又はYである	$X_{35}X_{36}X_{37}X_{38}X_{39}X_{40}$ (配列番号 87), 式中, $X_{35}$ はG, I, S, 又はVであり; $X_{36}$ はG, L, S, V, 又はWであり; $X_{37}$ はG, Q, R, 又はSであり; $X_{38}$ はRであり; $X_{39}$ はG, S, 又はVであり; 及び $X_{40}$ はA, G, L, S, 又はVである
	$X_{35}X_{36}X_{37}X_{38}X_{39}X_{40}$ (配列番号 88), 式中, $X_{35}$ はG, I, S, 又はVであり; $X_{36}$ はVであり; $X_{37}$ はSであり; $X_{38}$ はRであり; $X_{39}$ はSであり; 及び $X_{40}$ はA 又はVである
	$X_{35}X_{36}X_{37}X_{38}X_{39}X_{40}$ (配列番号 89), 式中, $X_{35}$ はIであり; $X_{36}$ はVであり; $X_{37}$ はSであり; $X_{38}$ はRであり; $X_{39}$ はSであり; 及び $X_{40}$ はA 又はVである

【0042】

## 【表 2 2】

表 9 E - 2. マトリプターゼ切断可能な拡張コア CM コンセンサス配列 5 B

拡張コア CM コンセンサス 5B	拡張コア CM コンセンサス 5Bの垂属
$X_{34}X_{35}X_{36}X_{37}X_{38}X_{39}X_{40}$ (配列番号 90), 式中, $X_{34}$ はA, G, K, M, P, Q, S, V, 又はY であり; $X_{35}$ はA, E, G, H, I, L, N, P, S, 又 はVであり; $X_{36}$ はG, K, L, S, V, 又はWであり; $X_{37}$ はG, I, P, Q, R, 又はSであり; $X_{38}$ はRであり; $X_{39}$ はG, K, R, S, 又はVであり; 及び $X_{40}$ はA, C, G, L, M, P, S, V, 又はY;	$X_{34}X_{35}X_{36}X_{37}X_{38}X_{39}X_{40}$ (配列番号 91), 式中, $X_{34}$ はA , G, K, S, V, 又はYであり; 及び $X_{35}$ はG, I, S , 又はVであり; $X_{36}$ はG, L, S, V, 又はWであり ; $X_{37}$ はG, Q, R, 又はSであり; $X_{38}$ はRであり; $X$ $_{39}$ はG, S, 又はVであり; 及び $X_{40}$ はA, G, L, S, 又はVである $X_{34}X_{35}X_{36}X_{37}X_{38}X_{39}X_{40}$ (配列番号 92), 式中, $X_{34}$ はG , S, V, 又はYであり; $X_{35}$ はG, I, S, 又はVで あり; $X_{36}$ はVであり; $X_{37}$ はSであり; $X_{38}$ はRであ り; $X_{39}$ はSであり; 及び $X_{40}$ はA 又はVである $X_{34}X_{35}X_{36}X_{37}X_{38}X_{39}X_{40}$ (配列番号 93), 式中, $X_{34}$ はY であり; $X_{35}$ はIであり; $X_{36}$ はVであり; $X_{37}$ はSで あり; $X_{38}$ はRであり; $X_{39}$ はSであり; 及び $X_{40}$ はA 又はVである

10

20

## 【 0 0 4 3】

## 【表 2 3】

表 9 E - 3. マトリプターゼ切断可能な拡張コア CM コンセンサス配列 5 C

拡張コア CM コンセンサス 5C	拡張コア CM コンセンサス 5Cの垂属
$X_{33}X_{34}X_{35}X_{36}X_{37}X_{38}X_{39}X_{40}$ (配列番号 94), 式 中, $X_{33}$ はG, K, P, Q, S, 又はTであり; $X_{34}$ はA, G, K, M, P, Q, S, V, 又はY であり; $X_{35}$ はA, E, G, H, I, L, N, P, S, 又 はVであり; $X_{36}$ はG, K, L, S, V, 又はWであり; $X_{37}$ はG, I, P, Q, R, 又はSであり; $X_{38}$ はRであり; $X_{39}$ はG, K, R, S, 又はVであり; 及び $X_{40}$ はA, C, G, L, M, P, S, V, 又はY である	$X_{33}X_{34}X_{35}X_{36}X_{37}X_{38}X_{39}X_{40}$ (配列番号 95), 式中, $X_{33}$ はG, P, Q, S, 又はTであり; $X_{34}$ はA, G, K, S, V, 又はYであり; 及び $X_{35}$ はG, I, S, 又はVで あり; $X_{36}$ はG, L, S, V, 又はWであり; $X_{37}$ はG, Q, R, 又はSであり; $X_{38}$ はRであり; $X_{39}$ はG, S, 又はVであり; 及び $X_{40}$ はA, G, L, S, 又はVであ る $X_{33}X_{34}X_{35}X_{36}X_{37}X_{38}X_{39}X_{40}$ (配列番号 96), 式中, $X_{33}$ はG, Q, 又はSであり; $X_{34}$ はG, S, V, 又はYで あり; $X_{35}$ はG, I, S, 又はVであり; $X_{36}$ はVであ り; $X_{37}$ はSであり; $X_{38}$ はRであり; $X_{39}$ はSであり; 及び $X_{40}$ はA 又はVである $X_{33}X_{34}X_{35}X_{36}X_{37}X_{38}X_{39}X_{40}$ (配列番号 97), 式中, $X_{33}$ はG, Q, 又はSであり; $X_{34}$ はYであり; $X_{35}$ はIで あり; $X_{36}$ はVであり; $X_{37}$ はSであり; $X_{38}$ はRであ り; $X_{39}$ はSであり; 及び $X_{40}$ はA 又はVである

30

40

## 【 0 0 4 4】

## 【表 2 4】

表 9 F. マトリプターゼ切断可能な拡張コア CM コンセンサス配列 6

拡張コア CM コンセンサス 6	拡張コア CM コンセンサス 6の垂属
$X_{41}X_{42}X_{43}X_{44}X_{45}X_{46}$ (配列番号 98), 式中, $X_{41}$ はG, K, P, R, S, 又はTであり; $X_{42}$ はA, E, G, I, L, M, R, 又はSであり; $X_{43}$ はA, G, K, L, N, R, S, 又はVであり; $X_{44}$ はF, H, L, R, 又はYであり; $X_{45}$ はA, F, G, H, P, 又はSであり; 及び $X_{46}$ はF, G, M, N, P, R, S, 又はVである	$X_{41}X_{42}X_{43}X_{44}X_{45}X_{46}$ (配列番号 99), 式中, $X_{41}$ はG, K, R, S, 又はTであり; $X_{42}$ はA, E, G, L, M, R, 又はSであり; $X_{43}$ はG, K, L, N, R, S, 又はVであり; $X_{44}$ はR 又はYであり; $X_{45}$ はA, F, G, P, 又はSであり; 及び $X_{46}$ はF, G, M, P, R, S, 又はVである
	$X_{41}X_{42}X_{43}X_{44}X_{45}X_{46}$ (配列番号 100), 式中, $X_{41}$ はG, R, S, 又はTであり; $X_{42}$ はA, E, G, M, 又はSであり; $X_{43}$ はG, L, S, 又はVであり; $X_{44}$ はR 又はYであり; $X_{45}$ はA, G, P, 又はSであり; 及び $X_{46}$ はF, G, M, P, R, S, 又はVである
	$X_{41}X_{42}X_{43}X_{44}X_{45}X_{46}$ (配列番号 101), 式中, $X_{41}$ はG, R, 又はSであり; $X_{42}$ はA, G, 又はSであり; $X_{43}$ はL, S, 又はVであり; $X_{44}$ はRであり; $X_{45}$ はAであり; 及び $X_{46}$ はM 又はPである
	$X_{41}X_{42}X_{43}X_{44}X_{45}X_{46}$ (配列番号 102), 式中, $X_{41}$ はG, R, 又はSであり; $X_{42}$ はAであり; $X_{43}$ はL, S 又はVであり; $X_{44}$ はRであり; $X_{45}$ はAであり; 及び $X_{46}$ はM 又はPである

【 0 0 4 5 】

## 【表 2 5】

表 9 G - 1. マトリプターゼ切断可能な拡張コア CM コンセンサス配列 7 A

拡張コア CM コンセンサス 7A	拡張コア CM コンセンサス 7Aの垂属
$X_{50}X_{51}X_{52}X_{53}X_{54}X_{55}$ (配列番号 103), 式中, $X_{50}$ はA, E, K, L, P, S, T, V, W, 又はYであり; $X_{51}$ はA, I, L, P, R, S, V, 又はYであり; $X_{52}$ はE, G, H, L, P, 又はVであり; $X_{53}$ はG, K, L, 又はRであり; $X_{54}$ はQ 又はRであり; 及び $X_{55}$ はA, G, H, M, R, 又はSである	$X_{50}X_{51}X_{52}X_{53}X_{54}X_{55}$ (配列番号 104), 式中, $X_{50}$ はE, P, S, V, 又はWであり; $X_{51}$ はA, P, R, S, V, 又はYであり; $X_{52}$ はE, G, H, L, P, 又はVであり; $X_{53}$ はG, K, L, 又はRであり; $X_{54}$ はQ 又はRであり; 及び $X_{55}$ はA, G, H, M, R, 又はSである
	$X_{50}X_{51}X_{52}X_{53}X_{54}X_{55}$ (配列番号 105), 式中, $X_{50}$ はP 又はVであり; $X_{51}$ はA, P, 又はRであり; $X_{52}$ はE, G, P, 又はVであり; 及び $X_{53}$ はG 又はRであり; $X_{54}$ はRであり; $X_{55}$ はG, M, 又はSである
	$X_{50}X_{51}X_{52}X_{53}X_{54}X_{55}$ (配列番号 106), 式中, $X_{50}$ はP 又はVであり; $X_{51}$ はA 又はRであり; $X_{52}$ はG 又はVであり; $X_{53}$ はG 又はRであり; $X_{54}$ はRであり; 及び $X_{55}$ はM 又はSである
	$X_{50}X_{51}X_{52}X_{53}X_{54}X_{55}$ (配列番号 107), 式中, $X_{50}$ はP 又はVであり; $X_{51}$ はAであり; $X_{52}$ はG 又はVであり; $X_{53}$ はRであり; $X_{54}$ はRであり; 及び $X_{55}$ はM 又はSである

【 0 0 4 6 】

## 【表 26】

表 9 G - 2. マトリプターゼ切断可能な拡張コア CM コンセンサス配列 7 B

拡張コア CM コンセンサス 7B	拡張コア CM コンセンサス 7Bの垂属
$X_{49}X_{50}X_{51}X_{52}X_{53}X_{54}X_{55}$ (配列番号 108), 式中, $X_{49}$ はE, G, K, P, Q, S, T, 又はVであ り; $X_{50}$ はA, E, K, L, P, S, T, V, W, 又 はYであり; $X_{51}$ はA, I, L, P, R, S, V, 又はYであ り; $X_{52}$ はE, G, H, L, P, 又はVであり; $X_{53}$ はG, K, L, 又はRであり; $X_{54}$ はQ 又はRであり; 及び $X_{55}$ はA, G, H, M, R, 又はSである	$X_{49}X_{50}X_{51}X_{52}X_{53}X_{54}X_{55}$ (配列番号 109), 式中, $X_{49}$ は G, K, P, Q, S, 又はVであり; $X_{50}$ はE, P, S, V , 又はWであり; $X_{51}$ はA, P, R, S, V, 又はYで あり; $X_{52}$ はE, G, H, L, P, 又はVであり; $X_{53}$ は G, K, L, 又はRであり; $X_{54}$ はQ 又はRであり; 及び $X_{55}$ はA, G, H, M, R, 又はSである
	$X_{49}X_{50}X_{51}X_{52}X_{53}X_{54}X_{55}$ (配列番号: 110), 式中, $X_{49}$ はG, P, S, 又はVであり; $X_{50}$ はP 又はVであり; $X_{51}$ はA, P, 又はRであり; $X_{52}$ はE, G, P, 又はV であり; $X_{53}$ はG 又はRであり; $X_{54}$ はRであり; 及 び $X_{55}$ はG, M, 又はSである
	$X_{49}X_{50}X_{51}X_{52}X_{53}X_{54}X_{55}$ (配列番号 111), 式中, $X_{49}$ は G, P, S, 又はVであり; $X_{50}$ はP 又はVであり; $X_{51}$ はA 又はRであり; $X_{52}$ はG 又はVであり; $X_{53}$ はG 又はRであり; $X_{54}$ はRであり; 及び $X_{55}$ はM 又はS である
	$X_{49}X_{50}X_{51}X_{52}X_{53}X_{54}X_{55}$ (配列番号 112), 式中, $X_{49}$ は G, S, 又はVであり; $X_{50}$ はP 又はVであり; $X_{51}$ は Aであり; $X_{52}$ はG 又はVであり; $X_{53}$ はRであり; $X_{54}$ はRであり; 及び $X_{55}$ はM 又はSである

10

20

【0047】

【表 27】

表 9 G - 3. マトリプターゼ切断可能な拡張コア CM コンセンサス配列 7 C

拡張コア CM コンセンサス 7C	拡張コア CM コンセンサス 7Cの垂属
$X_{49}X_{50}X_{51}X_{52}X_{53}X_{54}X_{55}X_{56}$ (配列番号 113), 式中, $X_{49}$ はE, G, K, P, Q, S, T, 又はVであり; $X_{50}$ はA, E, K, L, P, S, T, V, W, 又はYであり; $X_{51}$ はA, I, L, P, R, S, V, 又はYであり; $X_{52}$ はE, G, H, L, P, 又はVであり; $X_{53}$ はG, K, L, 又はRであり; $X_{54}$ はQ 又はRであり; $X_{55}$ はA, G, H, M, R, 又はSであり; 及び $X_{56}$ はF, G, L, M, P, S, 又はWである	$X_{49}X_{50}X_{51}X_{52}X_{53}X_{54}X_{55}X_{56}$ (配列番号 114), 式中, $X_{49}$ はG, K, P, Q, S, 又はVであり; $X_{50}$ はE, P, S, V, 又はWであり; $X_{51}$ はA, P, R, S, V, 又はYであり; $X_{52}$ はE, G, H, L, P, 又はVであり; $X_{53}$ はG, K, L, 又はRであり; $X_{54}$ はQ 又はRであり; $X_{55}$ はA, G, H, M, R, 又はSであり; 及び $X_{56}$ はG, L, M, P, S, 又はWである
	$X_{49}X_{50}X_{51}X_{52}X_{53}X_{54}X_{55}X_{56}$ (配列番号 115), 式中, $X_{49}$ はG, P, S, 又はVであり; $X_{50}$ はP 又はVであり; $X_{51}$ はA, P, 又はRであり; $X_{52}$ はE, G, P, 又はVであり; $X_{53}$ はG 又はRであり; $X_{54}$ はRであり; $X_{55}$ はG, M, 又はSであり; 及び $X_{56}$ はG, L, M, P, S, 又はWである
	$X_{49}X_{50}X_{51}X_{52}X_{53}X_{54}X_{55}X_{56}$ (配列番号 116), 式中, $X_{49}$ はG, P, S, 又はVであり; $X_{50}$ はP 又はVであり; $X_{51}$ はA 又はRであり; $X_{52}$ はG 又はVであり; $X_{53}$ はG 又はRであり; $X_{54}$ はRであり; $X_{55}$ はM 又はSであり; 及び $X_{56}$ はG, L, P, S, 又はWである
	$X_{49}X_{50}X_{51}X_{52}X_{53}X_{54}X_{55}X_{56}$ (配列番号 117), 式中, $X_{49}$ はG, S, 又はVであり; $X_{50}$ はP 又はVであり; $X_{51}$ はAであり; $X_{52}$ はG 又はVであり; $X_{53}$ はRであり; $X_{54}$ はRであり; $X_{55}$ はM 又はSであり; 及び $X_{56}$ はG, L, 又はSである

10

20

【表 28】

表9H-1. マトリプターゼ切断可能な拡張コアCMコンセンサス配列8A

拡張コアCMコンセンサス 8A	拡張コアCM コンセンサス 8Aの垂属
$X_{57}X_{58}X_{59}X_{60}X_{61}X_{62}$ (配列番号 118), 式中, $X_{57}$ はA, G, I, K, P, S, 又はTであり; $X_{58}$ はR 又はTであり; $X_{59}$ はH, M, 又はSであり; $X_{60}$ はF, M, 又はRであり; $X_{61}$ はA, G, I, L, P, Q, R, S, V, 又はW であり; 及び $X_{62}$ はA, G, L, M, P, Q, R, S, T, V, 又 はWである	$X_{57}X_{58}X_{59}X_{60}X_{61}X_{62}$ (配列番号 119), 式中, $X_{57}$ はA, G, I, K, S, 又はTであり; $X_{58}$ はRであり; $X_{59}$ はSであり; $X_{60}$ はF, M, 又はRであり; $X_{61}$ はA, I , L, R, 又はWであり; 及び $X_{62}$ はG, L, M, P, Q , R, S, 又はVである
	$X_{57}X_{58}X_{59}X_{60}X_{61}X_{62}$ (配列番号 120), 式中, $X_{57}$ はG 又はKであり; $X_{58}$ はRであり; $X_{59}$ はSであり; $X_{60}$ はMであり; $X_{61}$ はA, L, R, 又はWであり; 及び $X_{62}$ はG, L, M, P, R, 又はSである
	$X_{57}X_{58}X_{59}X_{60}X_{61}X_{62}$ (配列番号 121), 式中, $X_{57}$ はG であり; $X_{58}$ はRであり; $X_{59}$ はSであり; $X_{60}$ はMで あり; $X_{61}$ はA 又はLであり; 及び $X_{62}$ はG, L, M, R, 又はSである
	$X_{57}X_{58}X_{59}X_{60}X_{61}X_{62}$ (配列番号 122), 式中, $X_{57}$ はG であり; $X_{58}$ はRであり; $X_{59}$ はSであり; $X_{60}$ はMで あり; $X_{61}$ はA 又はLであり; 及び $X_{62}$ はL 又はMで ある

10

20

【0049】

【表 29】

表9H-2. マトリプターゼ切断可能な拡張コアCMコンセンサス配列8B

拡張コアCMコンセンサス 8B	拡張コアCM コンセンサス 8Bの垂属
$X_{57}X_{58}X_{59}X_{60}X_{61}X_{62}X_{63}$ (配列番号 123), 式中, $X_{57}$ はA, G, I, K, P, S, 又はTであり; $X_{58}$ はR 又はTであり; $X_{59}$ はH, M, 又はSであり; $X_{60}$ はF, M, 又はRであり; $X_{61}$ はA, G, I, L, P, Q, R, S, V, 又 はWであり; $X_{62}$ はA, G, L, M, P, Q, R, S, T, V, 又はWであり; 及び $X_{63}$ はA, G, K, M, P, R, S, W, 又はY である	$X_{57}X_{58}X_{59}X_{60}X_{61}X_{62}X_{63}$ (配列番号 124), 式中, $X_{57}$ は A, G, I, K, S, 又はTであり; $X_{58}$ はRであり; $X_{59}$ はSであり; $X_{60}$ はF, M, 又はRであり; $X_{61}$ はA, I, L, R, 又はWであり; $X_{62}$ はG, L, M, P, Q, R , S, 又はVであり; 及び $X_{63}$ はA, G, P, R, S, W , 又はYである
	$X_{57}X_{58}X_{59}X_{60}X_{61}X_{62}X_{63}$ (配列番号 125), 式中, $X_{57}$ は G 又はKであり; $X_{58}$ はRであり; $X_{59}$ はSであり; $X_{60}$ はMであり; $X_{61}$ はA, L, R, 又はWであり; $X_{62}$ は G, L, M, P, R, 又はSであり; 及び $X_{63}$ はA, G, P, R, S, 又はWである
	$X_{57}X_{58}X_{59}X_{60}X_{61}X_{62}X_{63}$ (配列番号 126), 式中, $X_{57}$ は Gであり; $X_{58}$ はRであり; $X_{59}$ はSであり; $X_{60}$ はMで あり; $X_{61}$ はA 又はLであり; $X_{62}$ はG, L, M, R, 又はSであり; 及び $X_{63}$ はA, G, P, R, 又はSで ある
	$X_{57}X_{58}X_{59}X_{60}X_{61}X_{62}X_{63}$ (配列番号 127), 式中, $X_{57}$ は Gであり; $X_{58}$ はRであり; $X_{59}$ はSであり; $X_{60}$ はMで あり; $X_{61}$ はA 又はLであり; $X_{62}$ はL 又はMであり ; 及び $X_{63}$ はG, P, 又はSである

30

40

50

【 0 0 5 0 】

【 表 3 0 】

表 9 H - 3. マトリプターゼ切断可能な拡張コア CM コンセンサス配列 8 C

拡張コア CM コンセンサス 8C	拡張コア CM コンセンサス 8C の垂属
$X_{57}X_{58}X_{59}X_{60}X_{61}X_{62}X_{63}X_{64}$ (配列番号 128), 式中, $X_{57}$ は A, G, I, K, P, S, 又は T であり; $X_{58}$ は R 又は T であり; $X_{59}$ は H, M, 又は S であり; $X_{60}$ は F, M, 又は R であり; $X_{61}$ は A, G, I, L, P, Q, R, S, V, 又は W であり; $X_{62}$ は A, G, L, M, P, Q, R, S, T, V, 又は W であり; $X_{63}$ は A, G, K, M, P, R, S, W, 又は Y であり; 及び $X_{64}$ は F, G, I, L, P, Q, S, 又は Y である	$X_{57}X_{58}X_{59}X_{60}X_{61}X_{62}X_{63}X_{64}$ (配列番号 129), 式中, $X_{57}$ は A, G, I, K, S, 又は T であり; $X_{58}$ は R であり; $X_{59}$ は S であり; $X_{60}$ は F, M, 又は R であり; $X_{61}$ は A, I, L, R, 又は W であり; $X_{62}$ は G, L, M, P, Q, R, S, 又は V であり; $X_{63}$ は A, G, P, R, S, W, 又は Y であり; 及び $X_{64}$ は F, G, L, P, 又は S である
	$X_{57}X_{58}X_{59}X_{60}X_{61}X_{62}X_{63}X_{64}$ (配列番号 130), 式中, $X_{57}$ は G 又は K であり; $X_{58}$ は R であり; $X_{59}$ は S であり; $X_{60}$ は M であり; $X_{61}$ は A, L, R, 又は W であり; $X_{62}$ は G, L, M, P, R, 又は S であり; $X_{63}$ は A, G, P, R, S, 又は W であり; 及び $X_{64}$ は F, G, L, P, 又は S である
	$X_{57}X_{58}X_{59}X_{60}X_{61}X_{62}X_{63}X_{64}$ (配列番号 131), 式中, $X_{57}$ は G であり; $X_{58}$ は R であり; $X_{59}$ は S であり; $X_{60}$ は M であり; $X_{61}$ は A 又は L であり; $X_{62}$ は G, L, M, R, 又は S であり; $X_{63}$ は A, G, P, R, 又は S であり; 及び $X_{64}$ は F, G, P, 又は S である
	$X_{57}X_{58}X_{59}X_{60}X_{61}X_{62}X_{63}X_{64}$ (配列番号 132), 式中, $X_{57}$ は G であり; $X_{58}$ は R であり; $X_{59}$ は S であり; $X_{60}$ は M であり; $X_{61}$ は A 又は L であり; $X_{62}$ は L 又は M であり; $X_{63}$ は G, P, 又は S であり; 及び $X_{64}$ は G, P, 又は S である

10

20

30

【 0 0 5 1 】

## 【表 3 1】

表 9 I - 1. マトリプターゼ切断可能な拡張コア CM コンセンサス配列 9 A

拡張コア CM コンセンサス 9A	拡張コア CM コンセンサス 9Aの垂属
$X_{67}X_{68}X_{69}X_{70}X_{71}X_{72}$ (配列番号 133), 式中, $X_{67}$ はI, L, 又はSであり; $X_{68}$ はA, G, K, P, R, 又はVであり; $X_{69}$ はL, R 又はSであり; $X_{70}$ はA, K, M, P, R, S, 又はTであり; $X_{71}$ はF, G, H, I, K, L, M, P, R, S, 又はVであり; 及び $X_{72}$ はF, G, I, L, M, P, R, S, T, V, W, 又はYである	$X_{67}X_{68}X_{69}X_{70}X_{71}X_{72}$ (配列番号 134), 式中, $X_{67}$ はI 又はLであり; $X_{68}$ はA, G, P, 又はVであり; $X_{69}$ はRであり; $X_{70}$ はA, M, P, R, S, 又はTであり; $X_{71}$ はG, K, L, R, S, 又はVであり; 及び $X_{72}$ はF, G, I, L, M, S, 又はVである
	$X_{67}X_{68}X_{69}X_{70}X_{71}X_{72}$ (配列番号 135), 式中, $X_{67}$ はL であり; $X_{68}$ はA, G, P, 又はVであり; $X_{69}$ はRで あり; $X_{70}$ はA, M, P, R, 又はSであり; $X_{71}$ はG, K, L, S, 又はVであり; 及び $X_{72}$ はF, G, I, L, S, 又はVである
	$X_{67}X_{68}X_{69}X_{70}X_{71}X_{72}$ (配列番号 136), 式中, $X_{67}$ はL であり; $X_{68}$ はA, G, 又はPであり; $X_{69}$ はRであり ; $X_{70}$ はA 又はSであり; $X_{71}$ はG 又はLであり; 及 び $X_{72}$ はI 又はLである
	$X_{67}X_{68}X_{69}X_{70}X_{71}X_{72}$ (配列番号 137), 式中, $X_{67}$ はL であり; $X_{68}$ はA 又はPであり; $X_{69}$ はRであり; $X_{70}$ はAであり; $X_{71}$ はG 又はLであり; 及び $X_{72}$ はI 又 はLである

10

20

【 0 0 5 2 】



## 【表 3 2】

表 9 I - 2. マトリプターゼ切断可能な拡張コア CM コンセンサス配列 9 B

拡張コア CM コンセンサス 9B	拡張コア CM コンセンサス 9Bの垂属
$X_{66}X_{67}X_{68}X_{69}X_{70}X_{71}X_{72}$ (配列番号 138), 式中, $X_{66}$ はG, K, P, Q, R, S, 又はTであり; $X_{67}$ はI, L, 又はSであり; $X_{68}$ はA, G, K, P, R, 又はVであり; $X_{69}$ はL, R 又はSであり; $X_{70}$ はA, K, M, P, R, S, 又はTであり; $X_{71}$ はF, G, H, I, K, L, M, P, R, S, 又はVであり; 及び $X_{72}$ はF, G, I, L, M, P, R, S, T, V, W, 又はYである	$X_{66}X_{67}X_{68}X_{69}X_{70}X_{71}X_{72}$ (配列番号 139), 式中, $X_{66}$ は G, P, R, S, 又はTであり; $X_{67}$ はI 又はLであり ; $X_{68}$ はA, G, P, 又はVであり; $X_{69}$ はRであり; $X_{70}$ はA, M, P, R, S, 又はTであり; $X_{71}$ はG, K, L , R, S, 又はVであり; 及び $X_{72}$ はF, G, I, L, M , S, 又はVである
	$X_{66}X_{67}X_{68}X_{69}X_{70}X_{71}X_{72}$ (配列番号 140), 式中, $X_{66}$ は G, P, R, 又はSであり; $X_{67}$ はLであり; $X_{68}$ はA, G, P, 又はVであり; $X_{69}$ はRであり; $X_{70}$ はA, M, P, R, 又はSであり; $X_{71}$ はG, K, L, S, 又はVで あり; 及び $X_{72}$ はF, G, I, L, S, 又はVである
	$X_{66}X_{67}X_{68}X_{69}X_{70}X_{71}X_{72}$ (配列番号 141), 式中, $X_{66}$ は Pであり; $X_{67}$ はLであり; $X_{68}$ はA, G, 又はPであ り; $X_{69}$ はRであり; $X_{70}$ はA 又はSであり; $X_{71}$ はG 又はLであり; 及び $X_{72}$ はI 又はLである
	$X_{66}X_{67}X_{68}X_{69}X_{70}X_{71}X_{72}$ (配列番号 142), 式中, $X_{66}$ は Pであり; $X_{67}$ はLであり; $X_{68}$ はA 又はPであり; $X_{69}$ はRであり; $X_{70}$ はAであり; $X_{71}$ はG 又はLであり ; 及び $X_{72}$ はI 又はLである

10

20

【 0 0 5 3 】

## 【表 3 3】

表 9 I - 3. マトリプターゼ切断可能な拡張コア CM コンセンサス配列 9 C

拡張コア CM コンセンサス 9C	拡張コア CM コンセンサス 9Cの垂属
$X_{65}X_{66}X_{67}X_{68}X_{69}X_{70}X_{71}X_{72}$ (配列番号 143), 式中, $X_{65}$ はA, G, I, K, P, R, S, 又はVであり; $X_{66}$ はG, K, P, Q, R, S, 又はTであり; $X_{67}$ はI, L, 又はSであり; $X_{68}$ はA, G, K, P, R, 又はVであり; $X_{69}$ はL, R 又はSであり; $X_{70}$ はA, K, M, P, R, S, 又はTであり; $X_{71}$ はF, G, H, I, K, L, M, P, R, S, 又はVであり; 及び $X_{72}$ はF, G, I, L, M, P, R, S, T, V, W, 又はYである	$X_{65}X_{66}X_{67}X_{68}X_{69}X_{70}X_{71}X_{72}$ (配列番号 144), 式中, $X_{65}$ はG, K, P, R, S, 又はVであり; $X_{66}$ はG, P, R, S, 又はTであり; $X_{67}$ はI 又はLであり; $X_{68}$ はA, G, P, 又はVであり; $X_{69}$ はRであり; $X_{70}$ はA, M, P, R, S, 又はTであり; $X_{71}$ はG, K, L, R, S, 又はVであり; 及び $X_{72}$ はF, G, I, L, M, S, 又はVである
	$X_{65}X_{66}X_{67}X_{68}X_{69}X_{70}X_{71}X_{72}$ (配列番号 145), 式中, $X_{65}$ はG, P, R, 又はSであり; $X_{66}$ はG, P, R, 又はSであり; $X_{67}$ はLであり; $X_{68}$ はA, G, P, 又はVであり; $X_{69}$ はRであり; $X_{70}$ はA, M, P, R, 又はSであり; $X_{71}$ はG, K, L, S, 又はVであり; 及び $X_{72}$ はF, G, I, L, S, 又はVである
	$X_{65}X_{66}X_{67}X_{68}X_{69}X_{70}X_{71}X_{72}$ (配列番号 146), 式中, $X_{65}$ はG, P, R, 又はSであり; $X_{66}$ はPであり; $X_{67}$ はLであり; $X_{68}$ はA, G, 又はPであり; $X_{69}$ はRであり; $X_{70}$ はA 又はSであり; $X_{71}$ はG 又はLであり; 及び $X_{72}$ はI 又はLである
	$X_{65}X_{66}X_{67}X_{68}X_{69}X_{70}X_{71}X_{72}$ (配列番号 147), 式中, $X_{65}$ はRであり; $X_{66}$ はPであり; $X_{67}$ はLであり; $X_{68}$ はA 又はPであり; $X_{69}$ はRであり; $X_{70}$ はAであり; $X_{71}$ はG 又はLであり; 及び $X_{72}$ はI 又はLである

10

20

## 【 0 0 5 4】

30

## 【表 3 4】

表 9 J - 1. マトリプターゼ切断可能な拡張コア CM コンセンサス配列 10A

拡張コア CM コンセンサス 10A	拡張コア CM コンセンサス 10Aの亜属
$X_{73}X_{74}X_{75}X_{76}X_{77}X_{78}X_{79}$ (配列番号 148), 式中, $X_{73}$ はG, H, N, P, R, S, T, 又はVであ り; $X_{74}$ はE, L, Q, S, T 又はVであり; $X_{75}$ はL, R, 又はSであり; $X_{76}$ はH, K, 又はRであり; $X_{77}$ はA, M, R, 又はSであり; $X_{78}$ はG, L, M, R, S, 又はWであり; 及 び $X_{79}$ はA, G, I, M, N, P, S, V, 又はY である	$X_{73}X_{74}X_{75}X_{76}X_{77}X_{78}X_{79}$ (配列番号 149), 式中, $X_{73}$ は G, N, P, S, T, 又はVであり; $X_{74}$ はE, L, T 又 はVであり; $X_{75}$ はR 又はSであり; $X_{76}$ はK 又はR であり; $X_{77}$ はM, R, 又はSであり; $X_{78}$ はG, L, M , S, 又はWであり; 及び $X_{79}$ はA, G, I, M, P, S , 又はVである
	$X_{73}X_{74}X_{75}X_{76}X_{77}X_{78}X_{79}$ (配列番号 150), 式中, $X_{73}$ は G, N, P, S, 又はVであり; $X_{74}$ はE, T 又はVで あり; $X_{75}$ はR 又はSであり; $X_{76}$ はK 又はRであり ; $X_{77}$ はM 又はRであり; $X_{78}$ はG, L, M, S, 又はW であり; 及び $X_{79}$ はA, G, I, M, P, S, 又はVで ある
	$X_{73}X_{74}X_{75}X_{76}X_{77}X_{78}X_{79}$ (配列番号 151), 式中, $X_{73}$ は G, P, S, 又はVであり; $X_{74}$ はE 又はVであり; $X_{75}$ はSであり; $X_{76}$ はK 又はRであり; $X_{77}$ はRであり ; $X_{78}$ はL, S, 又はWであり; 及び $X_{79}$ はG, I, M, P, S, 又はVである
	$X_{73}X_{74}X_{75}X_{76}X_{77}X_{78}X_{79}$ (配列番号 152), 式中, $X_{73}$ は G, P, 又はSであり; $X_{74}$ はEであり; $X_{75}$ はSであ り; $X_{76}$ はK 又はRであり; $X_{77}$ はRであり; $X_{78}$ はL 又はWであり; 及び $X_{79}$ はMである

10

20

【 0 0 5 5 】

## 【表 3 5】

表 9 J - 2. マトリプターゼ切断可能な拡張コア CM コンセンサス配列 10B

拡張コア CM コンセンサス 10B	拡張コア CM コンセンサス 10Bの亜属
$X_{74}X_{75}X_{76}X_{77}X_{78}X_{79}X_{80}$ (配列番号 153), 式中, $X_{74}$ はE, L, Q, S, T 又はVであり; $X_{75}$ はL, R, 又はSであり; $X_{76}$ はH, K, 又はRであり; $X_{77}$ はA, M, R, 又はSであり; $X_{78}$ はG, L, M, R, S, 又はWであり; $X_{79}$ はA, G, I, M, N, P, S, V, 又はY であり; 及び $X_{80}$ はG, I, L, N, P, S, V, 又はWであ る	$X_{74}X_{75}X_{76}X_{77}X_{78}X_{79}X_{80}$ (配列番号 154), 式中, $X_{74}$ は E, L, T 又はVであり; $X_{75}$ はR 又はSであり; $X_{76}$ はK 又はRであり; $X_{77}$ はM, R, 又はSであり; $X_{78}$ はG, L, M, S, 又はWであり; $X_{79}$ はA, G, I, M, P, S, 又はVであり; 及び $X_{80}$ はG, I, L, N, P, S, 又はVである
	$X_{74}X_{75}X_{76}X_{77}X_{78}X_{79}X_{80}$ (配列番号 155), 式中, $X_{74}$ は E, T 又はVであり; $X_{75}$ はR 又はSであり; $X_{76}$ はK 又はRであり; $X_{77}$ はM 又はRであり; $X_{78}$ はG, L, M, S, 又はWであり; $X_{79}$ はA, G, I, M, P, S, 又はVであり; 及び $X_{80}$ はG, I, L, N, P, S, 又 はVである
	$X_{74}X_{75}X_{76}X_{77}X_{78}X_{79}X_{80}$ (配列番号 156), 式中, $X_{74}$ は E 又はVであり; $X_{75}$ はSであり; $X_{76}$ はK 又はRで あり; $X_{77}$ はRであり; $X_{78}$ はL, S, 又はWであり; $X_{79}$ はG, I, M, P, S, 又はVであり; 及び $X_{80}$ はG, L, N, P, S, 又はVである
	$X_{74}X_{75}X_{76}X_{77}X_{78}X_{79}X_{80}$ (配列番号 157), 式中, $X_{74}$ は Eであり; $X_{75}$ はSであり; $X_{76}$ はK 又はRであり; X $_{77}$ はRであり; $X_{78}$ はL 又はWであり; $X_{79}$ はMであり ; 及び $X_{80}$ はG, P, 又はSである

10

20

## 【 0 0 5 6 】

## 【表 3 6】

表 9 J - 3. マトリプターゼ切断可能な拡張コア CM コンセンサス配列 10C

拡張コア CM コンセンサス 10C	拡張コア CM コンセンサス 10C の亜属
$X_{73}X_{74}X_{75}X_{76}X_{77}X_{78}X_{79}X_{80}$ (配列番号 158), 式中, $X_{73}$ は G, H, N, P, R, S, T, 又は V であり; $X_{74}$ は E, L, Q, S, T 又は V であり; $X_{75}$ は L, R, 又は S であり; $X_{76}$ は H, K, 又は R であり; $X_{77}$ は A, M, R, 又は S であり; $X_{78}$ は G, L, M, R, S, 又は W であり; $X_{79}$ は A, G, I, M, N, P, S, V, 又は Y であり; 及び $X_{80}$ は G, I, L, N, P, S, V, 又は W である	$X_{73}X_{74}X_{75}X_{76}X_{77}X_{78}X_{79}X_{80}$ (配列番号 159), 式中, $X_{73}$ は G, N, P, S, T, 又は V であり; $X_{74}$ は E, L, T 又は V であり; $X_{75}$ は R 又は S であり; $X_{76}$ は K 又は R であり; $X_{77}$ は M, R, 又は S であり; $X_{78}$ は G, L, M, S, 又は W であり; $X_{79}$ は A, G, I, M, P, S, 又は V であり; 及び $X_{80}$ は G, I, L, N, P, S, 又は V である
	$X_{73}X_{74}X_{75}X_{76}X_{77}X_{78}X_{79}X_{80}$ (配列番号 160), 式中, $X_{73}$ は G, N, P, S, 又は V であり; $X_{74}$ は E, T 又は V であり; $X_{75}$ は R 又は S であり; $X_{76}$ は K 又は R であり; $X_{77}$ は M 又は R であり; $X_{78}$ は G, L, M, S, 又は W であり; $X_{79}$ は A, G, I, M, P, S, 又は V であり; 及び $X_{80}$ は G, I, L, N, P, S, 又は V である
	$X_{73}X_{74}X_{75}X_{76}X_{77}X_{78}X_{79}X_{80}$ (配列番号 161), 式中, $X_{73}$ は G, P, S, 又は V であり; $X_{74}$ は E 又は V であり; $X_{75}$ は S であり; $X_{76}$ は K 又は R であり; $X_{77}$ は R であり; $X_{78}$ は L, S, 又は W であり; $X_{79}$ は G, I, M, P, S, 又は V であり; 及び $X_{80}$ は G, L, N, P, S, 又は V である
	$X_{73}X_{74}X_{75}X_{76}X_{77}X_{78}X_{79}X_{80}$ (配列番号 162), 式中, $X_{73}$ は G, P, 又は S であり; $X_{74}$ は E であり; $X_{75}$ は S であり; $X_{76}$ は K 又は R であり; $X_{77}$ は R であり; $X_{78}$ は L 又は W であり; $X_{79}$ は M であり; 及び $X_{80}$ は G, P, 又は S である

10

20

30

## 【0057】

いくつかの実施形態において、CM はアミノ酸配列 A A P R S (配列番号 163) を含むコア CM コンセンサス 1 配列を含む。いくつかの実施形態において、CM はアミノ酸配列 A A P R S F (配列番号 164) を含む拡張コア CM コンセンサス 1 配列を含む。

## 【0058】

いくつかの実施形態において、CM はアミノ酸配列 S R R V P (配列番号 165) を含むコア CM コンセンサス 2 配列を含む。いくつかの実施形態において、CM は、Q S R R V P (配列番号 166)、Q T R R V P (配列番号 167)、S R R V P L (配列番号 168)、S R R V P V (配列番号 169)、Q S R R V P L (配列番号 170)、Q S R R V P V (配列番号 171)、Q T R R V P L (配列番号 172)、及び Q T R R V P V (配列番号 173) から成る群から選択されるアミノ酸配列を含む拡張コア CM コンセンサス 2 配列を含む。

40

## 【0059】

いくつかの実施形態において、CM はアミノ酸配列 Q S R R V P (配列番号 166) を含む。いくつかの実施形態において、CM はアミノ酸配列 Q T R R V P (配列番号 167) を含む。いくつかの実施形態において、CM はアミノ酸配列 S R R V P L (配列番号 168) を含む。いくつかの実施形態において、CM はアミノ酸配列 S R R V P V (配列番号 169) を含む。いくつかの実施形態において、CM はアミノ酸配列 Q S R R V P L (配列番号 170) を含む。いくつかの実施形態において、CM はアミノ酸配列 Q S R R V P V (配列番号 171) を含む。いくつかの実施形態において、CM はアミノ酸配列 Q T

50

R R V P L (配列番号 172) を含む。いくつかの実施形態において、C M はアミノ酸配列 Q T R R V P V (配列番号 173) を含む。

#### 【0060】

いくつかの実施形態において、C M はアミノ酸配列 P P L G R (配列番号 174) を含むコア C M コンセンサス 3 配列を含む。いくつかの実施形態において、C M は、G P P L G R (配列番号 175)、S P P L G R (配列番号 176)、C G P P L G R (配列番号 177)、C S P P L G R (配列番号 178)、G G P P L G R (配列番号 179)、G S P P L G R (配列番号 180)、S G P P L G R (配列番号 181)、S S P P L G R (配列番号 182)、G C G P P L G R (配列番号 183)、G C S P P L G R (配列番号 184)、G G G P P L G R (配列番号 185)、G G S P P L G R (配列番号 186)、G S G P P L G R (配列番号 187)、G S S P P L G R (配列番号 188)、S C G P P L G R (配列番号 189)、S C S P P L G R (配列番号 190)、S G G P P L G R (配列番号 191)、S G S P P L G R (配列番号 192)、S S G P P L G R (配列番号 193)、及び S S S P P L G R (配列番号 194) から成る群から選択されるアミノ酸配列を含む拡張コア C M コンセンサス 3 配列を含む。

#### 【0061】

いくつかの実施形態において、C M はアミノ酸配列 G P P L G R (配列番号 175) を含む。いくつかの実施形態において、C M はアミノ酸配列 S P P L G R (配列番号 176) を含む。いくつかの実施形態において、C M はアミノ酸配列 C G P P L G R (配列番号 177) を含む。いくつかの実施形態において、C M はアミノ酸配列 C S P P L G R (配列番号 178) を含む。いくつかの実施形態において、C M はアミノ酸配列 G G P P L G R (配列番号 179) を含む。いくつかの実施形態において、C M はアミノ酸配列 G S P P L G R (配列番号 180) を含む。いくつかの実施形態において、C M はアミノ酸配列 S G P P L G R (配列番号 181) を含む。いくつかの実施形態において、C M はアミノ酸配列 S S P P L G R (配列番号 182) を含む。いくつかの実施形態において、C M はアミノ酸配列 G C G P P L G R (配列番号 183) を含む。いくつかの実施形態において、C M はアミノ酸配列 G C S P P L G R (配列番号 184) を含む。いくつかの実施形態において、C M はアミノ酸配列 G G G P P L G R (配列番号 185) を含む。いくつかの実施形態において、C M はアミノ酸配列 G G S P P L G R (配列番号 186) を含む。いくつかの実施形態において、C M はアミノ酸配列 G S G P P L G R (配列番号 187) を含む。いくつかの実施形態において、C M はアミノ酸配列 G S S P P L G R (配列番号 188) を含む。いくつかの実施形態において、C M はアミノ酸配列 S C G P P L G R (配列番号 189) を含む。いくつかの実施形態において、C M はアミノ酸配列 S C S P P L G R (配列番号 190) を含む。いくつかの実施形態において、C M はアミノ酸配列 S G G P P L G R (配列番号 191) を含む。いくつかの実施形態において、C M はアミノ酸配列 S G S P P L G R (配列番号 192) を含む。いくつかの実施形態において、C M はアミノ酸配列 S S G P P L G R (配列番号 193) を含む。いくつかの実施形態において、C M はアミノ酸配列 S S S P P L G R (配列番号 194) を含む。

#### 【0062】

いくつかの実施形態において、C M はアミノ酸配列 L R S G W (配列番号 195) を含むコア C M コンセンサス 4 配列を含む。いくつかの実施形態において、C M は、M L R S G W (配列番号 196)、M L R S G W R (配列番号 197)、M L R S G W R G (配列番号 198)、M L R S G W R L (配列番号 199)、及び M L R S G W R S (配列番号 200) から成る群から選択されるアミノ酸配列を含む拡張コア C M コンセンサス 4 配列を含む。

#### 【0063】

いくつかの実施形態において、アミノ酸配列 M L R S G W、(配列番号 196) を C M は含む。いくつかの実施形態において、C M はアミノ酸配列 M L R S G W R (配列番号 197) を含む。いくつかの実施形態において、C M はアミノ酸配列 M L R S G W R G (配列番号 198) を含む。いくつかの実施形態において、C M はアミノ酸配列 M L R S G W

R L (配列番号 199) を含む。いくつかの実施形態において、C M はアミノ酸配列 M L R S G W R S (配列番号 200) を含む。

【0064】

いくつかの実施形態において、C M はアミノ酸配列 V S R S A (配列番号 201) を含むコア C M コンセンサス 5 配列を含む。いくつかの実施形態において、C M は、I V S R S A (配列番号 202)、Y I V S R S A (配列番号 203)、及び Q Y I V S R S A (配列番号 204) から成る群から選択されるアミノ酸配列を含む拡張コア C M コンセンサス 5 配列を含む。

【0065】

いくつかの実施形態において、C M はアミノ酸配列 I V S R S A (配列番号 202) を含む。いくつかの実施形態において、C M はアミノ酸配列 Y I V S R S A (配列番号 203) を含む。いくつかの実施形態において、C M はアミノ酸配列 Q Y I V S R S A (配列番号 204) を含む。

10

【0066】

いくつかの実施形態において、C M はアミノ酸配列 A L R A P (配列番号 205) を含むコア C M コンセンサス 6 配列を含む。いくつかの実施形態において、C M は、アミノ酸配列 R A L R A P (配列番号 206) を含む拡張コア C M コンセンサス 6 配列を含む。

【0067】

いくつかの実施形態において、C M はアミノ酸配列 P A G R R (配列番号 207) を含むコア C M コンセンサス 7 配列を含む。いくつかの実施形態において、C M は、P A G R R S (配列番号 208)、P A G R R S L (配列番号 209)、V P A G R R S (配列番号 210)、及び V P A G R R S L (配列番号 211) から成る群から選択されるアミノ酸配列を含む拡張コア C M コンセンサス 7 配列を含む。

20

【0068】

いくつかの実施形態において、C M はアミノ酸配列 P A G R R S (配列番号 208) を含む。いくつかの実施形態において、C M はアミノ酸配列 P A G R R S L (配列番号 209) を含む。いくつかの実施形態において、C M はアミノ酸配列 V P A G R R S (配列番号 210) を含む。いくつかの実施形態において、C M はアミノ酸配列 V P A G R R S L (配列番号 211) を含む。

【0069】

いくつかの実施形態において、C M はアミノ酸配列 G R S M L (配列番号 212) を含むコア C M コンセンサス 8 配列を含む。いくつかの実施形態において、C M は、G R S M L L (配列番号 213)、G R S M L M (配列番号 214)、G R S M L L G (配列番号 215)、G R S M L L P (配列番号 216)、G R S M L L S (配列番号 217)、G R S M L M G (配列番号 218)、G R S M L M P (配列番号 219)、G R S M L M S (配列番号 220)、G R S M L L G G (配列番号 221)、G R S M L L P G (配列番号 222)、G R S M L L S G (配列番号 223)、G R S M L M G G (配列番号 224)、G R S M L M P G (配列番号 225)、G R S M L M S G (配列番号 226)、G R S M L L G P (配列番号 227)、G R S M L L P P (配列番号 228)、G R S M L L S P (配列番号 229)、G R S M L M G P (配列番号 230)、G R S M L M P P (配列番号 231)、G R S M L M S P (配列番号 232)、G R S M L L G S (配列番号 233)、G R S M L L P S (配列番号 234)、G R S M L L S S (配列番号 235)、G R S M L M G S (配列番号 236)、G R S M L M P S (配列番号 237)、及び G R S M L M S S (配列番号 238) から成る群から選択されるアミノ酸配列を含む拡張コア C M コンセンサス 8 配列を含む。

30

40

【0070】

いくつかの実施形態において、C M はアミノ酸配列 G R S M L L (配列番号 213) を含む。いくつかの実施形態において、C M はアミノ酸配列 G R S M L M (配列番号 214) を含む。いくつかの実施形態において、C M はアミノ酸配列 G R S M L L G (配列番号 215) を含む。いくつかの実施形態において、C M はアミノ酸配列 G R S M L L P (配

50

列番号 2 1 6 ) を含む。いくつかの実施形態において、C M はアミノ酸配列 G R S M L L S ( 配列番号 2 1 7 ) を含む。いくつかの実施形態において、C M はアミノ酸配列 G R S M L M G ( 配列番号 2 1 8 ) を含む。いくつかの実施形態において、C M はアミノ酸配列 G R S M L M P ( 配列番号 2 1 9 ) を含む。いくつかの実施形態において、C M はアミノ酸配列 G R S M L M S ( 配列番号 2 2 0 ) を含む。いくつかの実施形態において、C M はアミノ酸配列 G R S M L L G G ( 配列番号 2 2 1 ) を含む。いくつかの実施形態において、C M はアミノ酸配列 G R S M L L P G ( 配列番号 2 2 2 ) を含む。いくつかの実施形態において、C M はアミノ酸配列 G R S M L L S G ( 配列番号 2 2 3 ) を含む。いくつかの実施形態において、C M はアミノ酸配列 G R S M L M G G ( 配列番号 2 2 4 ) を含む。いくつかの実施形態において、C M はアミノ酸配列 G R S M L M P G ( 配列番号 2 2 5 ) を含む。いくつかの実施形態において、C M はアミノ酸配列 G R S M L M S G ( 配列番号 2 2 6 ) を含む。いくつかの実施形態において、C M はアミノ酸配列 G R S M L L G P ( 配列番号 2 2 7 ) を含む。いくつかの実施形態において、C M はアミノ酸配列 G R S M L L P P ( 配列番号 2 2 8 ) を含む。いくつかの実施形態において、C M はアミノ酸配列 G R S M L L S P ( 配列番号 2 2 9 ) を含む。いくつかの実施形態において、C M はアミノ酸配列 G R S M L M G P ( 配列番号 2 3 0 ) を含む。いくつかの実施形態において、C M はアミノ酸配列 G R S M L M P P ( 配列番号 2 3 1 ) を含む。いくつかの実施形態において、C M はアミノ酸配列 G R S M L M S P ( 配列番号 2 3 2 ) を含む。いくつかの実施形態において、C M はアミノ酸配列 G R S M L L G S ( 配列番号 2 3 3 ) を含む。いくつかの実施形態において、C M はアミノ酸配列 G R S M L L P S ( 配列番号 2 3 4 ) を含む。いくつかの実施形態において、C M はアミノ酸配列 G R S M L L S S ( 配列番号 2 3 5 ) を含む。いくつかの実施形態において、C M はアミノ酸配列 G R S M L M G S ( 配列番号 2 3 6 ) を含む。いくつかの実施形態において、C M はアミノ酸配列 G R S M L M P S ( 配列番号 2 3 7 ) を含む。いくつかの実施形態において、C M はアミノ酸配列 G R S M L M S S ( 配列番号 2 3 8 ) を含む。

#### 【 0 0 7 1 】

いくつかの実施形態において、C M はアミノ酸配列 L A R A G ( 配列番号 2 3 9 ) を含むコア C M コンセンサス 9 配列を含む。いくつかの実施形態において、C M は、L A R A G I ( 配列番号 2 4 0 )、L A R A G L ( 配列番号 2 4 1 )、P L A R A G I ( 配列番号 2 4 2 )、P L A R A G L ( 配列番号 2 4 3 )、R P L A R A G I ( 配列番号 2 4 4 )、及び R P L A R A G L ( 配列番号 2 4 5 ) から成る群から選択されるアミノ酸配列を含む拡張コア C M コンセンサス 9 配列を含む。

#### 【 0 0 7 2 】

いくつかの実施形態において、C M はアミノ酸配列 L A R A G I ( 配列番号 2 4 0 ) を含む。いくつかの実施形態において、C M はアミノ酸配列 L A R A G L ( 配列番号 2 4 1 ) を含む。いくつかの実施形態において、C M はアミノ酸配列 P L A R A G I ( 配列番号 2 4 2 ) を含む。いくつかの実施形態において、C M はアミノ酸配列 P L A R A G L ( 配列番号 2 4 3 ) を含む。いくつかの実施形態において、C M はアミノ酸配列 R P L A R A G I ( 配列番号 2 4 4 ) を含む。いくつかの実施形態において、C M はアミノ酸配列 R P L A R A G L ( 配列番号 2 4 5 ) を含む。

#### 【 0 0 7 3 】

いくつかの実施形態において、C M はアミノ酸配列 E S R R W ( 配列番号 2 4 6 ) を含むコア C M コンセンサス 1 0 配列を含む。いくつかの実施形態において、C M は、E S R R W M ( 配列番号 2 4 7 )、E S R R W M P ( 配列番号 2 4 8 )、及び P E S R R W M P ( 配列番号 2 4 9 ) から成る群から選択されるアミノ酸配列を含む拡張コア C M コンセンサス 1 0 配列を含む。

#### 【 0 0 7 4 】

いくつかの実施形態において、C M はアミノ酸配列 E S R R W M ( 配列番号 2 4 7 ) を含む。いくつかの実施形態において、C M はアミノ酸配列 E S R R W M P ( 配列番号 2 4 8 ) を含む。いくつかの実施形態において、C M はアミノ酸配列 P E S R R W M P ( 配列

10

20

30

40

50



番号 249) を含む。

【0075】

いくつかの実施形態において、CMは、ILPRSPAF (配列番号250)、VAGRSMRP (配列番号251)、VVPEGRRS (配列番号252)、QGRAITFI (配列番号253)、VLSKQMSF (配列番号254)、LKGRSYYY (配列番号255)、KRMPVQFL (配列番号256)、PQHRIVSF (配列番号257)、YKKFVGS L (配列番号258)、HMMQYARH (配列番号259)、IPFSWSRF (配列番号260)、LSQARWRK (配列番号261)、DISHWRRS (配列番号262)、RKT VQHWW (配列番号263)、RFYRNQFF (配列番号264)、RSLVFAP I (配列番号265)、RSPSRLKC (配列番号266)、及びRKMPNITV (配列番号267) から成る群から選択されるアミノ酸配列を含む。

10

【0076】

いくつかの実施形態において、CMはアミノ酸配列ILPRSPAF (配列番号250) を含む。いくつかの実施形態において、CMはアミノ酸配列VAGRSMRP (配列番号251) を含む。いくつかの実施形態において、CMはアミノ酸配列VVPEGRRS (配列番号252) を含む。いくつかの実施形態において、CMはアミノ酸配列QGRAITFI (配列番号253) を含む。いくつかの実施形態において、CMはアミノ酸配列VLSKQMSF (配列番号254) を含む。いくつかの実施形態において、CMはアミノ酸配列LKGRSYYY (配列番号255) を含む。いくつかの実施形態において、CMはアミノ酸配列KRMPVQFL (配列番号256) を含む。いくつかの実施形態において、CMはアミノ酸配列PQHRIVSF (配列番号257) を含む。いくつかの実施形態において、CMはアミノ酸配列YKKFVGS L (配列番号258) を含む。いくつかの実施形態において、CMはアミノ酸配列HMMQYARH (配列番号259) を含む。いくつかの実施形態において、CMはアミノ酸配列IPFSWSRF (配列番号260) を含む。いくつかの実施形態において、CMはアミノ酸配列LSQARWRK (配列番号261) を含む。いくつかの実施形態において、CMはアミノ酸配列DISHWRRS (配列番号262) を含む。いくつかの実施形態において、CMはアミノ酸配列RKT VQHWW (配列番号263) を含む。いくつかの実施形態において、CMはアミノ酸配列RFYRNQFF (配列番号264) を含む。いくつかの実施形態において、CMはアミノ酸配列RSLVFAP I (配列番号265) を含む。いくつかの実施形態において、CMはアミノ酸配列RSPSRLKC (配列番号266) を含む。いくつかの実施形態において、CMはアミノ酸配列RKMPNITV (配列番号267) を含む。

20

30

【0077】

いくつかの実施形態において、CMは、少なくともuPA及び/又はマトリプターゼのための基質であるモチーフ配列を含んでいて、且つ、以下の表10A~10Jに示すコアCMコンセンサス配列を含んでいる。いくつかの実施形態において、モチーフ配列は、以下の表10A~10Dに示すコアCMコンセンサス配列の亜属、すなわち、亜群を含んでいる。

【0078】

40

【表 37】

表 10A. uPA 及び／又はマトリプターゼ切断可能コア CM コンセンサス配列 11

コア CM コンセンサス 11	コア CM コンセンサス 11 の亜属
$X_{87}X_{88}X_{89}X_{90}X_{91}X_{92}X_{93}X_{94}$ (配列番号 268), 式中, $X_{87}$ は D, I, L, R, S, 又は V であり; $X_{88}$ は C, G, H, I, K, N, R, S, T, 又は Y であり; $X_{89}$ は D, G, 又は S であり; $X_{90}$ は R であり; $X_{91}$ は F 又は S であり; $X_{92}$ は A, D, G, H, I, L, T, 又は V であり; $X_{93}$ は H, I, N, R, S, 又は T であり; 及び $X_{94}$ は H, L, M, R, V 又は Y である	$X_{87}X_{88}X_{89}X_{90}X_{91}X_{92}X_{93}X_{94}$ (配列番号 269), 式中, $X_{87}$ は D, L, S, 又は V であり; $X_{88}$ は C, G, N, R, S, 又は T であり; $X_{89}$ は D, G, 又は S であり; $X_{90}$ は R であり; $X_{91}$ は F 又は S であり; $X_{92}$ は A, G, I, L, T, 又は V であり; $X_{93}$ は H, I, N, 又は S であり; 及び $X_{94}$ は H, M, R, 又は Y である
	$X_{87}X_{88}X_{89}X_{90}X_{91}X_{92}X_{93}X_{94}$ (配列番号 270), 式中, $X_{87}$ は L 又は V であり; $X_{88}$ は G, H, K, N, S, 又は T であり; $X_{89}$ は G であり; $X_{90}$ は R であり; $X_{91}$ は S であり; $X_{92}$ は A 又は D であり; $X_{93}$ は N 又は R であり; 及び $X_{94}$ は H 又は Y である
	$X_{87}X_{88}X_{89}X_{90}X_{91}X_{92}X_{93}X_{94}$ (配列番号 271), 式中, $X_{87}$ は L 又は V であり; $X_{88}$ は G, H, N 又は S であり; $X_{89}$ は G であり; $X_{90}$ は R であり; $X_{91}$ は S であり; $X_{92}$ は A 又は D であり; $X_{93}$ は N であり; 及び $X_{94}$ は H である
	$X_{87}X_{88}X_{89}X_{90}X_{91}X_{92}X_{93}X_{94}$ (配列番号 272), 式中, $X_{87}$ は L 又は V であり; $X_{88}$ は S であり; $X_{89}$ は G であり; $X_{90}$ は R であり; $X_{91}$ は S であり; $X_{92}$ は A 又は D であり; $X_{93}$ は N であり; 及び $X_{94}$ は H である
	$X_{87}X_{88}X_{89}X_{90}X_{91}X_{92}X_{93}X_{94}$ (配列番号 273), 式中, $X_{87}$ は L 又は V であり; $X_{88}$ は G 又は S であり; $X_{89}$ は G であり; $X_{90}$ は R であり; $X_{91}$ は S であり; $X_{92}$ は A であり; $X_{93}$ は N であり; 及び $X_{94}$ は H である

10

20

## 【表 3 8】

表 1 0 B.  $\mu$ PA 及び／又はマトリプターゼ切断可能コア CM コンセンサス配列 1 2

コア CM コンセンサス 12	コア CM コンセンサス 12 の亜属
$X_{99}X_{100}X_{101}X_{102}X_{103}X_{104}X_{105}X_{106}$ (配列番号 274) , 式中, $X_{99}$ は D, I, L, R, S, 又は V であり; $X_{100}$ は C, G, H, I, K, N, R, S, T 又は Y であり; $X_{101}$ は D, G, 又は S であり; $X_{102}$ は R であり; $X_{103}$ は F 又は S であり; $X_{104}$ は A, D, G, H, I, L, T, 又は V であり; $X_{105}$ は H, I, N, R, S, 又は T であり; 及び $X_{106}$ は H, L, M, R, V, 又は Y である	$X_{99}X_{100}X_{101}X_{102}X_{103}X_{104}X_{105}X_{106}$ (配列番号 275), 式中, $X_{99}$ は L であり; $X_{100}$ は N, S, 又は T であり; $X_{101}$ は G であり; $X_{102}$ は R であり; $X_{103}$ は S であり; $X_{104}$ は A, D, 又は H であり; $X_{105}$ は N 又は R であり; 及び $X_{106}$ は H, L, V, 又は Y である
	$X_{99}X_{100}X_{101}X_{102}X_{103}X_{104}X_{105}X_{106}$ (配列番号 276), 式中, $X_{99}$ は L 又は V であり; $X_{100}$ は G, H, K, N, S, 又は T であり; $X_{101}$ は G であり; $X_{102}$ は R であり; $X_{103}$ は S であり; $X_{104}$ は A 又は D であり; $X_{105}$ は N 又は R であり; 及び $X_{106}$ は H 又は Y である
	$X_{99}X_{100}X_{101}X_{102}X_{103}X_{104}X_{105}X_{106}$ (配列番号 277), 式中, $X_{99}$ は L 又は V であり; $X_{100}$ は G, H, N, 又は S であり; $X_{101}$ は G であり; $X_{102}$ は R であり; $X_{103}$ は S であり; $X_{104}$ は A 又は D であり; $X_{105}$ は N であり; 及び $X_{106}$ は H である
	$X_{99}X_{100}X_{101}X_{102}X_{103}X_{104}X_{105}X_{106}$ (配列番号 278), 式中, $X_{99}$ は L 又は V であり; $X_{100}$ は S であり; $X_{101}$ は G であり; $X_{102}$ は R であり; $X_{103}$ は S であり; $X_{104}$ は A 又は D であり; $X_{105}$ は N であり; 及び $X_{106}$ は H である
	$X_{99}X_{100}X_{101}X_{102}X_{103}X_{104}X_{105}X_{106}$ (配列番号 279), 式中, $X_{99}$ は L であり; $X_{100}$ は N 又は S であり; $X_{101}$ は G であり; $X_{102}$ は R であり; $X_{103}$ は S であり; $X_{104}$ は A 又は D であり; $X_{105}$ は N 又は R であり; 及び $X_{106}$ は H である

【 0 0 8 0 】

## 【表 3 9】

表 1 0 C.  $\mu$ PA 及び／又はマトリプターゼ切断可能コア CM コンセンサス配列 1 3

コア CM コンセンサス 13	コア CM コンセンサス 13 の亜属
$X_{111}X_{112}X_{113}X_{114}X_{115}X_{116}X_{117}X_{118}$ (配列番号 280) , 式中, $X_{111}$ は C, G, H, L, P, R, S, T, 又は V であり; $X_{112}$ は I, L, M, N, S, T, V, 又は Y であり; $X_{113}$ は A, D, E, G, K, R, 又は V であり; $X_{114}$ は A, C, G, H, L, R, S, T, 又は V であり; $X_{115}$ は C, F, P, S, T, V, 又は Y であり; $X_{116}$ は A, D, E, G, H, N, T, V, 又は Y であり; $X_{117}$ は D, E, H, K, N, Q, R, S, T であり; ; 及び $X_{118}$ は H, L, N, R, S, V, 又は Y である	$X_{111}X_{112}X_{113}X_{114}X_{115}X_{116}X_{117}X_{118}$ (配列番号 281), 式中, $X_{111}$ は C 又は R であり; $X_{112}$ は I, S, 又は Y であり; $X_{113}$ は G 又は R であり; $X_{114}$ は R 又は S であり; $X_{115}$ は F, P, 又は S であり; $X_{116}$ は D, G, 又は H であり; $X_{117}$ は H 又は N であり; 及び $X_{118}$ は H である
	$X_{111}X_{112}X_{113}X_{114}X_{115}X_{116}X_{117}X_{118}$ (配列番号 282), 式中, $X_{111}$ は R であり; $X_{112}$ は I であり; $X_{113}$ は G であり; $X_{114}$ は R であり; $X_{115}$ は S であり; $X_{116}$ は D 又は H であり; $X_{117}$ は N であり; 及び $X_{118}$ は H である

10

20

30

40

50

【 0 0 8 1 】

【 表 4 0 】

表 1 0 D. u P A 及び／又はマトリプターゼ切断可能コア C M コンセンサス配列 1 4

コア C M コンセンサス 14	コア C M コンセンサス 14 の亜属
$X_{123}X_{124}X_{125}X_{126}X_{127}X_{128}X_{129}X_{130}$ (配列番号 283) , 式中, $X_{123}$ は L, R, T, 又は V であり; $X_{124}$ は E, G, I, N, R, 又は S であり; $X_{125}$ は G であり; $X_{126}$ は R であり; $X_{127}$ は P 又は S であり; $X_{128}$ は A, G, 又は Y であり; $X_{129}$ は E, K, N, 又は Y であり; 及び $X_{130}$ は P, Q, 又は S である	$X_{123}X_{124}X_{125}X_{126}X_{127}X_{128}X_{129}X_{130}$ (配列番号 284), 式中, $X_{123}$ は L 又は T であり; $X_{124}$ は E, R, 又は S であり; $X_{125}$ は G であり; $X_{126}$ は R であり; $X_{127}$ は P 又は S であり; $X_{128}$ は A, G, 又は Y であり; $X_{129}$ は E 又は N であり; 及び $X_{130}$ は P, Q, 又は S である
	$X_{123}X_{124}X_{125}X_{126}X_{127}X_{128}X_{129}X_{130}$ (配列番号 285), 式中, $X_{123}$ は L, T, 又は V であり; $X_{124}$ は R 又は S であり; $X_{125}$ は G であり; $X_{126}$ は R であり; $X_{127}$ は S であり; $X_{128}$ は A 又は G であり; $X_{129}$ は K, N 又は Y であり; 及び $X_{130}$ は P である
	$X_{123}X_{124}X_{125}X_{126}X_{127}X_{128}X_{129}X_{130}$ (配列番号 286), 式中, $X_{123}$ は L 又は T であり; $X_{124}$ は S であり; $X_{125}$ は G であり; $X_{126}$ は R であり; $X_{127}$ は S であり; $X_{128}$ は A 又は G であり; $X_{129}$ は N であり; 及び $X_{130}$ は P である

10

20

【 0 0 8 2 】

いくつかの実施形態において、モチーフ配列は、少なくとも u P A 及び／又はマトリプターゼのための基質であり、且つ、表 1 0 A ~ 1 0 D に示すコア C M コンセンサス配列の 1 つに基づく拡張コンセンサス配列を含んでいる。いくつかの実施形態において、拡張コンセンサス配列は、以下の表 1 1 A ~ 1 1 D に示すコンセンサス配列である。

【 0 0 8 3 】

【表 4 1】

表 1 1 A. uPA 及び／又はマトリプターゼ切断可能拡張コア CM コンセンサス配列 1 1

拡張コア CM コンセンサス 11	拡張コア CM コンセンサス 11 の亜属
$X_{85}X_{86}X_{87}X_{88}X_{89}X_{90}X_{91}X_{92}X_{93}X_{94}X_{95}X_{96}$ (配列番号 287), 式中, $X_{85}$ は A, D, G, K, L, N, R, S, T, 又は V であり; $X_{86}$ は A, G, K, M, P, Q, R, S, 又は T であり; $X_{87}$ は D, I, L, R, S, 又は V であり; $X_{88}$ は C, G, H, I, K, N, R, S, T, 又は Y であり; $X_{89}$ は D, G, 又は S であり; $X_{90}$ は R であり; $X_{91}$ は F 又は S であり; $X_{92}$ は A, D, G, H, I, L, T, 又は V であり; $X_{93}$ は H, I, N, R, S, 又は T であり; $X_{94}$ は H, L, M, R, V 又は Y であり; $X_{95}$ は E, G, K, N, Q, R, 又は V であり; 及び $X_{96}$ は A, G, K, L, Q, R, 又は S である	$X_{85}X_{86}X_{87}X_{88}X_{89}X_{90}X_{91}X_{92}X_{93}X_{94}X_{95}X_{96}$ (配列番号 288), 式中, $X_{85}$ は A, D, G, K, N, S, 又は V であり; $X_{86}$ は A, G, K, M, R, S, 又は T であり; $X_{87}$ は D, L, S, 又は V であり; $X_{88}$ は C, G, N, R, S, 又は T であり; $X_{89}$ は D, G, 又は S であり; $X_{90}$ は R であり; $X_{91}$ は F 又は S であり; $X_{92}$ は A, G, I, L, T, 又は V であり; $X_{93}$ は H, I, N, 又は S であり; $X_{94}$ は H, M, R, 又は Y であり; $X_{95}$ は E, G, K, 又は R であり; 及び $X_{96}$ は K, R, 又は S である
	$X_{85}X_{86}X_{87}X_{88}X_{89}X_{90}X_{91}X_{92}X_{93}X_{94}X_{95}X_{96}$ (配列番号 289), 式中, $X_{85}$ は A, D, G, N, R, 又は T であり; $X_{86}$ は G, K, P, R, S, 又は T であり; $X_{87}$ は L 又は V であり; $X_{88}$ は G, H, K, N, S, 又は T であり; $X_{89}$ は G であり; $X_{90}$ は R であり; $X_{91}$ は S であり; $X_{92}$ は A 又は D であり; $X_{93}$ は N 又は R であり; $X_{94}$ は H 又は Y であり; $X_{95}$ は E, K, N, Q, 又は R であり; 及び $X_{96}$ は A, K, 又は R である
	$X_{85}X_{86}X_{87}X_{88}X_{89}X_{90}X_{91}X_{92}X_{93}X_{94}X_{95}X_{96}$ (配列番号 290), 式中, $X_{85}$ は A, D, G, 又は R であり; $X_{86}$ は K, P, R 又は T であり; $X_{87}$ は L 又は V であり; $X_{88}$ は G, H, N 又は S であり; $X_{89}$ は G であり; $X_{90}$ は R であり; $X_{91}$ は S であり; $X_{92}$ は A 又は D であり; $X_{93}$ は N であり; $X_{94}$ は H であり; $X_{95}$ は K, N, 又は R であり; 及び $X_{96}$ は A, K, 又は R である
	$X_{85}X_{86}X_{87}X_{88}X_{89}X_{90}X_{91}X_{92}X_{93}X_{94}X_{95}X_{96}$ (配列番号 291), 式中, $X_{85}$ は A 又は D であり; $X_{86}$ は K, P, 又は R であり; $X_{87}$ は L 又は V であり; $X_{88}$ は S であり; $X_{89}$ は G であり; $X_{90}$ は R であり; $X_{91}$ は S であり; $X_{92}$ は A 又は D であり; $X_{93}$ は N であり; $X_{94}$ は H であり; $X_{95}$ は K 又は R であり; 及び $X_{96}$ は K 又は R である
	$X_{85}X_{86}X_{87}X_{88}X_{89}X_{90}X_{91}X_{92}X_{93}X_{94}X_{95}X_{96}$ (配列番号 292), 式中, $X_{85}$ は D, G, 又は N であり; $X_{86}$ は K, R, 又は S であり; $X_{87}$ は L 又は V であり; $X_{88}$ は G 又は S であり; $X_{89}$ は G であり; $X_{90}$ は R であり; $X_{91}$ は S であり; $X_{92}$ は A であり; $X_{93}$ は N であり; $X_{94}$ は H であり; $X_{95}$ は K であり; 及び $X_{96}$ は K である

10

20

30

40

【表 4 2】

表 1 1 B. u P A 及び／又はマトリプターゼ切断可能拡張コア CM コンセンサス配列 1 2

拡張コア CM コンセンサス 12	拡張コア CM コンセンサス 12 の亜属
$X_{97}X_{98}X_{99}X_{100}X_{101}X_{102}X_{103}X_{104}X_{105}X_{106}X_{107}X_{108}$ (配列番号 293), 式中, $X_{97}$ は A, D, G, K, L, N, R, S, T, 又は V であり; $X_{98}$ は A, G, K, M, P, Q, R, S, 又は T であり; $X_{99}$ は D, I, L, R, S, 又は V であり; $X_{100}$ は C, G, H, I, K, N, R, S, T 又は Y であり; $X_{101}$ は D, G, 又は S であり; $X_{102}$ は R であり; $X_{103}$ は F 又は S であり; $X_{104}$ は A, D, G, H, I, L, T, 又は V であり; $X_{105}$ は H, I, N, R, S, 又は T であり; $X_{106}$ は H, L, M, R, V, 又は Y であり; $X_{107}$ は E, G, K, N, Q, R, 又は V であり; 及び $X_{108}$ は A, G, K, L, Q, R, 又は S である	$X_{97}X_{98}X_{99}X_{100}X_{101}X_{102}X_{103}X_{104}X_{105}X_{106}X_{107}X_{108}$ (配列番号 294), 式中, $X_{97}$ は D, G, K, 又は R であり; $X_{98}$ は G, P, 又は R であり; $X_{99}$ は L であり; $X_{100}$ は N, S, 又は T であり; $X_{101}$ は G であり; $X_{102}$ は R であり; $X_{103}$ は S であり; $X_{104}$ は A, D, 又は H であり; $X_{105}$ は N 又は R であり; $X_{106}$ は H, L, V, 又は Y であり; $X_{107}$ は E, G, K, N, Q, 又は R であり; 及び $X_{108}$ は A, G, K, L, Q, 又は R である
	$X_{97}X_{98}X_{99}X_{100}X_{101}X_{102}X_{103}X_{104}X_{105}X_{106}X_{107}X_{108}$ (配列番号 295), 式中, $X_{97}$ は A, D, G, N, R, 又は T であり; $X_{98}$ は G, K, P, R, S, 又は T であり; $X_{99}$ は L 又は V であり; $X_{100}$ は G, H, K, N, S, 又は T であり; $X_{101}$ は G であり; $X_{102}$ は R であり; $X_{103}$ は S であり; $X_{104}$ は A 又は D であり; $X_{105}$ は N 又は R であり; $X_{106}$ は H 又は Y であり; $X_{107}$ は E, K, N, Q, 又は R であり; 及び $X_{108}$ は A, K, 又は R である
	$X_{97}X_{98}X_{99}X_{100}X_{101}X_{102}X_{103}X_{104}X_{105}X_{106}X_{107}X_{108}$ (配列番号 296), 式中, $X_{97}$ は A, D, G, 又は R であり; $X_{98}$ は K, P, R, 又は T であり; $X_{99}$ は L 又は V であり; $X_{100}$ は G, H, N, 又は S であり; $X_{101}$ は G であり; $X_{102}$ は R であり; $X_{103}$ は S であり; $X_{104}$ は A 又は D であり; $X_{105}$ は N であり; $X_{106}$ は H であり; $X_{107}$ は K, N, 又は R であり; 及び $X_{108}$ は A, K, 又は R である
	$X_{97}X_{98}X_{99}X_{100}X_{101}X_{102}X_{103}X_{104}X_{105}X_{106}X_{107}X_{108}$ (配列番号 297), 式中, $X_{97}$ は A 又は D であり; $X_{98}$ は K, P, 又は R であり; $X_{99}$ は L 又は V であり; $X_{100}$ は S であり; $X_{101}$ は G であり; $X_{102}$ は R であり; $X_{103}$ は S であり; $X_{104}$ は A 又は D であり; $X_{105}$ は N であり; $X_{106}$ は H であり; $X_{107}$ は K 又は R であり; 及び $X_{108}$ は K 又は R である
	$X_{97}X_{98}X_{99}X_{100}X_{101}X_{102}X_{103}X_{104}X_{105}X_{106}X_{107}X_{108}$ (配列番号 298), 式中, $X_{97}$ は G 又は R であり; $X_{98}$ は P であり; $X_{99}$ は L であり; $X_{100}$ は N 又は S であり; $X_{101}$ は G であり; $X_{102}$ は R であり; $X_{103}$ は S であり; $X_{104}$ は A 又は D であり; $X_{105}$ は N 又は R であり; $X_{106}$ は H であり; $X_{107}$ は K, Q, 又は R であり; 及び $X_{108}$ は A, K, 又は R である

## 【表 4 3】

表 1 1 C.  $\mu$ PA 及び／又はマトリプターゼ切断可能拡張コア CM コンセンサス配列 1 3

拡張コア CM コンセンサス 13	拡張コア CM コンセンサス 13 の亜属
$X_{109}X_{110}X_{111}X_{112}X_{113}X_{114}X_{115}X_{116}X_{117}X_{118}X_{119}X_{120}$ (配列番号 299), 式中, $X_{109}$ は A, D, G, H, I, K, N, R, S, T, 又は Y であり; $X_{110}$ は D, G, H, L, N, Q, R, 又は Y であり; $X_{111}$ は C, G, H, L, P, R, S, T, 又は V であり; $X_{112}$ は I, L, M, N, S, T, V, 又は Y であり; $X_{113}$ は A, D, E, G, K, R, 又は V であり; $X_{114}$ は A, C, G, H, L, R, S, T, 又は V であり; $X_{115}$ は C, F, P, S, T, V, 又は Y であり; $X_{116}$ は A, D, E, G, H, N, T, V, 又は Y であり; $X_{117}$ は D, E, H, K, N, Q, R, S, T であり; $X_{118}$ は H, L, N, R, S, V, 又は Y であり; $X_{119}$ は E, G, K, L, N, Q, R, S, V, 又は W であり; 及び $X_{120}$ は A, E, G, K, L, N, P, Q, R, 又は W である	$X_{109}X_{110}X_{111}X_{112}X_{113}X_{114}X_{115}X_{116}X_{117}X_{118}X_{119}X_{120}$ (配列番号 300), 式中, $X_{109}$ は N であり; $X_{110}$ は H 又は R であり; $X_{111}$ は C 又は R であり; $X_{112}$ は I, S, 又は Y であり; $X_{113}$ は G 又は R であり; $X_{114}$ は R 又は S であり; $X_{115}$ は F, P, 又は S であり; $X_{116}$ は D, G, 又は H であり; $X_{117}$ は H 又は N であり; $X_{118}$ は H であり; $X_{119}$ は E, K, R, 又は V であり; 及び $X_{120}$ は A, G, Q, R, 又は W である  $X_{109}X_{110}X_{111}X_{112}X_{113}X_{114}X_{115}X_{116}X_{117}X_{118}X_{119}X_{120}$ (配列番号 301), 式中, $X_{109}$ は N であり; $X_{110}$ は H であり; $X_{111}$ は R であり; $X_{112}$ は I であり; $X_{113}$ は G であり; $X_{114}$ は R であり; $X_{115}$ は S であり; $X_{116}$ は D 又は H であり; $X_{117}$ は N であり; $X_{118}$ は H であり; $X_{119}$ は R であり; 及び $X_{120}$ は G 又は R である

10

20

## 【 0 0 8 6 】

30

【表 4 4】

表 1 1 D.  $\alpha$  P A 及び/又はマトリプターゼ切断可能拡張コア CM コンセンサス配列 1 4

拡張コア CM コンセンサス 14	拡張コア CM コンセンサス 14 の亜属
$X_{121}X_{122}X_{123}X_{124}X_{125}X_{126}X_{127}X_{128}X_{129}X_{130}X_{131}X_{132}$ (配列番号 302), 式中, $X_{121}$ は A, D, G, M, N, P, R, 又は T であり; $X_{122}$ は A, H, K, P, R, 又は S であり; $X_{123}$ は L, R, T, 又は V であり; $X_{124}$ は E, G, I, N, R, 又は S であり; $X_{125}$ は G であり; $X_{126}$ は R であり; $X_{127}$ は P 又は S であり; $X_{128}$ は A, G, 又は Y であり; $X_{129}$ は E, K, N, 又は Y であり; $X_{130}$ は P, Q, 又は S であり; $X_{131}$ は E, K, 又は R であり; 及び $X_{132}$ は D, E, G, H, 又は R である	$X_{121}X_{122}X_{123}X_{124}X_{125}X_{126}X_{127}X_{128}X_{129}X_{130}X_{131}X_{132}$ (配列番号 303), 式中, $X_{121}$ は M, N, P, R, 又は T であり; $X_{122}$ は A, P, 又は S であり; $X_{123}$ は L 又は T であり; $X_{124}$ は E, R, 又は S であり; $X_{125}$ は G であり; $X_{126}$ は R であり; $X_{127}$ は P 又は S であり; $X_{128}$ は A, G, 又は Y であり; $X_{129}$ は E 又は N であり; $X_{130}$ は P, Q, 又は S であり; $X_{131}$ は E, K, R であり; 及び $X_{132}$ は E, G, 又は R である
	$X_{121}X_{122}X_{123}X_{124}X_{125}X_{126}X_{127}X_{128}X_{129}X_{130}X_{131}X_{132}$ (配列番号 304), 式中, $X_{121}$ は G, N, 又は T であり; $X_{122}$ は A, P, 又は S であり; $X_{123}$ は L, T, 又は V であり; $X_{124}$ は R 又は S であり; $X_{125}$ は G であり; $X_{126}$ は R であり; $X_{127}$ は S であり; $X_{128}$ は A 又は G であり; $X_{129}$ は K, N 又は Y であり; $X_{130}$ は P であり; $X_{131}$ は K 又は R であり; 及び $X_{132}$ は D, G 又は H である
	$X_{121}X_{122}X_{123}X_{124}X_{125}X_{126}X_{127}X_{128}X_{129}X_{130}X_{131}X_{132}$ (配列番号 305), 式中, $X_{121}$ は T であり; $X_{122}$ は P 又は S であり; $X_{123}$ は L 又は T であり; $X_{124}$ は S であり; $X_{125}$ は G であり; $X_{126}$ は R であり; $X_{127}$ は S であり; $X_{128}$ は A 又は G であり; $X_{129}$ は N であり; $X_{130}$ は P であり; $X_{131}$ は K 又は R であり; 及び $X_{132}$ は G 又は H である
	$X_{121}X_{122}X_{123}X_{124}X_{125}X_{126}X_{127}X_{128}X_{129}X_{130}X_{131}X_{132}$ (配列番号 306), 式中, $X_{121}$ は T であり; $X_{122}$ は S であり; $X_{123}$ は L 又は T であり; $X_{124}$ は S であり; $X_{125}$ は G であり; $X_{126}$ は R であり; $X_{127}$ は S であり; $X_{128}$ は A 又は G であり; $X_{129}$ は N であり; $X_{130}$ は P であり; $X_{131}$ は R であり; 及び $X_{132}$ は G である

10

20

30

## 【 0 0 8 7 】

いくつかの実施形態において、CM は、アミノ酸配列 L S G R S A N H (配列番号 3 0 7) 又は L S G R S G N H (配列番号 3 0 8) を含むコア CM コンセンサス 1 1 配列を含む。いくつかの実施形態において、CM は、アミノ酸配列 D R L S G R S A N H K K (配列番号 3 0 9)、D R L S G R S D N H K K (配列番号 3 1 0)、又は N T L S G R S G N H G S (配列番号 3 1 1) を含む拡張コア CM コンセンサス 1 1 配列を含む。

## 【 0 0 8 8 】

いくつかの実施形態において、CM はアミノ酸配列 L S G R S A N H (配列番号 3 0 7) を含む。いくつかの実施形態において、CM はアミノ酸配列 L S G R S G N H (配列番号 3 0 8) を含む。いくつかの実施形態において、CM はアミノ酸配列 D R L S G R S A N H K K (配列番号 3 0 9) を含む。いくつかの実施形態において、CM はアミノ酸配列 D R L S G R S D N H K K (配列番号 3 1 0) を含む。いくつかの実施形態において、CM はアミノ酸配列 N T L S G R S G N H G S (配列番号 3 1 1) を含む。

## 【 0 0 8 9 】

いくつかの実施形態において、CM はアミノ酸配列 L S G R S A N H (配列番号 3 0 7) を含む。いくつかの実施形態において、CM はアミノ酸配列 L N G R S D N H (配列番号 3 1 3) を含む。いくつかの実施形態において、CM はアミノ酸配列 L T G R S D R H

40

50



(配列番号314)を含む。いくつかの実施形態において、CMは、アミノ酸配列LSGRS ANH(配列番号307)、LNGRSDNH(配列番号313)、及びLTGRSDRH(配列番号314)を含むコアCMコンセンサス12配列を含む。いくつかの実施形態において、CMは、DRLSGRS ANHKK(配列番号309)、DRLSGRSDNHKK(配列番号310)、GPLNGRSDNHKA(配列番号320)、GPLNGRSDNHKK(配列番号321)、GPLNGRSDNHKR(配列番号322)、GPLNGRSDNHQA(配列番号323)、GPLNGRSDNHQK(配列番号324)、GPLNGRSDNHQR(配列番号325)、GPLNGRSDNHRA(配列番号326)、GPLNGRSDNHRK(配列番号327)、GPLNGRSDNHRR(配列番号328)、RPLNGRSDNHKA(配列番号329)、RPLNGRSDNHKK(配列番号330)、RPLNGRSDNHKR(配列番号331)、RPLNGRSDNHQA(配列番号332)、RPLNGRSDNHQK(配列番号333)、RPLNGRSDNHQR(配列番号334)、RPLNGRSDNHRA(配列番号335)、RPLNGRSDNHRK(配列番号336)、RPLNGRSDNHRR(配列番号337)、GPLSGRSDNHKA(配列番号338)、GPLSGRSDNHKK(配列番号339)、GPLSGRSDNHKR(配列番号340)、GPLSGRSDNHQA(配列番号341)、GPLSGRSDNHQK(配列番号342)、GPLSGRSDNHQR(配列番号343)、GPLSGRSDNHRA(配列番号344)、GPLSGRSDNHRK(配列番号345)、GPLSGRSDNHRR(配列番号346)、RPLSGRSDNHKA(配列番号347)、RPLSGRSDNHKK(配列番号348)、RPLSGRSDNHKR(配列番号349)、RPLSGRSDNHQA(配列番号350)、RPLSGRSDNHQK(配列番号351)、RPLSGRSDNHQR(配列番号352)、RPLSGRSDNHRA(配列番号353)、RPLSGRSDNHRK(配列番号354)、RPLSGRSDNHRR(配列番号355)、及びKGLTGRSDRHQA(配列番号356)から成る群から選択されるアミノ酸配列を含む拡張コアCMコンセンサス12配列を含む。

#### 【0090】

いくつかの実施形態において、CMはアミノ酸配列DRLSGRS ANHKK(配列番号309)を含む。いくつかの実施形態において、CMはアミノ酸配列DRLSGRSDNHKK(配列番号310)を含む。いくつかの実施形態において、CMはアミノ酸配列GPLNGRSDNHKA(配列番号320)を含む。いくつかの実施形態において、CMはアミノ酸配列GPLNGRSDNHKK(配列番号321)を含む。いくつかの実施形態において、CMはアミノ酸配列GPLNGRSDNHKR(配列番号322)を含む。いくつかの実施形態において、CMはアミノ酸配列GPLNGRSDNHQA(配列番号323)を含む。いくつかの実施形態において、CMはアミノ酸配列GPLNGRSDNHQK(配列番号324)を含む。いくつかの実施形態において、CMはアミノ酸配列GPLNGRSDNHQR(配列番号325)を含む。いくつかの実施形態において、CMはアミノ酸配列GPLNGRSDNHRA(配列番号326)を含む。いくつかの実施形態において、CMはアミノ酸配列GPLNGRSDNHRK(配列番号327)を含む。いくつかの実施形態において、CMはアミノ酸配列GPLNGRSDNHRR(配列番号328)を含む。いくつかの実施形態において、CMはアミノ酸配列RPLNGRSDNHKA(配列番号329)を含む。いくつかの実施形態において、CMはアミノ酸配列RPLNGRSDNHKK(配列番号330)を含む。いくつかの実施形態において、CMはアミノ酸配列RPLNGRSDNHKR(配列番号331)を含む。いくつかの実施形態において、CMはアミノ酸配列RPLNGRSDNHQA(配列番号332)を含む。いくつかの実施形態において、CMはアミノ酸配列RPLNGRSDNHQK(配列番号333)を含む。いくつかの実施形態において、CMはアミノ酸配列RPLNGRSDNHQR(配列番号334)を含む。いくつかの実施形態において、CMはアミノ酸配列RPLNGRSDNHRA(配列番号335)を含む。いくつかの実施形態において、CMはアミノ酸配列RPLNGRSDNHRK(配列番号336)を含む。いくつかの実施

形態において、CMはアミノ酸配列RPLNGRSDNHRR（配列番号337）を含む。いくつかの実施形態において、CMはアミノ酸配列GPLSGRSDNHKA（配列番号338）を含む。いくつかの実施形態において、CMはアミノ酸配列GPLSGRSDNHKK（配列番号339）を含む。いくつかの実施形態において、CMはアミノ酸配列GPLSGRSDNHKR（配列番号340）を含む。いくつかの実施形態において、CMはアミノ酸配列GPLSGRSDNHQA（配列番号341）を含む。いくつかの実施形態において、CMはアミノ酸配列GPLSGRSDNHQK（配列番号342）を含む。いくつかの実施形態において、CMはアミノ酸配列GPLSGRSDNHQR（配列番号343）を含む。いくつかの実施形態において、CMはアミノ酸配列GPLSGRSDNHRA（配列番号344）を含む。いくつかの実施形態において、CMはアミノ酸配列GPLSGRSDNHRK（配列番号345）を含む。いくつかの実施形態において、CMはアミノ酸配列GPLSGRSDNHRR（配列番号346）を含む。いくつかの実施形態において、CMはアミノ酸配列RPLSGRSDNHKA（配列番号347）を含む。いくつかの実施形態において、CMはアミノ酸配列RPLSGRSDNHKK（配列番号348）を含む。いくつかの実施形態において、CMはアミノ酸配列RPLSGRSDNHKR（配列番号349）を含む。いくつかの実施形態において、CMはアミノ酸配列RPLSGRSDNHQA（配列番号350）を含む。いくつかの実施形態において、CMはアミノ酸配列RPLSGRSDNHQK（配列番号351）を含む。いくつかの実施形態において、CMはアミノ酸配列RPLSGRSDNHQR（配列番号352）を含む。いくつかの実施形態において、CMはアミノ酸配列RPLSGRSDNHRA（配列番号353）を含む。いくつかの実施形態において、CMはアミノ酸配列RPLSGRSDNHRK（配列番号354）を含む。いくつかの実施形態において、CMはアミノ酸配列RPLSGRSDNHRR（配列番号355）を含む。いくつかの実施形態において、CMはアミノ酸配列KGLTGRSDRHHQA（配列番号356）を含む。

10

20

#### 【0091】

いくつかの実施形態において、CMは、アミノ酸配列RIGRSDNH（配列番号357）又はRLGRSDNN（配列番号358）を含むコアCMコンセンサス13配列を含む。いくつかの実施形態において、CMは、アミノ酸配列NHRIGRSDNHRR（配列番号359）又はTLRLGRSDNNKN（配列番号360）を含む拡張コアCMコンセンサス13配列を含む。

30

#### 【0092】

いくつかの実施形態において、CMはアミノ酸配列RIGRSDNH（配列番号357）を含む。いくつかの実施形態において、CMはアミノ酸配列RLGRSDNN（配列番号358）を含む。いくつかの実施形態において、CMはアミノ酸配列NHRIGRSDNHRR（配列番号359）を含む。いくつかの実施形態において、CMはアミノ酸配列TLRLGRSDNNKN（配列番号360）を含む。

#### 【0093】

いくつかの実施形態において、CMは、TSGRSANP（配列番号361）、TSGRSGNP（配列番号362）、LSGRSANP（配列番号363）、及びLSGRSGNP（配列番号364）から成る群から選択されるアミノ酸配列を含むコアCMコンセンサス14配列を含む。いくつかの実施形態において、CMは、TSTSGRSANPRG（配列番号365）、TSTSGRSGNPRG（配列番号366）、TSLSGRSANPRG（配列番号367）、及びTSLSGRSGNPRG（配列番号368）から成る群から選択されるアミノ酸配列を含む拡張コアCMコンセンサス14配列を含む。

40

#### 【0094】

いくつかの実施形態において、CMはアミノ酸配列TSGRSANP（配列番号361）を含む。いくつかの実施形態において、CMはアミノ酸配列TSGRSGNP（配列番号362）を含む。いくつかの実施形態において、CMはアミノ酸配列LSGRSANP（配列番号363）を含む。いくつかの実施形態において、CMはアミノ酸配列LSGRSGNP（配列番号364）を含む。いくつかの実施形態において、CMはアミノ酸配列

50

T S T S G R S A N P R G (配列番号 3 6 5) を含む。いくつかの実施形態において、C M はアミノ酸配列 T S T S G R S G N P R G (配列番号 3 6 6) を含む。いくつかの実施形態において、C M はアミノ酸配列 T S L S G R S A N P R G (配列番号 3 6 7) を含む。いくつかの実施形態において、C M はアミノ酸配列と T S L S G R S G N P R G (配列番号 3 6 8) を含む。

#### 【 0 0 9 5 】

いくつかの実施形態において、C M は、L S G R S E N H (配列番号 3 6 9)、S I A R S D N L (配列番号 3 7 0)、L S G R S V T Q (配列番号 3 7 1)、L S G R S G N H (配列番号 3 0 8)、L T G R S D R H (配列番号 3 1 4)、L Y G R S E N N (配列番号 3 7 4)、R L G R S D N N (配列番号 3 7 5)、T S G R S A N P (配列番号 3 7 6)、N T L S G R S E N H S G (配列番号 3 7 7)、P P S I A R S D N L A N (配列番号 3 7 8)、T G L S G R S V T Q T S (配列番号 3 7 9)、N T L S G R S G N H G S (配列番号 3 1 1)、K G L T G R S D R H Q A (配列番号 3 8 1)、K N L Y G R S E N N G N (配列番号 3 8 2)、T L R L G R S D N N K N (配列番号 3 8 3)、及び T S T S G R S A N P R G (配列番号 3 8 4) から成る群から選択されるアミノ酸配列を含む。

#### 【 0 0 9 6 】

いくつかの実施形態において、C M はアミノ酸配列 L S G R S E N H (配列番号 3 6 9) を含む。いくつかの実施形態において、C M はアミノ酸配列 S I A R S D N L (配列番号 3 7 0) を含む。いくつかの実施形態において、C M はアミノ酸配列 L S G R S V T Q (配列番号 3 7 1) を含む。いくつかの実施形態において、C M はアミノ酸配列 L S G R S G N H (配列番号 3 0 8) を含む。いくつかの実施形態において、C M はアミノ酸配列 L T G R S D R H (配列番号 3 1 4) を含む。いくつかの実施形態において、C M はアミノ酸配列 L Y G R S E N N (配列番号 3 7 4) を含む。いくつかの実施形態において、C M はアミノ酸配列 R L G R S D N N (配列番号 3 7 5) を含む。いくつかの実施形態において、C M はアミノ酸配列 T S G R S A N P (配列番号 3 7 6) を含む。いくつかの実施形態において、C M はアミノ酸配列 N T L S G R S E N H S G (配列番号 3 7 7) を含む。いくつかの実施形態において、C M はアミノ酸配列 P P S I A R S D N L A N (配列番号 3 7 8) を含む。いくつかの実施形態において、C M はアミノ酸配列 T G L S G R S V T Q T S (配列番号 3 7 9) を含む。いくつかの実施形態において、C M はアミノ酸配列 N T L S G R S G N H G S (配列番号 3 1 1) を含む。いくつかの実施形態において、C M はアミノ酸配列 K G L T G R S D R H Q A (配列番号 3 8 1) を含む。いくつかの実施形態において、C M はアミノ酸配列 K N L Y G R S E N N G N (配列番号 3 8 2) を含む。いくつかの実施形態において、C M はアミノ酸配列 T L R L G R S D N N K N (配列番号 3 8 3) を含む。いくつかの実施形態において、C M はアミノ酸配列 T S T S G R S A N P R G (配列番号 3 8 4) を含む。

#### 【 0 0 9 7 】

いくつかの実施形態において、C M は、少なくとも 2 つのプロテアーゼのための基質である。いくつかの実施形態において、少なくとも 1 つのプロテアーゼは、マトリプターゼ又は u P A であり、そして、少なくとも 1 つのプロテアーゼは、表 7 に示すものから成る群から選択される。

#### 【 0 0 9 8 】

10

20

30

40

【表 4 5】

表 7：代表的なプロテアーゼ及び／又は酵素

ADAMS, ADAMTS、例えば、 ADAM8 ADAM9 ADAM10 ADAM12 ADAM15 ADAM17/TACE ADAMDEC1 ADAMTS1 ADAMTS4 ADAMTS5	システインプロテイナーゼ類、 例えば、 クルジパイン レグマイン オツバイン-2  KLKs、例えば、 KLK4 KLK5 KLK6 KLK7 KLK8  KLK10 KLK11  KLK13 KLK14	セリンプロテアーゼ類、例えば、 活性化タンパク質C カテプシン A カテプシン G キマーゼ 血液凝固因子プロテアーゼ (例えば、FVIIa, FIXa, FXa, FXIa, FXIIa) エラスターゼ グランザイムB グアニジノベンゾアターゼ HtrA1 ヒト好中球エラスターゼ  ラクトフェリン マラプシン NS3/4A PACE4  プラスミン PSA tPA トロンビン トリプターゼ uPA  II型膜貫通セリンプロテアーゼ類 (TTSPs)、例えば、 DESC1 DPP-4 FAP ヘプシン マトリプターゼ-2 MT-SP1/マトリプターゼ TMPRSS2 TMPRSS3 TMPRSS4	10
アスパラギン酸プロテアーゼ類 、例えば、 BACE レニン	KLK11  KLK13 KLK14	ヒト好中球エラスターゼ  ラクトフェリン マラプシン	20
アスパラギン酸カテプシン類、 例えば、 カテプシン D カテプシン E	メタロプロテイナーゼ類、例え ば、 メブリン ネプリライシン  PSMA BMP-1	NS3/4A PACE4  プラスミン PSA tPA トロンビン トリプターゼ uPA	30
カスパーゼ類、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	MMPs、例えば、 MMP1 MMP2 MMP3 MMP7 MMP8 MMP9 MMP10 MMP11 MMP12 MMP13 MMP14	II型膜貫通セリンプロテアーゼ類 (TTSPs)、例えば、 DESC1 DPP-4 FAP ヘプシン マトリプターゼ-2 MT-SP1/マトリプターゼ TMPRSS2 TMPRSS3 TMPRSS4	40
システインカテプシン類、例え ば、 カテプシン B カテプシン C 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 カテプシン X/Z/P	MMP15 MMP16 MMP17 MMP19 MMP20 MMP23 MMP24 MMP26 MMP27		

【0099】

いくつかの実施形態において、抗体は、少なくとも第1のCM及び第2のCMに取り付けられている。いくつかの実施形態において、第1のCM及び第2のCMはそれぞれ、15アミノ酸未満の長さのポリペプチドである。いくつかの実施形態において、未切断状態における抗体内の第1のCM及び第2のCMは、以下のようなN末端からC末端への構造配置：剤 CM1 CM2 (抗体又は抗原結合フラグメント)、(抗体又はその抗原結

合フラグメント) C M 2 C M 1 剤、剤 C M 2 C M 1 (抗体又はその抗原結合フラグメント)、又は(抗体又はその抗原結合フラグメント) C M 1 C M 2 剤を有する。いくつかの実施形態において、抗体は、剤と C M 1 との間に連結ペプチドを含んでいる。いくつかの実施形態において、抗体は、C M 1 と C M 2 との間に連結ペプチドを含んでいる。いくつかの実施形態において、抗体は、C M 2 と抗体又はその抗原結合フラグメントとの間に連結ペプチドを含んでいる。いくつかの実施形態において、抗体は、剤と C M 1 との間に連結ペプチドを、及び C M 2 と抗体又はその抗原結合フラグメントとの間に連結ペプチドを含んでいる。いくつかの実施形態において、抗体は、剤と C M 1 との間に連結ペプチドを、及び C M 1 と C M 2 との間に連結ペプチドを含んでいる。いくつかの実施形態において、抗体は、C M 1 と C M 2 との間に連結ペプチドを、及び C M 2 と抗体又はその抗原結合フラグメントとの間に連結ペプチドを含んでいる。いくつかの実施形態において、抗体は、剤と C M 1 との間に連結ペプチドを、C M 1 と C M 2 との間に連結ペプチドを、及び C M 2 と抗体又はその抗原結合フラグメントとの間に連結ペプチドを含んでいる。

10

#### 【0100】

いくつかの実施形態において、抗体は、マトリプターゼ及び u P A から選択される少なくとも1つのプロテアーゼのための基質を含んでいる少なくとも1つの第1の C M、並びに基質配列を含んでいる第2の C M を含んでいる。第2の C M ( C M 2 ) のための代表的な基質としては、これだけに限定されるものではないが、表7で列挙した以下の酵素又はプロテアーゼの1若しくは複数で切断可能基質が挙げられる。

20

#### 【0101】

いくつかの実施形態において、C M 2 は、特定のプロテアーゼとの使用のために選択される。いくつかの実施形態において、C M 2 は、マトリックスメタロプロテアーゼ ( M M P )、好中球エラスターゼ、u P A ( また、u プラスミノゲン活性化因子とも呼ばれる )、レグミン、マトリプターゼ、トロンビン、例えばカテプシンなどのシステインプロテアーゼ、A D A M 1 7、B M P 1、H t r A 1、並びに、例えば T M P R S S 3 又は T M P R S S 4 などの T M P R S S から成る群から選択される少なくとも1つのプロテアーゼのための基質である。

#### 【0102】

いくつかの実施形態において、C M 2 は好中球エラスターゼのための基質である。いくつかの実施形態において、C M 2 は u P A のための基質である。いくつかの実施形態において、C M 2 はレグミンのための基質である。いくつかの実施形態において、C M 2 はマトリプターゼのための基質である。いくつかの実施形態において、C M 2 はトロンビンのための基質である。いくつかの実施形態において、C M 2 はシステインプロテアーゼのための基質である。いくつかの実施形態において、C M 2 は A D A M 1 7 のための基質である。いくつかの実施形態において、C M 2 は B M P 1 のための基質である。いくつかの実施形態において、C M 2 は H t r A 1 のための基質である。いくつかの実施形態において、C M 2 は T M P R S S のための基質である。いくつかの実施形態において、C M 2 は T M P R S S 3 のための基質である。いくつかの実施形態において、C M 2 は T M P R S S 4 のための基質である。

30

40

#### 【0103】

例えば、好適な C M 2 は、少なくとも1つのプロテアーゼによって切断され、且つ、配列 T G R G P S W V ( 配列番号 4 0 2 ) ; S A R G P S R W ( 配列番号 4 0 3 ) ; T A R G P S F K ( 配列番号 4 0 4 ) ; T A R G P S W ( 配列番号 4 0 5 ) ; L S G R S D N H ( 配列番号 4 0 6 ) ; G G W H T G R N ( 配列番号 4 0 7 ) ; H T G R S G A L ( 配列番号 4 0 8 ) ; P L T G R S G G ( 配列番号 4 0 9 ) ; A A R G P A I H ( 配列番号 4 1 1 ) ; R G P A F N P M ( 配列番号 4 1 2 ) ; S S R G P A Y L ( 配列番号 4 1 3 ) ; R G P A T P I M ( 配列番号 4 1 4 ) ; R G P A ( 配列番号 4 1 5 ) ; G G Q P S G M W G W ( 配列番号 4 1 6 ) ; F P R P L G I T G L ( 配列番号 4 1 7 ) ; V H M P L G F L G P

50

(配列番号 418); S P L T G R S G (配列番号 419); S A G F S L P A (配列番号 126); L A P L G L Q R R (配列番号 420); S G G P L G V R (配列番号 421); P L G L (配列番号 422); G P R S F G L (配列番号 423) 及び/又は G P R S F G (配列番号 424) を含んでいる。

#### 【0104】

いくつかの実施形態において、CM2 はアミノ酸配列 T G R G P S W V (配列番号 402) を含む。いくつかの実施形態において、CM2 はアミノ酸配列 S A R G P S R W (配列番号 403) を含む。いくつかの実施形態において、CM2 はアミノ酸配列 T A R G P S F K (配列番号 404) を含む。いくつかの実施形態において、CM2 はアミノ酸配列 T A R G P S W (配列番号 405) を含む。いくつかの実施形態において、CM2 はアミノ酸配列 L S G R S D N H (配列番号 406) を含む。いくつかの実施形態において、CM2 はアミノ酸配列 G G W H T G R N (配列番号 407) を含む。いくつかの実施形態において、CM2 はアミノ酸配列 H T G R S G A L (配列番号 408) を含む。いくつかの実施形態において、CM2 はアミノ酸配列 P L T G R S G G (配列番号 409) を含む。いくつかの実施形態において、CM2 はアミノ酸配列 A A R G P A I H (配列番号 411) を含む。いくつかの実施形態において、CM2 はアミノ酸配列 R G P A F N P M (配列番号 412) を含む。いくつかの実施形態において、CM2 はアミノ酸配列 S S R G P A Y L (配列番号 413) を含む。いくつかの実施形態において、CM2 はアミノ酸配列 R G P A T P I M (配列番号 414) を含む。いくつかの実施形態において、CM2 はアミノ酸配列 R G P A (配列番号 415) を含む。いくつかの実施形態において、CM2 はアミノ酸配列 G G Q P S G M W G W (配列番号 416) を含む。いくつかの実施形態において、CM2 はアミノ酸配列 F P R P L G I T G L (配列番号 417) を含む。いくつかの実施形態において、CM2 はアミノ酸配列 V H M P L G F L G P (配列番号 418) を含む。いくつかの実施形態において、CM2 はアミノ酸配列 S P L T G R S G (配列番号 419) を含む。いくつかの実施形態において、CM2 はアミノ酸配列 L A P L G L Q R R (配列番号 420) を含む。いくつかの実施形態において、CM2 はアミノ酸配列 S G G P L G V R (配列番号 421) を含む。いくつかの実施形態において、CM2 はアミノ酸配列 P L G L (配列番号 422) を含む。いくつかの実施形態において、CM2 はアミノ酸配列 G P R S F G L (配列番号 423) を含む。いくつかの実施形態において、CM2 はアミノ酸配列 G P R S F G (配列番号 424) を含む。

#### 【0105】

いくつかの実施形態において、CM2 は少なくとも 1 つの MMP のための基質である。いくつかの実施形態において、CM2 は表 7 で列挙した少なくとも 1 つの MMP のための基質である。いくつかの実施形態において、CM2 は MMP 9 のための基質である。いくつかの実施形態において、CM2 は MMP 14 のための基質である。いくつかの実施形態において、CM2 は 2 つ以上の MMP のための基質である。いくつかの実施形態において、CM2 は少なくとも MMP 9 又は MMP 14 のための基質である。いくつかの実施形態において、CM2 は 2 つ以上の MMP のための基質である。いくつかの実施形態において、CM2 は少なくとも MMP 9 及び MMP 14 のための基質である。

#### 【0106】

いくつかの実施形態において、CM2 は、MMP のための基質であり、且つ、配列 I S S G L L S S (配列番号 425); Q N Q A L R M A (配列番号 426); A Q N L L G M V (配列番号 427); S T F P F G M F (配列番号 428); P V G Y T S S L (配列番号 429); D W L Y W P G I (配列番号 430); M I A P V A Y R (配列番号 431); R P S P M W A Y (配列番号 432); W A T P R P M R (配列番号 433); F R L L D W Q W (配列番号 434); L K A A P R W A (配列番号 435); G P S H L V L T (配列番号 436); L P G G L S P W (配列番号 437); M G L F S E A G (配列番号 438); S P L P L R V P (配列番号 439); R M H L R S L G (配列番号 440); L A A P L G L L (配列番号 441); A V G L L A P P (配列番号 442); L L A P S H R A (配列番号 443); P A G L W L D P (配列番号 444) 及び/

又は I S S G L S S ( 配列番号 4 4 5 ) を含んでいる。

【 0 1 0 7 】

いくつかの実施形態において、第 1 の切断剤と第 2 の切断剤は同じプロテアーゼであり、且つ、第 1 の C M 及び第 2 の C M は酵素によって異なった基質である。いくつかの実施形態において、第 1 の切断剤と第 2 の切断剤は異なったプロテアーゼである。いくつかの実施形態において、第 1 の切断剤と第 2 の切断剤は標的組織内で共局在する。いくつかの実施形態において、第 1 の C M 及び第 2 の C M は標的組織内の少なくとも 1 つの切断剤によって切断される。

【 0 1 0 8 】

いくつかの実施形態において、C M はプロテアーゼ切断部位の非プライムサイドを含む；すなわち、C M は少なくとも P 1 及び P 2 アミノ酸を含み、そして、いくつかの実施形態において、P 1、P 2 及び P 3 アミノ酸を含み、そして、いくつかの実施形態において、P 1、P 2、P 3、及び P 4 アミノ酸を含む。いくつかの実施形態において、C M はプロテアーゼ切断部位の非プライムサイドとプライムサイドを含む。いくつかの実施形態において、C M は、非プライムサイドを含むが、プロテアーゼ切断部位のプライムサイドの少なくとも一部を欠いている。いくつかの実施形態において、C M は、非プライムサイドを含んでいるが、プロテアーゼ切断部位のプライムサイドを欠いている。斯かる C M は、抗体又は例えばこれだけに限定されるものではないが、検出部分などの本明細書中の本開示に示す他の分子に直接連結されるか、又はリンカーを通して連結される。

【 0 1 0 9 】

いくつかの実施形態において、抗体又はその抗原結合フラグメントに複合化される剤は治療薬である。いくつかの実施形態において、剤は、抗腫瘍剤である。いくつかの実施形態において、剤は、毒素又はその断片である。本明細書中に使用される場合、毒素の断片は、毒性活性を保持している断片である。いくつかの実施形態において、剤は、切断可能なリンカーを介して A B に結合される。いくつかの実施形態において、剤は、本明細書中に記載した少なくとも 1 つの切断可能基質配列を含んでいるリンカーを介して A B に結合される。いくつかの実施形態において、剤は、非切断可能リンカーを介して A B に結合される。いくつかの実施形態において、剤は、微小管障害剤である。いくつかの実施形態において、剤は、DNA アルキル化剤又は DNA インターカレーター、或いは他の DNA 損傷剤など核酸損傷剤である。いくつかの実施形態において、剤は、表 3 で列挙した群から選ばれた剤である。いくつかの実施形態において、剤はドラスタチンである。いくつかの実施形態において、剤は、アウリスタチン又はその誘導体である。いくつかの実施形態において、剤は、アウリスタチン E 又はその誘導体である。いくつかの実施形態において、剤はモノメチルアウリスタチン E ( M M A E ) である。いくつかの実施形態において、剤はモノメチルアウリスタチン D ( M M A D ) である。いくつかの実施形態において、剤は、マイタンシノイド又はマイタンシノイド誘導体である。いくつかの実施形態において、剤は、DM 1 又は DM 4 である。いくつかの実施形態において、剤は、デュオカルマイシン又はその誘導体である。いくつかの実施形態において、剤は、カリケアマイシン又はその誘導体である。いくつかの実施形態において、剤はピロロベンゾジアゼピンである。

【 0 1 1 0 】

いくつかの実施形態において、剤は、抗炎症剤である。

【 0 1 1 1 】

いくつかの実施形態において、抗体はまた、検出可能部分も含んでいる。いくつかの実施形態において、検出可能部分は診断剤である。

【 0 1 1 2 】

いくつかの実施形態において、複合抗体及び / 又は複合活性化可能抗体は、検出可能標識を含んでいる。いくつかの実施形態において、検出可能標識は、イメージング剤 ( imaging agent )、造影剤、酵素、蛍光標識、発色団、色素、1 若しくは複数の金属イオン、又はリガンドベースの標識を含む。いくつかの実施形態において、イメージング剤は放射性同位元素を含む。いくつかの実施形態において、放射性同位元素は、インジウム又はテ

クネチウムである。いくつかの実施形態において、造影剤は、ヨウ素、ガドリニウム又は酸化鉄を含む。いくつかの実施形態において、酵素は、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、又はガラクトシダーゼを含む。いくつかの実施形態において、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）、修飾された赤色蛍光タンパク質（mRFP）、赤色蛍光タンパク質tdimer2（RFPtdimer2）、HCRED、又はユーロピウム誘導体を含む。いくつかの実施形態において、発光性標識は、Nメチルアクリジニウム誘導体を含む。いくつかの実施形態において、標識は、AlexFluor（登録商標）680又はAlexaFluor（登録商標）750などのAlexaFluor（登録商標）標識を含む。いくつかの実施形態において、リガンドベースの標識は、ビオチン、アビジン、ストレプトアビジン又は1若しくは複数のハプテンを含む。

10

#### 【0113】

いくつかの実施形態において、抗体は、1若しくは複数のジスルフィド結合を自然に含む。いくつかの実施形態において、抗体又はその抗原結合フラグメントは、1若しくは複数のジスルフィド結合を含むように設計され得る。

#### 【0114】

いくつかの実施形態において、抗体及び/又は複合抗体は単一特異的である。いくつかの実施形態において、抗体及び/又は複合抗体は、多重特異的、例えば、制限されることのない例によれば、二重特異的又は三重特異的である。いくつかの実施形態において、抗体及び/又は複合抗体は、プロ二重特異的T細胞エンゲイジャー（プロBITE）分子の一部として処方される。いくつかの実施形態において、抗体及び/又は複合抗体は、プロキメラ抗原受容体（プロCAR）修飾T細胞又は他の遺伝子操作された受容体の一部として処方される。

20

#### 【0115】

いくつかの実施形態において、活性化可能抗体及び/又は複合活性化可能抗体は単一特異的である。いくつかの実施形態において、活性化可能抗体及び/又は複合活性化可能抗体は多重特異的であり、本明細書中では多重特異的活性化可能抗体及び/又は多重特異的な複合活性化可能抗体とも呼ばれる。本明細書中に使用される場合、「活性化可能抗体」という用語やその文法的変化形のすべてが、別段の注意がない限り、活性化可能抗体が本開示の多重特異的活性化可能抗体である実施形態に限定されることなく、本開示の多重特異的活性化可能抗体を包含するものとする。本明細書中に使用される場合、「複合活性化可能抗体」という用語やその文法的変化形のすべてが、別段の注意がない限り、複合活性化可能抗体が本開示の多重特異的な複合活性化可能抗体である実施形態に限定されることなく、本開示の多重特異的な複合活性化可能抗体を包含するものとする。いくつかの実施形態において、多重特異的活性化可能抗体及び/又は多重特異的な複合活性化可能抗体は、二重特異的又は三重特異的である。

30

#### 【0116】

いくつかの実施形態において、本明細書中に記載した複合抗体は、1若しくは複数の追加の剤と複合化した状態で、又は追加の剤と組み合わせた状態で使用される。好適な追加の剤は、例えば、癌などの対象とする適用のための現在の医薬療法及び/又は外科療法を含む。例えば、複合抗体は、追加の化学療法剤又は抗癌剤と複合化した状態で使用される。

40

#### 【0117】

本開示のマトリプターゼ及び/又はuPA基質もまた、活性化可能抗体に有用である。本明細書に記載される活性化された状態での活性化可能抗体は、所定の標的を結合し、そして次のものを含む：(i) 標的に対して特異的に結合する抗体又はその抗原結合フラグメント（AB）；(ii) 活性化可能抗体が未切断状態で存在する場合、標的に対するABの結合を阻害するマスキング部分（MM）；及び(iii) ABにカップリングされる切断可能部分（CM）、ここでCMはマトリプターゼ及び/又はuPAから選択される少なくとも1つのプロテアーゼのための基質として機能するポリペプチドである。

50



## 【0118】

いくつかの実施形態において、未切断状態下での活性化可能抗体は、次の通りにN末端からC末端側への構造配置：MM - CM - AB又はAB - CM - MMを有する。

## 【0119】

いくつかの実施形態において、活性化可能抗体は、MMとCMとの間に連結ペプチドを含む。

## 【0120】

いくつかの実施形態において、活性化可能抗体は、CMとABとの間に連結ペプチドを含む。

## 【0121】

いくつかの実施形態において、活性化可能抗体は第1連結ペプチド(LP1)及び第2連結ペプチド(LP2)を含み、そして未切断状態での前記活性化可能抗体は、N末端からC末端側に、次のような構造配置：MM - LP1 - CM - LP2 - AB 又はAB - LP2 - CM - LP1 - MMを有する。

## 【0122】

いくつかの実施形態において、前記2種の連結ペプチドがお互い同一である必要はない。

## 【0123】

いくつかの実施形態において、LP1又はLP2のうちの少なくとも1つは、(GS)<sub>n</sub>、(GGS)<sub>n</sub>、(GSGGS)<sub>n</sub>(配列番号385)及び(GGGS)<sub>n</sub>(配列番号386){ここで、nは少なくとも1つの整数である}から成る群から選択されるアミノ酸配列を含む。

## 【0124】

いくつかの実施形態において、LP1又はLP2のうちの少なくとも1つは、GSGG(配列番号387)、GSGGG(配列番号388)、GSGSG(配列番号389)、GSGGG(配列番号390)、GGGSG(配列番号391)、及びGSSSG(配列番号392)から成る群から選択されるアミノ酸配列を含む。

## 【0125】

いくつかの実施形態において、LP1は、アミノ酸配列GSSGGSGGSGGSGG(配列番号393)、GSSGGSGGSGGSGG(配列番号394)、GSSGGSGGSGGSGG(配列番号395)、GSSGGSGGSGGSGGSGGSGG(配列番号396)、GSSGGSGGSGGSGGSGGSGG(配列番号397)、又はGSSGGSGGSGGSGG(配列番号398)を含む。

## 【0126】

いくつかの実施形態において、LP2は、アミノ酸配列GSS、GGS、GGGS(配列番号399)、GSSGT(配列番号400)又はGSSG(配列番号401)を含む。

## 【0127】

いくつかの実施形態において、ABは、標的への結合に関して約100nM以下の平衡解離定数を有する。

## 【0128】

いくつかの実施形態において、活性化可能抗体は、標的を特異的に結合する抗体又はその抗原結合フラグメントを含んでいる。いくつかの実施形態において、標的を結合する抗体又はその免疫学的活性フラグメントは、モノクローナル抗体、ドメイン抗体、単鎖、Fabフラグメント、F(ab')<sub>2</sub>フラグメント、scFv、scAb、dAb、単ドメインH鎖抗体、又は単ドメインL鎖抗体である。いくつかの実施形態において、標的に結合する斯かる抗体又はその免疫学的活性フラグメントは、マウス、他の齧歯動物、キメラ、ヒト化又は完全なヒトモノクローナル抗体である。

## 【0129】

いくつかの実施形態において、MMは、標的へのABの平衡解離定数よりも大きい、ABへの結合のための平衡解離定数を有する。

10

20

30

40

50

## 【 0 1 3 0 】

いくつかの実施形態において、MMは、標的へのABの平衡解離定数以下である、ABへの結合のための平衡解離定数を有する。

## 【 0 1 3 1 】

いくつかの実施形態において、MMは、切断された状態である場合、標的への結合のために、ABと干渉もしないし、競合もしない。

## 【 0 1 3 2 】

いくつかの実施形態において、MMは、約2～40個の長さのアミノ酸のポリペプチドである。例えば、MMは、40個以下の長さのアミノ酸のポリペプチドである。

## 【 0 1 3 3 】

いくつかの実施形態において、MMポリペプチド配列は、ABのどの天然の結合パートナーのポリペプチド配列とも異なっている。いくつかの実施形態において、MMポリペプチド配列は、ABの任意の天然の結合パートナーに対して50%未満同一である。いくつかの実施形態において、MMポリペプチド配列は、ABの任意の天然の結合パートナーに対して40%、30%、25%、20%、15%、又は10%未満同一である。

## 【 0 1 3 4 】

いくつかの実施形態において、MMのカップリングは、標的を結合するABの能力を低め、結果的に、標的に向かってMMにカップリングされる場合のABの解離定数( $K_d$ )は、標的に向かってMMにカップリングされない場合のABの $K_d$ よりも、少なくとも2倍高い。

## 【 0 1 3 5 】

いくつかの実施形態において、MMのカップリングは、標的を結合するABの能力を低め、結果的に、標的に向かってMMにカップリングされる場合のABの解離定数( $K_d$ )は、標的に向かってMMにカップリングされない場合のABの $K_d$ よりも、少なくとも3倍高い。

## 【 0 1 3 6 】

いくつかの実施形態において、MMのカップリングは、標的を結合するABの能力を低め、結果的に、標的に向かってMMにカップリングされる場合のABの解離定数( $K_d$ )は、標的に向かってMMにカップリングされない場合のABの $K_d$ よりも、少なくとも5倍高い。

## 【 0 1 3 7 】

いくつかの実施形態において、MMのカップリングは、標的を結合するABの能力を低め、結果的に、標的に向かってMMにカップリングされる場合のABの解離定数( $K_d$ )は、標的に向かってMMにカップリングされない場合のABの $K_d$ よりも、少なくとも10倍高い。

## 【 0 1 3 8 】

いくつかの実施形態において、MMのカップリングは、標的を結合するABの能力を低め、結果的に、標的に向かってMMにカップリングされる場合のABの解離定数( $K_d$ )は、標的に向かってMMにカップリングされない場合のABの $K_d$ よりも、少なくとも20倍高い。

## 【 0 1 3 9 】

いくつかの実施形態において、MMのカップリングは、標的を結合するABの能力を低め、結果的に、標的に向かってMMにカップリングされる場合のABの解離定数( $K_d$ )は、標的に向かってMMにカップリングされない場合のABの $K_d$ よりも、少なくとも40倍高い。

## 【 0 1 4 0 】

いくつかの実施形態において、MMのカップリングは、標的を結合するABの能力を低め、結果的に、標的に向かってMMにカップリングされる場合のABの解離定数( $K_d$ )は、標的に向かってMMにカップリングされない場合のABの $K_d$ よりも、少なくとも100倍高い。

10

20

30

40

50

## 【0141】

いくつかの実施形態において、MMのカップリングは、標的を結合するABの能力を低め、結果的に、標的に向かってMMにカップリングされる場合のABの解離定数( $K_d$ )は、標的に向かってMMにカップリングされない場合のABの $K_d$ よりも、少なくとも1000倍高い。

## 【0142】

いくつかの実施形態において、MMのカップリングは、標的を結合するABの能力を低め、結果的に、標的に向かってMMにカップリングされる場合のABの解離定数( $K_d$ )は、標的に向かってMMにカップリングされない場合のABの $K_d$ よりも、少なくとも10,000倍高い。

10

## 【0143】

いくつかの実施形態において、プロテアーゼ、すなわち、マトリプターゼ及び/又はuPAは組織内で標的と共同在し、そして活性化抗体がプロテアーゼに晒されると、プロテアーゼは活性化抗体内のCMを切断する。

## 【0144】

いくつかの実施形態において、標的の存在下で、MMは、標的置換アッセイ、例えばPCT公開番号第WO2009/025846号及び同第WO2010/081173号に記載されるアッセイを用いて、インビトロでアッセイされる場合、CMが切断される場合に比較して、CMが切断されていない場合、標的を結合するABの能力を、少なくとも90%低める。

20

## 【0145】

いくつかの実施形態において、CMは活性化可能抗体に位置し、結果的に、未切断状態で、標的への活性化可能抗体の結合が低められ、標的に結合する未修飾ABの平衡解離定数よりも少なくとも2倍、高い平衡解離定数の発生が確認され、そしてところが、切断された状態で(すなわち、活性化可能抗体が切断状態にあるとき)、ABは標的を結合する。

## 【0146】

いくつかの実施形態において、CMは活性化可能抗体に位置し、結果的に、未切断状態で、標的への活性化可能抗体の結合が低められ、標的に結合する未修飾ABの平衡解離定数よりも少なくとも5倍、高い平衡解離定数の発生が確認され、そしてところが、切断された状態で(すなわち、活性化可能抗体が切断状態にあるとき)、ABは標的を結合する。

30

## 【0147】

いくつかの実施形態において、CMは活性化可能抗体に位置し、結果的に、未切断状態で、標的への活性化可能抗体の結合が低められ、標的に結合する未修飾ABの平衡解離定数よりも少なくとも10倍、高い平衡解離定数の発生が確認され、そしてところが、切断された状態で(すなわち、活性化可能抗体が切断状態にあるとき)、ABは標的を結合する。

## 【0148】

いくつかの実施形態において、CMは活性化可能抗体に位置し、結果的に、未切断状態で、標的への活性化可能抗体の結合が低められ、標的に結合する未修飾ABの平衡解離定数よりも少なくとも20倍、高い平衡解離定数の発生が確認され、そしてところが、切断された状態で(すなわち、活性化可能抗体が切断状態にあるとき)、ABは標的を結合する。

40

## 【0149】

いくつかの実施形態において、CMは活性化可能抗体に位置し、結果的に、未切断状態で、標的への活性化可能抗体の結合が低められ、標的に結合する未修飾ABの平衡解離定数よりも少なくとも40倍、高い平衡解離定数の発生が確認され、そしてところが、切断された状態で、ABは標的を結合する。

## 【0150】

50

いくつかの実施形態において、CMは活性化可能抗体に位置し、結果的に、未切断状態で、標的への活性化可能抗体の結合が低められ、標的に結合する未修飾ABの平衡解離定数よりも少なくとも50倍、高い平衡解離定数の発生が確認され、そしてところが、切断された状態で（すなわち、活性化可能抗体が切断状態にあるとき）、ABは標的を結合する。

#### 【0151】

いくつかの実施形態において、CMは活性化可能抗体に位置し、結果的に、未切断状態で、標的への活性化可能抗体の結合が低められ、標的に結合する未修飾ABの平衡解離定数よりも少なくとも100倍、高い平衡解離定数の発生が確認され、そしてところが、切断された状態で（すなわち、活性化可能抗体が切断状態にあるとき）、ABは標的を結合する。

10

#### 【0152】

いくつかの実施形態において、CMは活性化可能抗体に位置し、結果的に、未切断状態で、標的への活性化可能抗体の結合が低められ、標的に結合する未修飾ABの平衡解離定数よりも少なくとも200倍、高い平衡解離定数の発生が確認され、そしてところが、切断された状態で（すなわち、活性化可能抗体が切断状態にあるとき）、ABは標的を結合する。

#### 【0153】

いくつかの実施形態において、CMは長さが最大15アミノ酸のポリペプチドである。

#### 【0154】

いくつかの実施形態において、CMは少なくともマトリプターゼのための基質である。いくつかの実施形態において、CMは少なくともuPAのための基質である。いくつかの実施形態において、CMは少なくともマトリプターゼ及びuPAのための基質である。

20

#### 【0155】

いくつかの実施形態において、CMはマトリプターゼ及び/又はuPAのための基質であり、少なくとももう一方のプロテアーゼによる切断に対して抵抗性の基質である。いくつかの実施形態において、CMはマトリプターゼ及び/又はuPAのための基質であり、少なくともプラスミンによる切断に対して抵抗性の基質である。いくつかの実施形態において、CMはマトリプターゼ及び/又はuPAのための基質であり、少なくとも組織プラスミノゲン活性化因子（tPA）による切断に対して抵抗性の基質である。

30

#### 【0156】

いくつかの実施形態において、CMはマトリプターゼ及び/又はuPAのための基質であり、マトリプターゼ及び/又はuPAによって認識されるモチーフ配列を含んでいるが、但し、本開示の任意のモチーフ配列に関して：

（i）CMは、以下のアミノ酸配列TGRGPSWV（配列番号402）、SARGPSRW（配列番号403）、又はTARGPSFK（配列番号404）のいずれも含まず；且つ、CMは、例えば、TARGPSW（配列番号405）などのこれらのアミノ酸配列に基づくコンセンサスアミノ酸配列を含まず；

（ii）CMは、以下のアミノ酸配列LSGRSDNH（配列番号406）、GGWHTGRN（配列番号407）、HTGRSGAL（配列番号408）、又はPLTGRSGG（配列番号409）のいずれも含まず；且つ、CMは、例えば、LTGRSGA（配列番号410）などのこれらのアミノ酸配列に基づくコンセンサスアミノ酸配列を含まず；及び/又は

40

（iii）CMは、以下のアミノ酸配列AARGPAIH（配列番号411）、RGPAFNPM（配列番号412）、SSRGPAYL（配列番号413）、又はRGPATPIM（配列番号414）のいずれも含まず；且つ、CMは、例えば、RGPA（配列番号415）などのこれらのアミノ酸配列に基づくコンセンサスアミノ酸配列を含まない。

#### 【0157】

いくつかの実施形態において、モチーフ配列は、表8A～8Jに示すコアCMコンセンサス配列を含む。いくつかの実施形態において、モチーフ配列は、表8A～8Jに示すコ

50

アＣＭコンセンサス配列の垂属、すなわち、垂群を含む。

【 0 1 5 8 】

いくつかの実施形態において、モチーフ配列は、表 8 A ~ 8 J に示すコアＣＭコンセンサス配列の 1 つに基づく拡張コンセンサス配列を含む。いくつかの実施形態において、拡張コンセンサス配列は、表 9 A ~ 9 J ~ 3 に示すコンセンサス配列である。

【 0 1 5 9 】

いくつかの実施形態において、ＣＭはアミノ酸配列 A A P R S ( 配列番号 1 6 3 ) を含むコアＣＭコンセンサス 1 配列を含む。いくつかの実施形態において、ＣＭはアミノ酸配列 A A P R S F ( 配列番号 1 6 4 ) を含む拡張コアＣＭコンセンサス 1 配列を含む。

【 0 1 6 0 】

いくつかの実施形態において、ＣＭはアミノ酸配列 S R R V P ( 配列番号 1 6 5 ) を含むコアＣＭコンセンサス 2 配列を含む。いくつかの実施形態において、ＣＭは、Q S R R V P ( 配列番号 1 6 6 )、Q T R R V P ( 配列番号 1 6 7 )、S R R V P L ( 配列番号 1 6 8 )、S R R V P V ( 配列番号 1 6 9 )、Q S R R V P L ( 配列番号 1 7 0 )、Q S R R V P V ( 配列番号 1 7 1 )、Q T R R V P L ( 配列番号 1 7 2 )、及び Q T R R V P V ( 配列番号 1 7 3 ) から成る群から選択されるアミノ酸配列を含む拡張コアＣＭコンセンサス 2 配列を含む。

【 0 1 6 1 】

いくつかの実施形態において、ＣＭはアミノ酸配列 Q S R R V P ( 配列番号 1 6 6 ) を含む。いくつかの実施形態において、ＣＭはアミノ酸配列 Q T R R V P ( 配列番号 1 6 7 ) を含む。いくつかの実施形態において、ＣＭはアミノ酸配列 S R R V P L ( 配列番号 1 6 8 ) を含む。いくつかの実施形態において、ＣＭはアミノ酸配列 S R R V P V ( 配列番号 1 6 9 ) を含む。いくつかの実施形態において、ＣＭはアミノ酸配列 Q S R R V P L ( 配列番号 1 7 0 ) を含む。いくつかの実施形態において、ＣＭはアミノ酸配列 Q S R R V P V ( 配列番号 1 7 1 ) を含む。いくつかの実施形態において、ＣＭはアミノ酸配列 Q T R R V P L ( 配列番号 1 7 2 ) を含む。いくつかの実施形態において、ＣＭはアミノ酸配列 Q T R R V P V ( 配列番号 1 7 3 ) を含む。

【 0 1 6 2 】

いくつかの実施形態において、ＣＭはアミノ酸配列 P P L G R ( 配列番号 1 7 4 ) を含むコアＣＭコンセンサス 3 配列を含む。いくつかの実施形態において、ＣＭは、G P P L G R ( 配列番号 1 7 5 )、S P P L G R ( 配列番号 1 7 6 )、C G P P L G R ( 配列番号 1 7 7 )、C S P P L G R ( 配列番号 1 7 8 )、G G P P L G R ( 配列番号 1 7 9 )、G S P P L G R ( 配列番号 1 8 0 )、S G P P L G R ( 配列番号 1 8 1 )、S S P P L G R ( 配列番号 1 8 2 )、G C G P P L G R ( 配列番号 1 8 3 )、G C S P P L G R ( 配列番号 1 8 4 )、G G G P P L G R ( 配列番号 1 8 5 )、G G S P P L G R ( 配列番号 1 8 6 )、G S G P P L G R ( 配列番号 1 8 7 )、G S S P P L G R ( 配列番号 1 8 8 )、S C G P P L G R ( 配列番号 1 8 9 )、S C S P P L G R ( 配列番号 1 9 0 )、S G G P P L G R ( 配列番号 1 9 1 )、S G S P P L G R ( 配列番号 1 9 2 )、S S G P P L G R ( 配列番号 1 9 3 )、及び S S S P P L G R ( 配列番号 1 9 4 ) から成る群から選択されるアミノ酸配列を含む拡張コアＣＭコンセンサス 3 配列を含む。

【 0 1 6 3 】

いくつかの実施形態において、ＣＭはアミノ酸配列 G P P L G R ( 配列番号 1 7 5 ) を含む。いくつかの実施形態において、ＣＭはアミノ酸配列 S P P L G R ( 配列番号 1 7 6 ) を含む。いくつかの実施形態において、ＣＭはアミノ酸配列 C G P P L G R ( 配列番号 1 7 7 ) を含む。いくつかの実施形態において、ＣＭはアミノ酸配列 C S P P L G R ( 配列番号 1 7 8 ) を含む。いくつかの実施形態において、ＣＭはアミノ酸配列 G G P P L G R ( 配列番号 1 7 9 ) を含む。いくつかの実施形態において、ＣＭはアミノ酸配列 G S P P L G R ( 配列番号 1 8 0 ) を含む。いくつかの実施形態において、ＣＭはアミノ酸配列 S G P P L G R ( 配列番号 1 8 1 ) を含む。いくつかの実施形態において、ＣＭはアミノ酸配列 S S P P L G R ( 配列番号 1 8 2 ) を含む。いくつかの実施形態において、ＣＭは

10

20

30

40

50

アミノ酸配列 G C G P P L G R (配列番号 183) を含む。いくつかの実施形態において、C M はアミノ酸配列 G C S P P L G R (配列番号 184) を含む。いくつかの実施形態において、C M はアミノ酸配列 G G G P P L G R (配列番号 185) を含む。いくつかの実施形態において、C M はアミノ酸配列 G G S P P L G R (配列番号 186) を含む。いくつかの実施形態において、C M はアミノ酸配列 G S G P P L G R (配列番号 187) を含む。いくつかの実施形態において、C M はアミノ酸配列 G S S P P L G R (配列番号 188) を含む。いくつかの実施形態において、C M はアミノ酸配列 S C G P P L G R (配列番号 189) を含む。いくつかの実施形態において、C M はアミノ酸配列 S C S P P L G R (配列番号 190) を含む。いくつかの実施形態において、C M はアミノ酸配列 S G G P P L G R (配列番号 191) を含む。いくつかの実施形態において、C M はアミノ酸配列 S G S P P L G R (配列番号 192) を含む。いくつかの実施形態において、C M はアミノ酸配列 S S G P P L G R (配列番号 193) を含む。いくつかの実施形態において、C M はアミノ酸配列 S S S P P L G R (配列番号 194) を含む。

10

#### 【0164】

いくつかの実施形態において、C M はアミノ酸配列 L R S G W (配列番号 195) を含むコア C M コンセンサス 4 配列を含む。いくつかの実施形態において、C M は、M L R S G W (配列番号 196)、M L R S G W R (配列番号 197)、M L R S G W R G (配列番号 198)、M L R S G W R L (配列番号 199)、及び M L R S G W R S (配列番号 200) から成る群から選択されるアミノ酸配列を含む拡張コア C M コンセンサス 4 配列を含む。

20

#### 【0165】

いくつかの実施形態において、アミノ酸配列 M L R S G W、(配列番号 196) を C M は含む。いくつかの実施形態において、C M はアミノ酸配列 M L R S G W R (配列番号 197) を含む。いくつかの実施形態において、C M はアミノ酸配列 M L R S G W R G (配列番号 198) を含む。いくつかの実施形態において、C M はアミノ酸配列 M L R S G W R L (配列番号 199) を含む。いくつかの実施形態において、C M はアミノ酸配列 M L R S G W R S (配列番号 200) を含む。

#### 【0166】

いくつかの実施形態において、C M はアミノ酸配列 V S R S A (配列番号 201) を含むコア C M コンセンサス 5 配列を含む。いくつかの実施形態において、C M は、I V S R S A (配列番号 202)、Y I V S R S A (配列番号 203)、及び Q Y I V S R S A (配列番号 204) から成る群から選択されるアミノ酸配列を含む拡張コア C M コンセンサス 5 配列を含む。

30

#### 【0167】

いくつかの実施形態において、C M はアミノ酸配列 I V S R S A (配列番号 202) を含む。いくつかの実施形態において、C M はアミノ酸配列 Y I V S R S A (配列番号 203) を含む。いくつかの実施形態において、C M はアミノ酸配列 Q Y I V S R S A (配列番号 204) を含む。

#### 【0168】

いくつかの実施形態において、C M はアミノ酸配列 A L R A P (配列番号 205) を含むコア C M コンセンサス 6 配列を含む。いくつかの実施形態において、C M は、アミノ酸配列 R A L R A P (配列番号 206) を含む拡張コア C M コンセンサス 6 配列を含む。

40

#### 【0169】

いくつかの実施形態において、C M はアミノ酸配列 P A G R R (配列番号 207) を含むコア C M コンセンサス 7 配列を含む。いくつかの実施形態において、C M は、P A G R R S (配列番号 208)、P A G R R S L (配列番号 209)、V P A G R R S (配列番号 210)、及び V P A G R R S L (配列番号 211) から成る群から選択されるアミノ酸配列を含む拡張コア C M コンセンサス 7 配列を含む。

#### 【0170】

いくつかの実施形態において、C M はアミノ酸配列 P A G R R S (配列番号 208) を

50

含む。いくつかの実施形態において、CMはアミノ酸配列PAGRRSL（配列番号209）を含む。いくつかの実施形態において、CMはアミノ酸配列VPAGRRS（配列番号210）を含む。いくつかの実施形態において、CMはアミノ酸配列VPAGRRSL（配列番号211）を含む。

【0171】

いくつかの実施形態において、CMはアミノ酸配列GRSML（配列番号212）を含むコアCMコンセンサス8配列を含む。いくつかの実施形態において、CMは、GRSMLL（配列番号213）、GRSMLM（配列番号214）、GRSMLLG（配列番号215）、GRSMLLP（配列番号216）、GRSMLLS（配列番号217）、GRSMLMG（配列番号218）、GRSMLMP（配列番号219）、GRSMLMS（配列番号220）、GRSMLLGG（配列番号221）、GRSMLLPG（配列番号222）、GRSMLLSG（配列番号223）、GRSMLMGG（配列番号224）、GRSMLMPG（配列番号225）、GRSMLMSG（配列番号226）、GRSMLLGP（配列番号227）、GRSMLLPP（配列番号228）、GRSMLLS（配列番号229）、GRSMLMGP（配列番号230）、GRSMLMPP（配列番号231）、GRSMLMSP（配列番号232）、GRSMLLGS（配列番号233）、GRSMLLPS（配列番号234）、GRSMLLSS（配列番号235）、GRSMLMGS（配列番号236）、GRSMLMPS（配列番号237）、及びGRSMLMSS（配列番号238）から成る群から選択されるアミノ酸配列を含む拡張コアCMコンセンサス8配列を含む。

【0172】

いくつかの実施形態において、CMはアミノ酸配列GRSMLL（配列番号213）を含む。いくつかの実施形態において、CMはアミノ酸配列GRSMLM（配列番号214）を含む。いくつかの実施形態において、CMはアミノ酸配列GRSMLLG（配列番号215）を含む。いくつかの実施形態において、CMはアミノ酸配列GRSMLLP（配列番号216）を含む。いくつかの実施形態において、CMはアミノ酸配列GRSMLLS（配列番号217）を含む。いくつかの実施形態において、CMはアミノ酸配列GRSMLMG（配列番号218）を含む。いくつかの実施形態において、CMはアミノ酸配列GRSMLMP（配列番号219）を含む。いくつかの実施形態において、CMはアミノ酸配列GRSMLMS（配列番号220）を含む。いくつかの実施形態において、CMはアミノ酸配列GRSMLLGG（配列番号221）を含む。いくつかの実施形態において、CMはアミノ酸配列GRSMLLPG（配列番号222）を含む。いくつかの実施形態において、CMはアミノ酸配列GRSMLLSG（配列番号223）を含む。いくつかの実施形態において、CMはアミノ酸配列GRSMLMGG（配列番号224）を含む。いくつかの実施形態において、CMはアミノ酸配列GRSMLMPG（配列番号225）を含む。いくつかの実施形態において、CMはアミノ酸配列GRSMLMSG（配列番号226）を含む。いくつかの実施形態において、CMはアミノ酸配列GRSMLLGP（配列番号227）を含む。いくつかの実施形態において、CMはアミノ酸配列GRSMLLPP（配列番号228）を含む。いくつかの実施形態において、CMはアミノ酸配列GRSMLLS（配列番号229）を含む。いくつかの実施形態において、CMはアミノ酸配列GRSMLMGP（配列番号230）を含む。いくつかの実施形態において、CMはアミノ酸配列GRSMLMPP（配列番号231）を含む。いくつかの実施形態において、CMはアミノ酸配列GRSMLMSP（配列番号232）を含む。いくつかの実施形態において、CMはアミノ酸配列GRSMLLGS（配列番号233）を含む。いくつかの実施形態において、CMはアミノ酸配列GRSMLLPS（配列番号234）を含む。いくつかの実施形態において、CMはアミノ酸配列GRSMLLSS（配列番号235）を含む。いくつかの実施形態において、CMはアミノ酸配列GRSMLMGS（配列番号236）を含む。いくつかの実施形態において、CMはアミノ酸配列GRSMLMPS（配列番号237）を含む。いくつかの実施形態において、CMはアミノ酸配列GRSMLMSS（配列番号238）を含む。

## 【 0 1 7 3 】

いくつかの実施形態において、CMはアミノ酸配列 L A R A G (配列番号 2 3 9) を含むコアCMコンセンサス 9 配列を含む。いくつかの実施形態において、CMは、L A R A G I (配列番号 2 4 0)、L A R A G L (配列番号 2 4 1)、P L A R A G I (配列番号 2 4 2)、P L A R A G L (配列番号 2 4 3)、R P L A R A G I (配列番号 2 4 4)、及び R P L A R A G L (配列番号 2 4 5) から成る群から選択されるアミノ酸配列を含む拡張コアCMコンセンサス 9 配列を含む。

## 【 0 1 7 4 】

いくつかの実施形態において、CMはアミノ酸配列 L A R A G I (配列番号 2 4 0) を含む。いくつかの実施形態において、CMはアミノ酸配列 L A R A G L (配列番号 2 4 1) を含む。いくつかの実施形態において、CMはアミノ酸配列 P L A R A G I (配列番号 2 4 2) を含む。いくつかの実施形態において、CMはアミノ酸配列 P L A R A G L (配列番号 2 4 3) を含む。いくつかの実施形態において、CMはアミノ酸配列 R P L A R A G I (配列番号 2 4 4) を含む。いくつかの実施形態において、CMはアミノ酸配列 R P L A R A G L (配列番号 2 4 5) を含む。

10

## 【 0 1 7 5 】

いくつかの実施形態において、CMはアミノ酸配列 E S R R W (配列番号 2 4 6) を含むコアCMコンセンサス 1 0 配列を含む。いくつかの実施形態において、CMは、E S R R W M (配列番号 2 4 7)、E S R R W M P (配列番号 2 4 8)、及び P E S R R W M P (配列番号 2 4 9) から成る群から選択されるアミノ酸配列を含む拡張コアCMコンセンサス 1 0 配列を含む。

20

## 【 0 1 7 6 】

いくつかの実施形態において、CMはアミノ酸配列 E S R R W M (配列番号 2 4 7) を含む。いくつかの実施形態において、CMはアミノ酸配列 E S R R W M P (配列番号 2 4 8) を含む。いくつかの実施形態において、CMはアミノ酸配列 P E S R R W M P (配列番号 2 4 9) を含む。

## 【 0 1 7 7 】

いくつかの実施形態において、CMは、I L P R S P A F (配列番号 2 5 0)、V A G R S M R P (配列番号 2 5 1)、V V P E G R R S (配列番号 2 5 2)、Q G R A I T F I (配列番号 2 5 3)、V L S K Q M S F (配列番号 2 5 4)、L K G R S Y Y Y (配列番号 2 5 5)、K R M P V Q F L (配列番号 2 5 6)、P Q H R I V S F (配列番号 2 5 7)、Y K K F V G S L (配列番号 2 5 8)、H M M Q Y A R H (配列番号 2 5 9)、I P F S W S R F (配列番号 2 6 0)、L S Q A R W R K (配列番号 2 6 1)、D I S H W R R S (配列番号 2 6 2)、R K T V Q H W W (配列番号 2 6 3)、R F Y R N Q F F (配列番号 2 6 4)、R S L V F A P I (配列番号 2 6 5)、R S P S R L K C (配列番号 2 6 6)、及び R K M P N I T V (配列番号 2 6 7) から成る群から選択されるアミノ酸配列を含む。

30

## 【 0 1 7 8 】

いくつかの実施形態において、CMはアミノ酸配列 I L P R S P A F (配列番号 2 5 0) を含む。いくつかの実施形態において、CMはアミノ酸配列 V A G R S M R P (配列番号 2 5 1) を含む。いくつかの実施形態において、CMはアミノ酸配列 V V P E G R R S (配列番号 2 5 2) を含む。いくつかの実施形態において、CMはアミノ酸配列 Q G R A I T F I (配列番号 2 5 3) を含む。いくつかの実施形態において、CMはアミノ酸配列 V L S K Q M S F (配列番号 2 5 4) を含む。いくつかの実施形態において、CMはアミノ酸配列 L K G R S Y Y Y (配列番号 2 5 5) を含む。いくつかの実施形態において、CMはアミノ酸配列 K R M P V Q F L (配列番号 2 5 6) を含む。いくつかの実施形態において、CMはアミノ酸配列 P Q H R I V S F (配列番号 2 5 7) を含む。いくつかの実施形態において、CMはアミノ酸配列 Y K K F V G S L (配列番号 2 5 8) を含む。いくつかの実施形態において、CMはアミノ酸配列 H M M Q Y A R H (配列番号 2 5 9) を含む。いくつかの実施形態において、CMはアミノ酸配列 I P F S W S R F (配列番号 2 6 0) を含む。

40

50



）を含む。いくつかの実施形態において、CMはアミノ酸配列LSQARWRK（配列番号261）を含む。いくつかの実施形態において、CMはアミノ酸配列DISHWRRS（配列番号262）を含む。いくつかの実施形態において、CMはアミノ酸配列RKT V QHWW（配列番号263\_\_）を含む。いくつかの実施形態において、CMはアミノ酸配列RFYRNQFF（配列番号264）を含む。いくつかの実施形態において、CMはアミノ酸配列RSLVFAP I（配列番号265）を含む。いくつかの実施形態において、CMはアミノ酸配列RSPSRLKC（配列番号266）を含む。いくつかの実施形態において、CMはアミノ酸配列RKMPNITV（配列番号267）を含む。

#### 【0179】

いくつかの実施形態において、モチーフ配列は、表10A～10Dに示すコアCMコンセンサス配列を含む。いくつかの実施形態において、モチーフ配列は、表10A～10Dに示すコアCMコンセンサス配列の亜属、すなわち、亜群を含む。

10

#### 【0180】

いくつかの実施形態において、モチーフ配列は、表10A～10Dに示すコアCMコンセンサス配列の1つに基づく拡張コンセンサス配列を含む。いくつかの実施形態において、拡張コンセンサス配列は、表11A～11Dに示すコンセンサス配列である。

#### 【0181】

いくつかの実施形態において、CMは、アミノ酸配列LSGRS ANH（配列番号307）又はLSGRSGNH（配列番号308）を含むコアCMコンセンサス11配列を含む。いくつかの実施形態において、CMは、アミノ酸配列DRLSGRS ANHKK（配列番号309）、DRLSGRSDNHKK（配列番号310）、又はNTLSGRSGNHGS（配列番号311）を含む拡張コアCMコンセンサス11配列を含む。

20

#### 【0182】

いくつかの実施形態において、CMはアミノ酸配列LSGRS ANH（配列番号307）を含む。いくつかの実施形態において、CMはアミノ酸配列LSGRSGNH（配列番号308）を含む。いくつかの実施形態において、CMはアミノ酸配列DRLSGRS ANHKK（配列番号309）を含む。いくつかの実施形態において、CMはアミノ酸配列DRLSGRSDNHKK（配列番号310）を含む。いくつかの実施形態において、CMはアミノ酸配列NTLSGRSGNHGS（配列番号311）を含む。

#### 【0183】

30

いくつかの実施形態において、CMはアミノ酸配列LSGRS ANH（配列番号307）を含む。いくつかの実施形態において、CMはアミノ酸配列LNGRSDNH（配列番号313）を含む。いくつかの実施形態において、CMはアミノ酸配列LTGRSDRH（配列番号314）を含む。いくつかの実施形態において、CMは、アミノ酸配列LSGRS ANH（配列番号307）、LNGRSDNH（配列番号313）、及びLTGRSDRH（配列番号314）を含むコアCMコンセンサス12配列を含む。いくつかの実施形態において、CMは、DRLSGRS ANHKK（配列番号309）、DRLSGRSDNHKK（配列番号310）、GPLNGRSDNHKA（配列番号320）、GPLNGRSDNHKK（配列番号321）、GPLNGRSDNHKR（配列番号322）、GPLNGRSDNHQA（配列番号323）、GPLNGRSDNHQK（配列番号324）、GPLNGRSDNHQR（配列番号325）、GPLNGRSDNHRA（配列番号326）、GPLNGRSDNHRK（配列番号327）、GPLNGRSDNHRR（配列番号328）、RPLNGRSDNHKA（配列番号329）、RPLNGRSDNHKK（配列番号330）、RPLNGRSDNHKR（配列番号331）、RPLNGRSDNHQA（配列番号332）、RPLNGRSDNHQK（配列番号333）、RPLNGRSDNHQR（配列番号334）、RPLNGRSDNHRA（配列番号335）、RPLNGRSDNHRK（配列番号336）、RPLNGRSDNHR（配列番号337）、GPLSGRSDNHKA（配列番号338）、GPLSGRSDNHKK（配列番号339）、GPLSGRSDNHKR（配列番号340）、GPLSGRSDNHQA（配列番号341）、GPLSGRSDNHQK（配列番号342）

40

50

、G P L S G R S D N H Q R (配列番号343)、G P L S G R S D N H R A (配列番号344)、G P L S G R S D N H R K (配列番号345)、G P L S G R S D N H R R (配列番号346)、R P L S G R S D N H K A (配列番号347)、R P L S G R S D N H K K (配列番号348)、R P L S G R S D N H K R (配列番号349)、R P L S G R S D N H Q A (配列番号350)、R P L S G R S D N H Q K (配列番号351)、R P L S G R S D N H Q R (配列番号352)、R P L S G R S D N H R A (配列番号353)、R P L S G R S D N H R K (配列番号354)、R P L S G R S D N H R R (配列番号355)、及びK G L T G R S D R H Q A (配列番号356)から成る群から選択されるアミノ酸配列を含む拡張コアCMコンセンサス12配列を含む。

# 【0184】

いくつかの実施形態において、CMはアミノ酸配列D R L S G R S A N H K K (配列番号309)を含む。いくつかの実施形態において、CMはアミノ酸配列D R L S G R S D N H K K (配列番号310)を含む。いくつかの実施形態において、CMはアミノ酸配列G P L N G R S D N H K A (配列番号320)を含む。いくつかの実施形態において、CMはアミノ酸配列G P L N G R S D N H K K (配列番号321)を含む。いくつかの実施形態において、CMはアミノ酸配列G P L N G R S D N H K R (配列番号322)を含む。いくつかの実施形態において、CMはアミノ酸配列G P L N G R S D N H Q A (配列番号323)を含む。いくつかの実施形態において、CMはアミノ酸配列G P L N G R S D N H Q K (配列番号324)を含む。いくつかの実施形態において、CMはアミノ酸配列G P L N G R S D N H Q R (配列番号325)を含む。いくつかの実施形態において、CMはアミノ酸配列G P L N G R S D N H R A (配列番号326)を含む。いくつかの実施形態において、CMはアミノ酸配列G P L N G R S D N H R K (配列番号327)を含む。いくつかの実施形態において、CMはアミノ酸配列G P L N G R S D N H R R (配列番号328)を含む。いくつかの実施形態において、CMはアミノ酸配列R P L N G R S D N H K A (配列番号329)を含む。いくつかの実施形態において、CMはアミノ酸配列R P L N G R S D N H K K (配列番号330)を含む。いくつかの実施形態において、CMはアミノ酸配列R P L N G R S D N H K R (配列番号331)を含む。いくつかの実施形態において、CMはアミノ酸配列R P L N G R S D N H Q A (配列番号332)を含む。いくつかの実施形態において、CMはアミノ酸配列R P L N G R S D N H Q K (配列番号333)を含む。いくつかの実施形態において、CMはアミノ酸配列R P L N G R S D N H Q R (配列番号334)を含む。いくつかの実施形態において、CMはアミノ酸配列R P L N G R S D N H R A (配列番号335)を含む。いくつかの実施形態において、CMはアミノ酸配列R P L N G R S D N H R K (配列番号336)を含む。いくつかの実施形態において、CMはアミノ酸配列R P L N G R S D N H R R (配列番号337)を含む。いくつかの実施形態において、CMはアミノ酸配列G P L S G R S D N H K A (配列番号338)を含む。いくつかの実施形態において、CMはアミノ酸配列G P L S G R S D N H K K (配列番号339)を含む。いくつかの実施形態において、CMはアミノ酸配列G P L S G R S D N H K R (配列番号340)を含む。いくつかの実施形態において、CMはアミノ酸配列G P L S G R S D N H Q A (配列番号341)を含む。いくつかの実施形態において、CMはアミノ酸配列G P L S G R S D N H Q K (配列番号342)を含む。いくつかの実施形態において、CMはアミノ酸配列G P L S G R S D N H Q R (配列番号343)を含む。いくつかの実施形態において、CMはアミノ酸配列G P L S G R S D N H R A (配列番号344)を含む。いくつかの実施形態において、CMはアミノ酸配列G P L S G R S D N H R K (配列番号345)を含む。いくつかの実施形態において、CMはアミノ酸配列G P L S G R S D N H R R (配列番号346)を含む。いくつかの実施形態において、CMはアミノ酸配列R P L S G R S D N H K A (配列番号347)を含む。いくつかの実施形態において、CMはアミノ酸配列R P L S G R S D N H K K (配列番号348)を含む。いくつかの実施形態において、CMはアミノ酸配列R P L S G R S D N H K R (配列番号349)を含む。いくつかの実施形態において、CMはアミノ酸配列R P L S G R S D N H Q A (配列番号350)を含む。いくつかの実施形態において、C

10

20

30

40

50

Mはアミノ酸配列 R P L S G R S D N H Q K (配列番号 3 5 1) を含む。いくつかの実施形態において、C Mはアミノ酸配列 R P L S G R S D N H Q R (配列番号 3 5 2) を含む。いくつかの実施形態において、C Mはアミノ酸配列 R P L S G R S D N H R A (配列番号 3 5 3) を含む。いくつかの実施形態において、C Mはアミノ酸配列 R P L S G R S D N H R K (配列番号 3 5 4) を含む。いくつかの実施形態において、C Mはアミノ酸配列 R P L S G R S D N H R R (配列番号 3 5 5) を含む。いくつかの実施形態において、C Mはアミノ酸配列 K G L T G R S D R H Q A (配列番号 3 5 6) を含む。

#### 【 0 1 8 5 】

いくつかの実施形態において、C Mは、アミノ酸配列 R I G R S D N H (配列番号 3 5 7) 又は R L G R S D N N (配列番号 3 5 8) を含むコア C M コンセンサス 1 3 配列を含む。いくつかの実施形態において、C Mは、アミノ酸配列 N H R I G R S D N H R R (配列番号 3 5 9) 又は T L R L G R S D N N K N (配列番号 3 6 0) を含む拡張コア C M コンセンサス 1 3 配列を含む。

10

#### 【 0 1 8 6 】

いくつかの実施形態において、C Mはアミノ酸配列 R I G R S D N H (配列番号 3 5 7) を含む。いくつかの実施形態において、C Mはアミノ酸配列 R L G R S D N N (配列番号 3 5 8) を含む。いくつかの実施形態において、C Mはアミノ酸配列 N H R I G R S D N H R R (配列番号 3 5 9) を含む。いくつかの実施形態において、C Mはアミノ酸配列 T L R L G R S D N N K N (配列番号 3 6 0) を含む。

20

#### 【 0 1 8 7 】

いくつかの実施形態において、C Mは、T S G R S A N P (配列番号 3 6 1)、T S G R S G N P (配列番号 3 6 2)、L S G R S A N P (配列番号 3 6 3)、及び L S G R S G N P (配列番号 3 6 4) から成る群から選択されるアミノ酸配列を含むコア C M コンセンサス 1 4 配列を含む。いくつかの実施形態において、C Mは、T S T S G R S A N P R G (配列番号 3 6 5)、T S T S G R S G N P R G (配列番号 3 6 6)、T S L S G R S A N P R G (配列番号 3 6 7)、及び T S L S G R S G N P R G (配列番号 3 6 8) から成る群から選択されるアミノ酸配列を含む拡張コア C M コンセンサス 1 4 配列を含む。

#### 【 0 1 8 8 】

いくつかの実施形態において、C Mはアミノ酸配列 T S G R S A N P (配列番号 3 6 1) を含む。いくつかの実施形態において、C Mはアミノ酸配列 T S G R S G N P (配列番号 3 6 2) を含む。いくつかの実施形態において、C Mはアミノ酸配列 L S G R S A N P (配列番号 3 6 3) を含む。いくつかの実施形態において、C Mはアミノ酸配列 L S G R S G N P (配列番号 3 6 4) を含む。いくつかの実施形態において、C Mはアミノ酸配列 T S T S G R S A N P R G (配列番号 3 6 5) を含む。いくつかの実施形態において、C Mはアミノ酸配列 T S T S G R S G N P R G (配列番号 3 6 6) を含む。いくつかの実施形態において、C Mはアミノ酸配列 T S L S G R S A N P R G (配列番号 3 6 7) を含む。いくつかの実施形態において、C Mはアミノ酸配列と T S L S G R S G N P R G (配列番号 3 6 8) を含む。

30

#### 【 0 1 8 9 】

いくつかの実施形態において、C Mは、L S G R S E N H (配列番号 3 6 9)、S I A R S D N L (配列番号 3 7 0)、L S G R S V T Q (配列番号 3 7 1)、L S G R S G N H (配列番号 3 0 8)、L T G R S D R H (配列番号 3 1 4)、L Y G R S E N N (配列番号 3 7 4)、R L G R S D N N (配列番号 3 7 5)、T S G R S A N P (配列番号 3 7 6)、N T L S G R S E N H S G (配列番号 3 7 7)、P P S I A R S D N L A N (配列番号 3 7 8)、T G L S G R S V T Q T S (配列番号 3 7 9)、N T L S G R S G N H G S (配列番号 3 1 1)、K G L T G R S D R H Q A (配列番号 3 8 1)、K N L Y G R S E N N G N (配列番号 3 8 2)、T L R L G R S D N N K N (配列番号 3 8 3)、及び T S T S G R S A N P R G (配列番号 3 8 4) から成る群から選択されるアミノ酸配列を含む。

40

#### 【 0 1 9 0 】

50

いくつかの実施形態において、CMはアミノ酸配列LSGRSENH（配列番号369）を含む。いくつかの実施形態において、CMはアミノ酸配列SIARSDNL（配列番号370）を含む。いくつかの実施形態において、CMはアミノ酸配列LSGRSVTQ（配列番号371）を含む。いくつかの実施形態において、CMはアミノ酸配列LSGRSGNH（配列番号308）を含む。いくつかの実施形態において、CMはアミノ酸配列LTGRSDRH（配列番号314）を含む。いくつかの実施形態において、CMはアミノ酸配列LYGRSENN（配列番号374）を含む。いくつかの実施形態において、CMはアミノ酸配列RLGRSDNN（配列番号375）を含む。いくつかの実施形態において、CMはアミノ酸配列TSGRS ANP（配列番号376）を含む。いくつかの実施形態において、CMはアミノ酸配列NTLSGRSENHSG（配列番号377）を含む。いくつかの実施形態において、CMはアミノ酸配列PPSIARSDNL AN（配列番号378）を含む。いくつかの実施形態において、CMはアミノ酸配列TGLSGRSVTQT S（配列番号379）を含む。いくつかの実施形態において、CMはアミノ酸配列NTLSGRSGNHGS（配列番号311）を含む。いくつかの実施形態において、CMはアミノ酸配列KGLTGRSDRHQA（配列番号381）を含む。いくつかの実施形態において、CMはアミノ酸配列KNLYGRSENNGN（配列番号382）を含む。いくつかの実施形態において、CMはアミノ酸配列TLRLGRSDNNKN（配列番号383）を含む。いくつかの実施形態において、CMはアミノ酸配列TSTSGRS ANPRG（配列番号384）を含む。

10

#### 【0191】

20

いくつかの実施形態において、CMは、少なくとも2つのプロテアーゼのための基質である。いくつかの実施形態において、少なくとも1つのプロテアーゼは、マトリプターゼ及びuPAから選択され、そして、少なくとも1つのプロテアーゼは、表7に示すものから成る群から選択される。

#### 【0192】

いくつかの実施形態において、活性化可能抗体は、少なくとも第1のCM及び第2のCMを含んでいる。いくつかの実施形態において、第1のCM及び第2のCMはそれぞれ、長さが15アミノ酸未満のポリペプチドである。いくつかの実施形態において、活性化可能抗体内の第1のCM及び第2のCMは、未切断状態で以下のN末端からC末端への構造配置：MM CM1 CM2 AB、AB CM2 CM1 MM、MM CM2 CM1 AB、又はAB CM1 CM2 MMを有する。いくつかの実施形態において、活性化可能抗体は、MMとCM1との間に連結ペプチドを含んでいる。いくつかの実施形態において、活性化可能抗体は、CM1とCM2との間に連結ペプチドを含んでいる。いくつかの実施形態において、活性化可能抗体は、CM2とABとの間に連結ペプチドを含んでいる。いくつかの実施形態において、活性化可能抗体は、MMとCM1との間に連結ペプチドを、及びCM2とABとの間に連結ペプチドを含んでいる。いくつかの実施形態において、活性化可能抗体は、MMとCM1との間に連結ペプチドを、及びCM1とCM2との間に連結ペプチドを含んでいる。いくつかの実施形態において、活性化可能抗体は、CM1とCM2との間に連結ペプチドを、及びCM2とABとの間に連結ペプチドを含んでいる。いくつかの実施形態において、活性化可能抗体は、MMとCM1との間に連結ペプチドを、CM1とCM2との間に連結ペプチドを、及びCM2とABとの間に連結ペプチドを含んでいる。

30

40

#### 【0193】

いくつかの実施形態において、CM2は、特定のプロテアーゼとの使用のために選択される。いくつかの実施形態において、CM2は、マトリックスメタロプロテアーゼ（MMP）、好中球エラスターゼ、uPA、レグミン、マトリプターゼ、トロンビン、例えばカテプシンなどのシステインプロテアーゼ、ADAM17、BMP 1、HtrA1、並びに、例えばTMPRSS3又はTMPRSS4などのTMPRSSから成る群から選択される少なくとも1つのプロテアーゼのための基質である。

#### 【0194】

50

いくつかの実施形態において、CM2は好中球エラスターゼのための基質である。いくつかの実施形態において、CM2はuPAのための基質である。いくつかの実施形態において、CM2はレグミンのための基質である。いくつかの実施形態において、CM2はマトリプターゼのための基質である。いくつかの実施形態において、CM2はトロンビンのための基質である。いくつかの実施形態において、CM2はシステインプロテアーゼのための基質である。いくつかの実施形態において、CM2はカテプシンのための基質である。いくつかの実施形態において、CM2はADAM17のための基質である。いくつかの実施形態において、CM2はBMP 1のための基質である。いくつかの実施形態において、CM2はHtrA1のための基質である。いくつかの実施形態において、CM2はTMPRSS3のための基質である。いくつかの実施形態において、CM2はTMPRSS4のための基質である。

10

# 【0195】

例えば、好適なCM2は、少なくとも1つのプロテアーゼによって切断され、且つ、配列TGRGPSWV（配列番号402）；SARGPSRW（配列番号403）；TARGPSFK（配列番号404）；TARGPSW（配列番号405）；LSGRSDNH（配列番号406）；GGWHTGRN（配列番号407）；HTGRSGAL（配列番号408）；PLTGRSGG（配列番号409）；AARGPAIH（配列番号411）；RGPAFNPM（配列番号412）；SSRGPAYL（配列番号413）；RGPAATPIM（配列番号414）；RGPA（配列番号415）；GGQP SGMWGW（配列番号416）；FPRPLGITGL（配列番号417）；VHMPLGFLGP（配列番号418）；SPLTGRSG（配列番号419）；SAGFSLPA（配列番号126）；LAPLGLQRR（配列番号420）；SGGPLGVR（配列番号421）；PLGL（配列番号422）；GPRSFGL（配列番号423）及び/又はGPRSFGL（配列番号424）を含んでいる。

20

# 【0196】

いくつかの実施形態において、CM2はアミノ酸配列TGRGPSWV（配列番号402）を含む。いくつかの実施形態において、CM2はアミノ酸配列SARGPSRW（配列番号403）を含む。いくつかの実施形態において、CM2はアミノ酸配列TARGPSFK（配列番号404）を含む。いくつかの実施形態において、CM2はアミノ酸配列TARGPSW（配列番号405）を含む。いくつかの実施形態において、CM2はアミノ酸配列LSGRSDNH（配列番号406）を含む。いくつかの実施形態において、CM2はアミノ酸配列GGWHTGRN（配列番号407）を含む。いくつかの実施形態において、CM2はアミノ酸配列HTGRSGAL（配列番号408）を含む。いくつかの実施形態において、CM2はアミノ酸配列PLTGRSGG（配列番号409）を含む。いくつかの実施形態において、CM2はアミノ酸配列AARGPAIH（配列番号411）を含む。いくつかの実施形態において、CM2はアミノ酸配列RGPAFNPM（配列番号412）を含む。いくつかの実施形態において、CM2はアミノ酸配列SSRGPAYL（配列番号413）を含む。いくつかの実施形態において、CM2はアミノ酸配列RGPAATPIM（配列番号414）を含む。いくつかの実施形態において、CM2はアミノ酸配列RGPA（配列番号415）を含む。いくつかの実施形態において、CM2はアミノ酸配列GGQP SGMWGW（配列番号416）を含む。いくつかの実施形態において、CM2はアミノ酸配列FPRPLGITGL（配列番号417）を含む。いくつかの実施形態において、CM2はアミノ酸配列VHMPLGFLGP（配列番号418）を含む。いくつかの実施形態において、CM2はアミノ酸配列SPLTGRSG（配列番号419）を含む。いくつかの実施形態において、CM2はアミノ酸配列LAPLGLQRR（配列番号420）を含む。いくつかの実施形態において、CM2はアミノ酸配列SGGPLGVR（配列番号421）を含む。いくつかの実施形態において、CM2はアミノ酸配列PLGL（配列番号422）を含む。いくつかの実施形態において、CM2はアミノ酸配列GPRSFGL（配列番号423）を含む。いくつかの実施形態において、CM2

30

40

50

はアミノ酸配列 G P R S F G (配列番号 4 2 4) を含む。

【 0 1 9 7 】

いくつかの実施形態において、C M 2 は少なくとも 1 つの M M P のための基質である。いくつかの実施形態において、C M 2 は表 7 で列挙した少なくとも 1 つの M M P のための基質である。いくつかの実施形態において、C M 2 は M M P 9 のための基質である。いくつかの実施形態において、C M 2 は M M P 1 4 のための基質である。いくつかの実施形態において、C M 2 は 2 つ以上の M M P のための基質である。いくつかの実施形態において、C M 2 は少なくとも M M P 9 又は M M P 1 4 のための基質である。いくつかの実施形態において、C M 2 は 2 つ以上の M M P のための基質である。いくつかの実施形態において、C M 2 は少なくとも M M P 9 及び M M P 1 4 のための基質である。

10

【 0 1 9 8 】

いくつかの実施形態において、C M 2 は、M M P のための基質であり、且つ、配列 I S S G L L S S (配列番号 4 2 5) ; Q N Q A L R M A (配列番号 4 2 6) ; A Q N L L G M V (配列番号 4 2 7) ; S T F P F G M F (配列番号 4 2 8) ; P V G Y T S S L (配列番号 4 2 9) ; D W L Y W P G I (配列番号 4 3 0) ; M I A P V A Y R (配列番号 4 3 1) ; R P S P M W A Y (配列番号 4 3 2) ; W A T P R P M R (配列番号 4 3 3) ; F R L L D W Q W (配列番号 4 3 4) ; L K A A P R W A (配列番号 4 3 5) ; G P S H L V L T (配列番号 4 3 6) ; L P G G L S P W (配列番号 4 3 7) ; M G L F S E A G (配列番号 4 3 8) ; S P L P L R V P (配列番号 4 3 9) ; R M H L R S L G (配列番号 4 4 0) ; L A A P L G L L (配列番号 4 4 1) ; A V G L L A P P (配列番号 4 4 2) ; L L A P S H R A (配列番号 4 4 3) ; P A G L W L D P (配列番号 4 4 4) 及び / 又は I S S G L S S (配列番号 4 4 5) を含んでいる。

20

【 0 1 9 9 】

いくつかの実施形態において、第 1 の切断剤と第 2 の切断剤はマトリプターゼ及び u P A から選択されるプロテアーゼであり、且つ、第 1 の C M 及び第 2 の C M は酵素によって異なった基質である。いくつかの実施形態において、第 1 の切断剤と第 2 の切断剤は異なったプロテアーゼであり、ここで、少なくとも 1 つのプロテアーゼがマトリプターゼ及び u P A から選択される。いくつかの実施形態において、第 1 の切断剤と第 2 の切断剤は標的組織内で共局在する。いくつかの実施形態において、第 1 の C M 及び第 2 の C M は標的組織内の少なくとも 1 つの切断剤によって切断される。

30

【 0 2 0 0 】

いくつかの実施形態において、活性化可能抗体がマトリプターゼ及び u P A 斯かるから選択されるプロテアーゼに晒され、それによって切断され、その結果、活性化された又は切断された状態で、活性化された抗体は、プロテアーゼが C M を切断した後、少なくとも L P 2 及び / 又は C M 配列の一部を含む軽鎖アミノ酸配列を含んでいる。

【 0 2 0 1 】

いくつかの実施形態において、C M はプロテアーゼ切断部位の非プライムサイドを含む ; すなわち、C M は少なくとも P 1 及び P 2 アミノ酸を含み、そして、いくつかの実施形態において、P 1、P 2 及び P 3 アミノ酸を含み、そして、いくつかの実施形態において、P 1、P 2、P 3、及び P 4 アミノ酸を含む。いくつかの実施形態において、C M はプロテアーゼ切断部位の非プライムサイドとプライムサイドを含む。いくつかの実施形態において、C M は、非プライムサイドを含むが、プロテアーゼ切断部位のプライムサイドの少なくとも一部を欠いている。いくつかの実施形態において、C M は、非プライムサイドを含んでいるが、プロテアーゼ切断部位のプライムサイドを欠いている。斯かる C M は、抗体又は例えばこれだけに限定されるものではないが、検出部分などの本明細書中の本開示に示す他の分子に直接連結されるか、又はリンカーを通して連結される。

40

【 0 2 0 2 】

いくつかの実施形態において、活性化可能抗体もまた、A B と複合化された剤を含んでいる。いくつかの実施形態において、剤は治療剤である。いくつかの実施形態において、剤は抗腫瘍剤である。いくつかの実施形態において、剤は、毒素又はその断片である。い

50

いくつかの実施形態において、剤はリンカーを介してA Bに結合される。いくつかの実施形態において、リンカーは切断可能なリンカーである。いくつかの実施形態において、剤は微小管阻害剤である。いくつかの実施形態において、剤は、例えばDNAアルキル化剤、DNAインターカレーター、又は他のDNA損傷剤などの核酸損傷剤である。いくつかの実施形態において、リンカーは切断可能なリンカーである。いくつかの実施形態において、剤は、少なくとも1つのMMP切断可能基質配列を含んでいるリンカーを介してA Bに結合される。いくつかの実施形態において、剤は、表3で列挙した群から選ばれた剤である。いくつかの実施形態において、剤はドラスタチンである。いくつかの実施形態において、剤は、アウリスタチン又はその誘導体である。いくつかの実施形態において、剤は、アウリスタチンE又はその誘導体である。いくつかの実施形態において、剤はモノメチルアウリスタチンE (MMAE) である。いくつかの実施形態において、剤はモノメチルアウリスタチンD (MMA D) である。いくつかの実施形態において、剤は、マイタンシノイド又はマイタンシノイド誘導体である。いくつかの実施形態において、剤は、DM 1又はDM 4である。いくつかの実施形態において、剤は、デュオカルマイシン又はその誘導体である。いくつかの実施形態において、剤は、カリケアマイシン又はその誘導体である。いくつかの実施形態において、剤はピロロベンゾジアゼピンである。

10

## 【0203】

いくつかの実施形態において、剤は、抗炎症剤である。

## 【0204】

いくつかの実施形態において、活性化可能抗体はまた、検出可能部分も含んでいる。いくつかの実施形態において、検出可能部分は診断剤である。

20

## 【0205】

いくつかの実施形態において、複合抗体は、検出可能標識を含んでいる。いくつかの実施形態において、検出可能標識は、イメージング剤 (imaging agent)、造影剤、酵素、蛍光標識、発色団、色素、1若しくは複数の金属イオン、又はリガンドベースの標識を含む。いくつかの実施形態において、イメージング剤は放射性同位元素を含む。いくつかの実施形態において、放射性同位元素は、インジウム又はテクネチウムである。いくつかの実施形態において、造影剤は、ヨウ素、ガドリニウム又は酸化鉄を含む。いくつかの実施形態において、酵素は、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、又はガラクトシダーゼを含む。いくつかの実施形態において、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)、修飾された赤色蛍光タンパク質 (mRFP)、赤色蛍光タンパク質 t d i m e r 2 (RFP t d i m e r 2)、HCR ED、又はユーロピウム誘導体を含む。いくつかの実施形態において、発光性標識は、Nメチルアクリジニウム誘導体を含む。いくつかの実施形態において、標識は、Alexa Fluor (登録商標) 680又はAlexa Fluor (登録商標) 750などのAlexa Fluor (登録商標) 標識を含む。いくつかの実施形態において、リガンドベースの標識は、ビオチン、アビジン、ストレプトアビジン又は1若しくは複数のハプテンを含む。

30

## 【0206】

いくつかの実施形態において、活性化可能抗体はまた、シグナルペプチドも含んでいる。いくつかの実施形態において、シグナルペプチドはスパーサーを介して活性化可能抗体に結合される。いくつかの実施形態において、スパーサーはシグナルペプチドがない状態でも活性化可能抗体に結合される。いくつかの実施形態において、スパーサーは活性化可能抗体のMMに直接連結される。いくつかの実施形態において、スパーサーは、スパーサーMMCMABのN末端からC末端への構造配置で活性化可能抗体のMMに直接連結される。活性化可能抗体のMMのN末端に直接連結されるスパーサーの例は、QGQSGQ (配列番号446) である。いくつかの実施形態において、スパーサーは、少なくともアミノ酸配列QGQSGQ (配列番号446) を含んでいる。

40

## 【0207】

いくつかの実施形態において、活性化可能抗体のA Bは、1若しくは複数のジスルフィ

50

ド結合を自然に含んでいる。いくつかの実施形態において、A B は、1 若しくは複数のジスルフィド結合を含むように設計され得る。

【0208】

いくつかの実施形態において、活性化可能抗体の血清中半減期は、対応する抗体の血清中半減期より長い；例えば、活性化可能抗体のp Kは、対応する抗体のp Kより長い。いくつかの実施形態において、活性化可能抗体の血清中半減期は、対応する抗体の血清中半減期と同等である。いくつかの実施形態において、活性化可能抗体の血清中半減期は、生物に投与される場合、少なくとも15日である。いくつかの実施形態において、活性化可能抗体の血清中半減期は、生物に投与される場合、少なくとも12日である。いくつかの実施形態において、活性化可能抗体の血清中半減期は、生物に投与される場合、少なくとも11日である。いくつかの実施形態において、活性化可能抗体の血清中半減期は、生物に投与される場合、少なくとも10日である。いくつかの実施形態において、活性化可能抗体の血清中半減期は、生物に投与される場合、少なくとも9日である。いくつかの実施形態において、活性化可能抗体の血清中半減期は、生物に投与される場合、少なくとも8日である。いくつかの実施形態において、活性化可能抗体の血清中半減期は、生物に投与される場合、少なくとも7日である。いくつかの実施形態において、活性化可能抗体の血清中半減期は、生物に投与される場合、少なくとも6日である。いくつかの実施形態において、活性化可能抗体の血清中半減期は、生物に投与される場合、少なくとも5日である。いくつかの実施形態において、活性化可能抗体の血清中半減期は、生物に投与される場合、少なくとも4日である。いくつかの実施形態において、活性化可能抗体の血清中半減期は、生物に投与される場合、少なくとも3日である。いくつかの実施形態において、活性化可能抗体の血清中半減期は、生物に投与される場合、少なくとも2日である。いくつかの実施形態において、活性化可能抗体の血清中半減期は、生物に投与される場合、少なくとも24時間である。いくつかの実施形態において、活性化可能抗体の血清中半減期は、生物に投与される場合、少なくとも20時間である。いくつかの実施形態において、活性化可能抗体の血清中半減期は、生物に投与される場合、少なくとも18時間である。いくつかの実施形態において、活性化可能抗体の血清中半減期は、生物に投与される場合、少なくとも16時間である。いくつかの実施形態において、活性化可能抗体の血清中半減期は、生物に投与される場合、少なくとも14時間である。いくつかの実施形態において、活性化可能抗体の血清中半減期は、生物に投与される場合、少なくとも12時間である。いくつかの実施形態において、活性化可能抗体の血清中半減期は、生物に投与される場合、少なくとも10時間である。いくつかの実施形態において、活性化可能抗体の血清中半減期は、生物に投与される場合、少なくとも8時間である。いくつかの実施形態において、活性化可能抗体の血清中半減期は、生物に投与される場合、少なくとも6時間である。いくつかの実施形態において、活性化可能抗体の血清中半減期は、生物に投与される場合、少なくとも4時間である。いくつかの実施形態において、活性化可能抗体の血清中半減期は、生物に投与される場合、少なくとも3時間である。

【0209】

いくつかの実施形態において、活性化可能抗体及び/又は複合化(conjugated)活性化可能抗体は、単一特異的である。いくつかの実施形態において、活性化可能抗体及び/又は複合活性化可能抗体は、多重特異的であり、例えば非限定な例によれば、二重特異的又は三官能性である。いくつかの実施形態において、活性化可能抗体及び/又は複合活性化可能抗体は、プロ二重特異的T細胞エンゲージ(BITE)分子の一部として処方される。いくつかの実施形態において、活性化可能抗体及び/又は複合活性化可能抗体は、プロキメラ抗原受容体(CAR)修飾されたT細胞又は他の操作された受容体の一部として処方される。

【0210】

本開示はまた、所定の標的を特異的に結合する抗体又は抗体フラグメント(A B)を含む活性化可能抗体を含む組成物及び方法をも提供し、ここでA Bは、A Bのその標的を結合する能力を低めるマスキング部分(M M)に結合される。いくつかの実施形態において



、活性化可能抗体はさらに、マトリプターゼ及びu P Aから選択される少なくとも1つのプロテアーゼのための基質である切断可能部分(C M)を含む。本明細書に提供される組成物及び方法は、活性化可能抗体の活性(例えば、マスキング、活性化又は結合活性)を損なうことなく、A Bにおける1若しくは複数のシステイン残基への1若しくは複数の剤の結合を可能にする。いくつかの実施形態において、本明細書に提供される組成物及び方法は、M M内の1若しくは複数のジスルフィド結合を還元し、そうでなければ、破壊することなく、A Bにおける1若しくは複数のシステイン残基への1若しくは複数の剤の結合を可能にする。本明細書に提供される組成物及び方法は、1若しくは複数の剤、例えば任意の種々の治療剤、診断剤及び/又は予防剤に結合される活性化可能抗体を生成し、例えば、いくつかの実施形態において、前記(単数若しくは複数の)剤のいずれも、活性化可能抗体のM Mに結合されない。本明細書に提供される組成物及び方法は、M Mが切断されていない状態で活性化可能抗体のA Bを、効果的且つ効率的にマスキングする能力を保持する、複合活性化可能抗体(conjugated activatable antibody)を生成する。本明細書に提供される組成物及び方法は、複合活性化可能抗体を生成し、ここで活性化可能抗体は、C Mを切断できるプロテアーゼ、すなわち、マトリプターゼ及び/又はu P Aの存在下でまだ活性されており、すなわち切断されている。

10

#### 【0211】

活性化可能抗体は、剤のための少なくとも1つの結合点を有するが、本明細書に提供される方法及び組成物においては、すべてよりも少ない可能性ある結合点が、剤への結合のために利用できる。いくつかの実施形態において、1若しくは複数の結合点は、ジスルフィド結合に含まれる硫黄原子である。いくつかの実施形態において、1若しくは複数の結合点は、鎖間ジスルフィド結合に含まれる硫黄原子である。いくつかの実施形態において、1若しくは複数の結合点は、鎖間スルフィド結合に含まれる硫黄原子であるが、しかし鎖内ジスルフィド結合に含まれる硫黄原子ではない。いくつかの実施形態において、1若しくは複数の結合点は、システイン、又は硫黄原子を含む他のアミノ酸残基中の硫黄原子である。斯かる残基は、抗体構造中に天然に存在することができるか、又は部位特異的突然変異誘発、化学的変換、又は非天然アミノ酸の誤取り組みにより、抗体中に組み込まれ得る。

20

#### 【0212】

A Bに1若しくは複数の鎖間ジスルフィド結合及びM Mに1若しくは複数の鎖内辞スルフィド結合を有する活性化可能抗体の調製方法もまた提供され、そして遊離チオールと反応性の薬物が提供される。前記方法は一般的に、活性化可能抗体における鎖間ジスルフィド結合を、還元剤、例えばT C E Pにより部分的に還元し；そして前記部分的に還元された活性化可能抗体に、遊離チオールと反応性の薬物を結合することを含んでいる。本明細書において使用される場合、用語「部分的還元」とは、活性化可能抗体が、還元剤と接触され、そしてすべてよりも少ないジスルフィド結合、例えばすべてよりも少ない可能性ある結合部位が還元される状況を言及する。いくつかの実施形態において、すべての可能性ある結合部位の99%、98%、97%、96%、95%、90%、85%、80%、75%、70%、65%、60%、55%、50%、45%、40%、35%、30%、25%、20%、15%、10%又は5%未満が還元される。

30

40

#### 【0213】

いくつかの実施形態において、剤、例えば薬物を、前記剤の配置下で選択性をもたらす活性化可能抗体に還元し、そして結合する方法が提供される。前記方法は、一般的に、還元剤により活性化可能抗体を部分的に還元し、結果的に、活性化可能抗体のマスキング部分又は他の非-A B部分における任意の結合部位が還元されず、そして前記剤を、A Bにおける鎖間チオールに結合することを含んでいる。結合部位は、所望する部位での結合を可能にする剤の所望する配置を可能にするよう選択される。還元剤は例えば、T C E Pである。還元反応条件、例えば還元剤：活性化可能抗体の比、インキュベーションの長さ、インキュベーションとの間に温度、還元反応溶液のp H、等は、M Mが切断されていない状態で活性化可能抗体のA Bを、効果的に且つ効率的にマスキングする能力を保持する、

50

複合活性化可能抗体を生成する条件を同定することにより決定される。還元剤：活性化可能抗体の比は、活性化可能抗体に依存して変化するのであろう。いくつかの実施形態において、還元剤：活性化可能抗体の比は、約20：1～1：1、約10：1～1：1、約9：1～1：1、約8：1～1：1、約7：1～1：1、約6：1～1：1、約5：1～1：1、約4：1～1：1、約3：1～1：1、約2：1～1：1、約20：1～1：1.5、約10：1～1：1.5、約9：1～1：1.5、約8：1～1：1.5、約7：1～1：1.5、約6：1～1：1.5、約5：1～1：1.5、約4：1～1：1.5、約3：1～1：1.5、約2：1～1：1.5、約1.5：1～1：1.5又は約1：1～1：1.5の範囲で存在するであろう。いくつかの実施形態において、前記比は、約5：1～1.5：1の範囲で存在する。いくつかの実施形態において、前記比は、約4：1～1：1の範囲で存在する。いくつかの実施形態において、前記比は、約4：1～1.5：1の範囲で存在する。いくつかの実施形態において、前記比は、約8：1～約1：1の範囲で存在する。いくつかの実施形態において、前記比は、約2.5：1～1：1の範囲で存在する。

#### 【0214】

いくつかの実施形態において、活性化可能抗体のABにおける鎖間ジスルフィド結合を還元し、そして剤、例えばチオール含有剤、例えば薬物を、AB上に剤を選択的に位置決定するために、前記得られる鎖間チオールに結合する方法が提供される。前記方法は一般的に、活性化可能抗体におけるすべての可能性ある鎖間チオールを形成しないで、少なくとも2つの鎖間チオールを形成するために、還元剤によりABを部分的に還元する；前記剤を、部分的に還元されたABの鎖間チオールに結合することを含んでいる。例えば活性化可能抗体のABは、還元剤：活性化可能抗体の所望する比で、約37で約1時間、部分的に還元される。いくつかの実施形態において、還元剤：活性化可能抗体の比は、約20：1～1：1、約10：1～1：1、約9：1～1：1、約8：1～1：1、約7：1～1：1、約6：1～1：1、約5：1～1：1、約4：1～1：1、約3：1～1：1、約2：1～1：1、約20：1～1：1.5、約10：1～1：1.5、約9：1～1：1.5、約8：1～1：1.5、約7：1～1：1.5、約6：1～1：1.5、約5：1～1：1.5、約4：1～1：1.5、約3：1～1：1.5、約2：1～1：1.5、約1.5：1～1：1.5又は約1：1～1：1.5の範囲で存在するであろう。いくつかの実施形態において、前記比は、約5：1～1：1の範囲で存在する。いくつかの実施形態において、前記比は、約4：1～1：1の範囲で存在する。いくつかの実施形態において、前記比は、約4：1～1.5：1の範囲で存在する。いくつかの実施形態において、前記比は、約8：1～約1：1の範囲で存在する。いくつかの実施形態において、前記比は、約2.5：1～1：1の範囲で存在する。

#### 【0215】

チオール含有試薬は例えば、システイン又はN-アセチルシステインであり得る。還元剤は例えば、TCEPであり得る。いくつかの実施形態において、還元された活性化可能抗体は、結合の前、例えばカラムクロマトグラフィー、透析又はダイアフィルトレーションを用いて、精製され得る。いくつかの実施形態において、還元された抗体は、部分的還元の後、及び結合の前、精製されない。

#### 【0216】

本発明は、部分的に還元された活性化可能抗体も提供し、ここで前記活性化可能抗体における少なくとも1つの鎖間ジスルフィド結合が、活性化可能抗体中のいずれの鎖内ジスルフィド結合も妨害しないで、還元剤により還元されており、ここで前記活性化可能抗体は、標的に対して特異的に結合する抗体又はその抗原結合フラグメント(AB)、切断されていない状態で、標的への活性化可能抗体中のABの結合を阻害するマスキング部分(MM)、及びABに結合される切断可能部分(CM)を含み、ここで、該CMは、マトリプターゼ及びuPAから選択されるプロテアーゼのための基質として機能するポリペプチドである。いくつかの実施形態において、MMは、CMを介してABに結合される。いくつかの実施形態において、活性化可能抗体の1若しくは複数の鎖内ジスルフィド結合は、

還元剤により妨害されない。いくつかの実施形態において、活性化可能抗体内のMMの1若しくは複数の鎖内ジスルフィド結合は、還元剤により妨害されない。いくつかの実施形態において、切断されていない状態での活性化可能抗体は、以下のようなN末端からC末端側への構造配置：MM - CM - AB又はAB - CM - MMを有する。いくつかの実施形態において、還元剤はTCEPである。

#### 【0217】

本開示はまた、モノメチルアウリスタチンD(MMAD)ペイロードに接続された活性化可能抗体を含む複合活性化可能抗体を提供し、ここで前記活性化可能抗体は、標的に対して特異的に結合する抗体又はその抗原結合フラグメント(AB)、切断されていない状態、標的への活性化可能抗体中のABの結合を阻害するマスキング部分(MM)、及びABに結合される切断可能部分(CM)を含み、且つ、該CMは少なくとも1つのMMPプロテアーゼのための基質として機能するポリペプチドである。

10

#### 【0218】

いくつかの実施形態において、MMAD複合活性化可能抗体は、剤をABに付加するためのいくつかの方法：(a)ABの炭化水素部分への付加、又は(b)ABのスルフィドリル基への付加、又は(c)ABのアミノ基への付加、又は(d)ABのカルボキシレート基への付加、のいずれかを使用して複合化され得る。

#### 【0219】

いくつかの実施形態において、MMADペイロードはリンカーを介してABに結合される。いくつかの実施形態において、MMADペイロードはリンカーを介してABのシステムに結合される。いくつかの実施形態において、MMADペイロードはリンカーを介してABのリジンに結合される。いくつかの実施形態において、MMADペイロードは、本明細書中に本開示されたそれらの残基などのリンカーを介してABの別の残基に結合される。いくつかの実施形態において、リンカーはチオール含有リンカーである。いくつかの実施形態において、リンカーは切断可能なリンカーである。いくつかの実施形態において、リンカーは、非切断可能リンカーである。いくつかの実施形態において、リンカーは、表5及び6に示したリンカーから成る群から選択される。いくつかの実施形態において、活性化可能抗体とMMADペイロードは、マレイミドカプロイル - バリン - シトルリンリンカーを介して連結される。いくつかの実施形態において、活性化可能抗体とMMADペイロードは、マレイミドPEG - バリン - シトルリンリンカーを介して連結される。いくつかの実施形態において、活性化可能抗体とMMADペイロードは、マレイミドカプロイル - バリン - シトルリン - パラ - アミノベンジルオキシカルボニルリンカーを介して連結される。いくつかの実施形態において、活性化可能抗体とMMADペイロードは、マレイミドPEG - バリン - シトルリン - パラ - アミノベンジルオキシカルボニルリンカーを介して連結される。いくつかの実施形態において、MMADペイロードは、本明細書中に本開示した部分還元と結合技術を使用してABに結合される。

20

30

#### 【0220】

本開示はまた、本明細書中に提示したマトリプターゼ切断可能基質配列及び/又は本明細書中に提示したuPA切断可能基質配列の1若しくは複数を含んでいるポリペプチド及び他の大型分子を提供する。制限されることのない例によると、本明細書中に提示したマトリプターゼ切断可能基質配列及び/又は本明細書中に提示したuPA切断可能基質配列は、プロドラッグ組成物及びその使用方法に有効である。これらの本明細書中に提示したマトリプターゼ切断可能基質配列及び/又は本明細書中に提示したuPA切断可能基質配列は、プローブ及び他の検出可能な剤、並びにその使用方法に有効である。例えば、本明細書中に提示したマトリプターゼ切断可能基質配列及び/又は本明細書中に提示したuPA切断可能基質配列は、イメージング剤及び/又は他の診断薬などの検出可能な剤を生じさせるために蛍石や他のクエンチャーと結合状態で使用される。当業者は、本明細書中に提示したマトリプターゼ切断可能基質配列及び/又は本明細書中に提示したuPA切断可能基質配列がマトリプターゼ及び/又はuPAによって切断可能基質を使用する技術分野における任意の組成物及び/又は方法に有効であることを理解する。

40

50

## 【0221】

いくつかの実施形態において、本開示のマトリプターゼ及び/又はuPA基質は、大型分子、例えば、(i)CMに対してアミノ(N)末端側に位置する、すなわち、大型分子内にて、CMよりも大型分子のN末端の近くに位置している、少なくとも1つの部分(M<sub>N</sub>)；(ii)CMに対してカルボキシル(C)末端側に位置する、すなわち、大型分子内にて、CMよりも大型分子のC末端の近くに位置している少なくとも1つの部分(M<sub>C</sub>)；(iii)その組み合わせ、から成る群から選択される少なくとも1つの追加部分(M)を含む単離されたポリペプチドに使用される。いくつかの実施形態において、大型分子は、少なくとも1つのM<sub>N</sub>及び少なくとも1つのM<sub>C</sub>を含んでいる。

## 【0222】

制限されることのない例によると、本開示の大型分子における使用のための好適なM<sub>N</sub>は、次の：マスキング部分、抗体、タンパク質、治療薬、抗悪性腫瘍薬、毒性剤、薬剤、検出可能部分、診断剤、親和性タグ、及びその組み合わせ、のうちの少なくとも1つを含む。

## 【0223】

制限されることのない例によると、本開示の大型分子における使用のための好適なM<sub>C</sub>は、次の：マスキング部分、抗体、タンパク質、治療薬、抗悪性腫瘍薬、毒性剤、薬剤、検出可能部分、診断剤、親和性タグ、及びその組み合わせ、のうちの少なくとも1つを含む。

## 【0224】

本開示はまた、本開示のCM含有分子、例えばCM含有ポリペプチド、例えば本明細書中に記載したCM含有プローブ、抗体、及び/又は活性化可能抗体、をコードする単離された核酸分子、並びにこれらの単離された核酸配列を含むベクターも提供する。本開示は、CM含有ポリペプチドの発現につながる条件下で細胞を培養することによってCM含有ポリペプチドを製造する方法を提供し、ここで、該細胞は斯かるベクターを含む。本開示は、抗体及び/又は活性化可能抗体の発現につながる条件下で細胞を培養することによって抗体及び/又は活性化可能抗体を製造する方法を提供し、ここで、該細胞は斯かるベクターを含む。

## 【0225】

本開示は、所定の標的に結合する、本開示のCM含有ポリペプチドを製造する方法であって、(a)CM含有ポリペプチドをコードする核酸構築物を含んでいる細胞を、ポリペプチドの発現につながる条件下で培養し、(i)ここで、該ポリペプチドは切断可能部分(CM)を含んでおり、及び(ii)ここで、該CMが、マトリプターゼ及びuPAから選択される少なくとも1つのプロテアーゼのための基質として機能するポリペプチドであり；そして、(b)ポリペプチドを回収することによる方法を提供する。これらの方法はまた、(c)回収したポリペプチドを1若しくは複数の追加の剤に結合すること、から成る更なるステップを含むこともできる。

## 【0226】

本開示は、所定の標的に結合する、本開示の複合抗体を製造する方法であって、(a)抗体をコードする核酸構築物を含んでいる細胞を、抗体の発現につながる条件下で培養し、(i)ここで、該抗体が切断可能部分(CM)を含んでおり、及び(ii)該CMが、マトリプターゼ及びuPAから選択される少なくとも1つのプロテアーゼのための基質として機能するポリペプチドであり；(b)抗体を回収し；そして、(c)回収した抗体を1若しくは複数の追加の剤に結合することによる方法を提供する。

## 【0227】

本開示はまた、(a)活性化可能抗体をコードする核酸構築物を含む細胞を、前記活性化可能抗体の発現を導く条件下で培養し、ここで前記活性化可能抗体はマスキング成分(MM)、切断可能成分(CM)、及び標的を特異的に結合する抗体又はその抗原結合フラグメント(AB)を含み、ここで、(i)CMは、マトリプターゼ及びuPAから選択されるプロテアーゼのための基質として機能するアミノ酸配列を含むポリペプチドであり；

10

20

30

40

50

そして ( i i ) 前記 C M は、活性化可能抗体に位置し、結果的に、末切断状態下で、M M は標的への A B の特異的結合と干渉し、そして切断された状態下で、前記 M M は標的への A B の特異的結合と干渉しないか又はその結合と競合せず；そして ( b ) 前記活性可能抗体を回収することにより、所定の標的に活性化された状態で結合する、本開示の活性化可能抗体の製造方法も提供する。

【 0 2 2 8 】

本開示はまた、制限されることのない例として、プロドラッグ、非ペプチド型プローブなどを含む C M 含有非ポリペプチド分子を製造する方法も提供する。これらの C M 含有非ポリペプチド分子は、標準的な化学合成及び／又は複合化方法を含めた、技術分野で認識されているさまざまな技術を使用することで作製されることができる。

10

【 0 2 2 9 】

本開示は、それを必要としている対象に、治療上有効な量の本明細書中に記載した複合抗体、活性化可能抗体及び／又は複合活性化可能抗体を投与するのによって、対象の標的関連の疾患を予防する、進行を遅らせる、処置する、症状を緩和する、又はそうでなければ改善する方法を提供する。

【 0 2 3 0 】

本開示は、それを必要としている対象に、治療上有効な量の本明細書中に記載した複合抗体、活性化可能抗体及び／又は複合活性化可能抗体を投与するのによって、対象の炎症及び／又は炎症性疾患を予防する、進行を遅らせる、処置する、症状を緩和する、又はそうでなければ改善する方法を提供する。本開示はまた、それを必要としている対象に、治療上有効な量の本明細書中に記載した複合抗体、活性化可能抗体及び／又は複合活性化可能抗体を投与するのによって、対象の癌を予防する、進行を遅らせる、処置する、症状を緩和する、又はそうでなければ改善する方法を提供する。本開示はまた、それを必要としている対象に、治療上有効な量の本明細書中に記載した複合抗体、活性化可能抗体及び／又は複合活性化可能抗体を投与するのによって、対象の自己免疫疾患を予防する、進行を遅らせる、処置する、症状を緩和する、又はそうでなければ改善する方法を提供する。

20

【 0 2 3 1 】

これらの方法及び用途のいずれの実施形態で使用される複合抗体、活性化可能抗体及び／又は複合活性化可能抗体も、疾患のいずれの病期で投与されてもよい。例えば、斯かる複合抗体、活性化可能抗体及び／又は複合活性化可能抗体は、初期から転移性までのいずれの病期の癌罹患患者に投与されてもよい。対象及び患者という用語は、本明細書中で互換的に使用される。

30

【 0 2 3 2 】

いくつかの実施形態において、対象は哺乳類、例えばヒト、ヒト以外の霊長類、愛玩動物（例えば、ネコ、イヌ、ウマ）、家畜、作業動物又は動物園の動物などである。いくつかの実施形態において、対象はヒトである。いくつかの実施形態において、対象は愛玩動物である。いくつかの実施形態において、対象は、獣医が処置中の動物である。

【 0 2 3 3 】

複合抗体、活性化可能抗体及び／又は複合活性化可能抗体及びその治療製剤は、異常な標的の発現及び／又は活性に関係する疾患又は障害を有するか又はかかりやすい対象に投与される。異常な標的の発現及び／又は活性に関係する疾患又は障害を有するか又はかかりやすい対象は、当業界において知られている種々の方法を用いて、同定される。例えば、癌又は他の腫瘍性状態を有する対象は、健康状態を評価するために、種々の臨床学的及び／又は臨床検査、例えば物理的検査法、及び血液、尿及び／又は検便を用いて、同定される。例えば、炎症及び／又は炎症性疾患に罹患している対象は、健康状態を評価するために、臨床学的及び／又は臨床検査、例えば物理的検査法、及び体液分析、血液、尿及び／又は検便などのさまざまな検査のいずれかを用いて、同定される。

40

【 0 2 3 4 】

異常な標的の発現及び／又は活性に関係する疾患又は障害を有する患者への複合抗体、活性化可能抗体及び／又は複合活性化可能抗体の投与は、種々の実験的又は臨床目的が達

50

成される場合、成功したものとして見なされる。例えば、異常な標的の発現及び／又は活性に関する疾患又は障害を有する患者への複合抗体、活性化可能抗体及び／又は複合活性化可能抗体の投与は、患者又は障害に関連する１若しくは複数の症状が緩和され、軽減され、阻害されるか、又はさらなる悪化状態に進行しない場合、成功したものとして見なされる。異常な標的の発現及び／又は活性に関する疾患又は障害を有する患者への複合抗体、活性化可能抗体及び／又は複合活性化可能抗体の投与は、疾患又は障害が回復するか、又はさらに悪化状態に進行しない場合、成功したものとして見なされる。

#### 【 0 2 3 5 】

いくつかの実施形態において、複合抗体、活性化可能抗体及び／又は複合活性化可能抗体は、例えば、抗炎症剤、免疫抑制剤、及び／又は化学療法薬などの１若しくは複数の追加の剤と組み合わせて、処置中及び／又は処置後に投与される。いくつかの実施形態において、複合抗体、活性化可能抗体及び／又は複合活性化可能抗体、並びに（単数若しくは複数の）追加の剤は、同時に投与する。例えば、複合抗体、活性化可能抗体及び／又は複合活性化可能抗体、並びに（単数若しくは複数の）追加の剤は、単一の組成物で処方されても、又は２つ以上の別個の組成物として投与されてもよい。いくつかの実施形態において、複合抗体、活性化可能抗体及び／又は複合活性化可能抗体、並びに（単数若しくは複数の）追加の剤は、連続して投与されるか、又は抗体及び／又は複合抗体、並びに追加の剤は、治療計画中のいろいろな時間に投与される。例えば、抗体及び／又は複合抗体は追加の剤の投与前に投与されるか、抗体及び／又は複合抗体は追加の剤の投与に続いて投与されるか、又は抗体及び／又は複合抗体、並びに追加の剤は交互の様式で投与される。本明細書中に記載したように、抗体及び／又は複合抗体、並びに追加の剤は単回投与又は複数回投与で投与される。

#### 【 0 2 3 6 】

いくつかの実施形態において、複合抗体、活性化可能抗体及び／又は複合活性化可能抗体は、制限されることのない例によれば、抗炎症剤、免疫抑制剤、例えばアルキル化剤、代謝拮抗物質、抗微小管剤、トポイソメラーゼ阻害剤、細胞傷害性の抗生物質、及び／又はその他の核酸損傷剤などの化学療法薬などの１若しくは複数の追加の剤と組み合わせて、処置中及び／又はその後に投与される。いくつかの実施形態において、追加の剤はパクリタキセルなどのタキサン（例えば、Abraxane（登録商標））である。いくつかの実施形態において、追加の剤はゲムシタピンなどの代謝拮抗物質である。いくつかの実施形態において、追加の剤は、カルボプラチン又はシスプラチンなどの白金を用いた化学療法などのアルキル化剤である。いくつかの実施形態において、追加の剤は、キナーゼ阻害剤、例えば、ソラフェニブ又はエルロチニブなどの標的化剤である。いくつかの実施形態において、追加の剤は、別の抗体、例えば、モノクローナル抗体（例えば、ペバシズマブ）、二重特異性抗体、又は多重特異性抗体などの標的化剤である。いくつかの実施形態において、追加の剤は、ボルテゾミブ又はカーフィルゾミブなどのプロテオソーム阻害剤である。いくつかの実施形態において、追加の剤は、レナリドマイド（lenalidomide）又はIL-2などの免疫修飾薬である。いくつかの実施形態において、追加の剤は放射線である。いくつかの実施形態において、追加の剤は、当業者によって標準的な処置と考えられる剤である。いくつかの実施形態において、追加の剤は、当業者にとって周知の化学療法薬である。

#### 【 0 2 3 7 】

いくつかの実施形態において、追加の剤は、抗体、別の複合抗体、別の活性化可能抗体、及び／又は別の複合活性化可能抗体である。いくつかの実施形態において、追加の剤は、第１の複合抗体、活性化可能抗体及び／又は複合活性化可能抗体と同じ標的に対する抗体、別の複合抗体、別の活性化可能抗体、及び／又は別の複合活性化可能抗体はそうである。いくつかの実施形態において、追加の剤は、第１の複合抗体、活性化可能抗体及び／又は複合活性化可能抗体の標的と異なった標的に対する抗体、別の複合抗体、別の活性化可能抗体、及び／又は別の複合活性化可能抗体である。

#### 【 0 2 3 8 】

いくつかの実施形態において、複合抗体、活性化可能抗体及び／又は複合活性化可能抗体、並びに（単数若しくは複数の）追加の剤は、同時に投与する。例えば、複合抗体、活性化可能抗体及び／又は複合活性化可能抗体、並びに（単数若しくは複数の）追加の剤は、単一の組成物で処方されても、又は２つ以上の別個の組成物として投与されてもよい。いくつかの実施形態において、複合抗体、活性化可能抗体及び／又は複合活性化可能抗体、並びに（単数若しくは複数の）追加の剤は、連続して投与されるか、又は抗体及び／又は複合抗体、並びに追加の剤は、治療計画中のいろいろな時間に投与される。例えば、抗体及び／又は複合抗体は追加の剤の投与前に投与されるか、抗体及び／又は複合抗体は追加の剤の投与に続いて投与されるか、又は抗体及び／又は複合抗体、並びに追加の剤は交互の様式で投与される。本明細書中に記載したように、抗体及び／又は複合抗体、並びに追加の剤は単回投与又は複数回投与である。

10

#### 【 0 2 3 9 】

いくつかの実施形態において、CMは、マスキング部分（MM）にカップリングされた所定の標的に特異的に結合する抗体又はその抗原結合フラグメントを含んでいる活性化可能抗体に連結されるか又は別の方法で取り付けられ、結果的に、ABへのMMのカップリングが、標的に結合する抗体又はその抗原結合フラグメントの能力を低減する。いくつかの実施形態において、MMはCMを介してカップリングされる。代表的な標的は、これだけに限定されるものではないが、表１に示す標的を含む。代表的なABは、これだけに限定されるものではないが、ないで、表２に示す標的を含む。本明細書中に提供した活性化可能抗体は、循環中で安定していて、意図される治療及び／又は診断部位で活性化されるが、正常であれば、例えば健康な組織又は処置及び／又は診断の標的となっていない他の組織で活性化されず、そして、活性化された場合、対応する未修飾の抗体に少なくとも匹敵する標的への結合を示す。

20

#### 【 0 2 4 0 】

本開示はまた、種々の診断及び／又は予防徴候に、複合抗体、活性化可能抗体及び／又は複合活性化可能抗体を使用するための方法及びキットも提供する。

#### 【 0 2 4 1 】

いくつかの実施形態において、本開示は、（i）対象又はサンプルと、活性化可能抗体とを接触し、ここで前記活性化可能抗体は、マスキング部分（MM）、切断剤により切断される切断可能部分（CM）、及び目的の標的物を特異的に結合する抗原結合ドメイン又はそのフラグメント（AB）を含み、ここで未切断、非活性化状態での活性化可能抗体は、次の通りにN末端からC末端側への構造配置：MM - CM - AB又はAB - CM - MMを有し、ここで（a）MMは、標的へのABの結合を阻害するペプチドであり、そしてMMはABの天然に存在する結合パートナーのアミノ酸配列を有さず、そしてABの天然の結合パートナーの修飾された形ではなく、そして（b）未切断、非活性化状態で、MMは標的へのABの特異的結合と干渉し、そして切断された、活性化された状態で、MMは標的へのABの特異的結合と干渉せず、又は競合せず；そして（ii）対象又はサンプルにおける活性化された活性化可能抗体のレベルを測定することにより、対象又はサンプルにおける切断剤及び目的の標的物の存在又は不在を検出するための方法及びキットを提供し、ここで、対象又はサンプルにおける検出可能レベルの活性化された、活性化可能抗体は、切断剤及び標的が対象又はサンプルに存在することを示唆し、そして対象又はサンプルにおける検出可能レベルの活性化された、活性化可能抗体の不在が、切断剤、標的、又はそれらの両者が対象又はサンプルに不在であり、及び／又は十分には存在しないことを示唆する。

30

40

#### 【 0 2 4 2 】

いくつかの実施形態において、活性化可能抗体は、治療剤が結合される活性化可能抗体である。いくつかの実施形態において、活性化可能抗体は、剤に結合されな。いくつかの実施形態において、活性化可能抗体は、検出可能標識を含む。いくつかの実施形態において、検出可能標識は、AB上に位置する。いくつかの実施形態において、対象又はサンプルにおける活性化可能抗体のレベルの測定は、活性化された抗体に対して特異的に結合す

50

る二次試薬を用いて達成され、ここで前記試薬は検出可能標識を含む。いくつかの実施形態において、前記二次試薬は、検出可能標識を含む抗体である。

【0243】

それらの方法及びキットのいくつかの実施形態において、活性化可能抗体は、検出可能標識を含む。それらの方法及びキットのいくつかの実施形態において、検出可能標識は、イメージング剤、造影剤、酵素、蛍光標識、発色団、色素、1又は2以上の金属イオン、又はリガンド系標識を含む。それらの方法及びキットのいくつかの実施形態において、イメージング剤は、放射性同位体を含む。それらの方法及びキットのいくつかの実施形態において、放射性同位体は、インジウム又はテクネチウムである。それらの方法及びキットのいくつかの実施形態において、造影剤は、ヨウ素、ガドリニウム又は酸化鉄を含む。それらの方法及びキットのいくつかの実施形態において、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又は - ガラクトシダーゼを含む。それらの方法及びキットのいくつかの実施形態において、発光標識は、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)、修正赤色蛍光タンパク質 (mRFP)、赤色蛍光タンパク質tdimer2 (RFP tdimer2)、HCRD、又はユーロピウム誘導体を包含する。それらの方法及びキットのいくつかの実施形態において、発光標識は、N - メチルアクリジウム誘導体を含む。それらの方法及びキットのいくつかの実施形態において、標識は、Alexa Fluor (登録商標) 標識、例えばAlex Fluor (登録商標) 680又はAlexa Fluor (登録商標) 750を包含する。それらの方法及びキットのいくつかの実施形態において、リガンド系標識は、ビオチン、アビジン、ストレプトタビジン、又は1又は2以上のハプテンを包含する。

10

20

【0244】

それらの方法及びキットのいくつかの実施形態において、対象は哺乳類である。それらの方法のいくつかの実施形態において、対象はヒトである。それらの方法及びキットのいくつかの実施形態において、対象は非ヒト哺乳類、例えば非ヒト霊長類、愛玩動物 (例えば、ネコ、イヌ、ウマ)、家畜、作業動物又は動物園の動物である。いくつかの実施形態において、対象は齧歯動物である。

【0245】

それらの方法及びキットのいくつかの実施形態において、前記方法は、インビボ方法である。それらの方法のいくつかの実施形態において、前記方法は、現場方法である。それらの方法のいくつかの実施形態において、前記方法は、エクスピボ方法である。それらの方法のいくつかの実施形態において、前記方法は、インビトロ方法である。

30

【0246】

本開示はまた、(i) 対象又は生物学的サンプルを、切断可能部分 (CM) 及びCMの切断後に放出又は活性化される検出可能標識を含んでいるプローブと接触させ；そして、(ii) 対象又は生物学的サンプル中の検出可能標識のレベルを計測することによる、対象又はサンプル内の切断剤の有無を検出する方法を提供する。斯かる放出又は活性化が標識の検出を増強する (例えば、検出可能シグナルを刺激する) とき、対象又は生物学的サンプル中の検出可能標識の検出可能レベルは、切断剤が対象又は生物学的サンプル中に存在することを示し、そして、ここで、対象又は生物学的サンプル中の検出可能標識の検出可能レベルの低下は、対象又は生物学的サンプル中に切断剤が存在していない、及び/又は検出可能レベルにて対象又は生物学的サンプル中に存在しておらず、その結果、斯かるCMのプロテアーゼ切断が検出できないことを示す。斯かる放出又は活性化が標識の検出を削減する場合、対象又は生物学的サンプル中の検出可能標識の検出可能レベルは、検出可能レベルにて対象又は生物学的サンプル中に切断剤が存在していないか又は十分に存在していないことを示し、その結果、CMのプロテアーゼ切断が対象又は生物学的サンプル中で検出されることはできず、そしてここで、対象又は生物学的サンプル中の検出可能標識の削減された検出可能レベルは、切断剤が対象又は生物学的サンプル中に存在することを示す。

40

【0247】

50



それらの方法及びキットのいくつかの実施形態において、CM含有プローブは、検出可能標識を含む。それらの方法及びキットのいくつかの実施形態において、検出可能標識は、イメージング剤、造影剤、酵素、蛍光標識、発色団、色素、1又は2以上の金属イオン、又はリガンド系標識を含む。それらの方法及びキットのいくつかの実施形態において、イメージング剤は、放射性同位体を含む。それらの方法及びキットのいくつかの実施形態において、放射性同位体は、インジウム又はテクネチウムである。それらの方法及びキットのいくつかの実施形態において、造影剤は、ヨウ素、ガドリニウム又は酸化鉄を含む。それらの方法及びキットのいくつかの実施形態において、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又は - ガラクトシダーゼを含む。それらの方法及びキットのいくつかの実施形態において、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)、修正赤色蛍光タンパク質 (mRFP)、赤色蛍光タンパク質tdimer2 (RFP tdimer2)、HCRED、又はユーロピウム誘導体を包含する。それらの方法及びキットのいくつかの実施形態において、蛍光標識は、N - メチルアクリジウム誘導体を含む。それらの方法及びキットのいくつかの実施形態において、標識は、Alexa Fluor (登録商標) 標識、例えばAlex Fluor (登録商標) 680又はAlexa Fluor (登録商標) 750を包含する。それらの方法及びキットのいくつかの実施形態において、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、又は1又は2以上のハプテンを包含する。

#### 【0248】

それらの方法のいくつかの実施形態において、前記方法は、インビボ方法である。それらの方法のいくつかの実施形態において、前記方法は、現場方法である。それらの方法のいくつかの実施形態において、前記方法は、エクスピボ方法である。それらの方法のいくつかの実施形態において、前記方法は、インビトロ方法である。

#### 【0249】

それらの方法及びキットのいくつかの実施形態において、前記方法は、本開示の活性化可能抗体による治療と、それに続くその活性化可能抗体及び/又は複合活性化可能抗体をそれを必要としている対象に投与することによる治療のために適切な患者集団を同定するか、そうでなければ、細分するために使用される。例えば、標的、及びそれらの方法において試験される活性化可能抗体の切断可能部分 (CM) において基質を切断するマトリプターゼ及びuPAから選択される少なくとも1つのプロテアーゼの両者について検査陽性である患者は、斯かるCMを含む斯かる活性化可能抗体による治療のための適切な候補として同定され、その後、該患者には、治療上有効な量の試験される活性化可能抗体及び/又は複合活性化可能抗体が投与される。同様に、標的、及びそれらの方法を用いて試験される活性化可能抗体中のCMにおける基質を切断するプロテアーゼ、すなわち、マトリプターゼ及び/又はuPAのいずれか又は両者について検査陰性である患者は、別の治療のための適切な候補として同定されるであろう (すなわち、試験される活性化可能抗体による治療のために適切でない)。いくつかの実施形態において、斯かる患者は、治療のための適切な活性化可能抗体が同定されるまで、他の活性化可能抗体により検査され得る。いくつかの実施形態において、患者にはその後、該患者が検査で陽性であった活性化可能抗体及び/又は複合活性化可能抗体の治療上有効な量が投与される。

#### 【0250】

本開示はまた、本明細書中に提示したマトリプターゼ切断可能基質配列及び/又は本明細書中に提示したuPA切断可能基質配列の1若しくは複数を含んでいるポリペプチド及び他の大型分子を提供する。制限されることのない例によると、本明細書中に提示したマトリプターゼ切断可能基質配列及び/又は本明細書中に提示したuPA切断可能基質配列は、プロドラッグ組成物及びその使用方法に有効である。いくつかの実施形態において、ポリペプチドは小分子などの薬剤に連結されたCMを含む。薬剤の例は当該技術分野で周知である。これらの本明細書中に提示したマトリプターゼ切断可能基質配列及び/又は本明細書中に提示したuPA切断可能基質配列は、プローブ及び他の検出可能な剤、並びにその使用方法に有効である。例えば、本明細書中に提示したマトリプターゼ切断可能基質

配列及び／又は本明細書中に提示したu P A切断可能基質配列は、イメージング剤及び／又は他の診断薬などの検出可能な剤を生じさせるために蛍石や他のクエンチャーと結合状態で使用される。当業者は、本明細書中に提示したマトリプターゼ切断可能基質配列及び／又は本明細書中に提示したu P A切断可能基質配列がマトリプターゼ及び／又はu P Aによって切断可能基質を使用する技術分野における任意の組成物及び／又は方法に有効であることを理解する。

#### 【0251】

いくつかの実施形態において、本開示のマトリプターゼ及び／又はu P A基質は、大型分子、例えば、(i) C Mに対してアミノ(N)末端側に位置する、すなわち、大型分子内にて、C Mよりも大型分子のN末端の近くに位置している、少なくとも1つの部分(M<sub>N</sub>) ; (i i) C Mに対してカルボキシル(C)末端側に位置する、すなわち、大型分子内にて、C Mよりも大型分子のC末端の近くに位置している少なくとも1つの部分(M<sub>C</sub>) ; (i i i) その組み合わせ、から成る群から選択される少なくとも1つの追加部分(M)を含む単離されたポリペプチドに使用される。いくつかの実施形態において、大型分子は、少なくとも1つのM<sub>N</sub>及び少なくとも1つのM<sub>C</sub>を含んでいる。

#### 【0252】

制限されることのない例によると、本開示の大型分子における使用のための好適なM<sub>N</sub>は、次の：マスキング部分、抗体、タンパク質、治療薬、抗悪性腫瘍薬、毒性剤、薬剤、検出可能部分、診断剤、親和性タグ、及びその組み合わせ、のうちの少なくとも1つを含む。

#### 【0253】

制限されることのない例によると、本開示の大型分子における使用のための好適なM<sub>C</sub>は、次の：マスキング部分、抗体、タンパク質、治療薬、抗悪性腫瘍薬、毒性剤、薬剤、検出可能部分、診断剤、親和性タグ、及びその組み合わせ、のうちの少なくとも1つを含む。

#### 【0254】

本開示による医薬組成物は本開示の抗体及び担体を含むことができる。これらの医薬組成物は、例えば、診断キットなどのキットに含まれる。

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0255】

【図1】図1は、マトリプターゼ 1によるプールS M P 30の切断を示す一連のグラフである。

【図2】図2は、マトリプターゼ 1によるプールS M P 17の切断及びt P Aによる切断に対する抵抗性を示す一連のグラフである。

【図3】図3は、マトリプターゼ 1による基質配列V A G R S M R P (配列番号251)の切断を示す一連のグラフである。

【図4A】図4Aは、本明細書中に提供した実施例において使用されるペプチドディスプレイプラットフォームの一連の略図である。図4Aは「ディスプレイプラットフォームC Y T X D P X X X X X X X X」又は「C Y T X D P X X X X X X X X」(配列番号694)と本明細書中で呼ばれるディスプレイプラットフォーム配列の略図である。図4Bは「ディスプレイプラットフォームS P C Y T X D P X X X X X X X X」又は「S P C Y T X D P X X X X X X X X」(配列番号695)と本明細書中で呼ばれるディスプレイプラットフォーム配列の略図であり、ここで、S P C Y T X D P X X X X X X X Xは、シグナルペプチドを伴うC Y T X D P X X X X X X X Xプラットフォームである。

【図4B】図4Bは、本明細書中に提供した実施例において使用されるペプチドディスプレイプラットフォームの一連の略図である。図4Bは「ディスプレイプラットフォームS P C Y T X D P X X X X X X X X」又は「S P C Y T X D P X X X X X X X X」(配列番号695)と本明細書中で呼ばれるディスプレイプラットフォーム配列の略図であり、ここで、S P C Y T X D P X X X X X X X Xは、シグナルペプチドを伴うC Y

10

20

30

40

50

T X D P X X X X X X X プラットフォームである。

【発明を実施するための形態】

【0256】

発明の詳細な説明

本開示は、マトリプターゼ及びu プラスミノーゲン活性化因子(u P A)から選択される少なくとも1つのプロテアーゼのための基質である切断可能部分(C M)を含んでいるアミノ酸配列を提供する。これらのC Mは、さまざまな治療的、診断的、及び予防的適応において有用である。

【0257】

本開示は、これらのマトリプターゼ切断可能基質及び/又はu P A切断可能基質の1若しくは複数を含んでいる抗体を提供する。例えば、これらのマトリプターゼ切断可能基質、及び/又はu P A切断可能基質は、抗体を1若しくは複数の追加の剤に結合して複合抗体を製造するときには有用である。これらのマトリプターゼ切断可能基質及び/又はu P A切断可能基質は、活性化可能抗体構築物において有用である。

【0258】

複合抗体は、標的に特異的に結合する抗体又はその抗原結合フラグメントを含んでおり、活性化可能抗体は、標的に特異的に結合する抗体又はその抗原結合フラグメント(A B)を含んでいる。抗体又はその抗原結合フラグメントの標的の代表的なクラスとしては、これだけに限定されるものではないが、細胞表面受容体及び分泌される結合タンパク質(例えば、成長因子)、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。いくつかの実施形態において、複合抗体及び/又は活性化可能抗体は、細胞外標的、通常、細胞外タンパク質標的に結合する抗体又はその抗原結合フラグメントを有する。いくつかの実施形態において、複合抗体及び/又は活性化可能抗体は、細胞取り込み向けに設計され、そして、細胞内部で切り替え可能である。

【0259】

制限されることのない例として、抗体又は抗原結合フラグメント及び/又は活性化可能抗体のA Bは、表1で列挙した任意の標的の結合パートナーである。

【0260】

10

20

【表 4 6】

表 1 : 代表的な標的

1-92-LFA-3	CD52	DL44	HVEM	LIF-R	STEAP1
アルファ-4 イ ンテグリン	CD56	DLK1	ヒアルロニ ダーゼ	ルイス X	STEAP2
アルファ-V イ ンテグリン	CD64	DLL4	ICOS	LIGHT	TAG-72
アルファ4ベー タ1 インテグ リン	CD70	DPP-4	IFNアルファ	LRP4	TAPA1
アルファ4ベー タ7 インテグ リン	CD71	DSG1	IFNベータ	LRRC26	TGFベータ
AGR2	CD74	EGFR	IFNガンマ	MCSP	TIGIT
抗ルイス-Y		EGFRviii	IgE	メソテリン	TIM-3
アペリン J 受 容体	CD80	エンドセリン B 受容体 (ETBR)	IgE 受容体 (FcεRI)	MRP4	TLR2
APRIL	CD81	ENPP3	IGF	MUC1	TLR4
B7-H4	CD86	EpCAM	IGF1R	Mucin-16 (MUC16, CA-125)	TLR6
BAFF	CD95	EPHA2	IL1B	Na/K ATPase	TLR7
BTLA	CD117	EPHB2	IL1R	好中球エラスター ゼ	TLR8
C5 補体	CD125	ERBB3	IL2	NGF	TLR9
C-242	CD132 (IL-2RG)	RSVのFタンパク 質	IL11	Nicastrin	TMEM31
CA9	CD133	FAP	IL12	Notch 受容体	TNFアルファ
CA19-9 (ルイス a)	CD137	FGF-2	IL12p40	Notch 1	TNFR
炭酸脱水酵素 9	CD138	FGF8	IL-12R, IL-12Rベータ1	Notch 2	TNFRS12A
CD2	CD166	FGFR1	IL13	Notch 3	TRAIL-R1
CD3	CD172A	FGFR2	IL13R	Notch 4	TRAIL-R2

【 0 2 6 1 】

【表 47】

CD6	CD248	FGFR3	IL15	NOV	トランスフェリン
CD9	CDH6	FGFR4	IL17	OSM-R	トランスフェリン受容体
CD11a	CEACAM5 (CEA)	葉酸受容体	IL18	OX-40	TRK-A
CD19	CEACAM6 (NCAM-90)	GAL3ST1	IL21	PAR2	TRK-B
CD20	CLAUDIN-3	G-CSF	IL23	PDGF-AA	uPAR
CD22	CLAUDIN-4	G-CSFR	IL23R	PDGF-BB	VAP1
CD24	cMet	GD2	IL27/IL27R (wsx1)	PDGFRアルファ	VCAM-1
CD25	コラーゲン	GITR	IL29	PDGFRベータ	VEGF
CD27	Cripto	GLUT1	IL-31R	PD-1	VEGF-A
CD28	CSFR	GLUT4	IL31/IL31R	PD-L1	VEGF-B
CD30	CSFR-i	GM-CSF	IL2R	PD-L2	VEGF-C
CD33	CTLA-4	GM-CSFR	IL4	ホスファチジルセリン	VEGF-D
CD38	CTGF	GP IIb/IIIa 受容体	IL4R	PIGF	VEGFR1
CD40	CXCL10	Gp130	IL6, IL6R	PSCA	VEGFR2
CD40L	CXCL13	GPIIB/IIIA	インスリン受容体	PSMA	VEGFR3
CD41	CXCR1	GPVMB	Jagged リガンド	RAAG12	VISTA
CD44	CXCR2	GRP78	Jagged 1	RAGE	WISP-1
CD44v6		HER2/neu	Jagged 2	SLC44A4	WISP-2
CD47	CXCR4	HGF	LAG-3	スフィンゴシン 1 リン酸	WISP-3
CD51	CYR61	hGH			

10

20

30

## 【0262】

制限されることのない例として、抗体又は抗原結合フラグメント及び／又は活性化可能抗体のA Bは、表2で列挙した抗体であるか、又はそれに由来する。

## 【0263】

【表 4 8】

表 2 : A B の代表的な供給源

抗体商品名 (抗体名)	標的
Avastin™ (ベバシズマブ)	VEGF
Lucentis™ (ラニビズマブ)	VEGF
Erbitux™ (セツキシマブ)	EGFR
Vectibix™ (パニツムマブ)	EGFR
Remicade™ (インフリキシマブ)	TNF $\alpha$
Humira™ (アダリムマブ)	TNF $\alpha$
Tysabri™ (ナタリズマブ)	インテグリン $\alpha 4$
Simulect™ (バシリキシマブ)	IL2R
Soliris™ (エクリズマブ)	補体C5
Raptiva™ (エファリズマブ)	CD11a
Bexxar™ (トシツモマブ)	CD20
Zevalin™ (イブリツモマブ・チウキセタン)	CD20
Rituxan™ (リツキシマブ)	CD20
オクレリズマブ	CD20
Arzerra™ (オフアツムマブ)	CD20
オビヌツズマブ	CD20
Zenapax™ (ダクリズマブ)	CD25
Adcetris™ (ブレンツキシマブ・ベドチン)	CD30
Myelotarg™ (ゲムツズマブ)	CD33
Mylotarg™ (ゲムツズマブ・オゾガマイシン)	CD33
Campath™ (アレムツズマブ)	CD52
ReoPro™ (アブシキシマブ(abiciximab))	糖タンパク質受容体 IIb/IIIa
Xolair™ (オマリズマブ)	IgE
Herceptin™ (トラスツズマブ)	Her2
Kadcyla™ (トラスツズマブ・エムタンシン)	Her2
Synagis™ (パリビズマブ)	RSVのFタンパク質
(イピリムバブ)	CTLA-4
(トレメリムマブ)	CTLA-4
Hu5c8	CD40L
(ペルツズマブ)	Her2-neu
(エルツマキシマブ)	CD3/Her2-neu
Orencia™ (アバタセプト)	CTLA-4
(タネズマブ)	NGF
(バビツキシマブ)	ホスファチジルセリン
(ザルツムマブ)	EGFR
(マパツムマブ)	EGFR
(マツズマブ)	EGFR

【表 4 9】

(ニモツズマブ)	EGFR
IGR62	EGFR
mAb 528	EGFR
CH806	EGFR
MDX-447	EGFR/CD64
(エドレコロマブ)	EpCAM
RAV12	RAAG12
huJ591	PSMA
Enbrel™ (エタネルセプト)	TNF-R
Amevive™ (アレファセプト)	1-92-LFA-3
Antril™, Kineret™ (アナキンラ (ankinra))	IL-1Ra
GC1008	TGFベータ
	Notch、例えば、Notch 1
	Jagged 1又はJagged 2
(アデカツムマブ)	EpCAM
(フィギツムマブ)	IGF1R
(トシリズマブ)	IL-6 受容体
Stelara™ (ウステキヌマブ)	IL-12/IL-23
Prolia™ (デノスマブ)	RANKL

10

20

## 【 0 2 6 5 】

本開示の代表的な複合抗体及び／又は活性化可能抗体は、例えば、インターロイキン 6 受容体 (IL 6 R) に結合する、並びにインターロイキン 6 受容体 (IL 6 R) と結合する本明細書中で「A v 1」抗体と呼ばれる抗体であるか若しくはそれに由来する重鎖及び軽鎖を含んでいる抗体を含む。A v 1 重鎖及び A v 1 軽鎖のアミノ酸配列はそれぞれ配列番号 5 4 及び配列番号 5 5 において以下に示されている。

A v 1 抗体重鎖アミノ酸配列：

QVQLQESGPGLVPRPSQTLSTCTVSGYSITSDHAWSWVRQPPGRGLEWIGYISYSGITTYNPSLKSRTVSRDNSKNTLY  
LQMNSLR AEDTAVYYCARSLARTTAMDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW  
NSGALTSKVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPPELLGGP  
SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE  
YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVL  
DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (配列番号 4 4 7)

30

A v 1 抗体軽鎖アミノ酸配列：

DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQDISSYLNWYQQKPKGKAPKLLIYYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDFFTISSLQP  
EDIATYYCQGGNTLPYTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ  
ESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC (配列番号 4 4 8)

40

## 【 0 2 6 6 】

本開示の代表的な複合抗体及び／又は活性化可能抗体は、例えば、インターロイキン 6 受容体 (IL 6 R) に結合する、並びに A v 1 抗体及びマスキング部分であるか若しくはそれに由来する重鎖及び軽鎖を含んでいる抗体を含む。本開示の代表的な複合抗体及び／又は活性化可能抗体は、A v 1 軽鎖の N 末端に結合されたアミノ酸配列を含んでいる。これらの N 末端アミノ酸配列としては、例えば YGSCSWNYVHIFMDC (配列番号 4 4 9) ; QGDFDIPPAHWVPIT (配列番号 4 5 0) ; MGVPAGCVWNYAHIFMDC (配列番号 4 5 1) ; QGQSGQYGS CSWNYVHIFMDC (配列番号 4 5 2) ; QGQSGQGDFDIPPAHWVPIT (配列番号 4 5 3) ; 又は QGQSGQMGVPAGCVWNYAHIFMDC (配列番号 4 5 4) が挙げられる。斯かるアミノ酸配列が A v 1 重鎖の N 末端、又は A v 1 重鎖若しくは軽鎖の C 末端に取り付けられることもまた理解さ

50

れるべきである。

【 0 2 6 7 】

本開示の代表的な活性化可能抗体は、例えば、上皮成長因子受容体（ E G F R ）に結合する、並びにそのそれぞれが E G F R に結合する本明細書中で「 c 2 2 5 v 5 」と呼ばれる抗体、本明細書中で「 c 2 2 5 v 4 」と呼ばれる抗体及び本明細書中で「 c 2 2 5 v 6 」と呼ばれる抗体から成る群から選択される抗体であるか若しくはそれに由来する重鎖及び軽鎖を含んでいる抗体を含む。 c 2 2 5 v 5 抗体、 c 2 2 5 v 4 抗体、及び c 2 2 5 v 6 抗体は、本明細書中で「 c 2 2 5 軽鎖」と呼ばれる同じ軽鎖配列を共有する。 c 2 2 5 v 5 重鎖、 c 2 2 5 v 4 抗体、 c 2 2 5 v 6 抗体、及び c 2 2 5 軽鎖のアミノ酸配列は以下に示されている。

C 2 2 5 v 5 抗体重鎖アミノ酸配列：

QVQLKQSGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWLGVIWSGGNTDYNTPFTSRLSINKDNSKSQVFF  
KMNSLQSQDIAIYYCARALTYDYEFAYWGQGLTVTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW  
NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGPP  
SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE  
YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVL  
DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK\*（配列番号 4 5 5）

C 2 2 5 v 4 抗体重鎖アミノ酸配列：

QVQLKQSGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWLGVIWSGGNTDYNTPFTSRLSINKDNSKSQVFF  
KMNSLQSQDIAIYYCARALTYDYEFAYWGQGLTVTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW  
NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGPP  
SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE  
YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVL  
DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK\*（配列番号 4 5 6）

C 2 2 5 v 6 抗体重鎖アミノ酸配列：

QVQLKQSGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWLGVIWSGGNTDYNTPFTSRLSINKDNSKSQVFF  
KMNSLQSQDIAIYYCARALTYDYEFAYWGQGLTVTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW  
NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGPP  
SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE  
YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVL  
DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK\*（配列番号 4 5 7）

C 2 2 5 抗体軽鎖アミノ酸配列：

QILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVES  
EDIADYYCQNNNNWPTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ  
ESVTEQDSKDSSTLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC\*（配列番号 4 5 8）

【 0 2 6 8 】

本開示の代表的な活性化可能抗体は、例えば、E G F R に結合し、 c 2 2 5 v 5 抗体であるか若しくはそれに由来する重鎖及び軽鎖を含み、そして、マスキング部分、第 1 連結ペプチド、切断可能部分、及び第 2 の連結ペプチドを含んでいる抗体を含む。いくつかの実施形態において、重鎖及び / 又は軽鎖はシグナルペプチドを含んでいる。シグナルペプチドのない c 2 2 5 v 5 の重鎖及び軽鎖アミノ酸配列は、配列番号 4 5 5（シグナルペプチドのない重鎖）及び配列番号 4 5 8（シグナルペプチドのない軽鎖）において先に示している。いくつかの実施形態において、活性化可能な抗 E G F R 抗体は、配列番号 4 5 5、配列番号 4 5 8 に示したアミノ酸配列、及び / 又は以下に示した核酸及びアミノ酸配列の組み合わせを含む：

シグナルペプチドを有する C 2 2 5 v 5 抗体重鎖核酸配列：

ATGTACAGGATGCAACTCCTGTCTTGCATTGCACTAAGTCTTGCACCTTGTCACGAATTCGCAGGTGCAGCTGAAACAGAG  
CGGCCCGGGCTGGTGCAGCCGAGCCAGAGCCTGAGCATTACCTGCACCGTGAGCGGCTTTAGCCTGACCAACTATGGCG  
TGCAATGGGTGCGCCAGAGCCCGGCAAGGCCTGGAATGGCTGGGCGTGATTTGGAGCGGCGCAACACCGATTATAAC  
ACCCCGTTTACCAGCCGCTGAGCATTAAACAAAGATAACAGCAAAAGCCAGGTGTTTTTTAAATGAACAGCCTGCAAG



CCAGGATACCGGATTTATTATTGCGCGCGCGCTGACCTATTATGATTATGAATTTGCGTATTGGGGCCAGGGCACCC  
 TGGTGACCGTGAGCGCGGCTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGG  
 ACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAAGTCAAGCGCCCTGACCAG  
 CGGCGTGACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCA  
 GCTTGGGACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAA  
 TCTTGTGACAAAACCTACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCC  
 AAAACCCAAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGACGTGAGCCACGAAGACCCTG  
 AGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGC  
 ACGTACCGTGTGGTCAAGCGTCTCACCGTCTGCACCGAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAA  
 CAAAGCCCTCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACACAGGTGTACACCCTGC  
 CCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGACCTGACCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCC  
 GTGGAGTGGGAGAGCAATGGGACCCGAGAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTT  
 CCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTC  
 TGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA (配列番号 6 8 4)

下線部：シグナルペプチド

シグナルペプチドを有する C 2 2 5 v 5 抗体重鎖 アミノ酸配列：

MYRMQLLSCIALSLALVTNSQVQLKQSGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWLGVISGGNTDYN  
 TPFTSRLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSQDTAIIYYCARALTYDYEFAYWQGTLTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG  
 TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPK  
 SCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS  
 TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTSKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA  
 VEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK\* (配列番  
 号 6 8 5)

下線部：シグナルペプチド

シグナルペプチドを有する 3 9 5 4 2 7 8 7 c 2 2 5 軽鎖核酸配列：

ATGTACAGGATGCAACTCCTGTCTTGCAATTGCACTAAGTCTTGCACTTGTCACGAATTCGCAAGGCCAGTCTGGCCAGTG  
 CATCTCACCTCGTGGTTGTCCGGACGGCCCATACGTCATGTACGGCTCGAGCGGTGGCAGCGGTGGCTCTGGTGGATCCG  
 GTACCTCCACCTCCGGCCGTTCCGCGAACCCGCGTGGTGGCAGTAGCGGTACCCAGATCTTGCTGACCCAGAGCCCGGTG  
 ATTCTGAGCGTGAGCCCGGGCGAACGTGTGAGCTTTAGTGCCGCGCGAGCCAGAGCATTGGCACCAACATTCATTGGTA  
 TCAGCAGCGCACCAACGGCAGCCCGCGCCTGCTGATTAAATATGCGAGCGAAAGCATTAGCGGCATTCCGAGCCGCTTTA  
 GCGGCAGCGGCAGCGGCACCGATTTTACCCTGAGCATTAAACAGCGTGGAAGCGAAGATATTGCGGATTATTATTGCCAG  
 CAGAACAACTGGCCGACCACCTTTGGCGCGGGCACCAACTGGAAGTGAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTT  
 CATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCAGAG  
 AGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAG  
 GACAGCACCTACAGCCTCAGCAGACCCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGT  
 CACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAG (配列番号 6 8 6)

下線部：シグナルペプチド

シグナルペプチドを有する 3 9 5 4 2 7 8 7 c 2 2 5 軽鎖 アミノ酸配列：

MYRMQLLSCIALSLALVTNSQGSQGCISPRGCPDGPYVMYSSGSGSGSGSGTSTSGRSANPRGGSSGTQILLTQSPV  
 ILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQ  
 QNNNWPTTFGAGTKLELKRTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK  
 DSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC\* (配列番号 6 8 7)

下線部：シグナルペプチド

3 9 5 4 2 7 8 7 c 2 2 5 軽鎖核酸配列 (シグナルペプチドなし)：

CAAGGCCAGTCTGGCCAGTGCACTCACCTCGTGGTTGTCCGGACGGCCCATACGTCATGTACGGCTCGAGCGGTGGCAG  
 CGGTGGCTCTGGTGGATCCGGTACCTCCACCTCCGGCCGTTCCGCGAACCCGCGTGGTGGCAGTAGCGGTACCCAGATCT  
 TGCTGACCCAGAGCCCGGTGATTCTGAGCGTGAGCCCGGGCGAACGTGTGAGCTTTAGTGCCGCGCGAGCCAGAGCATT  
 GGCACCAACATTCATTGGTATCAGCAGCGCACCAACGGCAGCCCGCGCCTGCTGATTAAATATGCGAGCGAAAGCATTAG  
 CGGCATTCCGAGCCGCTTTAGCGGACGCGCAGCGGCACCGATTTTACCCTGAGCATTAAACAGCGTGGAAGCGAAGATA  
 TTGCGGATTATTATTGCCAGCAGAACAACTGGCCGACCACCTTTGGCGCGGGCACCAACTGGAAGTGAACGTACG

GTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCT  
GAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAAGTCCCAGGAGAGTG  
TCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACAC  
AAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAG  
(配列番号 6 8 8)

3 9 5 4 2 7 8 7 c 2 2 5 軽鎖アミノ酸配列 (シグナルペプチドなし) :

QGQSGQCISPRGCPDGPYVMYSSSGSGSGSGSGTSTSGRSANPRGGSGTQILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQS  
GTNIHWYQRTNGSPRLLIKYASEISGIPSRFSGSGSGTDFTLINSVESEDIADYYCQQNNNNWPTTFGAGTKLELKRT  
VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNFPYFREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEK  
KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC\* (配列番号 6 8 9)

10

【 0 2 6 9 】

本開示の代表的な複合抗体及び / 又は活性化可能抗体は、例えば、J a g g e d 標的、  
J a g g e d 1、J a g g e d 2、及び / 又は J a g g e d 1 及び J a g g e d  
2 の両方に結合する抗体、並びに以下に示した可変重鎖及び可変軽鎖配列であるか若しく  
はそれに由来する可変重鎖領域及び可変軽鎖領域の組み合わせを含んでいる抗体を含む。

可変軽鎖アミノ配列 L c 4

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQ  
EDFATYYCQQSVVAPLTFGQGTKVEIKR (配列番号 4 5 9)

可変重鎖アミノ配列 H c 4

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSIEQMGWQTYADSVKGRFTISRDN  
SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDIGGRSAFDYWGQGLTVTVSS (配列番号 4 6 0)

20

可変軽鎖アミノ配列 L c 5

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQ  
EDFATYYCQQSVVAPLTFGQGTKVEIKR (配列番号 4 6 1)

可変重鎖アミノ配列 H c 5

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSIEQMGWQTYADSVKGRFTISRDN  
SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSPPYHGQFDYWGQGLTVTVSS (配列番号 4 6 2)

可変軽鎖アミノ配列 L c 7

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQ  
EDFATYYCQQSVVAPLTFGQGTKVEIKR (配列番号 4 6 3)

30

可変重鎖アミノ配列 H c 7

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSIEQMGWQTYADSVKGRFTISRDN  
SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSPFFGQFDYWGQGLTVTVSS (配列番号 4 6 4)

可変軽鎖アミノ配列 L c 8

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQ  
EDFATYYCQQSVVAPLTFGQGTKVEIKR (配列番号 4 6 5)

可変重鎖アミノ配列 H c 8

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSIEQMGWQTYADSVKGRFTISRDN  
SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKHIGRTNPFQDYWGQGLTVTVSS (配列番号 4 6 6)

可変軽鎖アミノ配列 L c 1 3

40

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQ  
EDFATYYCQQSVVAPLTFGQGTKVEIKR (配列番号 4 6 7)

可変重鎖アミノ配列 H c 1 3

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSIEQMGWQTEYADSVKGRFTISRDN  
SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSAAAFDYWGQGLTVTVSS (配列番号 4 6 8)

可変軽鎖アミノ配列 L c 1 6

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQ  
EDFATYYCQQSVVAPLTFGQGTKVEIKR (配列番号 4 6 9)

可変重鎖アミノ配列 H c 1 6

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSIEQMGWQTYADSVKGRFTISRDN  
SKNTLY

50

LQMNSLRAEDTAVYYCAKSPPYGQFDYWGGTLTVSS (配列番号 4 7 0)

可変軽鎖アミノ配列 L c 1 9

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSVVAPLTFGGGTKVEIKR (配列番号 4 7 1)

可変重鎖アミノ配列 H c 1 9

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSIEMGWQTYADSVKGRFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAVYYCAKSPFFGQFDYWGGTLTVSS (配列番号 4 7 2)

可変軽鎖アミノ配列 L c 2 1

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSVVAPLTFGGGTKVEIKR (配列番号 4 7 3)

可変重鎖アミノ配列 H c 2 1

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSIEMGWQTYADSVKGRFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAVYYCAKDIGGRSAFDYWGGTLTVSS (配列番号 4 7 4)

可変軽鎖アミノ配列 L c 2 4

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSVVAPLTFGGGTKVEIKR (配列番号 4 7 5)

可変重鎖アミノ配列 H c 2 4

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSIEMGWQTYADSVKGRFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAVYYCAKSAAFDYWGQTLTVSS (配列番号 4 7 6)

可変軽鎖アミノ配列 L c 2 6

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSVVAPLTFGGGTKVEIKR (配列番号 4 7 7)

可変重鎖アミノ配列 H c 2 6

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSIEMGWQTYADSVKGRFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAVYYCAKDIGGRSAFDYWGGTLTVSS (配列番号 4 7 8)

可変軽鎖アミノ配列 L c 2 7

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSVVAPLTFGGGTKVEIKR (配列番号 4 7 9)

可変重鎖アミノ配列 H c 2 7

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSIEMGWQTYADSVKGRFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAVYYCAKSPFYGQFDYWGGTLTVSS (配列番号 4 8 0)

可変軽鎖アミノ配列 L c 2 8

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSVVAPLTFGGGTKVEIKR (配列番号 4 8 1)

可変重鎖アミノ配列 H c 2 8

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSIEMGWQTYADSVKGRFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAVYYCAKSPFFGQFDYWGGTLTVSS (配列番号 4 8 2)

可変軽鎖アミノ配列 L c 3 0

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSVVAPLTFGGGTKVEIKR (配列番号 4 8 3)

可変重鎖アミノ配列 H c 3 0

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSIEMGWQTYADSVKGRFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAVYYAKSAAFDYWGQTLTVSS (配列番号 4 8 4)

可変軽鎖アミノ配列 L c 3 1

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSVVAPLTFGGGTKVEIKR (配列番号 4 8 5)

可変重鎖アミノ配列 H c 3 1

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSIEMGWQTYADSVKGRFTISRDN SKNTLY LQMNSLRAEDTAVYYCAKDIGGRSAFDYWGGTLTVSS (配列番号 4 8 6)

可変軽鎖アミノ配列 L c 3 2

10

20

30

40

50

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPE  
EDFATYYCQQSVVAPLTFGQGTKVEIKR (配列番号 4 8 7)

可変重鎖アミノ配列 H c 3 2

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSIDPEGWQTYADSVKGRFTISRDNKNTLY  
LQMNSLRAEDTAVYYCAKSAAFDYWGQGLTVTVSS (配列番号 4 8 8)

可変軽鎖アミノ配列 L c 3 7

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPE  
EDFATYYCQQSVVAPLTFGQGTKVEIKR (配列番号 4 8 9)

可変重鎖アミノ配列 H c 3 7

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSIEQMGWQTYADSVKGRFTISRDNKNTLY  
LQMNSLRAEDTAVYYCAKSPPHNGQFDYWGQGLTVTVSS (配列番号 4 9 0)

可変軽鎖アミノ配列 L c 3 9

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPE  
EDFATYYCQQSVVAPLTFGQGTKVEIKR (配列番号 4 9 1)

可変重鎖アミノ配列 H c 3 9

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSIEQMGWQTEYADSVKGRFTISRDNKNTLY  
LQMNSLRAEDTAVYYCAKSAAFDYWGQGLTVTVSS (配列番号 4 9 2)

可変軽鎖アミノ配列 L c 4 0

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPE  
EDFATYYCQQSVVAPLTFGQGTKVEIKR (配列番号 4 9 3)

重鎖アミノ配列 H c 4 0

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSIEQMGWQTYADSVKGRFTISRDNKNTLY  
LQMNSLRAEDTAVYYCAKSPFFGQFDYWGQGLTVTVSS (配列番号 4 9 4)

可変軽鎖アミノ配列 L c 4 7

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPE  
EDFATYYCQQSVVAPLTFGQGTKVEIKR (配列番号 4 9 5)

可変重鎖アミノ配列 H c 4 7

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSIDEMGWQTEYADSVKGRFTISRDNKNTLY  
LQMNSLRAEDTAVYYCAKSAAFDYWGQGLTVTVSS (配列番号 4 9 6)

可変 4 B 2 軽鎖

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPE  
EDFATYYCQQTLDAAPPQFGQGTKVEIKR (配列番号 4 9 7)

可変 4 B 2 重鎖

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSIEQMGWQTYADSVKGRFTISRDNKNTLY  
LQMNSLRAEDTAVYYCAKDIGGRSAFDYWGQGLTVTVSS (配列番号 4 9 8)

可変 4 D 1 1 軽鎖

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPE  
EDFATYYCQQTVVAPPLFGQGTKVEIKR (配列番号 4 9 9)

可変 4 D 1 1 重鎖

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSIDPEGRQTYADSVKGRFTISRDNKNTLY  
LQMNSLRAEDTAVYYCAKDIGGRSAFDYWGQGLTVTVSS (配列番号 5 0 0)

可変 4 E 7 軽鎖

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPE  
EDFATYYCQQSLVAPLTFGQGTKVEIKR (配列番号 5 0 1)

可変 4 E 7 重鎖

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSIEEMGWQTKYADSVKGRFTISRDNKNTLY  
LQMNSLRAEDTAVYYCAKSAAFDYWGQGLTVTVSS (配列番号 5 0 2)

可変 4 E 1 1 軽鎖

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPE  
EDFATYYCQQALDAPLMFGQGTKVEIKR (配列番号 5 0 3)

10

20

30

40

50

## 可変 4 E 1 1 重鎖

EVQLLES GGG L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F S S Y A M S W R Q A P G K G L E W V S S I E P M G Q L T E Y A D S V K G R F T I S R D N S K N T L Y  
L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A K D I G G R S A F D Y W G Q G T L V T V S S ( 配列番号 5 0 4 )

## 可変 6 B 7 軽鎖

D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q S I S S Y L N W Y Q Q K P G K A P K L L I Y A A S S L Q S G V P S R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q P  
E D F A T Y Y C Q Q A L V A P L T F G Q G T K V E I K R ( 配列番号 5 0 5 )

## 可変 6 B 7 重鎖

EVQLLES GGG L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F S S Y A M S W R Q A P G K G L E W V S S I D E M G W Q T Y Y A D S V K G R F T I S R D N S K N T L Y  
L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A K S A A A F D Y W G Q G T L V T V S S ( 配列番号 5 0 6 )

## 可変 6 F 8 軽鎖

D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q S I S S Y L N W Y Q Q K P G K A P K L L I Y A A S S L Q S G V P S R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q P  
E D F A T Y Y C Q Q A L V A P L T F G Q G T K V E I K R ( 配列番号 5 0 7 )

## 可変 6 F 8 重鎖

EVQLLES GGG L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F S S Y A M S W R Q A P G K G L E W V S S I D E M G W Q T Y Y A D S V K G R F T I S R D N S K N T L Y  
L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A K S A A A F D Y W G Q G T L V T V S S ( 配列番号 5 0 8 )

## 【 0 2 7 0 】

本開示の代表的な複合抗体及び / 又は活性化可能抗体は、例えば、J a g g e d 標的、  
J a g g e d 1、J a g g e d 2、及び / 又は J a g g e d 1 及び J a g g e d  
2 の両方に結合する抗体、並びに以下に示した重鎖及び軽鎖配列であるか若しくはそれら  
に由来する重鎖領域と軽鎖領域の組み合わせを含んでいる抗体を含む。

## 4 D 1 1 軽鎖配列 :

D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q S I S S Y L N W Y Q Q K P G K A P K L L I Y A A S S L Q S G V P S R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q P  
E D F A T Y Y C Q Q T V V A P P L F G Q G T K V E I K R T V A A P S V F I F P P S D E Q L K S G T A S V V C L L N F Y P R E A K V Q W K V D N A L Q S G N S Q  
E S V T E Q D S K D S T Y S L S S T L T L S K A D Y E K H K V Y A C E V T H Q G L S S P V T K S F N R G E C ( 配列番号 5 0 9 )

## 4 D 1 1 重鎖配列 :

E V Q L L E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F S S Y A M S W R Q A P G K G L E W V S S I D P E G R Q T Y Y A D S V K G R F T I S R D N S K N T L Y  
L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A K D I G G R S A F D Y W G Q G T L V T V S S A S T K G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S W  
N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T P S S S L G T Q T Y I C N V N H K P S N T K V D K K V E P K S C D K T H T C P P C P A P E L L G G P  
S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S H E D P E V K F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K E  
Y K C K V S N K A L P A P I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R E E M T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L  
D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G K ( 配列番号 5 1 0 )

## 4 D 1 1 v 2 重鎖配列

E V H L L E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F S S Y A M S W R Q A P G K G L E W V S S I D P E G R Q T Y Y A D S V K G R F T I S R D N S K N T L Y  
L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A K D I G G R S A F D Y W G Q G T L V T V S S A S T K G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S W  
N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T P S S S L G T Q T Y I C N V N H K P S N T K V D K K V E P K S C D K T H T C P P C P A P E L L G G P  
S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S H E D P E V K F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K E  
Y K C K V S N K A L P A P I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R E E M T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L  
D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G K ( 配列番号 5 1 1 )

## 4 D 1 1 v 2 軽鎖配列

D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q S I S S Y L N W Y Q Q K P G K A P K L L I Y A A S S L Q S G V P S R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q P  
E D F A T Y Y C Q Q T V V A P P L F G Q G T K V E I K R T V A A P S V F I F P P S D E Q L K S G T A S V V C L L N F Y P R E A K V Q W K V D N A L Q S G N S Q  
E S V T E Q D S K D S T Y S L S S T L T L X K A D Y E K H K V Y A C E V T H Q G L S S P V T K S F N R G E C ( 配列番号 5 1 2 )

## 【 0 2 7 1 】

本明細書中に提供した活性化可能抗体は、標的、例えばヒト標的に特異的に結合する、  
抗体又はその抗体フラグメント（本開示を通じて A B としてまとめて言及される）を少な  
くとも含み、ここで、A B はマスキング部分（M M）によって修飾される。

## 【 0 2 7 2 】

いくつかの実施形態において、マスキング部分は、特異的抗体又は抗体フラグメントと  
共に使用するために選択される。例えば、E G F R に結合する抗体と共に使用するのに好  
適なマスキング部分としては、配列 C I S P R G（配列番号 5 1 3）を含む M M が挙げられる。

制限されることのない例として、MMは、CISPRGC (配列番号 690)、CISPRGCG (配列番号 514)、CISPRGCPDGPYVMY (配列番号 515)、CISPRGCPDGPYVM (配列番号 516)、CISPRGCEPGTYVPT (配列番号 517)、及びCISPRGCPGQIWHPP (配列番号 518)などの配列を含み得る。他の好適なマスキング部分としては、制限されることのない例によれば、GSHCLIPINMGAPSC (配列番号 519); CISPRGCGSSASQSGQSHCLIPINMGAPSC (配列番号 520); CNHHFYTCGCISPRGCPG (配列番号 521); ADHVFWSYGCISPRGCPG (配列番号 522); CHHVYWGHCISPRGCPG (配列番号 523); CPHFTTTSCGCISPRGCPG (配列番号 524); CNHHYHYCGCISPRGCPG (配列番号 525); CPHVSFGSCGCISPRGCPG (配列番号 526); CPHYTLYSCGCISPRGCPG (配列番号 527); CNHVFYTCGCISPRGCPG (配列番号 528); CNHFTLTTCGCISPRGCPG (配列番号 529); CHHFTLTTCGCISPRGCPG (配列番号 530); YNPCATPMCCISPRGCPG (配列番号 531); CNHHFYTCGCISPRGCG (配列番号 532); CNHHYHYCGCISPRGCG (配列番号 533); CNHVFYTCGCISPRGCG (配列番号 534); CHHVYWGHCISPRGCG (配列番号 535); CPHFTTTSCGCISPRGCG (配列番号 536); CNHFTLTTCGCISPRGCG (配列番号 537); CHHFTLTTCGCISPRGCG (配列番号 538); CPHYTLYSCGCISPRGCG (配列番号 539); CPHVSFGSCGCISPRGCG (配列番号 540); ADHVFWSYGCISPRGCG (配列番号 541); YNPCATPMCCISPRGCG (配列番号 542); CHHVYWGHCISPRGCG (配列番号 543); C(N/P)H(H/V/F)(Y/T)(F/W/T/L)(Y/G/T/S)(T/S/Y/H)CGCISPRGCG (配列番号 544); CISPRGCGQIPSVK (配列番号 545); CISPRGCTQPHYVSR (配列番号 546); 及び/又はCISPRGCNAVSLGS (配列番号 547)などのPCT出願公開WO2010/081173で開示されたEGFR特異的なマスクのいずれかが挙げられる。

#### 【0273】

Jagged標的(例えば、Jagged1及び/又はJagged2)に結合する抗体と共に使用するのに好適なマスキング部分としては、制限されることのない例としてQGSQCNIWLVGDCRGWQG (配列番号 691); QGSQCNIWLVGDCRGWNG (配列番号 548); PWCQRQDFLRCPQP (配列番号 549); QLGLPAYMCTFECLR (配列番号 550); CNLWVSGDCGLQG (配列番号 551); SCSLWTSGSCLPHSP (配列番号 552); YCLQLPHYMQAMCGR (配列番号 553); CFLYSCTDVSYNNT (配列番号 554); PWCQRQDYLRCPQP (配列番号 555); CNLWISGGDCRGLAG (配列番号 556); CNLWVSGDCRGVQG (配列番号 557); CNLWVSGDCRGLRG (配列番号 558); CNLWISGGDCRGLPG (配列番号 559); CNLWVSGDCRDAPW (配列番号 560); CNLWVSGDCRDLLG (配列番号 561); CNLWVSGDCRGLQG (配列番号 562); CNLWLHGGDCRGWQG (配列番号 563); CNIWLVGDCRGWQG (配列番号 564); CTTWFCGGDCGVMRG (配列番号 565); CNIWGPSVDCGALLG (配列番号 566); CNIWVNGDCRSFEG (配列番号 567); YCLNLPRYMQDMCWA (配列番号 568); YCLALPHYMQADCAR (配列番号 569); CFLYSCGDVSYWGA (配列番号 570); CYLYSCTDSAFWNNR (配列番号 571); CYLYSCNDVSYWSNT (配列番号 572); CFLYSCTDVSYW (配列番号 573); CFLYSCTDVAYWNSA (配列番号 574); CFLYSCTDVSYWGD (配列番号 575); CFLYSCTDVSYWNS (配列番号 576); CFLYSCTDVAYWNN (配列番号 577); CFLYSCGDVSYWNPGLS (配列番号 578); CFLYSCTDVAYWSGL (配列番号 579); CYLYSCTDGSYWNST (配列番号 580); CFLYSCSDVSYWNI (配列番号 581); CFLYSCTDVAYW (配列番号 582); CFLYSCTDVSYWGST (配列番号 583); CFLYSCTDVAYWGD (配列番号 584); GCNIWLNGGDCRGWVDPLQG (配列番号 585); GCNIWLVGDCRGWIGDNTG (配列番号 586); GCNIWLVGDCRGWIEDSNG (配列番号 587); GCNIWANGGDCRGWIDNIDG (配列番号 588); GCNIWLVGDCRGWLGEAVG (配列番号 589); GCNIWLVGDCRGWLEEAVG (配列番号 590); GGPALCNIWLNGGDCRGWSG (配列番号 591); GAPVFCNIWLNGGDCRGWVG (配列番号 592); GQQWCNIWLNGGDCRGWNG (配列番号 593); GKSEFCNIWLNGGDCRGWIG (配列番号 594); GTPGGCNIWANGGDCRGWEG (配列番号 595); GASQYCNLWINGGDCRGWRG (配列番号 596); GCNIWLVGDCRPWVEGG (配列番号 597); GCNIWAVGGDCRPVFDGG (配列番号 598); GCNIWLNGGDCRAWDTG (配列番号 599); GCNIWIVGGDCRPFINDG (配列番号 600); GCNIWLNGGDCRPVFGG (

【 0 2 7 4 】

30

【 0 2 7 5 】

40

【 0 2 7 6 】

50

000、000、10、000～10、000、000、100、000～1、000、000又は100、000～10、000、000倍、高い。逆に言えば、MMにより修飾されたABの標的に対する結合親和性は、MMにより修飾されていないAB、又は標的物に対する親ABの結合親和性よりも、少なくとも2、3、4、5、10、25、50、100、250、500、1、000、2、500、5、000、10、000、50、000、100、000、500、000、1、000、000、5、000、000、10、000、000、50、000、000又はそれ以上、又は5～10、10～100、10～1、000、10～10、000、10～100、000、10～1、000、000、10～10、000、000、100～1、000、100～10、000、100～100、000、100～1、000、000、100～10、000、000、1、000～10、000、1、000～100、000、1、000～1、000、000、1000～10、000、000、10、000～100、000、10、000～1、000、000、10、000～10、000、000、100、000～1、000、000又は100、000～10、000、000倍、低い。

#### 【0277】

ABに対するMMの解離定数( $K_d$ )は一般的に、標的に対するABの $K_d$ よりも大きい。ABに対するMMの $K_d$ は、標的に対するABの $K_d$ よりも、少なくとも5、10、25、50、100、250、500、1、000、2、500、5、000、10、000、100、000、1、000、000又はさらに10、000、000倍、大きい。逆に言えば、ABに対するMMの結合親和性は、一般的に、標的に対するABの結合親和性よりも低い。ABに対するMMの結合親和性は、標的に対するABの結合親和性よりも少なくとも5、10、25、50、100、250、500、1、000、2、500、5、000、10、000、100、000、1、000、000又はさらに10、000、000倍、低い。

#### 【0278】

ABがMMにより修飾され、そして標的の存在下にある場合、ABのその標的への特異的結合は、MMにより修飾されていないABの特異的結合、又は標的への親ABの特異的結合に比較して、低められるか、又は阻害される。MMにより修飾されていないABの結合、又は標的への親ABの結合に比較される場合、MMにより修飾される場合の標的を結合するABの能力は、インビボ又はインビトロアッセイにより測定される場合、少なくとも2、4、6、8、12、28、24、30、36、48、60、72、84、又は96時間、又は5、10、15、30、45、60、90、120、150、または180日間、又は1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、又は12か月間、又はそれ以上の間、少なくとも50%、60%、70%、80%、90%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%及びさらに100%、低められ得る。

#### 【0279】

MMは、標的へのABの結合を阻害する。MMは、ABの抗原結合ドメインを結合し、そして標的へのABの結合を阻害する。MMは、標的へのABの結合を立体的に阻害することができる。MMはABのその標的への結合を、アロステリック的に阻害することができる。それらの実施形態において、ABが修飾され、標的の存在下でMMにカップリングされる場合、MMにより修飾されていないAB、親AB、又はMMにカップリングされていないABの標的への結合に比較して、インビボ又はインビトロアッセイで測定される場合、少なくとも2、4、6、8、12、28、24、30、36、48、60、72、84、又は96時間、又は5、10、15、30、45、60、90、120、150、または180日間、又は1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、又は12か月間、又はそれ以上の間、標的へのABの結合は存在しないか、又は実質的に存在しないか、又はせいぜい0.001%、0.01%、0.1%、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、又は50%の標的へのABの結合が存在する。

#### 【0280】

10

20

30

40

50



A BがMMにカップリングされるか、又はMMにより修飾される場合、MMは、標的へのA Bの特異的結合を、「マスキングするか」又は低めるか、又は他方では、阻害する。A BがMMにカップリングされるか、又はMMにより修飾される場合、斯かるカップリング又は修飾は、A Bのその標的を特異的に結合する能力を低めるか又は阻害する構造変化をもたらすことができる。

#### 【0281】

MMにカップリングされるか、又はMMにより修飾されるA Bは、アミノ(N)末端領域からカルボキシル(C)末端領域に順に、以下の式で表され得る：

(MM) - (A B)

(A B) - (MM)

(MM) L (A B)

(A B) L (MM)

式中、MMはマスキング部分であり、A Bは抗体又は抗体フラグメントであり、そしてLはリンカーである。多くの実施形態において、柔軟性を提供するために、組成物中に、1又は2以上のリンカー、例えば柔軟リンカー(flexible linker)を挿入することが所望される。

#### 【0282】

ある実施形態において、MMは、A Bの天然の結合パートナーではない。いくつかの実施形態において、MMは、A Bの任意の天然結合パートナーに対する相同性を含まないか、又は実質的に含まない。いくつかの実施形態において、MMは、A Bの任意の天然の結合パートナーに対して、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、又は80%以下、類似する。いくつかの実施形態において、MMは、A Bの任意の天然の結合パートナーに対して、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、又は80%以下、同一である。いくつかの実施形態において、MMは、A Bの任意の天然の結合パートナーに対して、25%以下、同一である。いくつかの実施形態において、MMは、A Bの任意の天然の結合パートナーに対して、50%以下、同一である。いくつかの実施形態において、MMは、A Bの任意の天然の結合パートナーに対して、20%以下、同一である。いくつかの実施形態において、MMは、A Bの任意の天然の結合パートナーに対して、10%以下、同一である。

#### 【0283】

いくつかの実施形態において、活性化可能抗体は、MMにより修飾されるA Bを含み、そしてまた、1又は2以上の切断可能部分(CM)も含む。斯かる活性可能抗体は、A Bの標的への活性化可能/切り替え可能結合を示す。

活性可能抗体は一般的に、マスキング部分(MM)及び修飾可能又は切断可能部分(CM)により修飾されたか又はそれらにカップリングされた、抗体又は抗体フラグメント(A B)を含む。いくつかの実施形態において、CMは、マトリプターゼ及びu P Aから選択される少なくとも1つのプロテアーゼのための基質として作用するアミノ酸配列を含む。

#### 【0284】

活性化可能抗体の要素は、MM及びCMが、切断された(又は比較的活性の)状態で、及び標的の存在下で、A Bが標的を結合するが、ところが切断されていない(又は比較的活性の)状態で、標的の存在下で、A Bのその標的の特異的結合が低められるか又は阻害されるよう位置決定されるよう配置される。A Bのその標的への特異的結合は、MMによりその標的を特異的に結合するA Bの能力の阻害又はマスキングのために低められ得る。

#### 【0285】

標的に対する、MM及びCMにより修飾されたA Bの $K_d$ は、MM及びCMにより修飾されていないA B、又は標的に対する親A Bの $K_d$ よりも、少なくとも5、10、25、50、100、250、500、1、000、2、500、5、000、10、000、50、000、100、000、500、000、1、000、000、5、000、0

10

20

30

40

50

00、10、000、000、50、000、000又はそれ以上、又は5～10、10～100、10～1、000、10～10、000、10～100、000、10～1、000、000、10～10、000、000、100～1、000、100～10、000、100～100、000、100～1、000、000、100～10、000、000、1、000～10、000、1、000～100、000、1、000～1、000、000、1000～10、000、000、10、000～100、000、10、000～1、000、000、10、000～10、000、000、100、000～1、000、000又は100、000～10、000、000倍、高い。逆に言えば、MM及びCMにより修飾されたABの標的に対する結合親和性は、MM及びCMにより修飾されていないAB、又は標的に対する親ABの結合親和性よりも、少なくとも5、10、25、50、100、250、500、1、000、2、500、5、000、10、000、50、000、100、000、500、000、1、000、000、5、000、000、10、000、000、50、000、000又はそれ以上、又は5～10、10～100、10～1、000、10～10、000、10～100、000、10～1、000、000、10～10、000、000、100～1、000、100～10、000、100～100、000、100～1、000、000、100～10、000、000、1、000～10、000、1、000～100、000、1、000～1、000、000、1000～10、000、000、10、000～100、000、10、000～1、000、000、10、000～10、000、000、10、000～10、000、000、100、000～1、000、000又は100、000～10、000、000倍、低い。

10

20

#### 【0286】

ABがMM及びCMにより修飾され、そして標的の存在下であるが、しかし修飾剤（例えば、マトリプターゼ及びuPAから選択される少なくとも1つのプロテアーゼ）の存在下にはない場合、その標的へのABの特異的結合は、MM及びCM又は親ABにより修飾されていないABの標的への特異的結合に比較して、低められるか又は阻害される。親ABの結合、又はMM及びCMにより修飾されていないABのその標的への結合に比較して、MM及びCMにより修飾される場合の標的を結合するABの能力は、インビボ又はインビトロアッセイにより測定される場合、少なくとも2、4、6、8、12、28、24、30、36、48、60、72、84、又は96時間、又は5、10、15、30、45、60、90、120、150、または180日間、又は1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、又は12か月間の間、又はそれ以上の間、少なくとも50%、60%、70%、80%、90%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%及びさらに100%、低められ得る。

30

#### 【0287】

本明細書において使用される場合、用語、切断された状態とは、マトリプターゼ及びuPAから選択される少なくとも1つのプロテアーゼによるCMの修飾に続いての活性化可能抗体の状態を言及する。用語、切断されていない状態とは、本明細書において使用される場合、マトリプターゼ及びuPAから選択されるプロテアーゼによるCMの切断の不在下での活性化可能抗体の状態を言及する。上記で論じられるように、用語「活性化可能抗体」は、その切断されていない（生来の）状態及びその切断された状態での活性化可能抗体を言及するために、本明細書において使用される。いくつかの実施形態において、切断された活性化可能抗体が、プロテアーゼによるCMの切断のためにMMを欠いており、少なくともMM（例えば、MMは共有結合（例えば、システイン残基間のジスルフィド結合）により活性化可能抗体に連結されていない）の放出をもたらすことは、当業者に明らかであろう。

40

#### 【0288】

活性化可能又は切り替え可能とは、活性化可能抗体が、阻害された、マスキングされた又は切断されていない状態（すなわち、第1コンホメーション）下で、標的への結合の第1レベル、及び阻害されていない、マスキングされていない及び/又は切断された状態（すなわち、第2コンホメーション）下で標的への結合の第2レベルを示すことを意味し、

50

ここで標的結合の第2レベルは、結合の第1レベルよりも大きい。一般的に、活性化可能抗体のA Bへの標的の接近性は、C Mを切断できる切断剤、すなわち、マトリプターゼ及びu P Aから選択されるプロテアーゼの存在下で、斯かる切断剤の不在下でよりも高い。従って、活性化可能が切断されていない状態下で存在する場合、A Bは、標的結合から阻害され、そして標的結合からマスキングされ得（すなわち、第1コンホメーション下で、斯かるA Bは標的を結合できない）、そして切断された状態で、A Bは標的結合に阻害されないか、又はマスキングされていない。

#### 【0289】

活性化可能抗体のC M及びA Bが選択され、結果的に、A Bは所定の標的のための結合部分を表し、そしてC Mは、マトリプターゼ及びu P Aから選択されるプロテアーゼのために基質を表す。いくつかの実施形態において、プロテアーゼは、対象における治療部分又は診断部位で標的と共同在する。本明細書中に使用される場合、共同在とは、同じ部位又は比較的近くに存在することを示す。いくつかの実施形態において、プロテアーゼはC Mを切断し、切断部位の近くに位置する標的に結合する活性化された抗体を得た。本明細書に開示される活性化可能抗体は、例えばC M内の部位を切断できるプロテアーゼ、すなわち、マトリプターゼ及びu P Aから選択されるプロテアーゼが、非治療部位の組織（例えば、健康な組織）においてよりも、治療部位又は診断部位の標的含有組織において、比較的高いレベルで存在する場合、特に使用される。いくつかの実施形態において、本開示のC Mはまた、他の1若しくは複数のプロテアーゼによっても切断される。いくつかの実施形態において、標的と共同在し、インビボにおけるC Mの切断に応答し得る他の1若しくは

10

20

#### 【0290】

いくつかの実施形態において、活性化可能抗体は、A Bがマスキングされていないか又は標的の結合から阻害される場合、非治療部位でA Bの結合に起因する、低められた毒性及び/又は有害な副作用を提供する。

#### 【0291】

一般的に、活性化可能抗体は、目的のA Bを選択し、そして活性化可能抗体の残りの部分を構成することにより設計され得、結果的に、コンホメーション的に制約される場合、M MはA Bのマスキング、又はA Bのその標的への結合の低下を提供する。構造的設計基準が、この機能的特徴を提供するために考慮されるべきである。

30

#### 【0292】

阻害されていないコンホメーションに対する阻害されたコンホメーションにおいて標的結合のための所望するダイナミック範囲の切り替え可能な表現型を示す活性化可能抗体が、提供される。ダイナミック範囲は一般的に、(b)第2組の条件下でのパラメーターの最小の検出される値に対する(a)第1組の条件下でのパラメーターの最大の検出されるレベルの比率を意味する。例えば、活性化可能抗体の場合、ダイナミック範囲とは、(b)プロテアーゼの不在化で活性化可能抗体に結合する、標的タンパク質の最小検出レベルに対する、(a)活性化可能抗体のC Mを切断できるマトリプターゼ及びu P Aから選択される少なくとも1つのプロテアーゼの存在下で活性化可能抗体に結合する標的タンパク質、すなわち標的の最大検出レベルの比率を意味する。活性化可能抗体のダイナミック範囲は、活性化可能抗体切断剤処理の平衡解離定数に対する活性化可能抗体切断剤（例えば、酵素）処理の平衡解離定数の比率として計算され得る。活性化可能抗体のダイナミック範囲が高いほど、活性化可能抗体の切り替え可能な表現型は良好である。比較的高いダイナミック範囲（例えば、1以上）を有する活性化可能抗体は、より所望の切り替え可能な表現型を示し、結果的に、活性化可能抗体による標的タンパク質結合が、切断剤の不在下でよりも、活性化可能抗体のC Mを切断できる切断剤（例えば、酵素）の存在化でより高い程度、生じる（例えば、主として生じる）。

40

#### 【0293】

活性化可能抗体は、種々の構造コンホメーションで提供され得る。活性化可能抗体についての典型的な式は、下記に提供される。A B、M M及びC MのN - 末端からC - 末端の

50

順序が、活性化可能抗体内で逆にされ得ることが特に意図される。C M及びM Mはアミノ酸配列においてオーバーラップし、例えば結果的に、C MはM M内に含まれることもまた特に意図される。

#### 【0294】

例えば、活性化可能抗体は、アミノ(N)末端領域からカルボキシル(C)末端領域の順に、下記式によりあらわされ得る：



式中、MMはマスキング部分であり、CMは切断可能部分であり、そしてABは抗体又はそのフラグメントである。MM及びCMは上記式においては異なった成分として示されているが、本明細書に開示されるすべての典型的な実施形態(式を包含する)においては、MM及びCMのアミノ酸配列がオーバーラップし、例えば結果的に、CMはMM内に完全に又は部分的に含まれることが意図される。さらに、上記式は、活性化可能抗体要素にN-末端又はC-末端を位置決定できる追加のアミノ酸配列を提供する。

#### 【0295】

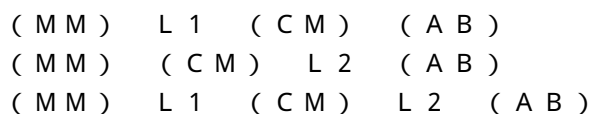
ある実施形態において、MMは、ABの天然の結合パートナーではない。いくつかの実施形態において、MMは、ABの任意の天然結合パートナーに対する相同性を含まないか、又は実質的に含まない。いくつかの実施形態において、MMは、ABの任意の天然の結合パートナーに対して、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、又は80%以下、類似する。いくつかの実施形態において、MMは、ABの任意の天然の結合パートナーに対して、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、又は80%以下、同一である。いくつかの実施形態において、MMは、ABの任意の天然の結合パートナーに対して、50%以下、同一である。いくつかの実施形態において、MMは、ABの任意の天然の結合パートナーに対して、25%以下、同一である。いくつかの実施形態において、MMは、ABの任意の天然の結合パートナーに対して、20%以下、同一である。いくつかの実施形態において、MMは、ABの任意の天然の結合パートナーに対して、10%以下、同一である。

#### 【0296】

多くの実施形態において、1又は2以上のMM-CM接合、CM-AB接合、又は両方で、柔軟性を提供するために、1又は2以上のリンカー、例えば柔軟リンカーを、活性化可能抗体構築物中に挿入することが所望される。例えば、AB、MM及び/又はCMは、所望する柔軟性を提供するのに十分な数の残基(例えば、Gly、Ser、Asp、Asn、特にGly及びSer、特にGly)を含まない。斯かる活性化可能抗体構築物の切切り換え可能表現型は、柔軟リンカーを提供するために、1又は2以上のアミノ酸の導入から利益を得ることができる。さらに、下記のように、活性化可能体がコンホメーション的に制約された構築物として提供される場合、柔軟リンカーが、切断された活性化可能抗体において環状構造の形成及び維持を促進するために、操作可能的に挿入され得る。

#### 【0297】

例えば、ある実施形態において、活性化可能抗体は、下記式の1つを含む(ここで、下記式は、N-からC-末端方向、又はC-からN-末端方向のいずれかでのアミノ酸配列を表す)：



式中、MM、CM及びABは上記に定義される通りであり；L1及びL2はそれぞれ独立して及び任意には、存在しても又は不在であっても良く、少なくとも1つの柔軟アミノ酸(例えば、Gly)を含む同じか又は異なった柔軟リンカーである。さらに、上記式は、活性化可能抗体要素にN-末端又はC-末端を位置決定できる追加のアミノ酸配列を提供する。例としては、次のものを挙げることが、但しそれらだけには限定されない：標的

部分（例えば、標的組織に存在する細胞の受容体のためのリガンド）、及び血清中半減期拡張部分（例えば、血清タンパク質、例えば免疫グロブリン（例えば、IgG）又は血清アルブミン（例えば、ヒト血清アルブミン（HAS））を結合するポリペプチド。

#### 【0298】

CMは、約  $0.001 \sim 1500 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ S}^{-1}$  又は少なくとも  $0.001$ 、 $0.005$ 、 $0.01$ 、 $0.05$ 、 $0.1$ 、 $0.5$ 、 $1$ 、 $2.5$ 、 $5$ 、 $7.5$ 、 $10$ 、 $15$ 、 $20$ 、 $25$ 、 $50$ 、 $75$ 、 $100$ 、 $125$ 、 $150$ 、 $200$ 、 $250$ 、 $500$ 、 $750$ 、 $1000$ 、 $1250$ 、又は  $1500 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ S}^{-1}$  の速度で、酵素により特異的に切断される。いくつかの実施形態において、CMは約  $100,000 \text{ M}^{-1} \text{ S}^{-1}$  の速度で特異的に切断される。いくつかの実施形態において、CMは約  $1 \times 10^2 \sim 1 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ S}^{-1}$ （すなわち、約  $1 \times 10^2 \sim 1 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ S}^{-1}$ ）の速度で特異的に切断される。

10

#### 【0299】

酵素による特異的切断のためには、酵素とCMとの間の接触が行われる。MM及びCMにカップリングされるABを含む活性化可能抗体が標的且つ十分な酵素活性の存在下にある場合、CMは切断され得る。十分な酵素活性とは、CMと接触し、そして切断をもたらす酵素の能力を言及する。酵素はCMと接近して存在するが、しかし酵素の他の細胞要因又はタンパク質修飾のために、切断できないことが容易に想定され得る。

#### 【0300】

本明細書に記載される組成物に使用するのに適切なリンカーは一般的に、標的へのABの結合の障害を促進するために、修飾されたAB又は活性化可能抗体の柔軟性を提供するリンカーである。斯かるリンカーは一般的に、柔軟リンカーとして言及される。適切なリンカーは、容易に選択され得、そして異なった長さのいずれかの適切なもの、例えば長さが1アミノ酸（例えば、Gly）～20アミノ酸、長さが2アミノ酸～15アミノ酸、長さが3アミノ酸～12アミノ酸、長さが4アミノ酸～10アミノ酸、長さが5アミノ酸～9アミノ酸、長さが6アミノ酸～8アミノ酸、又は長さが7アミノ酸～8アミノ酸であり、そして長さが1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、又は20アミノ酸であり得る。

20

#### 【0301】

典型的な柔軟リンカーは、グリシンポリマー（G）<sub>n</sub>、グリシン-セリンポリマー（例えば、（GS）<sub>n</sub>、（GS GGS）<sub>n</sub>（配列番号385）及び（GGGS）<sub>n</sub>（配列番号386）、ここでnは少なくとも1つの整数である）、グリシン-アラニン-セリンポリマー及び当業界において知られている他の柔軟リンカーを包含する。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おらず、そして従って、成分間の中立テザーとして機能することができる。グリシンは、アラニンよりも有意に（phi-psi）空間にアクセスし、そしてより長い側鎖を有する残基よりもはるかに低く制限される（Scheraga, Rev. Computational Chem. 11173-142 (1992)を参照のこと）。典型的な柔軟リンカーは、次のものを包含するが、但しそれらだけには限定されない：Gly-Gly-Ser-Gly（配列番号387）、Gly-Gly-Ser-Gly-Gly（配列番号388）、Gly-Ser-Gly-Ser-Gly（配列番号389）、Gly-Ser-Gly-Gly-Gly（配列番号390）、Gly-Gly-Gly-Ser-Gly（配列番号391）、Gly-Ser-Ser-Ser-Gly（配列番号392）、及び同様のもの。当業者は、活性化可能抗体の企画が、完全に又は部分的に柔軟性であるリンカーを包含することができ、結果的に、前記リンカーは、柔軟リンカー、及び所望する活性化可能抗体構造を提供するために、低い柔軟性構造を与える1又は2以上の部分を含むことができることを理解するであろう。

30

40

#### 【0302】

本明細書中に記載した複合活性化可能抗体はまた、活性化可能抗体に複合化された剤を含む。いくつかの実施形態において、複合化される剤は、抗炎症剤及び/又は抗悪性腫瘍薬などの治療剤である。斯かる実施形態では、例えば、いくつかの実施形態において、炭

50

化水素部分が抗体の抗原結合領域又は活性化可能抗体内の抗原結合フラグメントの外側に位置している場合には、剤は活性化可能抗体の炭化水素部分に結合されるいくつかの実施形態において、剤は、活性化可能抗体内の抗体又は抗原結合フラグメントのスルフィド基に結合される。

#### 【0303】

いくつかの実施形態において、剤は、細胞毒性剤、例えば毒素（例えば、細菌、真菌、植物又は動物起源の酵素的活性毒素、若しくはそのフラグメント）又は放射性同位体（すなわち、放射性複合体）である。適切な細胞毒性剤は、例えば、表4に列挙される細胞毒性剤のいずれかである。

#### 【0304】

いくつかの実施形態において、剤は、例えば、標識又は他のマーカーなどの検出可能部分である。例えば、剤は、放射性標識アミノ酸、目印を付したアビジン（例えば、光学的又は熱量計的方法で検出できるストレプトアビジン含有蛍光標識又は酵素活性）によって検出できる1若しくは複数のピオチニル残基、1若しくは複数の放射性同位元素又は放射性核種、1若しくは複数の蛍光標識、1若しくは複数の酵素標識、及び/又は1若しくは複数の化学発光剤を含んでいる。いくつかの実施形態において、検出可能残基はスペーサ分子によって取り付けられる。

#### 【0305】

本開示はまた、細胞毒性薬、例えば毒素（例えば、細菌、真菌、植物又は動物起源の酵素的活性毒素、若しくはそのフラグメント）又は放射性同位体（すなわち、放射性複合体）などに結合した抗体を含む免疫複合体に係する。好適な細胞毒性薬としては、例えば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、MMAF、MMAE、MMAD、DMAF、DMAE）が挙げられる。例えば、剤はモノメチルアウリスタチンE（MMAE）又はモノメチルアウリスタチンD（MMAD）である。いくつかの実施形態において、剤は、表3で列挙した基から選択される剤である。いくつかの実施形態において、剤はドラスタチンである。いくつかの実施形態において、剤は、アウリスタチン又はその誘導体である。いくつかの実施形態において、剤は、アウリスタチンE又はその誘導体である。いくつかの実施形態において、剤はモノメチルアウリスタチンE（MMAE）である。いくつかの実施形態において、剤はモノメチルアウリスタチンD（MMAD）である。いくつかの実施形態において、剤はマイタンシノイドである又はマイタンシノイド誘導体である。いくつかの実施形態において、剤は、DM1又はDM4である。いくつかの実施形態において、剤は、デュオカルマイシン又はその誘導体である。いくつかの実施形態において、剤は、カリケアマイシン又はその誘導体である。いくつかの実施形態において、剤は、ピロロベンゾジアゼピンである。

#### 【0306】

いくつかの実施形態において、剤は、マレイミドカプロイル-バリン-シトルリンリンカー又はマレイミドPEG-バリン-シトルリンリンカーを使用してABに接続される。いくつかの実施形態において、剤は、マレイミドカプロイル-バリン-シトルリンリンカーを使用してABに接続される。いくつかの実施形態において、剤は、マレイミドPEG-バリン-シトルリンリンカーを使用してABに接続される。いくつかの実施形態において、剤は、マレイミドPEG-バリン-シトルリン-パラ-アミノベンジルオキシカルボニルリンカーを使用してABに接続されたモノメチルアウリスタチンD（MMAD）であり、このリンカーペイロード構築物は本明細書中で「vc-MMAD」と呼ばれる。いくつかの実施形態において、剤は、マレイミドPEG-バリン-シトルリン-パラ-アミノベンジルオキシカルボニルリンカーを使用してABに接続されたモノメチルアウリスタチンE（MMAE）であり、このリンカーペイロード構築物は本明細書中で「vc-MMAE」と呼ばれる。vc-MMAD及びvc-MMAEの構築物は、以下に示されている：

vc-MMAD：

#### 【0307】

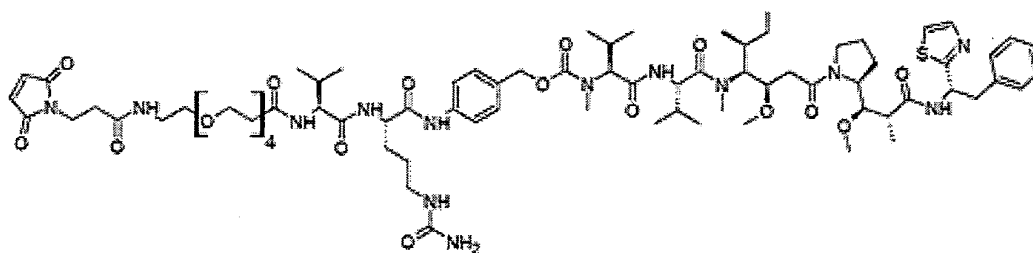
10

20

30

40

## 【化 1】



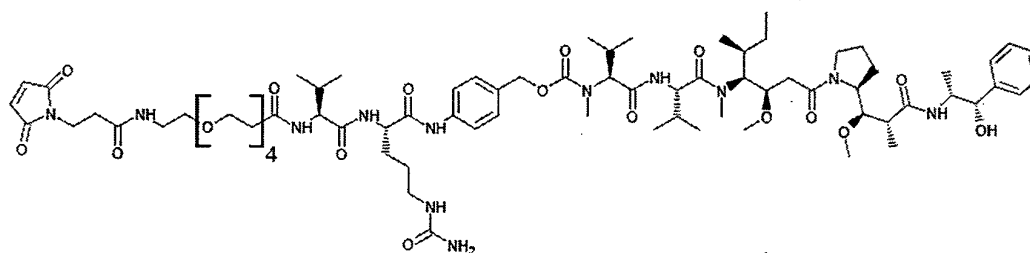
10

## 【 0 3 0 8 】

v c - M M A E :

## 【 0 3 0 9 】

## 【化 2】



20

## 【 0 3 1 0 】

使用され得る酵素的活性の毒素及びそのフラグメントは、ジフテリア A 鎖、ジフテリアトキシンの非結合活性フラグメント、外毒素 A 鎖（シュードモナス・アエルギノサ（*Pseudomonas aeruginosa*）からの）、リシン A 鎖、アブリン A 鎖、モデシン A 鎖、 $\alpha$ -サルシン、アレウリテス・フォルジ（*Aleurites fordii*）タンパク質、ジアンチンタンパク質、ファイトラカ・アメリカナ（*Phytolacca americana*）タンパク質（P A P I、P A P I I 及び P A P - S）、ゴーヤ（*Momordica charantia*）阻害剤、クルシン、クロチン、サパオナリア・オフィシナリス（*Saponaia officinalis*）阻害剤、ゲロニン、ミトゲリン、レストリクトシン、フェノマイシン、エノマイシン及びトリコテセンを包含する。種々の放射性核種は、放射性複合抗体の製造のために利用できる。例としては、2 1 2 B i、1 3 1 I、1 3 1 I n、9 0 Y 及び 1 8 6 R e を挙げることができる。

30

## 【 0 3 1 1 】

抗体と細胞毒性剤との結合は、種々の二官能性タンパク質 - カップリング剤、例えば 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 (S P D P)、イミノチオラン (I T)、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 H C l）、活性エステル（例えば、ジスクシンイミジルスベート）、アルデヒド（例えば、グルタルアルデヒド）、ビス - アジド誘導体（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、ビス - (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）を用いて製造される。例えば、リシン免疫毒素は、Vitetta et al., Science 238: 1098 (1987) に記載のようにして調製され得る。炭素 - 1 4 - 標識された 1 - イソチオシアネートベンジル - 3 - メチルジエチレントリアミン五酢酸 (M X - D T P A) は、抗体への放射性核種の結合のための典型的なキレート剤である (W O 9 4 / 1 1 0 2 6 を参照のこと)。

40

50

## 【 0 3 1 2 】

表 3 は、本明細書に記載される開示に使用され得る典型的な医薬剤のいくつかを列挙するが、但しそれらだけに限定するものではない。

## 【 0 3 1 3 】

## 【表 5 0】

表 3：複合化のための代表的な医薬剤

細胞毒性剤

アウリスタチン	ターボスタチン	10
アウリスタチンE	フェンスタチン	
モノメチルアウリスタチンD (MMAD)	ヒドロキシフェンスタチン	20
モノメチルアウリスタチンE (MMAE)	スポンギスタチン5	
デスメチルアウリスタチンE (DMAE)	スポンギスタチン7	
アウリスタチンF	ハリスタチン1	
モノメチルアウリスタチンF (MMAF)	ハリスタチン2	
デスメチルアウリスタチンF (DMAF)	ハリスタチン3	
アウリスタチン誘導体類、例えば、そのアミド	変性ブリオスタチン	
アウリスタチンチラミン	ハロコムスタチン	
アウリスタチンキノリン	ピロロベンズイミダゾール (PBI)	
ドラスタチン	シブロスタチン6	30
ドラスタチン誘導体	ドキサリホルム	
ドラスタチン 16 DmJ	アントラサイクリン類似体	
ドラスタチン 16 Dpv		
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	セマドチン類似体 (GemCH <sub>2</sub> -SH)	
デュオカルマイシン	シュードモナス属毒素A (PE38) バリエーション	
デュオカルマイシン誘導体	シュードモナス属毒素A (ZZ-PE38) バリエーション	
アルファ - アマニチン	ZJ-101	
アントラサイクリン	OSW-1	
ドキソルビシン	06-ベンジルグアニンの4-ニトロベンジルオキシカルボニル誘導体	40
ダウノルビシン	トポイソメラーゼ阻害剤	
ブリオスタチン	ヘミアステルリン	
カンプトテシン	セファロタキシン	
カンプトテシン誘導体	ホモハリングトニン	
7-置換カンプトテシン	ピロロベンゾジアゼピン二量体 (PBDs)	
10, 11- ジフルオロメチレンジオキシカンプトテシン	官能化ピロロベンゾジアゼピン	
コンブレタスタチン	カリケアマイシン	
デブromoアプリシアトキシン	ポドフィロトキシン	
カハリラリド - F	タキサン	
ジスコデルモリド	ビンカアルカロイド	
エクテイナシジン		
	<u>複合化可能検出試薬</u>	
<u>抗ウイルス剤</u>	フルオレセイン及びその誘導体	
アシクロビル	フルオレセインイソチオシアネート (FITC)	
ビラA		

## 【 0 3 1 4 】



【表 5 1】

シンメトレル	<u>放射性同位元素</u>	
	<sup>125</sup> I	
<u>抗真菌剤</u>	<sup>131</sup> I	
ナイスタチン	<sup>89</sup> Zr	
	<sup>111</sup> In	
<u>追加の抗新生物薬</u>	<sup>123</sup> I	
アドリアマイシン	<sup>131</sup> I	
セルビジン	<sup>99m</sup> Tc	10
ブレオマイシン	<sup>201</sup> Tl	
アルケラン	<sup>133</sup> Xe	
ベルバン	<sup>11</sup> C	
オンコビン	<sup>62</sup> Cu	
フルオロウラシル	<sup>18</sup> F	
メトトレキサート	<sup>68</sup> Ga	
チオテパ	<sup>13</sup> N	
ビスアントレン	<sup>15</sup> O	
ノバントロン	<sup>38</sup> K	
チオグアニン	<sup>82</sup> Rb	20
プロカラビジン	<sup>99m</sup> Tc (テクネチウム)	
シタラビン		
<u>抗菌薬</u>	<u>重金属</u>	
アミノグルコシド	バリウム	
ストレプトマイシン	金	
ネオマイシン	プラチナ	
カナマイシン		
アミカシン	<u>抗マイコプラズマ</u>	
ゲンタマイシン	チロシン	
トブラマイシン	スペクチノマイシン	30
ストレプトマイシンB		
スペクチノマイシン		
アンピシリン		
スルファニルアミド		
ポリミキシン		
クロラムフェニコール		

## 【0315】

当業者は、多くの種類の可能性ある部分が、本開示の得られる抗体に結合され得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)を参照のこと；それらの全内容は、参照により本明細書に援用される）。 40

## 【0316】

いくつかの実施形態において、本明細書中に提供された組成物及び方法に加えて、複合活性化可能抗体はまた、

カップリングは、抗体及び他の部分がそれらのそれぞれの活性をできるだけ長く保持するよう、それらの2つの分子を結合するであろういずれかの化学反応を使用することによって達成され得る。この結合は、多くの化学機構、例えば共有結合、親和性結合、インターカレーション、コーディネート結合及び複合体化を包含する。いくつかの実施形態において、結合は、しかしながら、共有結合である。共有結合は、存在する側鎖の直接的縮合に 50

より、又は外部架橋分子の組込みにより達成され得る。多くの二価又は多価結合剤が、タンパク質分子、例えば本開示の抗体の他の分子へのカップリングにおいて有用である。例えば、代表的なカップリング剤は、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、ジイソシアネート、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包含することができる。この列挙は、当業界において知られている種々の種類のカップリング剤を網羅することを意図するものではなく、むしろ、より一般的なカップリング剤の例である (Killen and Lindstrom, Jour. Immun. 133:1335-2549 (1984); Jansen et al., Immunological Reviews 62:185-216 (1982); 及び Vitetta et al., Science 238:1098 (1987) を参照のこと)。

#### 【0317】

いくつかの実施形態において、本明細書中に提供された組成物及び方法に加えて、複合活性化可能抗体もまた、活性化可能抗体配列に挿入されたか、そうでなければ、含まれる修飾されたアミノ酸配列を通して部位 - 特異的結合のために修飾され得る。それらの修飾されたアミノ酸配列は、複合活性化可能抗体内の結合された剤の制御された配置及び / 又は投与を可能にするよう企画される。例えば、活性化可能抗体は、反応性チオ基を提供し、そして抗原結合を変更しないで、タンパク質折り畳み及びアッセムブリーに負の影響を及ぼさない、L 及び H 鎖上の位置でのシステイン置換を含むよう構築され得る。いくつかの実施形態において、活性化可能抗体は、結合のための適切な部位を提供するために活性化可能抗体内に 1 若しくは複数の非天然アミノ酸残基を含むか、そうでなければ、導入するよう構築され得る。いくつかの実施形態において、活性化可能抗体は、活性化可能抗体配列内に酵素的に活性化可能ペプチド配列を含むか、そうでなければ、導入するよう構築され得る。

#### 【0318】

好適なリンカーは、文献に記載されている (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) の使用を記載する、Ramakrishnan, S. et al., Cancer Res. 44:201-208 (1984) を参照のこと)。また、オリゴペプチドリナーにより抗体に結合されるハロゲン化されたアセチルヒドラジド誘導体の使用を記載する米国特許第 5, 030, 719 号を参照のこと。いくつかの実施形態において、好適なリンカーは、次のものを包含する: (i) EDC (1 - エチル 3 - (3 - ジメチルアミノ) プロピル) カルボジイミドヒドロクロリド; (ii) SMP T (4 - スクシンイミジルオキシカルボニル - - メチル - - (2 - ピリジル - ジチオ) - トルエン (Pierce Chem. Co., カタログ番号 (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 2165G)); (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 に結合されたスルホ NHS (N - ヒドロキシルスルホ スクシンイミド: Pierce Chem. Co., カタログ番号 24510)。追加のリンカーとしては、これだけに限定されるものではないが、SMCC、スルホ - SMqCC、SPDB、又はスルホ - SPDB が挙げられる。

#### 【0319】

上記リンカーは、異なった属性を有し、従って異なった物理化学的特性を有する複合体を導く成分を含む。例えば、カルボン酸アルキルのスルホ NHS エステルは、芳香族カルボキシレートのスルホ NHS エステルより安定している。NHS エステル含有リンカーは、スルホ NHS エステルより可溶性が低い。さらに、リンカー SHPT は、立体的ヒンダードジスルフィド結合を含み、そして高められた安定性を有する複合体を形成することができる。ジスルフィド結合はインビトロで切断され、低い利用可能な複合体をもたらすので、そのジスルフィド結合は一般的に、他の結合よりも低い安定性である。スルホ NHS は特に、カルボジミド (carbodiimide) カップリングの安定性を高め得る。スルホ NHS との結合に使用される場合、カルボジミドカップリング (EDC など) は、単独のカルボジミドカップリング反応より加水分解に抵抗性であるエステルを形成する。

## 【0320】

いくつかの実施形態において、リンカーは切断できる。いくつかの実施形態において、リンカーは非切断性である。いくつかの実施形態において、複数のリンカーが存在する。前記複数のリンカーはすべて同じであり、すなわち切断できるか、又は非切断性であり、又は複数のリンカーは異なっており、すなわち少なくとも1つは切断でき、そして少なくとも1つは非切断性である。

## 【0321】

本開示は、次のように、A Bへの剤の結合のためにいくつかの方法を利用する：(a) A Bの炭水化物部分への結合、又は(b) A Bのスルフヒドリル基への結合、又は(c) A Bのアミノ基への結合、又は(d) A Bのカルボキシレート基への結合。本開示によれば、A Bは少なくとも2種の反応基(1つはA Bと反応し、そして1つは剤と反応する)を有する中間リンカーを介して剤に共有結合され得る。任意の適合できる有機化合物を含むリンカーが選択され、結果的に、A B(又は剤)との反応はA B反応性及び選択性に悪影響を及ぼさない。さらに、剤へのリンカーの結合は、剤の活性を破壊しない。酸化された抗体又は酸化された抗体フラグメントとの反応のための適切なリンカーは、第1級アミン、第二アミン、ヒドラジン、ヒドラジド、ヒドロキシルアミン、フェニルヒドラジン、セミカルバジド及びチオセミカルバジド基から成る群から選択されたアミンを含むそれらを包含する。斯かる反応性官能基は、リンカーの構造の一部として存在することができるか、又は斯かる基を含まないリンカーの適切な化学的修飾により導入され得る。

## 【0322】

本開示によれば、還元されたA Bへの結合のための適切なリンカーは、還元された抗体又はフラグメントのスルフヒドリル基と反応できる一定の反応基を有するそれらを包含する。斯かる反応基は、次のものを包含するが、但しそれらだけには制限されない：反応性ハロアルキル基(例えば、ハロアセチル基)、p-マーキュリーベンゾエート基、及びマイケル型付加反応できる基(例えば、マレイミド、及びMitra and Lawton, 1979, J. Amer. Chem. Soc. 101: 3097-3110により記載される基を包含する)。

## 【0323】

本開示によれば、酸化も還元もされていないA bへの結合のための適切なリンカーは、A Bにおける修飾されていないリシン残基に存在する一次アミノ基と反応できる一定の官能基を有するそれらを包含する。斯かる反応基は、次のものを包含するが、但しそれらだけに制限されない：NHSカルボン酸又は炭酸エステル、ペンタフルオロフェニルカルボン酸又は炭酸エステル、アシルイミダゾール、イソシアネート及びイソチオシアネート。

## 【0324】

本開示によれば、酸化も又は還元もされていないA Bへの結合のための適切なリンカーは、適切な試薬により活性化されている、A bにおけるアスパラギン酸又はグルタミン酸残基に存在するカルボン酸基と反応できる一定の官能基を有するそれらを包含する。適切な活性化試薬は、付加されたNHS又はスルホ-NHSを有するか又は有さないEDC、及びカルボキサミド形成のために使用される他の脱水剤を包含する。それらの場合、適切なリンカーに存在する官能基は、第1級及び第2級アミン、ヒドラジン、ヒドロキシルアミン及びヒドラジドを包含する。

## 【0325】

剤は、リンカーがA Bに結合される前又はその後、リンカーに結合され得る。ある種の用途によれば、リンカーが関連する剤を有さないA B-リンカー中間体を、まず生成することが所望される。特定の用途に依存して、特定の剤がリンカーに共有結合され得る。他の実施形態において、A Bはまず、MM、CM、及び関連リンカーに結合され、そして次に、結合目的のためのリンカーに結合される。

## 【0326】

分枝状リンカー：特定の実施形態において、剤の結合のための複数の部位を有する分枝リンカーが使用される。複数部位リンカーに関しては、A Bへの単一の共有結合が、多くの部位で剤を結合できるA B-リンカー中間体をもたらす。部位はアデヒド又はスルフヒ

10

20

30

40

50

ドリル基、又は剤が結合され得るいずれかの化学部位であり得る。

【0327】

他方では、より高い比活性（又はA Bに対する剤のより高い比率）が、A B上の複数部位での単一位点リンカーの結合により達成され得る。この複数部位は、2種の方法のいずれかによりA B中に導入され得る。最初の方法は、同じA Bに複数のアルデヒド基及び／又はスルフヒドリル基を生成することができる。第2の方法は、リンカーへの続く結合のための複数の官能部位を有する「分枝状リンカー」を、A Bのアルデヒド又はスルフヒドリル基に結合することができる。分枝状リンカー又は複数部位リンカー中の官能部位は、アルデヒド又はスルフヒドリル基であり得、又はリンカーが結合され得るいずれかの化学部位であり得る。さらに高い比活性が、それらの2つのアプローチを組合すことにより、すなわちA B上のいくつかの部位で複数部位リンカーを結合することにより得られる。

10

【0328】

切断可能リンカー：補体系の酵素、例えばu プラスミノゲン活性化因子、組織プラスミノゲン活性化因子、トリプシン、プラスミン、又はタンパク質分解活性を有する別の酵素（但し、それらだけには限定されない）による分解に対して敏感であるペプチドリinkerは、本開示の1つの実施形態に使用され得る。本開示の1つの方法によれば、剤は、補体による切断に対して感受性のリンカーを介して結合される。抗体は、補体を活性化できる種類から選択される。従って、抗体-剤結合体は、補体カスケードを活性化し、そして標的部位で剤を開放する。本開示の別の方法によれば、剤は、タンパク質分解活性を有する酵素、例えばu プラスミノゲン活性化因子、組織プラスミノゲン活性化因子、プラスミン又はトリプシンによる切断に対して感受性のリンカーを介して結合される。それらの切断可能リンカーは、細胞外毒素、例えば非制限的例によれば、表3に示される細胞外毒素のいずれかを含む複合活性化可能抗体において有用である。

20

【0329】

切断可能リンカー配列の非制限的例が、表4に提供される。

【0330】

## 【表 5 2】

表 4：複合化のための代表的なリンカー配列  
切断可能な配列の型

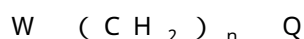
アミノ酸配列	
<u>プラスミンで切断可能な配列</u>	
プロウロキナーゼ	PRFKIIGG (配列番号 665)
	PRFRIIGG (配列番号 666)
TGFβ	SSRHRRALD (配列番号 667)
プラスミノーゲン	RKSSIIIRMDVVL (配列番号 668)
スタフィロキナーゼ	SSSFDKGKYKGGDA (配列番号 669)
	SSSFDKGKYKRGDDA (配列番号 670)
<u>第 X a 因子で切断可能な配列</u>	
	IEGR (配列番号 671)
	IDGR (配列番号 672)
	GGSIDGR (配列番号 673)
<u>MMP で切断可能な配列</u>	
ゼラチナーゼA	PLGLWA (配列番号 674)
<u>コラゲナーゼで切断可能な配列</u>	
仔ウシ皮膚コラーゲン (α1(I)鎖)	GPQGIAGQ (配列番号 675)
仔ウシ皮膚コラーゲン (α2(I)鎖)	GPQGLLGA (配列番号 676)
ウシ軟骨コラーゲン (α1(II)鎖)	GIAGQ (配列番号 677)
ヒト肝臓コラーゲン (α1(III)鎖)	GPLGIAGI (配列番号 678)
ヒトα <sub>2</sub> M	GPEGLRVG (配列番号 679)
ヒトPZP	YGAGLGVV (配列番号 680)
	AGLGVVER (配列番号 681)
	AGLGISST (配列番号 682)
ラットα <sub>1</sub> M	EPQALAMS (配列番号 683)
	QALAMSAI (配列番号 312)
ラットα <sub>2</sub> M	AAYHLVSQ (配列番号 315)
	MDAFLESS (配列番号 316)
ラットα <sub>1</sub> I <sub>3</sub> (2J)	ESLPVAV (配列番号 317)
ラットα <sub>1</sub> I <sub>3</sub> (27J)	SAPAVESE (配列番号 318)
ヒト線維芽細胞コラゲナーゼ	DVAQFVLT (配列番号 319)
(自己分解切断)	VAQFVLTE (配列番号 372)
	AQFVLTEG (配列番号 373)
	PVQPIGPQ (配列番号 380)

## 【0331】

さらに、剤は、ジスルフィド結合（例えば、システイン分子上のジスルフィド結合）を介して A B に結合され得る。多くの腫瘍は自然に高レベルのグルタチオン（還元剤）を放出するので、これはジスルフィド結合を還元し、続いて、送達の部位で剤を開放する。いくつかの実施形態において、C M を修飾する還元剤はまた、複合活性化可能抗体のリンカーも修飾するであろう。

## 【0332】

スパーサー及び切断可能要素：いくつかの実施形態において、剤と、活性化可能抗体の A B との間の空間を最適化するような手段でリンカーを構築することが必要である。これは、下記一般構造のリンカーの使用により達成され得る：



式中、W は、- N H - C H<sub>2</sub> - 又は - C H<sub>2</sub> - のいずれかであり；

40

50

Qは、アミノ酸、ペプチドであり；そして  
nは、0～20の整数である。

【0333】

いくつかの実施形態において、リンカーは、スペーサー要素及び切断可能要素を含むことができる。スペーサー要素は、A Bのコアから離れて切断可能要素を配置するのに役立つ、結果的に、切断可能要素は切断を担当できる酵素により接近できる。上記に記載される特定の分枝状リンカーがスペーサー要素として役立つことができる。

【0334】

この議論を通して、剤へのリンカー（又は切断可能要素へのスペーサー要素の、又は剤への切断可能要素の）の結合は、結合又は反応の特定の様式である必要はない。適切な安定性及び生物学的適合性の生成物を提供するいずれかの反応が許容される。

10

【0335】

血清補体及びリンカーの選択：本開示の1つの方法によれば、剤の放出が所望される場合、補体を活性化できる種類の抗体であるA Bが使用される。得られる結合体は、抗原を結合し、そして補体カスケードを活性化する両能力を保持する。従って、本開示の実施形態において、剤は、切断可能リンカー又は切断可能要素の一端に連結され、そしてリンカー基の他端はA B上の特定部位に結合される。例えば、剤がヒドロキシ基又はアミノ基を有する場合、それは、それぞれエステル又はアミド結合を介して、ペプチド、アミノ酸又は他の適切に選択されたリンカーのカルボキシ末端に結合され得る。例えば、斯かる剤は、カルボジイミド反応を介してリンカーペプチドに結合され得る。剤がリンカーへの結合と干渉する官能基を含む場合、それらの干渉性官能基は、結合の前、ブロックされ得、そして生成物の結合体又は中間体が製造されると、ブロック解除される。次に、リンカーの反対又はアミノ末端が直接的に、又は補体を活性化できるA Bへの結合のためにさらなる修飾の後、使用される。

20

【0336】

リンカー（又はリンカーのスペーサー要素）は任意の所望する長さのものであり得、その一端は、活性化可能抗体のA B上の特定部位に共有結合され得る。リンカー又はスペーサー要素の他端は、アミノ酸又はペプチドリナーに結合され得る。

【0337】

従って、それらの結合体が補体の存在下で抗原に結合する場合、リンカーに剤を結合するアミド又はエステル結合が切断され、その活性形での剤の放出がもたらされる。それらの結合体は、対象に投与される場合、標的部位で剤の送達及び放出を達成し、そして表3に提供されるように（但し、それらに限定されない）、医薬剤、抗生物質、代謝拮抗剤、抗増殖剤及び同様のもののインビボ送達のために特に効果的である。

30

【0338】

補体活性化を伴わない放出のためのリンカー：標的化された送達のさらなる別の用途によれば、補体活性化を伴わない剤の放出が、補体カスケードの活性化は究極的には標的細胞を溶解するので、所望される。従って、このアプローチは、剤の送達及び放出が標的細胞を殺さないで達成される場合、有用である。細胞メディエーター、例えばホルモン、酵素、コルチコステロイド、神経達成物質、遺伝子又は酵素の標的細胞への送達が所望される、そのような場合が、目標である。それらの結合体は、血清プロテアーゼによる切断に対して軽度に影響を受けるリンカーを介して、補体を活性化できないA Bへの剤の結合により調製され得る。この結合体が個人に投与される場合、抗原-抗体複合体はすばやく形成するが、ところが剤の切断はゆっくり生じ、従って標的部位での化合物の放出がもたらされる。

40

【0339】

生化学的架橋剤：いくつかの実施形態において、活性化可能抗体は、一定の生化学的架橋剤を用いて、1又は2以上の治療剤に結合され得る。架橋試薬は、2種の異なった分子の官能基と一緒に結びつける分子架橋を形成する。2種の異なったタンパク質を段階的に連結するためには、所望しないホモポリマー形成を排除するヘテロ二官能性架橋剤が使用

50

され得る。

【0340】

リソソームプロテアーゼにより切断できるペプチジルリンカー、例えばVal-Cit、Val-Ala、又は他のジペプチドがまた有用である。さらに、リソソームの低-pH環境下で切断できる酸-不安定性リンカー、例えばビス-シアリルエーテルが使用され得る。他の適切なリンカーは、カテプシン-不安定性基質、特に酸性pHで最適な機能を示すそれらのものを包含する。

【0341】

代表的なヘテロ二官能性架橋剤が表5に参照される。

【0342】

【表53】

表5：代表的なヘテロ二官能性架橋剤

リンカー	反応性の対象	利点及び適用	ヘテロ二官能性架橋剤	
			架橋後のスペーサーアームの長さ (オングストローム)	
SMPT	第一級アミン スルフヒドリル	より高い安定性	11.2 Å	20
SPDP	第一級アミン スルフヒドリル	チオール化 切断可能な架橋	6.8 Å	
LC-SPDP	第一級アミン スルフヒドリル	伸延されたスペーサーアーム	15.6 Å	
スルホ-LC-SPDP	第一級アミン スルフヒドリル	伸延されたスペーサーアーム 水溶性	15.6 Å	
SMCC	第一級アミン スルフヒドリル	安定したマレイミド反応基 酵素-抗体の複合化	11.6 Å	
スルホ-SMCC	第一級アミン スルフヒドリル	ハプテン-担体タンパク質の複合化 安定したマレイミド反応基 水溶性	11.6 Å	30
MBS	第一級アミン スルフヒドリル	酵素-抗体の複合化 ハプテン-担体タンパク質の複合化	9.9 Å	
スルホ-MBS	第一級アミン スルフヒドリル	水溶性	9.9 Å	
SIAB	第一級アミン スルフヒドリル	酵素-抗体の複合化	10.6 Å	
スルホ-SIAB	第一級アミン スルフヒドリル	水溶性	10.6 Å	
SMPB	第一級アミン スルフヒドリル	伸延されたスペーサーアーム 酵素-抗体の複合化	14.5 Å	40
スルホ-SMPB	第一級アミン スルフヒドリル	伸延されたスペーサーアーム 水溶性	14.5 Å	
EDE/スルホ-NHS	第一級アミン カルボキシル群	ハプテン-担体の複合化	0	
ABH	炭水化物 非選択的	糖基と反応	11.9 Å	

【0343】

非切断可能リンカー又は直接的結合：本開示のいくつかの実施形態において、結合体は

10

20

30

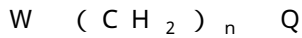
40

50

、剤が標的に送達するが、しかし放出されないよう設計され得る。これは、直接的に、又は非切断可能リンカーを介して、A Bに剤を結合することにより達成され得る。

#### 【0344】

それらの非切断可能リンカーは、続いて、本明細書に記載される方法によりA Bへの結合において利用され得る官能基を含むよう修飾され得る、アミノ酸、ペプチド、D - アミノ酸又は他の有機化合物を包含することができる。斯かる有機リンカーのための一般式は、下記式であり得る：



式中、Wは、-NH-CH<sub>2</sub>-又は-CH<sub>2</sub>-のいずれかであり；

Qは、アミノ酸、ペプチドであり；そして

nは、0～20の整数である。

10

#### 【0345】

非切断可能結合体：いくつかの実施形態において、化合物は、補体を活性化しないA Bに結合され得る。補体活性化できないA Bを用いる場合、この結合は、活性化された補体による切断に対して敏感であるリンカー、又は活性化された補体による切断に対して敏感ではないリンカーを用いて、達成され得る。

#### 【0346】

本明細書に開示される抗体はまた、免疫リポソームとして処方され得る。抗体を含むリポソームは、当業界において知られている方法、例えばEpstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 3688 (1985); Hwang et al., Proc. Natl Acad. Sci. USA, 77: 4030 (1980); 及び米国特許第4,485,045号及び第4,544,545号に記載される方法により調製される。向上された循環時間を有するリポソームが、米国特許第5,013,556号に開示されている。

20

#### 【0347】

特に有用なリポソームは、ホスファチジルコリン、コレステロール及びPEG-誘導体化されたホスファチジルエタノールアミン(PEG-PE)を含む脂質組成物による逆相蒸発方法により生成され得る。リポソームは、規定の孔サイズのフィルターを通して押出され、所望する直径を有するリポソームが得られる。本開示の抗体のFab フラグメントは、ジスルフィド-交換反応を介してMartin et al., J. Biol. Chem., 257: 286-288 (1982)に記載のようにして、リポソームに結合され得る。

30

#### 【0348】

定義：

特にことわらない限り、本開示に関連して使用される科学用語及び技術用語は、当業者により通常理解される意味を有するであろう。「a」実体(「a」 entity)又は「an」実体(「an」 entity)といった用語は、1若しくは複数のその実体を指す。例えば、「a」化合物(「a」 compound)は1若しくは複数の化合物を指す。このように、「a」、「an」、「1若しくは複数」及び「少なくとも1つ」といった用語は互換的に使用され得る。さらに、特に必要とされない限り、単数形の実体は複数を含むものとし、そして複数形は単数を含むものとする。一般的に、本明細書に記載される細胞及び組織培養物、分子生物学、及びタンパク質及びオリゴ-又はポリヌクレオチド化学及びハイブリダイゼーションに関連して使用される命名法及びそれらの技法は、当業者に良く知られており、そして当業界において通常使用される。標準技法が、組換えDNA、オリゴヌクレオチド合成、及び組織培養及び形質転換(例えば、エレクトロポレーション、リポフェクション)について使用される。酵素反応及び精製技法は、製造業者の規格に従って、又は当業界において通常達成されるようにして、又は本明細書に記載されるようにして、実施される。前述の技法及び手順は、当業界において良く知られている従来の方法に従って、及び本明細書を通して引用され、そして論じられる種々の一般的及び特定の参照に記載のようにして、一般的に実施される。例えば、Sambrook et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989))を参照のこと。本明細書に記載される分析化学、合成有機化学、及び医学及び薬化

40

50



学に関連して使用される命名法、及び実験手順及び技法は、当業者に良く知られており、そして当業界において通常使用される。標準技法が、化学合成、化学分析、医薬調製、配合、及び送達、及び患者の治療のために使用される。

【0349】

本開示に従って使用される場合、次の用語が、特にことわらない限り、次の意味を有することが理解されるであろう。

【0350】

本明細書において使用される場合、用語「抗体 (antibody)」とは、免疫グロブリン分子、及び免疫グロブリン (Ig) 分子の免疫学的活性部分、すなわち抗原を特異的に結合する (抗原と免疫反応する) 抗原結合部位を含む分子を言及する。「特異的に結合する (specifically bind)」又は「免疫反応する (immunoreacts with)」又は「免疫特異的に結合する (immunospecifically bind)」とは、抗体が所望する抗原の1又は2以上の抗原決定因子と反応し、そして他のポリペプチドと反応せず、そしてより低い親和性 ( $K_d > 10^{-6}$ ) で結合しないことを意味する。抗体は、ポリクローナル、モノクローナル、キメラ、ドメイン抗体、単鎖、Fab, 及び F(ab)2 フラグメント、scFv s、及び Fab 発現ライブラリーを包含するが、但しそれらだけには限定されない。

【0351】

基本的な抗体構造単位は、テトラマーを含むことが知られている。各テトラマーは、同一の2対のポリペプチド鎖から構成され、各対は1つの「L鎖」(約25 kDa) 及び1つの「H鎖」(約50 ~ 70 kDa) を有する。各鎖のアミノ末端部分は、抗原認識を主に担当する約100 ~ 110 又はそれ以上のアミノ酸の可変領域を含む。各鎖のカルボキシ末端は、エフェクター機能を主に担当する不変領域を規定する。一般的に、ヒトから得られる抗体分子は、分子に存在するH鎖の性質によりお互い異なる、クラス IgG、IgM、IgA、IgE 及び IgD のいずれかに関連する。特定クラスは、サブクラス、例えば IgG1、IgG2、及び他のものも有する。さらに、ヒトにおいては、L鎖はカップ鎖又はラムダ鎖である得る。

【0352】

用語「モノクローナル抗体 (monoclonal antibody)」(mAb) 又は「モノクローナル抗体組成物 (monoclonal antibody composition)」とは、本明細書において使用される場合、固有のL鎖遺伝子生成物及び固有のH鎖遺伝子生成物から成る抗体分子の1つの分子種のみを含む抗体分子集団を言及する。特に、モノクローナル抗体の相補性決定領域 (CDR) は、前記集団のすべての分子において同一である。MAbは、抗原のエピトープに対して固有の結合親和性により特徴づけられる抗原の特定エピトープと免疫反応できる抗原結合部位を含む。

【0353】

用語「抗原 - 結合部位 (antigen-binding site)」又は「結合部分 (binding portion)」とは、抗原結合に関与する免疫グロブリン分子の一部を言及する。抗原結合部位は、重鎖 (H) 及び軽鎖 (L) のN - 末端可変 (V) 領域のアミノ酸残基により形成される。「超可変領域 (hypervariable regions)」として言及される、H及びL鎖のV領域内の3種の高度に分岐するストレッチが、「フレームワーク領域 (framework regions)」又は「FR」として知られているより保存された隣接ストレッチ間に介在される。従って、用語「FR」とは、免疫グロブリン中の超可変領域間に、及びそれに隣接して天然に見出されるアミノ酸配列を言及する。抗体分子においては、L鎖の3種の超可変領域及びH鎖の3種の超可変領域が、立体空間においてお互い相対的に配列され、抗原 - 結合表面が形成される。前記抗原 - 結合表面は、結合される抗原の立体表面に対して相補的であり、そして各H及びL鎖の3種の超可変領域は、「相補性 - 決定領域 (complementarity-determining regions)」又は「CDR」として言及される。各ドメインへのアミノ酸の割り当ては、Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987 and 1991))、又は Chothia & Lesk J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987), Chothia et al. Nature 342:878-883 (1989) の定義に従う。

## 【 0 3 5 4 】

本明細書において使用される場合、用語「エピトープ (epitope)」は、免疫グロブリン、s c F v又はT細胞受容体に対して特異的結合できる任意のタンパク質決定因子を包含する。用語「エピトープ」は、免疫グロブリン又はT細胞受容体に対して特異的結合できる任意のタンパク質決定因子を包含する。エピトープ決定因子は通常、アミノ酸又は糖側鎖などの分子の化学的活性表面基から成り、そして通常、特定の立体構造特性、及び特定の電荷特性を有する。例えば、抗体は、ポリペプチドのN末端又はC末端ペプチドに対して産生され得る。抗体は、解離定数が  $1 \mu\text{M}$  ; いくつかの実施形態において、  $100 \text{ mM}$ 、及びいくつかの実施形態において、  $10 \text{ nM}$  である場合、抗原を特異的に結合すると言われる。

10

## 【 0 3 5 5 】

本明細書において使用される場合、用語「特異的結合 (specific binding)」、「免疫学的結合 (immunological binding)」及び「免疫学的結合性質 (immunological binding properties)」とは、免疫グロブリンが特異的である、免疫グロブリン分子と抗原との間に生じるタイプの非共有相互作用を言及する。免疫学的結合相互作用の強度又は親和性は、相互作用の解離定数 ( $K_d$ ) により表され、ここでより小さな  $K_d$  はより大きな親和性を表す。選択されるポリペプチドの免疫学的結合性質は、当業界において良く知られている方法を用いて定量化され得る。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を測定することを伴い、ここでそれらの速度は、複雑なパートナーの濃度、相互作用の親和性、及び両方の速度の等しい影響を及ぼす幾何学的パラメータに依存する。従って、「オン速度定数 (on rate constant)」（ $K_{on}$ ）及び「オフ速度定数 (off rate constant)」（ $K_{off}$ ）の両者は、濃度、及び会合及び解離の実際の速度の計算により決定され得る (Nature 361:186-87 (1993)を参照のこと)。  $K_{off} / K_{on}$ の比は、親和性に関連しないすべてのパラメータの取り消しを可能にし、そして解離定数  $K_d$  に等しい (一般的に、Davies et al. (1990) Annual Rev Biochem 59:439-473を参照のこと)。本開示の抗体は、アッセイ、例えば放射性リガンド結合アッセイ又は当業者に知られている類似するアッセイにより測定されるように、平衡結合定数 ( $K_d$ ) が  $1 \mu\text{M}$ 、いくつかの実施形態において、  $100 \text{ nM}$ 、いくつかの実施形態において、  $10 \text{ nM}$ 、及びいくつかの実施形態において、  $100 \text{ M} \sim 約 1 \text{ pM}$  である場合、標的に対して特異的に結合すると言われる。

20

30

## 【 0 3 5 6 】

用語「単離されたポリヌクレオチド (isolated polynucleotide)」とは、本明細書において使用される場合、ゲノム、cDNA又は合成起源、又はそれらのいくつかの組合せのポリヌクレオチドを意味し、その起源によれば、「単離されたポリヌクレオチド」は、(1)「単離されたポリヌクレオチド」が天然に見出されるポリヌクレオチドのすべて又は一部と会合せず、(2)それが天然で連結されないポリヌクレオチドに対して操作可能に連結されるか、又は(3)大きな配列の一部として、天然に存在しない。本開示のポリヌクレオチドは、本明細書に示されるH鎖免疫グロブリン分子をコードする核酸分子、及び本明細書に記載されるL鎖免疫グロブリン分子をコードする核酸分子を含む。

## 【 0 3 5 7 】

本明細書に記載される用語「単離されたタンパク質 (isolated protein)」とは、cDNA、組換えRNA、又は合成起源又はそれらのいくつかの組合せのタンパク質を意味し、その起源、又は誘導の源によれば、「単離されたタンパク質」は、(1)自然界に見出されるタンパク質に関連せず、(2)同じ源からの他のタンパク質を有さず、例えばネズミタンパク質を有さず、(3)異なった種からの細胞により発現され、又は(4)自然界には存在しない。

40

## 【 0 3 5 8 】

用語「ポリペプチド (polypeptide)」は、ポリペプチド配列の天然タンパク質、フラグメント、又は類似体を言及するために一般用語として本明細書において使用される。従って、天然タンパク質、フラグメント及び類似体は、ポリペプチド属の種である。本開示

50

のポリペプチドは、本明細書に示されるH鎖免疫グロブリン分子、及び本明細書に示されるL鎖免疫グロブリン分子、並びにL鎖免疫グロブリン分子、例えばカップL鎖免疫グロブリン分子、及びその逆、並びにそれらのフラグメント及び類似体を含んで成る組合せにより形成される抗体分子を含む。

#### 【0359】

本明細書において使用される場合、用語「天然に存在する (naturally-occurring)」とは、目的物に適用される場合、目的物が自然界において見出され得る事実を言及する。例えば、生物（例えば、ウィルス）に存在するポリペプチド又はポリヌクレオチドは、自然源から単離され、そして実験室においてヒトにより意図的に変性されていないか、又は他方では、天然に存在する。

10

#### 【0360】

用語「操作可能的に連結された (operably linked)」とは、本明細書において使用される場合、記載される成分の意図された様式でのそれらの機能を可能にする関係下にある斯かる成分の位置を言及する。コード配列に「操作可能的に連結された」制御配列は、そのコード配列の発現が制御配列と適合できる条件下で達成されるような手段で連結される。

#### 【0361】

用語「制御配列 (control sequence)」とは、本明細書において使用される場合、それらが連結されるコード配列の発現及びプロセッシングをもたらすのに必要であるポリヌクレオチド配列を言及する。斯かる制御配列の性質は、原核生物における宿主生物に依存して異なり、斯かる制御配列は一般的に、真核生物におけるプロモーター、リボソーム結合部位及び転写終結配列を含み、一般的に斯かる制御配列は、プロモーター及び転写終結配列を含む。用語「制御配列」は、それらの存在が発現及びプロセッシングのために必須であるすべての成分を、最低でも含むことが意図され、そしてまた、それらの存在がリーダー配列及び融合パートナー配列のために好都合である追加成分も含むことができる。用語「ポリヌクレオチド」とは、本明細書において使用される場合、少なくとも10個の長さの塩基のヌクレオチド、リボヌクレオチド又はデオキシヌクレオチドのいずれか、又は修飾された形のいずれかのタイプのヌクレオチドを意味する。この用語は、単鎖及び二本鎖形のDNAを包含する。

20

#### 【0362】

本明細書に言及される用語「オリゴヌクレオチド (oligonucleotide)」は、天然に存在し、そして天然に存在しないオリゴヌクレオチド結合により一緒に連結された、天然に存在し、そして修飾されたヌクレオチドを包含する。オリゴヌクレオチドは、200個の長さか、又はそれよりも少ない長さの塩基を、一般的に含むポリヌクレオチドサブセットである。いくつかの実施形態において、オリゴヌクレオチドは、10～60個の長さ、及び、いくつかの実施形態において、12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19又は20～40個の長さの塩基である。オリゴヌクレオチドは通常、例えばプローブに関しては、単鎖であり、ところがオリゴヌクレオチドは、遺伝子変異体の構成への使用のためには、二本鎖であり得る。本開示のオリゴヌクレオチドは、センス又はアンチセンスオリゴヌクレオチドである。

30

40

#### 【0363】

本明細書において言及される用語「天然に存在するヌクレオチド (naturally occurring nucleotides)」は、デオキシリボヌクレオチド及びリボヌクレオチドを包含する。本明細書において言及される用語「修飾されたヌクレオチド」は、修飾された又は置換された糖基及び同様のものを有するヌクレオチドを包含する。本明細書において言及される用語「オリゴヌクレオチド結合」は、オリゴヌクレオチド結合、例えばホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホロセレノエート、ホスホロジセレノエート、ホスホロアニロチオエート、ホスホラニラデート (phosphoraniladate)、ホスホロンミデート (phosphoronmidate) 及び同様のものを包含する。例えば、LaPlanche et al. Nucl. Acids Res. 14:9081 (1986); Stec et al. J. Am. Chem. Soc. 106:6077 (1984), Stein et al. Nuc

50

I. Acids Res. 16:3209 (1988), Zon et al. Anti Cancer Drug Design 6:539 (1991); Zon et al. Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach, pp. 87-108 (F. Eckstein, Ed., Oxford University Press, Oxford England (1991)); Stec et al. U.S. Patent No. 5,151,510; Uhlmann and Peyman Chemical Reviews 90:543 (1990)を参照のこと。オリゴヌクレオチドは、所望には、検出のための標識を含むことができる。

#### 【 0 3 6 4 】

本明細書において使用される場合、20個の従来のアミノ酸及びそれらの略語は、従来の使用法に従う。Immunology - A Synthesis (2nd Edition, E.S. Golub and D.R. Gren, Eds., Sinauer Associates, Sunderland Mass. (1991))を参照のこと。20個の従来のアミノ酸の立体異性体（例えば、D - アミノ酸）、非天然アミノ酸、例えば、 $\alpha$ -、 $\beta$ -二置換されたアミノ酸、N - アルキルアミノ酸、乳酸、及び他の非従来型アミノ酸もまた、本開示のポリペプチドのための適切な成分であり得る。非従来型アミノ酸の例は、次のものを包含する：4 - ヒドロキシプロリン、 $\gamma$ -カルボキシグルタメート、 $\epsilon$ -N、N、N、N - トリメチルリシン、 $\epsilon$ -N - アセチルリシン、O - ホスホセリン、N - アセチルセリン、N - ホルミルメチオニン、3 - メチルヒスチジン、5 - ヒドロキシリシン、 $\epsilon$ -N - メチルアルギニン、及び他の類似するアミノ酸及びイミノ酸（例えば、4 - ヒドロキシプロリン）。本明細書で使用されるポリペプチド表記法においては、標準用法及び慣例に従って、左側方向はアミノ末端方向であり、そして右側方向はカルボキシ末端方向である。

10

#### 【 0 3 6 5 】

同様に、特にことわらない限り、単鎖ポリヌクレオチド配列の左側端は、5' 端であり、二本鎖ポリヌクレオチド配列の左側方向は、5' 方向として言及される。新生RNA転写体の5' から3' 付加の方向は、転写方向として言及され、RNAと同じ配列を有するDNA鎖上の及びRNA転写体の5' 末端に対して5' 側に存在する配列領域は、「上流配列（upstream sequences）」と呼ばれ、RNAと同じ配列を有するDNA鎖上の、及びRNA転写体の3' 末端に対して3' 側に存在する領域は、「下流配列（downstream sequences）」と呼ばれる。

20

#### 【 0 3 6 6 】

ポリペプチドに適用される場合、用語「実質的に同一（substantial identity）」とは、2種のペプチド配列が、デフォルトギャップ重量を用いて、プログラムGAP又はGESSFITによれば、適切に整列される場合、少なくとも80%の配列同一性、いくつかの実施形態において、少なくとも90%の配列同一性、いくつかの実施形態において、少なくとも95%の配列同一性、及びいくつかの実施形態において、少なくとも99%の配列同一性を共有することを意味する。

30

#### 【 0 3 6 7 】

いくつかの実施形態において、同一でない残基位置は、保存性アミノ酸置換により異なる。

#### 【 0 3 6 8 】

本明細書において論じられる場合、抗体又は免疫グロブリン分子のアミノ酸配列におけるマイナーな変動は、アミノ酸配列における変動が少なくとも75%、いくつかの実施形態において、少なくとも80%、90%、95%及びいくつかの実施形態において、99%維持する場合、本開示により包含されるものとして意図される。特に、保存性アミノ酸置換が企画される。保存性置換は、それらの側鎖に関連するアミノ酸ファミリー内で起こるそれらの置換である。遺伝的にコードされたアミノ酸は一般的に、次のファミリーに分けられる：（1）酸性アミノ酸はアスパラギン酸、グルタミン酸であり；（2）塩基性アミノ酸は、リシン、アルギニン、ヒスチジンであり；（3）非極性アミノ酸は、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファンであり、そして（4）非荷電性極性アミノ酸は、グリシン、アスパラギン、グルタミン、システイン、セリン、トレオニン、チロシンである。親水性アミノ酸は、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

40

50

、セリン、及びトレオニンを含む。疎水性アミノ酸は、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を含む。他のファミリーのアミノ酸は、(i) 脂肪族 - ヒドロキシファミリーである、セリン及びトレオニン；(ii) アミド含有ファミリーである、アスパラギン及びグルタミン；(iii) 脂肪族ファミリーである、アラニン、バリン、ロイシン、及びイソロイシン；及び(iv) 芳香族ファミリーである、フェニルアラニン、トリプトファン及びチロシンを含む。例えば、イソロイシン又はバリンによるロイシンの、グルタミン酸によるアスパラギン酸の、セリンによるトレオニンの単離された置換、又は構造的に関連するアミノ酸による1つのアミノ酸の類似する置換は、特にその置換が骨格部位内にアミノ酸を含まない場合、得られる分子の結合又は性質に対して主要効果を有さないであろうことを予測するが妥当である。アミノ酸変化が機能ペプチドをもたらすかどうかは、ポリペプチド誘導体の比活性をアッセイすることにより、容易に決定され得る。アッセイは本明細書に詳細に記載される。抗体又は免疫グロブリン分子のフラグメント又は類似体は、当業者により容易に調製され得る。フラグメント又は類似体の好適なアミノ - 及びカルボキシ末端は、機能的ドメインの境界近くで存在する。構造的及び機能的ドメインは、公的又は独自の配列データベースとのヌクレオチド及び/又はアミノ酸配列データの比較により同定され得る。いくつかの実施形態において、コンピューター化された比較方法が、既知構造及び/又は機能の他のタンパク質に存在する配列モチーフ又は予測されるタンパク質コンホメーションドメインを同定するために使用される。既知立体構造に折り畳むタンパク質配列を同定するための方法は周知である (Bowie et al. Science 253:164 (1991))。従って、前述の例は、当業者が本開示に従って構造及び機能的ドメインを規定するために使用され得る、配列モチーフ及び構造コンホメーションを認識することができることを示している。

#### 【0369】

好適なアミノ酸置換は、(1) タンパク質分解に対する感受性を低め、(2) 酸化に対する感受性を低め、(3) タンパク質複合体を形成するために結合親和性を変更し、(4) 結合親和性を変更し、並びに(5) 斯かる類似体の他の物理化学的又は機能的性質を付与するか又は修正するそれらの置換である。類似体は、天然に存在するペプチド配列以外の配列の種々のムテインを含むことができる。例えば、単一又は複数のアミノ酸置換 (例えば、保存性アミノ酸置換) が、分子間接触を形成する天然に存在する配列 (例えば、ドメイン外のポリペプチドの一部) において行われ得る。保存性アミノ酸置換は、親配列の構造特性を実質的変更すべきではない (例えば、置換アミノ酸は、親配列に生じるヘリックスを分解するか、又は親配列を特徴づける他のタイプの二次構造を破壊する傾向であってはならない)。当核分野で認識されるポリペプチド二次及び三次構造の例は、Proteins, Structures and Molecular Principles (Creighton, Ed., W. H. Freeman and Company, New York (1984)); Introduction to Protein Structure (C. Branden and J. Tooze, eds., Garland Publishing, New York, N.Y. (1991)); 及びThornton et al. Nature 354: 105 (1991)に記載される。

#### 【0370】

用語「ポリペプチドフラグメント (polypeptide fragment)」とは、本明細書において使用される場合、アミノ酸末端及び/又はカルボキシ末端欠失及び/又は1又は2以上の内部欠失を有するが、しかし残るアミノ酸配列は例えば完全長cDNA配列から推定される天然に存在する配列においてその対応する位置と同一であるポリペプチドを言及する。フラグメントは、典型的には、少なくとも5、6、8又は10個の長さのアミノ酸、いくつかの実施形態において、少なくとも14個の長さのアミノ酸、いくつかの実施形態において、少なくとも20個の長さのアミノ酸、通常少なくとも50個の長さのアミノ酸、及びいくつかの実施形態において、少なくとも70個の長さのアミノ酸である。用語「類似体」とは、本明細書において使用される場合、推定されるアミノ酸配列の一部に対して実質的な同一性を有し、そして適切な結合条件下で標的に対する特異的結合を有する、少なくとも25個のアミノ酸のセグメントから構成されるポリペプチドを言及する。典型的

には、ポリペプチド類似体は、天然に存在する配列に関して、保存性アミノ酸置換（又は付加又は欠失）を含む。類似体は典型的には、少なくとも20個の長さのアミノ酸、いくつかの実施形態において、少なくとも50個又はそれ以上の長さのアミノ酸であり、そしてしばしば、完全な長さの天然に存在するポリペプチドと同じ長さであり得る。

【0371】

用語「剤（agent）」は、化学物質、化学物質及び生体高分子の混合物、又は生物学的材料から製造される抽出物を示すために、本明細書において使用される。

【0372】

本明細書において使用される場合、用語「標識（label）」又は「標識された（labeled）」とは、例えば放射性標識されたアミノ酸の組込み、又はマークされたアビジン（例えば、光学的又は熱量測定方法により検出され得る蛍光マーカー又は酵素活性を含むストレプトアビジン）により検出され得るビオチニル部分のポリペプチドへの結合による、検出可能マーカーの組込みを言及する。一定の状況下で、標識又はマーカーもまた治療性であり得る。ポリペプチド及び糖タンパク質を標識する種々の方法は、周知であり、そして使用され得る。ポリペプチドについての標識の例は、次のものを包含するが、但しそれらだけには限定されない：放射性同位体又は放射性核種（例えば、 $^3\text{H}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^{15}\text{N}$ 、 $^{35}\text{S}$ 、 $^{90}\text{Y}$ 、 $^{99}\text{Tc}$ 、 $^{111}\text{In}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{131}\text{I}$ ）、蛍光標識（例えば、FITC、ローダミン、ランタニド蛍光体）、酵素標識（例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ、p-ガラクトシダーゼ、ルシフェラーゼ、アルカリホスファターゼ）、化学ルミネセンス、ゼオチニル基、二次レポーターにより認識される所定のポリペプチドエピトープ（例えば、ロイシンジッパー対配列、二次抗体のための結合部位、金属結合ドメイン、エピトープタグ）。いくつかの実施形態において、標識は、可能性ある立体障害を低めるために、種々の長さのスペーサーアームにより結合される。用語「医薬剤又は薬剤（pharmaceutical agent or drug）」とは、本明細書において使用される場合、患者に適切に投与される場合、所望する治療効果を誘発できる化学物質又は組成物を言及する。

【0373】

本明細書における他の化学用語は、The McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms (Parker, S., Ed., McGraw-Hill, San Francisco (1985))により例示されるように、当核技術分野における従来の使用法に従って使用される。

【0374】

本明細書において使用される場合、「実質的に純粋な（substantially pure）」とは、目的の種が存在する優性種であり（すなわち、モル基準で、組成物において任意の他の個々の種より豊富である）、そして、いくつかの実施形態において、実質的に純粋な画分が、目的の種が存在するすべての高分子種の少なくとも約50%（モル基準で）を含む組成物であることを意味する。

【0375】

一般的に、実質的に純粋な組成物は、組成物に存在するすべての高分子種の約80%以上、いくつかの実施形態において、約85%、90%、95%及び99%以上を含むであろう。いくつかの実施形態において、目的の種は、本質的な均質性に精製され（汚染種は従来の検出方法によっては、組成物において検出され得ない）、ここで組成物は単一の高分子種から実質的に成る。

【0376】

用語、患者とは、ヒト及び動物種を包含する。

【0377】

本開示の活性化可能抗体は所定の標的、例えばヒト標的タンパク質に結合する。本明細書中に記載した活性化可能抗体と同じエピトープに結合する活性化可能抗体もまた本開示に含まれる。

【0378】

当業者は、モノクローナル抗体（例えば、ネズミ又はヒト適合されたモノクローナル抗体）が、前者が標的への結合から後者を妨げるかどうかを確かめることにより、本明細書

10

20

30

40

50

に記載される方法に使用されるモノクローナル抗体と同じ特異性を有するかどうかを、過渡の実験をすることなく、決定することが可能であることを認識するであろう。試験されるモノクローナル抗体が、本開示のモノクローナル抗体による結合の低下により示されるように、本開示のモノクローナル抗体と競争する場合、それらの2種のモノクローナル抗体は、同じか、又は密接に関連するエピトープに結合する。モノクローナル抗体が本開示のモノクローナル抗体の特異性を有するかどうかを決定するための他の方法は、標的と共に本開示のモノクローナル抗体をブレインキュベートし、そして次に、試験されるモノクローナル抗体が標的を結合するその能力を阻害するかどうかを決定するために試験されるモノクローナル抗体を添加することである。試験されるモノクローナル抗体が阻害される場合、十中八九、それは本開示のモノクローナル抗体と同じか、又は機能的に等しいエピトープ特異性を有する。

10

多重特異的活性化可能抗体

【0379】

本開示はまた、多重特異的活性化可能抗体も提供する。本明細書において提供される多重特異的活性化可能抗体は、本明細書中に提供した多重特異的活性化可能抗体は、2つ以上の別個の抗原又はエピトープを認識し、且つ、多重特異的抗体の少なくとも1つの抗原 - 又はエピトープ結合ドメインに連結される少なくとも1つのマスキング部分(MM)を含む多重特異的抗体であり、ここでMMのカップリングが、抗原 - 又はエピトープ - 結合ドメインのその標的を結合する能力を低める。いくつかの実施形態において、MMは、uPA及びマトリプターゼから選択される少なくとも1つのプロテアーゼのための基質として機能する切断可能部分(CM)を介して、多重特異的抗体の抗原 - 又はエピトープ - 結合ドメインにカップリングされる。本明細書において提供される多重特異的活性化可能抗体は、循環において安定し、治療及び/又は診断の意図される部位で活性化されるが、しかし正常な、すなわち健康な組織においては活性化されず、そして活性化される場合、その対応する、修飾されていない多重特異的抗体に、少なくとも匹敵する標的への結合を示す。

20

【0380】

いくつかの実施形態において、多重特異的活性化可能抗体は、また本明細書において免疫エフェクター細胞動員多重特異的活性化可能抗体としても言及される免疫エフェクター細胞を動員するよう企画される。いくつかの実施形態において、多重特異的活性化可能抗体は、また白血病動員多重特異的活性化可能抗体として本明細書において言及される、白血球を動員するよう企画される。いくつかの実施形態において、多重特異的活性化可能抗体は、またT細胞動員多重特異的活性化可能抗体として本明細書において言及される、T細胞を動員するよう企画される。いくつかの実施形態において、多重特異的活性化可能抗体は、白血球、例えばT細胞、ナチュラルキラー(NK)細胞、骨髄単核細胞、マクロファージ、及び/又は別の免疫エフェクター細胞上の表面抗原を動員する。いくつかの実施形態において、免疫エフェクター細胞は、白血球である。いくつかの実施形態において、免疫エフェクター細胞は、T細胞である。いくつかの実施形態において、免疫エフェクター細胞は、NK細胞である。いくつかの実施形態において、免疫エフェクター細胞は、単核細胞、例えば骨髄単核細胞である。いくつかの実施形態において、多重特異的活性化可能抗体は、多抗原標的化抗体及び/又は多抗原標的化、活性化可能抗体としても本明細書において言及される、複数の標的及び/又は複数のエピトープを結合するか、又は他方では、それと反応するよう企画される。本明細書において使用される場合、用語「標的(target)」及び「抗原(antigen)」とは、交換可能的に使用される。

30

40

【0381】

いくつかの実施形態において、本開示の免疫エフェクター細胞動員多重特異的活性化可能抗体は、標的化抗体又はその抗原結合フラグメント、及び免疫エフェクター細胞動員抗体又はその抗原結合部分を含み、ここで標的化抗体又はその抗原結合フラグメント、及び/又は免疫エフェクター細胞動員抗体又はその抗原結合部分の少なくとも1つはマスキングされている。いくつかの実施形態において、免疫エフェクター細胞動員抗体又はその抗

50

原結合フラグメントは、第1免疫エフェクター細胞動員標的を結合する、第1抗体又はその抗原結合フラグメント(A B 1)を含み、ここで前記A B 1はマスキング部分(M M 1)に結合され、結果的に、前記M M 1のカップリングは、前記第1標的を結合するA B 1の能力を低める。いくつかの実施形態において、標的化抗体又はその抗原結合フラグメントは、第2標的を結合する、第2抗体又はその抗原結合フラグメント(A B 2)を含み、ここで前記A B 2はマスキング部分(M M 2)に結合され、結果的に、M M 2のカップリングは、第2標的を結合するA B 2の能力を低める。いくつかの実施形態において、免疫エフェクター細胞動員抗体又はその抗原結合フラグメントは、第1免疫エフェクター細胞動員標的を結合する、第1抗体又はその抗原フラグメント(A B 1)を含み、ここで前記A B 1はマスキング部分(M M 1)に結合され、結果的にM M 1のカップリングは、第1標的を結合するA B 1の能力を低め、そして前記標的化抗体又はその抗原結合フラグメントは、第2標的を結合する、第2抗体又は抗原結合フラグメント(A B 2)を含み、ここで前記A B 2は、マスキング成分(M M 2)に結合され、結果的に、M M 2のカップリングは、第2標的を結合するA B 2の能力を低める。いくつかの実施形態において、非免疫エフェクター細胞動員抗体は、癌標的化抗体である。いくつかの実施形態において、免疫エフェクター細胞動員抗体は、s c F vである。いくつかの実施形態において、標的化抗体(例えば、非免疫細胞エフェクター抗体)は、I g Gであり、そして免疫エフェクター細胞動員抗体はs c F vである。いくつかの実施形態において、免疫エフェクター細胞は白血球である。いくつかの実施形態において、免疫エフェクター細胞は、T細胞である。いくつかの実施形態において、免疫エフェクター細胞は、NK細胞である。いくつかの実施形態において、免疫エフェクター細胞は骨髄単核細胞である。

10

20

## 【0382】

いくつかの実施形態において、本開示のT細胞動員多重特異的活性化可能抗体は、標的化抗体又はその抗原結合フラグメント、及びT細胞動員抗体又はその抗原結合部分を含み、ここで標的化抗体又はその抗原結合フラグメント、及び/又はT細胞動員抗体又はその抗原結合部分の少なくとも1つはマスキングされている。いくつかの実施形態において、T細胞動員抗体又はその抗原結合フラグメントは、第1T細胞動員標的を結合する、第1抗体又はその抗原結合フラグメント(A B 1)を含み、ここで前記A B 1はマスキング部分(M M 1)に結合され、結果的に、前記M M 1のカップリングは、前記第1標的を結合するA B 1の能力を低める。いくつかの実施形態において、標的化抗体又はその抗原結合フラグメントは、第2標的を結合する、第2抗体又はその抗原結合フラグメント(A B 2)を含み、ここで前記A B 2はマスキング部分(M M 2)に結合され、結果的に、M M 2のカップリングは、第2標的を結合するA B 2の能力を低める。いくつかの実施形態において、T細胞動員抗体又はその抗原結合フラグメントは、第1T細胞動員標的を結合する、第1抗体又はその抗原フラグメント(A B 1)を含み、ここで前記A B 1はマスキング部分(M M 1)に結合され、結果的にM M 1のカップリングは、第1標的を結合するA B 1の能力を低め、そして前記標的化抗体又はその抗原結合フラグメントは、第2標的を結合する、第2抗体又は抗原結合フラグメント(A B 2)を含み、ここで前記A B 2は、マスキング成分(M M 2)に結合され、結果的に、M M 2のカップリングは、第2標的を結合するA B 2の能力を低める。

30

40

## 【0383】

いくつかの実施形態において、T細胞動員多重特異的活性化可能抗体は、癌標的化抗体又はその抗原結合フラグメント、及びT細胞動員抗体又はその抗原結合部分を含み、ここで癌標的化抗体又はその抗原結合フラグメント、及び/又はT細胞動員抗体又はその抗原結合部分の少なくとも1つはマスキングされている。いくつかの実施形態において、T細胞動員抗体又はその抗原結合フラグメントは、第1T細胞動員標的を結合する、第1抗体又はその抗原結合フラグメント(A B 1)を含み、ここで前記A B 1はマスキング部分(M M 1)に結合され、結果的に、前記M M 1のカップリングは、前記第1標的を結合するA B 1の能力を低める。いくつかの実施形態において、癌標的化抗体又はその抗原結合フラグメントは、第2標的を結合する、第2抗体又はその抗原結合フラグメント(A B 2)

50



を含み、ここで前記 A B 2 はマスキング部分 ( M M 2 ) に結合され、結果的に、 M M 2 のカップリングは、第 2 癌関連標的を結合する A B 2 の能力を低める。いくつかの実施形態において、 T 細胞動員抗体又はその抗原結合フラグメントは、第 1 T 細胞動員標的を結合する、第 1 抗体又はその抗原フラグメント ( A B 1 ) を含み、ここで前記 A B 1 はマスキング部分 ( M M 1 ) に結合され、結果的に M M 1 のカップリングは、第 1 標的を結合する A B 1 の能力を低め、そして前記癌標的化抗体又はその抗原結合フラグメントは、第 2 癌関連標的を結合する、第 2 抗体又は抗原結合フラグメント ( A B 2 ) を含み、ここで前記 A B 2 は、マスキング成分 ( M M 2 ) に結合され、結果的に、 M M 2 のカップリングは、第 2 癌関連標的を結合する A B 2 の能力を低める。

【 0 3 8 4 】

10

いくつかの実施形態において、 T 細胞動員多重特異的活性化可能抗体は、癌標的化 I g G 抗体又はその抗原結合フラグメント、及び T 細胞動員 s c F v を含み、ここで癌標的化 I g G 抗体又はその抗原結合フラグメント、及び/又は T 細胞動員抗体又はその抗原結合部分の少なくとも 1 つはマスキングされている。いくつかの実施形態において、 T 細胞動員抗体又はその抗原結合フラグメントは、第 1 T 細胞動員標的を結合する、第 1 抗体又はその抗原結合フラグメント ( A B 1 ) を含み、ここで前記 A B 1 はマスキング部分 ( M M 1 ) に結合され、結果的に、前記 M M 1 のカップリングは、前記第 1 標的を結合する A B 1 の能力を低める。いくつかの実施形態において、癌標的化 I g G 抗体又はその抗原結合フラグメントは、第 2 標的を結合する、第 2 抗体又はその抗原結合フラグメント ( A B 2 ) を含み、ここで前記 A B 2 はマスキング部分 ( M M 2 ) に結合され、結果的に、 M M 2 のカップリングは、第 2 癌関連標的を結合する A B 2 の能力を低める。いくつかの実施形態において、 T 細胞動員抗体又はその抗原結合フラグメントは、第 1 T 細胞動員標的を結合する、第 1 抗体又はその抗原フラグメント ( A B 1 ) を含み、ここで前記 A B 1 はマスキング部分 ( M M 1 ) に結合され、結果的に M M 1 のカップリングは、第 1 標的を結合する A B 1 の能力を低め、そして前記癌標的化 I g G 抗体又はその抗原結合フラグメントは、第 2 癌関連標的を結合する、第 2 抗体又は抗原結合フラグメント ( A B 2 ) を含み、ここで前記 A B 2 は、マスキング成分 ( M M 2 ) に結合され、結果的に、 M M 2 のカップリングは、第 2 癌関連標的を結合する A B 2 の能力を低める。

20

【 0 3 8 5 】

免疫エフェクター動員多重特異的活性化可能抗体のいくつかの実施形態において、 1 つの抗原は典型的には、腫瘍細胞、又は疾患に関連する他の細胞型の表面上に存在する抗原、例えば、表 1 に列挙されるに任意の標的、例えば E G G R、 e r b B 2、 E p C A M、 J a g g e d、 P D - L 1、 B 7 H 3 又は C D 7 1 ( トランスフェリン受容体 ) であるが、但しそれらだけには限定されず、そして別の抗原は典型的には、 T 細胞、ナチュラルキラー ( N K ) 細胞、骨髄単核細胞、マクロファージ、及び/又は他の免疫エフェクター細胞の表面上に存在する刺激又は阻害受容体、例えば B 7 - H 4、 B T L A、 C D 3、 C D 4、 C D 8、 C D 1 6 a、 C D 2 5、 C D 2 7、 C D 2 8、 C D 3 2、 C D 5 6、 C D 1 3 7、 C T L A - 4、 G I T R、 H V E M、 I C O S、 L A G 3、 N K G 2 D、 O X 4 0、 P D - 1、 T I G I T、 T I M 3、又は V I S T A であるが、但しそれらだけには限定されない。いくつかの実施形態において、抗原は、 T 細胞又は N K 細胞の表面上に存在する刺激受容体であり；斯かる刺激受容体の例は、 C D 3、 C D 2 7、 C D 2 8、 C D 1 3 7 ( 又は 4 - 1 B B としても言及される )、 G I T R、 H V E M、 I C O S、 N K G 2 D、及び O X 4 0 を包含するが、但しそれらだけには制限されない。いくつかの実施形態において、抗原は、 T 細胞の表面上に存在する阻害受容体であり；斯かる阻害受容体の例は、 B T L A、 C T L A - 4、 L A G 3、 P D - 1、 T I G I T、 T I M 3 及び N K - 発現 K I R を包含するが、但しそれらだけには限定されない。 T 細胞表面抗原に対して特異的を与える抗体エフェクター細胞受容体、例えば B 7 - 1、 B 7 - 2、 B 7 H 3、 P D - L 1、 P D - L 2 又は T N F S F 9 ( 但し、それらだけには限定されない ) に結合する、リガンド又はリガンドドメインにより置換され得る。

30

40

【 0 3 8 6 】

50

本開示の1つの実施形態は、癌微小環境において活性化でき、そして抗体、例えば腫瘍標的及びアゴニスト抗体に向けられるIgG又はscFv、例えば活性化されたT細胞又はNK細胞の表面上で発現される共刺激受容体に向けられるIgG又はscFvを含む多重特異的活性化可能抗体であり、ここで前記癌標的抗体及び/又はアゴニスト抗体の少なくとも1つはマスキングされている。共刺激受容体の例は、CD27、CD137、GITR、HVEM、NKGD2及びOX40を包含するが、但しそれらだけには限定されない。この実施形態において、多重特異的活性化可能抗体は、腫瘍関連プロテアーゼにより活性化されると、任意の腫瘍抗原に応答するT細胞の活性を、それらの内因性T細胞抗原又はNK-活性化受容体を介して増強するために、腫瘍依存性態様でT細胞又はNK細胞発現共刺激受容体を効果的に架橋し、そして活性化するであろう。それらのT細胞又はNK細胞共刺激受容体の活性化-依存性質は、それらの抗原特異的に関係なく、すべてのT細胞を活性化しないで、腫瘍特異的T細胞に、活性化された多重特異的活性化可能抗体の活性の焦点を当てている。1つの実施形態において、多重特異的活性化可能抗体の少なくとも共刺激受容体抗体、多重特異的活性化可能抗体において腫瘍標的指向抗体により認識される抗原をまた発現する組織に存在することができる自己反応性T細胞の活性化を防止するために、マスキングされているが、しかしそれらの活性は、共受容体の動員の欠如により制限されている。

10

#### 【0387】

本開示の1つの実施形態は、T細胞過剰刺激により特徴づけられる疾患、例えば自己免疫疾患又は炎症性疾患の微小環境（但し、それらだけには限定されない）において活性化できる多重特異的活性化可能抗体である。斯かる多重特異的活性化可能抗体は、抗体、例えば自己免疫炎症性疾患においてT細胞により標的化される組織において発現される表面抗原を含む標的に向けられたIgG又はscFv、及び抗体、例えばT細胞又はNK細胞の表面上に発現される阻害受容体に向けられるIgG又はscFvを含み、ここで疾患組織標的抗体及び/又はT細胞受容体抗体の少なくとも1つはマスキングされている。阻害受容体の例は、次のものを包含するが、但しそれらだけには限定されない：BTLA、CTLA-4、LAG3、PD-1、TIGIT、TIM3及びNK-発現KIR。自己免疫疾患におけるT細胞により標的化される組織抗原の例は、次のものを包含するが、但しそれらだけには制限されない：多発性硬化症におけるミエリン又は神経細胞上に発現される表面抗原、又は1型糖尿病における膵島細胞上に発現される表面抗原。この実施形態において、多重特異的活性化可能抗体は、自己免疫攻撃又は炎症下で組織に局在する場合、活性化され、そして任意の疾患組織-標的化抗原に応答する自己反応性T細胞の活性を抑制するために、T細胞又はNK細胞阻害受容体を、それらの内因性TCR又は活性化受容体を介して共同動員する。1つの実施形態において、少なくとも1つの又は複数の抗体が、標的抗原がまた発現され得る非疾患組織におけるT細胞応答の抑制を防ぐために、マスキングされる。

20

30

#### 【0388】

いくつかの実施形態において、T細胞動員多重特異的活性化可能抗体は、抗-CD3イプシロン（CD3、またCD3e及びCD3としても本明細書において言及される）scFv及び標的化抗体又はその抗原結合フラグメントを含み、ここで抗-CD3 scFv及び/又は標的化抗体又はその抗原結合フラグメントの少なくとも1つはマスキングされている。いくつかの実施形態において、前記CD3 scFvは、CD3を結合する、第1抗体又はその抗原結合フラグメント（AB1）を含み、ここで前記AB1はマスキング部分（MM1）に結合され、結果的に、MM1のカップリングは、CD3を結合するAB1の能力を低める。いくつかの実施形態において、前記標的化抗体又はその抗原結合フラグメントは、第2標的を結合する、第2抗体又はその抗原結合フラグメント（AB2）を含む、第2抗体又はそのフラグメントを含み、ここで前記AB2はマスキング部分（MM2）に結合され、結果的に、MM2のカップリングが前記第2標的を結合するAB2の能力を低める。いくつかの実施形態において、前記CD3 scFvは、CD3を結合する、第1抗体又はその抗原結合フラグメント（AB1）を含み、ここで前記A

40

50

B 1 はマスキング部分 ( M M 1 ) に結合され、結果的に、M M 1 のカップリングは、C D 3 を結合する A B 1 の能力を低め、そして前記標的化抗体又はその抗原結合フラグメントは、第 2 標的を結合する、第 2 抗体又はその抗原結合フラグメント ( A B 2 ) を含む、第 2 抗体又はそのフラグメントを含み、ここで前記 A B 2 はマスキング部分 ( M M 2 ) に結合され、結果的に、M M 2 のカップリングが前記第 2 標的を結合する A B 2 の能力を低める。

#### 【 0 3 8 9 】

いくつかの実施形態において、T 細胞動員多重特異的活性化可能抗体は、抗 - C D 3 s c F v 及び癌標的化抗体又はその抗原結合フラグメントを含み、ここで抗 - C D 3 s c F v 及び / 又は癌標的化抗体又はその抗原結合フラグメントの少なくとも 1 つはマスキングされている。いくつかの実施形態において、前記 C D 3 s c F v は、C D 3 を結合する、第 1 抗体又はその抗原結合フラグメント ( A B 1 ) を含む、ここで前記 A B 1 はマスキング部分 ( M M 1 ) に結合され、結果的に、M M 1 のカップリングは、C D 3 を結合する A B 1 の能力を低める。いくつかの実施形態において、前記癌標的化抗体又はその抗原結合フラグメントは、第 2 の癌関連標的を結合する、第 2 抗体又はその抗原結合フラグメント ( A B 2 ) を含む、第 2 抗体又はそのフラグメントを含み、ここで前記 A B 2 はマスキング部分 ( M M 2 ) に結合され、結果的に、M M 2 のカップリングが前記第 2 癌関連標的を結合する A B 2 の能力を低める。いくつかの実施形態において、前記 C D 3 s c F v は、C D 3 を結合する、第 1 抗体又はその抗原結合フラグメント ( A B 1 ) を含む、ここで前記 A B 1 はマスキング部分 ( M M 1 ) に結合され、結果的に、M M 1 のカップリングは、C D 3 を結合する A B 1 の能力を低め、そして前記癌標的化抗体又はその抗原結合フラグメントは、第 2 癌関連標的を結合する、第 2 抗体又はその抗原結合フラグメント ( A B 2 ) を含む、第 2 抗体又はそのフラグメントを含み、ここで前記 A B 2 はマスキング部分 ( M M 2 ) に結合され、結果的に、M M 2 のカップリングが前記第 2 癌関連標的を結合する A B 2 の能力を低める。

#### 【 0 3 9 0 】

いくつかの実施形態において、T 細胞動員多重特異的活性化可能抗体は、抗 - C D 3 s c F v 及び癌標的化 I g G 抗体又はその抗原結合フラグメントを含み、ここで抗 - C D 3 s c F v 及び / 又は癌標的化 I g G 抗体又はその抗原結合フラグメントの少なくとも 1 つはマスキングされている。いくつかの実施形態において、前記 C D 3 s c F v は、C D 3 を結合する、第 1 抗体又はその抗原結合フラグメント ( A B 1 ) を含む、ここで前記 A B 1 はマスキング部分 ( M M 1 ) に結合され、結果的に、M M 1 のカップリングは、C D 3 を結合する A B 1 の能力を低める。いくつかの実施形態において、前記癌標的化 I g G 抗体又はその抗原結合フラグメントは、第 2 の癌関連標的を結合する、第 2 抗体又はその抗原結合フラグメント ( A B 2 ) を含む、第 2 抗体又はそのフラグメントを含み、ここで前記 A B 2 はマスキング部分 ( M M 2 ) に結合され、結果的に、M M 2 のカップリングが前記第 2 癌関連標的を結合する A B 2 の能力を低める。いくつかの実施形態において、前記 C D 3 s c F v は、C D 3 を結合する、第 1 抗体又はその抗原結合フラグメント ( A B 1 ) を含む、ここで前記 A B 1 はマスキング部分 ( M M 1 ) に結合され、結果的に、M M 1 のカップリングは、C D 3 を結合する A B 1 の能力を低め、そして前記癌標的化 I g G 抗体又はその抗原結合フラグメントは、第 2 癌関連標的を結合する、第 2 抗体又はその抗原結合フラグメント ( A B 2 ) を含む、第 2 抗体又はそのフラグメントを含み、ここで前記 A B 2 はマスキング部分 ( M M 2 ) に結合され、結果的に、M M 2 のカップリングが前記第 2 癌関連標的を結合する A B 2 の能力を低める。

#### 【 0 3 9 1 】

いくつかの実施形態において T 細胞動員多重特異的活性化可能抗体は、O K T 3 由来の抗 - C D 3 イプシロン ( C D 3 ) s c F v を含み、ここで標的抗体又はその抗原結合フラグメント及び / 又は O K T 3 s c F v 又は O K T 3 - 由来の s c F v の少なくとも 1 つがマスキングされている。いくつかの実施形態において、前記 O K T 3 s c F v 又は O K T 3 - 由来の s c F v は、C D 3 を結合する、第 1 抗体又はその抗原結合フラグメ

10

20

30

40

50

ント ( A B 1 ) を含み、ここで前記 A B 1 はマスキング部分 ( M M 1 ) に結合され、結果的に、M M 1 のカップリングは、C D 3 を結合する A B 1 の能力を低める。いくつかの実施形態において、前記標的化抗体又はその抗原結合フラグメントは、第 2 標的を結合する、第 2 抗体又はその抗原結合フラグメント ( A B 2 ) を含む、第 2 抗体又はそのフラグメントを含み、ここで前記 A B 2 はマスキング部分 ( M M 2 ) に結合され、結果的に、M M 2 のカップリングが前記第 2 標的を結合する A B 2 の能力を低める。いくつかの実施形態において、前記 O K T 3 s c F v 又は O K T 3 - 由来の s c F v は、C D 3 を結合する、第 1 抗体又はその抗原結合フラグメント ( A B 1 ) を含み、ここで前記 A B 1 はマスキング部分 ( M M 1 ) に結合され、結果的に、M M 1 のカップリングは、C D 3 を結合する A B 1 の能力を低め、そして前記標的化抗体又はその抗原結合フラグメントは、第 2 標的を結合する、第 2 抗体又はその抗原結合フラグメント ( A B 2 ) を含む、第 2 抗体又はそのフラグメントを含み、ここで前記 A B 2 はマスキング部分 ( M M 2 ) に結合され、結果的に、M M 2 のカップリングが前記第 2 標的を結合する A B 2 の能力を低める。

10

#### 【 0 3 9 2 】

いくつかの実施形態において、T細胞動員多重特異的活性化可能抗体は、O K T 3 s c F v 又は O K T 3 - 由来の s c F v 及び癌標的化抗体又はその抗原結合フラグメントを含み、ここで O K T 3 s c F v 又は O K T 3 - 由来の s c F v 及び / 又は癌標的化抗体又はその抗原結合フラグメントの少なくとも 1 つはマスキングされている。いくつかの実施形態において、前記 O K T 3 s c F v 又は O K T 3 - 由来の s c F v は、C D 3 を結合する、第 1 抗体又はその抗原結合フラグメント ( A B 1 ) を含み、ここで前記 A B 1 はマスキング部分 ( M M 1 ) に結合され、結果的に、M M 1 のカップリングは、C D 3 を結合する A B 1 の能力を低める。いくつかの実施形態において、前記癌標的化抗体又はその抗原結合フラグメントは、第 2 の癌関連標的を結合する、第 2 抗体又はその抗原結合フラグメント ( A B 2 ) を含む、第 2 抗体又はそのフラグメントを含み、ここで前記 A B 2 はマスキング部分 ( M M 2 ) に結合され、結果的に、M M 2 のカップリングが前記第 2 癌関連標的を結合する A B 2 の能力を低める。いくつかの実施形態において、前記 O K T 3 s c F v 又は O K T 3 - 由来の s c F v は、C D 3 を結合する、第 1 抗体又はその抗原結合フラグメント ( A B 1 ) を含み、ここで前記 A B 1 はマスキング部分 ( M M 1 ) に結合され、結果的に、M M 1 のカップリングは、C D 3 を結合する A B 1 の能力を低め、そして前記癌標的化抗体又はその抗原結合フラグメントは、第 2 癌関連標的を結合する、第 2 抗体又はその抗原結合フラグメント ( A B 2 ) を含む、第 2 抗体又はそのフラグメントを含み、ここで前記 A B 2 はマスキング部分 ( M M 2 ) に結合され、結果的に、M M 2 のカップリングが前記第 2 癌関連標的を結合する A B 2 の能力を低める。

20

30

#### 【 0 3 9 3 】

いくつかの実施形態において、T細胞動員多重特異的活性化可能抗体は、O K T 3 s c F v 又は O K T 3 - 由来の s c F v 及び癌標的化 I g G 抗体又はその抗原結合フラグメントを含み、ここで O K T 3 s c F v 又は O K T 3 - 由来の s c F v 及び / 又は癌標的化 I g G 抗体又はその抗原結合フラグメントの少なくとも 1 つはマスキングされている。いくつかの実施形態において、前記 O K T 3 s c F v 又は O K T 3 - 由来の s c F v は、C D 3 を結合する、第 1 抗体又はその抗原結合フラグメント ( A B 1 ) を含み、ここで前記 A B 1 はマスキング部分 ( M M 1 ) に結合され、結果的に、M M 1 のカップリングは、C D 3 を結合する A B 1 の能力を低める。いくつかの実施形態において、前記癌標的化 I g G 抗体又はその抗原結合フラグメントは、第 2 の癌関連標的を結合する、第 2 抗体又はその抗原結合フラグメント ( A B 2 ) を含む、第 2 抗体又はそのフラグメントを含み、ここで前記 A B 2 はマスキング部分 ( M M 2 ) に結合され、結果的に、M M 2 のカップリングが前記第 2 癌関連標的を結合する A B 2 の能力を低める。いくつかの実施形態において、前記 O K T 3 s c F v 又は O K T 3 - 由来の s c F v は、C D 3 を結合する、第 1 抗体又はその抗原結合フラグメント ( A B 1 ) を含み、ここで前記 A B 1 はマスキング部分 ( M M 1 ) に結合され、結果的に、M M 1 のカップリングは、C D 3 を結合する A B 1 の能力を低め、そして前記癌標的化 I g G 抗体又はその抗原結合フラグメントは

40

50

、第2癌関連標的を結合する、第2抗体又はその抗原結合フラグメント(AB2)を含む、第2抗体又はそのフラグメントを含み、ここで前記AB2はマスキング部分(MM2)に結合され、結果的に、MM2のカップリングが前記第2癌関連標的を結合するAB2の能力を低める。

【0394】

いくつかの実施形態においてT細胞動員多重特異的活性化可能抗体は、抗-CTLA-4 s c F vを含み、ここで標的抗体又はその抗原結合フラグメント及び/又は抗-CTLA-4 s c F vの少なくとも1つがマスキングされている。いくつかの実施形態において、前記抗-CTLA-4 s c F vは、CTLA-4を結合する、第1抗体又はその抗原結合フラグメント(AB1)を含み、ここで前記AB1はマスキング部分(MM1)に結合され、結果的に、MM1のカップリングは、CTLA-4を結合するAB1の能力を低める。いくつかの実施形態において、前記標的化抗体又はその抗原結合フラグメントは、第2標的を結合する、第2抗体又はその抗原結合フラグメント(AB2)を含む、第2抗体又はそのフラグメントを含み、ここで前記AB2はマスキング部分(MM2)に結合され、結果的に、MM2のカップリングが前記第2標的を結合するAB2の能力を低める。いくつかの実施形態において、前記抗-CTLA-4 s c F vは、CTLA-4を結合する、第1抗体又はその抗原結合フラグメント(AB1)を含み、ここで前記AB1はマスキング部分(MM1)に結合され、結果的に、MM1のカップリングは、CTLA-4を結合するAB1の能力を低め、そして前記標的化抗体又はその抗原結合フラグメントは、第2標的を結合する、第2抗体又はその抗原結合フラグメント(AB2)を含む、第2抗体又はそのフラグメントを含み、ここで前記AB2はマスキング部分(MM2)に結合され、結果的に、MM2のカップリングが前記第2標的を結合するAB2の能力を低める。

【0395】

いくつかの実施形態において、T細胞動員多重特異的活性化可能抗体は、抗-CTLA-4 s c F v、及び標的化IgG抗体又はその抗原結合フラグメントを含み、ここで抗-CTLA-4 s c F v及び/又は標的IgG抗体又はその抗原結合部分の少なくとも1つはマスキングされている。いくつかの実施形態において、前記抗-CTLA-4 s c F vは、CTLA-4を結合する、第1抗体又はその抗原結合フラグメント(AB1)を含み、ここで前記AB1はマスキング部分(MM1)に結合され、結果的に、MM1のカップリングは、CTLA-4を結合するAB1の能力を低める。いくつかの実施形態において、前記標的化IgG抗体又はその抗原結合フラグメントは、第2標的を結合する、第2抗体又はその抗原結合フラグメント(AB2)を含む、第2抗体又はそのフラグメントを含み、ここで前記AB2はマスキング部分(MM2)に結合され、結果的に、MM2のカップリングが前記第2標的を結合するAB2の能力を低める。いくつかの実施形態において、前記抗-CTLA-4 s c F vは、CTLA-4を結合する、第1抗体又はその抗原結合フラグメント(AB1)を含み、ここで前記AB1はマスキング部分(MM1)に結合され、結果的に、MM1のカップリングは、CTLA-4を結合するAB1の能力を低め、そして前記標的化IgG抗体又はその抗原結合フラグメントは、第2標的を結合する、第2抗体又はその抗原結合フラグメント(AB2)を含む、第2抗体又はそのフラグメントを含み、ここで前記AB2はマスキング部分(MM2)に結合され、結果的に、MM2のカップリングが前記第2標的を結合するAB2の能力を低める。

【0396】

いくつかの実施形態において、多重抗原標的化抗体及び/又は多重抗原標的化活性化可能抗体は、第1標的及び/又は第1エピトープを結合する、第1抗体又はその抗原結合フラグメント、及び第2標的及び/又は第2エピトープを結合する、第2抗体又はその抗原結合フラグメントを少なくとも含む。いくつかの実施形態において、多重抗原標的化抗体及び/又は多重抗原標的化活性化可能抗体は、複数の異なった標的を結合する。いくつかの実施形態において、多重抗原標的化抗体及び/又は多重抗原標的化活性化可能抗体は、同じ標的上の複数の異なったエピトープを結合する。いくつかの実施形態において、多重

10

20

30

40

50

抗原標的化抗体及び／又は多重抗原標的化活性化可能抗体は、複数の異なった標的及び同じ標的上の複数の異なったエピトープの組合せを結合する。

【 0 3 9 7 】

いくつかの実施形態において、I g Gを含む多重特異的活性化可能抗体は、マスキングされたI g G可能ドメインを有する。いくつかの実施形態において、s c F vを含む多重特異的活性化可能抗体は、マスキングされたs c F vドメインを有する。いくつかの実施形態において、多重特異的活性化可能抗体は、I g G可変ドメイン及びs c F vドメインの両者を有し、ここでI g G可変ドメインの少なくとも1つは、マスキングのブ部にカップリングされる。いくつかの実施形態において、多重特異的活性化可能抗体は、I g G可変ドメイン及びs c F vドメインの両者を有し、ここでs c F vドメインの少なくとも1つはマスキング部分にカップリングされる。いくつかの実施形態において、多重特異的活性化可能抗体は、I g G可変ドメイン及びs c F vドメインの両者を有し、ここでI g G可変ドメインの少なくとも1つは、マスキング部分にカップリングされ、そしてs c F vドメインの少なくとも1つはマスキング部分にカップリングされる。いくつかの実施形態において、多重特異的活性化可能抗体は、I g G可変ドメイン及びs c F vドメインの両者を有し、ここでI g G可変ドメイン及びs c F vドメインの個々は、それ自体のマスキング部分にカップリングされる。いくつかの実施形態において、多重特異的活性化可能抗体の1つの抗体ドメインは、標的抗原に対する特異的を有し、そして別の抗体ドメインは、T細胞表面抗原に対する特異的を有する。いくつかの実施形態において、多重特異的活性化可能抗体の1つの抗体ドメインは、標的抗原に対する特異的を有し、そして別の抗体ドメインは、別の標的抗原に対する特異的を有する。いくつかの実施形態において、多重特異的活性化可能抗体の1つの抗体ドメインは、標的抗原のエピトープに対する特異的を有し、そして別の抗体ドメインは、標的抗原の別のエピトープに対する特異的を有する。

【 0 3 9 8 】

多重特異的活性化可能抗体においては、s c F vは、I g G活性化可能抗体のH鎖のカルボキシル末端に、I g G活性化可能抗体のL鎖のカルボキシル末端、又はI g G活性化可能抗体のH鎖及びL鎖の両鎖のカルボキシル末端に融合され得る。多重特異的活性化可能抗体においては、s c F vは、I g G活性化可能抗体のH鎖のアミノ末端に、I g G活性化可能抗体のL鎖のアミノ末端に、又はI g G活性化可能抗体のH鎖及びL鎖の両鎖のアミノ末端に融合され得る。多重特異的活性化可能抗体においては、s c F vは、I g G活性化可能抗体の1又は2以上のカルボキシル末端及び1又は2以上のアミノ末端のいずれかの組合せに融合され得る。いくつかの実施形態において、切断可能部分(CM)に連結されるマスキング部分(MM)は、I g Gの抗原結合ドメインに結合され、そしてそのドメインをマスキングする。いくつかの実施形態において、切断可能部分(CM)に連結されるマスキング部分(MM)は、少なくとも1つのs c F vの抗原結合ドメインに結合され、そしてそのドメインをマスキングする。いくつかの実施形態において、切断可能部分(CM)に連結されるマスキング部分(MM)は、I g Gの抗原結合ドメインに連結され、そしてそのドメインをマスキングし、そして切断可能部分(CM)に連結されるマスキング部分(MM)は、少なくとも1つのs c F vの抗原結合ドメインに結合され、そしてそのドメインをマスキングする。

【 0 3 9 9 】

本開示は、以下のもの(但し、それらだけには限定されない)を含む多重特異的活性化可能抗体構造の例を提供し：

(VL-CL)<sub>2</sub>:(VH-CH1-CH2-CH3-L4-VH\*-L3-VL\*-L2-CM-L1-MM)<sub>2</sub>; (VL-CL)<sub>2</sub>:(VH-CH1-CH2-CH3-L4-VL\*-L3-VH\*-L2-CM-L1-MM)<sub>2</sub>; (MM-L1-CM-L2-VL-CL)<sub>2</sub>:(VH-CH1-CH2-CH3-L4-VH\*-L3-VL\*)<sub>2</sub>; (MM-L1-CM-L2-VL-CL)<sub>2</sub>:(VH-CH1-CH2-CH3-L4-VL\*-L3-VH\*)<sub>2</sub>; (VL-CL)<sub>2</sub>:(MM-L1-CM-L2-VL\*-L3-VH\*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)<sub>2</sub>; (VL-CL)<sub>2</sub>:(MM-L1-CM-L2-VH\*-L3-VL\*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)<sub>2</sub>; (MM-L1-CM-L2-VL-CL)<sub>2</sub>:(VL\*-L3-VH\*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)<sub>2</sub>; (MM-L1-CM-L2-VL-CL)<sub>2</sub>:(VH\*-L3-VL\*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)<sub>2</sub>; (VL-CL-L4-VH\*-L3-VL\*-L2-CM-L1-MM)<sub>2</sub>:(VH-CH1-CH2-CH3)<sub>2</sub>; (VL-CL-L4-VL\*-L3-VH\*-L2-CM-L1-MM)<sub>2</sub>:(VH-CH1-CH2-CH3)<sub>2</sub>; (MM-L1-CM-L2-VL\*-L3-

$VH^*-L4-VL-CL)_2:(VH-CH1-CH2-CH3)_2$ ;  $(MM-L1-CM-L2-VH^*-L3-VL^*-L4-VL-CL)_2:(VH-CH1-CH2-CH3)_2$ ;  $(VL-CL-L4-VH^*-L3-VL^*-L2-CM-L1-MM)_2:(MM-L1-CM-L2-VL^*-L3-VH^*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)_2$ ;  $(VL-CL-L4-VH^*-L3-VL^*-L2-CM-L1-MM)_2:(MM-L1-CM-L2-VH^*-L3-VL^*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)_2$ ;  $(VL-CL-L4-VL^*-L3-VH^*-L2-CM-L1-MM)_2:(MM-L1-CM-L2-VL^*-L3-VH^*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)_2$ ;  $(VL-CL-L4-VH^*-L3-VL^*)_2:(MM-L1-CM-L2-VL^*-L3-VH^*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)_2$ ;  $(VL-CL-L4-VH^*-L3-VL^*)_2:(MM-L1-CM-L2-VH^*-L3-VL^*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)_2$ ;  $(VL-CL-L4-VL^*-L3-VH^*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)_2$ ;  $(VL-CL-L4-VL^*-L3-VH^*-L2-CM-L1-MM)_2:(VH^*-L3-VL^*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)_2$ ;  $(VL-CL-L4-VH^*-L3-VL^*-L2-CM-L1-MM)_2:(VH^*-L3-VL^*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)_2$ ;  $(VL-CL-L4-VL^*-L3-VH^*-L2-CM-L1-MM)_2:(VH^*-L3-VL^*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)_2$ ; 又は  $(VL-CL-L4-VL^*-L3-VH^*-L2-CM-L1-MM)_2:(VH^*-L3-VL^*-L4-VH-CH1-CH2-CH3)_2$ 、ここで  $V L$  及び  $V H$  は、 $I g G$  に含まれる、第 1 特異的の  $L$  及び  $H$  可変ドメインを表し;  $V L^*$  及び  $V H^*$  は、 $s c F v$  に含まれる、第 2 特異的の可変ドメインを表し;  $L 1$  は、マスキング部分 ( $M M$ ) 及び切断可能部分 ( $C M$ ) を連結するリンカーペプチドであり;  $L 2$  は、切断可能部分 ( $C M$ ) 及び抗体を連結するリンカーペプチドであり;  $L 3$  は、 $s c F v$  の可変ドメインを連結するリンカーペプチドであり;  $L 4$  は、第 2 特異的の抗体に、第 1 特異的の抗体を有するリンカーペプチドであり;  $C L$  は、 $L$  鎖不変ドメインであり; そして  $C H 1$ 、 $C H 2$ 、 $C H 3$  は、 $H$  鎖不変ドメインである。前記第 1 及び第 2 特異的は、いずれかの抗原又はエピトープに対して存在することができる。

#### 【0400】

T 細胞動員多重特異的活性化可能抗体のいくつかの実施形態において、1 つの抗原は典型的には、腫瘍細胞又は疾患に関連する他の細胞型の表面上に存在する抗原、例えば表 1 に列挙されるいずれかの標的 (但し、それらだけには限定されない)、例えば  $E G F R$ 、 $e r b B 2$ 、 $E p C A M$ 、 $J a g g e d$ 、 $P D-L 1$ 、 $B 7 H 3$  又は  $C D 7 1$  (トランスフェリン受容体) (但し、それらだけには制限されない) であり、そして別の抗原は典型的には、T 細胞、ナチュラルキラー (NK) 細胞、骨髄単核細胞、マクロファージ及び / 又は他の免疫エフェクター細胞の表面上に存在する刺激 (また、本明細書においては、活性化として言及される) 又は阻害受容体、たとえば  $B 7-H 4$ 、 $B T L A$ 、 $C D 3$ 、 $C D 4$ 、 $C D 8$ 、 $C D 1 6 a$ 、 $C D 2 5$ 、 $C D 2 7$ 、 $C D 2 8$ 、 $C D 3 2$ 、 $C D 5 6$ 、 $C D 1 3 7$  (または、 $T N F R S F 9$  としても言及される)、 $C T L A-4$ 、 $G I T R$ 、 $H V E M$ 、 $I C O S$ 、 $L A G 3$ 、 $N K G 2 D$ 、 $O X 4 0$ 、 $P D-1$ 、 $T I G I T$ 、 $T I M 3$ 、又は  $V I S T A$  (但し、それらだけには制限されない) である。T 細胞表面抗原に対して特異的を提供する抗体ドメインはまた、T 細胞受容体、NK-細胞受容体、マクロファージ受容体及び / 又は他の免疫エフェクター細胞受容体、例えば  $B 7-1$ 、 $B 7-2$ 、 $B 7 H 3$ 、 $P D-L 1$ 、 $P D-L 2$  又は  $T N F S F 9$  (但し、それらだけには制限されない) に結合するリガンド又はリガンドドメインにより置換され得る。多重抗原標的化活性化可能抗原のいくつかの実施形態において、1 つの抗原は、表 1 に列挙される標的群から選択され、そして別の抗原は、表 1 に列挙される標的群から選択される。

#### 【0401】

いくつかの実施形態において、標的化抗原は、抗- $E G F R$  抗体である。いくつかの実施形態において、標的化抗体は、 $E G F R$  への結合に対して特異的である  $C 2 2 5 v 5$  である。いくつかの実施形態において、標的化抗体は、 $E G F R$  への結合に対して特異的である  $C 2 2 5$  である。いくつかの実施形態において、標的化抗体は、 $E G F R$  への結合に対して特異的である  $C 2 2 5 v 4$  である。いくつかの実施形態において、標的化抗体は、 $E G F R$  への結合に対して特異的である  $C 2 2 5 v 6$  である。いくつかの実施形態において、標的化抗体は、抗- $J a g g e d$  抗体である。いくつかの実施形態において、標的化抗体は、ヒト及びマウス  $J a g g e d 1$  及び  $J a g g e d 2$  への結合に対して特異的である  $4 D 1 1$  である。いくつかの実施形態において、標的化抗体は、ヒト及びマウス  $J a g g e d 1$  及び  $J a g g e d 2$  への結合に対して特異的である  $4 D 1 1 v 2$  である。

## 【 0 4 0 2 】

いくつかの実施形態において、標的化抗体は、活性化可能抗体の形で存在することができる。いくつかの実施形態において、s c F v は、プロ - s c F v の形で存在することができる（例えば、国際公開第 2 0 0 9 / 0 2 5 8 4 6 号、国際公開第 2 0 1 0 / 0 8 1 1 7 3 号を参照のこと）。

## 【 0 4 0 3 】

いくつかの実施形態において、s c F v は、C D 3 の結合に対して特異的であり、そして C D 3 、例えば C H 2 5 2 7、F N 1 8、H 2 C、O K T 3、2 C 1 1、U C H T 1 又は V 9 を結合する、抗体又はそのフラグメントであるか、又はそれに由来する。いくつかの実施形態において、s c F v は、C T L A - 4（また、本明細書においては、C T L A 及び C T L A 4 としても言及される）の結合に対して特異的である。

10

## 【 0 4 0 4 】

いくつかの実施形態において、抗 C T L A 4 s c F v は、以下のアミノ酸配列を含んでいる：

GGGSGGGSGSGGGSGGGSGGGG I V L T Q S P G T L S L S P G E R A T L S C R A S Q S V S S S Y L A W Y Q Q K P G Q A P R L L I Y G A S S R A T  
G I P D R F S G S G S G T D F T L T I S R L E P E D F A V Y Y C Q Q Y G S S P L T F G G G T K V E I K R S G G S T I T S Y N V Y Y T K L S S S G T Q V Q L V Q T  
G G G V V Q P G R S L R L S C A A S G S T F S S Y A M S W V R Q A P G K L E W V S A I S G S G G S T Y Y A D S V K G R F T I S R D N S K N T L Y L Q M N S L R  
A E D T A V Y Y C A T N S L Y W Y F D L W G R G T L V T V S S A S （配列番号 6 9 2）

## 【 0 4 0 5 】

いくつかの実施形態において、抗 C T L A 4 s c F v は、配列番号 6 9 2 のアミノ酸配列と少なくとも 9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 % 又はそれ以上同一であるアミノ酸配列を含んでいる。

20

## 【 0 4 0 6 】

いくつかの実施形態において、抗 C D 3 s c F v は、以下のアミノ酸配列を含んでいる：

GGGSGGGSGSGGGSGGGSGGGG Q V L Q Q S G A E L A R P G A S V K M S C K A S G Y T F T R Y T M H W V K Q R P G Q G L E W I G Y I N P S R G Y  
T N Y N Q K F K D K A T L T T D K S S T A Y M Q L S S L T S E D S A V Y Y C A R Y Y D D H Y C L D Y W G Q G T T L T V S S G G G S G G G S G G G S Q I V  
L T Q S P A I M S A S P G E K V T M T C S A S S V S Y M N W Y Q Q K S G T S P K R W I Y D T S K L A S G V P A H F R G S G S G T S Y S L T I S G M E A E D A A  
T Y Y C Q Q W S S N P F T F G S G T K L E I N R （配列番号 6 9 3）

## 【 0 4 0 7 】

いくつかの実施形態において、抗 C D 3 s c F v は、配列番号 6 9 3 のアミノ酸配列と少なくとも 9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 % 又はそれ以上同一のアミノ酸配列を含んでいる。

30

## 【 0 4 0 8 】

いくつかの実施形態において、s c F v は、1 又は 2 以下の T 細胞、1 又は 2 以上の N K - 細胞及び / 又は 1 又は 2 以上のマクロファージの結合に対して特異的である。いくつかの実施形態において、s c F v は、B 7 - H 4、B T L A、C D 3、C D 4、C D 8、C D 1 6 a、C D 2 5、C D 2 7、C D 2 8、C D 3 2、C D 5 6、C D 1 3 7、C T L A - 4、G I T R、H V E M、I C O S、L A G 3、N K G 2 D、O X 4 0、P D - 1、T I G I T、T I M 3、又は V I S T A から成る群から選択される標的の結合に対して特異的である。

40

## 【 0 4 0 9 】

いくつかの実施形態において、多重特異的活性化可能抗体はまた、A B に接合される剤も含む。いくつかの実施形態において、前記剤は、抗腫瘍である。いくつかの実施形態において、前記剤は、毒素又はその断片である。いくつかの実施形態において、剤はリンカーを介して多重特異的活性化可能抗体に結合される。いくつかの実施形態において、剤は切断可能なリンカーを介して A B に結合される。いくつかの実施形態において、剤は少なくとも 1 つの u P A 切断可能基質配列又は少なくとも 1 つのマトリプターゼ切断可能基質配列を含んでいるリンカーを介して A B に結合される。いくつかの実施形態において、前記リンカーは、非切断性リンカーである。いくつかの実施形態において、前記剤は微小管

50



阻害剤である。いくつかの実施形態において、前記剤は、核酸損傷剤、例えばDNAアルキル化剤、又はDNAインターカレーター、又は他のDNA損傷剤である。いくつかの実施形態において、前記リンカーは、切断可能リンカーである。いくつかの実施形態において、前記剤は、表4に列挙される群から選択される剤である。いくつかの実施形態において、前記剤は、トラスタチンである。いくつかの実施形態において、前記剤は、アウリスタチン又はその誘導体である。いくつかの実施形態において、前記剤は、アウリスタチンE又はその誘導体である。いくつかの実施形態において、前記剤は、モノメチルアウリスタチンE(MMAE)である。いくつかの実施形態において、前記剤は、モノメチルアウリスタチンD(MMAD)である。いくつかの実施形態において、前記剤は、メイタンシノイド又はマイタンシノイド誘導体である。いくつかの実施形態において、前記剤は、DM1又はDM4である。いくつかの実施形態において、前記剤は、デュオカルマイシン又はその誘導体である。いくつかの実施形態において、前記剤は、カリケアマイシン又はその誘導体である。いくつかの実施形態において前記剤は、ピロロベンゾジアゼピンである。

10

#### 【0410】

いくつかの実施形態において、多重特異的活性化可能抗体はまた、検出可能部分も含むことができる。いくつかの実施形態において、前記検出可能部分は、診断剤である。

#### 【0411】

いくつかの実施形態において、多重特異的活性化可能抗体は、天然において、1又は2以上のジスルフィド結合を含む。いくつかの実施形態において、多重特異的活性化可能抗体は、1又は2以上のジスルフィド結合を含むよう操作され得る。

20

#### 【0412】

本開示はまた、本明細書に記載される多重特異的活性化可能抗体をコードする単離核酸分子、及びそれらの単離核酸配列を含むベクターを提供する。本開示は、活性化可能抗体の発現を導く条件下で、斯かる核酸分子を含む細胞を培養することによる、多重特異的活性化可能抗体の生成方法を提供する。いくつかの実施形態において、前記細胞は、斯かるベクターを含む。

#### 【0413】

本開示はまた、本開示の多重特異的活性化可能抗体を製造する方法であって、(a)多重特異的活性化可能抗体の発現につながる条件下、多重特異的活性化可能抗体をコードする核酸構築物を含む細胞を培養し、そして(b)多重特異的活性化可能抗体を回収することによる方法も提供する。

30

#### 【0414】

本開示はまた、第1標的又は第1エピトープを特異的に結合する、第1抗体又はその抗原結合フラグメント(AB1)、及び第2標的又は第2エピトープを結合する、第2抗体又はその抗原結合フラグメント(AB2)を少なくとも含む多重特異的活性化可能抗体組成物も提供し、ここで少なくともAB1がマスキング部分(MM1)にカップリングされるか、又は他方では、結合され、結果的に、MM1のカップリングが、AB1のその標的を結合する能力を低める。いくつかの実施形態において、MM1は、プロテアーゼ、例えば対象における治療部位又は診断部位でAB1の標的と共局在するプロテアーゼのための基質を含む第1切断可能部分(CM1)配列を介してAB1にカップリングされる。本明細書において提供される多重特異的活性化可能抗体は、循環において安定し、治療及び/又は診断の意図される部位で活性化されるが、しかし正常、すなわち健康組織において活性化されず、そして活性化される場合、その対応する修飾されていない多重特異的抗体に少なくとも匹敵するAB1の標的への結合を示す。

40

#### 【0415】

いくつかの実施形態において、多重特異的活性化可能抗体は、MM1とCM1との間に連結ペプチドを含む。

#### 【0416】

いくつかの実施形態において、多重特異的活性化可能抗体は、CM1とAB1との間に

50

連結ペプチドを含む。

【0417】

いくつかの実施形態において、活性化可能抗体は、第1連結ペプチド(LP1)及び第2連結ペプチド(LP2)を含み、そして多重特異的活性化可能抗体の少なくとも一部が、切断されていない状態で次のようなN-末端からC-末端への構造配置を有する: MM1-LP1-CM1-LP2-AB1又はAB1-LP2-CM1-LP1-MM1。いくつかの実施形態において、前記2つの連結ペプチドはお互い同一である必要はない。

【0418】

いくつかの実施形態において、LP1又はLP2の少なくとも1つは、(GS)<sub>n</sub>、(GGS)<sub>n</sub>、(GSGGS)<sub>n</sub>(配列番号385)及び(GGGGS)<sub>n</sub>(配列番号386)(<sub>n</sub>は少なくとも1つの整数である)から成る群から選択されるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態において、LP1又はLP2の少なくとも1つは、GSGG(配列番号387)、GSGGG(配列番号388)、GSGSG(配列番号389)、GSGGG(配列番号390)、GGGSG(配列番号391)、及びGSSSG(配列番号392)から成る群から選択されるアミノ酸配列を含む。

10

【0419】

いくつかの実施形態において、多重特異的活性化可能抗体は、第1標的又は第1エピトープを特異的に結合する、第1抗体又はその抗原結合フラグメント(AB1)、及び第2標的又は第2エピトープを特異的に結合する、第2抗体又はその抗体結合フラグメント(AB2)を少なくとも含む。いくつかの実施形態において、多重特異的活性化可能抗体における各ABは、モノクローナル抗体、ドメイン、抗体、一本鎖、Fabフラグメント、F(ab')<sub>2</sub>フラグメント、scFv、scAb、dAb、単ドメインH鎖抗体、及び単ドメインL鎖抗体から成る群から独立して選択される。いくつかの実施形態において、多重特異的活性化可能抗体における各ABは、齧歯類(例えば、マウス又はラット)、キメラ性、ヒト化又は完全ヒトモノクローナル抗体である。

20

【0420】

いくつかの実施形態において、多重特異的活性化可能抗体における各ABは、その対応する標的又はエピトープに結合するために、約100nM又はそれ以下の平衡解離定数を有する。

【0421】

30

いくつかの実施形態において、MM1は、ABのその対応する標的又はエピトープへの結合のための平衡解離定数よりも高い、その対応するABへの結合のための平衡解離定数を有する。

【0422】

いくつかの実施形態において、MM1は、ABのその対応する標的又はエピトープへの結合のための平衡解離定数に過ぎない、その対応するABへの結合のための平衡解離定数を有する。

【0423】

いくつかの実施形態において、MM1は、多重特異的活性化可能抗体が切断された状態で存在する場合、その対応する標的又はエピトープに結合するために、その対応するABを阻止しないか、又はそれと競争しない。

40

【0424】

いくつかの実施形態において、MM1は、約2~40個の長さのアミノ酸のポリペプチドである。いくつかの実施形態において、多重特異的活性化可能抗体における各MMは、40個以下の長さのアミノ酸のポリペプチドである。

【0425】

いくつかの実施形態において、MM1は、その対応するABの標的の配列とは異なるポリペプチド配列を有する。

【0426】

いくつかの実施形態において、MM1は、その対応するABの任意の天然結合パートナー

50

ーに対して50%以下、同一であるポリペプチド配列を有する。いくつかの実施形態において、MM1は、その対応するABの任意の天然結合パートナーに対して25%以下、同一であるポリペプチド配列を有する。いくつかの実施形態において、MM1は、その対応するABの任意の天然結合パートナーに対して10%以下、同一であるポリペプチド配列を有する。

【0427】

いくつかの実施形態において、MM1のカップリングは、その対応するABのその標的又はエピトープへの結合の能力を低め、結果的に、その対応する標的又はエピトープに向かってMM1にカップリングされる場合、ABの解離定数( $K_d$ )は、その対応する標的又はエピトープに向かってMM1にカップリングされない場合のABの $K_d$ よりも少なくとも20倍、高い。

10

【0428】

いくつかの実施形態において、MM1のカップリングは、その対応するABのその標的又はエピトープへの結合の能力を低め、結果的に、その対応する標的又はエピトープに向かってMM1にカップリングされる場合、ABの解離定数( $K_d$ )は、その対応する標的又はエピトープに向かってMM1にカップリングされない場合のABの $K_d$ よりも少なくとも40倍、高い。

【0429】

いくつかの実施形態において、MM1のカップリングは、その対応するABのその標的又はエピトープへの結合の能力を低め、結果的に、その対応する標的又はエピトープに向かってMM1にカップリングされる場合、ABの解離定数( $K_d$ )は、その対応する標的又はエピトープに向かってMM1にカップリングされない場合のABの $K_d$ よりも少なくとも100倍、高い。

20

【0430】

いくつかの実施形態において、MM1のカップリングは、その対応するABのその標的又はエピトープへの結合の能力を低め、結果的に、その対応する標的又はエピトープに向かってMM1にカップリングされる場合、ABの解離定数( $K_d$ )は、その対応する標的又はエピトープに向かってMM1にカップリングされない場合のABの $K_d$ よりも少なくとも1000倍、高い。

【0431】

30

いくつかの実施形態において、MM1のカップリングは、その対応するABのその標的又はエピトープへの結合の能力を低め、結果的に、その対応する標的又はエピトープに向かってMM1にカップリングされる場合、ABの解離定数( $K_d$ )は、その対応する標的又はエピトープに向かってMM1にカップリングされない場合のABの $K_d$ よりも少なくとも10,000倍、高い。

【0432】

いくつかの実施形態において、MM1は、本明細書中に提示した実施例に示したMMから選択されるアミノ酸配列である。

【0433】

いくつかの実施形態において、多重特異的活性化可能抗体は、その多重特異的活性化可能抗体が切断されていない状態にある場合、AB2のその標的への結合を阻害する、第2マスキング部分(MM2)、及び第2プロテアーゼのための基質として機能する、AB2にカップリングされる第2切断可能部分(CM2)を少なくとも含む。いくつかの実施形態において、CM2は、長さが15アミノ酸以下のポリペプチドである。いくつかの実施形態において、前記第2プロテアーゼは、組織において第2標的又はエピトープと共局在し、そして第2プロテアーゼは、多重特異的活性化可能抗体が第2プロテアーゼに暴露される場合、多重特異的活性化可能抗体におけるCM2を切断する。いくつかの実施形態において、第1プロテアーゼ及び第2プロテアーゼは、組織において、第1標的又はエピトープ及び第2標的又はエピトープと共局在する。いくつかの実施形態において、第1プロテアーゼ及び第2プロテアーゼは、同じプロテアーゼである。いくつかの実施形態におい

40

50

て、C M 1 及び C M 2 は、同じプロテアーゼのための異なった基質である。いくつかの実施形態において、プロテアーゼは、表 7 に示されるそれらから成る群から選択される。いくつかの実施形態において、第 1 プロテアーゼ及び第 2 プロテアーゼは、異なったプロテアーゼである。いくつかの実施形態において、第 1 プロテアーゼ及び第 2 プロテアーゼは、表 7 に示されるそれらから成る群から選択される異なったプロテアーゼである。

【 0 4 3 4 】

いくつかの実施形態において、多重特異的活性化可能抗体における各 M M、例えば M M 1 及び少なくとも M M 2 は、A B のその対応する標的又はエピトープに結合するための平衡解離定数よりも高い、その対応する A B に結合するための平衡解離定数を有する。

【 0 4 3 5 】

いくつかの実施形態において、多重特異的活性化可能抗体における各 M M、例えば M M 1 及び少なくとも M M 2 は、A B のその対応する標的又はエピトープに結合するための平衡解離定数以下である、その対応する A B に結合するための平衡解離定数を有する。

【 0 4 3 6 】

いくつかの実施形態において、多重特異的活性化可能抗体における各 M M は、多重特異的活性化可能抗体が切断された状態にある場合、対応する標的又はエピトープに結合するためにその対応する A B を妨げないか、又はそれと競争しない。

【 0 4 3 7 】

いくつかの実施形態において、多重特異的活性化可能抗体における各 M M は、約 2 - 4 0 個の長さのアミノ酸のポリペプチドである。いくつかの実施形態において、多重特異的活性化可能抗体における各 M M は 4 0 個以下の長さのアミノ酸のポリペプチドである。

【 0 4 3 8 】

いくつかの実施形態において、多重特異的活性化可能抗体における各 M M は、対応する A B の標的の配列とは異なるポリペプチド配列を有する。

【 0 4 3 9 】

いくつかの実施形態において、多重特異的活性化可能抗体における各 M M は、その対応する A B の任意の天然の結合パートナーに対して 5 0 % 同一に過ぎないポリペプチド配列を有する。いくつかの実施形態において、多重特異的活性化可能抗体における各 M M は、その対応する A B の任意の天然の結合パートナーに対して 2 5 % 同一に過ぎないポリペプチド配列を有する。いくつかの実施形態において、多重特異的活性化可能抗体における各 M M は、その対応する A B の任意の天然の結合パートナーに対して 1 0 % 同一に過ぎないポリペプチド配列を有する。

【 0 4 4 0 】

いくつかの実施形態において、各 M M のカップリングは、その対応する A B のその標的又はエピトープを結合する能力を低め、結果的に、その対応する標的又はエピトープに向かって M M にカップリングされる場合、A B の解離定数 ( $K_d$ ) は、その対応する標的又はエピトープに向かって M M にカップされない場合の A B の  $K_d$  よりも少なくとも 2 0 倍、高い。

【 0 4 4 1 】

いくつかの実施形態において、各 M M のカップリングは、その対応する A B のその標的又はエピトープを結合する能力を低め、結果的に、その対応する標的又はエピトープに向かって M M にカップリングされる場合、A B の解離定数 ( $K_d$ ) は、その対応する標的又はエピトープに向かって M M にカップされない場合の A B の  $K_d$  よりも少なくとも 4 0 倍、高い。

【 0 4 4 2 】

いくつかの実施形態において、各 M M のカップリングは、その対応する A B のその標的又はエピトープを結合する能力を低め、結果的に、その対応する標的又はエピトープに向かって M M にカップリングされる場合、A B の解離定数 ( $K_d$ ) は、その対応する標的又はエピトープに向かって M M にカップされない場合の A B の  $K_d$  よりも少なくとも 1 0 0 倍、高い。

10

20

30

40

50

## 【 0 4 4 3 】

いくつかの実施形態において、各MMのカップリングは、その対応するABのその標的又はエピトープを結合する能力を低め、結果的に、その対応する標的又はエピトープに向かってMMにカップリングされる場合、ABの解離定数 ( $K_d$ ) は、その対応する標的又はエピトープに向かってMMにカップされない場合のABの  $K_d$  よりも少なくとも1000倍、高い。

## 【 0 4 4 4 】

いくつかの実施形態において、各MMのカップリングは、その対応するABのその標的又はエピトープを結合する能力を低め、結果的に、その対応する標的又はエピトープに向かってMMにカップリングされる場合、ABの解離定数 ( $K_d$ ) は、その対応する標的又はエピトープに向かってMMにカップされない場合のABの  $K_d$  よりも少なくとも10,000倍、高い。

10

## 【 0 4 4 5 】

いくつかの実施形態において、各MMは、本明細書に開示した実施例に示されるMMから選択されるアミノ酸配列である。

## 【 0 4 4 6 】

いくつかの実施形態において、CM1及び/又はCM2のうちの少なくとも1つが、UPA及びマトリプターゼから選択される少なくとも1つのプロテアーゼによって切断される。いくつかの実施形態において、CM1及び/又はCM2のうちの少なくとも1つが、8A~8Jに示すコアCMコンセンサス配列、表8A~8Jに示すコアCMコンセンサス配列の亜属、表8A~8Jに示すコアCMコンセンサス配列のうちの1つに基づく拡張コンセンサス配列から成る群から選択されるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態において、拡張コンセンサス配列は、表9A~9Jに示すコンセンサス配列、表10A~10Dに示すコアCMコンセンサス配列、表10A~10Dに示すコアCMコンセンサス配列の亜属、及び表11A~11Dに示すコンセンサス配列である。

20

## 【 0 4 4 7 】

いくつかの実施形態において、CM1及び/又はCM2のうちの少なくとも1つは、配列番号163~267から成る群から選択されるアミノ酸配列を含む。

## 【 0 4 4 8 】

いくつかの実施形態において、第1切断可能部分 (CM1) 配列を切断するプロテアーゼは、組織において多重特異的活性化可能抗体におけるAB1の標的と共局在し、そしてプロテアーゼは、多重特異的活性化可能抗体がそのプロテアーゼに暴露される場合、多重特異的活性化可能抗体におけるCM1を切断する。

30

## 【 0 4 4 9 】

いくつかの実施形態において、多重特異的活性化可能抗体は、複数の切断可能部分配列を含み、そして少なくとも1つの切断可能部分配列を切断するプロテアーゼは、組織において多重特異的活性化可能抗体におけるAB領域の少なくとも1つの領域の標的と共局在され、そしてプロテアーゼは、多重特異的活性化可能抗体がプロテアーゼに暴露される場合、多重特異的活性化可能抗体におけるCMを切断する。

## 【 0 4 5 0 】

いくつかの実施形態において、各CM、例えばCM1及び少なくともCM2は、多重特異的活性化可能抗体に位置し、結果的に、切断されていない状態下で、AB領域中の1つの領域の標的への多重特異的活性化可能抗体の結合が、その標的に結合する修飾されていないABの平衡解離定数よりも少なくとも2倍、高い平衡解離定数を伴って生じるよう低められ、そしてところが、切断された状態下で、ABはその標的を結合する。

40

## 【 0 4 5 1 】

いくつかの実施形態において、各CM、例えばCM1及び少なくともCM2は、多重特異的活性化可能抗体に位置し、結果的に、切断されていない状態下で、AB領域中の1つの領域の標的への多重特異的活性化可能抗体の結合が、その標的に結合する修飾されていないABの平衡解離定数よりも少なくとも3倍、高い平衡解離定数を伴って生じるよう低

50

められ、そしてところが、切断された状態下で、A Bはその標的を結合する。

【0452】

いくつかの実施形態において、各C M、例えばC M 1及び少なくともC M 2は、多重特異的活性化可能抗体に位置し、結果的に、切断されていない状態下で、A B領域中の1つの領域の標的への多重特異的活性化可能抗体の結合が、その標的に結合する修飾されていないA Bの平衡解離定数よりも少なくとも4倍、高い平衡解離定数を伴って生じるよう低められ、そしてところが、切断された状態下で、A Bはその標的を結合する。

【0453】

いくつかの実施形態において、各C M、例えばC M 1及び少なくともC M 2は、多重特異的活性化可能抗体に位置し、結果的に、切断されていない状態下で、A B領域中の1つの領域の標的への多重特異的活性化可能抗体の結合が、その標的に結合する修飾されていないA Bの平衡解離定数よりも少なくとも5倍、高い平衡解離定数を伴って生じるよう低められ、そしてところが、切断された状態下で、A Bはその標的を結合する。

10

【0454】

いくつかの実施形態において、各C M、例えばC M 1及び少なくともC M 2は、多重特異的活性化可能抗体に位置し、結果的に、切断されていない状態下で、A B領域中の1つの領域の標的への多重特異的活性化可能抗体の結合が、その標的に結合する修飾されていないA Bの平衡解離定数よりも少なくとも10倍、高い平衡解離定数を伴って生じるよう低められ、そしてところが、切断された状態下で、A Bはその標的を結合する。

【0455】

いくつかの実施形態において、各C M、例えばC M 1及び少なくともC M 2は、多重特異的活性化可能抗体に位置し、結果的に、切断されていない状態下で、A B領域中の1つの領域の標的への多重特異的活性化可能抗体の結合が、その標的に結合する修飾されていないA Bの平衡解離定数よりも少なくとも20倍、高い平衡解離定数を伴って生じるよう低められ、そしてところが、切断された状態下で、A Bはその標的を結合する。

20

【0456】

いくつかの実施形態において、各C M、例えばC M 1及び少なくともC M 2は、多重特異的活性化可能抗体に位置し、結果的に、切断されていない状態下で、A B領域中の1つの領域の標的への多重特異的活性化可能抗体の結合が、その標的に結合する修飾されていないA Bの平衡解離定数よりも少なくとも40倍、高い平衡解離定数を伴って生じるよう低められ、そしてところが、切断された状態下で、A Bはその標的を結合する。

30

【0457】

いくつかの実施形態において、各C M、例えばC M 1及び少なくともC M 2は、多重特異的活性化可能抗体に位置し、結果的に、切断されていない状態下で、A B領域中の1つの領域の標的への多重特異的活性化可能抗体の結合が、その標的に結合する修飾されていないA Bの平衡解離定数よりも少なくとも50倍、高い平衡解離定数を伴って生じるよう低められ、そしてところが、切断された状態下で、A Bはその標的を結合する。

【0458】

いくつかの実施形態において、各C M、例えばC M 1及び少なくともC M 2は、多重特異的活性化可能抗体に位置し、結果的に、切断されていない状態下で、A B領域中の1つの領域の標的への多重特異的活性化可能抗体の結合が、その標的に結合する修飾されていないA Bの平衡解離定数よりも少なくとも100倍、高い平衡解離定数を伴って生じるよう低められ、そしてところが、切断された状態下で、A Bはその標的を結合する。

40

【0459】

いくつかの実施形態において、各C M、例えばC M 1及び少なくともC M 2は、多重特異的活性化可能抗体に位置し、結果的に、切断されていない状態下で、A B領域中の1つの領域の標的への多重特異的活性化可能抗体の結合が、その標的に結合する修飾されていないA Bの平衡解離定数よりも少なくとも200倍、高い平衡解離定数を伴って生じるよう低められ、そしてところが、切断された状態下で、A Bはその標的を結合する。

【0460】

50

いくつかの実施形態において、多重特異的活性化可能抗体における各CMは、長さが最大15アミノ酸のポリペプチドである。

【0461】

いくつかの実施形態において、多重特異的活性化可能抗体の少なくとも一方のCMが、配列番号163～267から成る群から選択されるアミノ酸配列を含んでいて、そして、もう片方のCMが、アミノ酸配列LSGRSDNH（配列番号406）を含んでいる。いくつかの実施形態において、少なくとも1つのCMが、アミノ酸配列LSGRSDNH（配列番号406）を含んでいる。いくつかの実施形態において、少なくとも1つの切断可能部分が、特異的プロテアーゼ、例えば多重特異的活性化可能抗体の少なくとも1つの標的との共有が知られているプロテアーゼとの使用のために選択される。例えば、本開示の多重特異的活性化可能抗体における使用のための好適な切断可能部分は、少なくともウロキナーゼ、レグミン、及び/又はマトリプターゼ（本明細書中ではMTSP1又はMTSP1とも呼ばれる）などのプロテアーゼによって切断される。いくつかの実施形態において、好適な切断可能部分は、配列番号163～267から成る群から選択される少なくとも1つのアミノ酸配列を含んでいる。

【0462】

いくつかの実施形態において、多重特異的活性化可能抗体内の一方のCMがuPA及びマトリプターゼから選択される少なくとも1つのプロテアーゼのための基質であり、もう片方のCMが、表7に示されるそれらから成る群から選択されるプロテアーゼのための基質である。いくつかの実施形態において、プロテアーゼは、uPA、レグミン、マトリプターゼ、ADAM17、BMP-1、TMPRSS3、TMPRSS4、好中球エラスターゼ、MMP-7、MMP-9、MMP-12、MMP-13及びMMP-14から成る群から選択される。プロテアーゼは、カテプシン、例えば、カテプシンSであるが、但しそれだけには限定されない。いくつかの実施形態において、多重特異的活性化可能抗体における各CMは、uPA（ウロキナーゼプラスミノゲン活性化因子）、レグミン及びマトリプターゼから成る群から選択されるプロテアーゼのための基質である。いくつかの実施形態において、プロテアーゼは、uPAを包含する。いくつかの実施形態において、プロテアーゼはレグミンを包含する。いくつかの実施形態において、プロテアーゼは、マトリプターゼを包含する。

【0463】

いくつかの実施形態において、多重特異的活性化可能抗体中の少なくとも1つのCMは、少なくとも2つのプロテアーゼのための基質である。いくつかの実施形態において、多重特異的活性化可能抗体中の少なくとも1つのCMは、少なくとも2つのプロテアーゼのための基質であり、ここでプロテアーゼの1つは、uPA及びマトリプターゼから成る群から選択され、そして他のプロテアーゼは、表7に示されるそれらから成る群から選択される。いくつかの実施形態において、多重特異的活性化可能抗体中の少なくとも1つのCMは、uPA、レグミン及びマトリプターゼから成る群から選択され少なくとも2種のプロテアーゼのための基質である。

【0464】

いくつかの実施形態において、多重特異的活性化可能抗体は、第1CM（CM1）及び第2CM（CM2）を少なくとも含む。いくつかの実施形態において、CM1及びCM2は、MMをABに連結する単一の切断可能リンカーの一部である。いくつかの実施形態において、CM1は、MM1をAB1に連結する切断可能リンカーの一部であり、そしてCM2は、MM2をAB2に連結する別の切断可能リンカーの一部である。いくつかの実施形態において、多重特異的活性化可能抗体は、2以上のCMを含む。いくつかの実施形態において、斯かる多重特異的活性化可能抗体は、2つ以上のCM及び2つ以上のMMを含む。いくつかの実施形態において、CM1及びCM2は、それぞれ、15個以下の長さのアミノ酸のポリペプチドである。いくつかの実施形態において、第1CM及び第2CMの少なくとも1つは、表7に列挙されるそれらから成る群から選択されるプロテアーゼのための基質として機能するポリペプチドである。いくつかの実施形態において、第1CM及

び第2CMの少なくとも1つは、uPA、レグミン及びマトリプターゼから成る群から選択されるプロテアーゼのための基質としても機能するポリペプチドである。いくつかの実施形態において、第1CMは、標的組織において、uPA、レグミン及びマトリプターゼから成る群から選択される第1切断剤により切断され、そして第2CMは、標的組織において、第2切断剤により切断される。いくつかの実施形態において、他のプロテアーゼは、表7に示されるそれらから成る群から選択される。いくつかの実施形態において、第1切断剤及び第2切断剤は、表7に列挙されるそれらから成る群から選択される同じプロテアーゼであり、そして第1CM及び第2CMは、酵素のための異なった基質である。いくつかの実施形態において、第1切断剤及び第2切断剤は、uPA、レグミン及びマトリプターゼから成る群から選択される同じプロテアーゼであり、そして第1CM及び第2CMは、酵素のための異なった基質である。いくつかの実施形態において、第1切断剤及び第2切断剤は、表7に列挙される群から選択される同じプロテアーゼであり、そして第1CM及び第2CMは同じ基質である。いくつかの実施形態において、第1切断剤及び第2切断剤は、異なったプロテアーゼである。いくつかの実施形態において、第1切断剤及び第2切断剤は、表7に示されるそれらから成る群から選択される異なったプロテアーゼである。いくつかの実施形態において、第1切断剤及び第2切断剤は、標的組織において共存される。いくつかの実施形態において、第1CM及び第2CMは、標的組織において少なくとも1つの切断剤により切断される。

#### 【0465】

いくつかの実施形態において、多重特異的活性化可能抗体は、プロテアーゼに暴露され、そして切断され、結果的に、活性化されたか又は切断された状態で、活性化された多重特異的活性化可能抗体は、プロテアーゼがCMを切断した後、LP2及び/又はCM配列の少なくとも1部を含む鎖アミノ酸配列を含む。

#### 【0466】

本開示はまた、標的を特異的に結合する第1抗体又はフラグメント(AB1)、及び第2抗体又はフラグメント(AB2)を少なくとも含む多重特異的活性化可能抗体を包含する組成物及び方法も提供し、ここで少なくとも多重特異的活性化可能抗体における第1ABは、AB1のその標的を結合する能力を低めるマスキング部分(MM1)にカップリングされている。いくつかの実施形態において、各ABは、その対応するABの各標的を結合する能力を低めるMMにカップリングされる。例えば多重特異的活性化可能抗体の実施形態において、AB1は、AB1のその標的を結合する能力を低める第1マスキング部分(MM1)にカップリングされ、そしてAB2は、AB2のその標的を結合する能力を低める第2マスキング部分(MM2)にカップリングされる。いくつかの実施形態において、多重特異的活性化可能抗体は、2つ以上のAB領域を含み；斯かる実施形態において、AB1は、AB1のその標的を結合する能力を低める第1マスキング部分(MM1)にカップリングされ、AB2は、AB2のその標的を結合する能力を低める第2マスキング部分(MM2)にカップリングされ、AB3は、AB3のその標的を結合する能力を低める第3マスキング部分(MM3)にカップリングされそして多重特異的活性化可能抗体における各ABについても同様である。

#### 【0467】

いくつかの実施形態において、多重特異的活性化可能抗体は、プロテアーゼのための基質である少なくとも1つの切断可能部分(CM)をさらに含み、ここでCMはMMをABに連結する。例えば、いくつかの実施形態において、多重特異的活性化可能抗体は、標的を特異的に結合する第1抗体又は抗体フラグメント(AB1)及び第2抗体又は抗体フラグメント(AB2)を少なくとも含み、多重特異的活性化可能抗体における少なくとも第1ABは、AB1のその標的を結合する能力を低めるマスキング部分(MM1)に、切断可能部分(CM1)を介してカップリングされる。いくつかの多重特異的活性化可能抗体の実施形態において、AB1はCM1を介してMM1にカップリングされ、そしてAB2は、AB2のその標的を結合する能力を低める第2マスキング部分(MM2)に、第2切断可能部分(CM2)を介してカップリングされる。いくつかの実施形態において、多重



特異的活性化可能抗体は、2以上のAB領域を含み；それらの実施形態のいくつかによれば、AB1はCM1を介してMM1にカップリングされ、AB2はCM2を介してMM2にカップリングされ、そしてAB3は第3切断可能部分(CM3)を介して、AB3のその標的を結合する能力を低める第3マスキング部分(MM3)にカップリングされ、そして多重特異的活性化可能抗体における各ABについても同様である。

非結合立体部分又は非結合立体部分のための結合パートナーを有する活性化可能抗体  
【0468】

本開示はまた、非結合立体部分(NB)又は非結合立体部分のための結合パートナー(BP)を含む活性化可能抗体も提供し、ここでBPは、活性化可能抗体に対するNBを、リクルートするか、又は他方では、誘引する。本明細書に提供される活性化可能抗体は、非結合立体部分(NB)、切断可能リンカー(CL)、及び標的を結合する抗体又は抗体フラグメント(AB)を含む活性化可能抗体；非結合立体部分(BP)のための結合パートナー(BP)、CL及びABを含む活性化可能抗体；及びNBがリクルートされているBP、CL、及び標的を結合するABを含む活性化可能抗体を包含する。NBが活性化可能抗体のCL及びABに共有結合されるか、又は活性化可能抗体のCL及びABに共有結合されるBPとの相互作用により結合される活性化可能抗体は、「NB含有活性化可能抗体」として本明細書においては言及される。活性化可能又は切り替え可能とは、活性化可能抗体は、活性化可能抗体が、阻害された、マスキングされた又は切断されていない状態(すなわち、第1コンホメーション)下にある場合、標的への第1レベルの結合、及び活性化可能抗体が、阻害されていない、マスキングされていない及び/又は切断された状態(すなわち、第2コンホメーション、すなわち活性化された抗体)下にある場合、標的への第2レベルの結合を示すことを意味し、ここで標的結合の第2レベルは、標的結合の第1レベルよりも大きい。活性化可能組成物は、従来の抗体療法に比べて、高められた生物学的利用能、及びより好ましい生体内分布を示すことができる。

【0469】

いくつかの実施形態において、活性化可能抗体は、ABがマスキングされないか、又は他方では、非治療部位及び/又は非診断部位への結合から阻害されない場合、斯かる部位での結合に起因する、低められた毒性及び/又は有害な副作用を提供する。

【0470】

1つの実施形態において、活性化可能抗体は、非結合立体部分(NB)；切断可能リンカー(CL)；及び標的に対して特異的に結合する抗体又は抗体フラグメント(AB)を含み、ここでNBはABに対して特異的に結合しないポリペプチドであり；CLは酵素のための基質を含むポリペプチドであり；CLは、未切断状態で、NBが標的へのABの結合と干渉し、そして切断された状態で、NBは標的へのABの結合と干渉せず；そしてNBは酵素によるCLの切断を阻害しない。本明細書及び全体を通して使用される場合、用語、ポリペプチドとは、少なくとも2個のアミノ酸残基を含むいずれかのポリペプチド、例えばより大きなポリペプチド、完全長タンパク質及びそれらのフラグメントを言及し、そして前記用語のポリペプチドは、単鎖ポリペプチドに制限されず、そして複数ユニット、例えば多鎖ポリペプチドを包含する。ポリペプチドが、より短い長さ、例えば合計50個未満のアミノ酸のものである場合、用語ペプチド及びポリペプチドは、本明細書においては、交換可能的に使用され、そしてポリペプチドがより長い長さ、例えば50個又はそれ以上の長さのアミノ酸のものである場合、用語ポリペプチド及びタンパク質は、本明細書においては、交換可能的に使用される。

【0471】

1つの実施形態において、活性化可能抗体は、非結合立体部分(NB)；切断可能リンカー(CL)；及び標的に対して特異的に結合する抗体又は抗体フラグメント(AB)を含み、ここで(i)NBは、ABに対して特異的に結合しないポリペプチドを含み；(ii)CLは、酵素、例えばマトリプターゼ及びuPAから選択されるプロテアーゼのための基質(S)を含む、50個の長さまでのアミノ酸のポリペプチドであり；(iii)CLは、未切断状態で、NBが標的へのABの結合と干渉し、そして切断された状態で、N

B が標的への A B の結合と干渉しないよう位置決定され；そして ( i v ) N B は酵素による C L の切断を阻害しない。例えば、C L は、15 個までの長さのアミノ酸、20 個までの長さのアミノ酸、25 個までの長さのアミノ酸、30 個までの長さのアミノ酸、35 個までの長さのアミノ酸、40 個までの長さのアミノ酸、45 個までの長さのアミノ酸、50 個までの長さのアミノ酸、10 ~ 50 個までの長さのアミノ酸、15 ~ 50 個までの長さのアミノ酸、20 ~ 50 個までの長さのアミノ酸、25 ~ 50 個までの長さのアミノ酸、30 ~ 50 個までの長さのアミノ酸、35 ~ 50 個までの長さのアミノ酸、40 ~ 50 個までの長さのアミノ酸、45 ~ 50 個までの長さのアミノ酸、10 ~ 40 個までの長さのアミノ酸、15 ~ 40 個までの長さのアミノ酸、20 ~ 40 個までの長さのアミノ酸、25 ~ 40 個までの長さのアミノ酸、30 ~ 40 個までの長さのアミノ酸、35 ~ 40 個までの長さのアミノ酸、10 ~ 30 個までの長さのアミノ酸、15 ~ 30 個までの長さのアミノ酸、20 ~ 30 個までの長さのアミノ酸、25 ~ 30 個までの長さのアミノ酸、10 ~ 20 個までの長さのアミノ酸、又は 10 ~ 15 個までの長さのアミノ酸、を有する。

#### 【0472】

1 つの実施形態において、活性化可能抗体は、非結合立体部分 ( N B ) ；切断可能リンカー ( C L ) ；及び標的に対して特異的に結合する抗体又は抗体フラグメント ( A B ) を含み、ここで ( i ) N B は、A B に対して特異的に結合しないポリペプチドを含み；( i i ) C L は、酵素、例えばマトリプターゼ及び u P A から選択されるプロテアーゼのための基質 ( S ) を含むポリペプチドであり；( i i i ) C L は、未切断状態で、N B が標的への A B の結合と干渉し、そして切断された状態で、N B が標的への A B の結合と干渉しないよう位置決定され；そして ( i v ) N B は酵素による C L の切断を阻害せず；そして ( v ) 活性化可能抗体は、未切断状態で、次の通りに、N 末端から C 末端側への構造的配置を有する：N B - C L - A B 又は A B - C L - N B 。

#### 【0473】

1 つの実施形態において、活性化可能抗体は、非結合立体部分 ( N B ) ；切断可能リンカー ( C L ) ；及び標的に対して特異的に結合する抗体又は抗体フラグメント ( A B ) を含み、ここで ( i ) N B は、A B に対して特異的に結合しないポリペプチドを含み；( i i ) C L は、酵素、例えばマトリプターゼ及び u P A から選択されるプロテアーゼのための基質 ( S ) を含むポリペプチドであり；( i i i ) C L は、未切断状態で、N B が標的への A B の結合と干渉し、そして切断された状態で、N B が標的への A B の結合と干渉しないよう位置決定され、そして未切断の活性化可能抗体下で、N B は、標的を結合する A B の能力を、標的を結合する、切断された A B の能力に比較して、少なくとも 50%、例えば、少なくとも 60%、少なくとも 70%、少なくとも 75%、少なくとも 80%、少なくとも 85%、少なくとも 90%、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%、少なくとも 100%、低め；そして ( i v ) N B は、酵素による C L の切断を阻害しない。標的を結合する A B の能力の低下は、例えば本明細書に記載されているアッセイ、又はインビトロ標的置換アッセイ、例えば国際公開第 2009/025846 号及び第 2010/081173 号に記載されるアッセイを用いて、決定される。

#### 【0474】

1 つの実施形態において、活性化可能抗体は、非結合立体部分 ( N B ) のための結合パートナー ( B P ) ；切断リンカー ( C L ) ；及び標的に対して特異的に結合する抗体又は抗体フラグメント ( A B ) を含み、ここで B P は、N B に供される場合、N B に結合するポリペプチドであり；N B は A B に対して特異的に結合せず；C L は、酵素、例えばマトリプターゼ及び u P A から選択されるプロテアーゼのための基質 ( S ) を含むポリペプチドであり；C L は、N B の存在下で、未切断状態で、N B が標的への A B の結合と干渉し、そして切断された状態で、N B が標的への A B の結合と干渉せず、そして B P は標的への A B の結合と干渉するよう位置決定され；そして N B 及び B P は、酵素による C L の切断を阻害しない。この実施形態のいくつかの例によれば、活性化可能抗体の B P は任意には、N B に結合される。1 つの実施形態において、N B はインビボで、活性化可能抗体の B P によりリクルートされる。

## 【 0 4 7 5 】

任意のこれらの活性化可能抗体の実施形態に関するいくつかの例において、活性化可能抗体は、組成物として処方される。いくつかのそれらの実施形態において、組成物はまた、NBを含み、ここでNBは、BP、CL及びABを含む活性化可能抗体と共に同時処方される。この実施形態のいくつかの例によれば、BPは、アルブミン結合ペプチド、フィブリノゲン結合ペプチド、フィブロネクチン結合ペプチド、ヘモグロビン結合ペプチド、トランスフェリン結合ペプチド、免疫グロブリンドメイン結合ペプチド、及び他の血清タンパク質結合ペプチドから成る群から選択される。

## 【 0 4 7 6 】

任意のこれらの活性化可能抗体の実施形態に関するいくつかの例において、NBは可溶性球状タンパク質である。任意のこれらの活性化可能抗体の実施形態に関するいくつかの例において、NBは、血流において循環するタンパク質である。任意のこれらの活性化可能抗体の実施形態に関するいくつかの例において、NBは、アルブミン、フィブリノゲン、フィブロネクチン、ヘモグロビン、トランスフェリン、免疫グロブリンドメイン、および他の血清タンパク質から成る群から選択される。

## 【 0 4 7 7 】

任意のこれらの活性化可能抗体の実施形態に関するいくつかの例において、CLは、プロテアーゼのための基質(S)を含むポリペプチドである。任意のこれらの活性化可能抗体の実施形態に関するいくつかの例において、プロテアーゼは標的と共局在し、そしてプロテアーゼは、活性化可能抗体がプロテアーゼに供される場合、活性化可能抗体におけるCLを切断する。任意のこれらの活性化可能抗体の実施形態に関するいくつかの例において、CLは、50個までの長さのアミノ酸のポリペプチドである。抗体、CLは、15個までの長さのアミノ酸、例えば3個の長さのアミノ酸、4個の長さのアミノ酸、5個の長さのアミノ酸、6個の長さのアミノ酸、7個の長さのアミノ酸、8個の長さのアミノ酸、9個の長さのアミノ酸、10個の長さのアミノ酸、11個の長さのアミノ酸、12個の長さのアミノ酸、13個の長さのアミノ酸、又は15個の長さのアミノ酸を有する、基質(S)を含むポリペプチドである。

## 【 0 4 7 8 】

任意のこれらの活性化可能抗体の実施形態に関するいくつかの例において、活性化可能抗体は、未切断状態で次の通りに、N末端からC末端側に構造配置を有する：NB-CL-AB、AB-CL-NB、BP-CL-AB又はAB-CL-BP。活性化可能抗体がBPを含み、そして活性化可能抗体がその対応するNBの存在下で存在する実施形態において、活性化可能抗体は、未切断状態で次の通りに、N末端からC末端側に構造配置を有し：NB：BP-CM-AB又はAB-CM-BP：NB、ここで「：」は、NBとBPとの間の相互作用、例えば、結合を表す。

## 【 0 4 7 9 】

任意のこれらの活性化可能抗体の実施形態に関するいくつかの例において、活性化可能抗体は、標的を特異的に結合する、抗体又はその抗原結合フラグメントを含み、そしてモノクローナル抗体、ドメイン抗体、単鎖、Fabフラグメント、F(ab')<sub>2</sub>フラグメント、scFv、scab、dAb、単ドメインH鎖抗体及び単ドメインL鎖抗体である。いくつかの実施形態において、標的を結合する斯かる抗体又はその免疫学的活性フラグメントは、マウス、他の齧歯動物、キメラ、ヒト適合化、又は完全ヒトモノクローナル抗体である。

## 【 0 4 8 0 】

任意のこれらの活性化可能抗体の実施形態に関するいくつかの例において、活性化可能抗体は、本明細書中に提示したアミノ酸配列を含む可変重鎖領域と本明細書中に提示したアミノ酸配列を含む可変軽鎖領域の組み合わせを含んでいる。いくつかの実施形態において、活性化可能抗体は、本明細書中に提示したアミノ酸配列と少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又はそれ以上同一のアミノ酸配列を含んでいる可変重鎖領域と、本明細書中に提示したアミノ酸配列と少な

10

20

30

40

50

くとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又はそれ以上同一のアミノ酸配列を含んでいる可変軽鎖領域の組み合わせを含む。

【0481】

任意のこれらの活性化可能抗体の実施形態に関するいくつかの例において、活性化可能抗体はまた、ABに結合される剤も含む。いくつかの実施形態において、前記剤は治療剤である。いくつかの実施形態において、前記剤は抗腫瘍剤である。いくつかの実施形態において、前記剤は毒素又はその断片である。いくつかの実施形態において、前記剤は、リンカーを介してABに結合される。いくつかの実施形態において、前記リンカーは、切断可能リンカーである。いくつかの実施形態において、前記剤は、非切断可能リンカーを介してABに結合される。いくつかの実施形態において、前記剤は、表3に列挙される群から選択された剤である。いくつかの実施形態において、前記剤は微小管障害剤である。いくつかの実施形態において、前記剤は、DNAアルキル化剤、DNAインターカレーター、又は他のDNA損傷剤などの核酸損傷剤である。いくつかの実施形態において、前記剤はドラスタチンである。いくつかの実施形態において、前記剤は、アウリスタチン又はその誘導体である。いくつかの実施形態において、前記剤は、アウリスタチンE又はその誘導体である。いくつかの実施形態において、前記剤はモノメチルアウリスタチンE(MMAE)である。いくつかの実施形態において、剤はモノメチルアウリスタチンD(MMAD)である。いくつかの実施形態において、前記剤はマイタンシノイド又はマイタンシノイド誘導体である。いくつかの実施形態において、前記剤はDM1又はDM4である。いくつかの実施形態において、前記剤は、デュオカルマイシン又はその誘導体である。いくつかの実施形態において、前記剤は、カリケアマイシン又はその誘導体である。いくつかの実施形態において、剤はピロロベンゾジアゼピンである。

10

20

【0482】

任意のこれらの活性化可能抗体の実施形態に関するいくつかの例において、活性化可能抗体はまた、検出可能成分も含む。いくつかの実施形態において、前記検出可能成分は、診断剤である。

【0483】

任意のこれらの活性化可能抗体の実施形態に関するいくつかの例において、活性化可能抗体はまた、スペーサーも包含する。任意のこれらの活性化可能抗体の実施形態に関するいくつかの例において、活性化可能抗体はまた、シグナルペプチドも包含する。いくつかの実施形態において、シグナルペプチドは、スペーサーを介して活性化可能抗体に結合される。任意のこれらの活性化可能抗体の実施形態に関するいくつかの例において、スペーサーは、活性化可能抗体のMMに直接的に結合される。

30

【0484】

いくつかの実施形態において、活性化可能抗体の血清中半減期は、対応する抗体の血清中半減期より長い；例えば、活性化可能抗体のpKは、対応する抗体のpKより長い。いくつかの実施形態において、活性化可能抗体の血清中半減期は、対応する抗体の血清中半減期と同等である。いくつかの実施形態において、活性化可能抗体の血清中半減期は、生物に投与される場合、少なくとも15日である。いくつかの実施形態において、活性化可能抗体の血清中半減期は、生物に投与される場合、少なくとも12日である。いくつかの実施形態において、活性化可能抗体の血清中半減期は、生物に投与される場合、少なくとも11日である。いくつかの実施形態において、活性化可能抗体の血清中半減期は、生物に投与される場合、少なくとも10日である。いくつかの実施形態において、活性化可能抗体の血清中半減期は、生物に投与される場合、少なくとも9日である。いくつかの実施形態において、活性化可能抗体の血清中半減期は、生物に投与される場合、少なくとも8日である。いくつかの実施形態において、活性化可能抗体の血清中半減期は、生物に投与される場合、少なくとも7日である。いくつかの実施形態において、活性化可能抗体の血清中半減期は、生物に投与される場合、少なくとも6日である。いくつかの実施形態において、活性化可能抗体の血清中半減期は、生物に投与される場合、少なくとも5日である。いくつかの実施形態において、活性化可能抗体の血清中半減期は、生物に投与される場

40

50



、 0 0 0 ~ 1 0 0、 0 0 0、 1 0、 0 0 0 ~ 1、 0 0 0、 0 0 0、 1 0、 0 0 0 ~ 1 0、  
0 0 0、 0 0 0、 1 0 0、 0 0 0 ~ 1、 0 0 0、 0 0 0 又は 1 0 0、 0 0 0 ~ 1 0、 0 0  
0、 0 0 0 倍、低い。

#### 【 0 4 8 7 】

N B 含有活性化可能抗体が標的の存在下にある場合、標的への A B の特異的結合は、N  
B 又は N B : B P により結合されない場合の A B の特異的結合に比較して、低められるか  
、又は阻害される。N B 含有活性化可能抗体が標的の存在下にある場合、標的への A B の  
特異的結合は、標的への親 A B の特異的結合に比較して、低められるか、又は阻害される  
。N B 又は N B : B P に結合されない A B の結合、又は標的への親 A B の結合に比較され  
る場合、標的を結合する N B 含有活性化可能抗体の能力は、インビボ又はインビトロアッ  
セイにより測定される場合、少なくとも 2、4、6、8、12、28、24、30、36  
、48、60、72、84、又は 96 時間、又は 5、10、15、30、45、60、  
90、120、150、または 180 日間、又は 1、2、3、4、5、6、7、8、9  
、10、11、又は 12 か月間、又はそれ以上の間、少なくとも 50 %、60 %、70  
%、80 %、90 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99  
% 及びさらに 100 %、低められ得る。

10

#### 【 0 4 8 8 】

N B 含有活性化可能抗体が標的の存在下にある場合（但し、修飾剤（例えば、プロテア  
ーゼ又は他の酵素）は不在である）、標的への A B の特異的結合は、N B 又は N B : B P  
により結合されない場合の A B の特異的結合に比較して、低められるか、又は阻害される  
。N B 含有活性化可能抗体が標的の存在下にある場合（但し、修飾剤（例えば、プロテア  
ーゼ、他の酵素、還元剤又は光）は不在である）、標的への A B の特異的結合は、標的へ  
の親 A B の特異的結合に比較して、低められるか、又は阻害される。N B 又は N B : B P  
に結合されない A B の結合、又は標的への親 A B の結合に比較される場合、標的を結合す  
る N B 含有活性化可能抗体の能力は、インビボ又はインビトロアッセイにより測定される  
場合、少なくとも 2、4、6、8、12、28、24、30、36、48、60、72、  
84、又は 96 時間、又は 5、10、15、30、45、60、90、120、150  
、または 180 日間、又は 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、又は 1  
2 か月間、又はそれ以上の間、少なくとも 50 %、60 %、70 %、80 %、90 %、  
92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 % 及びさらに 100  
%、低められ得る。

20

30

#### 【 0 4 8 9 】

任意のこれらの活性化可能抗体の実施形態に関するいくつかの例において、活性化可能  
抗体は、活性化可能抗体結合体を生成するために、A B に結合される剤を含む。任意のこ  
れらの活性化可能抗体の実施形態に関するいくつかの例において、前記剤は治療剤である  
。いくつかの実施形態において、前記剤は診断剤である。いくつかの実施形態において、  
前記剤は検出可能マーカーである。活性化可能抗体結合体のいくつかの実施形態において  
、前記剤は抗腫瘍剤である。活性化可能抗体結合体のいくつかの実施形態において、前記  
剤は毒素又はその断片である。活性化可能抗体結合体のいくつかの実施形態において、前  
記剤は、リンカーを介して A B に結合される。活性化可能抗体結合体のいくつかの実施形  
態において、前記リンカーは、切断可能リンカーである。いくつかの実施形態において、  
前記剤は、切断不可能なリンカーを介して A B に結合される。いくつかの実施形態におい  
て、前記剤は微小管阻害剤である。いくつかの実施形態において、前記剤は、DNAアル  
キル化剤、DNAインターカレーター、又は他のDNA損傷剤などの核酸損傷剤である。  
いくつかの実施形態において、前記剤は、表3に列挙される群から選択された剤である。  
いくつかの実施形態において、前記剤はドラスタチンである。いくつかの実施形態におい  
て、前記剤は、アウリスタチン又はその誘導体である。いくつかの実施形態において、前  
記剤は、アウリスタチン E 又はその誘導体である。いくつかの実施形態において、前記剤  
はモノメチルアウリスタチン E (MMAE) である。いくつかの実施形態において、前記  
剤は、モノメチルアウリスタチン E (MMAE) である。いくつかの実施形態において、

40

50

前記剤はマイタンシノイド又はマイタンシノイド誘導体である。いくつかの実施形態において、前記剤はDM1又はDM4である。いくつかの実施形態において、前記剤は、デュオカルマイシン又はその誘導体である。いくつかの実施形態において、前記剤は、カリケアマイシン又はその誘導体である。いくつかの実施形態において、前記剤はピロロベンゾジアゼピンである。

#### 【0490】

任意のこれらの活性化可能抗体の実施形態に関するいくつかの例において、活性化可能抗体は、二重標的結合活性化可能抗体である。斯かる二重標的結合活性化可能抗体は、同じか又は異なった標的を結合できる2つのAbを含む。特定の実施形態において、二重標的活性化可能抗体は、二重特異的抗体又は抗体フラグメントを含む。

10

#### 【0491】

二重標的結合活性化可能抗体は、活性化可能抗体のABに結合することができる標的の1つ又は両者と共に、標的組織において共同在する切断剤、例えばマトリプターゼ及びuPAから選択されるプロテアーゼにより切断されるCLを有するよう企画される。同じか又は異なった標的に対する複数のABを有する二重標的結合活性化可能抗体は、複数のCLを有するよう企画され得、ここで第1CLは第1標的組織において切断剤により切断でき、そして第2CLは第2標的組織において切断剤により切断でき、そして1又は2以上の標的は活性化可能抗体のABに結合する。1つの実施形態において、第1及び第2標的組織は、例えば生物における異なった部位で、空間的に分離される。1つの実施形態において、第1及び第2標的組織は、一時的に分離される同じ組織、例えば異なった時点での同じ組織であり、ここで第1時点は、組織が初期段階腫瘍である時点であり、そして第2時点は、組織が後期段階腫瘍である時点である。

20

#### 【0492】

本開示はまた、本明細書に記載される活性化可能抗体をコードする核酸分子も提供する。本開示はまた、それらの核酸を含むベクターを提供する。本明細書に記載される活性化可能抗体は、活性化可能抗体の発現を誘導する条件下で、それらの核酸分子又はベクターを含む細胞を培養することにより生成される。

#### 【0493】

本開示はまた、活性化可能抗体の製造方法を提供する。1つの実施形態において、前記方法は、(a)活性化可能抗体をコードする核酸構築物を含む細胞を、活性化可能抗体の発現を導く条件下で培養し、ここで前記活性化可能抗体は、(i)非結合立体部分(NB)；(ii)切断可能リンカー(CL)；及び(iii)標的を特異的に結合する抗体又はその抗原結合フラグメント(AB)を含み、ここで(1)NBはABに対して特異的に結合せず；(2)CLは、酵素、例えばマトリプターゼ及びuPAから選択されるプロテアーゼのための基質(S)を含みポリペプチドであり；(3)CLは、未切断状態で、NBが標的へのABの結合と干渉し、そして切断された状態で、NBが標的へのABの結合と干渉しないよう位置決定され；そして(4)NBが酵素によるDLの切断を阻害せず；そして(b)活性化可能抗体を回収する段階を包含する。

30

#### 【0494】

別の実施形態において、前記方法は、(a)活性化可能抗体をコードする核酸構築物を含む細胞を、活性化可能抗体の発現を導く条件下で培養し、ここで前記活性化可能抗体は、(i)非結合立体部分(NB)のための結合パートナー(BP)；(ii)切断可能リンカー(CL)；及び(iii)標的を特異的に結合する抗体又はその抗原結合フラグメント(AB)を含み、ここで(1)NBはABに対して特異的に結合せず；(2)CLは、酵素、例えばマトリプターゼ及びuPAから選択されるプロテアーゼのための基質(S)を含みポリペプチドであり；(3)CLは、NBの存在下で、未切断状態で、NBが標的へのABの結合と干渉し、そして切断された状態で、NBが標的へのABの結合と干渉せず、そしてBPが標的へのABの結合と干渉しないよう位置決定され；そして(4)NBが酵素によるDLの切断を阻害せず；そして(b)活性化可能抗体を回収する段階を包含する。この実施形態のいくつかの例によれば、活性化可能抗体のBPは、NBに結

40

50

合される。

複合抗体及び活性化可能抗体を含めたC M含有分子の使用

【0495】

本開示の治療剤が、改良された転送、送達、耐性及び同様のものを提供するために製剤中に組込まれる、適切な担体、賦形剤及び他の剤と共に投与されることは理解されるであろう。多数の適切な製剤が、すべての製薬化学者に周知の処方に見出され得る：Remington's Pharmaceutical Sciences (15th ed, Mack Publishing Company, Easton, PA (1975))、特にそこにおける、Blaug、Seymourによるチャプター87。それらの製剤は、例えば粉末、ペースト、軟膏、ジェリー、ワックス、オイル、脂質、脂質（カチオン性又はアニオン性）含有小胞（例えば、Lipofection（登録商標））、DNA結合体、無水吸水性ペースト、水中油型及び油中水型エマルジョン、エマルジョンカーボワックス（種々の分子量のポリエチレングリコール）、半固体状ゲル、及びカーボワックスを含む半固体状混合物を包含する。前述の混合物のいずれかが、製剤中の活性成分が製剤化により不活性化されず、そして製剤が生理学的に適合でき、そして投与の経路で許容できる場合、本開示による治療及び療法において適切であり得る。また、Baldrick P. “Pharmaceutical excipient development: the need for preclinical guidance.” Regul. Toxicol Pharmacol. 32(2):210-8 (2000), Wang W. “Lyophilization and development of solid protein pharmaceuticals.” Int. J. Pharm. 203(1-2):1-60 (2000), Charman WN “Lipids, lipophilic drugs, and oral drug delivery-some emerging concepts.” J Pharm Sci.89(8):967-78 (2000), Powell et al. “Compendium of excipients for parenteral formulations” PDA J Pharm Sci Technol. 52:238-311 (1998)、及び製薬化学者に周知の製剤、賦形剤及び担体に関連する追加の情報についてのそこにおける引用も参照のこと。

【0496】

制限されることのない例として、複合抗体、活性化可能抗体及び／又は複合活性化可能抗体などのC M含有分子を含んでいる本開示の治療剤は、異常な標的発現及び／又は活性に関係している疾患又は障害を予防、治療、又はそうでなければ、改善するのに使用される。例えば、C M含有分子、例えば複合抗体、活性化可能抗体及び／又は複合活性化可能抗体を含めた本開示の治療剤は、炎症、炎症性疾患、自己免疫疾患及び／又は癌若しくは他の腫瘍性病態を治療、又はそうでなければ、改善するのに使用される。いくつかの実施形態において、癌とは、標的が発現されている固形腫瘍又は血液悪性腫瘍である。いくつかの実施形態において、癌とは、標的が発現されている固形腫瘍である。いくつかの実施形態において、癌とは、標的が発現されている血液悪性腫瘍である。いくつかの実施形態において、標的は、実質（例えば、癌において、多くの場合臓器又は組織の機能を果たす臓器又は組織の一部）で発現される。いくつかの実施形態において、標的は、細胞、組織、又は臓器で発現される。いくつかの実施形態において、標的は、間質（すなわち、細胞、組織、又は臓器の結合支持フレームワーク）で発現される。いくつかの実施形態において、標的は、骨芽細胞で発現される。いくつかの実施形態において、標的は、内皮（血管系）で発現される。いくつかの実施形態において、標的は、癌の幹細胞で発現される。いくつかの実施形態において、活性化可能抗体に複合化されている剤は、微小管阻害剤である。いくつかの実施形態において、活性化可能抗体に複合化されている剤は、核酸損傷剤である。

【0497】

予防、改善又は治療の有効性は、例えば異常な標的の発現及び／又は活性などの標的の発現及び／又は活性に関連する疾患又は障害を診断するか、又は治療するためのいずれかの既知方法に関連して決定される。対象の生存性の延長、そうでなければ、対象における標的の発現及び／又は活性、例えば異常な標的の発現及び／又は活性に関連する疾患又は障害の進行の遅延は、複合抗体、活性化可能抗体及び／又は複合活性化可能抗体が臨床的利益を与えることを示唆する。

【0498】

C M含有分子、例えば複合抗体、活性化可能抗体及び／又は複合活性化可能抗体は、医

10

20

30

40

50



薬組成物の形で投与され得る。斯かる組成物の調製に関連する原則及び考慮点、並びに成分の選択の指針は、例えばRemington : The Science And Practice Of Pharmacy 19th ed . (Alfonso R. Gennaro, et al., editors) Mack Pub. Co., Easton, Pa.: 1995; Drug Absorption Enhancement : Concepts, Possibilities, Limitations, And Trends, Harwood Academic Publishers, Langhorne, Pa., 1994; and Peptide And Protein Drug Delivery (Advances In Parenteral Sciences, Vol. 4), 1991, M. Dekker, New Yorkに提供される。

#### 【 0 4 9 9 】

抗体フラグメントが使用されるいくつかの実施形態において、標的タンパク質の結合ドメインに対して特異的に結合する最小フラグメントが選択される。例えば、抗体の可変領域配列に基づけば、標的タンパク質配列を結合する能力を保持するペプチド分子が企画され得る。斯かるペプチドは、化学的に合成され、及び/又は組換えDNA技法により製造され得る(例えば、Marasco et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 7889-7893 (1993)を参照のこと)。製剤はまた、治療される特定の徴候のために必要な1以上の活性化化合物、例えば、いくつかの実施形態において、互いに悪影響を与えない相補的活性を有するそれらのものも含むことができる。いくつかの実施形態において、又はさらに、組成物は、その機能を増強する剤、例えば細胞毒性剤、サイトカイン、化学療法剤、又は成長阻害剤を含むことができる。斯かる分子は、意図する目的のために効果的である量での組み合わせで適切に存在する。

#### 【 0 5 0 0 】

活性成分はまた、それぞれ、コロイド状薬剤送達システム(例えば、リポソーム、アルブミン微小球、マイクロエマルジョン、ナノ粒子及びナノカプセル)下で、又はマイクロエマルジョン下で、液滴形成技法又は界面重合により調製されたマイクロカプセル、例えばヒドロキシメチルセルロース又はゼラチン-マイクロカプセル及びポリ-(メチルメタクリレート)マイクロカプセルに閉じ込められ得る。

#### 【 0 5 0 1 】

インビボ投与のために使用される製剤は、無菌であるべきである。これは、無菌濾過膜を通しての濾液により容易に達成される。

#### 【 0 5 0 2 】

徐放性製剤が調製され得る。除放性製剤の適切な例は、抗体を含む固体疎水性ポリマーの半透過性マトリックスを包含し、ここでマトリックスは成形品、例えばフィルム又はマイクロカプセルの形で存在する。除放性マトリックスの例は、ポリエステル、ヒドロゲル(例えば、ポリ-(2-ヒドロキシエチル-メタクリレート)、又はポリ(ビニルアルコール)、ポリラクチド(米国特許第3,773,919号)、L-グルタミン酸及びエチル-L-グルタノートのコポリマー、非分解性エチレン-酢酸ビニル、分解性乳酸-グルコール酸コポリマー、例えばLUPRON DEPOT(登録商標)(乳酸-クリコール酸コポリマー及び酢酸ロイプロリドから構成される注射用微小球)、及びポリ-D-( )-3-ヒドロキシ酪酸を包含する。ポリマー、例えばエチレン-酢酸ビニル及び乳酸-グリコール酸は100日間にわたって分子を放出できるが、ある種のヒドロゲルは、より短い期間、タンパク質を放出する。

#### 【 0 5 0 3 】

いくつかの実施形態において、CM含有分子、例えば複合抗体、活性化可能抗体及び/又は複合活性化可能抗体は、検出可能標識を含む。損なわれていない抗体、又はそのフラグメント(例えば、Fab、scFv又はF(ab)<sub>2</sub>)が使用される。プローブ又は抗体に関して、用語「標識された」とは、プローブ又は抗体に検出可能物質を結合する(すなわち、物理的に連結する)ことによるプローブの直接的標識、及び直接的に標識される別の試薬との反応性によるプローブ又は抗体の間接的標識の包含を意図する。間接的標識の例は、蛍光標識された二次抗体を用いての一次抗体の検出、及び蛍光標識されたストレプトアビジンにより検出され得ようビオチンによるDNAプローブの末端標識を包含する。用語「生物学的サンプル」とは、対象から単離された組織、細胞及び生物学的流体、並

びに対象内に存在する組織、細胞及び体液の包含を意図する。従って、用語「生物学的サンプル」の使用範囲内に包含されるものは、血液、及び血清、血漿又はリンパを含む血液の画分又は成分である。すなわち、本開示の検出方法は、インビトロ及びインビボで、生物学的サンプルにおける検体mRNA、タンパク質、又はゲノムDNAを検出するために使用され得る。例えば、検体mRNAの検出のためのインビトロ法は、ノザンハイブリダイゼーション及びインサイチュハイブリダイゼーションを包含する。分析物タンパク質の検出のためのインビトロ技法において、酵素結合免疫吸着検定法(ELISA)、ウェスタンブロット、免疫沈澱、免疫化学染色、及び免疫蛍光が挙げられる。検体ゲノムDNAの検出のためのインビトロ法は、サザンハイブリダイゼーションを包含する。免疫検定を行うための手順は、例えば“ELISA: Theory and Practice: Methods in Molecular Biology”, Vol. 42, J. R. Crowther (Ed.) Human Press, Totowa, NJ, 1995; “Immunoassay”, E. Diamandis and T. Christopoulos, Academic Press, Inc., San Diego, CA, 1996; and “Practice and Theory of Enzyme Immunoassays”, P. Tijssen, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 1985に記載される。さらに、分析物タンパク質の検出のためのインビボ技法は、標識された抗-分析物タンパク質抗体を対象中に導入することを包含する。例えば、抗体は、対象における存在及び位置が標識イメージング技法により検出され得る放射性マーカーにより標識され得る。

10

#### 【0504】

本開示の複合抗体、活性化可能抗体及び/又は複合活性化可能抗体はまた、様々な診断及び予防製剤にも使用される。1つの実施形態において、複合抗体、活性化可能抗体及び/又は複合活性化可能抗体は、1又は2以上の前述の癌又は線維製障害を発症する危険性がある患者に投与される。1又は2以上の前述の障害に対する患者又は器官の素因は、遺伝子型、血清学的又は生化学的マーカーを用いて決定され得る。

20

#### 【0505】

本開示のいくつかの実施形態において、複合抗体、活性化可能抗体及び/又は複合活性化可能抗体は、1又は2以上の前述の障害に関連する臨床学的徴候を有するものとして診断されたヒト個人に投与される。診断に基づいて、複合抗体、活性化可能抗体及び/又は複合活性化可能抗体は、臨床学的徴候の効果を軽減するか又は無効にするために投与される。

#### 【0506】

30

本開示の複合抗体、活性化可能抗体及び/又は複合活性化可能抗体はまた、患者サンプルにおける標的の検出においても有用であり、そして従って、診断としても有用である。例えば、本開示の抗体及び/又は活性化可能抗体、並びにその複合化バージョンは、患者サンプルにおける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に使用される。

#### 【0507】

1つの実施形態において、本開示の複合抗体、活性化可能抗体及び/又は複合活性化可能抗体は、固体支持体(例えば、マイクロタイタプレートのウェル)上に固定される。固定された複合抗体、活性化可能抗体及び/又は複合活性化可能抗体は、試験サンプルに存在できるいずれかの標的のための保護抗体として機能する。患者サンプルと固定された抗体との接触の前、固体支持体は、すすがれ、そしてブロッキング剤、例えば乳タンパク質又はアルブミンにより、分析物の非特異的吸着を妨げるために処理される。

40

#### 【0508】

結果的に、ウェルは、抗原を含む疑いのある試験サンプル、又は標準量の抗原と含む溶液により処理される。斯かるサンプルは例えば、病理学の診断であると見なされるレベルの循環抗体を有する疑いのある対象からの血清サンプルである。試験サンプル又は標準をすすいだ後、固体支持体は、検出可能的に標識される二次抗体により処理される。標識された二次抗体は、検出抗体として作用する。検出可能標識のレベルが測定され、そして試験サンプル中の標的抗原の濃度が、標識サンプルから得られる標準曲線との比較により決定される。

50

## 【0509】

インビトロ診断アッセイで本開示の抗体及びその複合化バージョンを用いて得られる結果に基づけば、標的抗体の発現レベルに基づいて対象における疾患を段階的に分けることが可能であることが理解されるであろう。所定の疾患に関しては、血液サンプルが疾患の進行における種々の段階であるものとして診断された患者から、及び／又は疾患の治療処置における種々の点で採取される。進行又は治療の各段階について統計学的に有意な結果を提供するサンプル集団を用いて、各段階の特性と考えられ得る抗原の濃度範囲が示される。

## 【0510】

複合抗体、活性化可能抗体及び／又は複合活性化可能抗体はまた、診断及び／又はイメージング方法にも使用され得る。いくつかの実施形態において、斯かる方法は、インビトロ方法である。いくつかの実施形態において、斯かる方法は、インビボ方法である。いくつかの実施形態において、斯かる方法は、インサイチュ方法である。いくつかの実施形態において、斯かる方法は、エクスピボ方法である。例えば、酵素切断できるCMを有する活性化可能抗体は、CMを切断できる酵素の存在又は不在を検出するために使用され得る。斯かる活性化可能抗体は、所定の宿主生物の所定の細胞又は組織における活性化された抗体（すなわち、活性化可能抗体の切断に起因する抗体）の測定される蓄積を通して酵素活性（又は、いくつかの実施形態において、ジスルフィド結合の還元を提供することができる高められた還元電位の環境）のインビボ検出（例えば、定性的又は定量的）を包含することができる診断に使用され得る。活性化された抗体のそのような蓄積は、組織が酵素活性（又はCMの性質に依存する高められた還元電位）を表すことを示すのみならず、また組織が活性化された抗体が結合する標的を表すことも示唆する。

## 【0511】

例えば、CMは、腫瘍の部位で、ウィルス又は細菌感染の部位で、生成学的に制限された部位で（例えば、膿瘍において、器官において、及び同様に）、及び同様の部位で見出されるマトリプターゼ及びuPAから選択される少なくとも1つのプロテアーゼのための基質として選択され得る。ABは、標的抗原を結合するものである。本明細書中に開示した方法、又は適切であれば当業者になじみの方法を用いて、検出可能標識（例えば、蛍光標識又は放射性標識又は放射性トレーサー）は、AB、又は抗体及び／又は活性化可能抗体の他の領域に結合され得る。適切な検出可能標識は、上記スクリーニング方法において論じられ、そして追加の特定の例が下記に提供される。その活性が興味ある疾患組織において高められるマトリプターゼ及びuPAから選択される少なくとも1つのプロテアーゼと共に、病状のタンパク質又はペプチドに対して特異的なABを用いて、活性化可能抗体は、CM特異的な酵素が検出可能レベルで存在しないか、又は疾患組織においてよりも低いレベルで存在するか、又は不活性である（例えば、チモーゲン形で、又は阻害剤との複合体下で）、組織と比較して、疾患組織への結合率の増加を示すであろう。小タンパク質及びペプチドは腎臓濾過システムにより血液から急速にクリアランスされるので、及びCMに対して特異的な酵素は検出可能レベルで存在しないので（又は非疾患組織に低レベルで存在するか、又は不活性コンホメーション下で存在する）、疾患組織における活性化された抗体の蓄積は、非疾患組織に対して増強される。

## 【0512】

別の例によれば、活性化可能抗体は、サンプルにおける切断剤の存在又は不在を検出するために使用され得る。例えば、活性化可能抗体が酸素による切断に対して敏感なCMを含む場合、活性化可能抗体は、サンプル中の酵素の存在を検出する（定性的に又は定量的に）ために使用され得る。活性化可能抗体が還元剤による切断に対して敏感なCMを含む別の例によれば、活性化可能抗体は、サンプルにおける還元状態の存在を検出する（定性的に又は定量的に）ために使用され得る。それらの方法での分析を促進するためには、活性化可能抗体は検出可能的に標識され得、そして支持体（例えば、固体支持体、例えばスライド又はビーズ）に結合され得る。検出可能標識は、切断に続いて放出されない活性化可能抗体の一部上に位置し、例えば検出可能標識は、クエンチ蛍光標識、又は切断が生じ

10

20

30

40

50

るまで検出できない他の標識であり得る。アッセイは、例えば固定された、検出可能的に標識された活性化可能抗体と、酵素及び／又は還元剤を含む疑いがあるサンプルとを、切断が生じるのに十分な時間、接触し、次に過剰のサンプル及び汚染物を除去するために洗浄することにより実施され得る。次に、サンプル中に切断剤（例えば、酵素又は還元剤）の存在又は不在が、サンプルとの接触の前、活性化可能抗体の検出可能シグナルの変化、例えばサンプル中の切断剤による活性化可能抗体の切断による検出可能シグナルの存在及び／又は上昇により評価され得る。

#### 【 0 5 1 3 】

斯かる検出方法は、切断される場合、活性化可能抗体の A B を結合できる標的の存在又は不在の検出を提供できるよう適合され得る。従って、アッセイは、切断剤の存在又は不在、及び興味ある標的の存在又は不在を評価するように適合され得る。切断剤の存在又は不在は、上記のような活性化可能抗体の検出可能レベルでの存在及び／又は上昇により検出され得、そして標的の存在又は不在は標的 - A B 複合体の検出により、例えば検出可能的に標識された抗 - 標的抗体の使用により、検出され得る。

#### 【 0 5 1 4 】

活性化可能抗体は、例えばプロテアーゼ切断及び特定標的への結合による、活性化可能抗体活性化の検証のためのインサイチュイメージングにおいても有用である。インサイチュイメージングは、生物学的サンプル、例えば細胞培養物又は組織切片におけるタンパク質分解活性及び標的の局在化を可能にする技法である。この技法を用いて、所定の標的への結合、及び検出可能標識（たとえば、蛍光標識）の存在に基づいてのタンパク質分解活性の両者を確認することが可能である。

#### 【 0 5 1 5 】

それらの技法は、疾患部位（例えば、腫瘍組織）又は健康組織由来の任意の凍結細胞又は組織に関して有用である。それらの技法はまた、新鮮細胞又は組織サンプルに関しても有用である。

#### 【 0 5 1 6 】

それらの技法によれば、活性化可能抗体は、検出可能標識により標識される。検出可能標識は、蛍光色素（例えば、蛍光団、フルオレセインイソチオシアネート（F I T C）、ローダミンイソチオシアネート（T R I T C）、Alexa Fluor（登録商標）標識）近赤外（N I R）色素（例えば、Q d o t（登録商標）ナノ結晶）、コロイド状金属、ハプテン、放射性マーカー、ビオチン及び増幅試薬、例えばストレプトアビジン、又は酵素（例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ又はアルカリホスファターゼ）であり得る。

#### 【 0 5 1 7 】

標識された、活性化可能抗体と共にインキュベートされたサンプル中の標識の検出は、サンプルが標的を含み、そして活性化可能抗体の C M に対して特異的である、マトリプターゼ及び u P A から選択されるプロテアーゼを含むことを示唆する。いくつかの実施形態において、マトリプターゼ及び u P A から選択されるプロテアーゼの存在は、広範囲のプロテアーゼ阻害剤、例えば本明細書に記載されるそれらを用いて、及び／又はプロテアーゼに対して特異的である剤、例えばプロテアーゼであるマトリプターゼに対して特異的であり、そしてマトリプターゼのタンパク質分解活性を阻害する抗体、例えば A 1 1 を用いることにより確認され得る；例えば、国際公開番号第 W O 2 0 1 0 / 1 2 9 6 0 9 号（2010年11月11日に公開された）を参照のこと。広範囲のプロテアーゼ阻害剤、例えば本明細書に記載されるそれらを使用し、及び／又はより選択的な阻害剤を使用する同じアプローチが、活性可能抗体の C M に対して特異的であるマトリプターゼ及び u P A から選択されるプロテアーゼを同定するために使用され得る。いくつかの実施形態において、標的の存在は、標的、例えば別の抗体に対して特異的である剤を用いて確認され得、又は検出可能標識が、標識されていない標的と比較され得る。いくつかの実施形態において、標識されていない活性化可能抗体が、標識された二次抗体又はより複雑な検出システムによる検出を伴って、使用され得る。

#### 【 0 5 1 8 】

類似する技法がまた、対象、例えば哺乳類、例えばヒトにおける蛍光シグナルの検出が、疾患部位が標的を含み、そして活性化可能抗体のCMに対して特異的である、マトリプターゼ及びuPAから選択されるプロテアーゼを含むことを示唆する、インビボイメージングのためにも有用である。

#### 【0519】

それらの技法はまた、活性化可能抗体におけるプロテアーゼ - 特異的CMに基づいて、種々の細胞、組織及び生物におけるプロテアーゼの検出、同定又は特徴化のために、キットにおいて、及び/又は試薬としても有用である。

#### 【0520】

本開示はまた、種々の診断及び/又は予防徴候に、抗体及び/又は活性化可能抗体を使用するための方法も提供する。例えば、本開示は、(i)対象又はサンプルと、活性化可能抗体とを接触し、ここで前記活性化可能抗体は、マスキング部分(MM)、切断剤、例えばマトリプターゼ及びuPAから選択されるプロテアーゼにより切断される切断可能部分(CM)、及び目的の標的を特異的に結合する抗原結合ドメイン又はそのフラグメント(AB)を含み、ここで未切断、非活性化状態での活性化可能抗体は、次の通りにN末端からC末端側への構造配置：MM - CM - AB又はAB - CM - MMを有し、ここで(a)MMは、標的へのABの結合を阻害するペプチドであり、そしてMMはABの天然に存在する結合パートナーのアミノ酸配列を有さず、そしてABの天然の結合パートナーの修飾された形ではなく、そして(b)未切断、非活性化状態で、MMは標的へのABの特異的結合と干渉し、そして切断された、活性化された状態で、MMは標的へのABの特異的結合と干渉せず、又は競合せず；そして(ii)対象又はサンプルにおける活性化された活性化可能抗体のレベルを測定することにより、対象又はサンプルにおける切断剤及び目的の標的の存在又は不在を検出するための方法及びキットを提供し、ここで、対象又はサンプルにおける検出可能レベルの活性化された、活性化可能抗体は、切断剤及び標的が対象又はサンプルに存在することを示唆し、そして対象又はサンプルにおける検出可能レベルの活性化された、活性化可能抗体は、切断剤、標的、又はそれらの両者が対象又はサンプルに不在であり、そして/又は十分には存在しないことを示唆しない。いくつかの実施形態において、活性化可能抗体は、治療剤が結合される活性化可能抗体である。いくつかの実施形態において、活性化可能抗体は、剤に結合されな。いくつかの実施形態において、活性化可能抗体は、検出可能標識を含む。いくつかの実施形態において、検出可能標識は、AB上に位置する。いくつかの実施形態において、対象又はサンプルにおける活性化可能抗体のレベルの測定は、活性化された抗体に対して特異的に結合する二次試薬を用いて達成され、ここで前記試薬は検出可能標識を含む。いくつかの実施形態において、前記二次試薬は、検出可能標識を含む抗体である。

#### 【0521】

本開示は、(i)対象又はサンプルと、活性化可能抗体とを、目的の標的、例えば標的の存在下で接触し、ここで前記活性化可能抗体は、マスキング部分(MM)、切断剤、例えばマトリプターゼ及びuPAから選択されるプロテアーゼにより切断される切断可能部分(CM)、及び目的の標的を特異的に結合する抗原結合ドメイン又はそのフラグメント(AB)を含み、ここで未切断、非活性化状態での活性化可能抗体は、次の通りにN末端からC末端側への構造配置：MM - CM - AB又はAB - CM - MMを有し、ここで(a)MMは、標的へのABの結合を阻害するペプチドであり、そしてMMはABの天然に存在する結合パートナーのアミノ酸配列を有さず、そしてABの天然の結合パートナーの修飾された形ではなく、そして(b)未切断、非活性化状態で、MMは標的へのABの特異的結合と干渉し、そして切断された、活性化された状態で、MMは標的へのABの特異的結合と干渉せず、又は競合せず；そして(ii)対象又はサンプルにおける活性化された活性化可能抗体のレベルを測定することにより、対象又はサンプルにおける切断剤の存在又は不在を検出するための方法及びキットを提供し、ここで、対象又はサンプルにおける検出可能レベルの活性化された、活性化可能抗体は、切断剤が対象又はサンプルに存在することを示唆し、そして対象又はサンプルにおける検出可能レベルの活性化された、活性

10

20

30

40

50

化可能抗体が、切断剤が対象又はサンプルに不在であり、そして/又は十分には存在しないことを示唆できない。いくつかの実施形態において、活性化可能抗体は、治療剤が結合される活性化可能抗体である。いくつかの実施形態において、活性化可能抗体は、剤に結合されない。いくつかの実施形態において、活性化可能抗体は、検出可能標識を含む。いくつかの実施形態において、検出可能標識は、A B上に位置する。いくつかの実施形態において、対象又はサンプルにおける活性化可能抗体のレベルの測定は、活性化された抗体に対して特異的に結合する二次試薬を用いて達成され、ここで前記試薬は検出可能標識を含む。いくつかの実施形態において、前記二次試薬は、検出可能標識を含む抗体である。

【0522】

本開示はまた、対象又はサンプルにおける切断剤及び目的の標的の存在又は不在の検出方法への使用のためのキットも提供し、ここで前記キットは、マスキング部分(MM)、切断剤、例えばマトリプターゼ及びuPAから選択されるプロテアーゼにより切断される切断可能部分(CM)、及び目的の標的を特異的に結合する抗原結合ドメイン又はそのフラグメント(AB)を含む活性化可能抗体を少なくとも含み、ここで未切断の非活性化状態で、前記活性化可能抗体は、次の通りに、N-末端からC-末端側に構造配置を構造配置を含み：MM-CM-AB又はAB-CM-MM；ここで(a)MMは、標的へのABの結合を阻害するペプチドであり、そしてMMはABの天然に存在する結合パートナーのアミノ酸配列を有さず、そしてABの天然の結合パートナーの修飾された形ではなく、そして(b)未切断、非活性化状態で、MMは標的へのABの特異的結合と干渉し、そして切断された、活性化された状態で、MMは標的へのABの特異的結合と干渉せず、又は競合せず；そして(ii)対象又はサンプルにおける活性化された活性化可能抗体のレベルを測定することを包含し、ここで、対象又はサンプルにおける活性化された活性化可能抗体の検出可能レベルは、切断剤が対象又はサンプルに存在することを示唆し、そして対象又はサンプルにおける検出可能レベルの活性化された、活性化可能抗体は、切断剤が対象又はサンプルに不在であり、そして/又は十分には存在しないことを示唆しない。いくつかの実施形態において、活性化可能抗体は、治療剤が結合される活性化可能抗体である。いくつかの実施形態において、活性化可能抗体は、剤に結合されない。いくつかの実施形態において、活性化可能抗体は、検出可能標識を含む。いくつかの実施形態において、検出可能標識は、AB上に位置する。いくつかの実施形態において、対象又はサンプルにおける活性化可能抗体のレベルの測定は、活性化された抗体に対して特異的に結合する二次試薬を用いて達成され、ここで前記試薬は検出可能標識を含む。いくつかの実施形態において、前記二次試薬は、検出可能標識を含む抗体である。

【0523】

本開示は、(i)対象又はサンプルと、活性化可能抗体とを接触し、ここで前記活性化可能抗体は、マスキング部分(MM)、切断剤、例えばマトリプターゼ及びuPAから選択されるプロテアーゼにより切断される切断可能部分(CM)、標的を特異的に結合する抗原結合ドメイン(AB)、及び検出可能標識を含み、ここで未切断、非活性化状態での活性化可能抗体は、次の通りにN末端からC末端側への構造配置：MM-CM-AB又はAB-CM-MMを有し；ここでMMは、標的へのABの結合を阻害するペプチドであり、そしてMMはABの天然に存在する結合パートナーのアミノ酸配列を有さず、そしてABの天然の結合パートナーの修飾された形ではなく；そして未切断、非活性化状態で、MMは標的へのABの特異的結合と干渉し、そして切断された、活性化された状態で、MMは標的へのABの特異的結合と干渉せず、又は競合せず；そして検出可能標識が、CMの切断に続いて放出される活性化可能抗体の一部を位置決定され；そして(ii)対象又はサンプルにおける検出可能標識のレベルを測定することにより、対象又はサンプルにおける切断剤の存在又は不在を検出するための方法を提供し、ここで、対象又はサンプルにおける検出可能標識の検出可能レベルは、切断剤が対象又はサンプルに不在であり、そして/又は十分には存在しないことを示唆し、そして対象又はサンプルにおける検出可能標識の検出可能レベルが、切断剤が対象又はサンプルに存在することを示唆しない。いくつかの実施形態において、活性化可能抗体は、治療剤が結合される活性化可能抗体である。い

10

20

30

40

50

いくつかの実施形態において、活性化可能抗体は、剤に結合されない。いくつかの実施形態において、活性化可能抗体は、検出可能標識を含む。いくつかの実施形態において、検出可能標識は、A B上に位置する。いくつかの実施形態において、対象又はサンプルにおける活性化可能抗体のレベルの測定は、活性化された抗体に対して特異的に結合する二次試薬を用いて達成され、ここで前記試薬は検出可能標識を含む。いくつかの実施形態において、前記二次試薬は、検出可能標識を含む抗体である。

#### 【0524】

本開示はまた、対象又はサンプルにおける切断剤及び目的の標的の存在又は不在の検出方法への使用のためのキットも提供し、ここで前記キットは、対象又は生物学的サンプルの接触に使用するための本明細書に記載される活性化可能抗体及び/又は複合活性化可能抗体（例えば、治療剤が結合される活性化可能抗体）、及び対象又は生物学的サンプルにおける活性化可能抗体及び/又は複合活性化可能抗体のレベルを検出するための手段を、少なくとも包含し、ここで、対象又は生物学的サンプルにおける活性化された活性化可能抗体の検出可能レベルが、切断剤及び標的が対象又は生物学的サンプルに存在することを示唆し、そして対象又は生物学的サンプルにおける活性化された活性化可能抗体の検出可能レベルが、切断剤及び標的が対象又は生物学的サンプルに不在であり、そして/又は十分には存在しないことを示唆せず、結果的に、活性化可能抗体の標的結合及び/又はプロテアーゼ切断は、対象又は生物学的サンプルにおいては検出され得ない。

#### 【0525】

本開示はまた、(i) 対象又は生物学的サンプルと、活性化可能抗体とを、標的の存在下で接触し、そして(ii) 対象又は生物学的サンプルにおける活性化された活性化可能抗体のレベルを測定することにより、対象又はサンプルにおける切断剤の存在又は不在を検出するための方法を提供し、ここで、対象又は生物学的サンプルにおける活性化された、活性化可能抗体の検出可能レベルは、切断剤が対象又は生物学的サンプルに存在することを示唆し、そして対象又は生物学的サンプルにおける活性化された、活性化可能抗体の検出可能レベルが、切断剤が対象又は生物学的サンプルにおいて、検出可能レベルで不在であり、そして/又は十分には存在しないことを示唆できずない。斯かる活性化可能抗体は、マスキング部分(MM)、切断剤、例えばマトリプターゼ及びuPAから選択されるプロテアーゼにより切断される切断可能部分(CM)、及び目的の標的を特異的に結合する抗原結合ドメイン又はそのフラグメント(AB)を含み、ここで未切断（すなわち、活性化されていない）状態での活性化可能抗体は、次の通りにN末端からC末端側への構造配置：MM - CM - AB又はAB - CM - MMを有し、ここで(a) MMは、標的へのABの結合を阻害するペプチドであり、そしてMMはABの天然に存在する結合パートナーのアミノ酸配列を有さず、そして(b) 未切断状態で、活性化可能抗体のMMは標的へのABの特異的結合と干渉し、そして切断された（すなわち、活性化された）状態で、MMは標的へのABの特異的結合と干渉せず、又は競合しない。いくつかの実施形態において、活性化可能抗体は、治療剤が結合される活性化可能抗体である。いくつかの実施形態において、活性化可能抗体は、剤に結合されない。いくつかの実施形態において、検出可能標識はマスキング部分に結合される。いくつかの実施形態において、検出可能標識は、プロテアーゼ切断部分のN末端側の切断部分に結合される。いくつかの実施形態において、ABの単一抗体結合部位がマスキングされる。本開示の抗体が少なくとも2種の抗原結合部位を有するいくつかの実施形態において、少なくとも1つの抗原結合部位がマスキングされ、そして少なくとも1つの抗原結合部位はマスキングされない。いくつかの実施形態において、すべての抗原結合部位はマスキングされない。いくつかの実施形態において、測定段階は、検出可能標識を含む第2試薬の使用を包含する。

#### 【0526】

本開示はまた、対象又はサンプルにおける切断剤及び目的の標的の存在又は不在の検出方法への使用のためのキットも提供し、ここで前記キットは、対象又は生物学的サンプルと、活性化可能抗体とを、標的の存在下で接触し、そして対象又は生物学的サンプルにおける活性化された活性化可能抗体のレベルを測定することへの使用のために本明細書に記

10

20

30

40

50

載される活性化可能抗体及び／又は複合活性化可能抗体を少なくとも含み、ここで対象又は生物学的サンプルにおける活性化された、活性化可能抗体の検出可能レベルは、切断剤が対象又は生物学的サンプルに存在することを示唆し、そして対象又は生物学的サンプルにおける活性化された、活性化可能抗体の検出可能レベルが、切断剤が対象又は生物学的サンプルにおいて、検出可能レベルで不在であり、そして／又は十分には存在しないことを示唆できない。斯かる活性化可能抗体は、マスキング部分（MM）、切断剤、例えばマトリプターゼ及びuPAから選択されるプロテアーゼにより切断される切断可能部分（CM）、及び標的を特異的に結合する抗原結合ドメイン又はそのフラグメント（AB）を含み、ここで未切断（すなわち、活性化されていない）状態での活性化可能抗体は、次の通りにN末端からC末端側への構造配置：MM - CM - AB又はAB - CM - MMを有し、ここで（a）MMは、標的へのABの結合を阻害するペプチドであり、そしてMMはABの天然に存在する結合パートナーのアミノ酸配列を有さず、そして（b）未切断状態で、活性化可能抗体のMMは標的へのABの特異的結合と干渉し、そして切断された（すなわち、活性化された）状態で、活性化可能抗体のMMは標的へのABの特異的結合と干渉せず、又は競合しない。いくつかの実施形態において、検出可能標識はマスキング部分に結合される。いくつかの実施形態において、活性化可能抗体は、治療剤が結合される活性化可能抗体である。いくつかの実施形態において、活性化可能抗体は、剤に結合されない。いくつかの実施形態において、検出可能標識はマスキング部分に結合される。いくつかの実施形態において、検出可能標識は、プロテアーゼ切断部分のN末端側の切断部分に結合される。いくつかの実施形態において、ABの単一抗体結合部位がマスキングされる。本開示の抗体が少なくとも2種の抗原結合部位を有するいくつかの実施形態において、少なくとも1つの抗原結合部位がマスキングされ、そして少なくとも1つの抗原結合部位はマスキングされない。いくつかの実施形態において、すべての抗原結合部位はマスキングされない。いくつかの実施形態において、測定段階は、検出可能標識を含む第2試薬の使用を包含する。

#### 【0527】

本開示はまた、対象又はサンプルにおける切断剤の存在又は不在の検出方法への使用のためのキットも提供し、ここで前記キットは、対象又は生物学的サンプルの接触に使用するための本明細書に記載される活性化可能抗体及び／又は複合活性化可能抗体、及び対象又は生物学的サンプルにおける活性化された活性化可能抗体及び／又は複合活性化可能抗体のレベルを検出するための手段を、少なくとも包含し、ここで活性化可能抗体は、CMの切断に続いて放出される活性化可能抗体の一部に基づいて位置決定される検出可能標識を含み、ここで対象又は生物学的サンプルにおける活性化された活性化可能抗体の検出可能レベルは、切断剤が、対象又は生物学的サンプルに不在であり、そして／又は十分に存在しないことを示唆し、結果的に、活性化可能抗体の標的結合及び／又はプロテアーゼ切断は対象又は生物学的サンプルには検出され得ず、そして対象又は生物学的サンプルにおける活性化された抗体の検出可能レベルは、切断剤が対象又は生物学的サンプルに検出可能レベルで存在することを示唆しない。

#### 【0528】

本開示は、（i）対象又は生物学的サンプルと、活性化可能抗体とを接触し、ここで前記活性化可能抗体は、CMの切断に続いて放出される活性化可能抗体の一部に基づいて位置決定される検出可能標識を含み、そして（ii）前記対象又は生物学的サンプルにおける活性化された、活性化可能抗体のレベルを測定することにより、対象又は生物学的サンプルにおける活性化された、活性化可能抗体のレベルを測定することにより、対象又は生物学的における切断剤及び標的の存在又は不在を検出するための方法を提供し、ここで対象又は生物学的サンプルにおける活性化された活性化可能抗体の検出可能レベルが、切断剤、標的、又は切断剤及び標的の両者が、対象又は生物学的サンプルに不在であり、そして／又は十分に存在しないことを示唆し、結果的に、活性化可能抗体の標的結合及び／又はプロテアーゼ切断は対象又は生物学的サンプルには検出され得ず、そして前記対象又は生物学的サンプル中の活性化された、活性化可能抗体の低められた検出可能レベルが、切



断剤及び標的が対象又は生物学的サンプルに存在することを示唆する。検出可能標識の低められたレベルは例えば、約 5 %、約 10 %、約 15 %、約 20 %、約 25 %、約 30 %、約 35 %、約 40 %、約 45 %、約 50 %、約 55 %、約 60 %、約 65 %、約 70 %、約 75 %、約 80 %、約 85 %、約 90 %、約 95 % 及び/又は約 100 % の低下率である。斯かる活性化可能抗体は、マスキング部分 (MM)、切断剤により切断される切断可能部分 (CM)、及び標的を特異的に結合する抗原結合ドメイン又はそのフラグメント (AB) を含み、ここで未切断 (すなわち、活性化されていない) 状態での活性化可能抗体は、次の通りに N 末端から C 末端側への構造配置: MM - CM - AB 又は AB - CM - MM を有し、ここで (a) MM は、標的への AB の結合を阻害するペプチドであり、そして MM は AB の天然に存在する結合パートナーのアミノ酸配列を有さず、そして (b) 未切断状態で、活性化可能抗体の MM は標的への AB の特異的結合と干渉し、そして切断された (すなわち、活性化された) 状態で、活性化可能抗体の MM は標的への AB の特異的結合と干渉せず、又は競合しない。いくつかの実施形態において、活性化可能抗体は、治療剤が結合される活性化可能抗体である。いくつかの実施形態において、活性化可能抗体は、剤に結合されない。いくつかの実施形態において、活性化可能抗体は、検出可能標識である。いくつかの実施形態において、検出可能標識は、AB 上に位置決定される。いくつかの実施形態において、対象又はサンプル中の活性化可能抗体のレベルの測定は、活性化された抗体に対して特異的に結合する第 2 試薬を用いて達成され、ここで前記試薬は検出可能標識を含む。いくつかの実施形態において、第 2 試薬は、検出可能標識を含む抗体である。

#### 【0529】

本開示はまた、対象又はサンプルにおける切断剤及び目的の標的の存在又は不在の検出方法への使用のためのキットも提供し、ここで前記キットは、対象又は生物学的サンプルの接触に使用するための本明細書に記載される活性化可能抗体及び/又は複合活性化可能抗体、及び対象又は生物学的サンプルにおける活性化された活性化可能抗体及び/又は複合活性化可能抗体のレベルを検出するための手段を、少なくとも包含し、ここで対象又は生物学的サンプルにおける活性化された活性化可能抗体の検出可能レベルは、切断剤、標的、又は切断剤及び標的の両者が、対象又は生物学的サンプルに不在であり、そして/又は十分に存在しないことを示唆し、結果的に、活性化可能抗体の標的結合及び/又はプロテアーゼ切断は対象又は生物学的サンプルには検出され得ず、そして前記対象又は生物学的サンプル中の活性化された、活性化可能抗体の低められた検出可能レベルが、切断剤及び標的が対象又は生物学的サンプルに存在することを示唆する。検出可能標識の低められたレベルは例えば、約 5 %、約 10 %、約 15 %、約 20 %、約 25 %、約 30 %、約 35 %、約 40 %、約 45 %、約 50 %、約 55 %、約 60 %、約 65 %、約 70 %、約 75 %、約 80 %、約 85 %、約 90 %、約 95 % 及び/又は約 100 % の低下率である。

#### 【0530】

本開示はまた、(i) 対象又は生物学的サンプルと、活性化可能抗体とを接触し、ここで前記活性化可能抗体は、CM の切断に続いて放出される活性化可能抗体の一部に基づいて位置決定される検出可能標識を含み、そして (ii) 前記対象又は生物学的サンプルにおける検出可能標識のレベルを測定することにより、対象又は生物学的サンプルにおける活性化された、活性化可能抗体のレベルを測定することにより、対象又は生物学的における切断剤の存在又は不在を検出するための方法を提供し、ここで対象又は生物学的サンプルにおける検出可能レベルが、切断剤が、検出可能レベルで、対象又は生物学的サンプルに不在であり、そして/又は十分に存在しないことを示唆し、結果的に、活性化可能抗体のプロテアーゼ切断は対象又は生物学的サンプルには検出され得ず、そして前記対象又は生物学的サンプル中の検出可能レベルの低められた検出可能レベルが、切断剤が対象又は生物学的サンプルに存在することを示唆する。検出可能標識の低められたレベルは例えば、約 5 %、約 10 %、約 15 %、約 20 %、約 25 %、約 30 %、約 35 %、約 40 %、約 45 %、約 50 %、約 55 %、約 60 %、約 65 %、約 70 %、約 75

%、約 80%、約 85%、約 90%、約 95% 及び/又は約 100%の低下率である。斯かる活性化可能抗体は、マスキング部分(MM)、切断剤により切断される切断可能部分(CM)、及び標的を特異的に結合する抗原結合ドメイン又はそのフラグメント(AB)を含み、ここで未切断(すなわち、活性化されていない)状態での活性化可能抗体は、次の通りにN末端からC末端側への構造配置: MM - CM - AB又はAB - CM - MMを有し、ここで(a)MMは、標的へのABの結合を阻害するペプチドであり、そしてMMはABの天然に存在する結合パートナーのアミノ酸配列を有さず、そして(b)未切断状態で、活性化可能抗体のMMは標的へのABの特異的結合と干渉し、そして切断された(すなわち、活性化された)状態で、活性化可能抗体のMMは標的へのABの特異的結合と干渉せず、又は競合しない。いくつかの実施形態において、活性化可能抗体は、治療剤が結合される活性化可能抗体である。いくつかの実施形態において、活性化可能抗体は、剤に結合されない。いくつかの実施形態において、活性化可能抗体は、検出可能標識である。いくつかの実施形態において、検出可能標識は、AB上に位置決定される。いくつかの実施形態において、対象又はサンプル中の活性化可能抗体のレベルの測定は、活性化された抗体に対して特異的に結合する第2試薬を用いて達成され、ここで前記試薬は検出可能標識を含む。いくつかの実施形態において、第2試薬は、検出可能標識を含む抗体である。

10

#### 【0531】

本開示はまた、対象又はサンプルにおける目的の切断剤の存在又は不在の検出方法への使用のためのキットも提供し、ここで前記キットは、対象又は生物学的サンプルの接触に使用するための本明細書に記載される活性化可能抗体及び/又は複合活性化可能抗体、及び対象又は生物学的サンプルにおける活性化された活性化可能抗体及び/又は複合活性化可能抗体のレベルを検出するための手段を、少なくとも包含し、ここで活性化可能抗体は、CMの切断に続いて放出される活性化可能抗体の一部に基づいて位置決定される検出可能標識を含み、ここで対象又は生物学的サンプルにおける検出可能標識の検出可能レベルは、切断剤、標的、又は断剤、標的の両者が、対象又は生物学的サンプルに不在であり、そして/又は十分に存在しないことを示唆し、結果的に、活性化可能抗体の標的結合及び/又はプロテアーゼ切断は対象又は生物学的サンプルには検出され得ず、そして前記対象又は生物学的サンプル中の検出可能標識の検出可能レベルが、切断剤及び標的が対象又は生物学的サンプルに存在することを示唆する。検出可能標識の低められたレベルは例えば、約5%、約10%、約15%、約20%、約25%、約30%、約35%、約40%、約45%、約50%、約55%、約60%、約65%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約95%及び/又は約100%の低下率である。

20

30

#### 【0532】

それらの方法及びキットのいくつかの実施形態において、活性化可能抗体は、検出可能標識を含む。それらの方法及びキットのいくつかの実施形態において、検出可能標識は、イメージング剤、造影剤、酵素、蛍光標識、発色団、色素、1又は2以上の金属イオン、又はリガンド系標識を含む。それらの方法及びキットのいくつかの実施形態において、イメージング剤は、放射性同位体を含む。それらの方法及びキットのいくつかの実施形態において、放射性同位体は、インジウム又はテクネチウムである。それらの方法及びキットのいくつかの実施形態において、造影剤は、ヨウ素、ガドリニウム又は酸化鉄を含む。それらの方法及びキットのいくつかの実施形態において、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又は - ガラクトシダーゼを含む。それらの方法及びキットのいくつかの実施形態において、発光標識は、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)、修正赤色蛍光タンパク質(mRFP)、赤色蛍光タンパク質tdimer2(RFP tdimer2)、HCR ED、又はユーロピウム誘導体を包含する。それらの方法及びキットのいくつかの実施形態において、発光標識は、N - メチルアクリジウム誘導体を含む。それらの方法及びキットのいくつかの実施形態において、標識は、Alexa Fluor(登録商標)標識、例えばAlex Fluor(登録商標)

40

50

680又はAlexa Fluor（登録商標）750を包含する。それらの方法及びキットのいくつかの実施形態において、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、又は1又は2以上のハプテンを包含する。

【0533】

それらの方法及びキットのいくつかの実施形態において、対象は哺乳類である。それらの方法及びキットのいくつかの実施形態において、対象はヒトである。それらの方法及びキットのいくつかの実施形態において、対象は非ヒト哺乳類、例えば非ヒト霊長類、愛玩動物（例えば、ネコ、イヌ、ウマ）、家畜、作業動物又は動物園の動物である。いくつかの実施形態において、対象は齧歯動物である。

【0534】

それらの方法のいくつかの実施形態において、前記方法は、インビボ方法である。それらの方法のいくつかの実施形態において、前記方法は、現場方法である。それらの方法のいくつかの実施形態において、前記方法は、エクスピボ方法である。それらの方法のいくつかの実施形態において、前記方法は、インビトロ方法である。

【0535】

いくつかの実施形態において、インサイチュイメーキング及び／又はインビボイメーキングは、治療する患者を同定する方法において有用である。例えば、インサイチュイメーキングによれば、活性化可能抗体は、適切な位置で、例えば腫瘍部位で、適切なプロテアーゼ及び標的を有するそれらの患者を同定するために、患者サンプルをスクリーニングするために使用される。

【0536】

いくつかの実施形態において、インサイチュイメーキングが、本開示の活性化可能抗体による治療のために適切な患者集団を同定するか、又は他方では、細分するために使用される。標的（例えば、標的）、及び試験される活性化可能抗体の切断可能部分（CM）（例えば、疾患部位で活性化抗体を蓄積する）における基質を切断するプロテアーゼの両者に対して陽性の患者が、斯かるCMを含む活性化可能抗体による治療のための適切な候補として同定される。同様に、標的（例えば、標的）、及びそれらの方法を用いて試験される活性化可能抗体中のCMにおいて基質を切断するプロテアーゼのいずれか又は両者に対して陰性の患者が、別の形の療法のための適切な候補として同定されるであろう。いくつかの実施形態において、第1の活性化可能抗体に関して陰性のそのような患者は、治療のための適切な活性化可能抗体（例えば、疾患の部位で患者により切断されるCMを含む活性化可能抗体）が同定されるまで、異なったCMを含む他の活性化可能抗体により試験され得る。いくつかの実施形態において、患者は次に、該患者が検査でそれに関して陽性であった複合活性化可能抗体の治療上有効な量が投与される。

【0537】

いくつかの実施形態において、インビボイメーキングは、本開示の活性化可能抗体による治療のために適切な患者集団を同定するか又は細分するために使用される。標的（例えば、標的）、及び試験される活性化可能抗体の切断可能部分（CM）（例えば、疾患部位で活性化抗体を蓄積する）における基質を切断するプロテアーゼの両者に対して陽性の患者が、斯かるCMを含む斯かる活性化可能抗体による治療のための適切な候補として同定される。同様に、陰性の患者が、別の形の療法（すなわち、試験される活性化可能抗体による治療のためには適切でない）のための適切な候補として同定されるであろう。いくつかの実施形態において、第1の活性化可能抗体に関して陰性のそのような患者は、治療のための適切な活性化可能抗体（例えば、疾患の部位で患者により切断されるCMを含む活性化可能抗体）が同定されるまで、異なったCMを含む他の活性化可能抗体により試験され得る。いくつかの実施形態において、患者は次に、該患者が検査でそれに関して陽性であった複合活性化可能抗体の治療上有効な量が投与される。

【0538】

それらの方法及び／又はキットのいくつかの実施形態において、方法及び／又はキットは、開示の活性化可能抗体による治療のために適切な患者集団を同定するか、又は他方で

10

20

30

40

50

は、細分し、例えば層別化するために使用される。例えば、標的（例えば、標的）及びそれらの方法において試験される活性化可能抗体の切断部分（ＣＭ）において基質を切断するプロテアーゼの両者について検査陽性である患者は、斯かるＣＭを含む斯かる活性化可能抗体による治療のための適切な候補として同定される。同様に、標的（例えば、標的）、及びそれらの方法を用いて試験される活性化可能抗体中のＣＭにおける基質を切断するプロテアーゼのいずれか又は両者について検査陰性である患者は、別の治療形のための適切な候補として同定される（すなわち、試験される活性化可能抗体による治療のために適切でない）。いくつかの実施形態において、そのような患者は、治療のための適切な活性化可能抗体（例えば、患者の部位で患者により切断されるＣＭを含む抗－ＥＧＦＲ活性化可能抗体）が同定されるまで、他の活性化可能抗体により検査され得る。いくつかの実施形態において、標的（例えば、標的）のいずれかに対して陰性である患者は、斯かるＣＭを含む斯かる活性化可能抗体による治療のための適切な候補として同定される。いくつかの実施形態において、標的（例えば、標的）のいずれかに対して陰性である患者は、斯かるＣＭを含む斯かる活性化可能抗体による治療のための適切な候補ではないものとして同定される。いくつかの実施形態において、そのような患者は、治療のための適切な活性化可能抗体（例えば、患者の部位で患者により切断されるＣＭを含む抗－ＥＧＦＲ活性化可能抗体）が同定されるまで、他の活性化可能抗体により検査され得る。いくつかの実施形態において、活性化可能抗体は、治療剤が結合される活性化可能抗体である。いくつかの実施形態において、活性化可能抗体は、剤に結合されな。いくつかの実施形態において、活性化可能抗体は、検出可能標識を含む。いくつかの実施形態において、検出可能標識は、ＡＢ上に位置する。いくつかの実施形態において、対象又はサンプルにおける活性化可能抗体のレベルの測定は、活性化された抗体に対して特異的に結合する二次試薬を用いて達成され、ここで前記試薬は検出可能標識を含む。いくつかの実施形態において、前記二次試薬は、検出可能標識を含む抗体である。

#### 【０５３９】

いくつかの実施形態において、開示の活性化可能抗体及び／又は複合活性化可能抗体（例えば、治療剤が結合される活性化可能抗体）による治療、活性化可能抗体及び／又は複合活性化可能抗体を、その必要な対象に投与することによる続く治療のために適切な患者集団を同定するか、又は他方では、細分するために、方法又はキットが使用される。例えば、標的（例えば、標的）、及びそれらの方法において試験される活性化可能抗体及び／又は複合活性化可能抗体の切断可能部分（ＣＭ）における基質を切断するプロテアーゼの両者についての検査で陽性である患者が、斯かるＣＭを含む斯かる抗体及び／又は斯かる複合活性化可能抗体による治療のための適切な候補として同定され、そして次に、前記患者は、治療的有效量の試験された活性化可能抗体及び／又は複合活性化可能抗体を投与される。同様に、標的（例えば、標的）、及びそれらの方法を用いて試験される活性化可能抗体のＣＭにおける基質を切断するプロテアーゼのいずれか、又は両者についての検査で陰性である患者は、別の形の治療のための適切な候補として同定され得る。いくつかの実施形態において、そのような患者は、治療のための適切な抗体及び／又は複合活性化可能抗体（例えば、疾患の部位で患者により切断されるＣＭを含む、活性化可能抗体及び／又は複合活性化可能抗体）が同定されるまで、他の抗体及び／又は複合活性化可能抗体により試験され得る。いくつかの実施形態において、次に、検査で陽性であった患者は、治療的有效量の活性化可能抗体及び／又は複合活性化可能抗体を投与される。

#### 【０５４０】

それらの方法及びキットのいくつかの実施形態において、ＭＭは、約４～４０個の長さのアミノ酸を有するペプチドである。それらの方法及びキットのいくつかの実施形態において、活性化可能抗体は、リンカーペプチドを含み、ここで前記リンカーペプチドは、ＭＭとＣＭとの間に位置する。それらの方法及びキットのいくつかの実施形態において、活性化可能抗体は、リンカーペプチドを含み、ここで前記リンカーペプチドは、ＡＢとＣＭとの間に位置する。それらの方法及びキットのいくつかの実施形態において、活性化可能抗体は、第１リンカーペプチド（Ｌ１）及び第２リンカーペプチド（Ｌ２）を含み、ここ

10

20

30

40

50

で前記第1リンカーペプチドはMMとCMとの間に位置し、そして前記第2リンカーペプチドはABとCMとの間に位置する。それらの方法及びキットのいくつかの実施形態において、各L1及びL2は約1～20個の長さのアミノ酸のペプチドであり、そして各L1及びL2は同じリンカーである必要はない。それらの方法及びキットのいくつかの実施形態において、L1及びL2の1つ又は両者は、グリシン-セリンポリマーである。それらの方法及びキットのいくつかの実施形態において、L1及びL2の少なくとも1つは、(GS)<sub>n</sub>、(GSGGS)<sub>n</sub> (配列番号385)及び(GGGS)<sub>n</sub> (配列番号386) (ここで、nは少なくとも1つの整数である) から成る群から選択されたアミノ酸配列を含む。それらの方法及びキットのいくつかの実施形態において、L1及びL2の少なくとも1つは、式(GGS)<sub>n</sub> (ここで、nは少なくとも1の整数である) を有するアミノ酸配列を含む。それらの方法及びキットのいくつかの実施形態において、L1及びL2の少なくとも1つは、Gly-Gly-Ser-Gly (配列番号387)、Gly-Gly-Ser-Gly-Gly (配列番号388)、Gly-Ser-Gly-Ser-Gly (配列番号389)、Gly-Ser-Gly-Gly-Gly (配列番号390)、Gly-Gly-Gly-Ser-Gly (配列番号391)及びGly-Ser-Ser-Ser-Gly (配列番号392)から成る群から選択されたアミノ酸配列を含む。

10

**【0541】**

それらの方法及びキットのいくつかの実施形態において、ABは、本明細書に提供される交差反応性抗体配列から選択された抗体又は抗体フラグメント配列を含む。それらの方法及びキットのいくつかの実施形態において、ABは、Fabフラグメント、scFv又は単鎖抗体(scAb)を含む。

20

**【0542】**

それらの方法及びキットのいくつかの実施形態において、切断剤は、標的と、対象又はサンプルにおいて共局在するプロテアーゼであり、そしてCMはプロテアーゼのための基質として機能するポリペプチドであり、ここで、活性化可能抗体がプロテアーゼに供される場合、前記プロテアーゼは、活性化可能抗体におけるCMを切断する。それらの方法及びキットのいくつかの実施形態において、CMは、15個までの長さのアミノ酸ポリペプチドである。それらの方法及びキットのいくつかの実施形態において、CMは、ABのN末端にカップリングされる。それらの方法及びキットのいくつかの実施形態において、CMは、ABのC末端にカップリングされる。それらの方法及びキットのいくつかの実施形態において、CMは、ABのVL鎖のN末端にカップリングされる。

30

**【0543】**

本開示の活性化可能抗体及び/又は複合活性化可能抗体は、診断及び予防製剤に使用される。1つの実施形態において、活性化可能抗体は、1若しくは複数の前述の癌又は線維症を発症する危険性がある患者に投与される。

**【0544】**

炎症、炎症性疾患、癌又は他の障害の1若しくは複数に対する患者又は器官の素因は、遺伝子型、血清学的又は生化学的マーカーを用いて決定され得る。

**【0545】**

本開示のいくつかの実施形態において、活性化可能抗体及び/又は複合活性化可能抗体は、1若しくは複数の前述の障害に関連する臨床学的徴候を有するものとして診断されたヒト個人に投与される。診断に基づいて、活性化可能抗体及び/又は複合活性化可能抗体は、臨床学的徴候の効果を軽減するか又は無効にするために投与される。

40

**【0546】**

本開示の活性化可能抗体及び/又は複合活性化可能抗体はまた、患者サンプルにおける標的の検出においても有用であり、そして従って、診断としても有用である。例えば、本開示の抗体及び/又は活性化可能抗体は、患者サンプルにおける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に使用される。

**【0547】**

1つの実施形態において、本開示の活性化可能抗体は、固体支持体(例えば、マイクロ

50

タイタープレート（ウェル）上に固定される。固定された活性化可能抗体は、試験サンプルに存在できるいずれかの標的のための保護抗体として機能する。患者サンプルと固定された抗体との接触の前、固体支持体は、すすがれ、そしてブロッキング剤、例えば乳タンパク質又はアルブミンにより、分析物の非特異的吸着を妨げるために処理される。

【0548】

結果的に、ウェルは、抗原を含む疑いのある試験サンプル、又は標準量の抗原と含む溶液により処理される。斯かるサンプルは例えば、病理学の診断であると見なされるレベルの循環抗体を有する疑いのある対象からの血清サンプルである。試験サンプル又は標準をすすいだ後、固体支持体は、検出可能的に標識される二次抗体により処理される。標識された二次抗体は、検出抗体として作用する。検出可能標識のレベルが測定され、そして試験サンプル中の標的抗原の濃度が、標識サンプルから得られる標準曲線との比較により決定される。

10

【0549】

インビトロ診断アッセイで本開示の抗体を用いて得られる結果に基づけば、標的抗体の発現レベルに基づいて対象における疾患を段階的に分けることが可能であることが理解されるであろう。所定の疾患に関しては、血液サンプルが疾患の進行における種々の段階であるものとして診断された患者から、及び／又は疾患の治療処置における種々の点で採取される。進行又は治療の各段階について統計学的に有意な結果を提供するサンプル集団を用いて、各段階の特性と考えられ得る抗原の濃度範囲が示される。

【0550】

20

活性化可能抗体及び／又は複合活性化可能抗体はまた、診断及び／又はイメージング方法にも使用され得る。いくつかの実施形態において、斯かる方法は、インビトロ方法である。いくつかの実施形態において、斯かる方法は、インビボ方法である。いくつかの実施形態において、斯かる方法は、インサイチュ方法である。いくつかの実施形態において、斯かる方法はエクスピボ方法である。例えば、酵素切断できるCMを有する活性化可能抗体は、CMを切断できる酵素の存在又は不在を検出するために使用され得る。斯かる活性化可能抗体は、所定の宿主生物の所定の細胞又は組織における活性化された抗体（すなわち、活性化可能抗体の切断に起因する抗体）の測定される蓄積を通して酵素活性（又は、いくつかの実施形態において、ジスルフィド結合の還元を提供することができる高められた還元電位の環境）のインビボ検出（例えば、定性的又は定量的）を包含することができる診断に使用され得る。活性化された抗体のそのような蓄積は、組織が酵素活性（又はCMの性質に依存する高められた還元電位）を表すことを示すのみならず、また組織が活性化された抗体が結合する標的を表すことも示唆する。

30

【0551】

例えば、CMは、腫瘍の部位で、ウィルス又は細菌感染の部位で、生成学的に制限された部位で（例えば、膿瘍において、器官において、及び同様に）、及び同様の部位で見出されるプロテアーゼのためのプロテアーゼ基質として選択され得る。ABは、標的抗原を結合するものである。本明細書中に開示した方法、又は適切であれば当業者になじみの方法を用いて、検出可能標識（例えば、蛍光標識又は放射性標識又は放射性トレーサー）は、AB、又は活性化可能抗体の他の領域に結合され得る。適切な検出可能標識は、上記スクリーニング方法において論じられ、そして追加の特定の例が下記に提供される。その活性が興味ある疾患組織において高められるプロテアーゼと共に、病状のタンパク質又はペプチドに対して特異的なABを用いて、活性化可能抗体は、CM特異的酵素が検出可能レベルで存在しないか、又は疾患組織においてよりも低いレベルで存在するか、又は不活性である（例えば、チモーゲン形で、又は阻害剤との複合体下で）、組織と比較して、疾患組織への結合率の増加を示すであろう。小タンパク質及びペプチドは腎臓濾過システムにより血液から急速にクリアランスされるので、及びCMに対して特異的な酵素は検出可能レベルで存在しないので（又は非疾患組織に低レベルで存在するか、又は不活性コンホメーション下で存在する）、疾患組織における活性化された抗体の蓄積は、非疾患組織に対して増強される。

40

50

## 【 0 5 5 2 】

別の例によれば、活性化可能抗体は、サンプルにおける切断剤の存在又は不在を検出するために使用され得る。例えば、活性化可能抗体が酸素による切断に対して敏感なCMを含む場合、活性化可能抗体は、サンプル中の酵素の存在を検出する（定性的に又は定量的に）ために使用され得る。活性化可能抗体が還元剤による切断に対して敏感なCMを含む別の例によれば、活性化可能抗体は、サンプルにおける還元状態の存在を検出する（定性的に又は定量的に）ために使用され得る。それらの方法での分析を促進するためには、活性化可能抗体は検出可能的に標識され得、そして支持体（例えば、固体支持体、例えばスライド又はビーズ）に結合され得る。検出可能標識は、切断に続いて放出されない活性化可能抗体の一部上に位置し、例えば検出可能標識は、クエンチ蛍光標識、又は切断が生じるまで検出できない他の標識であり得る。アッセイは、例えば固定された、検出可能的に標識された活性化可能抗体と、酵素及び／又は還元剤を含む疑いがあるサンプルとを、切断が生じるのに十分な時間、接触し、次に過剰のサンプル及び汚染物を除去するために洗浄することにより実施され得る。次に、サンプル中に切断剤（例えば、酵素又は還元剤）の存在又は不在が、サンプルとの接触の前、活性化可能抗体の検出可能シグナルの変化、例えばサンプル中の切断剤による活性化可能抗体の切断による検出可能シグナルの存在及び／又は上昇により評価され得る。

10

## 【 0 5 5 3 】

斯かる検出方法は、切断される場合、活性化可能抗体のABを結合できる標的の存在又は不在の検出を提供できるよう適合され得る。従って、アッセイは、切断剤の存在又は不在、及び興味ある標的の存在又は不在を評価するように適合され得る。切断剤の存在又は不在は、上記のような活性化可能抗体の検出可能レベルでの存在及び／又は上昇により検出され得、そして標的の存在又は不在は標的-AB複合体の検出により、例えば検出可能的に標識された抗-標的抗体の使用により、検出され得る。

20

## 【 0 5 5 4 】

活性化可能抗体は、例えばプロテアーゼ切断及び特定標的への結合による、活性化可能抗体活性化の検証のためのインサイチュイメージングにおいても有用である。インサイチュイメージングは、生物学的サンプル、例えば細胞培養物又は組織切片におけるタンパク質分解活性及び標的の局在化を可能にする技法である。この技法を用いて、所定の標的への結合、及び検出可能標識（たとえば、蛍光標識）の存在に基づいてのタンパク質分解活性の両者を確認することが可能である。

30

## 【 0 5 5 5 】

それらの技法は、疾患部位（例えば、腫瘍組織）又は健康組織由来の任意の凍結細胞又は組織に関して有用である。それらの技法はまた、新鮮細胞又は組織サンプルに関しても有用である。

## 【 0 5 5 6 】

それらの技法によれば、活性化可能抗体は、検出可能標識により標識される。検出可能標識は、蛍光色素（例えば、フルオレセインイソチシアネート（FITC）、ローダミンイソチシアネート（TRITC））近赤外（NIR）色素（例えば、Qdot（登録商標）ナノ結晶）、コロイド状金属、ハプテン、放射性マーカー、ビオチン及び増幅試薬、例えばストレプトアビジン、又は酵素（例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ又はアルカリホスファターゼ）であり得る。

40

## 【 0 5 5 7 】

標識された、活性化可能抗体と共にインキュベートされたサンプル中の標識の検出は、サンプルが標的を含み、そして活性化可能抗体のCMに対して特異的である、プロテアーゼを含むことを示唆する。いくつかの実施形態において、プロテアーゼの存在は、広範囲のプロテアーゼ阻害剤、例えば本明細書に記載されるそれらを用いて、及び／又はプロテアーゼに対して特異的である剤、例えばプロテアーゼであるマトリプターゼに対して特異的であり、そしてマトリプターゼのタンパク質分解活性を阻害する抗体、例えばA11を用いることにより確認され得る；例えば、国際公開番号第WO2010/129609号

50

(2010年11月11日に公開された)を参照のこと。広範囲のプロテアーゼ阻害剤、例えば本明細書に記載されるそれらを使用し、及び/又はより選択的な阻害剤を使用する同じアプローチが、活性化可能抗体のCMに対して特異的なプロテアーゼ又はプロテアーゼの種類を同定するために使用され得る。いくつかの実施形態において、標的の存在は、標的、例えば別の抗体に対して特異的である剤を用いて確認され得、又は検出可能標識が、標識されていない標的と比較され得る。いくつかの実施形態において、標識されていない活性化可能抗体が、標識された二次抗体又はより複雑な検出システムによる検出を伴って、使用され得る。

【0558】

類似する技法がまた、対象、例えば哺乳類、例えばヒトにおける蛍光シグナルの検出が、疾患部位が標的を含み、そして活性化可能抗体のCMに対して特異的である、プロテアーゼを含むことを示唆する、インビボイメージングのためにも有用である。

【0559】

それらの技法はまた、活性化可能抗体におけるプロテアーゼ - 特異的CMに基づいて、種々の細胞、組織及び生物におけるプロテアーゼの検出、同定又は特徴化のために、キットにおいて、及び/又は試薬としても有用である。

【0560】

いくつかの実施形態において、インサイチュイメージング及び/又はインビボイメージングは、治療する患者を同定する方法において有用である。例えば、インサイチュイメージングによれば、活性化可能抗体は、適切な位置で、例えば腫瘍部位で、適切なプロテアーゼ及び標的を有するそれらの患者を同定するために、患者サンプルをスクリーニングするために使用される。

【0561】

いくつかの実施形態において、インサイチュイメージングが、本開示の活性化可能抗体による治療のために適切な患者集団を同定するか、又は他方では、細分するために使用される。例えば、標的、及び試験される活性化可能抗体の切断可能部分(CM)(例えば、疾患部位で活性化抗体を蓄積する)における基質を切断するプロテアーゼの両者に対して陽性の患者が、斯かるCMを含む活性化可能抗体による治療のための適切な候補として同定される。同様に、標的、及びそれらの方法を用いて試験される活性化可能抗体中のCMにおいて基質を切断するプロテアーゼのいずれか又は両者に対して陰性の患者が、別の形の療法のための適切な候補として同定される(すなわち、試験されている活性化可能抗体を用いた処置に好適でない)。いくつかの実施形態において、第1の活性化可能抗体に関して陰性のそのような患者は、治療のための適切な活性化可能抗体(例えば、疾患の部位で患者により切断されるCMを含む活性化可能抗体)が同定されるまで、異なったCMを含む他の活性化可能抗体により試験され得る。

【0562】

いくつかの実施形態において、インビボイメージングは、本開示の活性化可能抗体による治療のために適切な患者集団を同定するか又は細分するために使用される。例えば、標的、及び試験される活性化可能抗体の切断可能部分(CM)(例えば、疾患部位で活性化抗体を蓄積する)における基質を切断するプロテアーゼの両者に対して陽性の患者が、斯かるCMを含む斯かる活性化可能抗体による治療のための適切な候補として同定される。同様に、陰性の患者が、別の形の療法(すなわち、試験される活性化可能抗体による治療のためには適切でない)のための適切な候補として同定される(すなわち、試験されている活性化可能抗体を用いた処置に好適でない)。いくつかの実施形態において、第1の活性化可能抗体に関して陰性のそのような患者は、治療のための適切な活性化可能抗体(例えば、疾患の部位で患者により切断されるCMを含む活性化可能抗体)が同定されるまで、異なったCMを含む他の活性化可能抗体により試験され得る。

医薬組成物

【0563】

本開示の複合抗体、活性化可能抗体及び/又は複合活性化可能抗体(また「活性化化合物

10

20

30

40

50



」として、本明細書において言及される)、その誘導体、フラグメント、類似体及び相同志体は、投与のために適切な医薬組成物中に組み込まれ得る。斯かる組成物は典型的には、複合抗体、活性化可能抗体及び/又は複合活性化可能抗体、並びに医薬的に許容し得る担体を含む。本明細書において使用される場合、用語「医薬的に許容し得る担体」とは、医薬投与に適合できる、いずれか及びすべての溶媒、分散媒体、コーティング、抗菌及び抗真菌剤、等張剤及び吸収遅延剤、及び同様のものを含むよう意図される。適切な担体は、参照により本明細書に組み込まれる、分野的標準参考テキストである、Remington's Pharmaceutical Sciencesの最新版に記載される。斯かる担体又は希釈剤の例は、水、生理食塩水、リンガー溶液、デキストロース液体、及び5%ヒト血清アルブミンを包含するが、但しそれらだけには限定されない。リボソーム及び非水性ビヒクル、例えば固定油がまた使用され得る。医薬敵活性物質のための斯かる媒体及び剤の使用は、周知である。いずれかの従来の媒体又は剤が活性化合物と不適合である限りを除いて、組成物へのそれらの使用が企画される。補助活性化合物もまた、組成物中に組み込まれ得る。

10

#### 【0564】

本開示の医薬組成物は、その意図される投与経路と適合できるよう処方される。投与経路の例は、非経口、例えば静脈内、皮内、皮下、経口(例えば、吸入)、経皮(すなわち、局所)、経粘膜、及び直腸投与を包含する。非経口、皮内又は皮下適用のために使用される溶液又は懸濁液は次の成分を含むことができる:無菌希釈剤、例えば注射用蒸留水、生理食塩水溶液、固定油、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又は他の合成溶媒;抗菌剤、例えばベンジルアルコール又はメチルパラベン;酸化防止剤、例えばアスコルビン酸又は亜硫酸水素ナトリウム;キレート剤、例えばエチレンジアミン四酢酸(EDTA);緩衝液、例えば酢酸塩、クエン酸塩又はリン酸塩及び張性の調整のための剤、例えば塩化ナトリウム又はデキストロース。pHは、酸又は塩基、例えば塩酸又は水酸化ナトリウムにより調節され得る。非経口製剤は、アンプル、使い捨て注射器、又はガラス又はプラスチック製の複数用量バイアル中に封入され得る。

20

#### 【0565】

注射使用に適した医薬組成物は、無菌注射用溶液又は分散液の即時調整のための無菌水溶液(ここで、水溶性)又は分散液、及び無菌粉末を含む。静脈内投与に関しては、適切な担体は、生理食塩水、静菌水、Cremophor EL(登録商標)(BASF, Parsippany, N.J.)又はリン酸緩衝生理食塩水(PBS)を含む。すべての場合、組成物は、無菌であるべきであり、そして容易な注射針通過性が存在する程度に流動する必要がある。それは、製造及び貯蔵の条件下で安定性でなければならず、そして微生物、例えば細菌及び真菌の汚染作用に対して保存されるべきである。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、及び同様のもの)、及びそれらの適切な混合物を含む溶媒又は分散性媒体であり得る。適切な流動性は、例えばコーティング、例えばレシチンの使用により、分散液の場合、必要とされる粒度の維持により、及び界面活性剤の使用により維持され得る。微生物の作用の防止は、種々の抗菌剤及び抗真菌剤、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、チメロサル及び同様のものにより達成され得る。いくつかの実施形態において、等張剤、例えば糖、ポリアルコール、例えばマニトール、ソルビトール、塩化ナトリウムを、組成物に含むことが望ましい。注射用組成物の持続吸収は、吸収を遅延する剤、例えばモノステアリン酸アルミニウム及びゼラチンを、組成物に含むことによりもたらされ得る。

30

40

#### 【0566】

無菌注射用溶液は、上記に列挙される1つの成分又は成分の組み合わせと共に、適切な溶媒に、必要とされる量の活性化合物を組み込むことにより、必要なら、続いて濾過殺菌により調製され得る。一般的に、分散液は、塩基性分散液媒体及び上記に列挙されるそれらからの必要とされる他の成分を含む無菌ビヒクル中に、活性化合物を組み込むことにより調製される。注射用溶液の調製のための無菌粉末の場合、調製方法は、活性成分の粉末、及び前もって無菌濾過された溶液からの任意の追加の所望する成分の粉末を生成する、

50

真空乾燥及び凍結乾燥である。

【0567】

経口組成物は一般的に、不活性希釈剤又は食用担体を含む。それらは、ゼラチンカプセルに封入されるか、又は錠剤に圧縮される。経口治療投与のためには、活性化合物が、賦形剤と共に組込まれ、そして錠剤、トローチ又はカプセルの形で使用され得る。経口組成物はまた、マウスウォッシュとしての使用のために流体担体を用いて調製され得、ここで流体担体中、化合物が経口適用され、うがいされ、そして吐き出されるか、又は飲み込まれる。医薬的に適用できる結合剤及び/又はアジュバント材料が、組成物の一部として含まれ得る。錠剤、-pill、カプセル、トローチ及び同様のものは、次の成分、又は類似する性質の化合物：結合剤、例えば微結晶性セルロース、トラガカントゴム又はゼラチン；賦形剤、例えば澱粉又はラクトース、崩壊剤、例えばアルギン酸、プリモゲル又はコーンスターチ；潤滑剤、例えばステアリン酸マグネシウム又はステロート（Sterotes）；流動促進剤、例えばコロイド状二酸化珪素；甘味剤、例えばスクロース又はサッカリン；又は風味剤、例えばペパーミント、サリチル酸メチル又はオレンジ香料、のいずれかを含むことができる。

10

【0568】

吸入による投与に関しては、化合物は、適切な推進剤、例えばガス、例えば二酸化炭素を含む加圧された容器又は分散器、又はネブライザーからエアロゾル噴霧の形で供給される。

【0569】

20

全身性投与はまた、経粘膜又は経皮手段によるものであっても良い。経粘膜又は経皮投与に関しては、浸透されるバリアに適切な浸透剤が製剤に使用される。斯かる浸透剤は一般的に周知であり、そして例えば、経粘膜投与のためには、界面活性剤、胆汁酸塩、及びフシジン酸誘導体を包含する。経粘膜投与は、鼻用スプレー又は坐剤の使用を通して達成され得る。経皮投与に関しては、活性化合物は、一般的に当業界において知られているように、軟膏、膏剤、ゲル又はクリーム中に処方される。

【0570】

化合物はまた、直腸供給のためには、坐剤（例えば、従来の坐剤基材、例えばココアバター及び他のグリセリドを含む）、又は保持浣腸の形で調製され得る。

【0571】

30

1つの実施形態において、活性化合物は、身体からの急速な排除に対して化合物を保護するであろう担体、例えば制御放出製剤、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により調製される。生分解性、生体適合性ポリマー、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及びポリ乳酸が使用され得る。斯かる製剤の調製方法は、当業者に明らかであろう。材料はまた、Alza Corporation and Nova Pharmaceuticals, Inc. から商業的に得られる。リボソーム懸濁液（ウイルス抗原に対するモノクローナル抗体により、感染された細胞に標的化されるリボソームを含む）はまた、医薬的に許容し得る担体としても使用され得る。それらは、米国特許第4,522,811号に記載されるように、当業者に知られている方法に従って調製され得る。

40

【0572】

容易な投与及び投薬量の均一性のために、投薬単位形で、経口又は非経口組成物を処方することが特に好都合である。投薬単位形とは、本明細書において使用される場合、治療される対象のために単位投与量として適した物理的に別個の単位を言及し；各単位は、必要とされる医薬担体と共に所望する治療効果を生成するために計算された所定量の活性化合物を含む。本開示の単位剤形の仕様は、活性化合物のユニーク特性及び達成される特定の治療効果、及び個人の治療のために活性化合物を配合する技術的に固有の制限により決定され、そしてそれらに直接的に依存する。

【0573】

医薬組成物は、投与についての説明書と共に、容器、パック又はディスペンサーに含ま

50

れ得る。

【0574】

本発明はさらに、次の実施例に記載されるが、それらは請求項に記載される本発明の範囲を限定されるものではない。

【実施例】

【0575】

実施例1．材料と方法

試薬と菌株：ストレプトアビジン複合化フィコエリトリン (SAPE) (Invitrogen, Life Technologies) を修飾せずに使用した。ヒトマトリプターゼ 1 (Research & Diagnostics Systems, Inc.) を修飾せずに使用した。ヒトプラスミン (Haematologic Technologies Inc.) を修飾せずに使用した。ヒト tPA (Molecular Innovations) を修飾せずに使用した。Mona (単球のアダプター) の SH3 ドメインに融合させた YPet を修飾せずに使用した。TBST (50 mM の Tris HCl、150 mM の NaCl、0.05 % の Tween 20、pH 7.4) を使用した。E. コリ (E. coli) MC1061 (Casadaban et al., JMB 138(2):179-207 (1980)) を使用した。すべての細菌増殖を、別の抗生物質を指定しない限り 34 µg / mL のクロラムフェニコールを補った LB 培地 (LB) 中で激しく振盪しながら、37 °C にて実施した。

【0576】

基質切断と足場安定性分析：スクリーニング及びクローン分析のために、一晚培養した物を、新鮮培地 (1 : 50) 中に希釈し、1.5 ~ 2 時間培養することによって継代培養した。各継代培養物を、次に、0.04 % のアラビノースによって誘導し、振盪しながら 37 °C にて 1 時間インキュベートした。更なる増殖を停止するために、細胞を氷上で 15 ~ 30 分間インキュベートした。細胞アリコートを集菌し、PBS (pH 7.4) で洗浄した。細胞を遠心分離によってペレット化し、上清を除去し、そして細胞を酵素含有反応バッファー中に再懸濁した；反応混合物を 37 °C にて動かさずインキュベートした。反応を停止するために、細胞を取り出し、PBS 中に 10 倍に希釈し、遠心分離によってペレット化し、そして、SAPE (µg / mL の 20 mL) 又は YPet-Mona (50 nM) のいずれかを含んでいる PBS 中に再懸濁した。氷上におけるインキュベーション (30 分間) 後に、細胞を PBS で洗浄し、FACS Aria (商標) セルソーターを使用して分析した。

【0577】

プロテアーゼ切断アッセイのために、培養物を 1 時間誘導した。マトリプターゼ 1 のための反応バッファーは TBST であった。マトリプターゼ 1 加水分解に関するアッセイを、1 時間の 200 pM ~ 200 nM のマトリプターゼ 1 を用いた反応後に実施した。指定した基質領域内に生じる加水分解を保証するために、基質部位に隣接する領域のバックグラウンド加水分解を各反応条件下で計測した (2013 年 8 月 9 日に出願され、2014 年 2 月 13 日に WO 2014 / 026136 として公開された PCT 特許出願第 PCT / US 13 / 54378 号に記載のプラットフォーム eCLIPS 3.0 NSUB \_\_SP を使用した)。

【0578】

ヒトプラスミン安定性分析のために、プラットフォーム eCLIPS 3.0 NSUB \_\_SP を使用した；培養物を 1 時間誘導した。プラスミンのための反応バッファーは、100 mM の NaCl、0.01 % の Tween 20、及び 1 mM の EDTA を補った 50 mM の Tris HCl pH 7.5 であった。プラスミン加水分解のためのアッセイを、プラスミンを用いた反応の 1 時間後に実施した。

【0579】

ヒト tPA 安定性分析のために、プラットフォーム eCLIPS 3.0 NSUB \_\_SP を使用した；培養物を 1 時間誘導した。tPA のための反応バッファーは TBST であった。tPA 加水分解のためのアッセイを、tPA を用いた反応の 1 時間後に実施した。

【0580】

アミノ及びカルボキシ末端の標識条件：ストレプトアビジン複合化フィコエリトリン（S A P E）を、C P XのN末端でストレプトアビジン結合親和性リガンドを標識するために使用した。M o n aのS H 3ドメインに融合した蛍光タンパク質Y P e tを、C P XのC末端でM o n a結合親和性リガンドを標識するために使用した。プロテアーゼ反応のない細胞の最適な標識のために、細胞をS A P E（20 μg / mL）又はY P e t M o n a（50 nM）と共に4 にて30分間インキュベートした。

【0581】

反応速度データ分析：細胞表面提示ペプチド基質の変換の程度を、プロテアーゼ処理によるクローン細胞集団の平均蛍光における変化を計測するためにフローサイトメトリーを使用して直接計測した。具体的には、各サンプルに関して、変換を、以下の相関関係を使用したフローサイトメトリー分析によって決定した：

10

【0582】

【数1】

$$\text{変換} = \frac{FL_{-} - FL_{+}}{FL_{-} - FL_0} \quad [1]$$

【0583】

20

ここで、（FL<sub>-</sub>）は酵素なしインキュベーション後の蛍光であり、（FL<sub>+</sub>）は酵素ありインキュベーション後の蛍光であり、及び（FL<sub>0</sub>）は非標識細胞の蛍光である。予想される使用基質濃度が、標的プロテアーゼ（target protease）のための基質の予想されるK<sub>M</sub>を有意に下回ることを考慮して、ミカエリスメンテン（Michaelis-Menton）モデルを以下のように簡略化し：

【0584】

【数2】

$$\frac{d[S]}{dt} \approx -\frac{k_{cat}}{k_M} [S][E] \quad [2]$$

30

【0585】

そして、基質の変換を以下のように表現できる：

【0586】

【数3】

$$\text{変換} = 1 - \exp\left(-\frac{k_{cat}}{k_M} \cdot [E] \cdot t\right) \quad [3]$$

40

【0587】

ここで、[S]は基質濃度であり、[E]は酵素濃度であり、及びtは時間である。二次反応速度定数（k<sub>cat</sub> / K<sub>M</sub>）を決定するために、方程式[3]を簡略化した：

【0588】

【数 4】

$$\frac{kcat}{Km} = -\ln(1 - \text{生成物の変換}) / (\text{時間} * [\text{プロテアーゼ}])$$

【0589】

配列データ分析 メタモチーフ：基質を Ion Torrent (商標) 配列決定法に供した (例えば、Rothenberg, JM, Nature 475, 348-352 を参照のこと)。未処理の Ion 10  
Torrent 読み取り物を不変ベクター配列によって切り取り、可変ペプチド挿入物のみを得た。挿入配列を翻訳し、終止コドンのある配列を更なる分析から除外した。それぞれの配列の頻度は、観察したすべての実行可能なペプチド読み取り物から観察された回数によって得られた。配列の豊富さは、選択後のそれぞれの配列の観測頻度を選択前のそれぞれの配列の頻度と比較することによって得た。モチーフ分析を、すべての可能性のある 2mers、3mers、4mers、並びに非連続 1n2mers、2n1mers、2n2mers 及び 2nn2mers (ここで、最初の数字が第1の不変位置を表し、2番目の数字が第2の不変位置を表し、そして間の n の数が2つの不変位置の間にある可変位置の数を表す) を抽出することによって実施した。それぞれのモチーフの頻度は、選択前及び選択後ライブラリの両方ですべての標準化配列にわたって確立されて、それぞれの 20  
モチーフの豊富さの有意性を確立している。メタモチーフを作り出すために、各モチーフを含むすべての配列を整列し、そして、モチーフ担体内の各位置におけるアミノ酸傾向を表している位置加重行列 (Positional Weight Matrix) (PWM) を作成した。プロファイル プロファイル整列及びスコアリングを、それぞれのプロファイル プロファイル整列レジスタをスコア化するための最小相互情報量 (Minimum Mutual Information Content) (MMIC) スコア関数を使用して、すべてのモチーフにわたって実施した。有意である場合には、独特の形成 PWM から成る不正確なレジスタのバックグラウンドを先に整列したレジスタを抽出し；次に、個々の PWM を加え、平均メタモチーフを作成した。

【0590】

配列データ分析 定方向ファミリー：最終的な基質プールを Ion Torrent (商標) 配列決定法を使用して配列決定した。個々の配列を同定し、これらのデータから単離し、そして、配列を CLC main lab (CLC メインワークベンチ 6.6.2、オンラインで入手可能) により整列した。整列ファイルを Jalview にインポートし (例えば Waterhouse, A.M., et al., 2009, Bioinformatics 9, 1189-1191 を参照のこと)、平均距離系統樹を BLOSUM 62 アルゴリズムを使用して構築した (S Henikoff Set al., 1992, Proc Natl Acad Sci U S A. 89, 10915-10919)。制限される配列の基としては、着目の配列に最も近いクラスタ部材が挙げられる。伸長される配列の基としては、(適切である場合に) 最も近い共通祖先を共有する分岐を追加する配列が挙げられる。

【0591】

実施例 2 . プラットフォーム足場内の基質プールの選択と特徴づけ

細胞全体におけるマルチコピー基質ディスプレイの使用はマトリプターゼ 1 によって切断される基質集団の選択を可能にした。組み換えヒトマトリプターゼ 1 を使用した選択を、2010年2月23日に交付された米国特許第 7,666,817 B 号に記載のとおり実施した。(プラットフォーム eCLIP 3.0 NSUB\_\_SP を使用した) 基質部位に隣接する領域のバックグラウンド加水分解を、各反応条件下で計測して、指定された基質領域において起こる加水分解を保証した。最終的なプールを、マトリプターゼ 1、プラスミン、及び tPA に対して試験した。該プールは、マトリプターゼ 1 によって切断されたが、tPA 又はプラスミンによって切断されなかった。図 1 は、TBS-T 中のマトリプターゼ 1 によるプール SMP 30 の切断を示し、図 2 は、共に TBS-T 中、プール SMP 17 に関する 50 nM のマトリプターゼ 1 による切断、及び tPA に対 40  
50

する抵抗性を示す。同様の技術を使用して、別のライブラリをスクリーニングして、マトリプターゼ 1 と u プラスミノゲン活性化因子の両方で切断されるが、t P A 又はプラスミンによって切断されない基質を選択した。

#### 【0592】

実施例 3 . プラットフォーム足場における基質切断反応速度の特徴づけ

細胞全体におけるマルチコピー基質ディスプレイの使用は切断反応速度の簡単で直接的な定量的特徴づけを可能にした。その結果、フローサイトメトリーを、基質変換に基づいて個々の単離クローンを格付けするのに使用し、そしてクローンを DNA 配列決定によって同定した。このようにして、各クローンに関する変換の程度を、いくつかの異なったプロテアーゼ濃度にて測定し、そして、ミカエリスメンテンモデル（反応速度データ分析の項）に当てはめることができる。観察した二次反応速度定数（ $k_{cat} / K_M$ ）を各基質対マトリプターゼ 1 に関して決定した。（プラットフォーム e C L i P S 3 . 0 N S U B \_ S P を使用した）基質に隣接する領域のバックグラウンド加水分解を各反応条件下で計測して、指定された基質領域において起こる加水分解を保証した。例えば、図 3 は、T B S T 中、マトリプターゼ 1 によるアミノ酸配列 V A G R S M R P を含む基質の切断を示す。

#### 【0593】

実施例 4 . 活性化可能抗体のインビトロ基質活性

この実施例は、本開示の基質に関して、それらが活性化可能抗体内に組み込まれた場合のインビトロにおける活性を実証する。

#### 【0594】

これらの試験で同定したいいくつかの基質を、3954 マスクを有する P r o b o d i e s 及び（P C T 公開番号 W O 2 0 1 3 / 1 6 3 6 3 1 に記載の）セツキシマブの C 2 2 5 v 5 バリエーションに挿入した。前記文献の全体を参照により本明細書中に援用する。

#### 【0595】

得られた活性化可能抗体内の基質がマトリプターゼ 1 又は u P A によって切断される能力を次のようにして測定した。すべてのプロテアーゼ消化を、50 mM の T r i s H C l 、150 mM の N a C l 、0 . 0 5 % の T w e e n 2 0 、p H = 7 . 4 中で実施した。様々な濃度の活性部位滴定 u P A 又はマトリプターゼを、一定の活性化可能抗体濃度と組み合わせて、少なくとも 50 の基質対プロテアーゼ比を維持した。サンプルを、37 にて最長 20 時間インキュベートした。反応を止めるために、5  $\mu$  l の消化産物を、20 mM の 2 -メルカプトエタノールを含んでいる HT Protein Express Sample Buffer (Caliper LifeSciences) 7  $\mu$  l に加え、95 にて 10 分間加熱した。熱変性後、32  $\mu$  l の d d H <sub>2</sub> O を加え、サンプルを製造業者の取扱説明書により LabChip GXII で分析した。LabChip GXII ソフトウェアを使用して、軽鎖ピーク面積を定量化した。生成物変換を、以下の方程式：切断 LC / (切断 LC + 非切断 LC)、LC = 軽鎖、に軽鎖ピーク面積を代入することによって計算した。 $k_{cat} / K_M$  値を、以下の方程式を用いて決定した：

#### 【0596】

【数 5】

$$\frac{k_{cat}}{K_m} = -\ln(1 - C)/(t * p)$$

#### 【0597】

ここで、C は生成物変換であり、t は時間であり、及び p はプロテアーゼ濃度 (M) であって、基質濃度が  $K_m$  を下回っており、且つ、プロテアーゼ濃度を超過していると仮定する。

#### 【0598】

u P A 及びマトリプターゼによる切断のために選択される基質を含んでいる得られた活

性化可能抗体は、u P A に関して約  $400 \sim 5,000 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ 、及びマトリプターゼに関して約  $3,000 \sim 100,000 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  の範囲の  $k_{\text{cat}} / K_{\text{M}}$  値を有した（試験した7つの基質）。

マトリプターゼによる切断のために選択される基質を含んでいる得られた活性化可能抗体は、マトリプターゼに関して約  $6,500 \sim 100,000 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  の範囲の  $k_{\text{cat}} / K_{\text{M}}$  値を有した（試験した5つの基質）。

【0599】

実施例5．インビボにおける活性化可能抗体の基質の安定性

この実施例は、本開示の基質に関して、それらが活性化可能抗体に組み込まれて、マウスに注入された場合のインビボにおける安定性を実証する。

10

【0600】

先に記載したように製造した、本開示のいくつかの基質を含む活性化可能抗体を、標準的なNHSエステル化学反応を使用してA l e x a F l u o r 6 8 0 又はD y l i g h t 6 8 0 のいずれかをを用いて標識した。未反応の色素を、Z e b a スピン脱塩カラム（40 k D a M W C O、ThermoFisher）を用いた精製によって取り除いた。タンパク質濃度を、タンパク質配列及び色素吸収度を考慮した修正係数から計算した吸光係数を使用してA<sub>280</sub>によって測定した。

【0601】

3匹のヌードマウス（C r l : N U F o x n l n u ）には、0日目に10mg / kg 又は12.5mg / kg にて単回I P 用量の各活性化可能抗体を与えた。マウスを4日目（投与後約96時間）にC O<sub>2</sub> 窒息によって安楽死させ、そして、血液を血漿 E D T A としてすぐに採取し、-80℃にて保存した。

20

【0602】

血漿サンプルを、 $k_{\text{cat}} / K_{\text{M}}$  の項に記載の毛細管電気泳動による分析のために調製した。簡単に言えば、5µlの血漿を2×メルカプトエタノールを含むProtein Express Sample Buffer 7µlに加えた。循環安定性の定量は、生成物変換の定量と同一であった。

【0603】

u P A 又はマトリプターゼによる切断のために選択される本開示の基質を含んでいる14個の活性化可能抗体のうち、13個が採取した血漿サンプルにおいて20%未満の切断を呈した。

30

【0604】

実施例6．材料と方法

試薬と菌株：ヒトu P A（カタログ番号1310 SE、Research & Diagnostics Systems, Inc.）を修飾せずに使用した。ヒトマトリプターゼ 1（カタログ番号3946 SE、Research & Diagnostics Systems, Inc.）を修飾せずに使用した。ヒトt P A（カタログ番号H T P A T C、Molecular Innovations）を修飾せずに使用した。ヒトプラスミン（カタログ番号H C P M 0140、Haematologic Technologies Inc.）を修飾せずに使用した。抗E Eモノクローナル抗体（Covance, Princeton, NJ）をA l e x a 6 4 7（Life Sciences）で標識し、他に修飾せずに使用した（E E 6 4 7と名付けた）。E . コリM C 1 0 6 1 又はM C 1 0 6 1 誘導菌株（D H 1 0 ）をすべての実験に使用した（Casadaban et al., JMB 138(2):179-207 (1980)）。すべての細菌増殖を、別の抗生物質を指定しない限り、34µg / mLのクロラムフェニコール（cm）を補ったLB培地（LB）中で激しく振盪しながら37℃にて実施した。

40

【0605】

ディスプレイプラットフォーム：本実施形態の8～12アミノ酸基質を含むようにそれぞれ設計したディスプレイプラットフォームを、2014年2月13日に公開された国際公開番号W O 2 0 1 4 / 0 2 6 1 3 6 に記載のとおり作製し、そして、使用した。前記文献の全体を参照により本明細書中に援用する。成熟（すなわち、シグナルペプチドなし）C Y T X D P X X X X X X X Xディスプレイプラットフォーム（配列番号694）の

50

アミノ酸配列を図4Aに示す。XXXXXXXXXXは、各基質がその中に挿入される位置を示す。CYTX DP XXXXXXXXXXXXディスプレイプラットフォームのアミノ酸配列はまた、そのシグナルペプチドも含んでいる、すなわち、SP CYTX DP XXXXXXXXXXXXディスプレイプラットフォーム（配列番号695）を図4Bに示す。

CYTX DP XXXXXXXXXXXXディスプレイプラットフォーム：

GQSGQEYMPMEGGSGQXXXXXXXXXSGGQGGSGGSGGSGGSAYYGITAGPAYRINDWASIYGVVGVGYGSGPGGSYGF  
SYGAGLQFNPMENVALDFSIEQSRIRSVDVGTWILSVGYRFGSKSRRATSTVTGGYAQSDAQGMNKMGGFNLKYRYEED  
NSPLGVIGSFTYTGGSGGSSGQAAAGHHHHHHHHH（配列番号694）

SP CYTX DP XXXXXXXXXXXXディスプレイプラットフォーム：

MKKIACLSALAAVLAFTAGTSVAGQSGQEYMPMEGGSGQXXXXXXXXXSGGQGGSGGSGGSGGSAYYGITAGPAYRIN  
DWASIYGVVGVGYGSGPGGSYGFSGAGLQFNPMENVALDFSIEQSRIRSVDVGTWILSVGYRFGSKSRRATSTVTGGYA  
QSDAQGMNKMGGFNLKYRYEEDNSPLGVIGSFTYTGGSGGSSGQAAAGHHHHHHHHH（配列番号695）

#### 【0606】

基質切断と足場安定性分析：クローン分析のために、一晚培養した物を、新鮮培地（1：40）中に希釈し、1.5～2時間培養することによって継代培養した。継代培養物を、次に、0.04%のアラビノースによって誘導し、振盪しながら37℃にて40分から1時間インキュベートした。更なる増殖を停止するために、次に、細胞を氷上で15～1時間インキュベートした。細胞アリコートを集菌し、反応バッファーで洗浄した。細胞を遠心分離によってペレット化し、上清を除去し、そして細胞を酵素含有反応バッファー中に再懸濁した；反応混合物を37℃にて振盪しながらインキュベートした。反応を停止するために、細胞を取り出し、PBS中に10倍に希釈し、遠心分離によってペレット化し、そして、抗EE647（1mlあたり20マイクログラム（本明細書中では $\mu\text{g}/\text{ml}$ 又は $\mu\text{g}/\text{ml}$ とも言及される））を含んでいるPBS中に再懸濁した。氷上におけるインキュベーション（最長1時間）後に、細胞をPBSで洗浄し、Accuri C6セルソーターを使用して分析した。

#### 【0607】

uPAプロテアーゼ切断アッセイのために、培養物を40分間～1時間誘導した。uPAのための反応バッファーは、50mMのTris HCl、150mMのNaCl、0.05%のTween 20、pH 7.4（TBST）であった。uPA加水分解に関するアッセイを、2nM～50nMのuPAを用いた1時間の切断後に実施した。指定した基質領域内に起こる加水分解を保証するために、（「基質」が非切断可能リンカーGGGSGGGGS（配列番号696）であるディスプレイプラットフォーム、例えば、CYTX DP NSUBを使用した）基質部位に隣接する領域のバックグラウンド加水分解を各反応条件下で計測した。

#### 【0608】

マトリプターゼ 1プロテアーゼ切断アッセイのために、培養物を40分間～1時間誘導した。マトリプターゼ 1のための反応バッファーは、50mMのTris HCl、150mMのNaCl、0.05%のTween 20、pH 7.4（TBST）であった。マトリプターゼ 1加水分解に関するアッセイを、2nM～50nMのマトリプターゼ 1を用いた1時間の切断後に実施した。指定した基質領域内に起こる加水分解を保証するために、（例えば、CYTX DP NSUBを使用した）基質部位に隣接する領域のバックグラウンド加水分解を各反応条件下で計測した。

#### 【0609】

ヒトプラスミンプロテアーゼ切断アッセイのために、培養物を40分間～1時間誘導した。プラスミンのための反応バッファーは、100mMのNaCl、0.01%のTween 20、及び1mMのEDTAを補った50mMのTris HCl pH 7.5であった。プラスミン加水分解に関するアッセイを、20～500pMのプラスミンを用いた1時間の切断後に実施した。指定した基質領域内に起こる加水分解を保証するために、（例えば、CYTX DP NSUBを使用した）基質部位に隣接する領域のバックグラウンド加水分解を各反応条件下で計測した。



## 【 0 6 1 0 】

t P A プロテアーゼ切断アッセイのために、培養物を 4 0 分間 ~ 1 時間誘導した。t P A のための反応バッファは、5 0 m M の T r i s H C l 、1 5 0 m M の N a C l 、0 . 0 5 % の T w e e n 2 0 、p H 7 . 4 ( T B S T ) であった。t P A 加水分解に関するアッセイを、2 n M ~ 5 0 n M の t P A を用いた 1 時間の切断後に実施した。指定した基質領域内に起こる加水分解を保証するために、(例えば、C Y T X D P N S U B を使用した) 基質部位に隣接する領域のバックグラウンド加水分解を各反応条件下で計測した。

## 【 0 6 1 1 】

アミノ末端及びカルボキシル末端の標識条件：A l e x a 6 4 7 複合抗 E E 抗体 ( E E 6 4 7 ) を、C Y T X D P X X X X X X X X ディスプレイプラットフォームの N 末端の E E 結合親和性リガンドを標識するのに使用した。A l e x a 6 4 7 複合抗 H i s 抗体 ( H i s 6 4 7 ) を、C Y T X D P X X X X X X X X ディスプレイプラットフォームの C 末端の 8 H i s 結合親和性リガンドを標識するのに使用した。プロテアーゼ反応のない細胞の最適な標識のために、細胞を E E 6 4 7 ( 1 μ g / m L ) 又は H i s 6 4 7 ( 2 μ g / m l ) と共に 4 にて 1 時間インキュベートした。以下で記載した実施例のために、1 時間のインキュベーションを使用した。

## 【 0 6 1 2 】

反応速度データ分析：細胞表面提示ペプチド基質の変換の程度を、プロテアーゼ処理によるクローン細胞集団の平均蛍光の変化を計測するためのフローサイトメトリーを使用して直接計測した。具体的には、各サンプルに関して、変換を、以下の相関関係を使用したフローサイトメトリー分析によって決定した：

## 【 0 6 1 3 】

【数 6】

$$\text{変換}_{\text{CLIPS}} = \frac{FL_- - FL_+}{FL_- - FL_0} \quad [1]$$

## 【 0 6 1 4 】

ここで、( F L \_ ) は酵素なしインキュベーション後の蛍光であり、( F L \_ + ) は酵素ありインキュベーション後の蛍光であり、及び ( F L \_ 0 ) は非標識細胞の蛍光である。予想される使用基質濃度が、標的プロテアーゼのための基質の予想される K<sub>M</sub> を有意に下回ることを考慮して、ミカエリスメンテンモデルを以下のように簡略化し：

## 【 0 6 1 5 】

【数 7】

$$\frac{d[S]}{dt} \approx - \frac{k_{\text{cat}}}{k_M} [S][E] \quad [2]$$

## 【 0 6 1 6 】

そして、基質の変換を以下のように表現できる：

## 【 0 6 1 7 】

【数 8】

$$\text{変換}_{\text{MM}} = 1 - \exp\left(-\frac{k_{\text{cat}}}{k_{\text{M}}}[\text{E}] \cdot t\right) \quad [3]$$

【0618】

ここで、[S]は基質濃度であり、[E]は酵素濃度であり、及びtは時間である。二次反応速度定数( $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ )を決定するために、各基質に関する経時的変換を方程式[3]に当てはめた。

10

【0619】

実施例7. CYTX DPディスプレイプラットフォームにおける基質切断性の特徴づけ  
この実施例は、本実施形態の基質がマトリプターゼ及び/又はuPAによって切断されるが、プラスミン及び/又はtPAによって切断されない能力を実証する。

【0620】

細胞全体におけるマルチコピー基質ディスプレイの使用は、切断反応速度の簡単で直接的な定量的特徴づけを可能にした。基質をコードするクローンを、DNA配列決定によって同定し、そして、CYTX DP XXXXXXディスプレイプラットフォーム内に、発現されたディスプレイプラットフォームがXXXXXXXXXの位置に基質(典型的には8又は12アミノ酸)を含むようにサブクローニングした。個々の基質提示クローン(合計で148の独立した基質含有ディスプレイプラットフォーム)を、マトリプターゼ及び/又はuPA(標的プロテアーゼ、すなわち、基質を選択するのに使用するプロテアーゼ)及びプラスミン及び/又はtPA(標的外プロテアーゼ(off-target protease))による切断について評価した;フローサイトメトリーによって代謝回転を測定した。51個の基質を、マトリプターゼ及びuPAの両方による切断のために選択する(すなわち、マトリプターゼ及びuPA選択基質)。プールからの28個のマトリプターゼ及びuPA選択基質を、配列番号308、314、及び361のアミノ酸配列を含む基質と同じプールから、並びに配列番号369~371、374~379、及び381~384のアミノ酸配列を含む基質から選択する。23個のマトリプターゼ及びuPA選択コンセンサス基質を、配列番号307~311、313~314、及び320~368のアミノ酸配列を含む基質から選択する。

20

30

【0621】

97個の基質を、マトリプターゼによる切断のために選択する(すなわち、マトリプターゼ選択基質)。プールからの52個のマトリプターゼ選択基質を、表8A~8J及び表9A~9Jの3の基質から、並びに配列番号250~267のアミノ酸配列を含む基質から選択する。45個のマトリプターゼ選択コンセンサス基質を、配列番号163~249のアミノ酸配列を含む基質から選択する。

【0622】

40

このように、各クローンに関する切断の程度を決定でき、そして、標的プロテアーゼによって切断され、そして、データを集めて、標的外プロテアーゼによって切断されなかったクローンのパーセントを決定した。(例えば、CYTX DP NSUBディスプレイプラットフォームを使用した)基質部位に隣接する領域のバックグラウンド加水分解を、各反応条件下で計測して、指定された基質領域において起こる加水分解を保証した。結果を表12に示す。

【0623】

【表 5 4】

表 1 2 : 基質切断性の要約統計量

発見の成果	基質群	50 nMの マトリプターゼ-1又は 50 nMのuPAを用いて>20%の切断	50 nMの uPAを用いて>20%の切断	50 nMのマトリプターゼ-1を用いて >20%の切断	500 pM のプラスミン又は50 nMのtPAを用いて <20%の切断	500 pM のプラスミンを用いて <20%の切断	50 nMの tPAを用いて<20%の切断
マトリプターゼ及びuPA選択基質	試験したすべてのマトリプターゼ及びuPA選択基質	100% (51 / 51)	78% (40 / 51)	75% (38 / 51)	76% (39 / 51)	76% (39 / 51)	96% (49 / 51)
	プールからの基質	100% (28 / 28)	64% (18 / 28)	89% (25 / 28)	89% (25 / 28)	89% (25 / 28)	93% (26 / 28)
	コンセンサス基質	100% (23 / 23)	96% (22 / 23)	57% (13 / 23)	61% (14 / 23)	61% (14 / 23)	100% (23 / 23)
マトリプターゼ選択基質	すべてのマトリプターゼ選択基質	86% (83 / 97)	41% (40 / 97)	67% (65 / 97)	70% (68 / 97)	82% (80 / 97)	85% (82 / 97)
	プールからの基質	81% (42 / 52)	35% (18 / 52)	62% (32 / 52)	81% (42 / 52)	94% (49 / 52)	87% (45 / 52)
	コンセンサス基質	91% (41 / 45)	49% (22 / 45)	73% (33 / 45)	58% (26 / 45)	69% (31 / 45)	82% (37 / 45)
マトリプターゼ及び／又はuPAによる切断のために選択された混合基質	合計	91% (134 / 148)	54% (80 / 148)	70% (103 / 148)	72% (107 / 148)	80% (119 / 148)	89% (131 / 148)

## 【0624】

表 1 2 は、C Y T X D Pディスプレイプラットフォームにおいて試験したマトリプターゼ及びuPA選択基質又はマトリプターゼ選択基質のパーセンテージを示しており、(a) 50 mMのT r i s H C l、150 mMのN a C l、0.05% T w e e n 20、pH 7.4 (T B S T) 中で37 にて1時間、修飾なしで使用される50 nMのヒトuPA (カタログ番号1310 SE、Research & Diagnostics Systems, Inc.) と共にインキュベートしたとき、20%超の切断を呈し(50 nMのuPAを用いて>20%の切断); (b) 50 mMのT r i s H C l、150 mMのN a C l、0.05%のT w e e n 20、pH 7.4 (T B S T) 中で37 にて1時間、修飾なしで使用される50 nMのヒトマトリプターゼ 1 (カタログ番号3946 SE、Research & Diagnostics Systems, Inc.) と共にインキュベートしたとき、20%超の切断を呈し(50 nMのマトリプターゼ 1を用いて>20%の切断); (c) 100 mMのN a C l、0.01%のT w e e n 20、及び1 mMのE D T Aを補った50 mMのT r i s H C l pH 7.5 中で37 にて1時間、修飾なしで使用される500 pMのヒトプラスミン (カタログ番号H C P M 0140、Haematologic Technologies, Inc.) と共にインキュベートしたとき、20%未満の切断を呈し(500 pMのプラスミンを用いて<20%の切断); 並

びに (d) 50 mM の Tris HCl、150 mM の NaCl、0.05% の Tween 20、pH 7.4 (TBST) 中で 37 °C にて 1 時間、修飾なしで使用される 50 nM の Hit PA (カタログ番号 HTPA TC、Molecular Innovations) と共にインキュベートしたとき、20% 未満の切断を呈した (50 nM の tPA を用いて < 20% の切断)。

【0625】

実施例 8 . CYTX DP ディスプレイプラットフォームにおける基質切断反応速度の特徴づけ

この実施例は、本実施形態の様々な基質に関する切断反応速度を実証する。

【0626】

細胞全体におけるマルチコピー基質ディスプレイの使用は、切断反応速度の簡単で直接的な定量的特徴づけを可能にした。本明細書中に記載したように、クローンを DNA 配列決定によって同定し、そして、CYTX DP XXXXXXXX ディスプレイプラットフォーム内にサブクローニングした。90 個の個々の基質提示クローンを切断に関して評価し、そして、サブセットを選択して、該クローンの標的プロテアーゼによる切断反応速度を評価した。各クローンに関する変換の程度を、いくつかの異なったプロテアーゼ濃度にて測定し、そして、本明細書中に記載したミカエリスメンテンモデルに当てはめることができる。(例えば、CYTX DP NSUB を使用した) 基質部位に隣接する領域のバックグラウンド加水分解を各反応条件下で計測して、指定された基質領域において起こる加水分解を保証した。結果を表 13 及び表 14 に示す。

【0627】

【表 55】

表 13 : uPA 基質反応速度の要約統計量

発見の成果	uPA kcat/Km > 1x10E2	uPA kcat/Km > 1x10E3	uPA kcat/Km > 1x10E4
マトリプターゼ及び uPA 選択基質	100% (18 / 18)	100% (18 / 18)	50% (9 / 18)
マトリプターゼ選択基質	100% (16 / 16)	100% (16 / 16)	6% (1 / 16)
マトリプターゼ及び / 又は uPA に よって切断される 混合基質	100% (34 / 34)	100% (34 / 34)	29% (10 / 34)

【0628】

【表 56】

表 14 : マトリプターゼ - 1 基質反応速度の要約統計量

発見の成果	マトリプターゼ - 1 kcat/Km > 1x10E2	マトリプターゼ - 1 kcat/Km > 1x10E3	マトリプターゼ - 1 kcat/Km > 1x10E4
マトリプターゼ及び uPA 選択基質	100% (25 / 25)	100% (25 / 25)	16% (4 / 25)
マトリプターゼ選択基質	100% (31 / 31)	100% (31 / 31)	3% (1 / 31)
マトリプターゼ及び / 又は uPA に よって 切断される混合基質	100% (56 / 56)	100% (56 / 56)	9% (5 / 56)

## 【0629】

実施例9．マトリプターゼ及びノ又はuPAによって切断可能な基質を含んでいる活性化可能抗体のインビボにおける有効性とインサイチュにおける活性化

この実施例は、マトリプターゼ及びノ又はuPAによって切断可能である本実施形態の基質を含んでいる活性化可能抗体がインビボにおいて有効であることを実証する。この実施例はまた、斯かる活性化可能抗体が、2014年7月10日に公開された国際公開番号WO2014/107559に記載のものなどのインサイチュイメージングアッセイにおいて活性化可能であることも実証する。前記文献の全体を参照により本明細書中に援用する。

## 【0630】

10

マトリプターゼ及びノ又はuPAによって切断される本実施形態の異なった基質をそれぞれ含んでいる3つの活性化可能抗体を、H292異種移植腫瘍担持（肺癌）マウスに対して0日目に10mg/kgにて投与した。3つの活性化可能抗体のすべてはまた、アミノ酸配列CISPRGCPDGPYVMY（配列番号515）を含むマスキング部分、並びに軽鎖（配列番号458）及び重鎖（配列番号455）を含む抗EGFR抗体C225v5抗体も含んでいる。活性化可能抗体の軽鎖の立体配置は、C225v5のマスキング部分 基質 軽鎖であった。

## 【0631】

マウスを4日目（投与後約96時間）に後眼窩採血に供した。血液を、血漿 EDTAとしてすぐに採取し、そして、-80℃にて保存した。3つの活性化可能抗体を、磁性ビーズを使用した抗ヒトIgG免疫沈降反応によって血漿から精製した。毛細管電気泳動によって分析するために、5μlの溶出IgGを、20mMの2-メルカプトエタノールを含む7μlのProtein Express Sample Buffer（Caliper LifeSciences）に加え、95℃にて10分間加熱した。熱変性後に、32μlのddH<sub>2</sub>Oを加え、サンプルを製造業者の取扱説明書によりLabChip GXIIで分析した。LabChip GXIIソフトウェアを使用して、軽鎖ピーク面積を定量化した。生成物変換を、以下の方程式：切断LC / （切断LC + 非切断LC）、LC = 軽鎖ピーク面積、に軽鎖ピーク面積を代入することによって計算した。4日目の時点で、3つの活性化可能抗体は、13%～30%に及ぶ活性化値の平均%を実証した。活性化の平均%は、（（試験群の生成物変換の合計）×100%）/（試験群の動物数）として計算される。

20

30

## 【0632】

3つの活性化可能抗体は、阻害の平均%として計測した場合に、32%～59%に及ぶ腫瘍増殖阻害を実証した。阻害の平均%は、（平均（C）-平均（C0））-（平均（T）-平均（T0））/（平均（C）-平均（C0））×100% {式中、Tは現在の試験群値であり、T0は現在の試験群の初期値であり、Cは対照群値であり、及びC0は対照群の初期値である}として計算される。EGFR抗体のセツキシマブは、この試験で96%の阻害を実証した。

## 【0633】

同じ3つの活性化可能抗体を、WO2014/107559、前掲の実施例に記載の条件を使用して、マウス異種移植腫瘍組織のインサイチュイメージングアッセイに供した。3つの活性化可能抗体は活性化されて、そして、基質を切断し、放出された抗体が腫瘍組織のEGFRに結合したことを実証した。染色シグナルは、セツキシマブのIHCシグナル強度の15%～85%に及んだ。

40

## 【0634】

他の実施形態

本発明はその詳細な説明と共に記載されて来たが、前述の記載は例示的であり、添付の特許請求の範囲により定義される本発明の範囲を限定するものではない。他の態様、利点及び改変は、以下の範囲内である。





## フロントページの続き

(51)Int.Cl.

F I

C 1 2 P	21/08	(2006.01)	C 1 2 P	21/08	
C 1 2 N	1/15	(2006.01)	C 1 2 N	1/15	
C 1 2 N	1/19	(2006.01)	C 1 2 N	1/19	
C 1 2 N	1/21	(2006.01)	C 1 2 N	1/21	
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N	5/10	
A 6 1 K	47/68	(2017.01)	A 6 1 K	47/68	
A 6 1 K	39/395	(2006.01)	A 6 1 K	39/395	D
A 6 1 K	31/5365	(2006.01)	A 6 1 K	39/395	N
A 6 1 K	31/407	(2006.01)	A 6 1 K	31/5365	
A 6 1 K	31/4745	(2006.01)	A 6 1 K	31/407	
A 6 1 K	31/7036	(2006.01)	A 6 1 K	31/4745	
A 6 1 K	38/08	(2019.01)	A 6 1 K	31/7036	
A 6 1 K	49/00	(2006.01)	A 6 1 K	38/08	
			A 6 1 K	49/00	

(74)代理人 100117019

弁理士 渡辺 陽一

(74)代理人 100150810

弁理士 武居 良太郎

(74)代理人 100134784

弁理士 中村 和美

(72)発明者 スティーブン ジェイムズ ムーア

アメリカ合衆国, カリフォルニア 9 4 5 0 6 , ダンビル, カントリー メドーズ レーン 2 1 8

(72)発明者 マーガレット ティー ルー グエン

アメリカ合衆国, カリフォルニア 9 5 1 2 1 , サンノゼ, プサテリ ウェイ 1 1 7 6

(72)発明者 ダニエル アール・ホステッター

アメリカ合衆国, カリフォルニア 9 4 3 0 6 , パロ アルト, パーク ブールバード 3 9 0 9

(72)発明者 オルガ バジルジェバ

アメリカ合衆国, カリフォルニア 9 5 1 0 4 , クパチーノ, ロドリゲス アベニュー 2 0 0 8 0  
#ディー

審査官 星 功介

(56)参考文献 国際公開第 2 0 1 3 / 1 6 3 6 3 1 (WO, A 1)

特表 2 0 1 2 - 5 1 4 9 8 2 (JP, A)

米国特許出願公開第 2 0 1 4 / 0 0 2 3 6 6 4 (US, A 1)

The Journal of Biological Chemistry, 1998, Vol.273, No.30, pp.19190-19197

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 0 7 K 1 / 0 0 - 1 9 / 0 0

C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS  
(STN)